

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**OSTEOBLAST HÜCRE KÜLTÜRLERİNİN SES
DALGALARI İLE MEKANİK UYARIMI**

BERİVAN ÇEÇEN

BİYOMEKANİK A.D.
YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2007

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**OSTEOBLAST HÜCRE KÜLTÜRLERİNİN SES
DALGALARI İLE MEKANİK UYARIMI**

BİYOMEKANİK A.D.
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BERİVAN ÇEÇEN

Prof. Dr. Hasan HAVİTÇİOĞLU

Prof. Dr. Ahmet ÇAKIR


Bu araştırma BAP tarafından desteklenmiştir.

13/08/2007

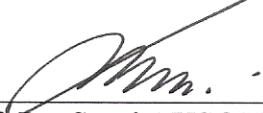
**OSTEOBLAST HÜCRE KÜLTÜRLERİNİN SES DALGALARI İLE
MEKANİK UYARIMI**

BERİVAN ÇEÇEN

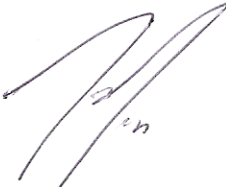
Jüri Üyeleri:



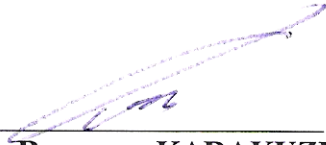
Prof. Dr. Hasan HAVITÇIOĞLU
Ortopedi ve Travmatoloji A.D.
(Danışman Öğretim Üyesi)




Prof. Dr. Sami AKSOY
Makine Mühendisliği
(Jüri Üyesi)




Prof. Dr. Hasan TATARİ
Ortopedi ve Travmatoloji A.D.
(Jüri Üyesi)



Prof. Dr. Ramazan KARAKUZU
Makine Mühendisliği
(Jüri Üyesi)



Prof. Dr. Ahmet ÇAKIR
Malzeme ve Metalürji Mühendisliği
(Danışman Öğretim Üyesi)



Doç. Dr. Önder BARAN
Ortopedi ve Travmatoloji A.D.
(Jüri Üyesi)

İÇİNDEKİLER

Sayfa

1	ÖZET	1
2	SUMMARY	2
3	GİRİŞ ve AMAÇ.....	3
4	GENEL BİLGİLER	
4.1	Kemik ve Yapısı.....	6
4.1.1	Osteoprogenitor Hücreler (Öncü Hücreler)	9
4.1.2	Osteoblastlar	9
4.1.3	Osteoklastlar.....	10
4.1.4	Osteositler.....	10
4.2	Yapı İskeleti.....	11
4.3	Ses Dalgaları.....	13
4.4	Transduser ve Yapısı.....	14
5	GEREÇ ve YÖNTEM	
5.1	Deney Düzenegi.....	15
5.2	Kemik Doku Yapı İskeletinin Kimyasal Hazırlanışı.....	17
5.3	In Vitro Hücre Kültürlerinin Hazırlanması	
5.3.1	Kullanılan reaktif ve malzemeler	18
5.3.2	Hazırlanan Solüsyonlar	19
5.4	Hücre Kültürlerinin Ultrason ile Mekanik Uyarımı	21
6	BULGULAR.....	22
7	TARTIŞMA	25
8	SONUÇ ve ÖNERİLER	27
9	KAYNAKLAR.....	28

1.ÖZET:

OSTEOBLAST HÜCRE KÜLTÜRLERİNİN SES DALGALARI İLE MEKANİK UYARIMI

Berivan ÇEÇEN

Dokuz Eylül Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Biyomekanik Anabilim Dalı

35340 Inciraltı/İzmir

Bu çalışmada geliştirilen kemik doku yapı iskeleti üzerindeki osteoblast hücrelerinin ses dalgası ile mekanik uyarım karşısında in vivo ortamdaki çoğalımının araştırılması amaçlanmıştır. Mekanik uyarımın tam olarak osteoblast hücrelerine olan etkileri in vivo ortamda bilinmese de hücreler üzerindeki gerilme etkisi olduğuna inanılmaktadır. Bir mekanik uyarım çeşidi olan ses dalgaları ile uyarım karşısında osteoblast hücrelerin kemik doku yapı iskeleti üzerinde optimal koşullarda çoğaldığı düşünülmektedir. Bu çalışmada kemik iliğinden alınan mezanşimal hücreler kültür ortamında farklılaştırılarak kimyasal olarak üretilen Poly-l-laktik asit (PLLA) ve kollajen yapı iskeletine ekilmiştir. Osteoblast kemik hücrelerine farklılaşma elde edildikten sonra üç gün süreyle 30 mW/cm² şiddetinde yirmi dakika boyunca hücreler ultrason (US) çevirici aygıt ile uyarılmıştır. Yapı iskeleti üzerinde osteoblast kemik hücrelerinin gözenekler içindeki yerleşiminin araştırılması taramalı elektron mikroskopunda (SEM) incelenmiştir.

Anahtar Sözcükler: Ses Dalgası, Mekanik Uyarım, Kemik Doku Yapı İskeleti

2.SUMMARY:

Berivan ÇEÇEN

Dokuz Eylül Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Biyomekanik Anabilim Dalı

35340 İnciraltı/İzmir

MECHANICAL STIMULATION OF OSTEOBLAST CELL CULTURES USING SONIC WAVES

In this study, the increase in osteoblast cells developed on scaffold in vivo under mechanical stimulation caused by sonic waves is investigated. Although the effects of mechanical stimulation on osteoblast cell in vivo are not exactly known, it is believed to have stress effect on cells. It is thought that osteoblast cells increase on scaffold under optimum conditions under stimulation caused by sonic waves, which is a type of mechanical stimulation. In this study, mesenchymal cells taken from bone marrow were differentiated in culture environment and planted onto chemically produced Poly-l-lactic acid (PLLA) and collagen scaffold. Osteoblast bone cells, after obtaining the differentiation, were stimulated using ultrasonic (US) converter device for three days under 30 mW/cm^2 magnitudes during twenty minutes. Allocation of osteoblast bone cell in pores on scaffold structure skeleton was investigated using scanning electron microscope (SEM).

Keywords: Sonic waves, Mechanical stimulation, Scaffold

3.GİRİŞ ve AMAC:

In vivo da birçok hücre, özellikle kemik hücreleri mekanik uyarıya cevap vermektedir (1). Mekanik uyarım, osteoblast mekanizmasını etkileyen önemli faktörlerden biridir (2,3,4). 19. yüzyılın sonlarına doğru Julius Wolff'dan beri mekanik yüklenmeye cevap olarak kemik modellenmesi çalışılmaktadır (5). Bu konudaki güncel araştırma metotları, osteoblastların metabolik olarak mekanik uyarımlarla reaksiyona girme kabiliyetine dayanır. Üzerinde osteoblast kültürleri taşıyan ve kontrol edilmiş bir akışkan akımına maruz bırakılan elastik membranlar mekanik uyarım uygulama biçimlerinin en yaygın olanlarıdır (6,7). Mekanik uyarımın hücrelere olan etkisi birçok deneysel yöntem ile araştırılmaktadır; fakat hiçbir aygıt çeşitli uyarımlarda ve yüklerde hücrenin mekanik iç yüzeyindeki mikro hareketleri tam olarak taklit edememektedir (8).

Mikro hareket doku farklılaşmasını belirlemede önemli bir etkidir. Mekanik uyarımlar kemik hücreleri tarafından algılanabilen, kayma gerilmeleri gibi, gerilmelere neden olurlar (9,10,11). Çalışmalar dinamik yüklemeler karşısında dokusal cevapların sadece emilmeyi engellemediği aynı zamanda gerilme ile orantılı olarak kemik formasyonunu da arttırdığını göstermiştir. Yapılan çalışmalarda kemik doku yapı iskeletin mekanik özelliklerinin, biyolojik özellikler kadar önemli olduğu vurgulanmaktadır (12). Mekanik yüklenme ile kemik formasyonu arasındaki ilişkinin osteoblast fonksiyonları ile alakalı olduğu bilinmektedir (13,14). Mekanik gerilim kemik yapısını ve fonksiyonları düzenlemede temel fizyolojik faktörlerden biridir (15,16). Kemik dokusunun mekanik çevreye uyumluluğu, mekanik gerilmeye cevap olarak kemik hücrelerinin modellenmesine ve tekrardan modellenmesine bağlıdır (17). In vitro ortamda kemik mekanik yüklemelere maruz kaldığı sürece bu yüklemeye cevap olarak tekrardan modellenmeye devam eder. Ayrıca, kemik hücreleri uzama ve kayma gerilmeleri gibi mekanik özelliklerine göre değişkenlik gösterir (18). Yani kemiğin yeniden modellenmesi dokuya yanıt süresince uygulanan kuvvete göre incelenebilir (19). Araştırmalar mekanik uyarımın kemik hücrelerinin çoğalmasını sağladığını ortaya koymuş ve mekanik yüklemeye cevap olarak kemik hücrelerinin sayısının artması ile matris sentezinin de kemik kütlesini arttırdığını göstermiştir (17).

Nagatomi ve ark. (20) yaptıkları in vitro çalışmalarda osteoblast hücrelerinin siklik basınçta ondokuz gün boyunca ardışık olarak uyarımı sonucu kollajen sentezinin ve depolanmasının tetiklendiğini göstermişlerdir. Dolayısıyla, osteoblast formasyonunun artışına paralel olarak kemik formasyonu gerçekleşmektedir. Kortikal kemikte yeniden modellenme

işlemi, çoğunlukla, osteoklastların harvens kanallarına açtığı osteoblastlar tarafından doldurulan osteoneel tünellerinden meydana gelmektedir (21). Bu kanallar 100–200 µm genişliğinde ve 10 mm uzunluğundadır. Konsellous kemikte ise 60–70 µm derinliğinde trabeküler yüzey boyunca aşınma yaratan osteoklastlar tarafından gerçekleştirilmektedir.

Osteoblastlar tarafından yapılan bu kemik formasyonu özellikle tip-I kollajen ve osteopontin, osteokalsin, osteonektin gibi kollajenöz olmayan proteinlerin serbest kalması ve sentezi gibi işlemleri içerir (20). Kırık kallusunda ki hücreler ultrason ile gönderilen mekanik enerjiye cevap vermektedir (12) ve düşük yoğunluktaki ultrason enerjisinin in vivo da kemik doku üzerinde olumlu etkisi vardır (13).

Kırık iyileşmesi dört safhadan oluşmaktadır; I-hasara cevap, II-intramembranöz ossifikasyon, III-kıkırdak formasyonu, IV- kemik köprüsünün oluşumu için endokondral (kıkırdak içi) ossifikasyon. Bu dört safha histolojik olarak farklı özellikteyken, kemotaksis ve ekstrasellüler matrisin sentezi gibi hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını içeren hücresel olaylarda ortaklık gösterirler (22).

Mekanik bir dalga olarak US, elastik materyal özellikleri açısından elektromanyetik dalgalara oranla daha etkili bir dalgadır (23). Kırık iyileşimindeki uygulamalarında termal ve tahrip edici özellikler göstermemesinden dolayı düşük şiddette kullanılmaktadır. Kolay bir yöntem olması yanında integrinlerin membran özelliklerini arttırdığı, aktin iskelet yapısını yeniden düzenlediği gösterilmiştir. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar da; düşük şiddette uygulanan ultrasona kemik cevap vermekte ve endokondral ossifikasyon artırmaktadır (24).

Kaspar ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada gingival fibroblasts, mandibular osteoblasts ve monocytes hücreleri 1MHz de 1:4 kesikli pulslar ile ve 45kHz de sürekli halde uyarım yapmış ve fibroblast ve osteoblastlarda hücre çoğalması gözlemlenmiştir. Ultrason uyarımı kırık iyileşmesinde, kemik-defekt iyileşmesinde ve trabeküler kemik rejenerasyonunda etkilidir (14,25). Ultrason osteoblast çoğalmasını uyarabilmekte (26) osteoblast ve osteoklast hücre sayısını düzenleyebilmektedir (27). Çalışmalar US uyarımının osteoblast farklılaşmasını arttırdığını osteoklastogenizi inhibe ettiğini ortaya çıkarmıştır (23). Reher ve ark. (28) in vitro ortamda ultrason ile yaptıkları uyarım sonucunda kemik hücreleri tarafından sentezlenen nitrik asit ve prostaglandin oranlarında artış olduğunu saptamışlardır. Yang ve ark. (23) osteoblast hücrelerine 125 mW/cm² şiddette, onbir gün boyunca onar dakikalık uyarım yapmışlar ve Alkalın (ALP) fosfatazda önemli oranda artış gözlemlenmiştir.

Ortopedi alanında kullanılan biyomateryaller, biyoyumluluk ve biyomekanik kriterleri açısından önemli bir yer tutmaktadır (29). Osteoblast kemik hücreleri mekanik uyarım karşısında hassaslık gösterirler, dolayısıyla, kemik-implant iç yüzeyi göz önüne alındığında söz konusu yüzeyde hücrelerin mekanik uyarıma karşı artış oranları gözlemlenebilmektedir. Kemik doku yapı iskeletin mekanik özellikleri hangi materyalden yapıldığına oldukça bağlıdır (30). Ayrıca mikro ve makro doku yerleşimi ve porozite mekanik özellikleri etkileyen diğer faktörlerdir. Yani, kemik doku yapı iskeletin biyobozulabilen, mikro-poroz ve nano yapısının olması mekanik özelliklerini etkilemektedir. Bir çok in vivo çalışmalar kemik dokusunun modellenmesi ve yeniden modellenmesinde, kırık iyileşmesinde, biyomateryal ve kemik etkileşiminde mekanik duyarlılığın önemli olduğunu göstermektedir (31,32,33,34,35).

Yapılan implant malzemelerin biyokarakteristiği kimyasal kompozisyonuna, yüzey dokusuna, porozitesine ve şekline oldukça bağlıdır. Biyolojik sistemlerin birbiriyle olan etkileşimini, hücreler arası tutunmayı ve adhezyonu sağladığı, dolayısıyla da, hücre morfolojisine önemli etkileri olduğu için çeşitli biyomateryaller geliştirilmektedir (36). Doku mühendisliğinde metal, biyoaktif seramik ve biyobozulabilen polimer gibi biyolojik ve sentetik tabanlı materyaller kemik-doku yapılanmasında kemik doku yapı iskeleti olarak kullanılmaktadır (37,38). Biyomateryallerde yüzey özellikleri; hücre adhezyonu, çoğalmı gibi hücre etkileşimlerinde büyük bir rol oynamaktadır. Birçok sentetik polimerlerin yüzey karakteristiğinin hidrofobik olması biyoyumluluğu ters yönde etkilemektedir. Bu yüzden yapı iskelet üretiminde hücre çoğalmını arttıran por boyutu, porozitesi ve yüzey hidrofilitesi önemli bir rol oynamaktadır (38).

Ostekalsin ekspresyonunda ve ALP aktivitesinde osteoblast aktivitesi indikatör olarak görev yapmaktadır. Tip I kollajen gibi ekstraselüler matris molekülleri osteoblast çoğalmında ve farklılaşmasında temel rol oynamaktadır (15). Kemik doku yapı iskelet uygunluğu gözenekli yapı elverişliliğine, hücre ile sentetik materyal arasındaki etkileşimi arttıran yüzey modifikasyonuna bağlıdır (39,40). Yapılan nano düzeydeki çalışmalar yapı iskeletlerinin kemik doku yapılanmasında tip I kollajenin morfolojik yapısını çok rahat taklit edebileceğini göstermiştir. Ayrıca 3-boyutlu bu nano iskeletlerin hücre çoğalmını tetiklediği bilinmektedir (41). Sonuç olarak US uyarımının hücre çoğalmını, kollajen/nonkollajen protein NCP üretimini, kemik yapılanmasını ve anjiogenesis oranını arttırdığı sonucuna varmışlardır (41). Liu ve ark. (39) hücre tutunmasının membran karakteristiğine göre değiştiğini, partiküllü membranlarda porozlu ve yoğun membranlara oranla hücre tutunmasının daha fazla olduğunu

göstermişlerdir. Yaptıkları partiküllü PLLA membranını iyi bir substrat görevi de görebildiğini saptamışlardır. Yüzey yapısının değişimi ile polimer kristalizasyonunda farklılık göstermektedir. Çok net olmamakla birlikte, kristalizasyon bozunum oranını azaltmaktadır. Mikro yapının tasarımı biyolojik ve biyomekanik yapının yanı sıra rejenerasyonu da etkilemektedir (43).

Gözenekli mikro yapının geometrisi, rejenerasyon işlemi sırasında ve sonrasında, biyobozulabilen iskelet yapının mekanik fonksiyonlarının kontrolü için anahtar bir faktördür. Üç boyutlu yapı iskeleti, therapeutic hücreleri serbest bırakmada, hasarlı bölgeleri saptamada ve doku onarımında bir araç olarak kullanılabilir (44). Kemik doku mühendisliği, öncü hücrelerin farklılaşmasını optimize ederek ve üç boyutlu yapı iskeleti üzerinde ekstraselüler matris (ECM) fonksiyonunu geliştirerek hücre-materyal yapımını fonksiyonel olarak sağlamaktır (45). İskelet üzerine ekili hücrelerin ürettiği doğal matrisin, yeni doku yapısı oluşana kadar, ekstraselüler matris görevi görmesi kemik doku yapı iskelet tasarımının başlıca amaçlarından biridir. Hücre popülasyonu ve matris yapı iskeleti, hücre kültürünü desteklemede ve implantasyonun dokuya eşdeğer olmasında, doku mühendisliğindeki önemli yaklaşımlardandır (45).

İdeal bir kemik doku yapı iskeleti hücre ile uyumlu olmalı, hücreler homojen dağılmalı ve matris sentezine izin vermelidir (46). Osteoblast hücrelerinin farklı substrat kullanımına bağımlı gelişiminde adezyon büyük bir rol oynamaktadır (36). MG-63 hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmaya göre yüzey morfolojisinin hücre adhezyonunda ve büyümesinde önemli bir faktör olduğu gösterilmiştir (39). Kemik doku yapı iskeleti üretiminde de substratın hücre adhezyonu, farklılaşması ve çoğalımında önemli olduğu düşünülmektedir. Nicel yaklaşımlar adhezyonun doku-biyomateryal arasındaki ilişkiyi, hücre morfolojisini ve biyomekanik özellikleri etkilediğini göstermiştir (36).

4.GENEL BİLGİLER:

4.1 Kemik ve Yapısı:

Kemik ekstraselüler matris, lif ile birlikte hücrelerden oluşan bir yapıdır. Bu ekstraselüler matris iki fazdan oluşmaktadır (47). Kollajen ve glikosaminglikanlardan oluşan osteoidler yani organik faz, kalsiyum fosfattan oluşan mineral yani inorganik faz. Lif yapı ise kollajenden oluşmaktadır. Çoğunluğu tip I, az miktarda da tip III ve Tip VI den oluşan kollajen, kemiğin ana bileşenini oluşturur. Kemiğin %67'sini inorganik bileşenler (kalsiyum, potasyum, sodyum, magnezyum, karbonat ve fosfat), %33'ünü ise organik bileşenler

oluşturmaktadır (48). Farklılaşmamış hücreler olan osteoprogenitor hücreler, kemik biçimlenmesini sağlayan osteoblastlar, kemik yıkımını sağlayan osteoklastlar ve hücre korunumunu sağlayan osteositler kemiği oluşturan hücrelerdir (47). Osteoblast ve osteositler fibroblast ve mezanşimal hücrelerin öncüsü, osteoklastlar ise monosit veya fagosit gibi kan hücrelerinin öncüsüdür.

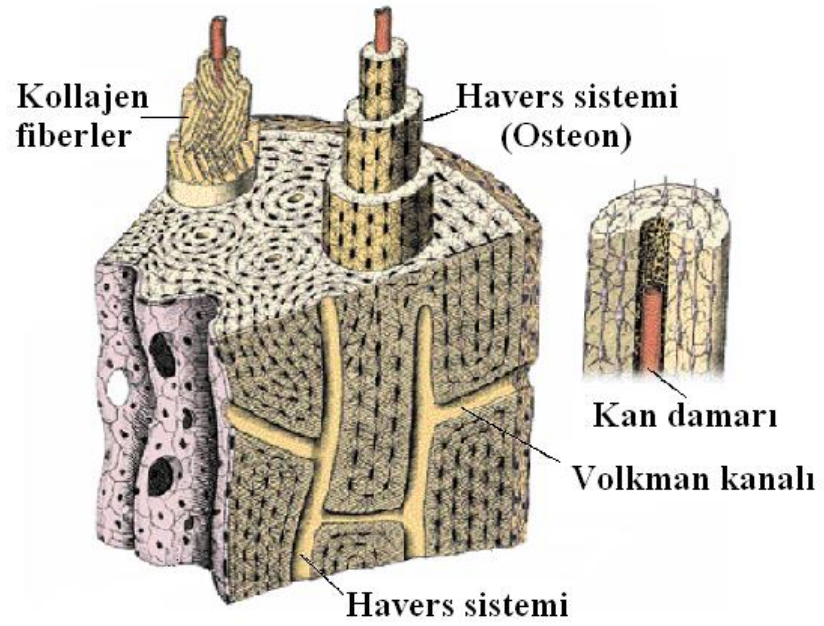
Kemik hücreleri iki tip doku üretirler; düzenli yönlenmiş lameller (sekonder) yapı ve rastgele yönlenmiş primer yapı (48). Primer kemik (olgunlaşmamış kemik); gelişigüzel kollajen ipliklerden oluşmuş olup lameller yapıya oranla az mineral içeriklidir. Birbiriyle ağzlaşan kemik trabeküllerinden oluşmuştur. Trabeküllerin aralarında, içleri kemik iliği ile dolu labirent gibi düzensiz süngerimsi boşluklar vardır.

Sekonder kemik (olgunlaşmış kemik, kortikal kemik); kemik lamellerinden oluşmuş lamelli bir yapıdır (Şekil-1) (47). Düzgün biçimde kollajen iplikler komşu lameldekiler ile çapraz yönde ve spiraller biçiminde yerleşmiştir. Sekonder kemikte, kemik lamelleri duran damar kanalları etrafında iç içe yerleşmiş silindirik birimler oluşturmaktadır (48). Bu yapıya havers sistemi veya osteon denir. Kemiklerin yeniden modellenme işlemi havers kanallarının (osteon) oluşumuna bağlıdır. İki adımda gerçekleşen bu şekillenme işleminde ilk adımda kemik yıkımını sağlayan osteoklastlar küçük kanallar açar, ikinci adımda ise kan damarları ve osteoblastlar açılan bu kanallara hücum eder. Sekonder kemikte havers kanalı ve volkman kanalı olmak üzere iki türlü damar kanalı vardır. Havers kanalı, havers sisteminin merkezinde uzunlamasına yer alan birbirleri ile bağlantı kanallardır. Dikey veya eğri yönde seyreden kanallar ise volkman kanallarıdır. Havers kanalları, volkmann kanalları aracılığıyla da sürekli ilişki kurarlar. Volkman kanalları kemiğin periosteumdan ve endosteumuna kadar uzanır (Şekil-2a, Şekil-2b).

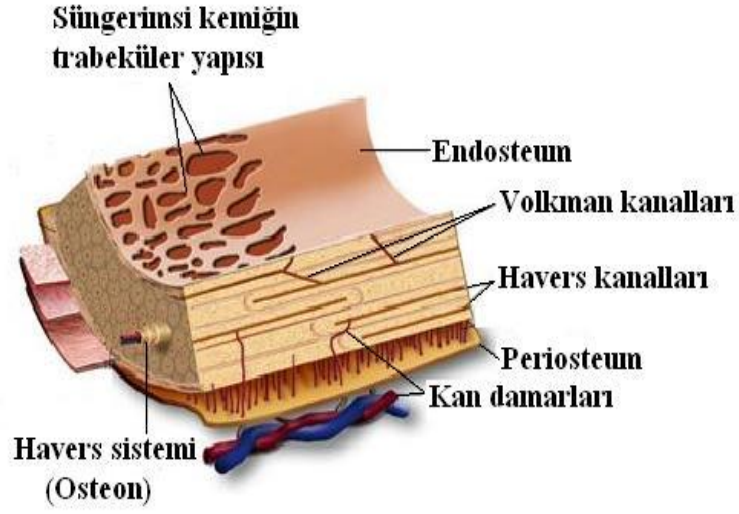
Sekonder kemikten yapılmış kalın duvarlı boşluğa medüller boşluk (ilik boşluğu) denir (48). İnce bir kompakt kemik tabakasıyla kaplanmış süngerimsi kemik epifizleri, uzun kemiklerin şişkin uç kısımlarını oluşturur. Kemiklere bu uzunluğu veren kısımlara ise diyafiz adı verilir. Kompakt kemikten oluşur, sadece kemik iliğine bakan yüzeylerde çok az süngerimsi kemik bulunur. Kemiğin dış yüzeyini periosteum adı verilen yüzey oluşturur. Birçok lameller kemiğin yığılımı ile bu dış yüzeyde ince kortikal tabakayı şekillendirir. Kemiğin iç yüzeyinde ise endosteum yüzey vardır (Şekil-2b). Genelde iki veya üç lameller tabakadan oluşmaktadır. Endosteum, ince spikül formda olup primer osteonlardan oluşan konsellous (spongioz, süngerimsi) kemiği oluşturur.



Şekil-1 Süngerimsi ve kortikal kemik
(<http://depts.washington.edu/bonebio/ASBMRed/cells.html>).



Şekil-2a Havers ve Volkman kanalları (<http://med.ege.edu.tr/~altug/images/kemikdokusu.ppt>)



Şekil-2b Kemiğin içyapısı (<http://ocw.mit.edu/OcwWeb/Health-Sciences-and-Technology/HST-523JSpring-2004/CourseHome/index.htm>)

4.1.1 Osteoprogenitor Hücreler (Öncü Hücreler):

Kemik dokuda, doğum sonrasında mitoz bölünme yapabilecek, yapı ve işlev bakımından gelişkin, farklılaşmamış hücre toplulukları vardır (48). Bu hücelere osteoprogenitor veya osteojenik hücreler denir. Bunlar kemik hücresi olma yönünde koşullanmış mezenşim hücrelerdir (Şekil-3, Şekil-4). Bu hücreler kemiklerin normal büyümesi sırasında aktiftirler. Kemikte yaralanma ve kırıkların iyileşme bölgelerinde ve kemiğin yeniden düzenlenmesi sırasında aktive edilerek mitozla bölünüp çoğalırlar. Çoğalan bu hücrelerin bir bölümü kemiği oluşturan osteoblastlara dönüşür. Osteogenez (kemik yapımı) durduğunda osteoblastlar da osteoprogenitor hücelere dönüşebilir.

4.1.2 Osteoblastlar:

Kemik oluşumundan sorumlu hücrelerdir (Şekil-3, Şekil-4) (48). Osteoblastlar genellikle endoplasmik retikulum ile çevrelenmiş çekirdeği olan küboit hücrelerdir (47). Osteoprogenitör hücrelerin farklılaşması sonucu oluşurlar. Kemik matrisini sentezlerler. Yüksek metabolik aktiviteye sahip hücrelerdir. Histokimyasal olarak osteoblastlar alkalın fosfataza duyarlı hücrelerdir. Bu da kemik matrisinde kalsiyum depolanmasını osteoblastların düzenlediğini gösterir. Bu hücreler kemik matrisinin organik kısmını yani kollajen fibrilleri, proteoglikanları, glikozaminoglikan ve glikoproteinleri salgılar. Henüz kireçleşmemiş olan bu

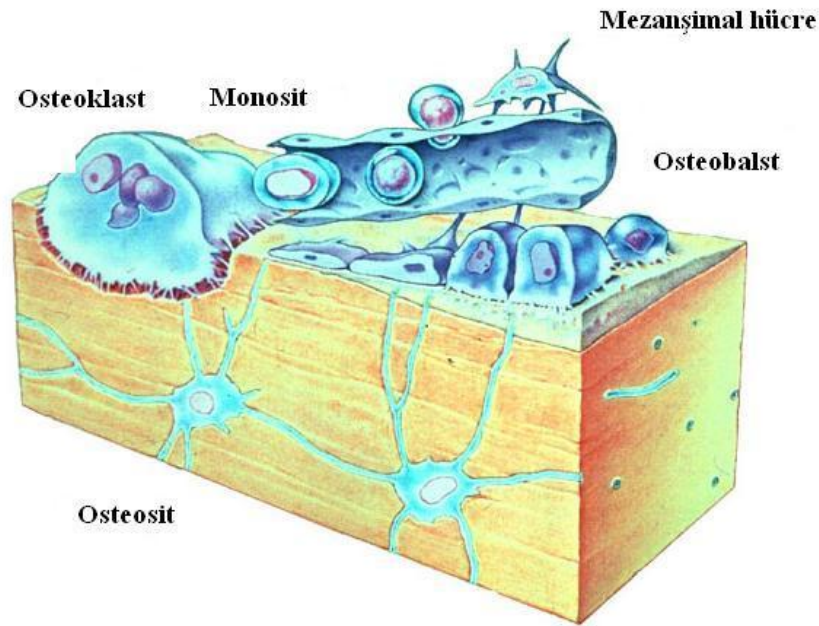
tür organik maddeye osteoit denir. Osteoblastlar salgıladıkları osteosit içinde gömülü kalır. Yeni aktif kemik oluşumu durduğunda, osteoblastların aktiviteleri önce yavaşlar sonra durur. Şekilleri yavaş yavaş değişmeye başlar ve iğ şeklinde hücelere dönüşürler. Sonunda da osteosit haline geçerler (48).

4.1.3 Osteoklastlar:

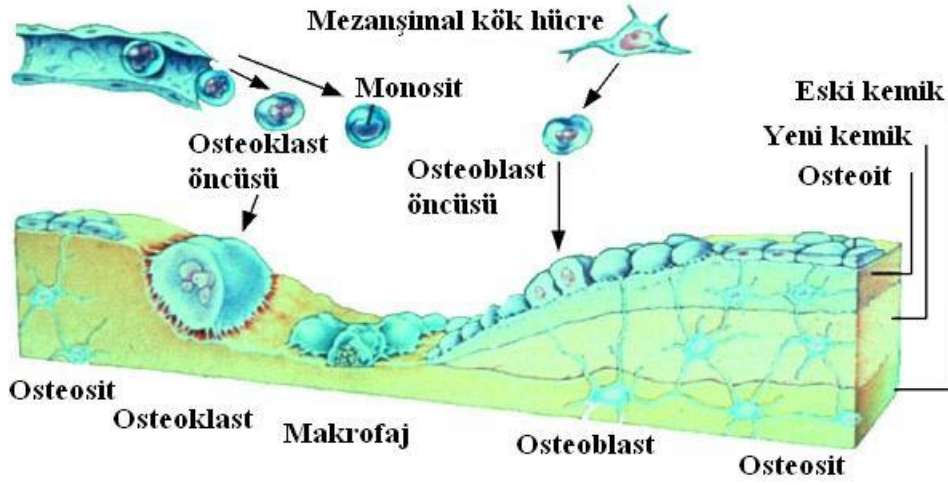
Osteoklast hücreleri 100µm çapında, elli çekirdekli, kemik iliği kökenli dev hücrelerdir (Şekil-3, Şekil-4) (47). Histokimyasal olarak yüksek lizozim içeriğinden anlaşılacağı gibi asit fosfataza duyarlıdır. Kemik rezorbsiyonundan sorumludurlar. Kemikğin yeniden biçimlenme süresince çözünüp çevre dokularca emilmesinden sorumlu bu hücreler, kalsiyumun kemik dokusundan kana salınmasında aktif rol oynar. Bu hücrelerin mekanik olarak yıkıcı ve hatta yüksek derecede fagositoz özelliğe sahip oldukları bilinmektedir (48).

4.1.4 Osteositler:

Ana kemik hücresidir ve osteoblasttan gelişirler. Kalsiyum tuzlarının birikmesiyle kireçleşmiş kemik matrisi içinde hapsolan osteoblastlara osteosit denir (Şekil-3, Şekil-4) (48). Dolayısıyla osteositler, tamamen oluşmuş kemikte esas hücrelerdir. Yassı şekilde bir yapıya sahip bu hücreler ince stoplazmik uzantılara sahiptirler. Osteositlerin, kemikğin diğer hücre tiplerine dönüşebilme özelliği vardır. Kemik yıkımı sırasında osteoprogenitor hücreler bunlarda osteoblastlara dönüşebilir.



Şekil-3 Kemik hücreleri (<http://www.roche.com/pages/facets/11/ostedefe.htm>).



Şekil-4 Kemik hücreleri ve öncü hücreler

(<http://www.roche.com/pages/facets/11/ostedefe.htm>)

4.2 Yapı İskeleti:

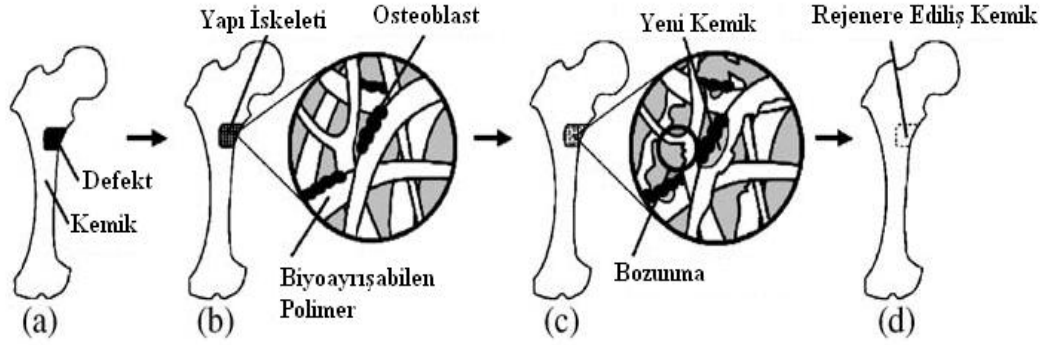
Çalışmaların büyük bir kısmı, biyolojik olarak parçalanabilen kemik doku yapı iskeleti ve hidrojeller kullanan, kırıldak doku mühendisliği üzerine yoğunlaşmıştır (49). Bunlar, kollajen, glikozaminoglikan, hiyaluronik asit, agros, jelatin ve alginat asitlere dayanan, çok çeşitli tabii jeller ve hidrojellerdir (45,50,51). Polilaktik, poliglikolit ve bunların kopolimerleri gibi polihidroksiasitler de çeşitli geometrilere üç boyutlu yapı iskeletleri olarak kullanılmaktadır (45). Bunlara ilave alternatif olarak elastomerik poliüretanlar biyomedikal mühendisliğinde idealdir. Yapı iskeletinde kimyasal kompozisyonların üretimi, mekanik özellikleri, elastikliği, dayanıklılığı belirlemede önemli bir faktördür. Son zamanlarda yapılan araştırmalar (52), kalsiyum fosfat kemik doku yapı iskeletlerinin doku mühendisliği için daha faydalı olabileceğini ve polimer-alginat kompozitlerin kırıldak ve doku mühendisliklerinin her ikisi için de hibrid jel/kemik doku yapı iskeletleri olarak önerilebileceğine işaret etmektedir.

Genellikle osteoblast kültüründeki PLLA substratları yoğun ve düz yüzey morfolojisine sahiptirler (39). PLLA, toksitesi olmayan ve biyobozulabilen özelliğinden dolayı, kemik rejenerasyonunda ve iyileşiminde, hücre adhezyonunda ve büyümesinde tercih edilebilir özelliğe sahiptir (Şekil-5). Yinede hızlı bozunması, bozunurken asidik özellik göstermesi ve hidrofobik olması zayıf özelliklerindedir (53). İki çeşit biyobozulabilen polimer vardır:

natürel tabanlı nişasta, aljinat, chitin/chitosan, hyaluronik asit türevleri gibi polisakkaritler ve lignoselulozik gibi takviye elemanlar olan biyofiberler (54,55). Hidroksiapatit/kollajen kompozit kemik doku yapı iskeleti geniş ölçüde çalışma alanına sahiptir. Çünkü hidroksiapatit ve kollajen kemikte bulunan doğal komponentlerdir (53). Fakat mekanik özellikleri normal kemikten daha düşüktür. Ayrıca, kemik doku yapı iskeleti bozunumu süresince kompresif yüklerde hızlı bir düşüş gösterir. Dolayısıyla bu tür kemik doku yapı iskeleti 40 mm üstündeki bozunmaları tamir etmekte oldukça zorlanır.

Çalışmalar, üç boyutlu kemik doku yapı iskeleti ile iki boyutlu hücre kültürü araştırmalarının farklı olduğunu göstermiştir. Osteoblast hücre kültürü çalışmaları için üç boyutlu tip I kollajen matrisi iyi bir biyolojik yapı olabilmektedir (47). Çünkü tip I kollajen, kemikteki ekstraselüler matrisin önemli bir organik komponenti olup osteoblast fenotip ekspresyonunda etkin bir rol oynamaktadır. Ayrıca osteogenik farklılaşma ve mineralizasyonunda teşvik edicidir (57,58). Bozunma oranı, patojen iletimi ve mekanik özelliklerin kontrolü açısından, tip I kollajen, doku yapılanmasında kilit bir rol oynamaktadır (41).

Kollajen, birçok dokunun, temel ECM bileşenidir ve lifli yapısının hücre bağlanmasındaki önemi uzunca bir süredir bilinmektedir (59,60). Yüzeyi muamele görmüş bir kemik doku yapı iskeletinin elde edilmesi iki adımda gerçekleşir: üretim ve yüzey değiştirme (59). Bununla birlikte, mevcut yüzey değiştirme metotlarının büyük bir bölümünün üç-boyutlu kalın yapı iskeletlerine uygulanması oldukça zordur. Bu durum, hem verimde düşme hem de istenmeyen mekanik özellik değişimlerine sebebiyet verebilir. Bu yüzden, tip I kollajenin, kemik doku mühendisliğinde kemik doku yapı iskeleti olarak kullanımı tercih edilmektedir (61). Kemikteki kollajen, bağ dokusundakine benzer. Yaklaşık 500–700 Å çapında ve 670 Å' da bir çizgilenme gösteren fibrillerdir. Diğer dokulardan kolayca ekstrakte edilmede kullanılan çözücülerde çözünmez; sulu asit çözeltilerinde şişmez. Bu durum, moleküller arası bağlanmanın oldukça kuvvetli olduğunu gösterir. Çok sert olmasına karşın, kemiklerin kolay kırılmasını sağlayan öğeler, bu kollajen fibrillerdir. Kollajen fibriller hidroksiapatit kristallerinin oluşumu için organik bir çerçeve görevi görür. Bu kristaller, kollajen fibriller üzerinde minik tabakalar ve çubukçuklar oluşturacak şekilde birikir. Protein-kristal kombinasyonu kemiğin güçlü, yerine göre esnek ve kırılmaya çok dayanıklı sağlam bir doku olmasına yol açar (48).



Şekil-5 Biyobozunabilen gözenekli yapı iskeletinin kemik rejenerasyonundaki işlemi.
(Adachi ve ark., 2006, p. 3965.)

4.3 Ses Dalgaları:

16 Hz–20 KHz arasında mekanik titreşim yapan cisimlerin insan kulağı ile teması olan bir ortamda oluşturdukları dalgalara ses dalgaları denir (62). İnsan kulağı bu aralıktaki titreşimleri algılayabilmektedir. Titreşimlerin tekrarlanma sayısı 20'den az olduğunda infrases, 20.000'den fazla olduğunda ultrases adını alır. Ultrases aynen ses gibi bir titreşim hareketidir (63). Titreşim hareketi ile doğar, titreşim hareketi olarak yayılır ve titreşim hareketi olarak algılanır.

Ultrasonik dalgalar tedavi, tanı ve biyolojik ölçümler olmak üzere tıpta üç şekilde uygulanmaktadır (64). Ses katı, sıvı veya gaz gibi herhangi bir madde ortamını oluşturan atom veya moleküllerin kolektif salınımlarından oluşan bir dalga hareketidir ve enerji taşır (63). Atomların veya moleküllerin denge konumları etrafında titreşimidir. Dolayısıyla ultrason mekanik enerjidir. Ortamda sıkışıklık ve seyreklik bantları oluşturarak ilerler (62). Sıkışıklık bantları ortam basıncına göre artmış, seyreklik bantları ise azalmış basınç alanlarıdır. Ses dalgaları, boyuna dalgalardır. Boyuna dalga, ortam taneciklerinin titreşim doğrultusunun dalganın yayılma doğrultusuna paralellidir. Ses dalgasında da ortamın parçacıkları, dalganın hareket doğrultusu boyunca yoğunluk ve hacim değişiklikleri üreterek titreşir. Bu dalgalar boşlukta yayılmazlar, maddesel ortamda (katı, sıvı, gaz) yayılabilirler. Ses, katı ve sıvıların içinde havadakine göre çok daha hızlı ilerler. Sesin yayılma hızını belirleyen en önemli faktör doku ya da madde karakteristiğidir. Dokunun ya da maddenin elastikliği arttıkça sesin yayılma hızı azalmaktadır. Örneğin yağ dokusu sıkıştırılabilir bir doku olduğu için sesin

iletim hızı daha düşük, katı ve sıvıların daha az sıkıştırılabilir olmaları nedeni ile sesin yayılımı daha hızlıdır (62).

Tablo-1 Bazı doku ve maddelerde sesin yayılma hızı (Gülsoy ve ark., 2003, p. 176).

Doku-Madde	Hız (m/sn)
Hava	348
Kan	1570
Kemik	4080
Yağ	1500
Kas	1580
Polietilen	920
Yumuşak dokular	1540
Su	1480

Elektrik enerjisinin mekanik titreşimlere, mekanik titreşimlerin de elektrik sinyallerine dönüşümüne piezo-elektrik olay denilmektedir (62). Önceleri quartz gibi doğal maddelerin kristallerinden yararlanılırken, günümüzde yapay seramikler yardımı ile ultrases enerjisi elde edilmektedir. Bu amaçla üretilmiş seramik diskler çevirici anlamında transduser adı verilmektedir. Transduserler kurşun zirkonat-titanat gibi seramiklerden imal edilmekte ve prob adı verilen bir başlıkla taşınmaktadır. Seramik disklerin kalınlığı, üretilen ses frekansı ile ters orantılıdır; kalınlık arttıkça frekans artar, dalga boyu kısalır. Böylece üretililecek maksimum frekans sınırlanır.

4.4 Transduser ve Yapısı:

Transduserin ses üreten en önemli parçası kristaldir (62). Kristal üzerine gelen elektrik akımı kristali mekanik olarak sıkıştırıp genişletmektedir. Bu fiziksel değişiklik karşısında ultrases dalgaları oluşur. Madde ya da dokular üzerine gelen ultrases, dokulardan yansıtılarak transduserine dönen ses dalgaları ise kristalde kompresyon etkisi yaratarak voltaj farklılığına sebep olur. Yani bu mekanik basınç ile elektrik akımı arasında doğru bir orantı vardır. Basınç değişimi ile elektrik akımında değişmektedir. Basınç olmadıkça herhangi bir akım değişimi gerçekleşmez.

5.GEREC VE YÖNTEM:

Bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Biyomekanik ve Hematoloji Anabilim dal'larının işbirliği ile yürütülmüştür.

5.1 Deney Düzenegi:

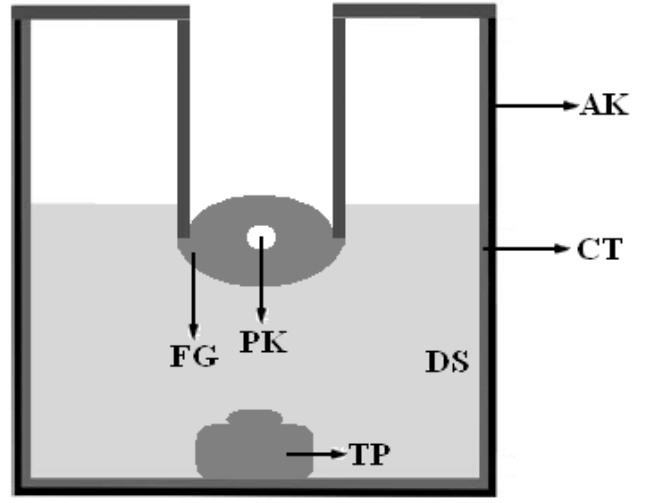
Deney düzenegi 12 × 12 × 15 cm boyutlarında cam tanktan oluşmaktadır. Cam tankın içi sesin yankılanmasını engellemek için 10 mm kalınlığında ultrason absorbe edici kauçuk (National Physical Laboratuvarları, İngiltere) ile kaplanmış olup içi tamamen damıtılmış su ile doldurulmuştur (Şekil-6a, Şekil-6b). Fleksiglass'dan imal edilen tutucu su tankına asılı halde duracak biçimde tespit edilmiştir. 35 × 10 mm boyutlarındaki üç adet petri kabı, bahsi geçen fleksiglass tutucunun ortasına açılmış deliklere yerleştirilmiştir.

Hücre kültürlerinin uyarımında klinik bir aygıt olan US transduser (Sonopuls 434, Enraf Nonius, Hollanda) kullanılmıştır (Şekil-7a). US transduser prob (9 mm çapında) su tankının içine 33 mm yukarıda bulunan tutucu sistemdeki petri kabını uyaracak şekilde tabana yerleştirilmiştir (Şekil-7b). Cam tank, petri kabının tabanına temas edene kadar damıtılmış su ile doldurulmuştur.

Hücrelere mekanik uyarım işlemleri laminal flow ortamında gerçekleştirilmiştir. Deney düzeneginin tamamı 90 °C'de etilen-oksit gaz sterilizasyon ile steril edilmiştir. Her uygulamadan önce damıtma suyu değiştirilmiş, US transduser cam tankı her deneyden önce %70'lik alkol ile silinmiştir.



(a)

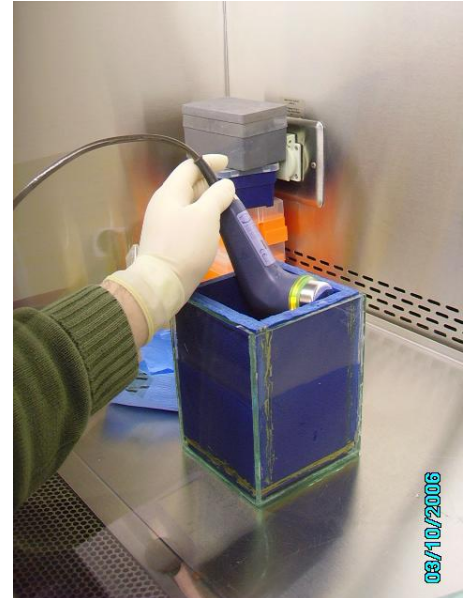


(b)

Şekil-6: Deneş düzeneği (a) ve Őematik gösterilimi (b). TP: Transduser probu, DS: Damıtılmış su, FG: Fileksiglass tutucu, PK: Petri kabı, CT: Cam tank, AK: Absorbe edici kauçuk.



(a)



(b)

Şekil-7: US transduser (a) ve US transduser prob (b)

5.2 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 (Şekil-8) 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-8 PLLA içeren kollajenli yapı iskeleti

Hazırlanan PLLA'li kollajen yapı iskeletleri hücre ekimi yapılmadan önce taramalı elektron mikroskobunda (SEM, JEOL JSM-6060) 10 KeV değerinde hem yüzeysel olarak hem de kesitsel olarak incelendi (Şekil-9). 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 90 °C'de etilen-oksit gaz sterilizasyon ile steril edildi.



Şekil-9 Elektron mikroskopu (Dokuz Eylül Üniversitesi, Malzeme ve Metalürji Bölümü)

5.3 In Vitro Hücre Kültürlerinin Hazırlanması:

5.3.1 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.

5.3.2 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 Na₂HPO₄ ve 0.24 g K₂HPO₄) 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 (laminar 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 Cocktail 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 altışar adet 35×10 mm'lik petri kaplarına RosetteSep ayrımı yapılan hücre süspansiyonundan 60'ar μ l ($\sim 2 \times 10^5$ 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 olduğu 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 altışar adet 35×10 mm'lik petri kaplarının her bir kuyucuğuna hazırladığımız 8 mm boyutunda yapı iskeletleri yerleştirildi. Daha sonra 3 ml ortam eklendi. Hücre süspansiyonundan 350'şer μ l ($\sim 2 \times 10^5$ 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, üç gün süreyle otuz dakika boyunca laminal flow içinde US ile

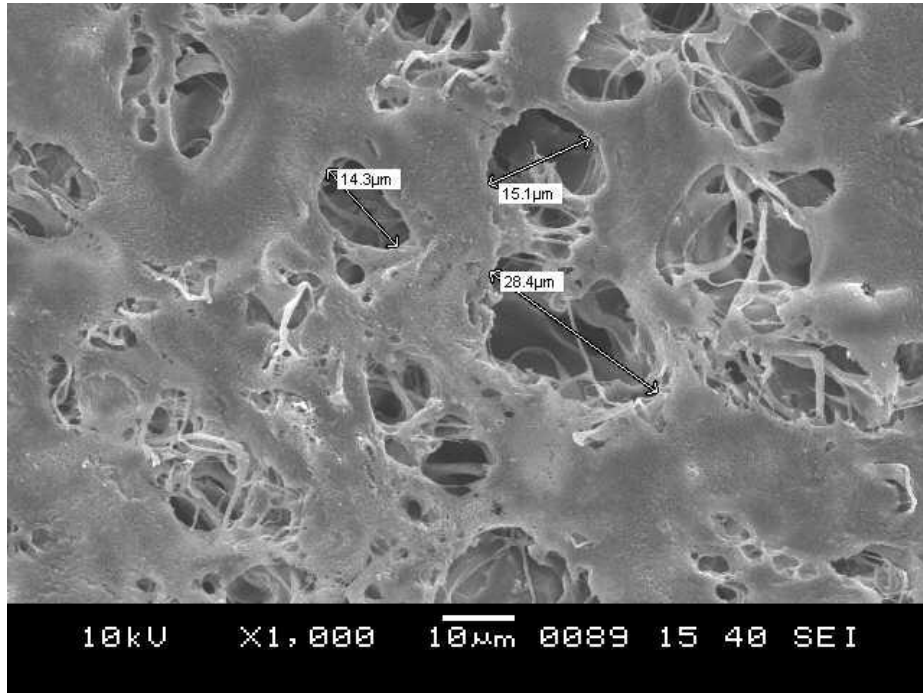
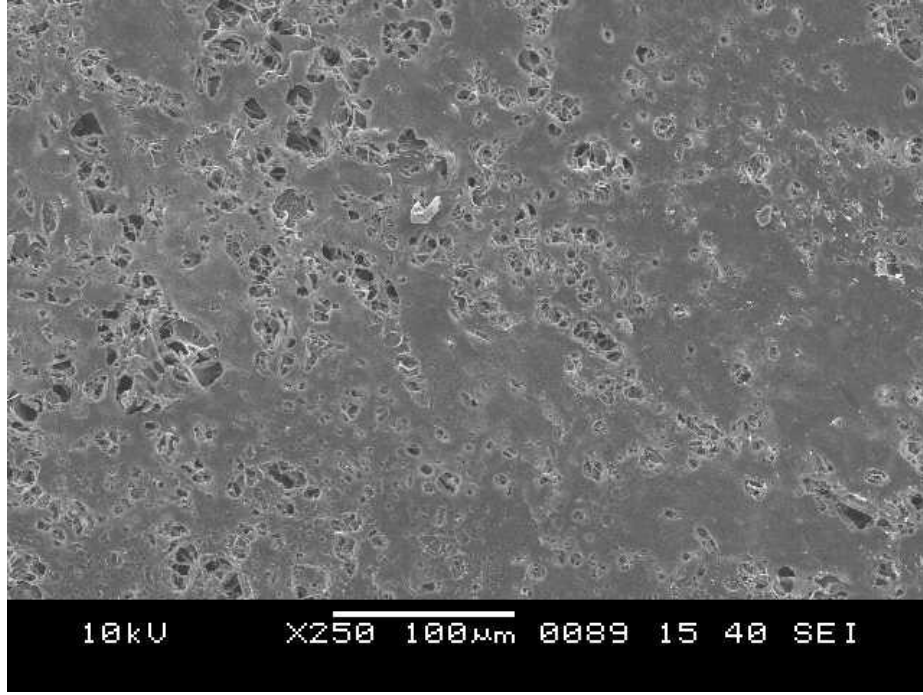
mekanik uyarım yapıldı. Her mekanik uyarımdan sonra kontrol ve mekanik grubun her bir kuyucuğundan NO ölçümü için 1'er ml ortam alındı.

5.4 Hücre Kültürlerinin Ultrason ile Mekanik Uyarımı:

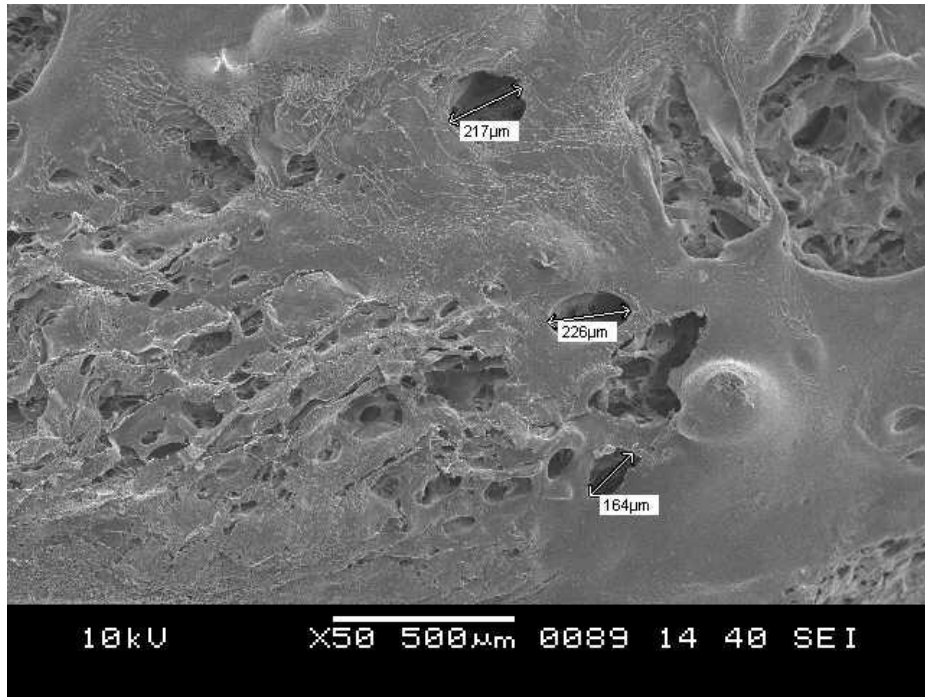
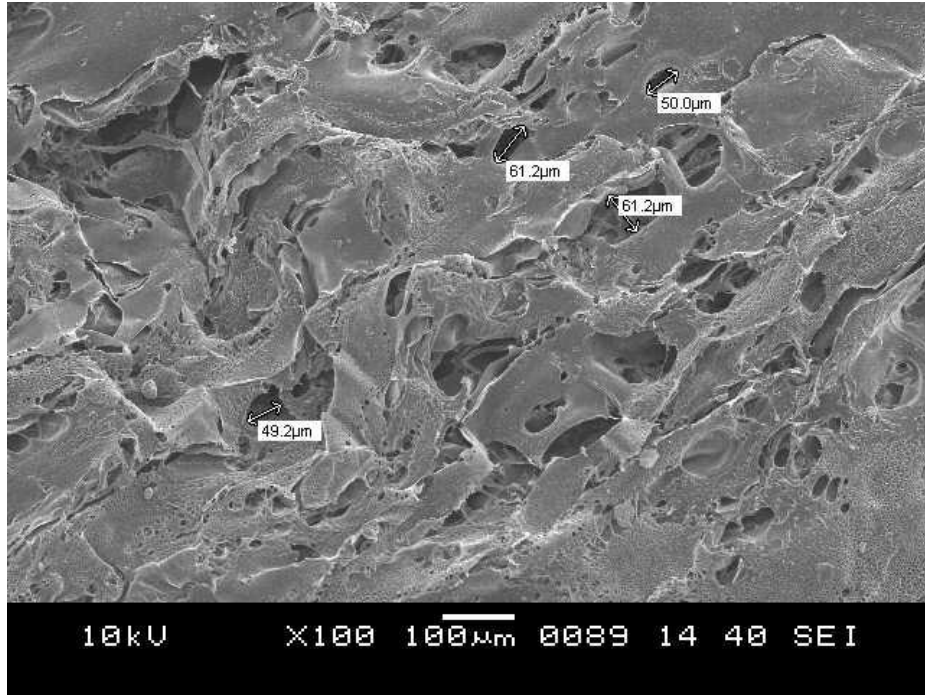
Deneyde osteoblast hücre kültürleri iki gruba ayrılmış olup her grupta altışar adet 35 × 10 mm petri kapları kullanıldı. İlk grup PLLA-kollajenden oluşturduğumuz kemik doku yapı iskeletleridir. PLLA-kollajenden oluşturduğumuz kemik doku yapı iskeletleri üzerine hücre ekimi yapılmış ve bu grup kontrol grubu olarak belirlendi. İkinci grupta ise birinci gruptakine benzer biçimde hazırlanan PLLA-kollajen kemik doku yapı iskeletleri üzerine hücre kültürleri ekildi. Bu grupta yer alan doku kültürlerine laminal flow ortamında yedi gün boyunca otuz dakika süreyle 30 mW/cm² şiddetinde US çevirici aygıt yardımı ile ses dalgaları uygulandı.

6.BULGULAR:

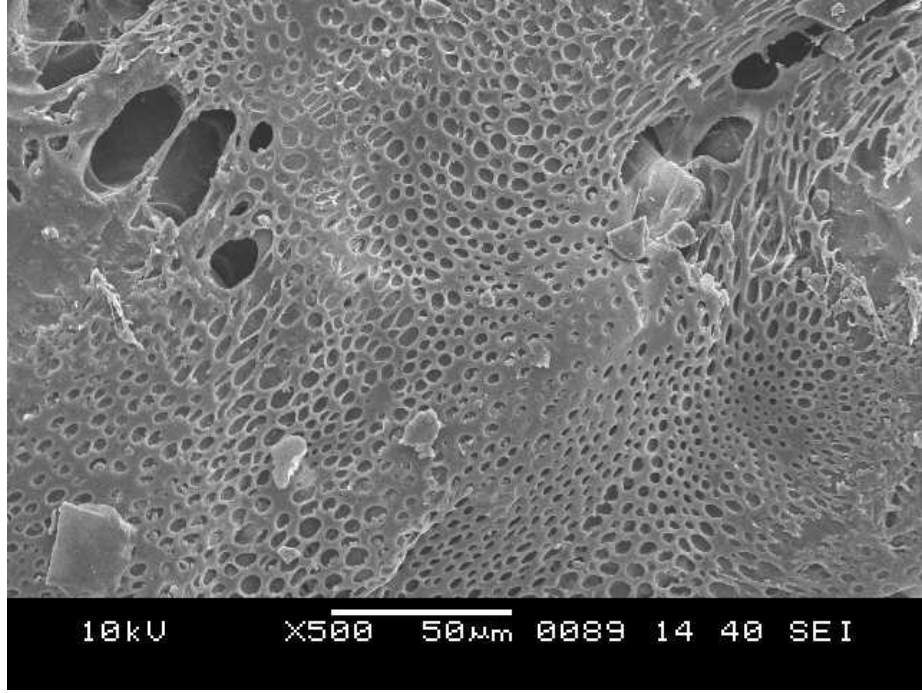
Hücre kültürü ekilmeden önceki yapı iskeletleri incelendiğinde yüzeysel gözenek boyutları 13–28 μm arasında (Şekil–9a, Şekil–9b), kesitsel gözenek boyutları ise 43–226 μm arasında (Şekil–9c, Şekil–9d, Şekil–9e) bulundu.



Şekil–9 devamı diğer sayfada

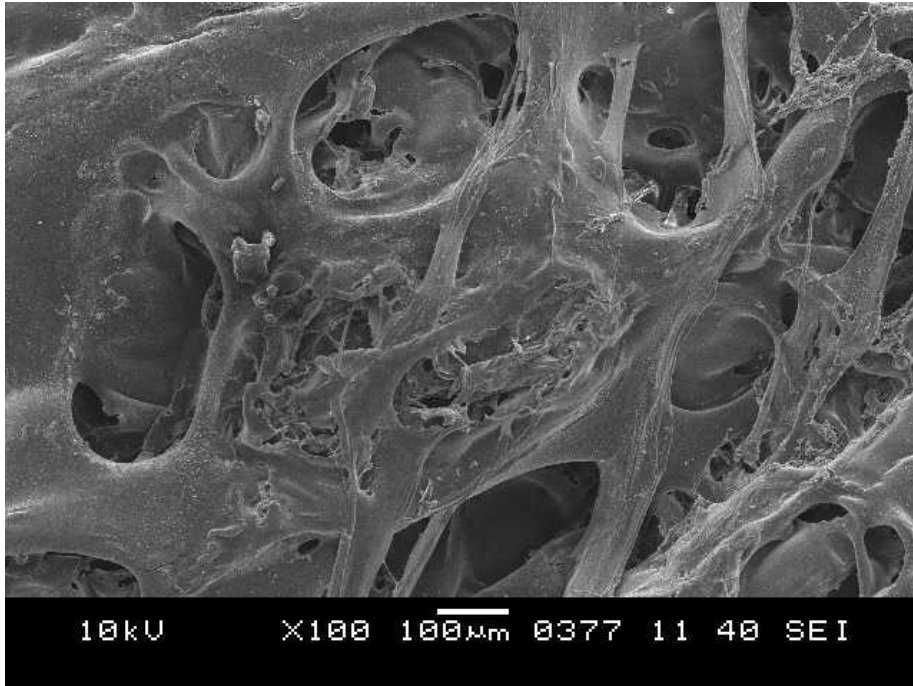
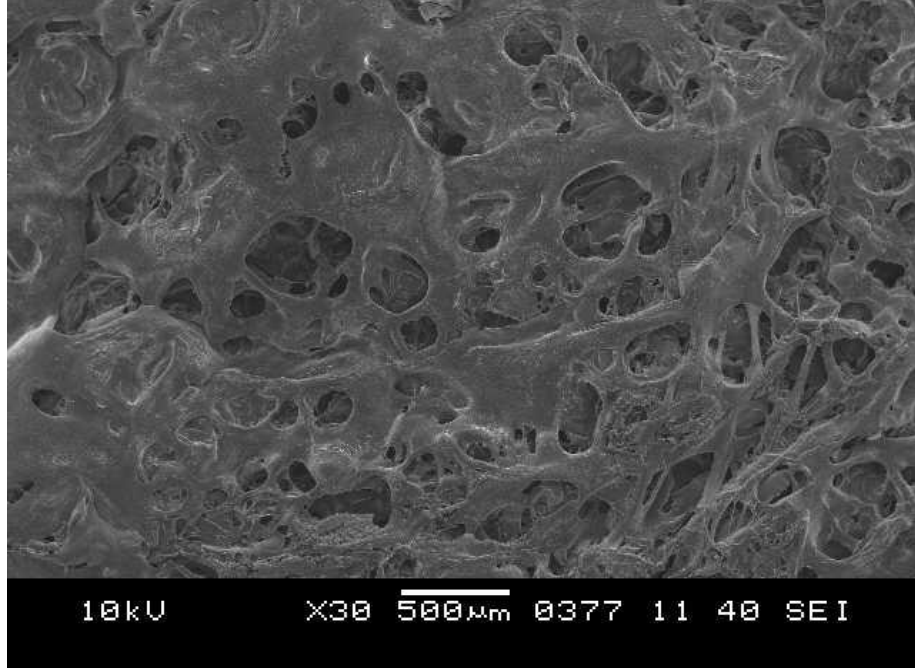


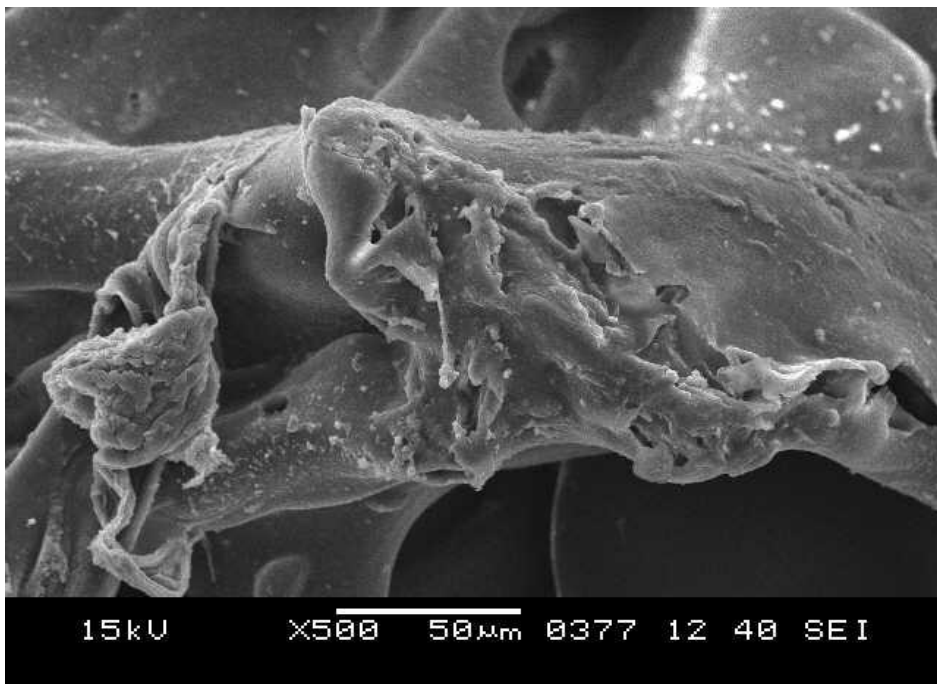
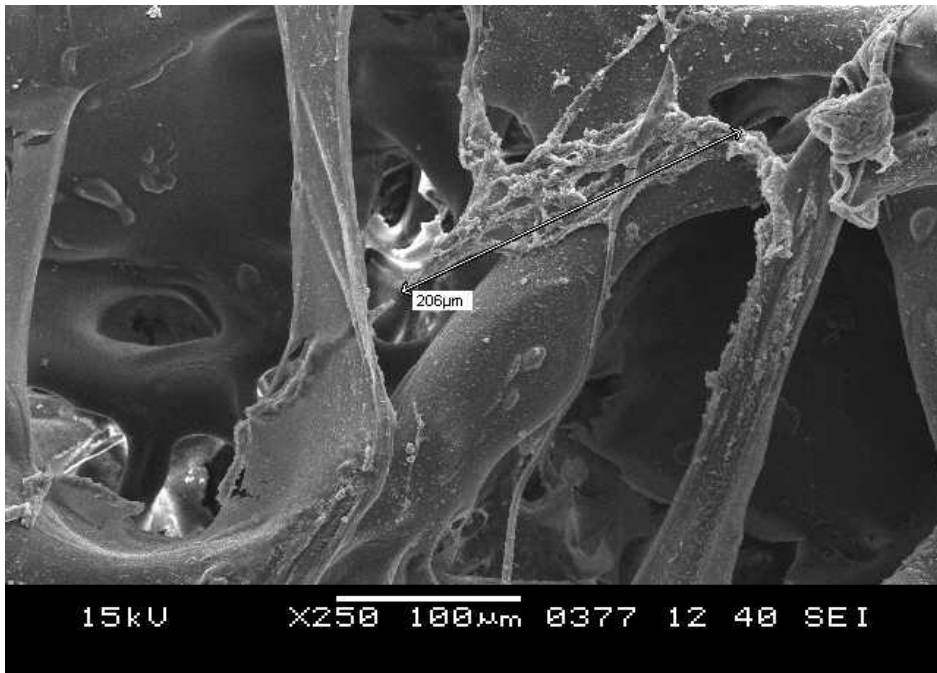
Şekil-9 devamı diğer sayfada

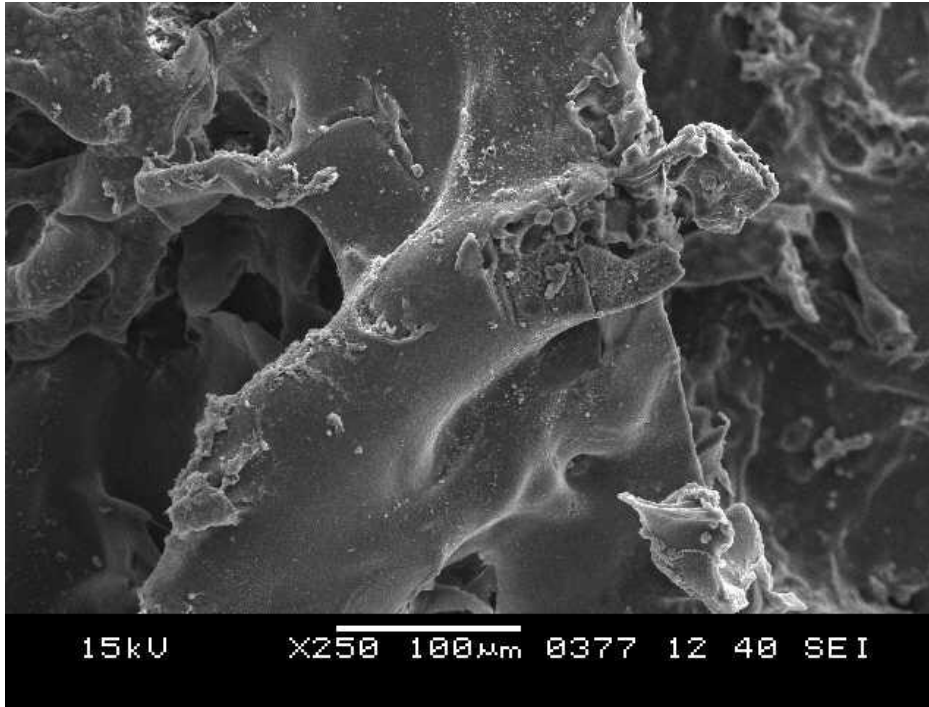
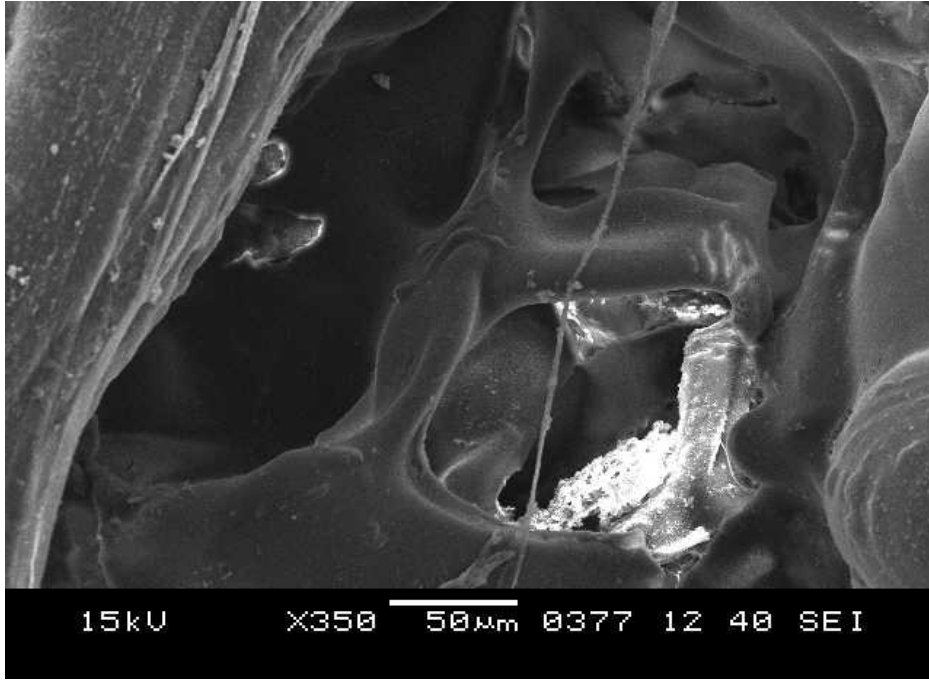


Şekil-9 Hücre kültürü ekilmeden önceki yapı iskeletlerinin elektron mikroskopundaki görüntüleri (a) yüzeysel (b) yüzeysel (c) kesitsel (d) kesitsel (e) kesitsel.

Hücre kültürü ekiminden sonra hücre tutulumunun olup olmadığı gözlemlenmek için yapı iskeletlerinin elektron mikroskopundaki görüntüleri incelendi.







Şekil-10 Hücre kültürü ekilmeden sonraki yapı iskeletlerinin elektron mikroskopundaki görüntüleri (a) kesitsel (b) kesitsel (c) kesitsel (d) kesitsel (e) kesitsel (f) kesitsel

7.TARTIŞMA:

Osteoblastlar mekanik stimülasyona karşı duyarlı hücrelerdir. Dolayısıyla kemik-implant yüzeyinde mekanik durumu taklit ederek bu hücrelerin reaksiyonlarını incelenmesi önemli çalışmalardandır (8). Mekanik uyarımın kemik hücrelerini çoğalttığını ve uygun mekanik yüklenmeler karşısında matris üretiminin ve kemik kütlelerini arttırdığını göstermiştir (42). Kemik, hemopoiesi desteklemede, mineral homeostasisinde kalsiyum rezervuarı olarak hem hareket hemde korumada mekanik desteği sağlayarak dinamik bir doku görevi görmektedir (65).

Son yirmi yıldır hücre kültürünün mekanik uyarımı üzerine olan çalışmalar en belirleyici özelliklerin deplasman, frekans ve uygulanan kuvvetin şekli olduğunu göstermiştir (66). Ultrason insan kulağının duyabileceği düzeyin üstündeki akustik radyasyon frekanslarıdır (28,67). İnsan vücuduna yüksek frekanslarda akustik basınç dalgaları olarak gönderilen ultrason mekanik enerjinin bir çeşididir. Mekanik enerjiyi dokuya ileten basınç dalgalarıdır (68). Hücresel düzlemde mikro mekanik gerilmeler vücut dokusu içerisinde bu basınç dalgaları ile üretilir (67,68). Akustik güç ve frekans değiştikçe de hücrenin mekanik uyarıma cevabında değişmektedir (36). In vitro bir çalışmada fare osteoblast hücrelerine 30 mW/cm² de düşük şiddette uygulan uyarımın prostaglandin E₂' yi artırmış dolayısıyla da kırık iyileşmesinde etkili olabileceği düşünülmüştür (69). Bununla beraber, pek az diğer çalışma, kök hücreler ve sert veyahut da yumuşak bağ dokularının tamirini ve yenilenmesini içeren moleküler süreçler üzerine US'nin hassas etkisini araştırmıştır. Böylelikle hasarlı dokuların iyileştirilmesine imkan verecek yeni stratejilerin geliştirilmesi bir nevi sınırlandırılmıştır (70).

Jamie Harle ve arkadaşları in vitro da MG63 hücrelerini ve periodontal ligamentleri sinüsoidal sinyallerle beş dakika boyunca 140, 230, 540 ve 990 mW/cm² yoğunluğunda uyarılmışlardır. Beş günlük bir incelemenin ardından ikinci günden itibaren uyarım şiddeti artıkça MG63 ve PDL hücrelerinin de arttığını gözlemlenmiş fakat istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunamamıştır. Yapılan çalışmalarda efektif yoğunluğun 30 ila 1000 mW/cm² olduğu rapor edilmiştir (24). Beş günlük fare kalveria kemikleri hücre kültüründe beş dakika boyunca 1000 mW/cm² yoğunluğunda 3 MHz de uyarıldıklarında, anlamlı olarak kemik formasyonunun arttırmıştır. Ancak kalveria kemikleri yine beş dakika boyunca, 3 MHz de fakat 1000–2000 mW/cm² şiddeti artırılarak uyarıldığında kollajen sentezinin inhibe edilmektedir (70). Çalışmalar, 1:4 pulsda, 100, 400, 700 ve 1000 mW/cm² şiddette ultrason

uyarımlarının fibroblast ve osteoblast hücre çoğalmasını arttırdığı düşünülmektedir (68). Ayrıca protein sentezi incelendiğinde de kollajen üretiminin tetiklendiği gözlemlenmiştir.

Osteoblast hücre kültürü çalışmalarında üç boyutlu tip I kollajen matris çok güçlü bir faktördür. Mekanik stresin osteoblast hücre kültürlerinin üç boyutlu tip I kollajen matrisindeki etkisi ile ilgili çok fazla bir çalışma bulunmamaktadır. Tip I kollajen kemikte ekstraselüler matrisin majör bir komponenti olup osteoblast fenotipinde önemli bir rol oynamaktadır. Ignatius ve ark. Yaptıkları almışmaya göre in vitro da doku formasyonunda tip I kollajen matris yapı iskeletinde ki osteoblast hücrelerin çoğaldığı gözlemlenmiştir. Kas aktivasyonunda ve kemik gelişiminde yüksek genlikte, düşük frekansta gerilme veya düşük genlikte, geniş frekansta uyarımların ideal olduğu düşünülmektedir (56). Yapı iskeleti kemik rejenerasyonun da biyolojik, biyomekanik ve biyomateryal özellikler olmak üzere üç önemli faktöre sahiptir. I-besinlerin difüzyonu için porozite uygunluğu, II-hücre yapısını ve hücrelerin normal fenotip açılımı için materyal yüzeyinin biyouyumluluğu, III-rejenerasyon işlemi sırasında yük taşıma gibi mekanik özelliğinin önemi, IV-yeni kemik formasyonu sağlandıktan sonra biyoayrışabilme özelliğinin sağlanması için bu kompleks fonksiyonlar dengelenmelidir. Yapı iskeletinin mikro yapısının dizaynı kemik rejenerasyonunu etkilemektedir. Rejenerasyon işlemi sırasında, yapı iskeletinin bozunumu ve yeni kemik formasyonunun oluşumu aynı zaman diliminde gerçekleşmektedir. Yinede kemik rejenerasyon işlemi in vivo da uzun bir süreç gerektirir. Biyoayrışabilen yapı iskeletleri kullanılarak rejenerasyon işlemi, mekanik ve biyolojik çevrenin değişiminden etkilenen yeni kemik formasyonu ve yapı iskeletinin bozunumu ile kompleks non-lineer bir yapı oluşturur (43).

8.SONUC VE ÖNERİLER:

Çeşitli nedenlere bağlı kemik doku defektlerin giderilmesinde otograft ve allograft uygulamaların yanında kemik doku mühendislik teknikleri kullanılarak doku defektleri giderilmeye çalışılmaktadır. Doku farklılaşmasında mikro hareketin önemli olduğunu düşünülmektedir. Osteoblast hücrelerinin hücre kültürlerinin mekanik uyarımında elde edilecek artış ve bu yönde gelecekte yapılacak olan çalışmalar ile kemik kırıklarının iyileşmesinde veya kemik boşluklarının doldurulması mümkün olabilir. Optimal ve suboptimal ses dalgalarının mekanik uyarım kemik doku mühendisliğinde yapı iskeletinin istenen mekanik koşullarının yerine getirilmesinde önemli bir basamak olacaktır.

Metal implantları kemik doku fonksiyonlarına cevap olarak farklı tepkiler gösterebilmektedir. Uygulanan stres karşısında implant materyalinin başarılılığı bu cevaba

bağlıdır. Bir başka deyişle implant çevresinde kemik gelişimi mekanik çevreye oldukça bağımlıdır. Bu yüzden kemik yapı ve kompozisyonunda osteoblast hücrelerinin mekanik uyurım karşısında nasıl bir cevap verecekleri oldukça önemlidir. Kemik doku mühendisliği dünyada ve ülkemizde yeni bir alandır. Bu alan sayesinde çeşitli yenilikler de yol alınmaktadır. Bunlardan biride, farklı kimyasallar ile üretilen yapı iskeletleridir.

9.KAYNAKLAR:

- 1) Brown TD. Techniques for mechanical stimulation of cells in vitro:a review. J Biomech 2000;33:3-14.
- 2) Boppart M.D. Kimmel D.B.Yee J.A. and Cullen D.M. Time course of osteoblast appearance after in vivo mechanical loading. Bone 1998;23:409–415.
- 3) Duncan R.L. and Turner C.H. Mechanotransduction and functional response of bone to mechanical strain. Calcif Tissue Int 1995;57:344–358.
- 4) Neidlinger-Wilke C. Wilke H.J. and 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.
- 5) Sun JS, Hong RC, Chang WH, Chen LT ve ark. In vitro effects of low-intensity ultrasound stimulation on the bone cells. J Biomed Mater Res 2001;57:449–456.
- 6) Neidlinger-Wilke C., Wilke H.J., Claes L. Cyclic stretch ing of human osteoblasts affects proliferation and metabolism: A new experimental method and its application. J Orthop Res 1994;12:70–78.
- 7) Banes A.J., Link G.W., Gilbert J.W., Tran Son Tay R. Culturing cells in a mechanically active environ ment. Am Biotech Lab 1990;8:12–22.
- 8) Pioletti DP, Muller J, Rakotomanana LR, Corbeil J ve ark. Effect of micromechanical stimulations on osteoblasts: development of a device simulating the mechanical situation at the bone-implant interface. Journal of Biomechanics 2003;36:131–135.
- 9) Akhouayri O, Lafage-Proust MH, Rattner A, Laroche N. Effects of Static or Dynamic Mechanical Stresses on Osteoblast Phenotype Expression in Three-Dimensional Contractile Collagen Gels. J Cell Biochem 1999;76:217–230.
- 10) Forwood MR, Turner CH. Skeletal adaptations to mechanical usage:results from tibial loading studies in rats. Bone 1995;17:197–205.
- 11) Rubin CT, Lanyon LE. Regulation of bone mass by mechanical strain magnitude. Calcif Tissue Int 1985;37:411– 417.

- 12) Vander Molen MA, Donahue HJ, Rubin CT, McLeod KJ. Osteoblastic networks with deficient coupling: Differential effects of magnetic and electric field exposure. *Bone* 2000;27:227–231.
- 13) Spadaro JA, Albanese SA. Application of low-intensity ultrasound to growing bone in rats. *Ultrasound in Medicine and Biology* 1998;24:567–573.
- 14) Chang WH, Sun JS, Chang S, Lin JC. Study of Thermal effects of ultrasound stimulation on fracture healing. *Bioelectromagnetics* 2002;23:256–263.
- 15) Koike M, Shimokawa H, Kanno Z, Ohya K, Soma K. Effects of mechanical strain on proliferation and differentiation of bone marrow stromal cell line ST2. *J Bone Miner Metab* 2005;23:219–225.
- 16) Umemura Y, Baylink DJ, Wergedal JE, Mohan S, Srivastava AK. A time course of bone response to jump exercise in C57BL/6J mice. *J Bone Miner Metab* 2002;20:209–215.
- 17) Kaspar D, Seidl W, Neidlinger-Wilke C, Ignatius A ve ark. Dynamic cell stretching increases human osteoblast proliferation and CICP synthesis but decreases osteocalcin synthesis and alkaline phosphatase activity. *Journal of Biomechanics* 2000;33:45–51.
- 18) McGarry JG, Klein-Nulend J, Mullender MG, Prendergast PJ. A comparison of strain and fluid shear stress in stimulating bone cell responses-a computational and experimental study. *The FASEB Journal* 2004;29:1–22.
- 19) Chad Winter L. A device for imposing uniform, cyclic strain to cells growing on implant alloys. Mississippi State Üniversitesi, Biyomedikal Mühendisliği Bölümü, Yüksek lisans tezi;2002.
- 20) Nagatomi J, Arulanandam BP, Metzger DW, Meunier A ve ark. Cyclic pressure affects osteoblast functions pertinent to osteogenesis. *Annals of Biomedical Engineering* 2003;31:917–923.
- 21) Basso N, Heersche JN. Characteristics of in vitro osteoblastic cell loading models: Review. *Bone* 2002;30:347–351.
- 22) Ito Masaya, Azuma Yoshiaki, Ohta Tomohiro, Komoriya Keiji. Effects of ultrasound and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on growth factor secretion in co-cultures of osteoblasts and endothelial cells. *Ultrasound in Medicine and Biology* 2000;26:161–166.
- 23) Yang RS, Lin WL, Chen YZ, Tang CH ve ark. Regulation by ultrasound treatment on the integrin expression and differentiation of osteoblasts. *Bone* 2005;36:276–283.

- 24) Lia JK, Changa WH, Lina JC, Ruaanb RC ve ark. Cytokine release from osteoblasts in response to ultrasound stimulation. *Biomaterials* 2003;24:2379–2385.
- 25) Sun JS, Tsuang YH, Lin FH, Liu HC ve ark. Bone defect healing enhanced by ultrasound stimulation: an in vitro tissue culture model. *J Biomed Mater Res* 1999;46:253–261.
- 26) Li JG, Chang WH, Lin JC, Sun JS. Optimum intensities of ultrasound for PGE2 secretion and growth of osteoblasts. *Ultrasound Med Biol* 2002;28:683–690.
- 27) Walboomers XF, Elder SE, Bumgardner JD, Jansen JA. Hydrodynamic compression of young and adult rat osteoblast-like cells on titanium fiber mesh. *J Biomed Mater Res A* 2006;76:16-24.
- 28) Reher P, Harris M, Whiteman M, Hai HK. Ultrasound stimulates nitric oxide and prostaglandin E2 production by human osteoblasts. *Bone*. 2002;31:236–241.
- 29) Labat B, Chepda T, Frey J, Rieu J. Practice of a testing bench to study the effects of cyclic stretching on osteoblast-orthopaedic ceramic interactions. *Biomaterials* 2000;21:1275–1281.
- 30) Babis GC, Soucacos PN. Bone scaffolds: The role of mechanical stability and instrumentation. *Injury, Int. J. Care Injured* 2005;36:38–44.
- 31) Wolff J. *Das gesetz der transformation der knochen*. Berlin: Verlag von Augsut Hirschwald; 1892.
- 32) Lanyon LE, Rubin CT. Static vs dynamic loads as an influence on bone remodelling. *J Biomech* 1984;17:897–905.
- 33) Goodship AE, Cunningham JL, Kenwright J. Strain rate and timing of stimulation in mechanical modulation of fracture healing. *Clin Orthop* 1998;355:105–15.
- 34) Claes LE, Heigele CA, Neidlinger-Wilke C, Kaspar D, Seidl W, Margevicius KJ, et al. Effects of mechanical factors on the fracture healing process. *Clin Orthop* 1998;355:132–47.
- 35) Kenwright J, Goodship AE. Controlled mechanical stimulation in the treatment of tibial fractures. *Clin Orthop* 1989;241:36–47.
- 36) Myrdycz A, Callens D, Kot K, Monchau F ve ark. Cells under stress: a non-destructive evaluation of adhesion by ultrasounds. *Biomolecular Engineering* 2002;19:219–225.
- 37) Rezwani K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering: Review. *Biomaterials* 27 2006;27:3413–3431.

- 38)** Lu HH, El-Amin SF, Scott KD, Laurencin CT. In vitro evaluation of a poly(lactide-co-glycolide)–collagen composite scaffold for bone regeneration. *Biomaterials* 2006;27:3466–3472.
- 39)** Liu HC, Lee IC, Wang JH, Yang SH, Young TH. Preparation of PLLA membranes with different morphologies for culture of MG–63 Cells. *Biomaterials* 2004;25:4047–4056.
- 40)** Liu X, Won Y, Ma PX. Porogen-induced surface modification of nano-fibrous poly(L-lactic acid) scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 2006;27:3980–3987.
- 41)** Chen VJ, Smith LA, Ma PX. Bone regeneration on computer-designed nano-fibrous scaffolds. *Biomaterials* 2006;27:3973–3979.
- 42)** Kaspar D, Seidl W, Neidlinger-Wilke C, Claes L. In vitro effects of dynamic strain on the proliferative and metabolic activity of human osteoblasts. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2000;1:61-4.
- 43)** Adachi T, Osako Y, Tanaka M, Hojo M, Hollister SJ. Framework for optimal design of porous scaffold microstructure by computational simulation of bone regeneration *Biomaterials* 2006;27:3964–3972.
- 44)** Li WJ, Cooper JA Jr, Mauck RL, Tuan RS. Fabrication and characterization of six electrospun poly (alpha-hydroxy ester)-based fibrous scaffolds for tissue engineering applications. *Acta Biomater* 2006;4:377–85.
- 45)** 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.
- 46)** Muller FA, Muller L, Hofmann I, Greil P ve ark. Cellulose-based scaffold materials for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 2006;27:3955–3963.
- 47)** Bouvier M. Bone Mechanics. In: Cowin C.S. editor. *The biology and composition of bone*. Florida: CRC press; 1989. p.2–13.
- 48)** Akay M.T. Genel Histoloji. In: Akay M.T. editor. *Kemik dokusu*. 5nd ed. Ankara: Palme yayıncılık; 2001. p.126–149.
- 49)** 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.
- 50)** 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.

51) 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.

52) Mizuno H, Roy AK, Vacanti CA, Kojima K ve ark. Tissue-engineered composites of annulus fibrosus and nucleus pulposus for intervertebral disc replacement. *Spine* 2004;29:1290–7.

53) Li X, Feng Q, Cui F. In vitro degradation of porous nano hydroxyapatite/collagen/PLLA scaffold reinforced by chitin fibres. *Materials Science and Engineering C* 2006;26:716–720.

54) Reis RL, Cunha AM, Allan PS, Bevis MJ. Mechanical behavior of injection-molded starch-based polymers. *Polym Adv Technol* 1996;7:784–90.

55) Mohanty AK, Misra M, Hinrichsen G. Biofibres, biodegradable polymers and biocomposites: an overview. *Macromol Mater Eng* 2000;276–277:1–24.

56) Ignatius A, Blessing H, Liedert A, Schmidt C. Tissue engineering of bone: effects of mechanical strain on osteoblastic cells in type I collagen matrices. *Biomaterials* 2005;26:311–318.

57) Casser-Bette M, Murray AB, Closs EI, Erfle V, Schmidt J. Bone formation by osteoblast-like cells in a three-dimensional cell culture. *Calcif Tissue Int* 1990;46:46–56.

58) Masi L, Franchi A, Santucci M, Danielli D, Arganini L, Giannone V, et al. Adhesion, growth, and matrix production by osteoblasts on collagen substrata. *Calcif Tissue Int* 1992;51:202–12.

59) Liu X, Won Y, Ma PX. Porogen-induced surface modification of nano-fibrous poly(L-lactic acid) scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 2006;27:3980-3987.

60) Elsdale T, Bard J. Collagen substrata for studies on cell behavior. *J Cell Biol* 1972 ;54:626-37.

61) Stock UA, Vacanti JP. Tissue engineering: current state and prospects. *Annu Rev Med* 2001;52:443–51.

62) Gülsoy U.K, Oyar O. Ultrasonografi Fiziği. In: Gülsoy U.K, Oyar O, editors. *Tıbbi Görüntüleme Fiziği*. Birinci baskı. Ankara: Rekmay Ltd.Şti; 2003.p.171–185.

63) Şener S, İkizer B. Ultrasonik Muayene. In: ÖZDEN Nezihi editor. *Ultrasonik Muayene*. Ankara: Sınav Eğitim ve Geliştirme Merkezi Genel Müdürlüğü (SEGEM); 1979.p.1–2.

- 64)** Crawford A.E. Ultrasonic engineering with particular reference to high power applications. In: Crawford A.E. editor. Biological and medical applications. 2nd ed. London: Butterworths scientific publications; 1955. p.296–303.
- 65)** Einhorn, T.A. Biomechanics of bone. In Principles of Bone Biology. R.L. Bilezikian, and G.A. Rodan, editors. Academic Press, Inc., San Diego. 1996;25–37.
- 66)** Experimental model for stimulation of cultured human osteoblast like cells by high frequency vibration.
- 67)** Rubin J, Biskobing D, Fan X, Rubin C ve ark. Pressure regulates osteoclast formation and MCSF expression in marrow culture. J Cell Physiol 1997;170:81–87.
- 68)** Reher P, Doan N, Bradnock B, Meghji S. Therapeutic ultrasound for osteoradionecrosis: an in vitro comparison between 1 MHz and 45 kHz machines. Eur J Cancer 1998;34:1962–1968.
- 69)** Kokubu T, Matsui N, Fujioka H, Tsunoda M ve ark. Low intensity pulsed ultrasound exposure increases prostaglandin E2 production via the induction of cyclooxygenase–2 mRNA in mouse osteoblasts. Biochem Biophys Res Commun 1999;256:284–287.
- 70)** Harle J, Salih V, Mayia F,. Knowles JC, Olsen I. Effects of ultrasound on the growth and function of bone and periodontal ligament cells in vitro. Ultrasound in Medicine and Biology 2001;27:579–586.