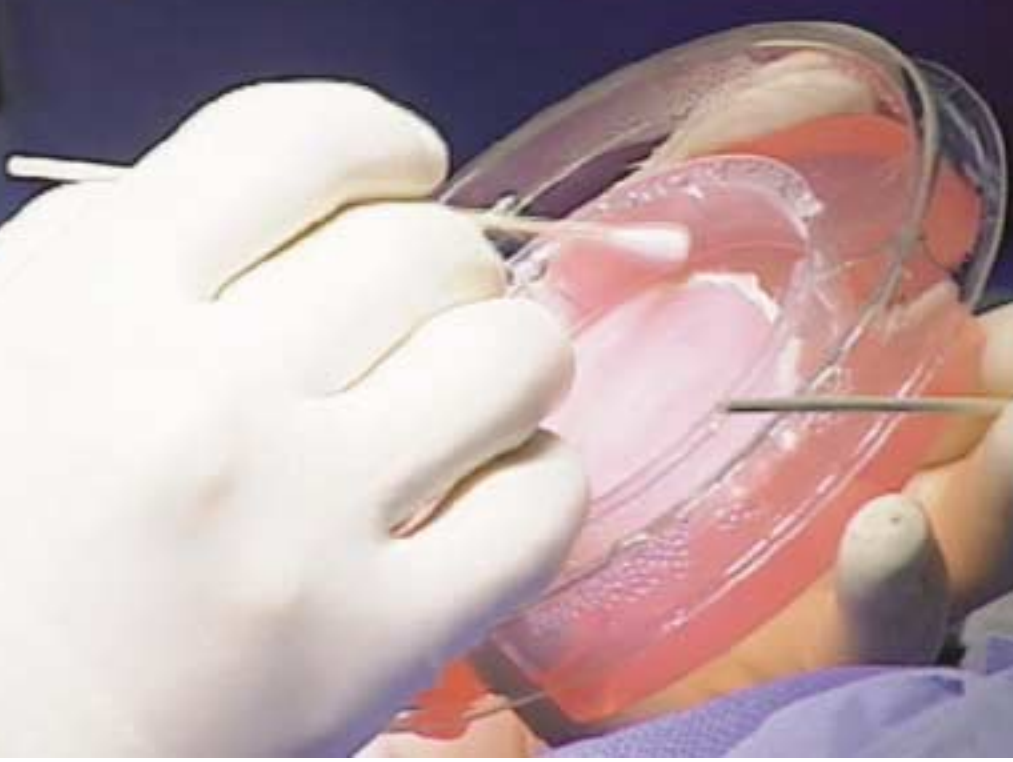




Doku mühendisliği, bilimsel ve teknolojik açıdan çok hızlı bir ilerleme kaydediyor. Bu alandaki son gelişmeler, insanlık için heyecan verici yeni ufuklar açıyor. Günümüzde yapay deri gibi ilk uygulamalar tıbbın hizmetine sunuldu bile. Gelecekteyse doku mühendisleri tarafından hazırlanacak "biyoyapay" organların, koroner by-pass ameliyatları gibi, rutin bir biçimde kullanılabileceği umut ediliyor.

Doku Mühendisliğinde Şaşırtıcı Gelişmeler

Çok yakın bir zamana kadar, hasar görmüş ya da fonksiyonunu yitirmiş doku ve organların yalnızca transplantasyonla ya da tamamen yapay olan plastik ya da metal implantlarla değiştirilebileceği bilinmekteydi. Canlı hücrelerle doğal ya da sentetik polimerlerin birleşiminden oluşan ve "biyoyapay organ" olarak adlandırılan organların asla yapılamayacağı ve donör (verici) eksikliğinden kaynaklanan transplantasyon sorunlarının yalnızca hayvanlardan alınan organlarla giderilebileceği düşünülmekteydi. "Biyonik insan" kavramı yalnızca bilim-kurgu filmlerinde yer almaktaydı. Oysa günümüzde, tüm dünya üzerindeki laboratuvarlarda yürütülen çalışmalar, biyoyapay organ üretiminin mümkün olduğunu gösteriyor. Doku mühendisliği henüz bilimkurgu filmlerindeki düzeye ulaşamadı; gene de çeşitli biyoteknoloji firmaları tarafından yaklaşık 4 milyar dolarlık pazar payına sahip doku mühendisliği ürünleri geliştirilmiş bulunuyor ve bu firmalar yatırımlarını her yıl % 22,5 oranında artırıyorlar.

ABD'de yapılan bir istatistik, 1997'de 40 000 kalp hastasından yal-

nızca 2300'ünün yeni bir kalp bulabildiğini gösteriyor. İşte bu noktada en heyecan verici çözüm, insan yapımı doku ve organların oluşturulması, yani "doku mühendisliği"nin gündeme gelmesi. İlk yaklaşım olarak, doku mühendisi bir molekülü -örneğin büyüme faktörünü- hasarlı doku veya organa enjekte eder veya uygun bir biçimde yerleştirir. Bu molekül, hastanın kendi hücrelerinin yaralı bölgeye hareketini sağlar ve onları istenilen tür hücreye dönüştürerek dokuyu yeniden üretir. İkinci yaklaşımda, çe-



Petri kabında üretilmiş deri dokusu (Apligraf).

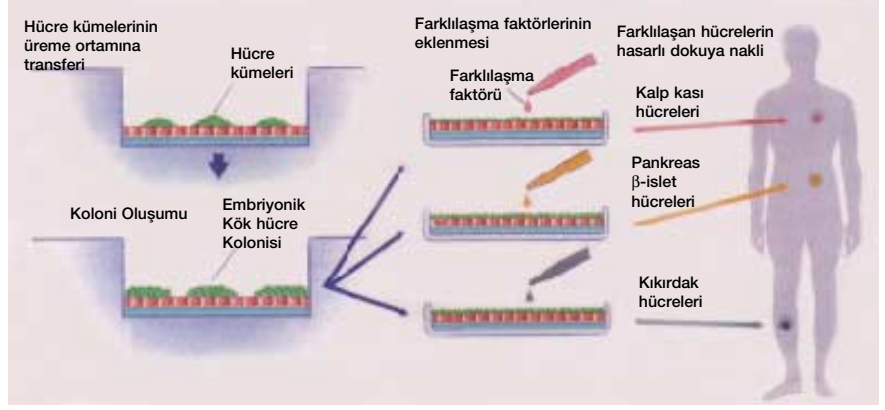
şitli kaynaklardan (insan veya uygun hayvan) sağlanan hücrelerin uygun polimerik taşıyıcılardaki kapsülleri hazırlanarak vücuda verilir. Son yöntemdeyse, hastanın kendi hücreleri ya da uygun bir vericiden alınan hücreler, biyolojik ortamda bozunabilen polimerlerden hazırlanan üç boyutlu desteklere tutturulur, hazırlanan yapı hasarlı bölgeye yerleştirilir, hücreler çoğalıp yeni doku yapısını oluştururken polimer matris parçalanır ve tamamen doğal olan ürün, yani doku elde edilir. Bu tür yeni organların inşası, materyal bilimindeki gelişmeler ve temel biyolojik bilgilerle mümkün oluyor.

Doku mühendisliği halen ABD'deki bazı sağlık kuruluşlarında sınırlı ölçüde uygulanıyor. Sürdürülmekte olan klinik çalışmalar, yapay kıkırdak, kemik, ligament ve tendonların çok kısa bir süre içerisinde eczanelerin raflarında yerini alacağı konusunda cesaret verici. İnsan yapımı deri, doku mühendisliğinin ilk ticari ürünü olarak piyasaya sürüldü bile. Klinik araştırmaları tamamlanmakta olan kıkırdak dokusuysa, önümüzdeki birkaç yıl içerisinde pazarda yerini

alacak. Bilimsel araştırmalar karaciğer, böbrek, bağırsak ve meme gibi, çok sayıda farklı hücreden oluşan daha kompleks yapı ve büyük organların üretiminin de teorik açıdan mümkün olduğunu, pratik açıdan ise uzun zaman alacağını gösteriyor.

Doku Mühendisliği İçin Hücre Kaynakları

Doku mühendisliğinde kuşkusuz en öncelikli konu, uygun bir hücre kaynağının bulunması. Uygulamalarda hayvan (örneğin domuz) hücrelerinin kullanımı olanaklı; ancak bunlar, bağışıklık sistemi tarafından reddedilebileceklerinden, insan hücreleri tercih ediliyor. Bu konudaki son gelişme, insan embriyonik kök hücrelerinin kullanımı. Kök hücreleri (stem cells), üreme ve farklılaşma kabiliyetine sahip hücreler olarak bilinirler. Kök hücreleri ürerlerken, bir yandan da farklılaşarak ait oldukları organın, (örneğin kalp, karaciğer veya beyin) temel işlevlerini kazanırlar. Embriyonik kök hücreleri ise alışılmışın dışında çok özel hücreler. Çünkü, farklılaşma sonucu vücut içerisindeki tüm hücre türlerini, dolayısıyla tüm dokuları oluşturabilirler. "Science" dergisinin 6 Kasım 1998 sayısında, farede deri altına yerleştirilen insan kök hücrelerinin bilinen çok çeşitli dokuları oluşturduğu gösterildi. Araştırmacılar bu hücrelerin kıkırdak, kemik, kas, bağırsak, ve sinirsel epitelyum dokularını nasıl oluşturduğunu açıkladılar; ama he-



Embriyonik kök hücre kültürleriyle çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmak üzere değişik hücreler üretilmektedir.

nüz konunun başlangıç aşamasında bulunuluyor.

Daha hızlı bir çözüm, dokulardan "progenitor hücre" (geçiş hücresi) olarak adlandırılan hücrelerin izolasyonu. Bu hücreler spesifikleşme yolunda adım atmışlar ama henüz tam anlamıyla farklılaşmamış durumda bulunuyorlar; ancak, çok sayıda değişik hücre türünü oluşturmak için yeterli esnekliğe sahiptirler. Cleveland Clinic'ten Arnold Caplan ve arkadaşları, insan kemik iliğinden progenitor hücreleri izole etmişler ve bu hücreleri laboratuvarıda üreterek kemik ve kıkırdak dokuyu oluşturacak osteoblast (kemik hücresi) ve kondrositleri (kıkırdak hücresi) elde etmişler. North Carolina Üniversitesi'nden bir grup araştırmacı da, yetişkin insan karaciğerinde küçük, oval yapıda progenitor hücreleri tanımlamışlar ve bu hücrelerin kültür ortamında olgunlaşarak hepatositleri (safra üreten ve toksinleri parçalayan hücreler) veya safra bezlerini oluşturan epitel hücreleri ürettiklerini göstermiş bulunuyorlar.

Hücre temininde başka bir yaklaşım, "genel verici" hücre hatlarının oluşturulması. Araştırmacılar, verici (donör) hücre yüzeyindeki proteinleri maskeleyecek molekülleri kullanarak bu tür hücreleri hazırlıyorlar. Domuz hücrelerinin bazı türleri, insanlara transplantasyonu mümkün olacak şekilde maskeleniyor. Bu yöntem uyumsuz insan donörler arasındaki hücre transplantasyonuna da olanak sağlayacak şekilde kullanıldı. İlke olarak, hazırlanan hücrelerin alıcı tarafından reddedilmeyeceği düşünülüyor. Yöntem başarılı olursa, genel verici hücreler çeşitli doku hücrelerinden hazırlanabilecek ve gereksinme olduğunda kültür ortamında üretilenler. Fakat henüz büyük ölçekli uygulamalarda nasıl kullanılacakları fazla açık değil.

Hücrelerin Büyük Miktarda Üretimi

Doku mühendisliğinde, yukarıda açıklanan uygun kaynaklardan sağlanan hücrelerin yüksek kapasitede üretilmesi de önemli. Bu amaçla araştırmacılar; besin maddesi, O₂, CO₂ gibi gazlar, ve atık ürünleri uygun miktarlarda sağlayacak/uzaklaştıracak sensörler ve karıştırıcılarla donatılmış biyoreaktörleri kullanıyorlar.

Araştırmacılar diz kıkırdağındaki bir yırtığı onarmak amacıyla kıkırdak dokuyu üretmeyi başardılar. Ancak doku belli kalınlığa ulaştığında, iç kısımlardaki kıkırdak hücreleri dışarıdaki besi ortamından çok uzakta kaldıklarından besinleri ve gazları alamıyorlar, atık ürünler de uzaklaşmıyor. Bu problem, kıkırdak hücrelerinin üç boyutlu polimerik taşıyıcı-



Burun şeklindeki sentetik polimer (solda) üzerinde kıkırdak hücreleri üretilmekte ve polimer yapının parçalanması sonucu tamamiyle doğal olan kıkırdak doku oluşmaktadır (sağda).



Yapay kıkırdaklar oynak yerlerdeki hasarın giderilmesi için yeni olanaklar sağlıyor (1 ve 2). Sağda biyoloji ve doku mühendisliğinin evliliği için iyi bir örnek olan yapay kalp damarı görülüyor. Damarın özelliği kalbe oksijen akışını düzenleyebilecek biçimde genişleyip büzülebilmeli.

ları içeren biyoreaktörlerde üretilmesi ile kısmen çözüldü.

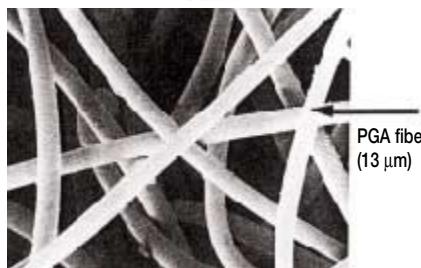
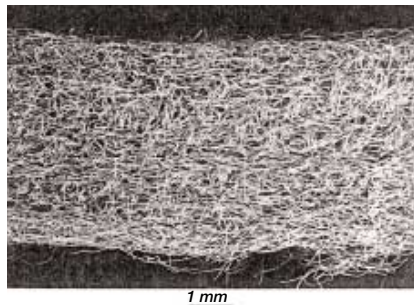
Doku, biyoreaktörlerde büyürken, mekanik özelliklerinin istenilen düzeye (gerçek dokuya yakın) getirilmesi çok önemli. Doku mühendisliğiyle üretilmiş kıkırdak dokusu, içerdiği hücre dışı matris (Extra Cellular Matrix, ECM) proteinleri nedeniyle, dış ortamdan gelecek etkilere daha açık. Kolajen partikül destekli biyoreaktörlerde karıştırılarak üretilen kemik hücrelerinin de, durgun ortamda (petri kaplarında) üretilenlere göre daha yüksek miktarda kemik minerali içerdikleri saptanmış bulunuyor.

Hücrelerin Beslenmesi ve Kan Damarı Oluşumu

Biyoyapay organlarda kritik bir konu da hücrelerin beslenmesi. Birkaç milimetreden daha kalın dokular, beslenebilmeleri için kan damarlarına ihtiyaç duyarlar. Judah Folkman'ın yaklaşık 30 yıl kadar önce başlattığı çalışmalar, bedendeki hücrelerin yeni kan damarları oluşturabileceğini ortaya koydu. Folkman 1972'de kan da-



marı oluşumunu, diğer adıyla "angiogenesis"i durduracak spesifik moleküller önerdi. Bu yaklaşım, 1998'de kanser tedavisi için değerlendirildi. Folkman'ın çalışmaları doku mühendisleri tarafından da uygulanmaya başlanmış durumda. Özellikle pankreas, karaciğer ve böbrek gibi çok miktarda kan gereksinmesi olan organların doku mühendisliğiyle hazırlanmasında angiogenesis temel nok-



Doku üretiminde kullanılan bozunur yapıdaki polimerik matrisler.

tayı oluşturuyor. Araştırmacılar, laboratuvar koşullarında angiogenesisi başarıyla gerçekleştiriyorlar. Günümüzde angiogenesisi destekleyen çok sayıda molekül, rekombinant formda ticari olarak üretiliyor. Önemli olan, bu moleküllerin ilgili doku veya organa gönderilmesi. "Kontrollü salım teknolojisi" ile bu sorunlara çözüm getirmeye çalışılıyor.

Hücre Davranışlarının Düzenlenmesi

Doku mühendislerinin üzerinde çalıştıkları başka bir konu, hücre davranışlarının nasıl düzenleneceğinin öğrenilmesi. Örneğin insan karaciğeri altı değişik türdeki hücrenin "lobül" adı verilen yerleşiminden oluşur. Her bir hücre, yüzlerce farklı biyokimyasal reaksiyonu gerçekleştirir. Hücrelerin biyokimyasal etkinlikleri, bunların diğer hücreler ve hücre dışı matris ile etkileşimine bağlı. Araştırmacılar hepatositlerin (karaciğer hücreleri), üzerinde üredikleri materyalin yapıştırıcı özelliğine bağlı olarak, değişen miktarlarda protein ürettiklerini gözlemişler. Bu nedenle, yapay organlar geliştirilirken, hücrelerin normal fizyolojik rollerini sağlayacak şekilde üretilmeleri de büyük önem taşıyor.

Polimer Taşıyıcılar ve Geliştirilmeleri

Doku mühendisliğinde önemli bir konu da, doku oluşumunu gerçekleştirecek yeni destek malzemelerinin geliştirilmesi. Yaygın olarak kullanılan materyaller polimerik yapıda olup, iki gruba ayrılırlar. Bunlardan birincisi, bozunabilen yapıdaki sentetik polimerler, ikincisiyse kolajen ve aljinat gibi doğal polimerler. Sentetik materyallerin avantajı, mekanik dayanım, bozunma (degradasyon) hızı, mikroyapı, ve geçirgenliğin üretim sırasında kontrol edilebilir olmasından kaynaklanıyor. Doğal materyallerse hücre yapışmasını, dolayısıyla üremesini daha iyi desteklerler.

Araştırmacılar bu iki grup materyalin istenilen özelliklerini birleştire-

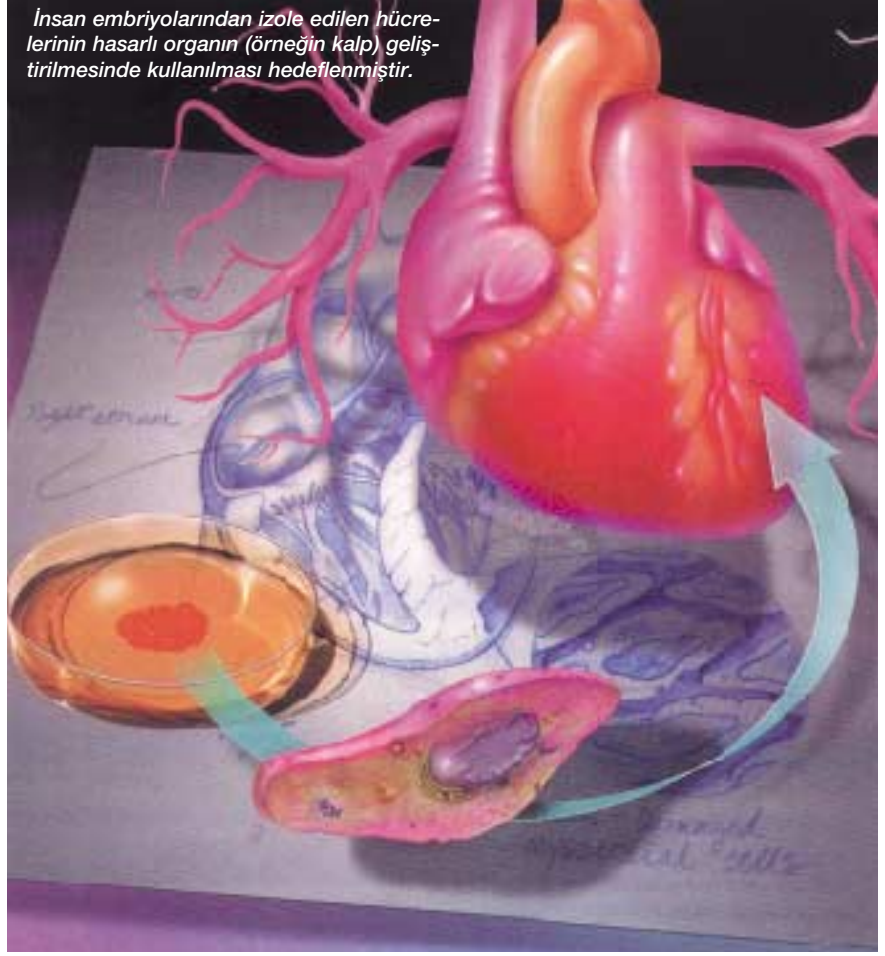
rerek yeni materyal türlerini geliştirmeye çalışıyorlar. Örnek olarak RGD ile modifiye edilmiş polimerler verilebilir. RGD, hücre dışı matris proteini olan fibronektinin bir parçası. RGD yapısı üç amino asitten oluşmuştur: Arjinin (R), Glisin (G) ve Asparajin (D). Pek çok hücre türü fibronektine bağlandığından, RGD içeren polimerler hücreler için daha doğal bir ortam sağlarlar.

Bir grup araştırmacı tarafından da ortopedik uygulamalarda kullanılmak üzere yeni, enjekte edilebilir ve bozunabilir yapıdaki polimerler geliştirilmiş bulunuyor. Bu polimerler 10-15 dakikada katılaşır ve enjekte edildikleri boşluğun şeklini alırlar. Mekanik özellikleri de kemiğine çok yakındır. Polimerler aynı zamanda, kontrol edilebilir bir hızla parçalanarak, hafta ya da ay periyodunda ortamdan ayrılırlar. Enjekte edilebilir ve bozunabilir hidrojel (jelatin benzeri, suda şişmiş polimerler) de dişlerde meydana gelen bozukluklara müdahale etmek üzere geliştiriliyor.

Hazırlanan Dokuların Korunması

Önemli bir nokta da, hazırlanan dokunun üretim aşamasından ameliyathaneye gelene kadar korunması ve nakil sırasında hücre ölümünün engellenmesi için yeni metodların geliştirilmesi. Nakilde, organ hasarının önemli bir kısmı, reperfüzyon sırasında yani organ hastanın kan damarıyla birleştiğinde oluyor. Reperfüzyon, oksijen serbest radikallerinin oluşumunu hızlandırır, bu da hücre membranında boşluklar meydana getirerek hücreleri öldürür. Bu durumun engellenmesi için cerrahlar, organı sakladıkları çözeltiliye serbest radikalleri söndürecek kimyasal maddeler ilave ediyorlar. Doku mühendisleri, ürünlerini, özellikle kan akışı yetersiz olduğunda ortaya çıkacak bu tür hasarlardan korumak için, daha mükemmel maddeler bulmaya çalışıyorlar. Ayrıca, dondurarak saklama (cryopreservation) tekniklerini geliştirerek, yapay doku ve organları

İnsan embriolarından izole edilen hücrelerinin hasarlı organın (örneğin kalp) geliştirilmesinde kullanılması hedeflenmiştir.

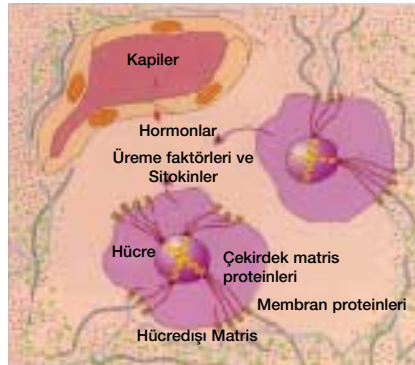


ihtiyaç anına kadar korumaya çalışıyorlar. Bu amaçla, hâlen hücreler için kullanılmakta olan yöntemleri daha büyük dokulara uygulama konusunda araştırmalar sürüyor.

Doku Mühendisliği Ürünleri

İlk "canlı" doku mühendisliği ürünü olan deri, Organogenesis firması tarafından geliştirilerek Apligraf ticari ismiyle piyasaya sürüldü. Apligraf, dermis (iç tabaka) ve epi-

dermis'den (dış tabaka) oluşmuştur. Mayıs 1998'de FDA (Food and Drug Administration) onayı alan ürün, ABD ve Kanada'da Novartis firması tarafından pazarlanıyor. Taze olarak piyasaya sunulan Apligraf, oda sıcaklığında 5 günlük raf ömrüne sahip. Apligraf'ın ana fikri 20 yıl öncesinde Eugene Bell tarafından yapılan çalışmalara dayanıyor. Bell, dermisi oluşturan hücrelerin, yani fibroblastların, kolajen jel üzerinde filtre edildiklerinde, fibroz denilen, canlı bir matrise dönüştüğünü gözlemiş. Kolajen, ECM'in temel elemanı olup, hücreleri yerlerinde tutan yapıştırıcı molekül olarak bilinir. Bell, 1981 yılında tamamladığı çalışmalarda, epidermal tabaka hücreleri olan keratinositlerin dermal substrat üzerinde ürediklerinde basit deri eşdeğeri bir yapı oluşturdıklarını açıkladı ve daha sonra bu ürünü sıçanlara greftledi. Bell'in çalışmalarını uygulamaya dönüştürmek üzere 1985 yılında Organogenesis firması kuruldu. Apligrafın geliştirilmesinde en önemli engel, hücre üremesini des-



Doku mikroçevresi.

tekleyecek, istenilen özelliklerdeki kolajenin temini oldu. Bu güçlük, sıgır tendonlarından kolajen elde edilmesini sağlayan bir yöntem geliştirilerek giderildi. Fibroblast ve keratinosit kaynağı olarak, olağanüstü üreme potansiyeline sahip yeni doğan hücreleri kullanıldı.

Advanced Tissue Sciences adlı bir başka biyoteknoloji firması tarafından da iki değişik deri ürünü hazırlandı. Bunlardan biri cansız, yara örtücü, TransCyte, diğeri ise canlı hücreleri içeren Dermagraft. TransCyte, Mart 1997'de "ilk insan doku mühendisliği ürünü" olarak FDA'dan onay alıp, üçüncü derece yanıklarda kullanılmaya başlandı. Ekim 1997'de ise ürünün ikinci derece yanıklarda da kullanımı- na izin verildi.

TransCyte, yeni doğmuş erkek bebeklerin sünnet derisinden elde edilen fibroblastlardan hazırlanmış. Hücreler, steril koşullardaki polimerler üzerinde ve vücut içerisindeki fizyolojik koşullara uygun bir ortamda üretilmişler. Hücreler, 2 haftalık üreme periyodunda bölünmüş ve fonksiyonel insan dermis'ini oluşturmak üzere kolajen ve diğer proteinleri üretmişler. TransCyte, depolama ve kullanım için dondurulana kadar canlıdır.

Dermagraft ise canlı doku olarak kalır ve özellikle şeker hastalığına bağlı olarak ayaklarda meydana gelen yaraların tedavisinde yeni deri olarak kullanılır. Dermagraftın klinik denemeleri tamamlanma aşamasında olup, yakın bir tarihte piyasaya sunulması bekleniyor. TransCyte ve Dermagraft'ın hazırlanma teknikleri birbirlerini andırıyor. Dermagraft dondurulur ve -70° C'da saklanır. Kullanım öncesi, oda sıcaklığına yükseltilerek yaranın şekil ve boyutuna uygun biçimde kesilir. Dermagraft, tek tabakalı dermisten oluşur.

Doku mühendislerinin üzerinde çok çalıştıkları ve başarılı oldukları ikinci doku ise kıkırdak. Kıkırdak, beslenme gereksinmesi çok düşük bir doku olduğundan yeni kan damarlarının oluşumunu da gerektirmez. Bu durum, kıkırdak dokunun üretimi açısından büyük bir avantaj sağlamış ve yapılan çalışmalar başarıyla sonuçlanmış bulunuyor.



Genzyme Tissue Repair adlı bir firma, diz kıkırdığındaki hasarı, hastanın kendi hücrelerinden hazırlanan dokuyla tedavi etmek için FDA onayı almıştır. Bu amaçla, hasarlı dizden alınan hastaya ait hücreler laboratuvar koşullarında üretilir ve daha sonra yaralı bölgeye yerleştirilir. Hastaya ve yaranın derecesine bağlı olarak iyileşme (doku rejenerasyonu) 12 ile 18 ay arasında tamamlanır. Araştırmacılar, kıkırdak dokusunu kulak, burun ve diğer bilinen formlarda da hazırlayabiliyorlar.

Deri, kemik ve kıkırdak dokusu üretimindeki başarı, bu dokuların diğer dokulara göre daha basit yapıda oluşlarının sonucu. Bir grup araştırmacı, karaciğer hücrelerini hayvanlara naklederek, karaciğer benzeri bir doku oluşturdu. Diğer bir çalışmada, karaciğer benzeri doku geliştirmek üzere yeni bir biyomateriyal hazırlandı. Tüm bu çalışmalarda geliştirilen yeni dokular, hayvanlarda karaciğerin yalnızca tek bir kimyasal fonksiyonunu sağladı ve henüz tam bir organ olmaktan uzak bulunuyorlar.

Araştırmacılar, böbreğin süzme işlevini gerçekleştirmek üzere böbrek hücreleriyle de çalışıyorlar. Bağırsak dokusunun hazırlanmasıyla ilgili araştırmalar da hâlen devam ediyor. Çok sayıda biyoteknoloji firması tarafından yapay kalp ile ilgili çalışmalar da sürdürülüyor.

Doku mühendisleri, bir yandan yukarıda söz edilen doku ve organla-

rı geliştirmeye çalışırken, bir yandan da çeşitli biyomoleküllerin (örneğin protein) eksikliğinden kaynaklanan birtakım hastalıkların tedavisinde kullanılmak üzere, genetik olarak değiştirilmiş hücreleri içeren polimerik kapsüller geliştirmeye çalışıyorlar (encapsulated-cell therapy). Bu hastalıklar arasında, dopamin eksikliğinden kaynaklanan Parkinson hastalığı, insülin eksikliğinden kaynaklanan şeker hastalığı, eritropoietin eksikliğinden kaynaklanan anemi (kansızlık), kan pıhtılaşmasında önemli olan Faktör VIII ve Faktör IX proteinlerinin eksikliğinden kaynaklanan hemofili, ve insan büyüme hormonu eksikliğinden kaynaklanan cücelik (dwarfism) sayılabilir. Hızlı üreme özelliğine sahip hücreler, söz konusu proteinleri üretmek üzere genetik olarak değiştirilmektedirler. Hücrelerin bağışıklık sistemi tarafından reddedilmesiye, çeşitli doğal (aljinat, kolajen, vb.) veya sentetik polimerlerden hazırlanmış kapsüller içerisine hapsedilmeleriyle engelleniyor. Önümüzdeki 20 yıl içerisinde bu tedavi yöntemlerinin de klinik uygulamalarda yerini alacağı kuşkusuz.

Menemşe Gümüşderelioglu

Prof. Dr., HÜ, Kimya Mühendisliği ve Biyomühendislik Ana Bilim Dalları

Hilal Türkoğlu

HÜ, Kimya Mühendisliği ve Biyomühendislik Ana Bilim Dalları

Kaynaklar

"The Promise of Tissue Engineering", Special Report, Scientific American, April 1999, p. 59-89.

M. Kiremitçi-Gümüşderelioglu, "Doku ve Organ Kaybı İçin Yeni Bir Yaklaşım: Doku Mühendisliği", Bilim ve Teknik, vol. 372, 92, 1998.

M. Kiremitçi-Gümüşderelioglu, Doku Mühendisliği, Ders Notları, Hacettepe Üniversitesi, 1999.