

Doku Mühendisliği ve Uygulama Alanları

Tissue Engineering and its Application Areas

✉ Ekin ERGİN,^a
 ✉ Yahya EKİCİ,^{a,b}
 Fatma Belgin ATAÇ^a

^aTıbbi Biyoloji AD,
 Başkent Üniversitesi Bağlıca Kampüsü,
^bGenel Cerrahi AD,
 Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi,
 Ankara

Received: 07.09.2017
 Received in revised form: 04.11.2017
 Accepted: 12.11.2017
 Available online: 04.04.2018

Correspondence:
 Ekin ERGİN
 Başkent Üniversitesi Bağlıca Kampüsü,
 Tıbbi Biyoloji AD, Ankara,
 TÜRKİYE/TURKEY
 ekinergin@gmail.com

ÖZET Doku mühendisliği, özellikle organ transplantasyonunda ortaya çıkan donör azlığı, immün cevap oluşumu gibi sınırlayıcı etmenlerden kaynaklanan sorunlara bir çözüm sunmak üzere ortaya konan multidisipliner bir alandır. Bu yaklaşım, uygun doku ve/veya organ modelini ortaya koyarak yenileyici tıp alanında uygulama bulabilmektedir. Temel olarak doku mühendisliği hedeflenen doku ve/veya organa uygun iskele yapısını, bu iskelenin yapılandırılmasını sağlayan faktörleri ve bu iskeleye ekilecek hücreleri içermektedir. Günümüzde özellikle kök hücre çalışmaları iskele yapılandırılmasında hücre kültürü şartlarında kullanılarak üç boyutlu (3B) iskele yapılarında uygulama bulabilmektedir. Son yıllarda yenileyici tıp yaklaşımı çalışmaları kök hücre ve üç boyutlu iskele yapılarının çalışıldığı alanlar üzerinde yoğunlaşmaktadır. Günümüzde, iki boyutlu (2B) kültür koşulları yerine üç boyutlu kültür koşullarının uygulama bulduğu ve bu üç boyutlu kültür ortamlarının biyoreaktör gibi unsurlarla dinamik kültür koşullarında çalışma alanı bulabildiği kök hücre çalışmaları hem doku mühendisliği hem de yenileyici tıp açısından artan önem kazanmaktadır. Gelişen teknolojiye bağlı olarak, doku mühendisliği ürünlerinin klinikte de geniş bir yer kaplaması söz konusudur. Doku ve organ rejenerasyonuna, hasarlı doku veya organ ile yer değiştirmeye yönelik olarak tasarlanan doku mühendisliği ürünlerinin bir kısmı araştırma ve bir kısmı klinik kullanım olmak üzere günümüzde yaşam bilimlerinde önemli bir yere sahiptir. Özellikle son yıllarda, kök hücre teknolojisi ve biyomalzeme alanındaki gelişmelere bağlı olarak önemli bir ivme kazanan rejeneratif tıp çalışmaları doku mühendisliğini yaşam bilimlerinin önemli bir parçası haline getirmiştir. Hazırlanan bu derlemede, doku mühendisliğini oluşturan unsurlar literatür örnekleri ile açıklanacaktır.

Anahtar Kelimeler: Doku mühendisliği; biyoyumlu materyaller; rejeneratif tıp; kök hücreler

ABSTRACT Tissue engineering is a multidisciplinary area that has been put forward to offer solutions to the problems arising from limiting factors, especially the lack of donors and the formation of immunological response in organ transplantation. This approach finds application in the field of regenerative medicine by demonstrating the appropriate tissue and / or organ model. Basically, tissue engineering involves the construction of scaffolds suitable for the target tissue and / or organ, the factors that make up this scaffold, and the cells to be added to this scaffold. Nowadays, especially stem cell studies can be applied in three dimensional (3D) structures by using cell culture conditions in scaffold construction. In recent years, regenerative medicine approaches have focused on areas where stem cell and three dimensional structures are studied. Today, stem cell studies in which three dimensional culture conditions are applied instead of two dimensional (2D) culture conditions and these three dimensional culture media can be found in dynamic culture conditions with elements such as bioreactors gain increasing importance in terms of tissue engineering and renewable medicine. Depending on the developing technology, tissue engineering products have a wide clinical coverage. Some of the tissue engineering products designed for tissue and organ regeneration, displacing damaged tissue or organ have an important place in life sciences today, including research and some clinical use. Especially in recent years, regenerative medicine studies, which have gained significant momentum due to improvements in stem cell technology and biomolecularization, have made tissue engineering an important part of life sciences. In this review, the elements that make up the tissue engineering will be explained with examples of the literature.

Vücutta fonksiyonunu kaybetmiş, hasarlı doku ve/veya organın yerine yenisinin nakil edilmesi transplantasyon olarak tanımlanmaktadır. Transplantasyon ototransplantasyon, allotransplantasyon ve ksenotransplantasyon olmak üzere üç başlıkta incelenmektedir. Ototransplantasyon, hastanın kendisinden alınan doku ve/veya organın kendisine olan naklini ifade etmektedir. Bu transplantasyon tipinde donör ve alıcı aynı kişi olmaktadır. Bu yöntem herhangi bir immün yanıt oluşturmaması ile avantaj taşısaya da, doku ve organların kullanılabilirliğinin sınırlı olması ve rejenerasyon kapasitesinin azlığı açısından dezavantaj göstermektedir. Buna örnek olarak deri ve kemik doku verilebilir. Ayrıca ototransplantasyon yönteminde aynı kişi hem donör hem de alıcı konumunda olduğundan hastanın seri operasyon geçirmesi söz konusu olup bu durum hastaya ayrıca bir ağrı ve operasyonel risk getirmektedir. Allotransplantasyon, aynı tür içerisinde farklı bireyler arasından gerçekleşen transplantasyondur. Bu yöntemde uygun donörün bulunabilmesi, alıcıda immün yanıtın oluşma ihtimali gibi unsurlar sınırlayıcıdır. Ksenotransplantasyon ise farklı iki tür arasındaki transplantasyonu ifade etmektedir. Ancak bu transplantasyon tipinde transplant reddi, ksenojenik enfeksiyon, etik sorunlar gibi sınırlayıcı faktörler bulunmaktadır.¹ Transplantasyonun tüm bu sınırlayıcı unsurlarından dolayı doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanı her geçen gün gelişerek önemi artan bir alan haline gelmiştir ve bu alan laboratuvardan kliniğe taşınan ürünler ile gelecek vaad eden multidisipliner bir çalışmanın gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Doku mühendisliği kavramı, rejeneratif tıp çalışmalarının yapılmasına ve sürdürülebilir olmasına imkan sağlayan disiplinlerarası bir yaklaşım olarak ortaya çıkmaktadır. Rejeneratif tıp çalışmalarının kapsamı kaybolan ya da zarar gören dokunun doğal yapısına ve fonksiyonuna en yakın ve en uygun olacak modelin geliştirilmesi şeklinde ifade edilir. Geliştirilen bu model, uygulandığı dokuyu onarma özelliği göstermeli veya hasarlı yapı ile yer değiştirmeye uygun özellikte olmalıdır.² Rejeneratif tıp kavramı disiplinlerarası bir alanda çalışmanın gerekliliğini ifade etmektedir ve biyolojik bilimler,

mühendislik bilimleri ve tıbbi bilimlerin iç içe geçtiği bir alan olarak son yıllarda hem deneysel hem de kliniğe yönelik çalışmaların konu başlığını oluşturmaktadır.

1993 yılında Langer ve Vacanti tarafından çıkarılan bir makale ile doku mühendisliğinin tanımı yapılmıştır.³ Bu tanıma göre doku mühendisliği; kaybedilmiş veya hasarlı dokuların işlevlerini yerine getiren, sürdürülebilir kılan ve yeniden modellemeyi hedefleyen disiplinlerarası bir uygulama alanıdır. Doku mühendisliği ile ilgili olarak 3 temel unsur ileri sürülmektedir.³

Bu temel unsurlar aşağıdaki şekilde belirtilmektedir:

- 1- Çalışmanın amacına uygun olarak seçilen iskele yapısına ekilecek hücreler
- 2- Doku uyarıcı maddeler olarak büyüme faktörleri, sitokinler gibi biyosinyal molekülleri
- 3- Uygulama için elverişli ve 3 boyutlu (3B) kültür ortamını sağlayan biyomalzeme olarak kullanılan yapı iskeleleri (scaffold) şeklinde ifade edilmektedir.³

Günümüzde hasar gören dokunun fonksiyonunu yeniden kazanması için başta kök hücreler olmak üzere farklı hücrelerin kullanımı söz konusudur. Biyosinyal molekülleri ise bir iskele ortamında hücre davranışlarını yönlendirebilecek özellikte ve hedef bir doku ya da organ için ekstrasellüler çevrenin oluşturulması ve sürdürülmesini sağlayabilir olmalıdır. Doku mühendisliği yaklaşımında başarı kazanılması hücre, iskele, biyosinyal moleküllerinin birlikte ya da ayrı ayrı, tekrarlanabilir, zaman-mekansal (spatiotemporal) olarak uygun şekilde kontrol edilebilir olarak uygulanmasına bağlıdır.

Yapı iskeleleri, 3 boyutlu ortamlar olarak hücrelerin hayatta kaldıkları ve çoğalabilecekleri çevreyi oluşturan yapılardır. Rejeneratif tıp alanında yapılacak çalışmada belirlenen hedeflere uygun 3 boyutlu iskele yapısının dizayn edilmesi gereklidir. Yapı iskeleleri, doğal kaynaklı veya sentetik kaynaklı yapı iskeleleri şeklinde iki sınıfa ayrılır.²

Sentetik kaynaklı yapı iskeleleri işlenebilir ve ayarlanabilir mekanik özellikler sergilerler. Bu ya-

pılar ile rejenerasyonu veya modellenmesi istenilen dokuya uygun geometrik şekil elde edilebilir ve üretim verimi, malzemenin esnekliği, yüzey özelliklerinin modifikasyonu sağlanabilir. Ancak sentetik biyomalzemeler hücre tutunma (adhezyon) yetersizliği ve buna bağlı olarak yetersiz ekstraselüler matriks üretimi, trombozise sebep olma, biyobozunma süresinin ayarlanamaması gibi dezavantajlar sergilerler. Doğal kaynaklı biyomalzemelerden oluşan iskele yapıları ise ilk olarak kendiliğinden biyouyumluluk özelliği göstererek avantaj sağlarlar; ancak bu yapılardan özellikle deselülerize yapılarda görülen zayıf mekanik özellikler dezavantaj yaratmaktadır.⁴

Doğal kaynaklı biyomalzeme örneklerinden deselülerize matriks yapıları yakın zamanda yapılan doku mühendisliği çalışmalarında karşımıza çıkmaktadır. Temel olarak deselülerize yapılar, insan ya da insan dışında başka kaynaklardan elde edilen dokuların hücre bileşenlerinden arındırılmış şeklini ifade etmektedir. Deselüerizasyon çalışmalarında dokunun ekstraselüler matriks yapısının bozulmaması en çok istenen durumdur. Buna bağlı olarak elde edilecek doğal iskele yapısı kalıp olarak hücre ekimi ve doku mühendisliğinin diğer gerekli unsurları ile yapılandırılarak uygulama alanı bulabilmektedir.

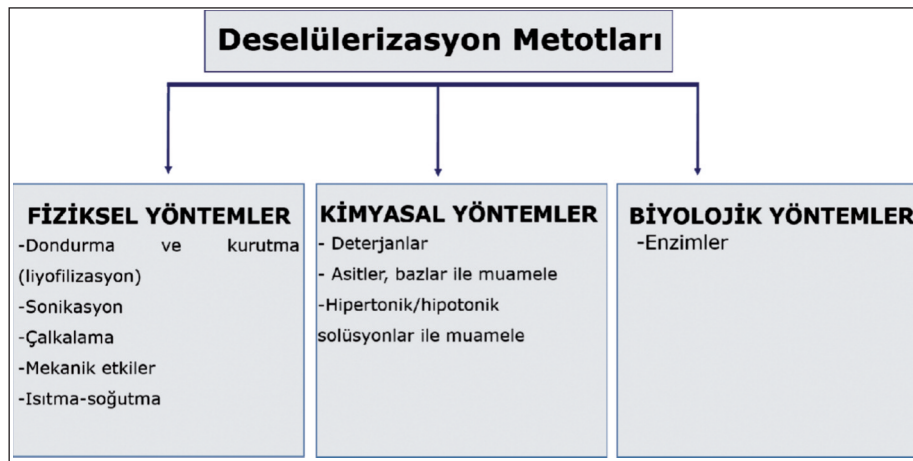
Bir dokunun deselüerizasyonu yani hücreleştirilmesi için literatürde çok sayıda yöntem bulunmaktadır.^{5,6}

Bu yöntemler kimyasal, enzimatik, fiziksel olmak üzere üç ana başlıkta incelenebilir (Şekil 1). Hangi yöntemin kullanılacağına doku-hücre durumu, dokunun yoğunluğu, kalınlığı, lipit içeriği gibi özellikler göz önüne alınarak karar verilir. Deselüerizasyon işlemi sonucunda uygulanan yöntem ne olursa olsun dokuyu doğal halinden uzaklaştıracak bir etki meydana getirecektir. Burada önemli olan nokta bu etkileri tamamen ortadan kaldırmak değil bu etkileri minimize eden en doğru ve tekrarlanabilir yöntemi bulmaktır.

Deselüerizasyon ile hücre membran lipitleri, proteinleri, nükleik asitler dokudan uzaklaştırılır ve tüm bunlara bağlı olarak immün cevap oluşma olasılığı en aza indirilir ve kalsifikasyon riski azaltılır. Ayrıca, hücreler ekildikleri bu üç boyutlu deselüerize iskelelerde doğal ortamlarına en uygun şekilde tutunma ve proliferasyon gösterme özelliğine sahip olurlar. Bu sayede hücrenin iskele yapısına en uygun şekilde yerleşimi ve istenilen doku modellenmesine en uygun şekilde yapının oluşturulması söz konusu olur.

DOKU MÜHENDİSLİĞİ VE HÜCRE

Doku mühendisliği çalışmalarına bakıldığında onarımı hedeflenen dokuya özgü hücrelerin veya farklılaştırılmış kök hücrelerin uygun iskele ortamlarına ekildikten sonra hedef dokuya yönelik fonksiyonel özelliklerin kazandırılmaya çalışıldığı görülmektedir. 2000'li yılların başlarından itibaren



ŞEKİL 1: Deselüerizasyon uygulamaları için kullanılan yöntemlerin sınıflandırılması.

çalışmalar artarak kök hücreler ile ilişkili olarak kendini göstermektedir.

Kök hücreler, köken aldıkları dokuya göre ve taşıdıkları farklılaşma potansiyeline göre sınıflandırılan henüz farklılaşmamış hücre popülasyonudur. Uyarıların etkisi ile kök hücreler hem farklılaşp istenilen hücre tipine dönüşerek hem de kendi kopyalarını meydana getirerek ve böylece buldukları popülasyonda durumlarını koruyarak asimetrik bölünme özelliği gösterirler.⁷⁻⁹

Kök hücreler; embriyonik kök hücreler, uyarılmış pluripotent kök hücreler ve yetişkin multipotent kök hücreler şeklinde doku mühendisliği çalışmalarında yaygın kullanılmaktadır. Yetişkin hücrelerin yeniden programlanarak pluripotent karakter kazanması esasına dayanarak elde edilen uyarılmış pluripotent kök hücrelerin keşfi doku mühendisliği uygulamaları açısından heyecan verici olmuştur.¹⁰ Uyarılmış pluripotent kök hücreler için kullanılan transkripsiyon faktörleri: Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4, Nanog ve Lin28 şeklinde ifade edilir. Uyarılmış pluripotent kök hücreler, özellikle otolog hücre transplantasyonu için çarpıcı bir yöntemdir. Bu yöntem, temel olarak hastadan alınan erişkin hücrelerin transkripsiyon faktörleri ile yeniden programlanarak farklılaştırılmasına ve sonra tekrar aynı hastada kullanılabilmesi temeline dayanmaktadır. Buna bağlı olarak allojenik veya ksenojenik nakillerde oluşabilecek immün ret cevabının ve diğer risklerin en aza inmesi söz konusu olmaktadır.

Yetişkin kök hücrelerin kullanımı ile ilgili birçok çalışma literatürde görülmektedir. Buna bağlı olarak en sık kullanılan iki kaynak kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücreler ve adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücrelerdir.^{8,9}

Mezenkimal kök hücreler (MKH) uygun sinyaller altında hedef doku ve/veya organ yapısına farklılaşabilme yetenekleri ile doku ve/veya organ rejenerasyonunu içeren doku mühendisliği çalışmalarında potansiyel kaynak olarak tercih edilirler. MKH'lerin gerek *in vivo* ortamda hedef doku ve/veya organ yapısına yönelik olarak gerekse biyomateryal ile birlikte *in vitro* koşullarda bir yapı iskelesi şeklinde kullanılması hücrelerin taşıdığı bu yüksek potansiyel ile ilişkilidir.⁷

Kök hücrelere ek olarak, özellikle deri doku mühendisliğinde keratinositlerin ve fibroblastların kullanıldığı, karaciğer doku mühendisliğinde hepatosit, insan umbilikal kord ven hücreleri ve fibroblastların kullanıldığı çalışmalar literatürde bulunmaktadır.¹¹⁻¹³ Ayrıca, damar doku mühendisliğinde de kök hücrelerin yanı sıra insan umbilikal kord ven hücreleri, fibroblast hücrelerinin çalışılması söz konusudur.¹⁴ Bu şekilde hücrelerin bir arada kullanılması doku organizasyonu ve dokuların tabakalı yapısına uygun şekilde çalışmaların dizayn edilmesini sağlamaktadır. Böylece, laboratuvarından kliniğe doğru hedef dokuya en uygun yapıların elde edilmesi söz konusu olmaktadır.

Doku mühendisliği ve hücre başlığı altında değinilmesi gereken bir başka unsur hücre kültürü koşullarıdır. Günümüzde gelişen teknikler ile 2 boyutlu hücre kültürü şartlarının ötesinde 3 boyutlu yapıya sahip biyomalzemelerin kullanılması sonucunda hücreler fizyolojik şartlara en uygun şekilde statik veya dinamik koşullar altında kültür edilmektedir. Statik kültür şartları klasik anlamda durağan kültür şartları olup burada seçilen hücrenin uygun substrat yüzeyinde üretimi hücre kültürü şartlarında yapılmaktadır. Dinamik kültür şartları ise içerisinde biyoreaktör kullanımını içeren ve fizyolojik şartlara daha uygun bir çevrenin oluşturulduğu koşullardır.

Biyoreaktörler; doku büyümesinin, şekillenmesinin ve davranışının *in vitro* çalışma koşullarında *in vivo* ortama yönelik gerçeğe en yakın ölçekte ortaya konabilmesini amaçlayan ve böylece fizyolojik koşullara en yakın ortamı araştırmacılara sunan araçlardır. Bu araçlar mekanik uyarı sağlamak adına sınırsız özellik gösterirler. Ayrıca besin, oksijen, pH ve sıcaklık gibi biyokimyasal şartların uzun süreli ve tekrarlanabilir şekilde çalışmada uygulanmasını sağlarlar. Bu tarz sistemler sayesinde kurulan dinamik hücre kültürü koşulları ile hücre proliferasyonu, ekstrasellüler matriks sentez hızı arttırılarak doku büyümesi ve yapılandırılması süreçlerine önemli katkılar sağlanır.¹⁵ Mekanik kuvvetlerin hücrede birçok fizyolojik süreci etkilediği göz önüne alındığında biyoreaktörler sayesinde mekanik uyarıların hücrede biyokimyasal uyarılara dönüştürülmesinin doku mühendisliği çalışmaları

rında gerek rejeneratif tıp gerekse doku mühendisliği alanında modellemede verimli sonuçlar ortaya koyduğu görülmektedir.¹⁶

Biyoreaktör dizaynı hem hedeflenen dokuya ve bu doku için belirlenen uygulamanın gerekliliklerine göre yapılmalıdır. Buna bağlı olarak hem yaşam bilimleri hem de mühendislik gibi disiplinlerin bir arada çalışması, fizyolojik koşulları ortaya koyacak biyoreaktör dizaynı için önem taşımaktadır. Biyoreaktörler temel olarak bazı özellikler taşımalıdır. Bu özellikler reaktör parçalarının toksik olmaması, sterilizasyonu yapılabilen dayanıklı malzemelerden oluşması ve parçalarının ayrılıp tekrar bir araya getirilmesinin zaman almaması şeklinde ifade edilebilir.¹⁷ Belirtilen bu özelliklere sahip biyoreaktör sistemler ile dinamik hücre kültürü ortamı için gerekli fiziksel, biyokimyasal ve mekaniksel koşullar sağlanır. Böylece fizyolojik koşullara uygun *in vitro* ortamlar oluşturularak doku mühendisliği çalışmaları desteklenebilir.

DOKU MÜHENDİSLİĞİ VE EKSTRASELLÜLER MATRİKS

Ekstrasellüler matriks (ECM), doku ve organlarda bulunan mevcut hücreler tarafından salgılanır. Bu yapı, hedeflenen dokuya yönelik doku mühendisliği çalışmalarında uygun iskele yapısının oluşturulması, hücrelerin ve biyosinyal moleküllerinin yerleşim göstermesi açısından destek ortamı olarak model oluşturmaktadır. Doku mühendisliğinde hedefe yönelik kullanılan biyomalzeme ECM yapısını taklit eden iskele yapısı yerine geçmektedir.

ECM, özellikle dokuya ait onarım ve yenilenmeye yönelik potansiyel taşıması ile doku iskelesi modellemede taklit edilmesi hedeflenen bir yapıdır. Yapay veya doğal kaynaklı biyomalzemeler iskele yapısı olarak ECM modellemede kullanılır. Bu iskelelere hücreler tutunurlar ve kemokin, sitokin gibi biyosinyal molekülleri iskeleye yüklenerek veya mevcut hücreler tarafından salgılanarak doku modellenmesinde etki gösterirler.¹ Böylece hücrelere yerleşim, farklılaşma ve proliferasyon için uygun ortam sağlanmış olur.

Uygun bir iskele yapısı; biyobozunur, biyoyumlu, porlu, hedeflenen doku veya organın me-

kanik özelliklerine uygun, nontoksik, nonmutajenik ve nonimmünojenik özelliklerde olmalıdır. Ayrıca yüzey özellikleri hücre tutunmasına, farklılaşmasına uygun olmalıdır veya yüzey özellikleri buna göre düzenlenebilmelidir.^{18,19}

Doku mühendisliği çalışmalarında ECM'yi modelleme için kullanan potansiyel materyaller; doğal veya sentetik polimerler, seramikler, metaller veya bunların kombinasyonu ve doğal kaynaklı yapılar olarak deselülerize doku iskeleleri şeklinde ifade edilebilir.

Polimerler doğal ve sentetik kaynaklı olmak üzere iki başlıkta incelenir. Sentetik polimerler, monomerlerin polimerizasyonu ile elde edilirken; doğal polimerler mikroorganizma, bitki ve hayvanlar gibi biyolojik sistemlerden elde edilirler. Bu noktada; porlu yapıya sahip, biyobozunur, nontoksik, hücre proliferasyonuna ve büyümesine uygun olan iskele yapısı çeşitli yöntemlerle elde edilmektedir (Tablo 1). Bunlar genel olarak kalıp sentezi, faz ayrımı, elektroçirgeme süreçlerine göre ayrım gösterirler.^{18,19}

Sentetik polimerler, rejeneratif tıp çalışmalarında yaygın olarak tercih edilen yapılardır. Sık kullanılan polimerlere örnek olarak; poli(laktik asit) (PLA), poliglikolik asit (PGA), polikaprolakton (PCL), poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) verilebilir. PLA, biyoyumlu özelliği ile birçok biyomedikal uygulamada yer alır. PLA polimerleri ile oluşturulan fiber yapıdaki iskeleler ayarlanabilir yüzeysel ve mekaniksel özellikler ile sert ve yumuşak doku mühendisliği çalışmalarında tercih edilir.^{18,19} Doğal polimerler kitin, kitosan, kollajen, jelatin, aljinat şeklinde sıralanabilir. Kitin, yara iyileşmesi başta olmak üzere birçok uygulama ve çalışmada tercih edilen bir polimerdir. Kitosan, kitinin deasetile şekli olup enjekte edilebilir şekilde hidrojel, mikro küre olarak uygulanabilir. Kollajen, ECM yapısında bulunan baskın protein yapısı olup doğal polimer olarak doku mühendisliği çalışmalarında kullanılmaktadır ve kollajen biyoyumlu özellikte olup hücrelerin tutunması için oldukça elverişli bir ortam sağlar.¹⁸

İskelenin mekanik dayanımı özellikle yük taşıyan kemik, kırık doku gibi yapılarda önemli-

TABLO 1: Sentetik/doğal polimerlerin elde edilme yöntemleri.

Yöntem Adı	Süreç
Elektroegirme	Üç temel elemandan oluşur. Bunlar; yüksek voltaj kaynağı, küçük çaplı kapiller iğne, toplayıcı(hareketli/sabit) şeklindedir. Polimerin molekül ağırlığı ve çözücüsü bu yöntemde önemli olup polimer çözeltisi uygulanan voltaj ile toplayıcıda birikir ve bu süreçte çözücü buharlaşarak veya katılarak polimerin fiberler şeklinde toplayıcıda birikmesi ile üretimi gerçekleşir. Bu yöntem ile sıklıkla sentetik polimerler olan PCL,PLGA ve doğal polimerler olan kitosan, kollajen elde edilebilir.
Çözücü Döküm Yöntemi ve Parçacık Uzaklaştırma	Kalıp şeklinde dökülen polimerden çözücüyü bir veya daha fazla yol ile uzaklaştırma prensibiyle çalışır. Burada çözücü döküm veya dondurarak kurutma yöntemi kullanılarak çözücüyü buharlaştırmak için kullanılabilir. Bu yöntem ile polimer membranlar elde edilebilir.
Dondurarak Kurutma	Porlu iskele yapılarının elde edilmesi için kullanılan bir yöntemdir. Sublimleşme prensibi ile çalışır. Polimer istenilen konsantrasyonda uygun çözücüsünde çözünür ve sonrasında çözelti dondurulur ve çözücü yüksek basınç altında liyofilize edilerek porlu bir iskele yapısı elde edilir.
Gaz Köpüklendirme	Yüksek porlu yapıların elde edilmesi için yüksek basınçlı CO2 gazı kullanılır. Polimer yüksek basınç altında gaz ile doygun hale gelir ve daha sonra gazın çözeltiden uzaklaşması sağlanır.

dir. Gerilim kuvveti, elastikiyet, emilim gibi mekaniksel unsurlar materyalin biyostabilizasyonu için önemlidir.¹⁸ Seçilen biyomalzemenin hedef organa uygun şekilde yapılandırılması gerekli olup bunun için birçok biyoaktif molekülün kullanımı da iskele yapılandırılmasında söz konusudur. Örneğin kemik dokuya yönelik çalışmalarda kalsiyum fosfat içeriğini veya kemik morfojenik proteini gibi büyüme faktörlerinin kullanımını görürken; damar doku mühendisliği çalışmalarında bazik fibroblast büyüme faktörü, vasküler endotelial büyüme faktörü kullanımını sıkça görmekteyiz.

DOKU MÜHENDİSLİĞİ UYGULAMA ALANLARINA YÖNELİK ÇALIŞMALAR

DERİ DOKU MÜHENDİSLİĞİ

2011 yılında Jin ve ark., insan kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücreleri epidermal farklılaşma için *in vitro* ortamda elektroegirme yöntemi ile üretilen kollajen/poli (L-laktikasit)-ko-poli (3-kaprolakton) (koll/PLLCL) iskelelerde gözlemlenmiştir. PLLCL ve koll/PLLCL nanofibröz iskeleler ayrı ayrı değerlendirilmiştir. MKH'lerin farklılaşması EGF ve 1, 25 dihidroksi vitamin D₃ besiyeri ortamında kullanılarak yapılmıştır. MKH proliferasyonu değerlendirildiğinde koll/PLLCL iskelelerde PLLCL iskelelere göre daha yüksek proliferasyon görülmüştür. Aynı çalışmada MKH'ler keratinosit

morfolojisine benzer morfoloji göstermiştir ve keratin10, filaggrin ve kısmen involukrin proteini ifadesi göstermiştir. Koll/PLLCL nanofiber iskeleler doğal deri ECM yapısını taklit etmiştir ve bu substrat deri doku mühendisliği için uygun bir yapı sunmuştur. Koll/PLLCL üzerindeki hücre proliferasyonu genel anlamda uyarılmış besiyeri ortamında daha fazla olarak bulunmuştur. Bu durum doku mühendisliği yaklaşımına uygun olarak büyüme faktörlerinin kullanılması ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, uyarılmış ve uyarılmamış besiyeri ortamlarıyla ekim yapılan MKH'ler Koll/PLLCL üzerinde sadece PLLCL'ye göre daha iyi proliferasyon göstermiştir.²⁰ 2017 yılında Zhu ve ark., elektroegirme tekniği ile ağ yapısında ve doğal ECM yapısına benzer yapay deriyi doku mühendisliği yaklaşımı kullanarak sentezlemiştir. PLGA/ipek fibroin kompoziti deri hücrelerinin büyümesi için iyi bir iskele ortamı sunmuştur. Çalışmada özellikle ipek fibroin yapının kolay bozulmaması ve PLGA'nın varlığı iskelenin sürdürülebilirliği açısından olumlu sonuçlar vermiştir. Sonuç olarak; oluşturulan iskele yapısı insan epidermal dokusunu yapılandırmak için uygun bulunmuştur ve takip eden çalışmalarda insan deri keratinosit hücrelerinin bu iskele yapısında kültür edilmesi ve hücre proliferasyonunun ile infiltrasyonunun değerlendirilmesinin daha faydalı olacağı sonucuna varılmıştır.²¹

KEMİK VE KIKIRDAK DOKU MÜHENDİSLİĞİ

Vücudun yük taşıyan bölgeleri olarak kemik ve kırık doku hasarları veya kayıpları yaşam kalitesini önemli ölçüde etkilemektedir. 2015 yılında, Quinlan ve ark., kollajen-hidroksiapatit iskeleleri PLGA ve aljinat mikropartükülleri ile hazırlayarak insan rekombinant kemik morfojenik protein-2 (rhBMP-2) kontrollü salınımını kemik doku mühendisliği çalışmasında kullanmışlardır. Çalışma sonucunda PLGA-kollajen hidroksiapatit yapısının kemik rejenerasyonu için daha etkin olduğu ve bu yapının pro-osteojenik etkisinin *in vitro* ortamda PLGA-aljinata göre daha fazla olduğu ortaya konmuştur. Sonuçta elde edilen bu yapının farklı hücreler ve büyüme faktörleri ile etkin olarak yapılandırılabilirliği ileri sürülmüştür.²² 2016 yılında, Lam ve ark., poli-l-lizin (PLL) polimeri kullanarak mezenkimal kök hücreler ile kondrojenik uyarımı çalışmışlardır. PLL iskeleler ile MKH'ler kapsüle edilmiştir. Sonuçta hücrelerde agrekan, tip I/II kollajen ifadesi artışı görülmüştür. Ancak fonksiyonel anlamda kondrositlerin üretilmesi için çalışmalara ihtiyaç vardır.²³

KALP VE DAMAR DOKU MÜHENDİSLİĞİ

Kardiyovasküler hastalıklar hem dünyada hem de ülkemizde en sık görülen hastalıklardır. Buna bağlı olarak bu alanda yapılan doku mühendisliği çalışmaları yoğunluktadır. Damar doku mühendisliği çalışmalarında damarın tabakalı yapısına uygun olarak hücrelerin yerleşim göstermesi ve hemodinamik basınç özelliklerinin sağlanabilmesi önem taşımaktadır. 2015 yılında Ahn ve ark. PCL ve kollajen tip I ile beraber bir iskele yapısı üretmiş ve bu iskele yapısı koyun femoral arterinden izole edilen düz kas hücreleri ile sarılmıştır. Çalışmada doğal damar yapısının oluşması için vuruşlu perfüzyon biyoreaktör kullanılarak uygun fizyolojik koşulların sağlanması da hedeflenmiştir. Böylece biyokimyasal ve mekaniksel olarak doğal damar yapısına en uygun yapının elde edilmesi hedeflenmiştir. Sonuçta kullanılan biyoreaktöre bağlı olan dinamik hücre kültürü koşullarının damarın fonksiyonunu arttıracak yönde etki gösterdiği öne sürülmüştür ve bu çalışma sonrasında endotelizasyon basamağının geliştirilerek *in vivo* uygulamalara

geçiş olabileceği ortaya konmuştur.²⁴ 2016 yılında, Melchiorri ve ark. damar doku mühendisliği yaklaşımına uyumlu olacak şekilde sağlam bir endotel tabakası oluşturmak amacıyla bir çalışma ortaya koymuşlardır. Yapılan çalışmada yetişkin endotel hücrelerin düşük proliferatif aktivite göstermesine bağlı olarak endotel öncül hücreler kullanılmıştır. Böylece oluşturulan biyoreaktör sisteminde vasküler greft yapılarına endotel ekimi yapılarak iskele yapısının olgunlaşması sağlanmıştır. Sonuçta kurulan sistemde özellikle endotel öncül hücrelerin kullanılmasının greft yapısında endotelizasyonu hızlandırdığı ortaya konmuştur.²⁵

SOLUNUM SİSTEMİ DOKU MÜHENDİSLİĞİ

Solunum sistemini oluşturan trakea, akciğer gibi yapılara ait doku mühendisliği çalışmalarında deselülerizasyon yöntemi sıklıkla görülmektedir. 2016 yılında, Johnson ve ark. tarafından 3 boyutlu PCL iskele ve domuz kökenli deselülerize trakea yapıları hibrid olarak sentezlenmiştir ve elde edilen yapının doku mühendisliği alanında kullanılabileceği gösterilmiştir.²⁶ Trakea transplantasyonunu hedefleyen deselülerize yapılarda immün yanıtın en az seviyede oluşması, yapıların hızlı vaskülerize olması, sağlıklı bir solunum için epitelyal tabaka büyümesinin desteklenmesi ve doğal trakea yapısının mekanik özelliklerinin sürdürülebilmesi önemlidir. Belirtilen bu hususlara bağlı olarak 2017 yılında, Den Hondt ve ark. tarafından tavşan trakeası kullanılarak mekanik özellikleri doğal trakea ile oldukça benzerlik gösteren bir deselülerize yapı iskelesi önerilmiştir. Yapılan çalışmada deselülerizasyon için kimyasal yöntemlerden deterjan muamelesi ve biyolojik yöntemlerden enzimler kullanılmıştır. Çalışma deselülerizasyon metodu ile ilgili bir optimizasyon süreci ortaya koymuştur. Buna göre deterjan ve enzimatik muameleler ve bunlar arasındaki yıkama süreçlerini de içeren döngü sayıları karşılaştırılmıştır. Deselülerizasyon için en az immün yanıtı oluşturacak ve mekanik özelliği doğal trakea ile yakından uyumlu olacak döngü tercih edilmiştir.²⁷ Bir diğer trakea deselülerizasyon çalışması 2015 yılında, Kuten ve ark. tarafından fare trakeaları kullanılarak ortaya konmuştur. Bu çalışmada trakealar deterjan ile muamele edilmenin yanı sıra fiziksel muamele uy-

gulanarak döngüsel basınç altında tutulmuştur. De-terjan ile muamele sırasında trakeaların değişen basınç altında tutulması daha iyi bir deselülerizasyon ile sonuçlanmıştır. Uygulanan vakum ile deselüerize dokuda hava kabarcığı kalmamış ve hücrelerin bu şekilde dokuya yerleşimi daha uygun şekilde gerçekleşmiştir. Kullanılan bu metot ile lümen epitel hücrelerin daha hızlı bir şekilde yeniden hücrelendirme sürecine katıldığı görülmüştür.²⁸

KARACİĞER DOKU MÜHENDİSLİĞİ

Karaciğer nakli, karaciğer hastalıklarının son evresinde olan hastalar için gereklidir. Donör azlığı bu noktada yine bir problem olup karaciğer doku mühendisliği bu probleme çözüm bulabilmek amacıyla *in vitro* ortamda karaciğer dokusunu oluşturmayı hedefler. Başta hepatositler ve MKH'ler olmak üzere karaciğer doku mühendisliği yaklaşımında çeşitli hücre tiplerinin kullanımı söz konusudur.²⁹ Hücre kaynağı ve karaciğere uygun metabolik aktivitenin varlığı karaciğer doku mühendisliği çalışmaları için ön plandadır. Bu şekilde doku mühendisliği yaklaşımı ile ortaya konan modellerin gelecekte biyoyapay karaciğerler olarak yenileyici tıp yaklaşımında yer bulması mümkündür.³⁰ Karaciğer doku mühendisliği alanındaki bir diğer önemli nokta karaciğerde mikrovasküler yapının ortaya konmasıdır. 2016 yılında, Lee ve ark. PCL içerikli bir iskele yapısını karaciğer doku mühendisliğine yönelik olarak 3 boyutlu yazıcı ile üretmiştir. Çalışmada elde edilen iskeleye hepatosit, insan umbilikal ven endotel hücreleri ve insan akciğer fibroblastları ekilmiştir ve ortaya konan yapının karaciğer dokusunu çalışmaya uygun olduğu sonucuna varılmıştır.¹³

SONUÇ

Günümüzde birçok doku ve/veya organa yönelik olarak doku mühendisliğinin uygulama alanı bulunduğu çalışmalar yapılmaktadır. Bunlardan kliniğe aktarımı en uygun olan modellerin ortaya konması veya bu modellerin sayısının arttırılabilmesi gerekmektedir. Bunun için fizyolojik koşullara uygun olarak 3 boyutlu kültür ortamlarının, biyoreaktörlerin ve buna bağlı olarak dinamik hücre kültürü şartlarının oluşturulması doku mühendisliği çalışmaları açısından önemlidir. Yapılacak çalışmaların ileri 3 boyutlu modelleme teknolojilerini içermesi ve bunların geliştirilmesi doku mühendisliği alanının geleceğini ve uygulama alanlarını belirleyecektir.

Finansal Kaynak

Bu çalışma sırasında, yapılan araştırma konusu ile ilgili doğrudan bağlantısı bulunan herhangi bir ilaç firmasından, tıbbi alet, gereç ve malzeme sağlayan ve/veya üreten bir firma veya herhangi bir ticari firmadan, çalışmanın değerlendirme sürecinde, çalışma ile ilgili verilecek kararı olumsuz etkileyebilecek maddi ve/veya manevi herhangi bir destek alınmamıştır.

Çıkar Çatışması

Bu çalışma ile ilgili olarak yazarların ve/veya aile bireylerinin çıkar çatışması potansiyeli olabilecek bilimsel ve tıbbi komite üyeliği veya üyeleri ile ilişkisi, danışmanlık, bilirkişilik, herhangi bir firmada çalışma durumu, hissedarlık ve benzer durumları yoktur.

Yazar Katkıları

Fikir/Kavram: Ekin Ergin, Yahya Ekici, Fatma Belgin Ataç; **Tasarım:** Ekin Ergin, Yahya Ekici, Fatma Belgin Ataç; **Denetleme/Danışmanlık:** Fatma Belgin Ataç; **Veri toplama ve/veya İşleme, Analiz ve/veya Yorum, Kaynak Taraması:** Ekin Ergin, Yahya Ekici; **Makalenin Yazımı:** Ekin Ergin, Yahya Ekici; **Eleştirel İnceleme:** Ekin Ergin, Yahya Ekici, Fatma Belgin Ataç.

KAYNAKLAR

1. Yi S, Ding F, Gong L, Gu X. Extracellular matrix scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. *Curr Stem Cell Res Ther* 2017;12(3):233-46.
2. Glotzbach JP, Wong VW, Gurtner GC, Longaker MT. Regenerative medicine. *Curr Probl Surg* 2011;48(3):148-212.
3. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993;260(5110):920-6.
4. Elliott MB, Gerecht S. Three-dimensional culture of small-diameter vascular grafts. *J Med Chem* 2016;4(20):3443-53.
5. Kawecki M, Łabuś W, Klama-Baryla A, Kitala D, Kraut M, Glik J, et al. A review of decellurization methods caused by an urgent need for quality control of cell-free extracellular matrix' scaffolds and their role in regenerative medicine. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2017 Feb 14. Doi: 10.1002/jbm.b.33865. [Epub ahead of print].
6. Crapo PM, Gilbert TW, Badyalok SF. An overview of tissue and whole organ decellurization processes. *Biomaterials* 2011; 32(12):3233-43.
7. Khademhosseini A, Langer R. A decade of progress in tissue engineering. *Nat Protoc* 2016;11(10):1775-81.

8. Orbay H, Tobita M, Mizuno H. Mesenchymal stem cells isolated from adipose and other tissues: basic biological properties and clinical applications. *Stem Cells Int* 2012;2012:461718.
9. Baer PC, Geiger H. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity. *Stem Cells Int* 2012;2012:812693.
10. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126(4):663-76.
11. Gümüşdereliolu M, Dalkıranoğlu S, Aydın RS, Cakmak S. A novel dermal substitute based on biofunctionalized electrospun PCL nanofibrous matrix. *J Biomed Mater Res A* 2011;98(3):461-72.
12. Shalumon KT, Anulekha KH, Chennazhi KP, Tamura H, Nair SV, Jayakumar R. Fabrication of chitosan/poly(caprolactone) nanofibrous scaffold for bone and skin tissue engineering. *Int J Biol Macromol* 2011;48(4):571-6.
13. Lee JW, Choi YJ, Yong WJ, Pati F, Shim JH, Kang KS, et al. Development of a 3D cell printed construct considering angiogenesis for liver tissue engineering. *Biofabrication* 2016; 8(1):015007.
14. Badhe RV, Bijukumar D, Chejara DR, Mabrouk M, Choonara YE, Kumar P, et al. A composite chitosan-gelatin bi-layered, biomimetic macroporous scaffold for blood vessel tissue engineering. *Carbohydr Polym* 2017;157:1215-25.
15. Isenberg BC, Williams C, Tranquillo RT. Small-diameter artificial arteries engineered in vitro. *Circ Res* 2006;98(1):25-35.
16. Orr AW, Helmke BP, Blackman BR, Schwartz MA. Mechanisms of mechanotransduction. *Dev Cell* 2006;10(1):11-20.
17. Zhao J, Griffin M, Cai J, Shaoxue L, Peter Butler EM, Kalaskar DM. Bioreactors for tissue engineering: an update. *Biochemical Engineering Journal* 2016;109(2016):268-81.
18. Asghari F, Samiei M, Adibkia K, Akbarzadeh A, Davaran S. Biodegradable and biocompatible polymers for tissue engineering application: a review. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2017;45(2):185-92.
19. Yang S, Leong KF, Du Z, Chua CK. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Eng* 2001; 7(6):679-89.
20. Jin G, Prabhakaran MP, Ramakrishna S. Stem cell differentiation to epidermal lineages on electrospun nanofibrous substrates for skin tissue engineering. *Acta Biomater* 2011;7(8): 3113-22.
21. Zhu C, Wang C, Chen R, Ru C. A novel composite and suspended nanofibrous scaffold for skin tissue engineering. *EMBEC & NBC* 2017;65:1-4.
22. Quinlan E, López-Noriega A, Thompson E, Kelly HM, Cryan SA, O'Brien FJ. Development of collagen-hydroxyapatite scaffolds incorporating PLGA and alginate microparticles for the controlled delivery of rhBMP-2 for bone tissue engineering. *J Control Release* 2015;198:71-9.
23. Lam J, Clark EC, Fong EL, Lee EJ, Lu S, Tabata Y, et al. Evaluation of cell-laden polyelectrolyte hydrogels incorporating poly(L-Lysine) for applications in cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 2016;83:332-46.
24. Ahn H, Ju YM, Takahashi H, Williams DF, Yoo JJ, Lee SJ, et al. Engineered small diameter vascular grafts by combining cell sheet engineering and electrospinning technology. *Acta Biomater* 2015;16:14-22.
25. Melchiorri AJ, Bracaglia LG, Kimerer LK, Hibino N, Fisher JP. In vitro endothelialization of biodegradable vascular grafts via endothelial progenitor cell seeding and maturation in a tubular perfusion system bioreactor. *Tissue Eng Part C Methods* 2016;22(7):663-70.
26. Johnson C, Sheshadri P, Ketchum JM, Narayanan LK, Weinberger PM, Shirwaiker RA. In vitro characterization of design and compressive properties of 3D-biofabricated/decellularized hybrid grafts for tracheal tissue engineering. *J Mech Behav Biomed Mater* 2016;59:572-85.
27. Den Hondt M, Vanaudenaerde BM, Maughan EF, Butler CR, Crowley C, Verbeke EK, et al. An optimized non-destructive protocol for testing mechanical properties in decellularized rabbit trachea. *Acta Biomater* 2017;60:291-301.
28. Kuttan JC, McGovern D, Hobson CM, Luffy SA, Nieponice A, Tobita K, et al. Decellularized tracheal extracellular matrix supports epithelial migration, differentiation, and function. *Tissue Eng Part A* 2015;21(1-2):75-84.
29. Zhang L, Guan Z, Ye JS, Yin YF, Stoltz JF, de Isla N. Research progress in liver tissue engineering. 2017;28(s1):S113-S9.
30. Nicolas CT, Hickey RD, Chen HS, Mao SA, Lopera Higuera M, Wang Y, et al. Concise review: liver regenerative medicine: from hepatocyte transplantation to bioartificial livers and bioengineered grafts. *Stem Cells* 2017;35(1):42-50.