

Doku Mühendisliği ve Hücre Kültürü Kaynaklı Yeni Tedavi Seçenekleri

Gül ÖZBİLEN ACAR¹

¹ SB Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul

Özet

Doku mühendisliği/onarıcı tıp; tıp, biyoloji ve mühendisliği kapsayan multidisipliner bir alandır. Bu bilimsel devrim, doku ve organların yapısı ve fonksiyonlarının canlı hücrelerin kullanımı ile onarımını amaç edinmiştir. Hücre temelli terapilerle insan sağlığı ve yaşam kalitesinin düzeltilmesi için çalışılmaktadır. Ayrıca onarıcı tıp özellikle ilaç endüstrisindeki diagnostik uygulamaları da içermektedir. Bu yazıda, doku mühendisliği ve hücre-temelli tedaviler vurgulanmış ve dünya literatürü ışığı altında bu bilimsel gelişme tartışılmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Doku mühendisliği, hücre-temelli terapi, onarıcı tıp

Cerrahpaşa Tıp Derg 2007; 38: 32 - 39

Tissue Engineering and New Treatment Options Originated from Cell-culture

Abstract

Tissue engineering/regenerative medicine is multidisciplinary area including medicine, biology, and engineering. This scientific revolution aims restoration of tissue and organ structure or function with use of living cells. Human health and quality of the life are tried to improve by cell-based therapies. Apart from these, regenerative medicine has diagnostic applications especially involving drug industry. In this review, we focused on tissue engineering and cell-based therapies, and discussed this scientific progress in the light of world literature.

KeyWords: Tissue engineering, cell-based therapy, regenerative medicine

Cerrahpaşa J Med 2007; 38: 32 - 39

Doku mühendisliği, materyal biliminin, mühendisliğin, moleküler biyolojinin, temel ilke ve yöntemlerini uygulayarak, insan doku yapısının ve fonksiyonunun korunması, onarılması ve düzeltilmesini hedef alan bir bilim dalıdır. Tıp ve mühendisliğin bir arada olduğu bu bilim alanında, doku ve organların rejenerasyonu üç temel faktörün kullanılmasıyla gerçekleşmektedir. Bu faktörler, sırasıyla canlı hücreler, biyomateryaller (yapı iskeleti) ve biyomoleküllerdir (düzenleme faktörleri). Bu üç faktörle yapılan çalışmalar, araştırma yapan kişiler için büyük zorluklar taşımaktadır ve bu nedenle günümüzde yapılan klinik uygulamalar henüz bazı organ ve dokularla sınırlı kalmaktadır [1, 2].

Doku mühendisliğindeki temel prensip hücrelerin izolasyonu ve çoğaltılması, daha sonra sadece hücre veya biyomateryalin, çoğunlukla da her ikisinin kombinasyonu-

nunun tekrar implantasyonudur (Şekil 1) [3]. Hücrelerin direkt injeksiyonu, biyomateryal (yapı iskeleti) ile hücrelerin in situ veya in vitro ortamda kombine edilmesi ya da biyomateryalin tek başına implantasyonu ile çevredeki hücreler doku onarımı için yönlendirilirler. Doku mühendisliği ilk bakışta basit bir kavram gibi gözükse de, uygulamada pek çok zorluk içermektedir. Tablo 1'de doku mühendisliğinde karşılaşılan güçlükler özetlenmiştir [4].

BİYOLOJİ ALANINDAKİ BOZUKLUKLAR

Hücreler

Hücre kaynağının seçimi çok önemlidir. Kaynak olarak otolog hücreler (canlının kendisinden alınan hücreler), allojenik hücreler (farklı bir insandan alınan hücreler), ksenojenik hücreler (farklı bir canlıdan alınan hücreler) ve kök hücreler kullanılabilir. Allojenik ve ksenojenik kaynaklardan elde edilen hücrelerle ilgili olarak hastalarda immün sistemle ilgili ret cevapları oluşabilmektedir. Otolog hücreler en iyi seçim olarak görünse de, hastada infeksiyon, fistül ve deride skar oluşumu gibi donör saha morbiditeleri gelişebilmektedir. Yine donör

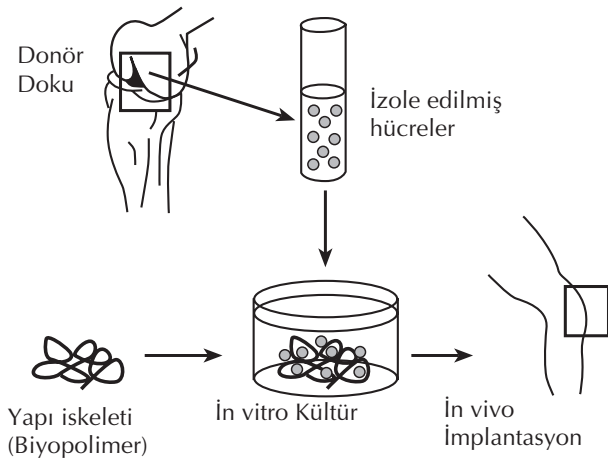
Alındığı Tarih: 8 Şubat 2007

Yazışma Adresi (Address): Uzm. Dr. Gül ÖZBİLEN ACAR
S.B. Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi
İstanbul

E-posta: gulozbilenacar@gmail.com

Tablo 1. Doku mühendisliği uygulamalarında karşılaşılan güçlükler.

Biyolojik sorunlar	Mühendislikteki zorluklar	Klinik zorluklar
Hücre kaynağı seçimi	Biyomateryalin seçimi	Yeni dokunun uygun şekil ve hacimde oluşturulması
Hücre sayısının hızla çoğaltılması	Biyomoleküllerin verimli olarak kullanılması	Yeni dokunun canlı dokuya adaptasyonu
Hücrelerin farklılaşma durumunun korunması	Fonksiyonel dokunun üretilmesi	Yeni dokunun yeterli vaskülarizasyonu



Şekil 1. Doku mühendisliğindeki temel uygulamalarda donör dokudan alınan hücreler uygun bir yapı iskeleti (biyopolimer) ve in vitro ortamda kombine edilip kültüre edildikten sonra tekrar canlı dokuya implante edilir.

sahanın, örneğin trakea gibi sınırlı, önemli ve ulaşılabilirliği zor bir alan olması sorun yaratabilmektedir. Örneğin Kojima ve ark. koyunların hem trakealarından hem de nazal septumlarından elde ettikleri kondrositlerden neotrakea (yeni trakea dokusu) oluşturabilmiştir [5]. Nazal septum trakeaya göre çok daha uygun bir donör saha olduğundan, bundan sonraki çalışmalarda neotrakea oluşturmak için nazal septum tercih edilebilir.

Hücre konusundaki bir diğer sorun da, hücrelerin uygun sayıda ve farklılaşma durumları bozulmadan çoğaltılabilmesidir. Buna örnek olarak, aljinate biyomateryalini kullanarak in vitro ortamda septal kondrosit üretiminin planlandığı bir çalışmada, 14. günden sonra hücreler yeterli sayıda çoğaltılamamıştır [6]. Yine kondrositlerin çoğalırken kendi fenotiplerini kaybederek fibroblastlara benzer özellikler kazandığı gösterilmiştir [7].

Özellikle kemik ve kıkırdakla ilgili doku mühendisliğinde hücre kaynağı olarak mezenkimal kök hücrelerin kullanımının çeşitli avantajları vardır. İlk olarak kemik iliğinden örnek alınması, kıkırdak veya kemikten biyopsi alınmasından daha basit, daha az invazif bir işlemdir ve donör saha morbiditesi ile pek karşılaşılmamaktadır.

Ayrıca bu hücreler kemik ve kıkırdak dışında yağ, kas ve stromal hücrelere farklılaşabilme yeteneğine sahiptir [8, 9]. Yapılan bir çalışmada kemik mineral blokları, otolog kemik iliği aspiratı ve kemik morfojenik protein, titanyum plak (meş) içine yerleştirilerek hastanın kendi latissimus dorsi kası içine implante edilmiştir. Yedi hafta sonra oluşturulan neomandibula (yeni mandibula dokusu) buradan alınarak, ileri oral kanser nedeniyle mandibulektomi uygulanan hastalara serbest doku grefti olarak implante edilmiştir [10].

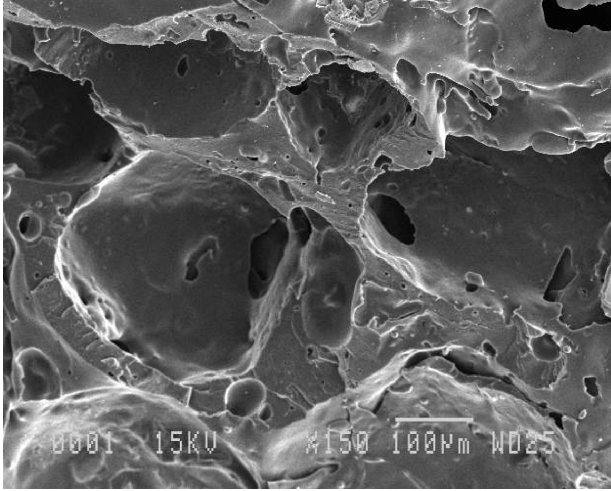
MÜHENDİSLİK ALANINDAKİ ZORLUKLAR

Biyomateryaller

Yeni dokunun üretilmesi ve bu dokunun fonksiyonel olabilmesi için uygun biyomateryalin seçimi çok önemlidir. Kullanılan yapı iskeletinin, hücrelerin ekimine ve üzerine tutunup çoğaltılmasına, besin maddelerinin ve atık maddelerin difüzyonuna ve bu süreç sonunda yeni doku oluşumuna izin vermesi gereklidir. Aynı biçimde, ideal olarak vücutta çözünebilir ve çevre doku tarafından rezorbe edilebilir olmalıdır. Ayrıca üretilen dokunun türüne göre farklı mekanik özelliklere sahip olmalıdır. Örneğin kemik ya da kıkırdak dokunun farklı mekanik özellikleri vardır. Günümüzde kullanılan, doğal ve sentetik materyallerden elde edilen yapı iskeletleri (biyomateryaller/biyopolimerler) Tablo 2'deki gibi sınıflandırılabilir (Tablo 2) [4].

Tablo 2. Biyomateryallerin sınıflandırılması

Biyomateryalin tipi	
Prefabrik olanlar	Polilaktik asit (PLA) Poliglikolik asit (PLG) Polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA)
İn situ-yapılan hidrojel	Kollojen Aljinate Fibrin glue Poliyeten glikol Pluroniks Hyaluronik asit



Şekil 2. Kemikle ilgili doku mühendisliğinde kullanılan prefabrik biyomateryallerden polilaktik-ko-glikolik asitin, elektron mikroskopisindeki por yapısının görüntüsü.

Dünyada yaygın olarak kullanılan biyomateryaller genelde prefabrik olanlardır (polilaktik asit [PLA], poliglitolik asit [PLG] ve polilaktik-ko-glikolik asit [PLGA]) (Şekil 2) [11,12, 13].

Doku mühendisliğinde kullanılan bu yapı iskeletlerinin başlıca dört fonksiyonu vardır. Bunlar, hücrelerin tutunmasına ve üzerinde yaşamasına izin verecek şekilde üç boyutlu bir yapıya sahip olması, hücrelerin ekstrasellüler matrisi oluşturmasına izin vermesi, yeni doku oluşurken onun için yeterli mekanik destek sağlaması ve istenen durumlarda biyoaktif moleküllerin salımına olanak sağlamasıdır. Ayrıca biyomateryallerin tasarımında istenen diğer önemli özellikler de, biyoyumluluk, çözünürlük, porlara sahip olma, su tutma ve besin maddelerinin ve atık maddelerin transportu ve hücre adezyonunun sağlanmasıdır.

Biyoyumluluk yapı iskeleti için hayati bir öneme sahiptir. Biyomateryalin veya onun çözünürlük ürünlerinin akut veya kronik inflamatuvar bir immün cevaba yol açmaması gereklidir. Uygun porlara sahip olma ise, besinlerin ve atıkların difüzyonuna izin vererek hücrelerin canlılığının devamının sağlanması açısından önemlidir. Ayrıca hücrelerin migrasyonu ve proliferasyonu da bu porlar sayesinde gerçekleşmektedir [4].

Yine su tutma ve hücre adezyon özellikleri de, hücrelerin kendi aralarında gruplar oluşturması ve yeni doku formasyonu için çok önemlidir. Örneğin, kondrositler su içeriği yüksek çevre şartlarında yuvarlak morfolojide kalarak daha iyi çoğalmakta ve yeni dokuyu oluşturmaktadır. Kamil ve ark. [14], su içeriği yüksek bir biyomateryal olan pluroniks F-127 (hidrojel) üzerine otolog kondrosit ektikten sonra bunu aurikula şekli verilmiş bir çok mikroporasyonları olan altın bir kalıba dökerek domuz ve koyunlara

Tablo 3. Biyomateryallerin çeşitlerine göre özellikleri.

Biyomateryalin özellikleri	PLA, PGA, PLGA	Hidrojeller
Por/meş büyüklüğü	10-100s µm	10-100s µm
Su içeriği	Düşük	Yüksek
Mekaniği	Güçlü	Zayıf
Hücre tutunması	Yüksek	Düşük
Biyoyumluluk	Var	Var
Çözünürlük	Hidrolitik	Enzimatik, hidrolitik

implante etmiştir. Estetik sonuçları çok iyi olmasa da, bu araştırmacılar neoaurikula (yeni aurikula) oluşturabilmiştir. Kondrositlerin aksine, osteoblastlar su içeriği düşük ortamda daha iyi çoğalmakta ve yapı iskeletinin üzerinde dağınık olarak yerleşmektedir. Bu nedenle prefabrik yapı iskeleti ürünlerinden polilaktik asit (PLA), poliglitolik asit (PGA) gibi hidrofobik, yani su içeriği düşük olan biyomateryallerle osteoblastların doku mühendisliğinde kemik yapımı ile ilgili kullanımının daha uygun olduğu düşünülmektedir [15, 16].

Çözünürlük sayesinde, yapı iskeleti çevre doku tarafından rezorbe edilirken yerini yeni dokuya bırakır. Çözünürlük ile yeni doku formasyonunun eş zamanlı olması gereklidir. Örneğin çözünürlük çok hızlı olursa yapı iskeletinde defektler oluşur ve yeni oluşan doku istenen şekil ve boyutta meydana gelmez [17]. Bunun aksine, çözünürlük çok yavaş olduğunda da yeni dokunun gelişimi için yeterli alan kalmayacaktır [18].

Günümüzde yaygın olarak kullanılan biyomateryallerin tipine göre taşıdığı özellikler Tablo 3'te gösterilmiştir (Tablo 3) [4].

Biyomoleküller

Biyoaktif moleküller, anjiyojenik faktörler, büyüme faktörleri (growth factor), farklılaşma faktörleri ve kemik morfojenik faktörler olarak sınıflandırılabilir. Bu faktörlerden en yaygın kullanılanlardan biri olan büyüme faktörü, hücre migrasyonunu, proliferasyonunu veya matris sentezini aktive ederek doku üretimini arttırmaktadır. Bazı biyomateryaller lokal olarak ve istenen zaman periyodları içinde bu biyomoleküllerin salımını sağlayacak şekilde tasarlanmaktadır. Bu biyomoleküllerin kullanımının kontrendike olduğu özel durumlar olabilir. Örneğin büyüme faktörünün onkolojik nedenlerle yapılan rekonstrüksiyonlarda yararlanan biyomateryallerle birlikte kullanımı uygun değildir [4].

Klinik uygulamalardaki zorluklar

Yeni oluşturulan dokuya istenen şekil ve boyutun kazandırılması, yeni dokunun çevre dokuya adaptasyonu ve bunun için yeterli vaskülarizasyonun temin edilmesi

gerekmektedir. Örnek olarak koyun ve domuzlarda yapılan bir araştırmada, otolog kondrositlerin hidrojele ekimi ile neoaurikula (yeni aurikula) oluşturulmaya çalışılmış, ancak aurikulaya istenen şekil ve boyut verilememiştir [14]. Aynı biçimde, yeni oluşturulan dokunun implantasyon alanının zayıf veya iyi vaskülarizasyona sahip olması çok önemlidir. Örneğin daha önce tümör nedeniyle lokal radyoterapi uygulanmış alanlar iyi vaskülarize olmadığından, doku mühendisliği ile üretilen doku ve organların implantasyonu ve biyoaktif moleküllerin kullanımı için pek uygun değildir [4].

Doku mühendisliğinin günümüzdeki uygulama alanları

Günümüzde en yaygın klinik uygulamalar kemiğe yönelik doku mühendisliği çalışmaları ile ortopedi alanında gerçekleştirilmektedir. Lomber füzyonlar ve birleşik olmayan uzun kemiklerin tedavisinde kemik morfojenik protein 2 (BMP-2) ve kemik morfojenik protein 7 kullanılmaktadır. Dünyada sadece kemik mühendisliği çalışmaları faz III klinik çalışma olarak değerlendirilmektedir ve rutin klinik kullanıma girmiştir. Kemik mühendisliğinin baş ve boyun cerrahisindeki klinik uygulamaları henüz olgu sunumları ile sınırlıdır. Kıkırdığa yönelik doku mühendisliği alanında kulak ve burun ile ilgili umut verici çalışmalar vardır. Üroloji alanında oldukça kompleks bir organ olan mesane üzerinde yapılan çalışmalar devam etmektedir. Göz hastalıkları ve kardiyovasküler cerrahide ise kornea ve vasküler greftlerle yapılan önemli araştırmalar dikkat çekmektedir [19].

Kulak Burun Boğaz alanındaki uygulamalar

Günümüzde, Kulak Burun Boğaz alanında trakea, krikoïd kıkırdak, mastoid hava hücreleri, fasiyal sinir, reküran laringeal sinir, korda timpani gibi çeşitli doku ve organlar üzerinde doku mühendisliği çalışmaları mevcuttur [2]. Bu çalışmalar için çok özel ve hassas bazı teknikler ve cihazlar gerekmektedir. Örneğin akış sitometrisi, hücrelerin multi-parametrik analizi için gerekli standart bir yöntemdir. Gerstner ve ark. [20] tarafından yapılan çalışmada, yeni bir cihaz olan lazer taramalı sitometri (LSC) kullanımının pek çok avantajı olduğu belirtilmektedir.

Rickert ve ark. [21], ilk olarak kobay oral mukozasından alınan spesimenlerden primer hücre kültürleri elde etmiştir. Bu kültürden elde edilen hücreler çözünebilir bir biyomateryal olan termoplastik blok kopolimere ekildikten sonra, ekstrasellüler matriks oluşumunda rolü oynayan endojen enzimlerin (matriks metalloproteinaz) ve bunların inhibitörlerinin aktivasyonu ölçülmüştür. Biyomateryal üzerindeki enzim aktivitesi ile kontrol grubundaki (polistiren yüzey) enzim aktivitesi arasında bir farklılık olmadığı gösterilmiştir.

Konjenital, travmatik veya tümoral nedenlerle oluşan auriküler kıkırdak defektlerinin rekonstrüksiyonları oldukça güçtür. Yeni aurikula oluşturulması için greft materyali

olarak genellikle kostal kıkırdak kullanılmaktadır. Özellikle konjenital defektlerin tamiri iki ila beş aşamalı cerrahi prosedürleri içermekte ve bu durum hem cerrah hem de hasta için büyük zaman ve efor kaybına yol açmaktadır [22, 23]. Ayrıca bu hastalarda pnömotoraks, yara enfeksiyonu, göğüste skar izi gibi donör saha morbiditeleri ortaya çıkabilmektedir. Kıkırdak mühendisliği ile ilgili olarak farelerde yapılan bir araştırmada, kondrositlerin poliglikolik asit (PGA) ve polilaktik asit (PLA) biyomateryallerine ekilerek oluşturulan auriküler implantlar 10 ay boyunca canlılıklarını ve kaliteli doku yapısını koruyabilmiştir [19, 24]. Kısa bir süre önce yapılan iki çalışmada, araştırmacılar elastik kıkırdak (neoaurikula) in vitro ortamda başarılı bir biçimde üretebilmiştir [24, 25]. Megehan ve ark. [26], doku mühendisliği için auriküler kıkırdak örneği almak için geleneksel açık tekniğe alternatif olarak minimal invazif bir yöntem tanımlamıştır. Bu araştırmacılar, 12 numara kör biyopsi iğnesi ile kapalı teknikle domuzlardan kıkırdak örneği almış ve daha sonra geleneksel açık teknikle, yeni kapalı tekniğin sonuçlarını karşılaştırarak, yeni tekniğin daha düşük bir sıklıkta kabuklanma, hematoma, abse ve skar oluşumuna neden olduğunu göstermiştir. Görüldüğü gibi, günümüzdeki auriküler kıkırdakla ilgili doku mühendisliği çalışmaları henüz in vitro hücre kültürü ve hayvan deneyleri ile sınırlıdır [4].

Nazal rekonstrüksiyonlar lokal fleplerin ve çeşitli greftlerin kullanımını gerektirebilmektedir. Otolog greftlerin yanı sıra, biyoimplantlar (porus polietilen gibi) ve alloplast (purifiye asellüler human dermis), saflaştırılmış asellüler kostal kıkırdak ve perikardium (tutoplast) kullanılabilir [4]. Günümüzde doku mühendisliği alanında septal kıkırdak üretimi konusunda yapılan araştırmalar devam etmektedir. Bununla konuda yapılan bir çalışmada, hücrelerin önemli miktarda sülfatlanmış glikozaminoglikan üretmesi sonucunda 14. günden sonra üremenin yeterli düzeyde olmaması nedeniyle, septal kondrositlerden in vitro ortamda hidrojel biyomateryali kullanarak neoseptum (yeni septum) yapımı başarıya ulaşmamıştır [6].

Laringotrakeal kompleksin çok özel fonksiyonları (fonasyon, hava yolu açıklığının sağlanması, beslenme) vardır. Bu nedenle, bu anatomik yapıya yönelik doku mühendisliği çalışmalarında çeşitli güçlükler yaşanmaktadır. Hemilaringeal paralizilerde yapılan medializasyon tiroplastik tekniklerinde otogreft (yağ) veya allogreft (gelfoam) enjeksiyonları ve açık teknik ile vücutta erimeyen biyoimplantların (silastik, titanyum, teflon) implantasyonları fonasyonun restorasyonu için kullanılmaktadır. Polidimetilsiloksan jel çok yeni olarak tiroplastik operasyonu için kullanıma sunulmuştur. Hiyaluronik asidin yüzdeki kırışıklıklar için kullanımı da çok yaygınlaşmıştır [4]. Hiyaluronik asitin enjeksiyon medializasyon tekniğinde başarılı bir biçimde kullanıldığı hayvan deneyleriyle kanıtlanmıştır [27].

Laringotrakeal rekonstrüksiyonlarda sıklıkla kostal kıkırdak, bazen de auriküler kıkırdak ve tiroid ala otogreft

olarak kullanılmaktadır [28]. Kostal kıkırdak en iyi seçim gibi gözükse de, hastada pnömotoraks, yara enfeksiyonu ve deride görünür skar meydana gelmesi gibi riskler oluşturmaktadır. Kojima ve ark. [29] tarafından yapılan çalışmada nazal septumdan elde edilen kondrositler poliglukolik asit (PGA) biyopolimeri üzerine ekilmiş ve silikon bir tüp etrafına sarılarak farelerin sırtına implante edilmiştir. İnkübasyondan 6 hafta sonra silikon silindir çıkarılmış ve oluşan kıkırdak lümen içine epitel hücreleri implante edilmiştir. Dört hafta sonra çıkarılan implantlar histolojik olarak incelenmiştir. Psödostratifye kolumnar epitel tabakası ile kaplı matür kıkırdak yapısının doğal koyun trakeasına çok benzer olduğu belirlenmiştir. Böylece neotrakea (yeni trakea) yapımı başarılı olmuştur. Tav şanlarda yapılan başka bir çalışmada ise, ilk aşamada tavşanın kulağından tam kat doku çıkarılarak geride kalan kılsız alandan epitelyal greft alınmıştır. İkinci aşamada, alınan epitelyal greft, polipropilen meş ve lateral torasik fasya (pedikülü ile beraber) silikon bir kateter etrafında döndürülerek tüp şekli verilmiştir. Yeni oluşturulan neotrakea, total trakea rekonstrüksiyonu için subkutan bir tünel içinde ilerletilerek servikal bölgeye yerleştirilmiştir. Üçüncü aşamada ise 2 hafta sonra silikon kateter alınmış ve yeni trakea dokusunun doğal trakea ile birleştiği ve kanlanmasının iyi olduğu gözlenmiştir. Dört hafta sonra hayvanların %70'i canlı kalmıştır. Daha sonra, oluşturulan yeni dokunun lümen açıklığı, epitelyal fasya ve greftin canlılığı, anastomozun durumu ve diğer özellikleri makroskopik, radyolojik ve histolojik olarak değerlendirilmiştir. Neotrakeanın, canlılığı, rijiditesi, lümen açıklığı, duvar kalınlığı gibi özelliklerinin doğal trakea ile benzer olduğu gözlenmiştir [30].

Fasiyal iskeletteki defektlerin tamiri genellikle uzun zaman, efor ve otolog kemik greftleri ile serbest doku transferlerini gerektirmektedir. Mandibular periostiumdan alınan kemik matrisi kullanılarak yapılan bir doku mühendisliği çalışmasıyla elde edilen kemik greft ile insanda posterior maksilla rekonstrüksiyonu yapılmıştır. On sekiz hastanın onunda implantasyondan 3 ay sonra lamellar kemik formasyonu görülmüştür [31].

Perfore kulak zarı tamiri, 1950'li yıllara kadar defekt artifisyal materyallerle kapatılarak yapılmıştır. Daha sonraki yıllarda kulak zarının cerrahi tekniklerle onarılmasına başlanmış (miringoplasti) ve biyolojik greftlerin kullanımı gündeme gelmiştir. Günümüzde biyolojik materyaller dışında vücutta eriyebilen ya da erimeyen sentetik materyallerin kullanılabilmesine dair çalışmalar yapılmaktadır. Kohn ve ark. [32], polialfahidroksi asit, polialfaamino asit ve tetrafloroetilen ile bisfenol-A-polikarbonattan yapılan kompozit greft şeklindeki membranları kobay ve köpeklerin kulaklarına implante etmiş ve bu implantlar yaklaşık 1 yıl sonra histolojik olarak incelenmiştir. Poli (beta-benzil-L-aspartat-ko-L-lösin) amino asitteki doku reaksiyonlarının en düşük düzeyde olduğu ve poli tetrafloroetilenin en ince ve timpanik membranla en iyi şekilde kaynaşan materyal

olduğu belirlenmiştir. Bu araştırmaya çok benzer olan bir başka çalışmada da aynı sonuçlar elde edilmiştir [33].

Malign baş-boyun tümörlerinden sonra yapılan radyoterapilerin ardından gelişen radyojenik kserostomi, dünyada çok sayıda hastayı etkileyen önemli bir sorundur. Bugün birçok çalışma grubu radyasyona bağlı tükürük bezi hasarı konusunda rejeneratif tıpla ilgili çalışmalarını sürdürmektedir ve bu konudaki gelişmeler umut vericidir [34].

Oral ve maksillofasiyal cerrahideki uygulamalar

Oral ve maksillofasiyal alandaki doku mühendisliği çalışmalarının kayıp dokuların rejenerasyonu için yararlı olduğu saptanmıştır. Periodontal hastalıklar alveolar kemiği de kapsayan periodontal dokuda şiddetli hasara neden olabilmektedir. Mizuno ve ark. [35]'nin yaptığı bir çalışmada, erişkin hibrid köpeklerin mandibula cisminden alınan periostal hücreler uygun kültür ortamında çoğaltılmış ve elde edilen kültüre edilmiş otolog periost grefti mekanik olarak hasar olan bölgeye suture edilerek 4. mandibular premolar defektin tamir edilmesine çalışılmıştır. Üç ay sonra greftler yerinden çıkarılarak radyolojik ve histolojik olarak değerlendirilmiş ve bu yeni tedavi yönteminin yeterince etkili bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır [35].

Kemik morfojenik protein (BMP) 1965 yılında bulunmasına rağmen, klinik kullanımı ile ilgili yayınlar 2001 ve 2002 yıllarına aittir. Bu yayınlarda genellikle kemik morfojenik protein-biyoiimplant kombinasyonu ile serbest vaskularize olmayan kemik grefti karşılaştırılmış ve iyileşme açısından aynı sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca kemik morfojenik protein-biyoiimplant kombinasyonu ile donör saha morbiditesi ortaya çıkmamaktadır. Bu avantajına karşın, osteoindüktif protein tedavisi ancak kısıtlı ve ufak kraniyofasiyal defektlerde uygulama alanı bulmuştur. Kraniyofasiyal defektlerin daha kompleks olması ve kendine has bazı özelliklerinin bulunması sebebiyle, kemik rejenerasyonu için daha fazla osteoindüktif sinyale gerek vardır. Kraniyofasiyal ve dental defektlere has karakteristik zorlukların ortadan kaldırılabilmesi için gen tedavisi yaklaşımları ile başarılı sonuçlar elde edilecektir [36].

Temporomandibular eklem hastalıklarındaki uygulamalar

Doku mühendisliğinde temporomandibular eklem (TME) diski ile ilgili yoğun uygulamalar mevcuttur. Şu an için TME disfonksiyonu olan hastalarda uygulanabilecek seçenekler kısıtlıdır. Etkili ve güvenilir bir tedavi mevcut olmadığı için hastaların çoğuna diskektomi operasyonu uygulanmaktadır. Ancak bu operasyon ideal bir yöntem değildir, çünkü hasarlı olan disk çıkartıldığı için hastaların şikayetleri kısmi olarak düzelmekte, ancak tam bir fonksiyonel iyileşme sağlanamamaktadır. Doku mühendisliği canlı ve etkin implantların oluşturulmasına olanak sağlamaktadır. TME disk hücrelerinin biyomateryal ile birlikte

kullanıldığı ilk araştırma 1991 yılında yapılmıştır. Son 10-15 yılda TME diskinin karakteristik özellikleriyle ilgili araştırmaların sayısı artmıştır. Son 5 yıl içinde ise doku mühendisliğinde yapı iskeleti, hücre kaynağı ve biyolojik-biyomekanik uyarılarla ilgili önemli çalışmalar yapılmıştır. TME ile ilgili doku mühendisliği ürünlerinin klinik kullanımını hala tam olarak geliştirmemiş olsa bile gelecekte başarılı uygulamalar görebileceğiz [37].

Nefroloji alanındaki uygulamalar

Böbrek yetmezliği tedavisinde dünya üzerinde pek çok insan hemodiyalize bağımlıdır. Donör organ azlığı sebebiyle böbrek transplantasyonu oldukça sınırlıdır. Bu nedenle renal replasman tedavisinde doku mühendisliği araştırmalarına başlanmıştır. Mevcut olan biyoartifisiel böbrekler büyüktür ve işlenmesi zahmetlidir; ancak yapılan prelinik çalışmalarda bu materyallerin konvansiyonel tedaviye kıyasla sağkalımı arttırdığı gösterilmiştir. Bu hibrid teknoloji için ufak hemofiltreler, hücre kültürü yapıları, sensörler ve elektronik kontrollerin integrasyonu gereklidir. Klinik kullanım için biyoartifisiel böbreğin hazırlanmasında kullanılan izolasyon ve çıkartılma tekniklerini kullanan araştırmacılar, insan renal tübül hücrelerini çeşitli silikon materyaller (nanopor membranlar, SNM) üzerinde üretmiştir. İnsan kortikal tübül epitel hücreleri, tek kristal silikon örnekleri, silikon dioksit, silikon nitrat, SU-8 fotorezist, SNM ve poliester dokular üzerine ekilmiş ve büyütülmüştür. Bu hücreler santral silialar ve sıkı bağlantılarla bir hücre tabakası oluşturmuştur [38].

Ürolojik yapılar ve ilişkili dokularda günümüzde rejeneratif tıptaki yeni uygulamaları ele alan başka bir araştırmada, yaşanan nüfusla birlikte donör doku ve organ sayısının gittikçe azaldığı, hasta olan doku ve organlardan alınan otolog örneklerle yapılan doku mühendisliği çalışmalarının normal dokuları oluşturma açısından çoğunlukla yetersiz kaldığı ve bu durumlarda kök hücrelerin iyi bir alternatif olabileceği belirtilmektedir [39]. Bu çalışmaya paralel olan bir diğer makalede, insan embriyosundan elde edilmiş kök hücrelerin, matür mesane düz kası ve üroepitelyum hücreleriyle birlikte kültüre edilmesinin kök hücre migrasyonunu arttırdığı, kemotaksi üzerinde pozitif etkisi olduğu ve böylece doku rejenerasyonunda faydalı olabileceği gösterilmiştir [40].

Göz hastalıklarındaki uygulamalar

Zorlutuna ve ark. [41], kendiliğinden eriyebilen doğal polyster (PHBV) ve sentetik polilaktik asiti (PLA) ve retinal pigment epitelyal hücreleri kullanarak korneanın stromal ve epitelyal tabakalarını oluşturmaya çalışmışlardır. Retinal pigment epitelyal hücreler bu biyomateryallerin üzerine ekilmiş, hücreler buraya tutunmuş ve çoğalmıştır. Buna ek olarak, hücreler kültürde fenotiplerini koruyabilmiştir. Bu araştırmadaki umut verici sonuçlar, kornea rekonstrüksiyonunda bu biyomateryalle ilgili doku mühendisliği çalışmalarının ciddi bir potansiyel taşıdığını

göstermektedir.

Kardiovasküler cerrahideki uygulamalar

Bin ve ark. [42] tarafından yapılan araştırmada, insan kemik iliğinden mezenkimal kök hücreler elde edildikten sonra, bu hücreler vasküler endotelial büyüme faktörü ile endotelial hücrelere farklılaştırılmış ve desellülarize edilmiş yapı iskeletine ekilerek 14 günlük statik kültürde çoğaltılmıştır. Dediferansiye hücrelerin % 90'dan fazlası von Willebrand faktör ve Tie 2 related antijen için pozitif boyanmıştır. Buna ek olarak, hücrelerin sitoplazmasında Weibel Palade korpüskül gözlenmiştir. Re-endotelizasyon seviyeleri statik kültürde 7, 14, 20. günlerde % 73, % 85, % 95 olarak saptanmıştır. Bu sonuçların tümü, insan kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücrelerin endotel hücrelerine farklılaşabildiğini ve bunun da doku mühendisliğinde kalp kapakçığı yapımında kullanılabileceğini göstermektedir.

Pediyatrik vasküler cerrahide de kök hücre ile ilgili çalışmalar sürdürülmektedir. Kısa süre önce yapılan bir araştırmada, umbilikal kordun vasküler segmentindeki hücrelerden izole edilen umbilikal kord hücreleri hücre bankasında dondurularak saklanmıştır. Hücreler 12 hafta sonra tekrar kültüre edilmiş ve histolojik, immünohistokimyasal ve proliferasyon analizleri yapılmıştır. Daha sonra umbilikal kord hücreleri Trileaflet kalp kapakçığı yapı iskeletine ekilmiştir. Doku mühendisliği ürünü olan bu fabrikasyon kalp kapakçıklarının değerlendirilmesinde, 12 hafta sonra umbilikal kord hücrelerinin canlılığını koruduğu, miyofibroblast benzeri morfoloji gösterdiği, alfa aktin ve fibroblast spesifik marker için pozitif boyandığı gözlenmiştir. Bunun yanı sıra, kollajen tip I, III, IV demsin, laminin için immünohistokimyasal pozitiflik mevcut olduğu belirlenmiştir. Elektron mikroskopisinde, hücrelerin biyopolimerin porlarına tutunduğu, büyüdüğü ve yeni doku oluşturduğu kanıtlanmıştır. Bu sonuçlar, umbilikal kord hücrelerinden in vitro ortamda canlı ve fonksiyonel insan kalp kapakçığı ve biyomimetik akım kültür sistemlerinin oluşturulabileceğini göstermektedir [43].

Ortopedi alanındaki uygulamalar

Meniskal doku rejenerasyonu oldukça sınırlı düzeydedir ve meniskal doku kaybı osteoartrite neden olmaktadır. Koyunlar üzerinde yapılan bir çalışmada, hiyaluronik asit ve polikaprolaktondan meydana gelen yeni bir biyomateryal menisküs doku kaybı tedavisinde kullanılmıştır. Üçüne total ve üçüne parsiyel menisküs replasmanı yapılırken, iki tanesine kontrol grubu olarak sadece menisektomi uygulanmıştır. Altı hafta sonra hayvanlar sakrifiye edilip spesimenler histolojik ve makroskopik olarak incelenmiş, ayrıca opere edilmeyen sol dizlerle de karşılaştırma yapılmıştır. Cerrahi tekniğin uygulanabilir olduğu kabul edilmiş, implantlar yerinde kalmış, yırtılmamış ve kapsüle doğru mükemmel bir doku büyümesi gözlenmiştir. Orijinal menisküs ile implant arasındaki doku integras-

yonu çok iyi bulunmuştur. Ancak greft basısı, atılımı ve opere edilen eklemlerde şiddetli kıkırdak dejenerasyonu görülmüştür. Sonuç olarak bu biyomateryalin ortopedi alanında umut verici bir implant olduğu vurgulanmıştır [44].

SONUÇ

Doku mühendisliği canlı ve fonksiyonel doku ve organ transplantasyonlarında yeni tedavi yöntemleri için seçenekler sunmaktadır. İn vitro olarak hazırlanan fabrikasyon dokuların klinik olarak uygulanmasında halen çeşitli sorunlar yaşanmaktadır. İn vitro ortamdaki yetersiz oksijen, beslenme zorlukları gibi kısıtlayıcı etkenler, fabrikasyon olan kompleks doku ve organ sistemlerinin yapımını zorlaştırmaktadır. Ayrıca implantasyondan sonra doku canlılığının sağlanması ve korunması için yeterli vaskülarizasyonun oluşturulması da gerekmektedir.

Doku mühendisliğinden gelecekteki beklentilerimiz, tüm somatik organ ve dokulara spesifik olan hücre tiplerinin in vitro ortamlarda üretilebilmesi, böylece fabrikasyon olarak hazırlanan doku ve organların implantasyonunun sağlanması ve implantların başarıyla yaşatılmasıdır. Ayrıca diagnostik amaçlı olarak özellikle ilaç endüstrisinde maddenin metabolizması, alımı, toksisitesi ve patojenitesinin bu fabrikasyon doku ve organlar üzerinde tatbikinin de geliştirilmesi gerekmektedir. Doku mühendisliğindeki bu araştırmalar henüz bazı ülke ve kurumlarla sınırlıdır. Bu zahmetli çalışmaların yaygınlaştırılması ve araştırmacıların maddi ve manevi olarak desteklenmesi sağlanmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Langer R, Vacanti JP. Tissue Engineering. Science 1993; 260: 920-926.
2. Kanemaru S. Regenerative medicine in the fields of otolaryngology; head and neck region. Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho 2006; 109: 1-7.
3. <http://xtell.lib.utexas.edu/stories/media/t0003-2.html>.
4. Rice MA, Dodson BT, Arthur JA, Anseth KS. Cell-Based therapies and tissue engineering. Otolaryngol Clin North Am 2005; 38: 199-214.
5. Kojima K, Bonassar LJ, Ignots RA, et al. Comparison of tracheal and nasal chondrocytes for tissue engineering of the trachea. Ann Thorac Surg 2003; 76: 1884-1888.
6. Homicz MR, Chia SH, Schumacher BL, et al. Human septal chondrocyte redifferentiation in alginate, polyglycolic acid scaffold, and monolayer culture Laryngoscope 2003; 113: 25-32.
7. Mayne R, Vail VS, Mayne PM, et al. Changes in type of collagen synthesized as clones of chick chondrocytes grow and eventually lose division capacity. Proc Natl Acad Sci USA 1976; 73: 1674-1978.
8. Pittenger MF, Mackay Am, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 1999; 284: 143-147.
9. Dennis JE, Caplan Al. Differentiation potential of conditionally immortalized mesenchymal progenitor cells from adult marrow of a H-2Kb-tsA58 transgenic mouse. J Cell Physiol 1996; 167: 523-538.
10. Warnke PH, Springer IN, Wiltfang J, et al. Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man. Lancet 2004; 364: 766-770.
11. Freed LE, Marquis JC, Nohria A, Emmanuel J, Mikos AG, Langer R Neocartilage formation in vitro and in vivo using cells cultured on synthetic biodegradable polymers. J Biomed Mater Res 1993; 27: 11-23.
12. Rotter N, Aigner J, Naumann A, Planck H, Hammer C, Burmester G, Sittlinger M. Cartilage reconstruction in head and neck surgery: comparison of resorbable polymer scaffolds for tissue engineering of human septal cartilage. J Biomed Mater Res 1998; 5; 42: 347-356.
13. <http://www.msm.cam.ac.uk/ccmm/projects/vam27.html>.
14. Kamil SH, Vacanti MP, Paige KT, et al. Tissue engineering of a human sized and shaped auricle using a mold. Laryngoscope 2004; 114: 867-870.
15. Burdick JA, Frankel D, Dernel WS, Anseth KS. An initial investigation of photocurable three-dimensional lactic acid based scaffolds in a critical-sized cranial defect. Biomaterials 2003; 24: 1613-1620.
16. Hedberg EL, Kroese-Deutman HC, Shih CK, et al. Bone regenerative effect of varied release kinetics of the osteogenic thrombin peptide TP508 from biodegradable, polymeric scaffolds. J Biomed Mater Res, in press.
17. Rice MA, Anseth KS. Encapsulating chondrocytes in copolymer gels: bimodal degradation kinetics influence cell phenotype and extracellular matrix development. J Biomed Mater Res A 2004; 15; 70: 560-568.
18. Bryant SJ, Anseth KS. Controlling the spatial distribution of ECM components in degradable PEG hydrogels for tissue engineering cartilage. J Biomed Mater Res A 2003; 1; 64: 70-79.
19. Nussebaum B, Teknos Tn, Chepeha DB. Tissue engineering: The current status of this futuristic modality in head neck reconstruction. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surgery 2004; 3212: 311-315.
20. Gerstner AO, Tarnok A, Bootz F. [Slide-based multiparametric cytometry in ENT. Perspectives for the clinic and research]. HNO 2005; 53: 134-141.
21. Rickert D, Lendlein A, Kelch S, et al. [Cell proliferation and cellular activity of primary cell cultures of the oral cavity after cell seeding on the surface of

- a degradable, thermoplastic block copolymer]. *Biomed Tech (Berl)* 2005; 50: 92-99.
22. Brent B. Auricular repair with autogenous rib cartilage grafts: two decades of experience with 600 cases. *Plast Reconstr Surg* 1992; 90: 355-374; discussion 375-376.
 23. Walton RL, Beahm EK. Auricular reconstruction for microtia: Part II. Surgical techniques. *Plast Reconstr Surg* 2002; 110: 234-249; quiz 250-251, 387.
 24. Cao YL, Vacanti JP, Paige KT et al. Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear. *Plast Reconstr Surg* 1997; 100: 297-302.
 25. Rodriguez A, Cao YL, Ibarra C, Pap S, et al. Characteristics of cartilage engineered from human pediatric auricular cartilage. *Plast Reconstr Surg* 1999; 103: 1111-1119.
 26. Megerian CA, Weitzner BD, Dore B, Bonassar LJ. Minimally invasive technique of auricular cartilage harvest for tissue engineering. *Tissue Eng* 2000; 6: 69-74.
 27. Hertegard S Dahlqvist A, Laurent C, et al. A. Viscoelastic properties of rabbit vocal folds after augmentation. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2003; 128: 401-406.
 28. de Jong AL, Park AH, Raveh E, et al. Comparison of thyroid, auricular, and costal cartilage donor sites for laryngotracheal reconstruction in an animal model. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2000; 126: 49-53.
 29. Kojima K, Bonassar LJ, Roy AK, et al. A composite tissue-engineered trachea using sheep nasal chondrocyte and epithelial cells. *FASEB J* 2003; 17: 823-828.
 30. Okumus A, Cizmeci O, Kabakas F, et al. Circumferential trachea reconstruction with a prefabricated axial bio-synthetic flap: experimental study. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2005; 69: 335-344.
 31. Schimming R, Schmelzeisen R. Tissue-engineered bone for maxillary sinus augmentation. *J Oral Maxillofac Surg* 2004; 62: 724-729.
 32. Kohn FE, Feijen J, Feenstra L. New perspectives in myringoplasty. *Int J Artif Organs* 1984; 7: 151-162.
 33. Feenstra L, van der Ven BW, Kohn FE, Feijen J. Experimental myringoplasty. *Int J Artif Organs* 1980; 3: 354-357.
 34. Bucheler M, Haisch A. Tissue engineering in otorhinolaryngology. *DNA Cell Biol* 2003; 22: 549-564.
 35. Mizuno H, Hata K, Kojima K, et al. A novel approach to regenerating periodontal tissue by grafting autologous cultured periosteum. *Tissue Eng* 2006; 12: 1227-1335.
 36. Nussenbaum B, Krebsbach PH. The role of gene therapy for craniofacial and dental tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 2006; Jun 9; [Epub ahead of print].
 37. Allen KD, Athanasiou KA. Tissue Engineering of the TMJ Disc: A Review. *Tissue Eng* 2006; 12: 1183-1196.
 38. Fissell WH, Manley S, Westover A, et al. Differentiated growth of human renal tubule cells on thin-film and nanostructured materials. *ASAIO J* 2006; 52: 221-227.
 39. Atala A. Recent applications of regenerative medicine to urologic structures and related tissues. *Curr Opin Urol* 2006; 16: 305-309.
 40. Frimberger D, Morales N, Gearhart JD, et al. Human embryoid body-derived stem cells in tissue engineering-enhanced migration in co-culture with bladder smooth muscle and urothelium. *Urology* 2006; 67: 1298-1303.
 41. Zorlutuna P, Tezcaner A, Kiyat I, et al. Cornea engineering on polyester carriers. *J Biomed Mater Res A* 2006; Jun 6; [Epub ahead of print].
 42. Bin F, Yinglong L, Nin X, et al. Construction of tissue-engineered homograft bioprosthetic heart valves in vitro 2006; 52: 303-309.
 43. Sodian R, Lueders C, Kraemer L, et al. Tissue engineering of autologous human heart valves using cryopreserved vascular umbilical cord cells. *Ann Thorac Surg* 2006; 81: 2207-2216.
 44. Chiari C, Koller U, Dorotka R, et al. A tissue engineering approach to meniscus regeneration in a sheep model. *Osteoarthritis Cartilage* 2006; May 26; [Epub ahead of print].