

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**OSTEOBLAST HÜCRELERİNİN ÇEŞİTLİ
MEKANİK UYARILARA YANITININ
ARAŞTIRILMASI**

İBRAHİM MUTLU

BİYOMEKANİK A.B.D.
YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2007

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**OSTEOBLAST HÜCRELERİNİN ÇEŞİTLİ
MEKANİK UYARILARA YANITININ
ARAŞTIRILMASI**

BİYOMEKANİK A.B.D.
YÜKSEK LİSANS TEZİ

İBRAHİM MUTLU

Danışman Öğretim Üyesi: Prof.Dr. Hasan HAVITÇIOĞLU
Prof.Dr. Ramazan KARAKUZU

ÖZET:

OSTEOBLAST HÜCRELERİNİN ÇEŞİTLİ MEKANİK UYARILARA YANITININ ARAŞTIRILMASI

Kemik hücresine biyolojik etkenlerin yanında mekanik etkenlerin etkisi olduğu bilinmektedir. Ancak mekanik etkiye hücresel tepkinin mekanizması tam olarak belirlenememiştir. Daha tabii bir yapıda in vivo da oluşan durumun taklit edilmesi için hücre kültürleri kollajen jel içine ekilir. Çünkü kollajenli yapay birleşim mekanik olarak uyarım yapılabilen, üç boyutlu, ağısı bir yapıda oluşur.

İn vivo ortamı taklit edecek polilaktik asit kaplı (PLLA) kollajen jel yapı iskeleti içine ekilmiş hücrelere tek yönlü ve devirli mekanik germe uygulayarak hücrelerin uyarım sonucunda hücre morfolojisi, hücre sayısı, hücrelerin yapı iskeleti içinde uyarıma karşı dağılımı ve biyolojik etkenlerin değişikliğini saptamak amaçlanmıştır. Ticari olarak satılan kollajen jel yapı iskeletine bir dizi kimyasal işlem sonrası PLLA ile kaplanarak yeni bir biyomalzeme üretildi.

Hücre ekilmiş kollajen jel yapı iskeletine uyarım yapabilmek için tek yönlü ve devirli germe uygulayan bir mekanik hücre uyarım aygıtı geliştirildi. Aygıtın donanımında bir adım motoru ve motorun miline doğrudan bağlanmış bir kramayer dişli doğrusal hareketi sağlamaktadır. Dişliye dikey yerleştirilmiş çubukların uçlarındaki iğnelere yapı iskeletimiz bağlanarak uyarım motor aracılığı ile uygulanabilir. İnsan kemik iliğinden elde edilmiş osteoblast hücreleri yapı iskeletine ekildikten sonra 1,5 Hz frekansında 1 gün boyunca 10,000 mikro-strain devirli germe uygulandı. DNA, protein, alkalın fosfataz (ALP) düzeyleri hücrelerin matris sentez aktivitesini ve hücre sayısını belirlemek için ölçüldü. Yapı iskeleti üzerinde osteoblast kemik hücresinin uyarım sonrası kontrol grupları ile karşılaştırılması gözenekler içindeki yerleşimi değerlendirilerek taramalı elektron mikroskop ile gerçekleştirildi.

Anahtar sözcükler: Osteoblast, Mekanik uyarım, kollajen jel

SUMMARY:

THE INVESTIGATION OF RESPONSE OF OSTEOLAST CELLS TO SEVERAL MECHANICAL STIMULATION

It is well known that not only biologic factors, but also mechanical factors affect bone cells. However the mechanism of cell response to mechanical effects couldn't be completely determined. Cell cultures cultivated into collagen gel are designed to imitate natural in vivo situation. Because artificial synthesis with collagen has capability of being mechanically stimulated, 3-dimension and web structural.

It is purposed to determine cell morphology, cell proliferation, cell alignment in scaffold after stimulation and alterations of biologic factors while applying uniaxial and cyclic strain resulting from stimulation to cells to be imitated in vivo situation and cultivated in collagen gel coated polylactic acid (PLLA).

After several chemical processes a new biomaterial was manufactured with the help of polylactic acid for coating the collagen gel scaffold which is commercially being sold. A mechanical cell stimulator device operating uniaxial and cyclic strain was developed to stimulate cells cultivated into collagen gel scaffold. A stepper motor and rock gear assembled directly motor shaft in hardware of the device provides linear movement. The stimulation can be applied by stepper motor via assembling scaffold to pins located on edge of rods oriented perpendicular to gear. After osteoblast cells obtained from human bone marrow cultivated into scaffold, dynamic strain applied at 10.000 micro-strain and a frequency of 1,5 Hz, for 24 hours. DNA, protein and alkaline phosphates levels was measured to determine cell proliferation and activities of matrix synthesis of cells. Comparison with control groups osteoblast bone cells on scaffold after stimulation performed by evaluating alignment in the pores by using SEM.

Keywords: Osteoblast, mechanical stimulation, collagen gel

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ	2
ŞEKİL LİSTESİ	3
1.ÖZET:	4
2.SUMMARY:	5
3.GİRİŞ ve AMAÇ:	6
4.GENEL BİLGİLER:	7
4.1 Kemik:	7
4.1.1 Kemik dokusunun yapısı ve özellikleri:	7
4.1.2. Kemik iliği kök hücrelerinin farklılaşması	9
4.1.3. Alkalın Fosfataz (ALP):	11
4.2 Kemiklerde Mekanik Etki:	11
4.2.1 In Vitro Mekanik Uyarım Çalışmaları:	12
4.2.2 Hücelere gelen mekanik kuvvetler:	13
4.2.3 Hücre işlevinde harici uygulanan mekanik kuvvetlerin rolü:	14
4.2.4. İn Vitro Hücrelerin Mekanik Uyarımı için Kullanılan Aygıtlar ve Yöntemler:	15
1- Kayma gerilmesi	15
2-Germe	16
3- Basınç	17
4.2.5 Doku Mühendisliğinde harici uygulanan mekanik kuvvet uygulamaları:	18
4.3 Doku İskeletleri	18
4.3.1 Yapı iskeletleri ile doku mühendisliği:	20
4.3.2 Biyobozunur polimerler ve biyoaktif yüzeyler:	21
4.3.3 Skafold malzemeleri:	22
4.3.4 Doku skafoldların uygulamaları:	23
4.3.5 Skafold içinde hücre yetiştirilmesinin ilerletilmesi:	23
5.ÖZEL AMAÇ	24
6.YÖNTEM:	26
6.1 Deney Düzenegi	26
6.2 Mastır yerleşimi:	27
6.3 Yük hücresi	27
6.4 Aygıt sürücüsü	28
6.4.1 Donanım:	28
6.4.2 Yazılım :	29
6.5 Kalibrasyon :	30
6.6 Aygıt Sterilizasyonu:	33
6.7 Kemik Doku Yapı İskeletinin Kimyasal Hazırlanışı:	33
6.8 In Vitro Hücre Kültürlerinin Hazırlanması:	34
6.8.1 Kullanılan reaktif ve malzemeler:	34
6.8.2 Hazırlanan Solüsyonlar:	34
6.9 Hücre Kültürlerinin Aygıt ile Mekanik Uyarımı:	36
7.KISITLILIKLAR	38
8.BULGULAR	39
8.1 Hücrelerin gerilmesi esnasında elde edilen kuvvet grafiği	43
9.TARTIŞMA	45
10.KAYNAKLAR	47

TABLO LİSTESİ

No:		Sayfa
1	Hücrelere ve dokulara uygulanan mekanik yüklenme uygulamaları	14

ŞEKİL LİSTESİ

No:		Sayfa
1	Kemik içyapısı	8
2	Bir osteonun histolojik kesiti	9
3	Yünsü ve Lamellar kemiğin histolojik kesiti	9
4	Doku farklılaşması teorisi	10
5	Kemik adaptasyonu hipotez diyagramı	12
6	a) Koni-ve plaka viskometre b) Paralel düzlem akım odacığı	16
7	a) Tek yönlü germe aygıtı b) Çift yönlü germe aygıtı	16
8	a) Hidrostatik basınç b)Tabla	17
9	Doku iskeletinin yapımı ve amacı	19
10	Doku iskeleti kullanarak hedefe ilaç salınımı	20
11	Deney aygıtının üstten görünüşü	26
12	Kullanılan mastır ve setkur vidaları	27
13	Deneyde kullanılan yük hücresi ve dijital gösterge aygıtı	28
14	Yük hücresi yazılım programı	28
15	Aygıtın motor sürücü donanımı	29
16	Sürücü kartı yazılım programı	29
17	Kalibrasyon için kullanılan komparatörlü düzenek	30
18	Ekstensiometre kullanılarak kalibrasyon için kullanılan düzenek	31
19	İletim mekanizmasının yerdeğıştirme-zaman grafiğı	32
20	Yapı iskeleti	33
21	Yapı iskeletleri için kullanılan mastır	33
22	Deney düzeneğinin mikrobiyolojik güvenlik kabin içindeki görüntüsü	36
23	Deney düzeneğinin inkübatör içindeki görüntüsü	37
24-29	Deney öncesi yapı iskeletlerinin SEM kesit resimleri	39-41
30-35	Deney sonrası yapı iskeletlerinin SEM kesit resimleri	41-43
36	2.deney kuvvet-zaman grafiğı	44

1.ÖZET:

OSTEOBLAST HÜCRELERİNİN ÇEŞİTLİ MEKANİK UYARILARA YANITININ ARAŞTIRILMASI

Kemik hüresine biyolojik etkenlerin yanında mekanik etkenlerin etkisi olduğu bilinmektedir. Ancak mekanik etkiye hüresel tepkinin mekanizması tam olarak belirlenememiştir. Daha tabii bir yapıda in vivo da oluşan durumun taklit edilmesi için hücre kültürleri kollajen jel içine ekilir. Çünkü kollajenli yapay birleşim mekanik olarak uyarım yapılabilen, üç boyutlu, ağısı bir yapıda oluşur.

İn vivo ortamı taklit edecek polilaktik asit kaplı (PLLA) kollajen jel yapı iskeleti içine ekilmiş hücrelere tek yönlü ve devirli mekanik germe uygulayarak hücrelerin uyarım sonucunda hücre morfolojisi, hücre sayısı, hücrelerin yapı iskeleti içinde uyarıma karşı dağılımı ve biyolojik etkenlerin değişikliğini saptamak amaçlanmıştır. Ticari olarak satılan kollajen jel yapı iskeletine bir dizi kimyasal işlem sonrası PLLA ile kaplanarak yeni bir biyomalzeme üretildi.

Hücre ekilmiş kollajen jel yapı iskeletine uyarım yapabilmek için tek yönlü ve devirli germe uygulayan bir mekanik hücre uyarım aygıtı geliştirildi. Aygıtın donanımında bir adım motoru ve motorun miline doğrudan bağlanmış bir kramayer dişli doğrusal hareketi sağlamaktadır. Dişliye dikey yerleştirilmiş çubukların uçlarındaki iğnelere yapı iskeletimiz bağlanarak uyarım motor aracılığı ile uygulanabilir. İnsan kemik iliğinden elde edilmiş osteoblast hücreleri yapı iskeletine ekildikten sonra 1,5 Hz frekansında 1 gün boyunca 10,000 mikro-strain devirli germe uygulandı. DNA, protein, alkalın fosfataz (ALP) düzeyleri hücrelerin matris sentez aktivitesini ve hücre sayısını belirlemek için ölçüldü. Yapı iskeleti üzerinde osteoblast kemik hüresinin uyarım sonrası kontrol grupları ile karşılaştırılması gözenekler içindeki yerleşimi değerlendirilerek taramalı elektron mikroskop ile gerçekleştirildi.

Anahtar sözcükler: Osteoblast, Mekanik uyarım, kollajen jel

2.SUMMARY:

THE INVESTIGATION OF RESPONSE OF OSTEOLAST CELLS TO SEVERAL MECHANICAL STIMULATION

It is well known that not only biologic factors, but also mechanical factors affect bone cells. However the mechanism of cell response to mechanical effects couldn't be completely determined. Cell cultures cultivated into collagen gel are designed to imitate natural in vivo situation. Because artificial synthesis with collagen has capability of being mechanically stimulated, 3-dimension and web structural.

It is purposed to determine cell morphology, cell proliferation, cell alignment in scaffold after stimulation and alterations of biologic factors while applying uniaxial and cyclic strain resulting from stimulation to cells to be imitated in vivo situation and cultivated in collagen gel coated polylactic acid (PLLA).

After several chemical processes a new biomaterial was manufactured with the help of polylactic acid for coating the collagen gel scaffold which is commercially being sold. A mechanical cell stimulator device operating uniaxial and cyclic strain was developed to stimulate cells cultivated into collagen gel scaffold. A stepper motor and rock gear assembled directly motor shaft in hardware of the device provides linear movement. The stimulation can be applied by stepper motor via assembling scaffold to pins located on edge of rods oriented perpendicular to gear. After osteoblast cells obtained from human bone marrow cultivated into scaffold, dynamic strain applied at 10.000 micro-strain and a frequency of 1,5 Hz, for 24 hours. DNA, protein and alkaline phosphates levels was measured to determine cell proliferation and activities of matrix synthesis of cells. Comparison with control groups osteoblast bone cells on scaffold after stimulation performed by evaluating alignment in the pores by using SEM.

Keywords: Osteoblast, mechanical stimulation, collagen gel

3.GİRİŞ ve AMAÇ:

Doku mühendisliği son yıllarda hızlı ilerleme kat etmiş biyomalzeme alanındaki son gelişmelerden bir tanesidir. Doku mühendisliği araştırmalarında insan hücrelerinin, özellikle kemik hücrelerinin, büyümesini kolaylaştırmak için “yapı iskeleti”nin kullanımını kapsamaktadır. Genellikle doğal maddelerden ya da çok iyi huylu hidrokarbonlardan yapılan yapı iskeletleri metal protezlerin yerine geçen iyi bir yedek malzeme olarak tanınmaya başladılar. Biyomalzeme hasar görmüş doku ve organların minimum cerrahi müdahaleyle işlevlerini yeniden yapabilmeleri için regenerasyonu ya da tamiri amacıyla kullanılır. Kemik doku mühendisliğinin amacı daha işlevsel hücre-malzeme yapısı elde etmektir. Bunu yapmak için hücrelerin farklılaşmasını ve üç boyutlu yapı iskeletlerinde işlevsel ekstrasellular matriksin gelişimini optimize etmek için teknikler gereklidir². Kemikler bedenimizin iskelet yapısını oluşturmaktadır. Bu nedenle fiziksel olaylarla kemik hücreleri çeşitli etkilere maruz kalmaktadır. Fiziksel olayların kemik hücreleri üzerine farklı etkisi olduğu ve bu fiziksel olaylara karşı tepki verdiği bilinmektedir¹.

Kemik hücreleri kemik hasarı oluşan, kemik defektinin olduğu yerde onarım ve yeni oluşum için bir araç olarak kullanılmak istenmektedir. Bu hedef için birçok araştırma yapılmaktadır^{2,3,4,5}. Araştırmaların bir çeşidi de in vitro ortamda kemik hücrelerine mekanik uyarım yaparak uyarım etkisini belirlemektir^{1,2,4,5,7-9,11}. Mekanik uyarıma kemik türevi hücrelerin tepkisi çeşitli in vitro çalışmalar tarafından onaylanmıştır^{12,13}. Cerrahi onarımda var olan altın standart yöntemi otografların kullanımınıdır. Otografların çoğu kez yeterli olmadığı durumlarda, allograft veya biyomalzeme kullanılması sözkonusudur. Ancak yapay ve yabancı bir dokunun halen eksiklikleri vardır. Bunun yanı sıra metal protez ve implantların da birçok sakıncaları sürmekte ve bu sorunların üstesinden gelmek için çalışmalar yapılmaktadır. Bahsi geçen tüm özelliklerin düzeltilmesi, istenen özelliklerde biyomalzeme üretilip tamir ve onarım tekniğinin bulunabilmesi için öncelikle özgül malzeme olarak kemiğin genel olarak yapısı iyi bilinmelidir.

4.GENEL BİLGİLER:

4.1 Kemik:

Kemikler, kemik dokudan oluşmuş sert yapılardır. Şekil ve boyut yönünden 6 tip kemik tanımlanmıştır. Kemikler kompakt ve spongioz kemik dokusundan yapılmıştır¹⁴. Kemik dokusunun esas maddesi, işlev görevi belirli yönlerde uzanan kollajen liflerden ve bu liflerin arasını dolduran ve bunları birbirine bağlayan ara maddeden oluşur. Bu ara maddede, çeşitli anorganik tuzlar bulunur.

Kemik dokusunun en önemli yapı elementlerini teşkil eden organik malzeme olan kollajen liflerin durumuna göre, yapı bakımından kemik dokusu, fibrilli ve lamelli olmak üzere iki esas gruba ayrılır. Fibrilli kemik dokusunda kollajen lifler kalın huzmeler halinde çeşitli yönlerde, bazen birbirini çaprazlayarak, bazen paralel olarak uzanırlar. Lamelli kemik dokusunda esas madde, yeni kollajen lifler ve bunların birbirine bağlayan ara madde, 4,5–11 mikron kalınlığında ince lameller meydana getirirler. Bu lameller içerisinde kollajen lifler birbirine paralel olarak eğik durumda uzanırlar.

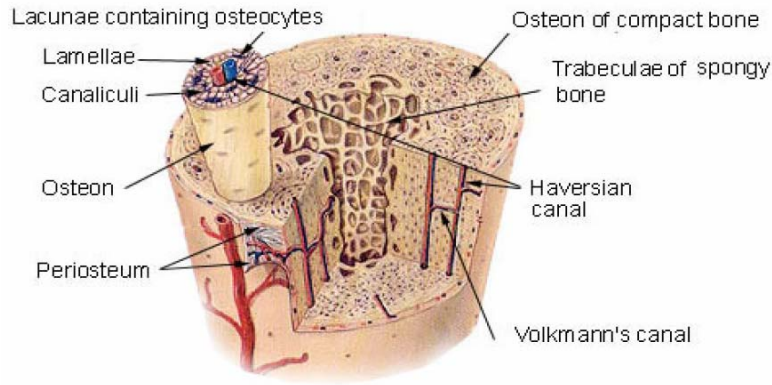
4.1.1 Kemik dokusunun yapısı ve özellikleri:

Kemik dokusunun çeşitli görevleri vardır. En dikkat çeken ise vücudun bir yerden başka bir yere hareketi ve hayati organların korunması için güçlü yapı desteği sağlamasıdır. Bununla birlikte kemik kalsiyum ve diğer mineraller için önemli depo kaynağıdır. Çeşitli hücre tipleri kemik oluşumundan ve muhafazasından sorumludur. Yeni kemik oluşumundan sorumlu ilk hücre tipi osteoblastlardır. Bu osteoblast hücreleri kemik matrisi içinde kendilerini sonunda paketlerler, bu noktada onlar osteosit olarak adlandırılır ve onlar aslında yeni kemik oluşumundan çok kendilerini çevreleyen matrisi korumak için görev yaparlar. Üçüncü hücre tipi çok çekirdekli büyük hücre olan osteoklastlardır. Osteoklastlar parçalanmış ya da hasar görmüş kemiğin yeni kemik tarafından yer değişiminden sorumludur. Bu hücrelerin tümü kemiğin korunması, oluşumu ve yıkımı süreci içerisinde sürekli aktiftir. Kemiğin yapımı ve yıkımı arasında hücre aktivitelerin fazlalığı ve dengesi, mekanik gerilme ve kan kalsiyum düzeyine hormonal tepki dahil çeşitli etkenler tarafından düzenlenir.

Kemik dokusu makroskopik ve mikroskopik düzeylerde tanımlanabilir. Hem görünür hem de moleküler düzeyde farklı yapılar vardır. İç katman süngerimsi kemik olarak adlandırılan çok daha fazla gözenekli dokudan oluşurken makroskopik olarak kemiğin dış katmanı kompakt kemik olarak bilinen yoğun dokudan oluşur (şekil 1). Kompakt kemik içinde hücreler arası matrisin katmanları ve osteositler merkezi kanallar çevresinde osteon olarak adlandırılan eşmerkezli dairesel desen içinde yerleşirler. Osteositler lakuna olarak

adlandırılan kemikte küçük boşluklar içinde bulunur. Bu osteonlar kemiğin uzun eksenine paralel yerleşerek kemiğe gelen baskı kuvvetlerine karşı kemiğin dayanımını artırır(şekil 1).

Osteonların merkezinden boylu boyuna geçen haversian kanalı, damarları ve sinirleri içinde barındırır. Haversian kanalları daha geniş damar ve sinirleri içeren Volkmann kanalları tarafından birbirlerine yatay bağlanır. Kan damarlarını ve sinirleri içeren bu ara bağlantı kanal sistemlerinin hepsi Haversian sistemi olarak adlandırılır. Osteon içerisindeki hücreler kanalikuli olarak bilinen kemikteki küçük açıklıklar vasıtasıyla birbirleri ve haversian sistemleri ile iletişim kurarlar (Şekil 1 ve 2).

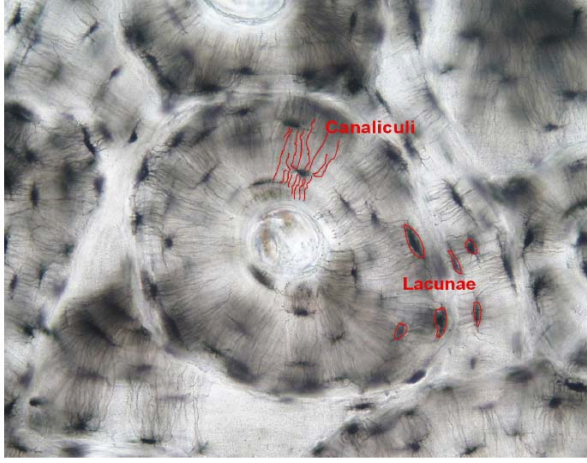


Şekil 1. Kemik içyapısı

http://www.training.seer.cancer.gov/module_anatomy/unit3_2_bone_tissue.html

Kanselöz ya da süngerimsi kemik osteositler içerirken doğal gözenekli yapısında ara bağlantı kanal sistemleri bulunmaz. Kompakt kemikte katı yapıdan daha çok kanselöz kemik daha fazla gözenekli yapı barındırır. Bu örümcek ağı gibi açık yapı süngere benzer. Ağı oluşturan küçük ayrı parça ve kuşaklar kemik mineral, proteinler ve osteositlerden oluşur ve trabeculer olarak bilinir (Şekil.1).

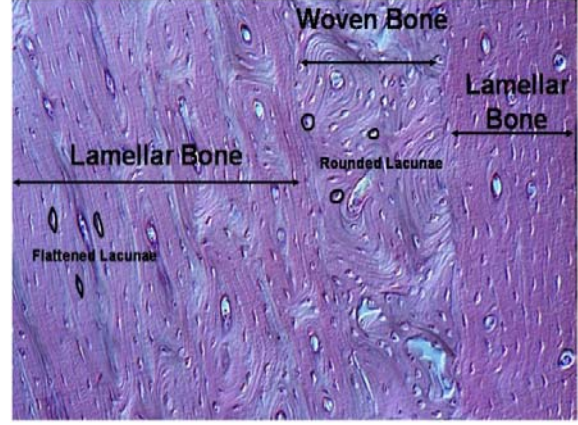
Mikroskopik düzeyde kemik dokusunun iki tipi doğal olarak kompakt kemikte meydana gelir(Şekil 3). İlki tüm sağlıklı yetişkin kemiklerde üretilen katmanlı (lamellar) kemiktir. Lamellar kemik çok düzenli paralel yapı şekil içinde organize olmuş kollajen fiberlerden oluşan olgun kemiktir. Bu paralel yapı kemiğe bir hayli güçlü bir dayanım kazandırır. İpliksi kemik (woven bone) genellikle bazı hasarların kemik dokusunda oluşumundan sonra hızlıca biçimlenir.(kırık iyileşmesi esnasında callus dokunun oluşması gibi). Bu kemik yapı farklı doğrultularda yerleşen kollajen fiberlerden oluşur ve lamellar kemiğin paralel yapısı kadar kuvvetli değildir. Sonuç olarak bu yünsü kemik lamellar kemiğin oluşumu için değiştirilerek iyileştirilir. Bu süreç remodelling (yeniden biçimlenmek) olarak adlandırılır.



Şekil 2 .Bir osteonun histolojik kesiti
(<http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/>)

Şekil 3. Yünsü ve Lamellar kemiğin histolojik kesiti

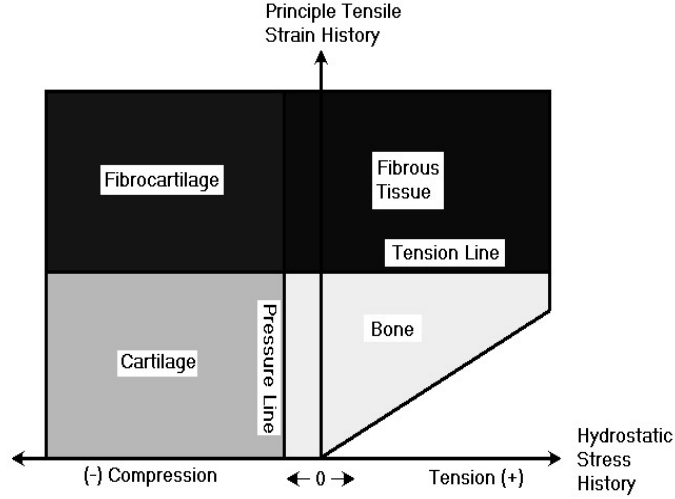
[http://www.lab.anhb.uwa.edu.edu.au/mb140/](http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/)



4.1.2. Kemik iliği kök hücrelerinin farklılaşması

Kemik iliği kemik içerisindeki kovuklarda(lakuna) yer alır ve iki büyük hücre sistemini barındırır. Bunlardan ilki hematopoitik hücreler ve ilik dokusudur. Hematopoitik hücreler kan hücrelerinin ve osteoklastların üretiminden sorumlu hücrelerdir. İlik dokusu hematopoitik hücreleri yapısal ve fizyolojik olarak destekleyen fibroblast, adipositler ve osteoblastları kapsayan hücre gruplarıdır ki ayrıca diğerleri arasında fibroblastlar, adipositler, kondrositler ve osteocitlere dönüşebilecek kök hücre benzeri özellikte hücreleri içeren dokuyu barındırır³⁷. Osteojenik, adipojenik ve kondrojenik hücreleri kapsayan bu hücre hatları yaygın progenitor hücrelerden doğarlar^{38,39}. Benzersiz bir şekilde bu stromal kök hücreleri doku kültür plastiğine yapışacağından ve ilik içinde kalan hematopoitic hücreler yapışmayacağından bu hücreler kolayca büyük miktardaki ilikten izole edilir³⁷.

Osteojenik hatlarda mezenşimal kök hücrelerin farklılaşması morfolojik değişiklikler ile tanımlanan pek çok özgül aşamalar boyunca gerçekleşir^{40,41}. Mezenşimal kök hücrelerin farklılaşmasında etkenlerden biri bile önemlidir. Hormonal etkiler, vasküler tedarik ve mekanik çevre koşullarının hepsi bu hücrelerin farklılaşma sürecinde rol alırlar. Kemik kırıkları ve embriyonik gelişmede doku farklılaşmasında amaçlanan teorilerden biri çevresel faktörlerle ilgilidir; Mezenşimal kök hücreleri hem hidrostatik kuvvetler hem de çevresinde oluşan uzama etkenlerinden oldukça etkilenir⁴² (Şekil 4). Kemik içerisine yerleştirilen yeni aygıtlar kırık iyileşmesinin benzersiz oluşum sürecinde hesaba katılabildiği ve yeni implant etrafında hücre farklılaşmasının aynı ilkelerinin kullanılabileceği dikkate alınmalıdır.



Şekil 4. Doku farklılaşması teorisi⁴²

Osteoblasta farklılaşmadaki ilk adım osteoprogenitor hücrelerin oluşumudur. Kendi kendini yenilemede temel olarak yetenekleri olmasa da İn vitro da bu hücreler çoğalmaya muazzam eğilim gösteriler⁴³. Olgun ve olgunlaşmamış osteoprogenitor hücrelerin arasındaki fark osteoblastlara dönüşmek için kendi içinde barındırdığı yeteneğinden kaynaklanır. Olgunlaşmamış hücreler osteoblastlara dönüşmek için özgül tetikleyici etkenlere ihtiyaç duyarken, olgun hücrelerin tetikleyicilerin yardımı olmadan kendiliğinden osteoblast oluşumu gösterebilirler^{44,45}. Bu tetikleyiciler 1,25-dihydroxy vitamin D₃ (1-25-OH D₃), kemik morfojenik protein-2 (BMP-2), deksametazon gibi bazı glukokortikoidleri, temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF) ve dönüştürücü büyüme faktörü gibi temel steroid hormon olan glukokortikoidleri içerir.

Osteoprogenitorü izleyen farklılaşmanın bir sonraki aşaması pre-osteoblastlardır. Bu hücreler tamamen son oluşan osteoblastların özelliğinde olmamalarına rağmen küçük miktarlarda aktif matriks mineralizasyon göstergesi olan alkaline fosfataz üretirler. Son osteoblast kemik matriks biçimlenmesinde kullanılan tüm ürünleri meydana getiren üreme/çoğalma süreci sonrası oluşan hücredir. Bunlar kollajen tip 1, osteokalsin ve osteopontini içerir. Bu hücreler kendilerine özgü olan büyük miktarda alkaline fosfataz ya da ALP ürettiklerinden ayrıca bunlar kemik matriksini tamamen mineralleştirme yeteneğine sahiptirler^{40,41}. Bu enzim kemik kollajen matris içinde kalsiyum fosfataz kristallerinin depolanmasını kolaylaştırır.

4.1.3. Alkalin Fosfataz (ALP):

Kemikte osteoblastların hazırladığı gözenekler arasında yer alan osteoid yapının içine Ca tuzları çökerek bu organik matriksi sertleştirirler, böylece mekanik zorlanmalar karşısında kalan kemiğin dayanma gücünü arttırırlar. Matriksteki ara madde içine Ca tuzları çökmeden önce osteoblastlar sitoplazmaları içinde bol miktarda alkalin fosfataz enzimi hazırlarlar ve bu enzimi sitoplazmaları dışına salarlar. Osteoblast hücrelerinden salınan kabarcıklar sonrasında in vitroda matrik mineralizasyonunu mümkün kılan ALP içermektedirler¹⁵. Böylece ekstrasellüler olarak fosfataz enzimi de ara madde içinde birikmiş olur. Bu şekilde osteoblastların salgıladığı alkalin fosfataz enziminin kemik mineralizasyonunda önemli bir işlevi, bir aracılık rolü bulunmaktadır.

Kemik oluşurken ya da ossifikasyon süreci ilerlerken alkalin fosfatazların açığa çıkması oldukça önem kazanan bir durumu yansıtmaktadır. Fosfatazlar yalnızca Ca tuzlarının organik matriks içerisine yerleştirilmesinde etkin bir rol oynamakla kalmazlar, ayrıca kollajen fibrillerin oluşmasında da bir işlevlerinin olduğu açıklanmıştır^{16,17}. Tüm ALP aktivitesi osteoblast işlevinin güvenilir bir delili olarak tanımlanır^{15,18}. Ayrıca ALP kemik oluşan tümörlerde osteoblastik aktivite için bir işaretleyici olarak kullanılır.

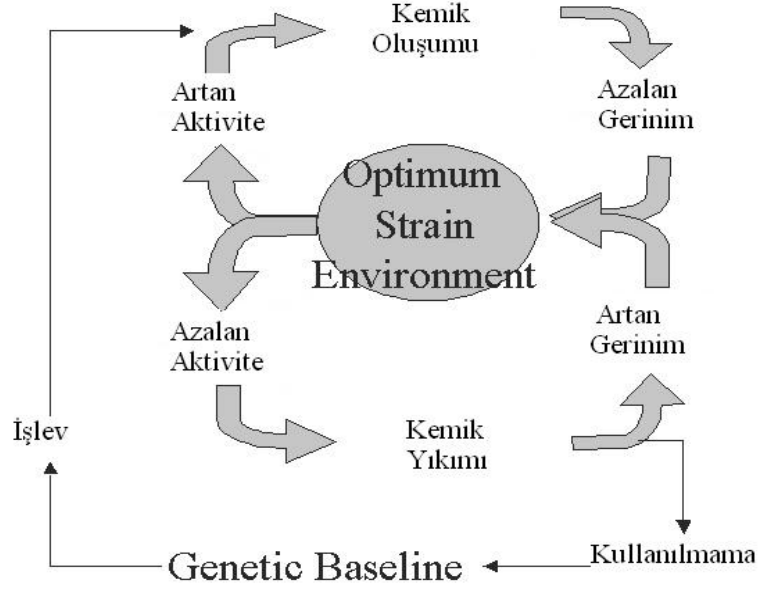
4.2 Kemiklerde Mekanik Etki:

Kemikler başlıca iki önemli kuvvetin etkisi altında kalırlar. Bunlardan biri ağırlık, diğeri de kemiklere yapışan kasların çekme kuvvetidir. Boşlukları sınırlayan bölmelerin durumu, basınç ve çekme kuvvetinin en çok etki gösterdiği yönlere göre ayarlanmıştır. Bölmeler arasında uzanan ve bunları birbirine bağlayan ince kemik parçaları, bölmeleri destekler ve durumlarını sağlamlaştırırlar.

Wolf kanununa göre kemiğin genetik modele göre gelişmesi veya kırılan kemiğin iyileşmesi ve yeniden şekillenmesi, kemiği uzun eksenini doğrultusunda etkileyen stres kuvvetlerinin yarattığı elektromanyetik alan sayesinde olur²². Kemik oluşumu uygulanan kuvvetlere karşılık doku boyunca gözlemlenebilir. Pek çok çalışma farklı yerçekimi kuvvetlerinden hücre kültür çalışmalarına dek değişen çevre koşullarının etkisini değerlendirmiştir^{3,23-25}. Bu çalışmaların hepsi bir temel prensibi göstermektedir: Aktivite arttığında kemik kütlesinde artışa, azaldığında ise kemik kütlesinde azalmaya neden olur. Bu hipotez ideal düzeyde gerilmeyi koruyan özgül biyomekanik çevre koşullarını sağlayan kemik genel anlayışına dayanır.

Aynı mekanik kuvveti veren mekanik uzamayı azaltarak kendi kendine sertleşmesi için matriks yığınının artmasıyla, kemik artan uzamaya tepki verir. Bu fikir belki de Rubin

tarafından geliştirilen ve yaygın bir şekilde vurgulanan diyagram ile en iyi şekilde açıklanır⁴⁶ (Şekil 5). Bu varsayımın pekişmesi hayvanları özgül mekanik yük etkisine maruz bırakan ve kemik oluşumunda artma ya da azalma gözlenen pek çok in vivo hayvan çalışması ile sağlandı⁴⁶⁻⁴⁹. Kemiğin uzama ortamını nicel olarak belirlemek için çeşitli çalışmalar yürütüldü. İnsanlarda koşma hareketi gibi yorucu hareketler esnasında uzun kemiklerde karşılaşılan ortalama azami uzama yaklaşık 850 mikro-strain, yürüyüş gibi daha az etkisiz hareketlerde ise 400 mikro-strain'dir⁵⁰.



Şekil 5. Kemik adaptasyonu hipotezi diyagramı

Ayrıca kemik kırıklarında da mekanik yüklenme çalışmaları da yürütüldü. Bazı çalışmalar harici sabitlenmiş kırığın hem pasif hem de aktif yüklenmenin yoğunluğu ve bazı durumlarda kırık çevresinde kallus oluşumunun kalitesini artırdığını gösterdi⁵¹. Bu çalışmalar yeni kemik oluşumuna sebep olan mekanik kuvvetlerin etkileri ve özellikleri ile ilgili büyük bir anlayış ve bilgi sağlar. Ancak çalışmalar daha kaliteli doku değil, daha çok kemik dokunun oluşumuna dikkat çekiyor. Bu durumdaki en iyi tedavi çok kaliteli kemiğin çok çabuk üretilme ve böylece kırıkta tamamen iyileşmenin olası en kısa zamanda gerçekleşmesidir.

4.2.1 In Vitro Mekanik Uyarım Çalışmaları:

In vitro ortam koşullarında mekanik uyarıma kemik hücrelerinin yanıtına ilişkin birçok araştırma yapılmaktadır. Halen detayları bilinmeyen bu konu üzerine çok çeşitli uyarım teknikleri ile çalışılmaktadır. Bu araştırma yöntemleri tendonlar, kemik hücreleri, endotel hücreleri, kalp kas ve damar hücreleri dahil kullanılan birçok hücre/doku çeşitlerinde

değişir^{7,9-12}. Ayrıca proliferasyon, morfoloji, DNA sentezi, protein vb. birçok yanıt çeşidi de araştırılır^{1,2,5}.

4 nokta bükme yöntemi çok yaygındır^{12,27,33}. Hücrelere mekanik uyarımın in vitro da diğer bir yöntemi ise uzunlamasına germe sistemleridir^{12,13,28-31,33}. Vakum sistemleri hücre ekilmiş substrata etki ettirmek için kullanılmaktadır^{32,33}. Diğer sistemler hidrostatik sıkıştırma özelliğini kullanarak hücrelere doğrudan eşit dağılımlı uyarımı kapsamaktadır. Sıvı dibine ekilen hücreler cendere türü bir kapta basınç yaratılarak uyarım sağlanır^{25,33}. Akışkan sistemleri ile yüzey üzerinde kayma gerilmesi oluşturulur. Kayma gerilmesini kullanarak hücrelere mekanik olarak uyarım yapılır^{24,33}. Bu akışkan modeller için kayma gerilmeleri tahmin edilir ya da teorik olarak hesaplanır.

4.2.2 Hücrelere gelen mekanik kuvvetler:

Bedimizdeki tüm hücreler kendi kendine yarattıkları ya da çevreden kaynaklanan mekanik kuvvetlere maruz kalırlar. Vücut içindeki yerine göre hücreler basınç, kayma gerilmesi, sıkıştırma ve germe gibi çeşitli kuvvetlere maruz kalabilirler. Bu harici uygulanan mekanik kuvvetler normal doku dengesi ve yeniden yapılanmasında önemli rol oynar. Örneğin yerçekimi kuvveti kemik oluşumunu kontrol eder, iskelet kaslarına gelen mekanik yüklenme kas kütesini belirler ve mekanik kuvvetle ilişkili kan akımı vascular duvarların metabolik dengesini düzenler⁵²⁻⁵⁴. Hücreler üzerinde etkisi olan tüm dış kuvvetler temel hücresel olayları (hücre bölünmesi, üremesi vb.) gerçekleştirmek için çeşitli içsel kuvvetlere dönüştürülerek dinamik bir arka planda hücrelere tesir eder. Hücreler dış yüklenmede değişiklik algıladığı zaman çabucak harici kuvvetlere karşılık vermek için içsel kuvvetlerini değiştirirler. İçsel, dönüştürülen kuvvetler ve harici kuvvetler arasındaki denge, hücrenin geleceğini belirleyen anahtar bir etkidir^{51,55}.

Doku mühendisliği uygulamalarındaki mekanik kuvvetlerin önemi açıktır. Doku mühendisliğinin asıl amacı hasar görmüş vücut parçalarının yerini alacak yapay dokuların üretimidir. Vücut dışında işlevsel bir doku üretebilmek için fizyolojik koşulların temel parametrelerini yerine getiren in vitro kültür çevre ortamı oluşturmak gereklidir. İn vivo mikro çevre koşullarının biyokimyasal yönlerini anlamak için büyük adımlar atılıyor. Ancak aynı düzeyde anlaşılma durumu mekanik destek için oluşmamıştır. Vücuttaki memeli hücrelerin mekanik çevre koşulları harici yüklenme ve hücreler arası gerilme arasındaki karmaşık bir denge tarafından tanımlanır. Bu bölümün amacı mekanik mikro çevre koşulları ile her bileşenin özelliklerini incelemek ve doku mühendislik uygulamalarında onların implikasyonlarına ışık tutmaktır.

4.2.3 Hücre işlevinde harici uygulanan mekanik kuvvetlerin rolü:

Hücreler yaşamları boyunca yaygın fizyolojik süreç sırasında çeşitli mekanik kuvvetlere maruz kalırlar. Bu dış kuvvetleri algılayabilme kabiliyeti özelleşmiş duyu organlarında hücrelerin benzersiz bir niteliği değildir fakat bu kabiliyet diğer hücre tipleri tarafından da kullanılmaktadır. Ayrıca pek çok duyu organı olmayan hücreler hücre büyümesi, işlevi ve yeniden yapılanmasının düzenlenmesi için uygun mekanik giriş uyarımı ile hareket eder. Örneğin yerçekimi basınç kuvvetleri kemik oluşumunu kontrol eder ve iskelet kaslarına gelen mekanik yüklenme kas kütlelerini belirler; uzun süreli yatak istirahati ya da mikro yerçekimi gibi azalan mekanik yüklenme koşulları altında kemik ve kas kütlesi çabucak kaybolur⁵²⁻⁵⁴. Mühendislik açısından normal koşullar altında hücrelerin dokuya etkiyen net harici kuvvetlerde artışı doku kütlelerinin ya da diğer tepkilerin artmasıyla içsel gerilime dönüştürdüğü görünüyor^{56,57}. Bu şekildeki tepkiler daima yararlı değildir ve kronik yüksek kan basıncına neden olan kardiyak ve vasküler hipertropi gibi patolojik hallere katkıda bulunabilir. Genel olarak fizyolojik oranlar dışındaki kuvvetlerin ters sonuçlara yol açabileceği düşünülüyor^{57,58}.

Tablo 1. Hücrelere ve dokulara uygulanan mekanik yüklenme uygulamaları

Gelişen kuvvetlerin aygıt/yöntem ismi	Öncül Kuvvet	Aygıtın İç ve Dış Akışkan Akımı	Yorumlar
Koni ve Plaka	Kayma gerilmesi	Yok	İkinci derecede akımlar olabilir.
Paralel Plaka adım odacığı	Kayma gerilmesi	Var	Akışkanın aygıtı girdiğı yerde tamamıyla laminar akım oluşturulmamış olabilir. Basınç, pozisyon fonksiyonu olarak doğrusal bir şekilde değişir. Fakat bu değişim çok küçük olduğundan çoğunlukla göz ardı edilir.
Uniaxial gerilme	Pozitif gerilme	Yok	Akışkana bağlı olarak hücrelerin hızından dolayı kayma gerilmesi de oluşabilir.
Biaxial gerilme	Pozitif gerilme	Yok	Akışkana bağlı olarak hücrelerin hızından dolayı kayma gerilmesi de oluşabilir.
Gaz ilavesiyle gaz fazında sıkıştırma	Basınç	Yok	İdeal olmayan akışkan olduğu için çözünmemiş gazların konsantrasyonu değişir.
Sıvı fazda direkt sıkıştırma	Basınç	Yok	Gaz fazı yok.

Hücre büyümesi ve işlevini etkilemek için mekanik kuvvetler geleneksel kimyasal uyarımla aktive olan aynı sinyalizasyon yollarını tetikleyebilir. Çok sayıda çalışma, kuvvetlere yanıt olarak hücreler tarafından oluşturulmuş pek çok biyokimyasal olayların kimyasal uyarımın tanınmasından sonra meydana gelen olaylar ile benzer olduğunu göstermektedir.^{54,56,57} Hücrelere biyokimyasal sinyalizasyon yolları tesir eden belirli mekanizmalar tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır ve halen aktif araştırma konusudur.

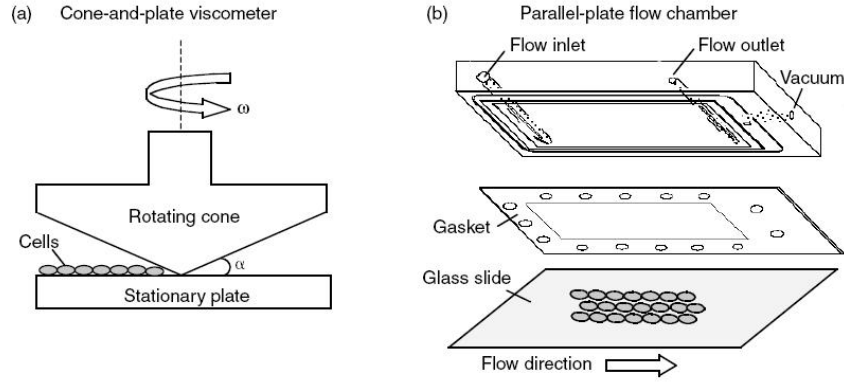
4.2.4. İn Vitro Hücrelerin Mekanik Uyarımı için Kullanılan Aygıtlar ve Yöntemler:

Karmaşık in vivo çevre koşullarında, diğer mekanik kuvvetlerin varlığı ve çok sayıda kimyasal faktörlerin karışımından dolayı mekanik tesir iletim sürecinde özel sinyalizasyon yollarının rollerinin taslağını oluşturmak ve özgül kuvvetlerin kesin etkilerini açıklamak zordur. Bu nedenle mekanik uyarıma hücrel yanıt üzerindeki araştırmalar daha çok in vitro sistemleri kullanarak yapılır. Yukarıdaki tabloda genel olarak kullanılan yöntemlerin özeti yapılmıştır⁵⁷. Bu aygıtlar çok sayıda hücreye fizyolojik yüklenmeyi ileten iyi tanımlanmış mekanik uyarım uygulamalarıdır. Birbirinden ayrı hücrelere kuvvet uygulamak için teknikler geliştirilmiştir.

1- Kayma gerilmesi

Dokular arası gerçekleşen akımdan dolayı çoğu hücre çeşidinin akışkan gerilmesine maruz kalması muhtemeldir. Ancak hücre davranışında kayma gerilmesinin etkileri sabit olarak kan akımına maruz kaldığı için çoğunlukla vasküler endotel hücrelerde çalışılır. Kayma gerilmesi in vitro çalışmaları için kullanılan iki yaygın akım sistemi koni-ve plaka viskometreleri ve paralel plaka akım odacıklarıdır. Şekil 6.a'da gösterilen şekilde koni-ve plaka viskometre aygıtında hücreler tablanın üzerine yerleştirilir. Sıvı koni ve plaka arasındaki boşluğa doldurulur ve koniyi döndürerek akışkan akımı elde edilir. Şekil 6.b'de resmedilmiş paralel düzlem akım odacığında diktörjen akım kanalının tabanını oluşturan cam lam üzerine hücreler ekilir. Akım etkileyen basınç tarafından hücre yüzeyi üzerinden akıtılarak oluşturulur. Her iki aygıtta hücrelerin yüzeyine etkileyen üniform kayma gerilmesi oluşturulur. Hidrodinamik teori kullanarak A ve B şıklarında gösterilen iki aygıt için kayma gerilmesi ve hız profillerinin tanımlanması için farklı tipte türeyen cihazlar başka kaynaklarda da tanımlanmıştır^{59,60}. Hesaplanan kayma gerilmesi genellikle normal sınırlar içerisindedir. Hücresel düzeyde uzunluk ölçeğinde kayma gerilmesinin büyüklüğü ve gradyanı hücre yüzey topografyası ile değişiklik gösterebilir⁶¹. Buna ek olarak akışkan sıkıştırılmayan newtonien akışkan olarak farzedilir. Eğer su araştırmada kullanılan biyolojik akışkanın baskın bileşeni

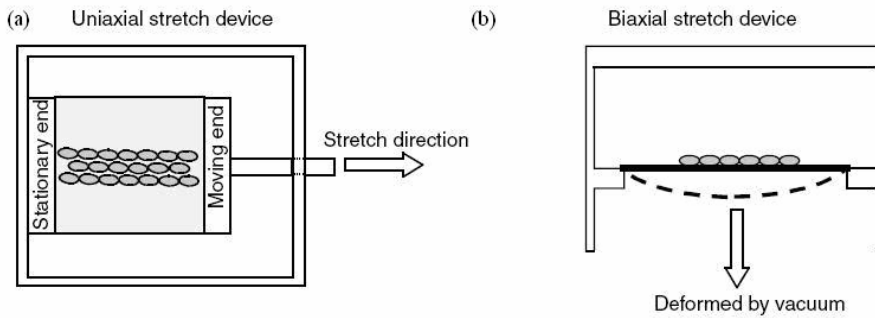
ise sıkıştırılmayan olarak kabul edilmesi geçerlidir. Ancak kan gibi diğer biyolojik akışkanlar Newtonian akışkan değildir ve bu nedenle tahmin doğruluğu kısıtlanır⁵⁷.



Şekil 6. a) Koni-ve plaka viskometre b) Paralel düzlem akım odacığı

2-Germe

Çok farklı hücre tipleri normal fizyolojik süreçler esnasında sürekli olarak germeye maruz kalırlar. Örneğin Aort damar duvarındaki hücreler kanın çarpıntısından dolayı siklik gerilmeye maruz kalırlar ve iskelet sistemindeki hücreler hareket ya da yerçekimi ya da her iki etki nedeniyle siklik gerilmeye maruz kalırlar. Hücreler üzerinde in vitro germe etkisinin çalışmaları için yaygın bir yöntem silikon membran benzeri esnek substratlar üzerinde hücre ekimini kapsar ve sonra kontrollü uzama büyüklüğü frekansı ve süresi ile birlikte membran gerdirilir. Hücreler tek taraflı ya da çift taraflı gerdirilir (Şekil 7. a ve b). Bu tip hücre deformasyon aygıtlarının doğal sorunları vardır. Bu sorunlardan bir tanesi hücrelere iletilen yükün hücre ile yapıştırıldığı substratlar arasındaki adezyon durumundan bağımsız olmasıdır. Substrata tamamen yapıştırılmayan hücreler tamamen yapıştırılmış olanlar gibi aynı germe miktarına maruz kalmazlar. Bunun sonucunda veriler yanıltıcı olabilir⁵⁷. Diğer bir problem ise besin ortamının hareket hızından dolayı akışkandan kaynaklanan kayma gerilmesinin substrat deformasyonunun tesiri ile aynı anda olmasındandır^{33,57}. Bu nedenle deneysel tasarım ve yorum kayma gerilmesi ve germe uyarımlarının bağlı katkısını hesaba katmak gerekir.

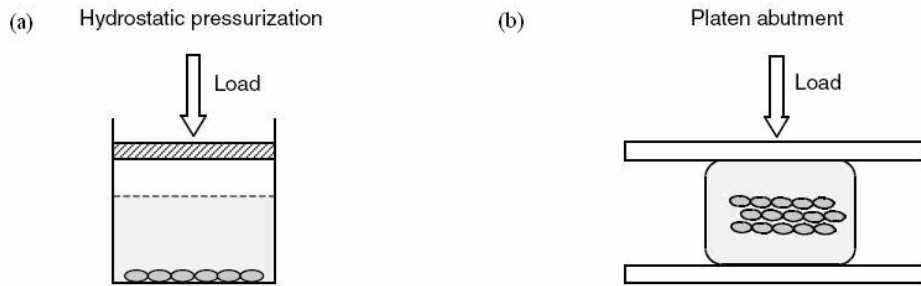


Şekil 7. a) Tek yönlü germe aygıtı b) Çift yönlü germe aygıtı

3- Basınç

Hidrostatik basınç hücre işlevinde artırılan basıncın etkilerini araştırmak için kullanılır³³ (Şekil 8. a). Bu yaklaşım yöntemi kolaydır ve devirli ve statik yükleme iletelebilmeye imkân sağlar. Ancak gaz fazın artırılan basıncından dolayı çözünmemiş gazların konsantrasyonunda meydana gelen artış hücre işlevlerini etkileyebilir, bu sistem de gözlemlenen etkilerin gaz konsantrasyonundaki değişiminde mi yoksa basınçtan mı kaynaklandığını belirlemek zordur⁵⁷. Bu sorunun üstesinden gelmek için 2 yöntem geliştirilmiştir. Biri gaz fazın olmadığı bir ortamda direk olarak akışkanı sıkıştırmak ve diğeri de biyolojik olarak aktif gazların (O₂, CO₂ vb.) etki ettikleri kısmi basınçları korunurken tesiri olmayan gazların eklenmesiyle (Helyum vb.) basıncı artırmaktır^{33,57}.

Sıkıştırma gerilimine ulaşmanın alternatif yaklaşımı doğrudan platin tabla kullanmaktır(Şekil 8. b). Bu yaklaşımda 3 boyutlu numune örneği 2 tabla arasına yerleştirilir. Alttaki tabla durağan kalırken, üstteki tabla etrafı tamamen kapatılmamış uniaxial sıkıştırma ya da tamamen çevrelenmiş sıkıştırma uygulayabilmek için aşağıya doğru bastırılır. (Numuneler yan taraflardan serbestçe genişleyebilmesi için numunelerin dikey destekleri yoktur.) Bu aygıt statik ve siklik sıkıştırma gerilimi uygulayabilir. Direk platin tabla kullanımı germe aygıtlarda karşılaşılan sorunlara benzer doğal sorunları vardır: Hücelere uygulanan yüklenme hücre-matriks adhezyonuna ile fazlasıyla ilişkilidir. Buna ek olarak çok sayıda değişken sıkıştırma uzaması ile birlikte meydana gelir³³.(akım, uzama gerilmesi, numune hacmindeki değişimler vb.) Bu etkiler deneyler için kullanıldığı zaman sıkıştırmadan kaynaklanan etkilerden diğer değişkenlerden kaynaklanan etkileri ayırabilmek için doğru kontrolü içermesi önemlidir.



Şekil 8. a) Hidrostatik basınç b) Tabla

Son olarak daha önce kullanılan tüm aparatlarda hücreler statik koşullardan etki ettirilen mekanik uyarıma -geçişte- genellikle aniden maruz bırakılır. Ani mekanik başlangıç uyarımının hücre yanıtına neden olan bazı kuvvetler üzerinde derinsel (çok büyük) etkisi olduğu bulunmuştur^{62,63,65}. Aygıtlarda gerilimin detaylı nümerik analizi istenmeyen etkilerin

saptanması ve uzaysal olarak gerilimin dağılımının saptanması dahil araştırılan mekanik gerilimin zaman geçmişi tanımlamak için dahi bilgi sağlayabilir^{33,57}.

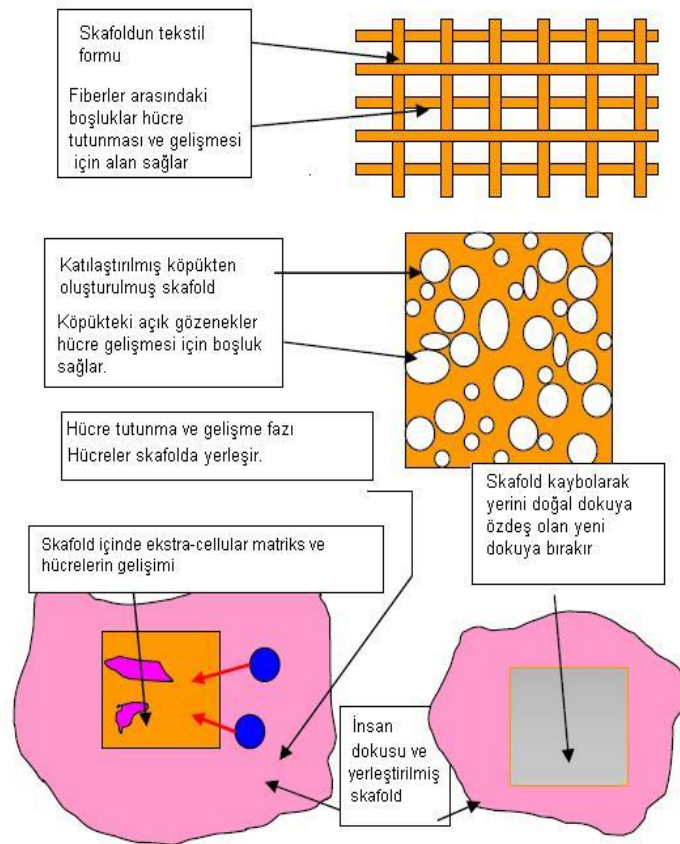
4.2.5 Doku Mühendisliğinde harici uygulanan mekanik kuvvet uygulamaları:

Statik koşullar altında geleneksel hücre kültür teknikleri hücelere gelişme ortamı sağlar: büyük boyuttaki biyoreaktörler (akışkan yataklı reaktörler, spinner flasklar, dönen kanallar vb.) akım ve karışım örnek aygıtlar 3 boyutlu skafoldlarda gelişen dokulara verimli bir şekilde kütle iletimi sağlar. Uygun hücre fizyolojisinde harici uygulanan mekanik kuvvetlerin önemi ortaya çıkarken, doku mühendisleri biyoreaktör tasarımları içinde mekanik gerilmeleri kullanarak adapte ettiler ve fizyolojik yüklenme in vitroda yetişen dokular ve hücreler üzerinde olumlu etkiye sahiptir. Örneğin artan akışkan tarafından kaynaklanan kayma kuvvetleri 3-D titanium fiber ağ skafoldu içinde sıçan iliği osteoblastı tarafından mineral depolanması önemli bir şekilde artar^{66,67} ve kollajen jel içinde vasküler düz kas hücrelerine siklik germe uygulamaları büzülüp kasılan düz kas hücrelerinin fenotipini muhafaza etmeye yardımcı olabilir, doğru fizyolojik oryantasyonda onları hizalar ve hücre jel birleşim karışımlarının mekanik özelliklerini geliştirir^{68,69}. Kıkırdak doku mühendisliği kapsamında araştırmacılar siklik kompresif yüklenme altında yapay kıkırdak gelişiminin özellikleri durağan şekilde büyüyenlerden daha üstün biyokimyasal kompozisyonu ve malzeme özelliklerine sahip olduğunu bulmuşlardır^{70,71}. Ayrıca siklik kompresyon daha sonradan düz kas hücrelerini kondrositlere farklılaştıran büyüme faktörünün sentezine yol açarak tavşan kemik iliği düz kas hücrelerinin kondrogenesi tetikler⁷². Bu sonuçlar uygun mekanik uyarımın in vitro da doku gelişiminin bir belirleyici faktörü olabileceğini ve vücutta mühendislik dokularının performansının gelişebileceğini göstermiştir.

4.3 Doku İskeletleri

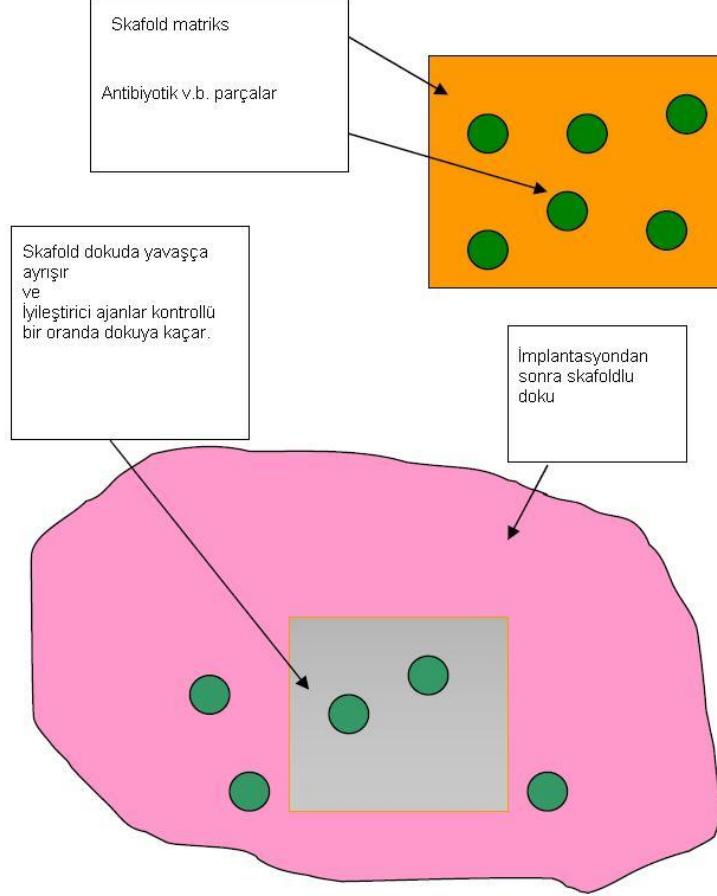
Doku mühendisliği son 20 yılda hızlı ilerleme görülmüş biyomalzeme alanındaki son gelişmelerden bir tanesidir. Bu teknik hasar görmüş doku ve organların minimum cerrahi müdahaleyle fonksiyonlarını yeniden yapabilmeleri için tamiri ya da regenerasyonu amacıyla kullanılır. Doku mühendisliği insan hücrelerin büyümesini kolaylaştırmak için “iskelet (skafold)’in kullanımını kapsar. Doku iskeletinin benimsenmesi için ilk girişim kaynağı, bağışıklık sisteminin madde reddini korumak için ilaçların uzun süreli yönetiminin ve donör organlarının eksikliğidir. Autografların kullanımı ile transplantasyondan (başka insan tarafından dokunun sacrifiye anlamına gelir) kaçınmak mümkün olsa bile, önemli sorunlar bulunmaktadır. Dokunun kesildiği yerde morbidite ve diğer hasta ile ilgili sorunlar (uygun dokunun olmaması ya da azlığı gibi) olabilir. Doku iskeletleri, organ oluşumu ve doku

regenerasyonu meydana gelirken doku ya da hücreleri destekleyen 3 boyutlu yapılardır. İskelet biyobozunabilir polimerden üretilir. İskelet genellikle dokulara besin taşınması ve hücre desteği için geçici kafes yapı sağlar. Doku ve hücrelerin yeniden oluşması beklenir bu nedenle güvenli bir şekilde kabuk değiştirip atılacak iskelet yapıya izin verilir. Metal malzemeler sert dokunun regenerasyonu için iskelet olarak kullanılır. Metal iskelet yapılarla ilgili sorunlardan bir tanesi gerilme yığılması (stres shielding) etkisidir. Bu kısıtlama polimerik iskelet kullanılarak üstesinden gelinir. Doku mühendisliğinde iskelet geliştirilmesi için yapılan ilk çalışmalara rağmen henüz çözülmesi gereken sorunlar vardır. Biyobozunur iskeletler de işlevsel olarak yenilenmesi gereken doku/organın regenerasyonundan sonra bedende bozunması ya da ayrışması beklenir. Doku iskeletleri kalp kası ve eklem kıkırdağın yeniden gelişebilmesi açısından önem kazanıyor. Böylece kalp ve eklem rahatsızlıkları için tedavi sağlıyor. Uygun bir iskelet var olmadıkça kıkırdak ve kas gibi özelleşmiş dokuların yenilenemeyeceği biliniyor. Genellikle doğal maddelerden ya da çok iyi huylu hidrokarbonlardan yapılan iskeletler metal protezlerin yerine geçen iyi bir yedek malzeme olarak tanınmaya başladılar. Bir iskeletin yapım ve amacı aşağıdaki şekilde şematik olarak gösterilmiştir(Şekil 9).



Şekil 9. Doku iskeletinin yapımı ve amacı

İskeletin daha özgün ikinci tipi, parçaların yada farmasotik yabancı maddelerin yada antikor gibi v.b maddelerin iskelet yıkıcı olarak derece derece salındığı ilaç salınım sistemidir. İskeletler tarafından salınan ilaç mekanizması şematik olarak şekil 10’da gösterilmiştir.



Şekil 10. Doku iskeleti kullanarak hedefe ilaç salınımı

4.3.1 Yapı iskeletleri ile doku mühendisliği:

Mevcut olan doku mühendisliğinin ana uygulamaları ortopedi, kalp ve sinir dokudur. Tüm bu uygulamalar yüksek derecede özel hücreler ve extra-cellular matriksten oluşan doku yenilemesini kapsar.

Doku iskeletlerinin ortopedik uygulamaları eklem kıkırdağının kaldırıldığı yere skafold malzeme bloğunun implante edilmesini içerir. Kıkırdak hücreleri doku iskeleti içinde olgunluğa eriştiği zaman kıkırdak kayan yüzeylerde restore edilir. Doku skafoldlarının başka ortopedik uygulamaları implant kusurlarından gelen doku enflamasyonu gibi hatalar nedeniyle kaybedilmiş kemiğin restorasyonudur. Bu uygulamada cam ve apatit karışımı olan biyoaktif camdan oluşturulmuş bir skafold gözenekli bir yapıda oluşturulur. Osteo-progenitor gibi kemik oluşum hücreleri daha sonra gözeneklerin içine gömülür⁷⁵. Çalışmaların büyük bir kısmı, biyolojik olarak parçalanabilen kemik doku yapı iskeleti ve hidrojeller kullanan,

kıkırdak doku mühendisliği üzerine yoğunlaşmıştır⁷⁹. Bunlar, kollajen, glikozaminoglikan, hiyaluronik asit, agros, jelatin ve alginat asitlere dayanan, çok çeşitli tabii jeller ve hidrojellerdir⁸⁰⁻⁸². Polilaktik, poliglikolit ve bunların kopolimerleri gibi polihidroksiasitler de çeşitli geometrilerde üç boyutlu yapı iskeletleri olarak kullanılmaktadır⁸⁰.

Kalp hastalıklarının tedavisi için öncü gaye hastaların kalplerinin zayıflayan alanına sonradan yerleştirilecek kalp kasının yamalarını geliştirmek için kabiliyet kazandırmaktır. Sinirsel problemlerin tedavisi için bir tüpsü skafold ayrılmış sinir liflerinin yeniden yetişmesine kolaylık sağlar. Bu düşme veya başka etkilerden sonra neden olduğu felç için tedavi sağlar.

Doku skafoldlarının önemli bir uygulaması yüz çene kafatası rekonstrüksiyonudur. Araştırmalar yüz ve çene ve kafatası cerrahisinde yıllık 3.5 milyar dolar harcandığını göstermektedir. Şu an bu alanda titanyumun biyouyumluluğu ve mekanik dayanımından dolayı titanyum ağırları kullanılır. Ancak dünya genelindeki araştırmacılar bu şekildeki rekonstrüksiyonlar için polimerik skafoldların kullanımını araştırıyor. Rekonstrüksiyon için polimerik skafoldların kullanımı dikkate alınıyor ve uygun malzemeler ve dünya genelindeki araştırmacılar yöntem araştırıyor.

4.3.2 Biyobozunur polimerler ve biyoaktif yüzeyler:

İskelet malzemesinin sahip olması gerektiği önemli özelliklerden birisi iskelet malzemesinden gelen bozunan ürünlerin toksik olmamasıdır. Doku iskeletlerinin önemli bir uygulaması ilaç salınım sistemleridir. Günümüzde farklı tipteki malzemeler özel uygulamaya bağlı olarak iskelet yapının imalatı için kullanılıyor. Doku iskeleti olarak kullanılan polimerler belli başlı iki grup altında sınıflandırılabilir ki bunlar doğal ve sentetik polimerlerdir. Polilaktik asit yada policolik asit ve onların türevleri, polikaprolakton v.b. malzemeler sentetik biyobozunur polimerlerin kategorisine girerken, kollajen ve aljinat doğal polimerler kapsamındadır. Ancak asit ve baz gruplu polimerlerin bozunumu yerel pH değerlerini değiştiren asit ve baz grupların salınımını yapar. Yerel pH değerlerindeki değişim iyileşen dokunun geleceğini etkiler. Buyüzden iskelet tekniğinin amacını bozar. Bu kısıtlamanın çaresi herhangi ters reaksiyona neden olmayan bozunabilir, vücutta emilmeye eğilimli biyoçözünür malzemelerin kullanımınıdır. Tüm biyobozunur polimerler hasarlı doku ya da organ yenilenirken başlangıçtaki hücre ekimi ve bozunma zamanı esnasında minimum mukavemete sahip olması için tasarlanır. Hemen hemen tüm biyobozunur polimerler ana ögesi su olan vücut akışkanlarının varlığında hidroliz bozunmasına maruz kalır.

Biyobozunur polimerler lif, tanecik ya da köpük gibi farklı formlarda işlenebilir. Köpükler iskeletler içindeki form olarak en iyi şekilde uygulanırken fiberler (lifler) gözenekli ve birleştirilmiş yünsü ağ yapımı için kullanılır. Arzu edilen gözeneklilikte 3 boyutlu yapı imalatı için kullanılan çeşitli teknikler var. Bu tekniklerden bazıları 3 boyutlu yazıcı, birleştirilmiş model (fused deposition modeling), tanecik filtreleme (particulate leaching), malzeme dökümü (solvent casting) gibi teknikleri kapsar.

Skafoldların önemli gereksinimlerinden biri ekilmiş hücrelere besin iletimini kolaylaştırmak için gözenek ağını birbirine bağlanmasıdır. Hızlı prototipleme teknolojisini kullanan teknikler (3-D yazıcı) gözenekli ve birbirine bağlanan belirli bir yapı üretebilmektedir. Ancak Bu teknikler mukavemet dayanımı bakımından yoksun ya da bağ yapıcı olan toksik organik çözücüler kullanır ki buda onların kullanımını kısıtlayan bir faktördür. Skafold imalatı için geliştirilen teknikler insan organlarının parçalarını taklit eden 3- boyutlu karmaşık şekillerin dokunmasıyla hızlı bir şekilde ilerlemektedir⁷³.

Ayrıca destek yapının işlevine hizmet eden bir skafold doku yetişmesi/hücre çoğalması ve farklılaşması için arzu edilen çevrenin belirli miktarına sahip olması da beklenir. Bu işlev skafoldun yüzeyi biyoaktif yapılarak kazandırılır. Biyoaktivite göstergesinin bir örneği ortopedik protezlerde hidroksiapatiti kaplamasının kullanımıdır.

Biyoaktif yüzeyler insan hücreleriyle bağ yapıp karışık birleşmesi için tasarlanmış yüzeylerdir. Biyoaktif yüzeylerin en yaygın uygulaması ortopedi ve diş uygulamalarında kullanılan hidroksiapatit kaplamadır. Biyoaktivite özel hücre tipleri için çok az malzeme tarafından paylaşılmış bir niteliktir.

4.3.3 Skafold malzemeleri:

Skafold olarak denenilen pek çok malzeme vardır. Fakat polie-kaprolaktone ve polilaktikler en çok çalışılmış malzemeleridir. Ayrıca polidimetilakrilamid, polimetilmetakrilat, poli (laktik asid, glicolic acid) ve poliürethanlar çalışılmıştır. Bu polimerlerin çoğu sonradan skafold olarak hizmet gören yün dokuma oluşturmak için fiber (lif) olarak kullanılır. Skafoldların başka bir tipide gözeneklerin ortalama çapları 10 µm ve üstüne sahip oldukları yüksek gözenekli katı v.b. malzemeler gibi köpükleri temel alır. Bu köpükler biyoaktif camdan inşa edilirler ya da kalsiyum hidroksiapatit karışımlar kemik restorasyonu için tasarlanır. Çitosan özellikle hidroksiapatit ile karıştırılarak skafold malzemesi olarak çalışılmıştır⁷⁴.

4.3.4 Doku skafoldların uygulamaları:

Skafoldların iki temel uygulaması vardır;

- (a) İnsan hücrelerini iliştiirmek ve yetiştirmek için skafold kullanarak dokuların restorasyonu.
- (b) Kademeli olarak parçalara ayrılan, bozulan skafoldlardan gelen farmasotik bileşimlerin yavaş salınımına dayanan tedavi olan tümör gibiler için kontrollü ve yerel ilaç salınımı

4.3.5 Skafold içinde hücre yetişmesinin ilerletilmesi:

Hücrelerin hem fiberlere hemde skafoldun gözeneklerine hızlı ve etkili yapışması kritik temel özelliğidir. Gözenekli polilaktik asit skafoldlu amino asit ve peptid kaplı yüzeylerin in vitro deneyleri sırasında kemik hücrelerinin daha hızlı gelişmesine neden olduğu gözlemlenmiştir⁷⁶. Hücre büyümesi insan deri fibroblastları için 160 µm genişliği olan yerde gözenek genişliğinin fiziksel karakteristikleri tarafından etkilenir⁷⁷ ve kemik dokusu için 100 µm hücre büyümesi için daha uygun düşünülür⁷⁸.

5.ÖZEL AMAÇ

Yara iyileşmesi ya da kemik greftleri defeklerin tedavi sürecinde önemli noktalardan bir tanesidir. Kemik içindeki implantların ya da defeklerin durumunda bu iyileşme süreci kemik içinde ve çevresinde yeni kemik oluşumunu içerir. Mekanik kuvvetler kemik dokunun yeniden biçimlenmesi etkiler ve kemik alternatifleri kemik etrafındaki mekanik durumu değiştirir. Bu mekanik etki kemik doku içine yerleştirilen alternatif yöntemlerin başarısını belirler. Bu nedenle mekanik kuvvetlerin nasıl kemik oluşumunu etkilediğini incelemek şarttır. Özellikle farklı mekanik yükleme koşullarının osseointegrasyonu nasıl etkilediğini test etmek yararlı olacaktır.

Pek çok çalışma bu başlık ile ilgili yürütülmüştür. İn vivo ortamında yapılan hayvan deneylerinde kemiğin devirli yüklenmesi kemik oluşumunu arttıracak ve dinamik yüklenme koşullarının statikten daha çok oluşuma yol açtığı gösterilmiştir. Kırık çevresindeki kallus oluşumu kırıktaki hareketle etkilendiği gösterilmiştir. İn vitro da osteoblastlar tarafından yapılan matris birleşimi fizyolojik olarak karşılaşılan azami gerinim düzeylerinde arttığı gösterilmiştir. Ayrıca fizyolojik düzey ötesindeki mekanik uyarım altında matris birleşimi azalırken hücre çoğalması artış gösterir.

Osteoblastların farklı mekanik uyarımlara verdiği yanıtın tam olarak belirlemenin zorlukları vardır. Tüm dünyada devam eden geniş çeşitlilikteki araştırmalardan dolayı bu öncelikli bir konudur. Bilim adamları farklı yükleme koşulları, substratlar ve hücre hatları ile çalışmalarını yürütmektedir. Bu çalışmalar 3 boyutlu skafold içinde hücre davranışları, araştırılan alternatiflerin başarısı ve etkileri ile ilgili bazı sorulara cevap bulmaya başlamıştır. Fakat farklı tekrarlı yükleme koşulları ya da kemik skafold etkileşiminde oluşabilecek nispeten düşük gerinim düzeyleri ve osseointegrasyon ile ilgili konular halen çözümlenmeyi bekliyor. Fizyolojik ve daha üst sınırlardaki düzeyler artan matris birleşiminin yanıtını tetiklerken normal fizyolojik düzey (yaklaşık 500 micro-strain), süreç ve tekrarlama değerlerinin üstünde kemikteki gerinim koşullarının hücre çoğalmasının fizyolojik yanıtını tetiklediğine inanılır. Kemik konusunda doku mühendisliğinin amacı daha işlevsel hücre-malzeme yapı elde etmektir. Bunu başarabilmek için 3 boyutlu yapı iskeletlerinde işlevsel matris gelişimini ve öncü hücrelerin farklılaşmasını optimize etmek gereklidir. Mekanik kuvvetlerinde kemik uyumunda önemli bir etken olduğu bilinmektedir.

Bu nedenlerden ötürü bu çalışma yapılırken sıralanan amaçlara ulaşılacak istenmiştir:

1. Hücre kültür uyarım aygıtının farklı bir çeşidini geliştirmek.
2. Hücre kültürlerinde uyarım yaparak çoğalmayı tetiklemek.
3. Mekanik uyarımın hücre sayısı, morfolojisi bakımından etkisi incelemek.

4. Mekanik uyarımın sonucu uyarım yapılanların alkalın fosfataz ve nitrik oksid düzeylerini ölçmek ve kontrol grupları ile karşılaştırmak.
5. Mekanik uyarımın biyomalzeme üzerinde oluşturduğu gerilme ve uzama doğrultusunda hücrelerin hizalanmasını incelemek.

Tekrarlı mekanik yüklenmelerin 3 boyutlu yapı iskeleti içinde daha az mekanik yüklenmeye maruz kalan hücrelerden daha fazla hücre çoğalmasına ve matris birleşiminin başlamasını gecikmesine neden olacaktır.

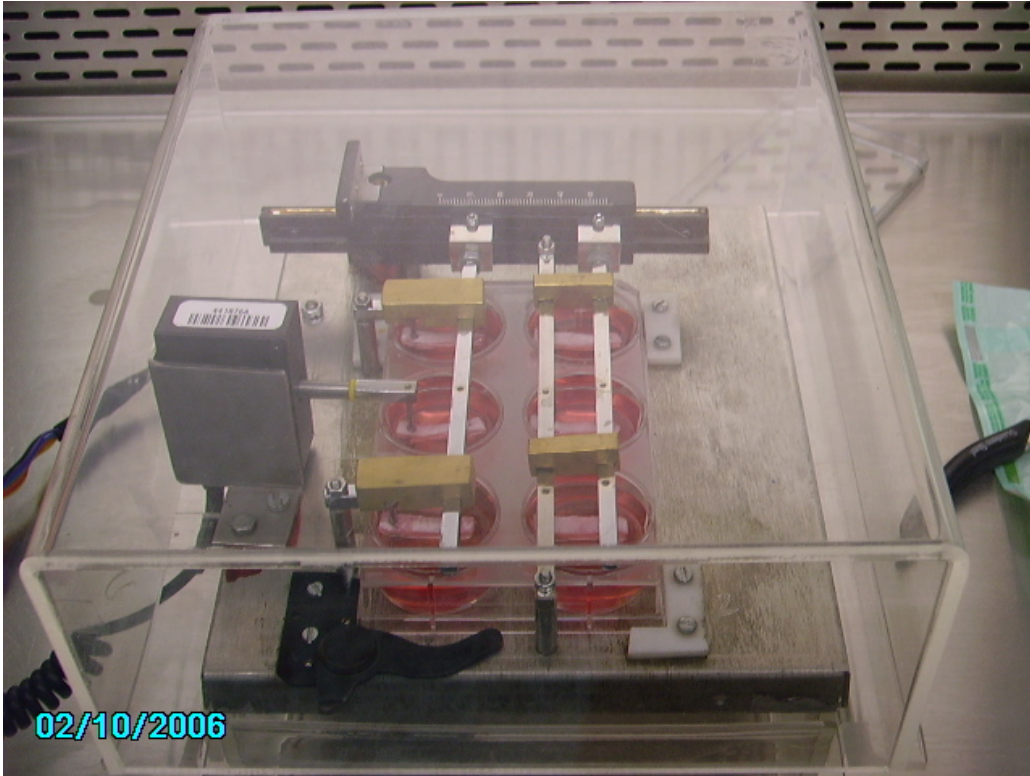
Bu deneyin osteojenik hücreler için var olan temel bilgilere katkı sağlaması beklenmektedir. Sonuçta bu çalışma araştırmacılara in vivo da yeni yapı iskeleti hakkında da bir fikir sağlayacaktır. Bu bilgi yapı iskeletlerinde olduğu kadar osteoporosis ya da kemik yaralanmaları gibi kemik rahatsızlıkları tedavisinde yararlı olabilir. Belki de bu implant tasarımlarında değişimlere, yapı iskelet kullanımına öncü olabilir.

6.YÖNTEM:

Bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Biyomekanik A.B.D. , Hematoloji A.B.D. Ortopedi ve Travmatoloji A.D. ve Bilgisayar Mühendisliği bölümleriyle işbirliği ile yürütülmüştür. Araştırma ileriye yönelik planlanmıştır.

6.1 Deney Düzeneği

Mekanik uyarım aygıtı bir hücre kültür çalışmasından esinlenerek tasarlandı³⁰ ve 6'lı petri kaplarında mekanik olarak etki edebilecek şekilde imal edildi. Her petri kabının kuyucuğunda 2 mm çapında birbirinden 17 mm uzaklıkta paslanmaz çelik iki adet iğnenin bir tarafı sabitken diğer tarafı hareket etmektedir. İğneler 5 mm genişliğinde çubuklardan aşağı doğru sarkmaktadır. Hareketli çubuklar bir setkur vidası ile doğrusal hareket mekanizmasına tutturulmuştur. Doğrusal hareket mekanizması olan kramayer dişliyi bir adım motoru, motoruda sürücü bir kart kontrol edecek şekilde tasarlandı(Şekil 11). Sürücü karttan frekans, gerilme uzaması ve zaman parametreleri kontrol edilebilir.



Şekil 11. Deney aygıtının üstten görünüşü

Yapı iskeletinin takılacağı iğne uçları hücre kültür ortamı ile temasta olacağından iğne uçları paslanmaz çelikten imal edilmiştir. Çubuklar ve set kur vidaları ise temasa yakın

bölgeler olduğundan kromla kaplanmıştır. Aygıt tablası ise alüminyum levhadır. Hareket iletim mekanizması pirinç malzeme üzerine eloksal kaplama uygulanmıştır.

Aygıtın koruyucu kapağı ise şeffaf fiberglastan imal edilmiştir. Koruyucu kapak imal edilirken kenarlarında hava dolaşımını sağlayacak küçük boşlukların olmasına dikkat edilmiştir.

Hücre kültür kabının levha üzerinde yeri belirlenerek kabın sabit durması için 3 köşeye L şeklinde plastikler monte edilmiştir. Hücre kültür kabı bu plastiklerle sıkı geçme olacak şekilde yerleştirilmektedir. Diğer bir köşesine de daha sağlamlaştırmak için sıkıştırma görevi gören kısıkaç konulmuştur.

6.2 Mastır yerleşimi:

5 mm genişlikteki çubukların birbirinden uzaklığını tam olarak ayarlayabilmek ve yük hücresi tarafındaki çubukların dikey ve istenilen mesafede sabitlenmesini sağlayabilmek için mastır parçalar imal edildi(Şekil 12).



Şekil 12. Kullanılan mastır ve setkur vidaları

Şekilde görülen setkur vidaları hareketli çubukları doğrusal hareket mekanizmasına tutturmak için kullanıldı. Sol baştaki mastırlar yük hücresinin yanındaki sabit çubukları üst kısmına gelecek şekilde yerleştirilir. Böylece hem çubuklar arası mesafe ayarlanır hem de sabit çubuğun dikey durması sağlanır. Ortada görülen mastırlar ise kalan çubukların arasına yerleştirilerek mesafe ayarlanır.

6.3 Yük hücresi

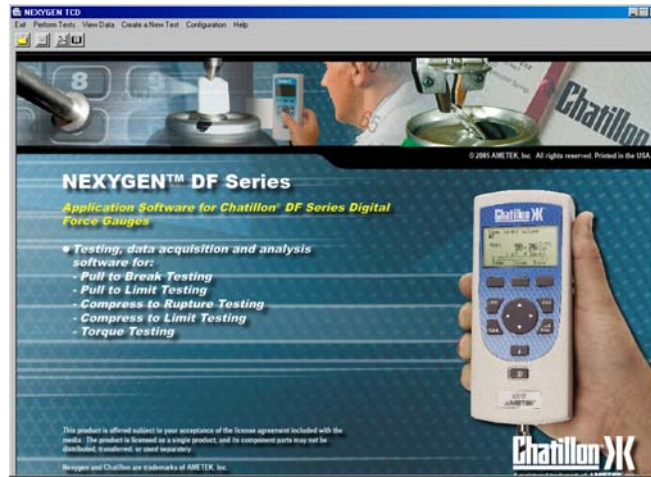
Sabit tarafın bir kuyucuğunda mekanik uyarım yaparken ölçüm alacak şekilde kuvvet oranlarını tespit etmek için Chatillon marka bir yük hücresi monte edildi. Yük hücresi dinamik olarak ölçüm verilerini elde eder. Kullanılan yük hücre kapasitesi 250 gr ve modeli SLC'dir.. Yük hücresi ölçümlerini alabilmek için modeli DFS-R-ND-EU olan dijital gösterge

aygıtına bağlanır(Şekil 13). Yine bir RS-232 kablosu ile de dijital indikatör dizüstü bilgisayara bağlanır.



Şekil 13. Denede kullanılan yük hücresi ve dijital gösterge aygıtı

Bir arayüz programı olan NEXGEN yazılımı vasıtasıyla istenilen değerler ekranda görülebilir ve istenilen parametrelerin grafiği elde edilebilir.



Şekil 14. Yük hücresi yazılım programı

6.4 Aygıt sürücüsü

6.4.1 Donanım:

MEC1A adı verilen sürücü kartı Bilgisayar Mühendisliği tarafından imal edildi(Şekil 15). Ünitenin arka panelinden çıkan bir standart elektrik besleme kablosu bulunmaktadır. Normal çalışma voltajı her yerde olduğu gibi 220V 'dur.

Ürünün ön panelinin sol üst köşesinde Motor Control Unit yazısı bulunmaktadır. Bu ünite Motor Kontrolü için gerekli olan iki donanım ünitesinden ilkidir. Bu ünite dışında ayrıca bir de Motor ünitesinin kendisi bulunmaktadır. Ön panelde ayrıca iki giriş daha bulunmaktadır. Bunlardan sol tarafta LAN (Local Area Network) olarak isimlendirilmiştir.

Bu porta (prize) yerel alan ağ ara kablosu takılmaktadır. RJ 45 standardı kullanılmıştır. İkinci giriş ise Motor ünitesinin bağlanacağı porttur. Herhangi bir yanlış bağlantı şüphesi yaratmamak için pasolu bir konnektör tipi kullanılmıştır.



Şekil 15. Aygıtın motor sürücü donanımı

MECIA' yı Motor Kontrolü yapmak için kullanılacak bilgisayara irtibatlandırılır. Deneyler esnasında kullanılan bilgisayar portatif olması açısından dizüstü bilgisayar kullanılmıştır. Daha sonra direkt olarak bir ara kablo ile bilgisayara bağlantı yapılır. Bağlantı için MECIA'nın ön panelinde bulunan LAN tanımlı, RJ 45 prizi olarak adlandırılan girişi kullanılır. Motor bağlantısı için LAN portu yanındaki MOTOR girişi kullanılır.

6.4.2 Yazılım :

Yazılım motoru kontrol etmek istediğimiz bilgisayara yüklenir. Gerekli ayarlamalar yapılır.



Şekil 16. Sürücü kartı yazılım programı

Ana Menüde iki ayrı kare bulunmaktadır. Bunlar farklı işlevlere sahiptir. Soldaki “Karıştırıcı” başlıklı pencerede üç ayrı seçenek bulunmaktadır. Birinci seçenek motoru ne kadar açıya kadar salınım yapmaya hazırlayacağınız girdiyi içermektedir. İkinci seçenek bu açıya kadar gidip tekrar sıfır başlangıç noktasına geri dönecek motorun hızının devir/dakika cinsinden girilmesini içermektedir. Üçüncü girdi de ise bu salınımın (motorun bir sağ bir sol yapmasının) ne kadar süre devam ettirileceği verilmelidir. Bu süre saniye cinsinden başlayıp saatlere tekabül edecek müddet olarak verilebilir. Başlat ve Durdur butonlarının işlevi açıktır. Ancak motor çevrimi başlatıldıktan sonra açı, hız ve süre değiştirilebilir. Açı değiştirildiği zaman motor bir önceki sıfır konumundan başladığı noktayı baz alarak açığı yeniden sıfırdan hesaplayacak ve herhangi bir açı kaymasına sebebiyet vermeyecek şekilde ayarlanmıştır. Sağdaki alt pencere ise motora erişemeyeceğiniz montaj durumlarında motora bağlı aksamı manuel olarak belli bir açıya getirebilmek için elektronik olarak adım adım sağa veya sola doğru çevirme hareketini sağlamak için hazırlanmıştır. Bu adım adım açı ayarlanmasının hızını elle girerek ayarlanabilir.

6.5 Kalibrasyon :

Aygıtın üretimi bittikten sonra iki şekilde aygıtın kalibrasyonu yapıldı. İlki bir komparatör vasıtasıyla kalibrasyon yapılmasıydı. Aygıtın sağ ve sol yanına titreşimi önlemesi amacıyla ağır metal tablalar yerleştirildi. Metal tablanın birine komparatörün manyetik standı oturtuldu. Komparatörün ölçüm ucu kramayerin ucuna dayandırıldı(Şekil 17). Yazılıma deneyde girilen veriler aynen girildi. Motor çalıştırıldıktan sonra SONY DCR-TRV270E model kamera ile çekim yapıldı. Kaydedilen görüntüler QuickTime Player version 6.5.2 yazılımı ile “Slide show” modunda izlendi ve değerler kaydedilmeye çalışıldı.



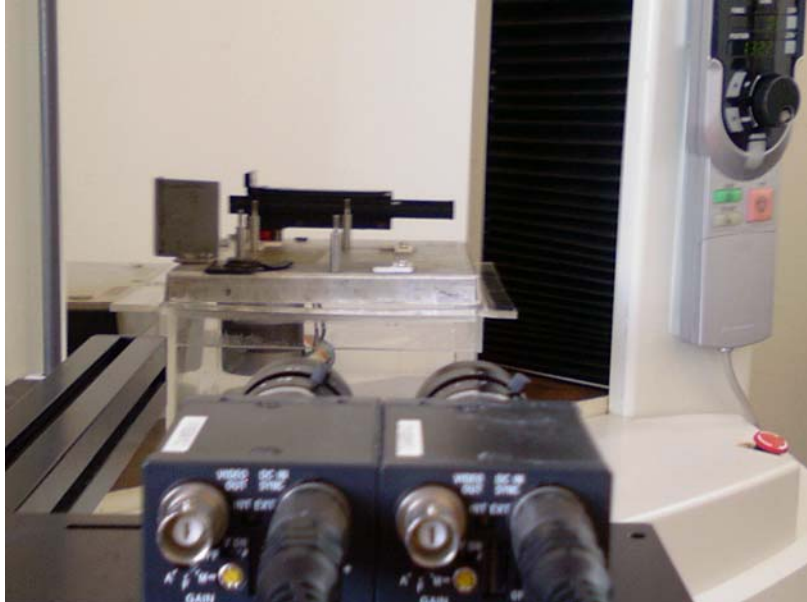
Şekil 17. Kalibrasyon için kullanılan komparatörlü düzenek

Komparatör dış ibre göstergesi 0'dan 20'ye kadar bölümlendirilmiştir. İç ibre ise 12 bölümdür. Azami ölçüm değeri 12 mm'dir. İç ibrenin her bir gösterge rakam aralığı 1 mm'ye denk geliyor. İç ibrenin her milimetresi 5'e bölümlendirilmiş. Böylece her çizgi arası $1\text{mm}/5 = 0,2\text{ mm}$ 'ye denk geliyor. Büyük ibrenin her bir turu 0,2 mm'ye denk gelen iç ibrenin küçük bir adımıdır. 20 bölmeli büyük ibrede rakamlar arasında 5'e bölümlendirilmiş. Yani Büyük ibre $5 \times 20 = 100$ küçük adımdan oluşuyor. Öyleyse $0,2\text{ mm}/100 = 0,002\text{ mm}$ en küçük adım birimidir.

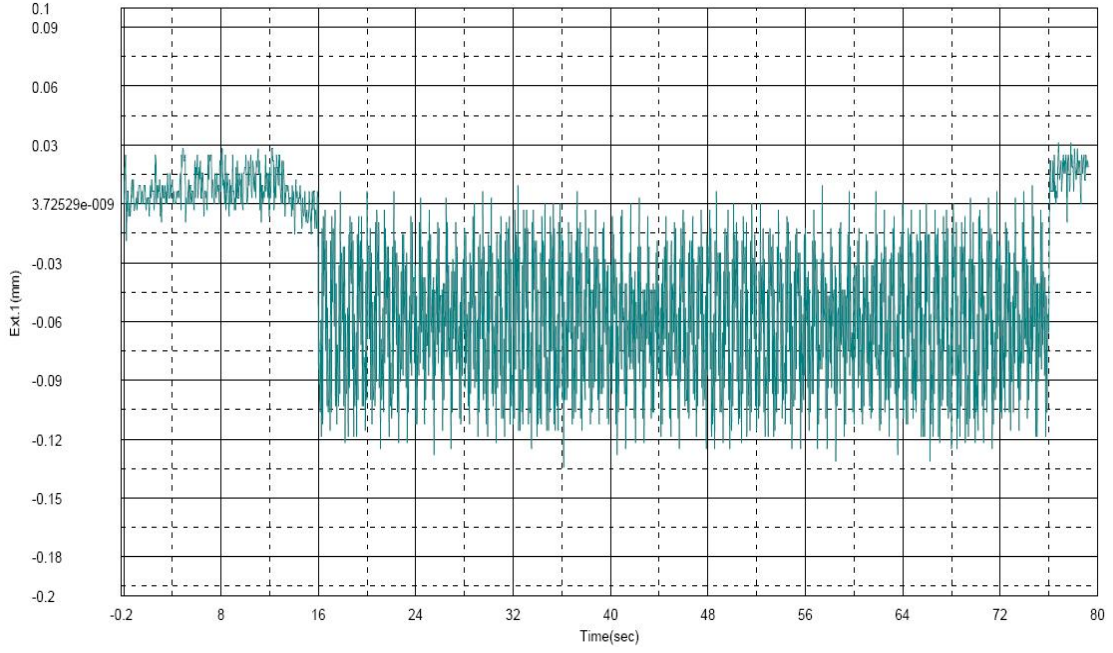
Kaydedilen 2 durak arasındaki farkı bulmak için bir formül yardımıyla hesaplama yapılır. Buna göre ; (Büyük ibre en küçük birim farkı $\times 0,2$) mm \pm (Küçük ibre en küçük birim farkı $\times 0,002$) mm . Formül arasında \pm simgesinin sebebi şudur: 1 tur fazla atıp atmadığına emin olmadığımızdan maksimum ve minimum değerlerde hesaplanır.

Bu hesaplamalardan sonra birim mesafe değeri bulunur. Fakat kamera resim kare hızı 25 görüntü/saniye olduğundan ibrenin gösterdiği değerler okunamamaktadır. Kamera kapasitesi yeterli gelmemektedir.

İkinci kalibrasyon yöntemi basma/çekme aygıtının aparatı non-contact extensiometre ile kalibrasyon yapmaktır. Aparatın kapasitesi 500 mm/dk'dır. Sabit bir nokta ile hareketli noktanın yer değiştirmesi 60 sn boyunca ölçülmüştür(Şekil18). Böylece yerdeğişimi-zaman grafiği elde edilmiştir(Şekil 19). Grafikten de muntazam bir devirli hareketin mekanizma tarafından yapıldığı görülmektedir.



Şekil 18. Ekstensiometre kullanılarak kalibrasyon için kullanılan düzenek



Şekil 19.İletim mekanizmasının yerdeğiştirme-zaman grafiği

Kullanılan numunelerin iki delik arası 17 mm'dir.%1 gerinim 10.000 $\mu\epsilon$ değerine eşittir. Hareket mekanizmasının uzama değeri hesaplanarak yapı iskeletinde yaratılan gerinim değeri hesaplanır. Dolayısıyla 17 mm o zaman %1 uzaması 0.17 mm'ye denk gelmektedir. Yukarıdaki grafikten maksimum yerdeğişimi yaklaşık 0,15 mm olduğu görülmektedir. Bu değerde yaklaşık %0.9 yuvarlatılırsa %1 uzamaya denk olduğu görülür.

Frekans veya titreşim sayısı gerçekleşen devirin 1 saniye içinde hangi sıklıkla, kaç defa tekrarlandığının ölçümüdür, matematiksel ifadeyle periyodun çarpmaya göre tersidir. 1 Hz değerinde bir frekans anlamı1 saniye içinde 1 tur gerçekleşmesidir. Dolayısıyla sadece bir gidiş hareketini 0,5 sn içerisinde yapmalıdır. Gidiş hareketi 2° verildiği için belirtilen hareket istenilen frekans değerine ulaşılacak isteniyorsa belirtilen saniye içerisinde oluşmalıdır. MEC1A ipyazılımının hic değeri 1'den küçük rakam girilemez. Bu değeri 0,5 hz değeri için hesaplırsak $X=0,33$ d/dk değeri MEC1A programına girmek gereklidir. Bir hesaplama yaparak MEC1A programına 1 d/dk değeri girilirse kaç Hz değerinde çalışıldığı bulunabilir.

$$2^{\circ} \quad X=$$

$$360^{\circ} \quad 60 \text{ sn'de tamamlanıyorsa}$$

Buradan $X = 0.33\text{sn}$ yani bir turu 0.666666 sn'de tamamlanır. Bu da $1/0.666666 = 1.5$ Hz anlamına gelmektedir.

6.6 Aygıt Sterilizasyonu:

Aygıtın sökülebilen çubukları, setkur vidaları ve mastır parçalarıyla birlikte bu parçaları takmaya yarayan allen, vida, somunlar ve skafoldları yerleştirirken kullanılan pensler otoklav ile steril edildi. Aygıtın motoru ve üst koruyucu kapağı ile birlikte tümü etilen oksit gaz sterilizasyon ile steril edildi. Yük hücresi ve kablosu laminar flowa ve inkübatöre sokulmadan önce deney başlangıcında alkol ile silindi.

6.7 Kemik Doku Yapı İskeletinin Kimyasal Hazırlanışı:

İlk olarak PLLA (Purac biochem bv Gorinchem, Purasorb Poly-L-Lactide, molekül ağırlığı 800000, Hollanda) kloroformda çözüldü ve %4 PLLA içeren çözelti hazırlandı. Hazır olarak temin edilen gelfix kollajen (Gelfix[®] collagen, EURORESEARCH s.r.l., İtalya) bu solüsyona daldırılarak kollajen liflerinin ıslanması sağlandı. Solüsyonun fazlası kollajenden ayrıldıktan sonra PLLA'li kollajen saf alkol (etanol) içine daldırıldı. Belirli aralıklarla alkol değiştirilerek PLLA'nin kollajen lifleri üzerine çökmesi sağlandı. Daha sonra etüvde 50 °C'de vakum altında kurutuldu(Şekil 20).



Şekil 20. Yapı iskeleti



Şekil 21. Skafoldları için kullanılan mastır

Hazırlanan yapı iskeletleri mekanik uyarımda kullanılması için bistüri ile 25X5 mm boyutlarında kesildi. Kesme işlemi sırasında bir mastır kullanıldı. Kullanılan mastırın deliklerin merkezleri arasındaki uzaklık 17 mm'dir(Şekil 21).

Hazırlanan PLLA'li kollajen yapı iskeletleri hücre ekimi yapılmadan önce taramalı elektron mikroskopunda (SEM, JEOL JSM-6060) hem yüzeysel olarak hem de kesitsel olarak incelendi. Numuneler ölçüm yapılmadan önce argon gazı ve elektrik alan içeren çember içerisinde (Polaran SC7620) vakum altında ince bir altın tabakasıyla kaplandı. Yüzeysel ve kesitsel olarak incelenen yapı iskeletinin porozitesi, gözenek boyutları ölçüldü. Yapı iskeletleri hücre ekimi yapılmadan önce kontamine riskine karşı etilen-oksit gaz sterilizasyon ile steril edildi.

6.8 In Vitro Hücre Kültürlerinin Hazırlanması:

6.8.1 Kullanılan reaktif ve malzemeler:

1. MesenCult Basal medium for human Mesenchymal Stem Cells (StemCell Technologies Inc, 05401).
2. Osteogenic stimulatory supplements, human (StemCell Technologies Inc, 05405).
3. Foetal calf serum (FCS), (Biological Industries, 04-001-1B).
4. Pen-Strep Solution; 10000 U/ml penicilin, 10 mg/ml streptomycin (biological Ind.03-031-1C).
5. Amphotericin B Solution; 2,5 mg/ml amphotericin B (biological Ind. 03-029-1C).
6. Dexamethasone, 1 mg (StemCell Technologies Inc, 05407).
7. Ascorbic Acid, 100 mg (StemCell Technologies Inc, 07157).
8. Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich/10771).
9. Steril santrifüj tüpleri, 50 ml (TPP, 91050).
10. Steril doku kültür tüpleri, 10 ml (Greiner labortechnik, 164160).
11. 6-Well plate (Greiner labortechnik, 657160).
12. 35 mm x 10 mm Cell Culture Dish (Corning incorporated, 430165).
13. Trypan-blue, $C_{34}H_{24}N_6O_{14}S_4Na_4$, MW 960,8 Sigma/T 0776.

6.8.2 Hazırlanan Solüsyonlar:

1. **Fosfat-tampon solüsyonu (Phosphate-buffered solution, PBS):** 137 mM NaCl (8.0 g), 2.7 mM KCl (0.2 g), 10mM Fosfat (0.92 g Na_2HPO_4 ve 0.24 g K_2HPO_4) karıştırılarak pH; 7.2-7.4'e ayarlanmıştır.
2. **Trypan-blue hücre viabilite solüsyonu:** % 0,4'lük trypan-blue solüsyonu hazırlandı. 3 ml trypan-blue solüsyonu ile 19 ml PBS karıştırıldı ve 0.22 µl steril filtreden süzülerek kullanıma hazır duruma getirildi (ref. BJC Health System).
3. **Osteojenik uyarıcı ilaveli MesenCult Basal Medium:** Steril 50 ml'lik dibi konik tüpe 42.5 ml MesenCult Basal Medium konuldu. Sırasıyla 7.5 ml Osteogenic supplement, 5 µl Dexamethasone ve 250 µl Ascorbic acid eklenerek tam ortam hazırlandı. Tam ortama 500'er µl amfoterisin-B ve penisilin-streptomisin solüsyonu ilave edildi.

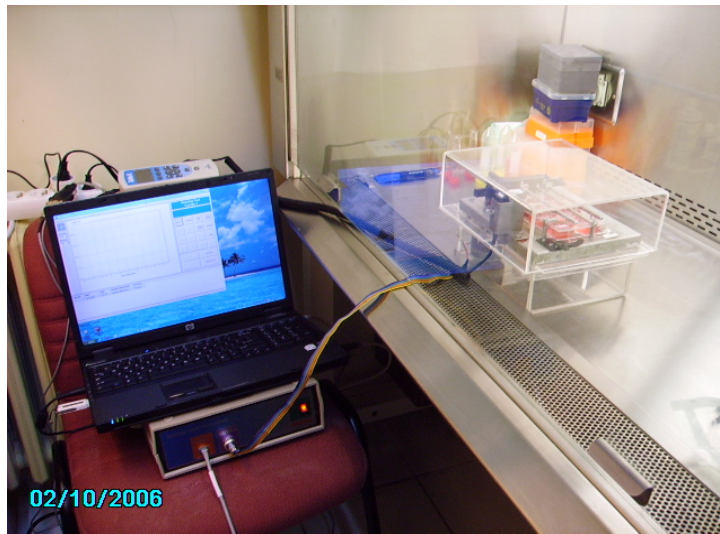
Dokuz Eylül Üniversitesi, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim dalı bölümünde herhangi bir sebepten dolayı ameliyatı önerilen hastaların aksiyel iskeletinden (sternum, vertebra ya da pelvis) 20 ml kemik iliği aspiratı steril koşullarda 1 ml heparin içeren enjektöre alınmıştır. Kemik iliği aspiratı steril koşullarda (laminal flow'da) %2 FCS içeren PBS karışımı ile dilüe

edildi. Dilüe edilen kemik iliği aspiratı, 12 ml'lik dibi konik dört ayrı tüpte, her 5 ml'si oda sıcaklığında bekletildikten sonra 5 ml Ficoll-paque üzerinde dikkatlice tabakalandırıldı. Tabakalandırma işleminden sonra 1650 rpm'de yirmi dakika santrifüj edildi. İnterfaz tabakasında yer alan hücreler steril pastör pipeti ile alındı ve dibi konik polipropilen tüpe transfer edildi. 10 ml %2 FCS içeren PBS karışımı eklenerek, oda sıcaklığında 1200 rpm'de beş dakika santrifüj edilerek süpernatantı atılarak yıkama işlemi yapıldı. Dipte kalan mononükleer hücreler 5 ml %2 FBS içeren PBS karışımında dilüe edildi. 5 ml'lik mononükleer hücre süspansiyonuna 100µl RosetteSep Human Mesenchymal Stem Cell Enrichment Coctail eklenip 50 ml'lik tüpte yirmi dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 12 ml'lik dibi konik tüpte 5 ml'lik hücre süspansiyonu 5 ml Ficoll-paque üzerinde dikkatlice tabakalandırıldı ve 1650 rpm'de yirmi dakika santrifüj edildi. İnterfaz tabakasında yer alan hücreler steril pastör pipeti ile toplandı ve dibi konik polipropilen tüpe transfer edildi. Ficoll-paque altında hücreler ise bir başka tüpe transfer edilerek ve her bir tüp üzeri yazılarak işaretlendi. Tüplere 10'ar ml %2 FCS içeren PBS karışımı eklenerek 1200 rpm'de beş dakika santrifüj edilerek yıkama işlemi iki defa yapıldı. Dipte kalan mononükleer hücreler, 1.5 ml Osteojenik uyarıcı ilaveli MesenCult Basal ortamda resüspanse edildi. Hücre süspansiyonlarından 0.5'er ml'lik iki örnek alındı. Örneklerden biri hücre sayımı için (Coulter STKS, Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Hematoloji Anabilim dalı) kullanıldı. Diğer hücre süspansiyonu tyrpan mavisi ile boyanarak hücre viabilitesi kontrol edildi ve viabilitenin %96'nın üzerinde olduğu saptandı. RosetteSep uygulama sonrası interfazdaki hücrelerin sayısı $\sim 12 \times 10^6$ hücre/ml bulundu. RosetteSep uygulama sonrası Ficoll-Paque altında kalan hücrelerin sayısı ise $\sim 20 \times 10^6$ hücre/ml olarak belirlendi. Kontrol grubu ve mekanik uyarım yapılacak grup için iki adet 6'lı petri kaplarına RosetteSep ayrımı yapılan hücre süspansiyonundan 60'ar µl ($\sim 2 \times 10^5$ hücre/ml) ilave edildi. Üzerine 4 ml Osteojenik uyarıcı MesenCult Basal ortam eklendi. %5 CO₂ ve nemli ortam içeren inkübatöre kaldırıldı. Hücrelerin ortamlarının değiştirilmesi üç günde bir aralıklarla yapıldı. Hücreler her ortam değişikliğinde Inverted mikroskop (Nikon, ELWD 0,3 206039, Japonya) ile incelendi ve onyedinci gün osteoblast kemik hücrelerinin oluştuğu gözlemlendi. Oluşan osteoblast kemik hücrelerin ortamları 10 ml'lik pipetler ile 12 ml'lik santrifüj tüplerine konuldu. Santrifüj tüplerine konulan ortamlar 1200 rpm'de beş dakika santrifüj edildi. Kuyucukların üzerlerine kapatacak kadar PBS eklenip yıkandı. Santrifüj edilen tüplerin ortamları atıldı. 2 ml yeni ortam ile tüplerin diplerindeki hücelere pipetaj yapıldı. Daha sonra bunlar 12 ml'lik tüplere konuldu. Hücre kültür kaplarının tabanlarına yapışmış olan hücreleri kaldırmak için hücrelerin üzerlerini örtecek kadar Tripsin/EDTA eklendi. Bir süre hücrelerin kalkması için beklenildi ve

sonra üzerlerine Tripsin/EDTA'yı nötralize etmek için %10 FCS bulunan ortam ilave edildi. Kaldırılan hücreler 12 ml'lik santrifüj tüplerine konuldu. Daha sonra santrifüj tüplerine konulan ortamlar 1200 rpm'de beş dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra tüplerdeki süpernatant atıldı. Tüplerin dibinde bulunan hücrelerin üzerlerine 5 ml toplam osteojenik uyarıcı ortam ile ardı ardına pipetleme yapıldı. Daha sonra hücrelerin hepsi tek bir tüpte toplandı. Elde edilen hücrelerden 0.5 ml örnek alınıp hücre sayısı hesaplandı. Hücre sayısı $\sim 0.6 \times 10^6$ hücre/ml bulundu. Kontrol grubu ve mekanik uyarım yapılacak grup için petri kaplarının her bir kuyucuğuna hazırladığımız yapı iskeletleri yerleştirildi. Daha sonra 3 ml ortam eklendi. Hücre süspansiyonundan 350'şer μl ($\sim 2 \times 10^5$ hücre/ml) ilave edildi. Daha sonra hücreler 37 °C'de %5 CO₂ inkübatörüne yerleştirildi. Hücrelerin yapı iskeletlerine ekiminin beşinci günü kontrol ve mekanik grubun her bir kuyucuğundan Nitrik Oksit (NO) ölçümü için 1'er ml ortam alındı. Daha sonra, yedinci gün başlangıç olmak üzere 30 dakika ve 24 saat boyunca uyarım aygıtı ile mekanik uyarım yapıldı. Her mekanik uyarımdan sonra kontrol ve mekanik grubun her bir kuyucuğundan NO ölçümü için 1'er ml ortam alındı.

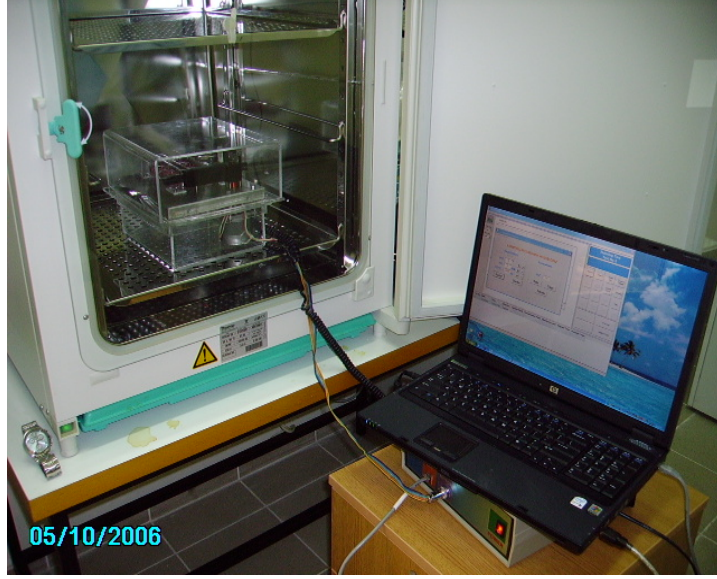
6.9 Hücre Kültürlerinin Aygıt ile Mekanik Uyarımı:

İlk deneyde deney aygıtı laminar flow içinde montajı yapıldı. Bilgisayar ve enerji bağlantıları yapıldı. Yapı iskeleti içinde olan hücre kültüründe aygıt levhasındaki yerine yerleştirildikten sonra pensler vasıtasıyla yapı iskeletleri iğnelere geçirildi. Motor sürücü programı ve yük hücresi programı çalıştırılarak deney laminar flow içinde başlatıldı. Deney 30 dk. boyunca laminar flow içinde gerçekleştirildi (Şekil 22). Bu nedenle yazılıma süre olarak 1800 değeri girildi. Hız değeri 1 dev/dk açılış değeri de 2° olarak girilmiştir.



Şekil 22. Deney düzeneğinin mikrobiyolojik güvenlik kabin içindeki görüntüsü

Diğer deneyde yine aynı süreçlerden geçildi. Fakat deney 24 saat boyunca inkübatör içinde gerçekleştirildi(Şekil 23).



Şekil 23. Deney düzeneğinin inkübatör içindeki görüntüsü

Deney sonrası biyomalzemelerin SEM görüntüleri çekildi.

7.KISITLILIKLAR

Deney kalibrasyonu video kamerayla yapılmıştır. Kameranın kapasitesi saniye de 25 görüntüdür. Bu kapasite ibre hızından dolayı tam okuma sağlamamaktadır.

Deneyler yapılırken Hematoloji A.B.D. hücre kültür laboratuvarı başka bir binaya taşınmıştır. Bu da deneylerin sürekliliğini kısıtlayan bir etkendi.

Bir takım sebeplerden dolayı ALP kitleri alınamamış ve tayini yapılamamıştır. Ayrıca NO₂ tayini için örnekler alınmıştır. Fakat birtakım nedenlerden dolayı tayin sonuçları elde edilememiştir.

Deney sonunda yine imkânsızlık nedeniyle numuneler sabitlenememiştir.

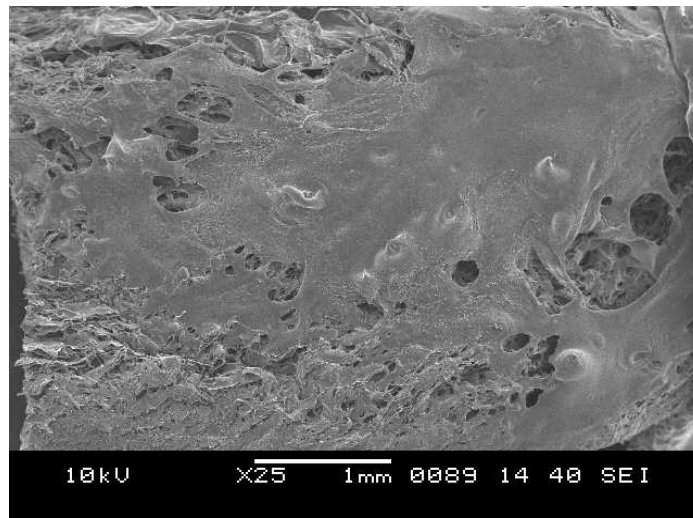
8.BULGULAR

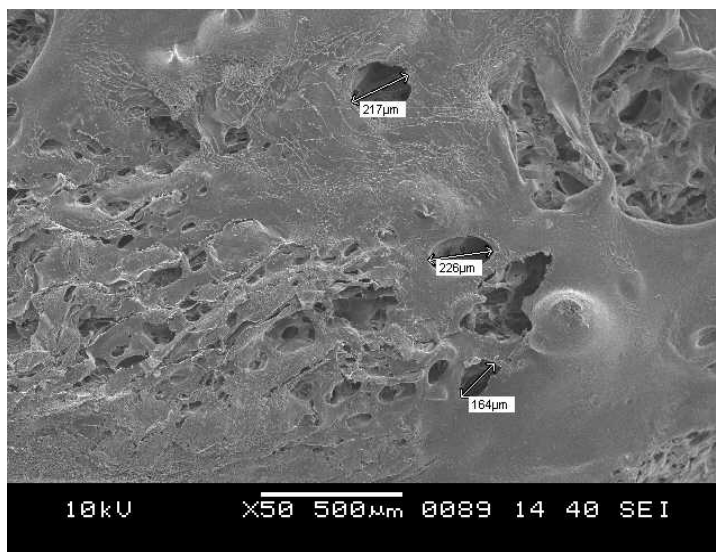
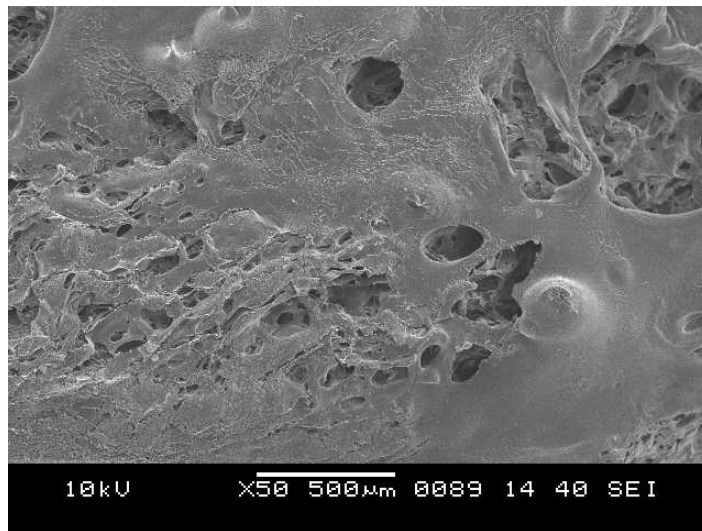
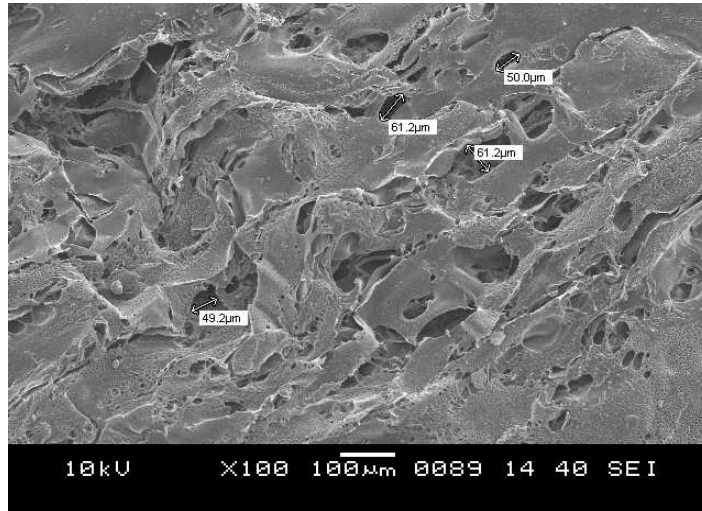
Bu çalışmanın ilk basamağı olan, planlanan hücre kültür uyarım aygıtının imalatı 2 farklı prototip yapıldıktan sonra bilgisayar mühendisliğinin katkılarıyla oldukça duyarlı mekanik uyarım yapabilen orijinal spesifik, gelişmiş yeni bir aygıt sistemi yapıldı. Elde edilen sistemin biyomekanik laboratuvarında bulunan basma/çekme aygıtının aparatı video ekstensiometre ile mikron hassasiyetteki kalibrasyonu yapıldı.

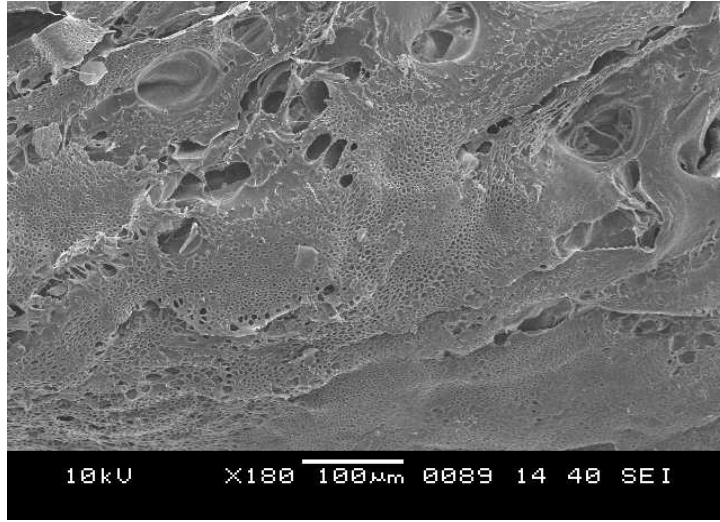
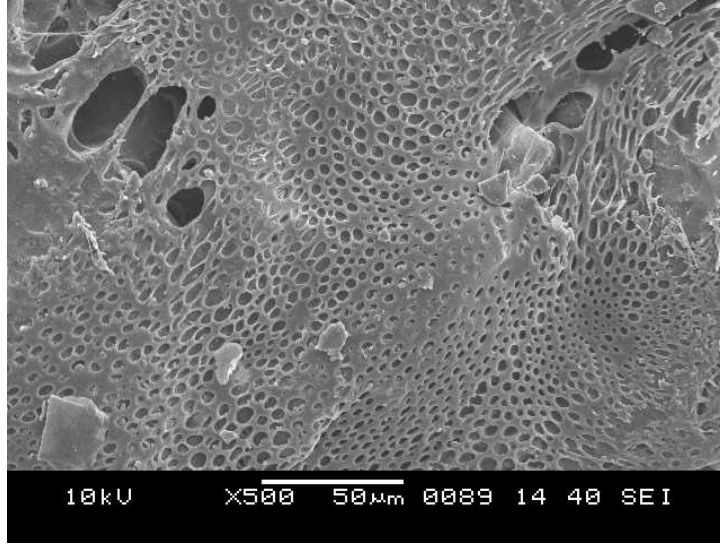
Çalışmanın ikinci aşaması hücre kültürlerinde osteoblast hücre kültür çoğalımı gerçekleşti.

Çalışmada kullanılan yapı iskeleti Ege üniversitesi kimya mühendisliği bölümünde bulunan Prof.Dr. Mesut İYİĞÜL tarafından gerçekleştirildi. PLLA (Purac biochem bv Gorinchem, Purasorb Poly-L-Lactide, molekül ağırlığı 800000, Hollanda) kloroformda çözüldü ve %4 PLLA içeren çözelti hazırlandı. Hazır olarak temin edilen gelfix kollajen (Gelfix® collagen, EURORESEARCH s.r.l., İtalya) bu solüsyona daldırılarak kollajen liflerinin ıslanması sağlandı. Solüsyonun fazlası kollajenden ayrıldıktan sonra PLLA'li kollajen saf alkol (etanol) içine daldırıldı. Belirli aralıklarla alkol değiştirilerek PLLA'nin kollajen lifleri üzerine çökmesi sağlandı. Daha sonra etüvde 50 °C'de vakum altında kurutuldu. Elde edilen 25X5 boyutlarındaki yapı iskeleti deney düzeneği için hazırlandı. Kullanılan yapı iskeleti SEM ile yapılan analizleri Şekil 24-29'de görülmektedir.

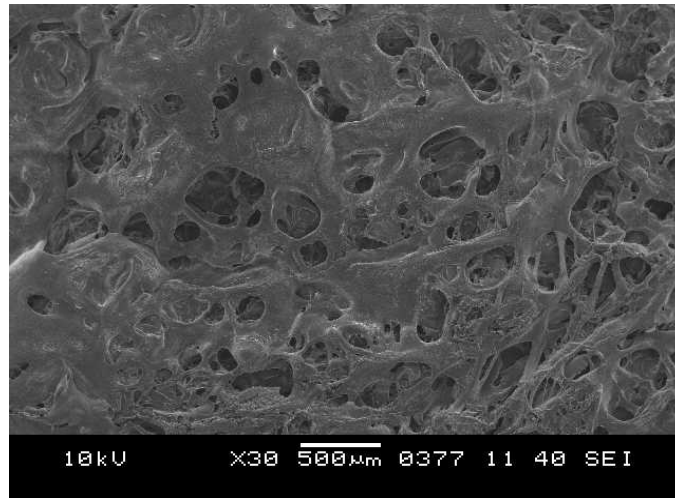
SEM ile yapılan analizlerde hücre kültürlerinin kollajen liflerin arasında osteoblastların yerleşmesine imkân verebilen gözeneklere sahip olduğu görüldü.

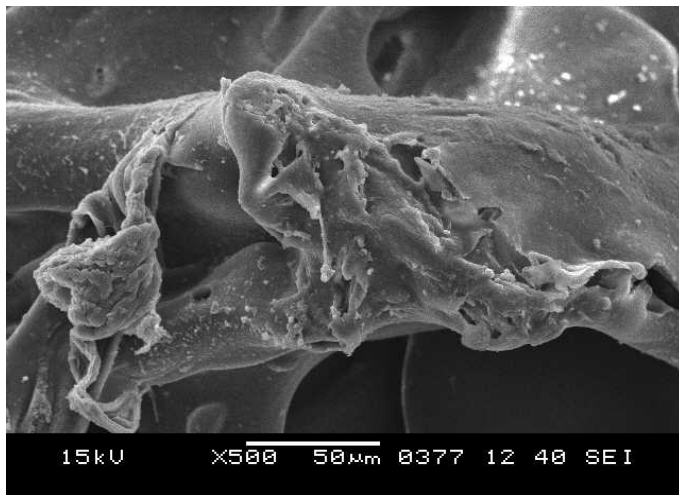
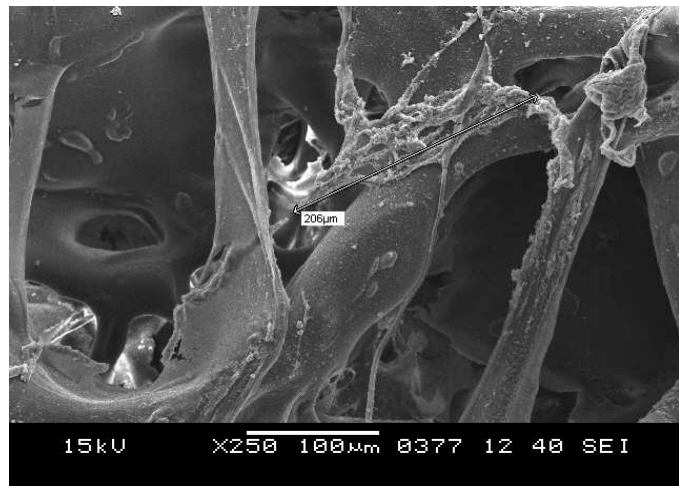
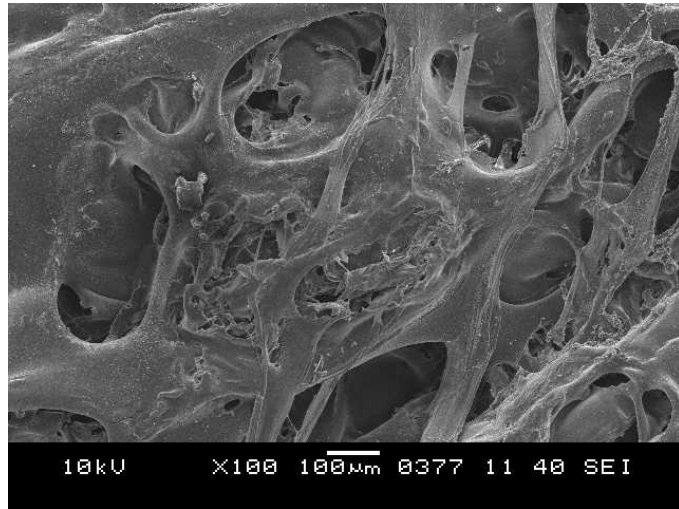


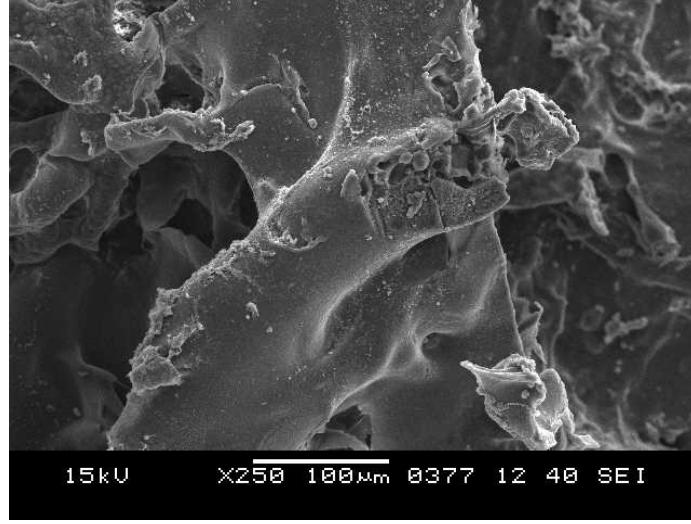
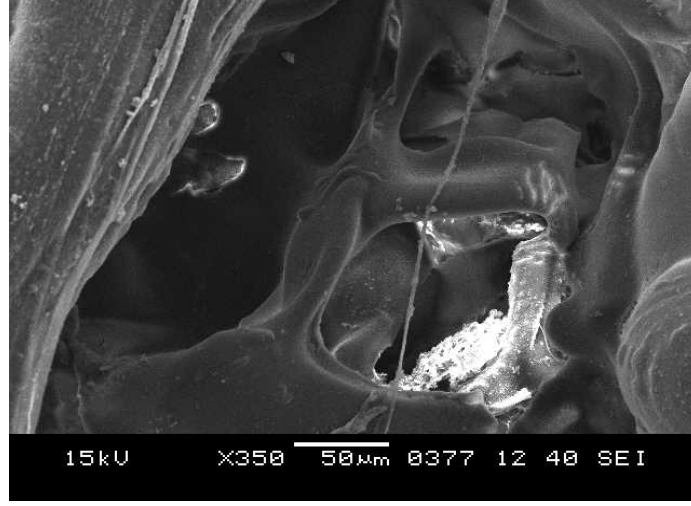




Şekil 24-29 Deney öncesi yapı iskeletlerinin SEM kesit resimleri





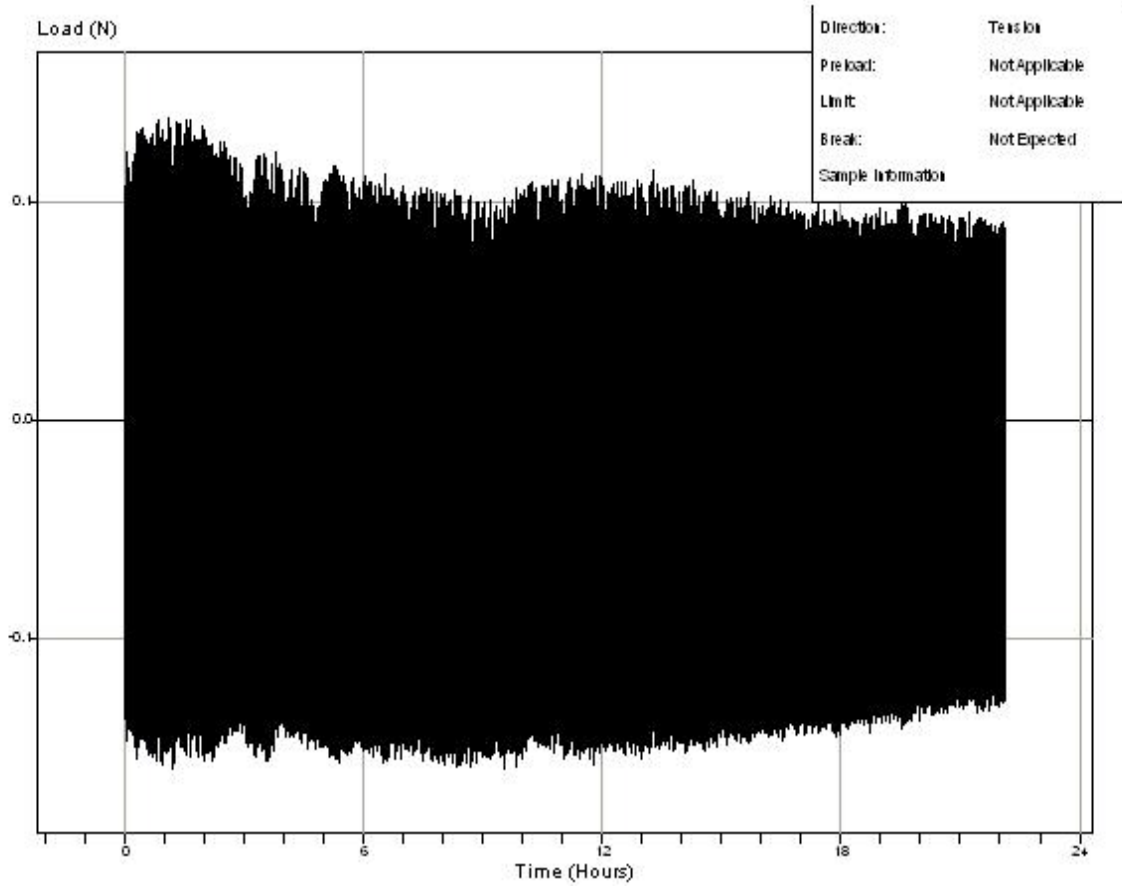


Şekil30–35. Deney sonrası yapı iskeletlerinin SEM kesit resimleri

Çalışmanın 3., 4. ve 5. basamakları devam etmektedir.

8.1 Hücrelerin gerinmesi esnasında elde edilen kuvvet grafiği

Uyarım uygulanan deneyde yük hücresinden aşağıda görülen veriler elde edilmiştir. Deney esnasında kuvvet değerlerinin az bir miktar azaldığı görülmektedir(Şekil 36). Sonuç olarak yapı iskeletleri sıvı ortamla birlikte yumuşamaktadır. Söz konusu tablo da yapı iskeletinin süngerleşmesinden dolayı zamanla içkuvvet değerinin farklılaştığını ispat etmektedir. Bununla beraber rezorbe olabilen in vivo ortamda kullanılacak bir malzeme için uygun yapı iskeletinin yapısına sahip olduğu düşünülmektedir.



	Maximum	Minimum	Mean	Median	Coefficient of Variance	Standard Deviation (N)	Standard Deviation (N-1)	True
Tension Peak	1.56 N	0.21 N	0.88 N	0.88 N	76.50%	0.68 N	0.96 N	
Compression Peak	-0.19 N	-0.52 N	-0.36 N	-0.36 N	47.12%	0.17 N	0.24 N	
Maximum Load	1.41 N	0.14 N	0.77 N	0.77 N	82.09%	0.63 N	0.90 N	
Elapsed Time	79681 s	22 s	39851 s	39851 s	99.94%	39829 s	56327 s	
Average Load	0.10 N	-0.02 N	0.04 N	0.04 N	143.18%	0.06 N	0.09 N	
Number of Rows that Passed	2							
Number of Rows that Failed	0							

Şekil 36. 24 saat boyunca gerilmeye uygulanan kuvvet-zaman grafiği

9. TARTIŞMA

Kemik hücreleri kemik hasarı oluşan, kemik defektinin olduğu yerde onarım ve yeni oluşum için bir araç olarak kullanılmak istenmektedir. Bu hedef için birçok araştırma yapılmaktadır^{2,3,4,5}. Araştırmaların bir çeşidi de in vitro ortamda kemik hücrelerine mekanik uyarım yaparak uyarım etkisini belirlemektir^{1,2,4,5,7-9,11}. Mekanik uyarıma kemik türevi hücrelerin tepkisi çeşitli in vitro çalışmalar tarafından onaylanmıştır^{12,13}. Cerrahi onarımda var olan altın standart yöntemi otografların kullanımınıdır. Otografların çoğu kez yeterli olmadığı durumlarda, allograft veya biyomalzeme kullanılması sözkonusudur. Ancak yapay ve yabancı bir dokunun halen eksiklikleri vardır. Bunun yanı sıra metal protez ve implantların da birçok sakıncaları sürmekte ve bu sorunların üstesinden gelmek için çalışmalar yapılmaktadır. Bahsi geçen tüm özelliklerin düzeltilmesi, istenen özelliklerde biyomalzeme üretilip tamir ve onarım tekniğinin bulunabilmesi için öncelikle özgül malzeme olarak kemiğin genel olarak yapısı iyi bilinmelidir.

Tüm ALP aktivitesi osteoblast işlevinin güvenilir bir delili olarak tanımlanır^{15,18}. Ayrıca ALP kemik oluşan tümörlerde osteoblastik aktivite için bir işaretleyici olarak kullanılır.

Doku mühendisliğinde yapı iskeletinin önemi hücrelerin tutunabilmesi ve çoğalabilmesi için optimizasyon çalışmaları çok çeşitli olarak yapılmaktadır.

Bizim çalışmamızda PLLA kaplanmış kollajenli yapı iskeleti ile osteoblast hücrelerinin tutunup üreyebilmesi için gereken optimum gözenek sayısı elde edilmiştir. Osteoblast hücreleri için elde edilen bu optimizasyon hücrelerin üremesine ve kliniğe dönük çalışmalara önemli ışık tutabilmektedir. Gelecekte hastanın kendisinden alınan kök hücrelerin laboratuvar koşullarında in vivo ortamda geliştirilerek yeniden hastaya uygulanması ve böylece kemik defektlerinin giderilmesi mümkün olabilecektir.

Deney aygıtı daha önceki benzer çalışmalardan esinlenerek imal edilmiştir. İletim mekanizmasının kramayer olmasından dolayı hassaslığın azalmış olacağı düşünülmektedir. Fakat aygıtın geliştirilmesinde ve doğruluğu sağlaması açısından kullanılan kalibrasyon sonuçları mikron hassasiyetle aygıtın çalıştığını göstermektedir. Literatürde de deneyimizde kullanılan kramayer dişli sistemlerin hücre kültür aygıtlarında kullanıldığı görülmektedir. Ayrıca sistemin kullanılmasında değişik sorunlar ile karşılaşmıştır. Örneğin iletim mekanizması aygıtın içinde doğrudan tesir etmektedir. Ancak aygıtın sterilizasyon edilme şartından dolayı yağlı iletim mekanizması sorun oluşturmuştur.

Bazı doku mühendisliğinde yapı iskeletinin resorbe olması istenirken (osteoblastların) bazılarında ise kalıcı ve dayanıklı bir yapı iskeleti gerekmektedir. Yapı iskeleti gerekiyorsa biyobozunur olması bir seçenek olabilir. Ancak hücrelerin üremesi için belli bir süre

bozulmadan belli bir mekanik yapıda kalması gerekebilir. Bizim çalışmamızda PLLA kaplanmış kollajen yapı iskeletinin arzu edildiği gibi mekanik açıdan daha stabil, daha sonradan bozunabilme imkanına sahip olması açısından iyi bir sonuç elde edilmiştir. Ancak yapı iskeletlerinin bazı dezavantajlarında mevcuttur. Doku iskeleti sıvı hücre ortamında süngerimsi bir yapı almaktadır. Bununla birlikte doğrudan hücrelere mekanik uyarım uygulaması güç olmuştur. Deney esnasında birçok yapı iskeletinin gerdirilen kenarı kopmuştur. Ayrıca yine bu yapıdan dolayı belirli zaman aralıklarında deney yapmak mümkün olmamıştır. Çünkü skafold deliklerini iğne uçlara ikinci kez geçirmek güç olmuştur. Ayrıca zaman almıştır. Hem steril koşulları sağlamak hem de yapı iskeletlerine zarar vermemek için deney sürekliliği mecbur kılmıştır.

Doku iskeletlerinin uyumu, malzemelerin kullanım özellikleri için pek çok yeni konuyu tetikler. Oysa geleneksel implant malzemesi vücut içinde olabildiğince tesirsiz kalmalıdır. İskelet malzemesi vücudun metabolik sürecine tepki vermeli ve insan hücresine eğilim göstermelidir. İskelet malzemesinin nasıl çabuk bozunması gerektiği, insan hücreleri iskelete yapışacak mı ve yaşayabilir kalacak mı, servis performansında bozunmanın etkisi nedir, iskelet malzemesinin kolay kırılabilirliğinde büyük artış var mı, bozulan ürünler vücuda zararlı mı, bozulan ürünlerin salınım oranı tehlikeli seviyeye gelmeden önce mümkün olan maksimum implant genişliği nedir, gibi sorular henüz tamamen araştırmacılar tarafından cevaplandırılmamışken gelecek araştırmacılar tarafından çözümlenmesi gereken sorular olarak kalmaktadır. Yapı iskeletlerinin birçok üretme yöntemi vardır. Bu tekniklerin her biri farklı tasarımlı skafold üretme kabiliyetine sahip olmalarına rağmen ulaşılmak istenen özelliklerinden yoksundur.

Yapı iskeletinin geliştirilmesi hücre kültürleri özelliklerinin anlaşılması mekanik uyarıların optimizasyonu daha iyi kemik hücresinin optimal üretilmesi insanoğlunun biyoteknolojik yapısının gelecekte oluşması için adım olabilir. İnsan hücreleri ile devam eden çalışmalar ileride birçok soruya ışık tutacaktır.

Günümüzde optimal yapı iskeletinin oluşmamasındaki sorunlar malzemenin mekanik dayanıklılığı, çözünürlüğünün kontrol edilebilmesindeki sıkıntılar, toksik özellik içermemesi gibi özellikler aşıldığı oranda üstesinden gelinebilecek ve gelişebilecektir.

Osteoblast hücrelerinin mekanik uyarımlarla üretilmesi ortopedik birçok sorunun çözülmesine ışık tutacaktır.

10.KAYNAKLAR

- 1- D. Kaspar, W. Seidl, C. Neidlinger-Wilke, L. Claes. In vitro effects of dynamic strain on the proliferative and metabolic activity of human osteoblasts. *J Musculoskel Neuron Interact* 2000; 1(2):161-164
- 2- A. Ignatius, H. Blessing, A. Liedert, C. Schmidt, C. Neidlinger-Wilke, D. Kaspar, B.Friemert, L. Claes. Tissue engineering of bone: effects of mechanical strain on osteoblastic cells in type Icollagen matrices. *Biomaterials* 26 (2005) 311–318
- 3- Lutz E. Claes, PhD; Christa A. Heigele, MS; Cornelia Neidlinger- Wilke, PhD; Daniela Kaspar, MS; Walter Seidl, MS;Kristen J. Margevicius, PhD; and Peter Augat, PhD. Effects of Mechanical Factors on the Fracture Healing Process. *Clinical Orthopaedics and Related Research* Number 3558, pp 8132-S147
- 4- Heidi Declercq, Natasja Van den Vreken, Erna De Maeyer, ve ark. Isolation, proliferation and differentiation of osteoblastic cells to study cell/biomaterial interactions; comparison of different isolation techniques and source. *Biomaterials* 25 (2004) 757–768
- 5- James H.-C. Wang, Edward S. Groom, Jane Florer, Richard Wenstrup, Alignment and proliferation of MC3T3-E1 osteoblasts in microgrooved silicone substrata subjected to cyclic stretching. *Journal of Biomechanics* 33 (2000) 729-735
- 6- B.D. Boyan a,b,*, Z. Schwartz, C.H. Lohmann, V.L. Sylvia, D.L. Cochran, D.D. Dean, J.E. Puzas, Pretreatment of bone with osteoclasts affects phenotypic expression of osteoblast-like cells. *Journal of Orthopaedic Research* 21 (2003) 638–647
- 7- Dominique P. Pioletti, Jan M. uller, Lalao R. Rakotomanana, Jacques Corbeil, Edmond Wild , Effect of micromechanical stimulations on osteoblasts: development of a device simulating the mechanical situation at the bone–implant interface. *Journal of Biomechanics* 36 (2003) 131–135
- 8- Gregory H. Altman, Rebecca L. Horan, Ivan Martin., Jian Farhadi., Peter R. H. Stark, Vladimir Volloch, John C. Richmond., Gordana Vunjak-Novakovic, and David L. Kaplan, Cell differentiation by mechanical stres. *The FASEB Journal* express article 10.1096/fj.01-0656fje.
- 9- F. Di Palmaa, M. Douet, C. Boachon, A. Guignandon, S. Peyroche, B. Forest, C. Alexandre, A. Chamson, A. Rattner, Physiological strains induce differentiation in human osteoblasts cultured on orthopaedic biomaterial, *Biomaterials* 24 (2003) 3139–3151

- 10- JOANNE GARVIN,^{1,2} JIE QI,³ MELISSA MALONEY,³ and ALBERT J. BANES, Ph.D.¹⁻⁴. Novel System for Engineering Bioartificial Tendons and Application of Mechanical Load. *Tissue Engineering* Volume 9, Number 5, 2003
- 11- MOHAMMAD SOTOUDEH, SHILA JALALI, SHUNICHI USAMI, JOHN Y-J. SHYY, and SHU CHIEN. A Strain Device Imposing Dynamic and Uniform Equi-Biaxial Strain to Cultured Cells. *Annals of Biomedical Engineering*, Vol. 26, pp. 181–189, 1998
- 12- Neidlinger-Wilke C, Wilke HJ, Claes L. Cyclic stretching of human osteoblasts affects proliferation and metabolism: A new experimental method and its application. *J Orthop Res* 1994; 12:70-78.
- 13- Murray DW, Rushton N. The effect of strain on bone cell prostaglandin E2 release: A new experimental method. *Calcif Tissue Int* 1990; 47:35-39.
- 14- Martin RB, Burr DB. 1989. *Structure, Function, and Adaptation of Compact Bone*. Raven
- 15- Fedde KN. Human osteosarcoma cells spontaneously release matrix-vesicle-like structures with the capacity to mineralize. *Bone and Mineral* 17(2):145-51,1992.
- 16- Millet PJ. Investigation into the activity of osteoblast in vitro and in vivo. Dissertation. University of Cambridge, 1994
- 17- Skojdt M, Russell G. Bone cell biology and the regulation of bone turnover. Gowen M, ed *Cytokines and Bone Metabolism*. Florida: CRC Press, 1-70, 1992
- 18- Rodan SB, Imai Y, Thiede MA. Characterization of an osteosarcoma cell line with (Saos-2) osteoblastic properties. *Cancer Research* 47:4961-4966, 1987
- 19- T. Livingston, P. Ducheyne and J. Garino, *In vivo* evaluation of a bioactive scaffold for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2002, Vol. 62, No. 1, pp. 1-13.
- 20- T. Matsuda and M. Mizutani, Liquid acrylate-terminated biodegradable poly(ϵ -caprolactone-co-trimethyl carbonate). I. Preparation and visible light-induced photocuring characteristics, *Journal of Biomedical Materials Research*, 2002, Vol. 62, No. 3, pp. 387-394.
- 21- M.C. Peters, P.J. Polverini and D.J. Mooney, Engineering vascular networks in porous polymer matrices, *Journal of Biomedical Materials Research*, 2002, Vol. 60, No. 4, pp. 668-678.
- 22- Forwood, M.R., & Turner, C.H. (1995). Skeletal adaptations to mechanical usage. *Bone*, 17, 197s-205s

- 23- Oganov VS, Bakulin AV, Novikov VE, Murashko LM, Kabitskaia OE, Morgun VV, Voronin LI, Schneider V, Shakelford L, LeBlanc A. Reactions of the human bone system in space flight: phenomenology. *Aviakosm Ekolog Med.* 2005 Nov-Dec;39(6):3-9
- 24- James G. McGarry, Jenneke Klein-Nulend, Margriet G. Mullender, and Patrick J. Prendergast. A comparison of strain and fluid shear stress in stimulating bone cell responses—a computational and experimental study. *The FASEB Journal* express article 10.1096/fj.04-2210fje
- 25- X. F. Walboomers, S. E. Elder, J. D. Bumgardner, J. A. Jansen. Hydrodynamic compression of young and adult rat osteoblast-like cells on titanium fiber mesh. DOI: 10.1002/jbm.a.30304
- 26- M. Lewandowska-Szumie, K. Sikorski, A. Szummer, Z. Lewandowski, W. Marczynski. Osteoblast response to the elastic strain of metallic support. *Journal of Biomechanics.* doi:10.1016/j.jbiomech.2006.02.012.
- 27- L. CHAD WINTER, JEROME A. GILBERT, STEVEN H. ELDER, and JOEL D. BUMGARDNER. A Device for Imposing Cyclic Strain to Cells Growing on Implant Alloys. *Annals of Biomedical Engineering*, Vol. 30, pp. 1242–1250, 2002
- 28- MOHAMMAD SOTOUDEH, SHILA JALALI, SHUNICHI USAMI, JOHN Y-J. SHYY, ve ark. A Strain Device Imposing Dynamic and Uniform Equi-Biaxial Strain to Cultured Cells. *Annals of Biomedical Engineering*, Vol. 26, pp. 181–189, 1998
- 29- Craig B. Clark, Thomas J. Burkholder, John A. Frangos. Uniaxial strain system to investigate strain rate regulation in vitro. *Review of Scientific Instruments* Volume 72, Number 5 MAY 2001.
- 30- COURTNEY A. POWELL, BETH L. SMILEY, JOHN MILLS, ve ark. Mechanical stimulation improves tissue-engineered human skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 283: C1557–C1565, 2002.
- 31- JAMES H.-C. WANG, GUOGUANG YANG, and ZHAOZHU LI. Controlling Cell Responses to Cyclic Mechanical Stretching. *Annals of Biomedical Engineering*, Vol. 33, No. 3, March 2005 (© 2005) pp. 337–342
- 32- BeH atrice Labat, Thierry Chepda!, Jacques Frey, Jean Rieu, Jean-Luc Aurelle, Martial Douet, Christian Alexandre, Annette Chamson. Practice of a testing bench to study the effects of cyclic stretching on osteoblast orthopaedic ceramic interactions. *Biomaterials* 21 (2000) 1275}1281

- 33- Thomas D. Brown. Techniques for mechanical stimulation of cells in vitro: a review. *Journal of Biomechanics* 33 (2000) 3}14
- 34- D. Kaspar, W. Seidl, C. Neidlinger-Wilke, A. Ignatius, L. Claes, Dynamic cell stretching increases human osteoblast proliferation and C1CP synthesis but decreases osteocalcin synthesis and alkaline phosphatase activity, *Journal of Biomechanics* 33 (2000) 45-51
- 35- J. You, C. E. Yellowley, H. J. Donahue, Y. Zhang, Q. Chen, C. R. Jacobs. Substrate Deformation Levels Associated With Routine Physical Activity Are Less Stimulatory to Bone Cells Relative to Loading-Induced Oscillatory Fluid Flow
- 36- Frost, H. Bone “mass” and the “mechanostat”: A proposal. *Anat Rec* 219:1–9;1987
- 37- Krebsbach PH, Kuznetsov SA, Bianco P, Robey PG (1999). Bone marrow stromal cells: characterization and clinical application. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* 10(2):165-81.
- 38- Muraglia A, Cancedda R, Quarto R (2000). Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *Journal of Cell Science* 113:1161-6
- 39- Houghton A, Oyajobi BO, Foster GA, Russell RG, Stringer BM (1998). Immortalization of human marrow stromal cells by retroviral transduction with a temperature sensitive oncogene: identification of bipotential precursor cells capable of directed differentiation to either an osteoblast or adipocytes phenotype. *Bone* 22(1):7-16.
- 40- Aubin JE (1998a). Bone Stem Cells. *Journal of Cell Biochemistry Supplemental* 30-31:73-82.
- 41- Aubin JE (1998b). Advances in the osteoblast lineage. *Biochemistry and Cell Biology* 76(6):899-910.
- 42- Carter DR, Blenman PR, Beaupre GS (1988). Correlations between mechanical stress history and tissue differentiation in initial fracture healing. *Journal of Orthopaedic Research* 6(5):736-48.
- 43- Bellows CG, Heersche JN, Aubin JE (1990). Determination of the capacity for proliferation and differentiation of osteoprogenitor cells in the presence and absence of dexamethasone. *Developmental Biology* 140(1):132-8.
- 44- Long MW, Robinson JA, Ashcraft EA, Mann KG (1995). Regulation of human bone marrow-derived osteoprogenitor cells by osteogenic growth factors. *Journal of Clinical Investigation* 95:881-7.

- 45- Turksen K, Aubin JE (1991). Positive and negative immunoselection for enrichment of two classes of osteoprogenitor cells. *Journal of Cell Biology* 114(2):373-84.
- 46- Rubin CT, Lanyon LE (1987). Osteoregulatory nature of mechanical stimuli: Function as a determinant for adaptive remodeling in bone. *Journal of Orthopaedic Research* 5:300-10.
- 47- Burr DB, Martin RB, Lefever S (1984). The prevention of disuse osteoporosis in sedentary rabbits. *Transactions of the Orthopaedic Research Society* 9:146.
- 48- Churches AE, Howlett CR, Waldron KJ, Ward GW (1979). The response of living bone to controlled time varying loading: method and preliminary results. *Journal of Biomechanics* 12:35-45.
- 49- O'Conner JA, Lanyon LE, McFie H (1982). The influence of strain rate on adaptive bone remodeling. *Journal of Biomechanics* 15:767-81.
- 50- Lanyon LE, Hampson, WGJ, Goodship AE, Shah JS (1975). Bone deformation recorded *in vivo* from strain gauges attached to the human tibial shaft. *Acta Orthopaedica Scandinavica* 46:256-68.
- 51- Egger EL, Gottsauner-Wolf F, Palmer J, Aro HT, Chau EY (1993). Effects of axial dynamization on bone healing. *Journal of Trauma* 34(2):185-92.
- 52- Zhu, C., Bao, G., and Wang, N., Cell mechanics: mechanical responses, cell adhesion, and molecular deformation, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 2, 189, 2000.
- 53- Chen, C.S., Tan, J.L., and Tien, J., Mechanotransduction at cell-matrix and cell-cell contacts, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 6, 3.1, 2004.
- 54- Asthagiri, A.R. and Lauffenburger, D.A., Bioengineering models of cell signaling, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 2, 31, 2000.
- 55- Chicurel, M.E., Chen, C.S., and Ingber, D.E., Cellular control lies in the balance of forces, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 10, 232, 1998.
- 56- Silver, F.H. and Siperko, L.M., Mechanosensing and mechanochemical transduction: how is mechanical energy sensed and converted into chemical energy in an extracellular matrix? *Crit. Rev. Biomed. Eng.*, 31, 255, 2003.
- 57- Gooch, K.J. and Tennant, C.J., *Mechanical Forces: Their Effects on Cells and Tissues*, Springer-Verlag, New York, 1997.
- 58- Ingber, D.E., Mechanobiology and diseases of mechanotransduction, *Ann. Med.*, 35, 564, 2003.
- 59- Bird, R.B., Stewart, W.E., and Lightfoot, E.N., *Transport Phenomena*, John Wiley & Sons, New York, 1960.

- 60- Schlichting, H., *Boundary Layer Theory*, McGraw-Hill, New York, 1979.
- 61- Sakurai, A. et al., A computational fluid mechanical study of flow over cultured endothelial cells, *Adv. Bioeng.*, 20, 299, 1991.
- 62- Haidekker, M.A., White, C.R., and Frangos, J.A., Analysis of temporal shear stress gradients during the onset phase of flow over a backward-facing step, *J. Biomech. Eng.*, 123, 455, 2001.
- 63- Frangos, J.A., Huang, T.Y., and Clark, C.B., Steady shear and step changes in shear stimulate endothelium via independent mechanisms — superposition of transient and sustained nitric oxide production, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 224, 660, 1996
- 64- Duncan, R.L. and Turner, C.H., Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain, *Calcif. Tissue Int.*, 57, 344, 1995.
- 65- Millward-Sadler, S.J. and Salter, D.M., Integrin-dependent signal cascades in chondrocyte mechanotransduction, *Ann. Biomed. Eng.*, 32, 435, 2004.
- 66- Bancroft, G.N. et al., Fluid flow increases mineralized matrix deposition in 3D perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in a dose-dependent manner, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 99, 12600, 2002.
- 67- Sikavitsas, V.I. et al., Mineralized matrix deposition by marrow stromal osteoblasts in 3D perfusion culture increases with increasing fluid shear forces, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 100, 14683, 2003.
- 68- Nerem, R.M., Role of mechanics in vascular tissue engineering, *Biorheology*, 40, 281, 2003.
- 69- Kanda, K. and Matsuda, T., Mechanical stress-induced orientation and ultrastructural change of smooth muscle cells cultured in three-dimensional collagen lattices, *Cell Transplant.*, 3, 481, 1994.
- 70- Davisson, T. et al., Static and dynamic compression modulate matrix metabolism in tissue engineered cartilage, *J. Orthop. Res.*, 20, 842, 2002.
- 71- Park, S., Hung, C.T., and Ateshian, G.A., Mechanical response of bovine articular cartilage under dynamic unconfined compression loading at physiological stress levels, *Osteoarthr. Cartil.*, 12, 65, 2004.
- 72- Huang, C.Y. et al., Effects of cyclic compressive loading on chondrogenesis of rabbit bone-marrow derived mesenchymal stem cells, *Stem Cells*, 22, 313, 2004.
- 73- R. Landers and R. Mulhaupt, Complex objects and tailor-made scaffolds fabricated by means of three dimensional plotting of biodegradable thermoplastics, thermosets and hydrogels, Proc. 10th International Conference on Biomedical engineering, 6-9

- December 2002, Singapore, edit. JCH Goh, publ. National University of Singapore, pp. 132-133.
- 74- Feng Zhao, Yuji Yin, William W. Lu, J. Chiyang Leong, Wenyi Zhang, Jingyu Zhang, Mingfang Zhang and Kangde Yao. Preparation and histological evaluation of biomimetic three-dimensional hydroxyapatite/chitosan-gelatin network composite scaffolds. *Biomaterials*, Volume 23, Issue 15, August 2002, Pages 3227-3234
- 75- T. Livingston, P. Ducheyne and J. Garino, *In vivo* evaluation of a bioactive scaffold for bone tissue engineering, *Journal of Biomedical Materials Research*, 2002, Vol. 62, No. 1, pp. 1-13.
- 76- Y. Hu, S.R. Winn, I. Krajchich and J.O. Hollinger, Porous polymer scaffolds surface-modified with arginine-glycine-aspartic acid enhance bone cell attachment and differentiation *in vitro*, *Journal of Biomedical Materials Research*, 2003, Vol. 64A, No. 3, pp. 583-590.
- 77- J. Yang, G. Shi, J. Bei, S. Wang, Y. Cao, Q. Shang, G. Yang and W. Wang, Fabrication and surface modification of macroporous poly (L-lactic acid) and poly (L-lactic-co-glycolic acid) (70/30) cell scaffolds for human skin fibroblast cell culture, *Journal of Biomedical Materials Research*, 2002, Vol. 62, No. 3, pp. 438-446.
- 78- Y. Zhang and M. Zhang, Three-dimensional macroporous calcium phosphate bioceramics with nested chitosan sponges for load-bearing bone implants, *Journal of Biomedical Materials Research*, 2002, Vol. 61, No. 1, pp. 1-8.
- 79- Richardson SM, Curran JM, Chen R, Vaughan-Thomas A ve ark. The differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into chondrocyte-like cells on poly-L-lactic acid (PLLA) scaffolds. *Biomaterials* 2006;27:4069–4078.
- 80- Grad S, Kupcsik L, Gorna K, Gogolewski S ve ark. The use of biodegradable polyurethane scaffolds for cartilage tissue engineering: potential and limitations. *Biomaterials* 2003;24:5163–71.
- 81- Masuoka K, Asazuma T, Ishihara M, Sato M ve ark. Tissue engineering of articular cartilage using an allograft of cultured chondrocytes in a membrane-sealed atelocollagen honeycomb-shaped scaffold (ACHMS scaffold). *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2005;75:177–84.
- 82- Ma HL, Hung SC, Lin SY, Chen YL ve ark. Chondrogenesis of human mesenchymal stem cells encapsulated in alginate beads. *J Biomed Mater Res A* 2003;64:273–81.