

## Kardiyovasküler doku mühendisliği: Yaklaşımlar ve klinik öncesi uygulamalar

### Cardiovascular tissue engineering: Approaches and preclinical applications

Yonca Erdal,<sup>1</sup> Umut Doğu Seçkin,<sup>2</sup> Kubilay Doğan Kılıç,<sup>3</sup> Oytun Erbaş<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kök Hücre Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

<sup>2</sup>Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

<sup>3</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

<sup>4</sup>Bilim Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

#### ÖZ

Günümüzde, kardiyovasküler hastalıklar yetişkinlerde mortalitenin yüksek olduğu ölüm nedenlerinin başında gelmektedir. Kardiyovasküler hastalıkların tedavisi donör eksikliği, immün tolerans gibi etmenlerden dolayı sınırlanmaktadır. Bu açıdan, kişiye özgü tedavi yöntemleri üzerine çalışmalar hızla sürmektedir. Biyomalzeme bilimindeki gelişmeler ve mevcut hücre çalışmaları ile yapılan uygulamalar ile doku mühendisliği çalışmaları gün geçtikçe hız kazanmaktadır. Doku hasar tedavilerinde doku mühendisliği yaklaşımı ile kardiyovasküler uygulamalar da klinik uygulamalar açısından öncüllük etmektedir. Bu derlemede, tedaviye yönelik çalışmaları devam eden kardiyomyosit ve kalp kapakçıkları modellerinde doku uygulamaları ve klinik öncesi çalışmaları anlatılmıştır.

**Anahtar sözcükler:** Kardiyomyosit; kardiyovasküler doku mühendisliği; kardiyovasküler doku; kalp kapakçıkları.

#### ABSTRACT

Currently, cardiovascular diseases are among the most common causes of death in adults, with high mortality rates. The treatment of cardiovascular diseases is limited by factors such as donor deficiency and immunological tolerance. On the face of it, studies on person-specific treatment methods are rapidly taking place. Tissue engineering studies are accelerating with the developments in biomaterials science and existing cell studies and applications. Tissue engineering approach in tissue damage treatment and cardiovascular applications also pioneer in terms of clinical applications. In this review, we explain, ongoing tissue applications and preclinical studies in cardiomyocyte and heart valve models treatment are described.

**Keywords:** Cardiomyocyte; cardiovascular tissue engineering; cardiovascular tissue; heart valves.

## KARDİYOVASKÜLER DOKU MÜHENDİSLİĞİ

Doku mühendisliğinin amacı, hasar görmüş veya işlevini kaybetmiş doku/organ yapılarının geometrisine özgü yeni doku iskeleleri üreterek vücuda uyumlu ve doku/organın işlevini yerine getirebilecek yapay doku oluşturmaktır.<sup>[1,2]</sup> Kardiyovasküler fizyoloji açısından kardiyovasküler doku mühendisliği, başlangıçtan beri uygulama ve tedavi açısından doku mühendisliği çalışmaları alanında öncelikli hedeflerden olmuştur.

Günümüzde, kardiyovasküler hastalıklar genel ölüm nedenlerinin %20'sini oluşturur iken ve ABD'deki erişkinlerde en sık rastlanan ölüm nedenidir.<sup>[3]</sup> Bu açıdan kardiyovasküler tedavi için önemli adımlar atılmış olmakla birlikte, protez implantlarının kullanılmasını gerektiren cerrahi müdahale birçok yetişkin hastada kritik olmaya devam etmektedir. Buna rağmen, kalp nakli, son dönem kalp yetmezliği için tek ve kesin tedavi olmaya devam etmektedir. Buna ek olarak, doğuştan kalp anomalileri, yenidoğan döneminde önde gelen ölüm nedenidir ve bu hasta nüfusunda

genellikle cerrahi müdahale tek çözüm olarak görülmektedir.<sup>[4]</sup> Günümüzde kullanılan protez biyomalzemelerinde, kalsifik bozunma, enfeksiyon, rejeksiyon, zayıf dayanıklılık ve somatik aşırı büyüme gibi sorunlarla karşılaşabilmektedir.

Kardiyovasküler doku çalışmaları, büyüme kapasitesine sahip bir immünojenik olmayan ve fonksiyonel olarak doku ve organ çalışmasını destekleyen yapıların oluşturulmasını hedeflemektedir. Halen kullanılan protezlere göre açık avantajları, doğuştan kalp anomalilerinin onarımı, kapak veya iskemik kalp hastalığının tedavisi için doku mühendisliği uygulamaları ile yapılmış kapakçıklar, damarlar ve miyokard yamalarındaki gelişmelere doğru önemli bir ilerleme göstermiştir.<sup>[5]</sup> Başarılı mühendislik dokusu, üç temel bileşenleri içeren tasarım kriterlerine dayanır:

1. Doku büyümesi için üç boyutlu bir geometriyi sağlayan bir doku iskelesi,
2. İskele üzerinde ekilmiş veya kültürü yapılmış hücre hattı,
3. Doku oluşumunu yönlendiren ve yeniden şekillendirmeye olanak sağlayan biyolojik ve mekanik sinyallerdir.<sup>[6]</sup>

Otolog doku oluşturmak için öncelikle biyotasarım stratejileri, doku mühendisliği implantlarının uygulama potansiyeli kadar çeşitlidir ve bu nedenle tek bir tartışmada ele alınması zordur. Bu nedenle kardiyovasküler doku mühendisliği uygulama alanı, Kardiyomiyosit uygulaması, kan damarları ve kalp kapakçıkları uygulamaları açısından ele alınmaktadır.

## KARDİYOVASKÜLER DOKU MÜHENDİSLİĞİ AÇISINDAN KARDİYOMİYOSİTLER

Kardiyomiyositler doğumdan sonra yeniden oluşmaz ve hücre hiperplazisi yerine hücre hipertrofisi ile mitotik sinyallere yanıt verirler.<sup>[7]</sup> Kardiyomiyosit kaybı bölgesel kontraktıl işlev bozukluğuna yol açar ve enfarktüsli ventriküler dokulardaki nekrotize uğrar ve kardiyomiyositler yara dokularını oluşturmak için fibroblastlarla yer değiştirir. Yakın tarihli bir araştırma, nakledilmiş fetal kardiyomiyositlerin, kalp skar dokusunda hayatta kalabileceğini ve bu nakledilen hücrelerin skar genişlemesini sınırladığını ve kalp yetmezliğini önlediğini göstermiştir.<sup>[8]</sup> Hücre

kültürü ile kardiyomiyositlerin hasar görmüş miyokardlara doku nakli, kalp yetmezliği tedavisinde gelecekte uygulanabilecek bir yöntem olarak görülmektedir.<sup>[9,10]</sup> Bununla birlikte, bu yenilikçi uygulama alanının klinik ortamda uygulanabilirliği halen tartışma aşamasındadır çünkü donör fetal kalp dokusunun elde edilmesi halen zorluklar içermektedir. Doku mühendisliği yaklaşımları ile kardiyomiyojenik hücre hattı potansiyel olarak fetal kardiyomiyositlerin yerini alabilir.

Yakın tarihli yapılan çalışmalarda, yetişkin dokulardan elde edilen pluripotent kök hücrelerin, farklılaşma potansiyellerinin varlığı gösterilmiştir. Roy ve ark.,<sup>[11]</sup> *in vitro* nöronlar, oligodendrositler ve astrositler için ayırt edebilen beyindeki nöral kök hücrelerin varlığını bildirmiş ve kemik iliği hücrelerinin mezenkimal kök hücrelerin birçok özelliğine sahip oldukları göstermişlerdir.<sup>[12]</sup>

Pluripotent öncü kemik iliği stromal hücreleri, kemik,<sup>[13,14]</sup> kas,<sup>[15]</sup> yağ,<sup>[16]</sup> tendon ve kıkırdak<sup>[17]</sup> gibi çeşitli hücre tiplerine ayrılabilir. Kemik iliği stromal hücrelerinin, farklılaşmasını düzenleyen bazı genlerin ekspresyonunu değiştirebilen bir sitozin analogu olan 5-azasitidine maruz bırakıldıktan sonra kendiliğinden farklılaşması sonucu kardiyomiyositlere farklılaşabileceği hipotezi verilmiştir.<sup>[18]</sup>

Yakın tarihte Supokawej ve ark.nın<sup>[19]</sup> yaptıkları bir çalışmada, mezenkimal kök hücreler farklı konsantrasyonlarda 5-Azasitidine maruz bırakılmış, immünofloresans yöntemi ile elde edilen bulgularda, mezenkimal kalp dokusuna özgül belirteçler olan GATA4 ve troponin T boyamaları gösterilmiştir. Buna ek olarak çizgili kasa özgül belirteçler olan MyoD ve miyojenin belirteçleri görülmüştür. Elde edilen immünofloresan boyamalar paralelinde yapılan gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu sonuçlarına göre kalp ve çizgili kasa özgül mRNA'ların sekanslanması tespit edilmiştir.

Yapılan bu çalışmalar daha çok nakil ön çalışmaları olarak görülebilir ve nakil öncesi *in vitro* ve *in vivo* denemelerinin önemine değinilmektedir.

## KALP KAPAKÇIKLARI VE NAKİL ÇALIŞMALARI

Kalp kapakları, kalpte bulunan ve kalpten tek yönlü kan akışını sağlayan özelleşmiş yapılardır. Kalp kapakları yılda yaklaşık 40 milyon

kez ve yaklaşık  $3 \times 10^9$  defa açılıp kapanır.<sup>[20]</sup> Kalp kapakları mutlaka uzun yıllar boyunca mekanik gerilmelere karşı yeterli güce ve dayanıklılığa sahip olmalıdır. Kalp kapaklarının çoğu kusursuz bir mimariye sahiptir. Kapakların kanla temas eden yüzeylerinde endotel hücreleri, daha derin katmanlarda ise interstisyel hücreler, valvüler ekstraselüler matriks ise kollajen, elastin, amorf hücre dışı matriks yapıları içerir.<sup>[21]</sup> Valvüler ekstraselüler matriksin en önemli birleşeni glikozaminoglyanlardır.<sup>[22]</sup> Kapakçıkların kapanış fazında meydana gelen basınç yaklaşık olarak 80 mmHg'dir. Bu esnada geri akış sızıntılarının önlenmesi için kapak başları kendilerini uzatır. Bu mekanizmada en büyük stres yaşayan yapı kollajen olur. Kollajen bu yüksek basınca oldukça dayanıklıdır ve kalbin en önemli bileşenidir.<sup>[23]</sup>

Günümüzde işlevini yerine getiremeyen kalp kapakçıklarının mekanik ve yapay doku kapakçıkları ile değiştirilmesi cerrahi olarak mümkün olup birçok hastada yaşam şansını ve yaşam kalitesini artırmaktadır. Fakat daha komplike cerrahilerde küçük damar çaplarına ihtiyaç duyulur ve bunların piyasada bulunması oldukça zordur. Bu tarz sıkıntılara ek olarak kalp kapakçıklarının değiştirilmesi için çeşitli cihazlar kullanılmaktadır ve bu cihazların morbidite ve mortalite açısından önemli riskleri vardır.<sup>[24]</sup> En yaygın nakledilen üç kapak tipi vardır. Bunlar; mekanik kapaklar (MV), biyoprostetik kalp kapakları (BHV) ve kriyoprezervasyonlu hemogreft kapakları (CHV)'dir.<sup>[25]</sup> Mekanik kapakçıklar trombojenik olup kapak tromboz ve trombotik materyalin embolizasyon riskini azaltır fakat bunun için öbür boyu anti-koagülasyona ihtiyaç duyarlar. Özellikle bu kapaklar enfeksiyona karşı duyarlıdır ve enfeksiyonun yok edilmesi oldukça zordur.<sup>[26]</sup> Biyoprostetik kalp kapakçıklarında ise en sık karşılaşılan sorunlar ise yaprakçık yırtılması veya yaprakçık mineralizasyonudur. Dejenere kapakların çoğunda kalsifikasyon ve yaprak kusurları bulunmaktadır. Bunlara ek olarak bazı hastalara nakledilen bu kapakçıklarda kalsifikasyon göstermeksizin de bozulma meydana gelmiştir. Buna benzer sorunlar kriyoprezervasyonlu hemogreft kapaklarda da görülmüştür.<sup>[27,28]</sup>

Doku mühendisliği yaklaşımları kalp kapakçık üretimi için de cazip hale gelmektedir. Biyomekanik olarak uygun, dayanıklı, elastik kalp kapakçıklarının üretiminde doku iskeleleri de göz önüne bulundurulmaktadır. Yukarıda bahsedilen kapakların enfeksiyon, yenilenme, onarım sürelerinde deza-

vantajlar olduğu için daha dayanıklı ve ömürleri daha uzun olan kapakların üretilmesine gerek duyulmaktadır.<sup>[29]</sup> Bu sorunları göz önünde bulunduran Lee ve ark.<sup>[30]</sup> heterotropik kalp kapak nakli modeli geliştirmiş kalp kapakçığı donörü olarak fareleri kullanarak deneyler gerçekleştirmişlerdir. Pulmoner kapakçık çıkartılan kalbe implante edilmiş ve bu heterotropik kalp başka bir fareye nakledilmiştir. Donör fare gözlemlendiğinde kalp atışlarının ve kan akışının normal olduğu görülmüştür. Yüksek frekanslı Doppler kullanarak kan akışı gözlemlenmiş, implante edilen kapakçık minimal seviyede regürjitasyon göstermiş ve akış piki 100 mm/sn olarak tespit edilmiştir. Bu çalışma farklı fizyolojik akış koşulları, deselülerize kapakçık implantasyonları gibi birçok kombinasyon ile daha geniş nakil modellerin çıkartılmasına ve prelinik kullanımlara ışık tutmuştur. Bir başka çalışmada ise, fibroblast ve endotel hücreleri kullanılarak sentetik poliglikolik asit fiber matriksi üreterek kuzular için kalp kapakçık yaprakları geliştirilmiştir. Koyun arterleri kullanarak endotel ve fibroblast hücre popülasyonları izole edilmiş ve fibroblast hücreleri üretilen sentetik iskele üzerine ekilmiş ardından bunun üzerine tek katmanlı olacak şekilde endotel hücreleri ekilmiştir. Üretilen bu yapılar yedi hayvana nakledilmiştir. Bu hayvanlardan üçü otolog kaynaklı dördü ise allojenik olacak şekilde kullanılmıştır. Her hayvandan var olan pulmoner kapakçıkları rezeke edilmiş ve sentetik olan mühendislik ürünü kapakçık implante edilmiştir. Bu deneyin sonunda ölüm ve her iki türde de pulmoner yetersizlik veya darlık gözlenmemiştir. Kollajen analizler sonucunda hücre dışı matriksin geliştiği gözlemlenmiş ve histolojik değerlendirmeler sonucunda hücre mimarisinde sorun saptanmamıştır. Kalp kapakçık yapraklarının üretilmesinde ve başarılı bir şekilde kullanılmasında doku mühendisliği ürünlerinin kullanılabilmesi gösterilmiştir. Aynı zamanda bu ön çalışmaya göre otogreft dokusunun allogreft dokuya kıyasla daha üstün olduğu bildirilmiştir.<sup>[31]</sup> Literatürde başka bir *in vivo* çalışmaya göz atıldığında ise triküspit kapakçık modeli çalışıldığı görülmüştür. Bu çalışmada triküspit kapakçık modeli ekstraselüler hücre matriksi kullanılarak üretilmiş ve kapağın mekanik işlevselliğini gözlemleyebilmek adına koyun modelinde denenmiştir. Kullanılan dört koyundan var olan triküspit kapakçıkları eksize edilmiş ve ekstraselüler hücre dışı matriksinden üretilen biyoiskele kalitesinde yapılmış biyokapakçıklar implante edilmiştir. *İn vivo* fonksiyon

testleri, ekokardiyografi ve histopatolojik analizler ile implante edilen kapakçıkların durumu 12 ay boyunca gözlemlenmiş ve herhangi bir kayıp yaşanmamıştır. Testler sonucunda nakledilen kapakçıklarda önemli sorunlar tespit edilmemiştir. Aksine kapakçıkların hareketleri, yaprakçıkların morfolojik yapıları normal gözlemlenmiştir. Önemszenmeyecek miktarda regürjitasyon tespit edilmiştir. Üçüncü ayın sonunda ekstraselüler matriks bileşeni olan elastin oluşumları gözlemlenmiş, beşinci ayın sonunda ise kollajen organizasyonu ve glikozaminoglikanların varlığı tespit edilmiştir.<sup>[32]</sup> Bu çalışma ile doku yenilenmesi ve biyomekanik olarak sağlıklı bir triküspit replasmanı gösterilmiştir.

Bu çalışmalar kalp kapakçık nakillerinde başarılı ilerlemeler kaydettiğimizin göstergesi olup, klinik çalışmalar için daha fazla mühendislik ürünlerinin üretilmesi konusundaki önemi de ortaya koymaktadır.

#### Çıkar çakışması beyanı

Yazarlar bu yazının hazırlanması ve yayınlanması aşamasında herhangi bir çıkar çakışması olmadığını beyan etmişlerdir.

#### Finansman

Yazarlar bu yazının araştırma ve yazarlık sürecinde herhangi bir finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

## KAYNAKLAR

- Şenköylü A, Korkusuz F. Kıkırdak onarımında doku mühendisliği uygulamaları. *TOTBİD Dergisi*. 2004;3:3-4.
- Ölçek-Buzkıran B. Veri zarflama analizi ile türkiye'de organ nakli merkezlerinin performans kıyaslaması. [Yüksek Lisans Tezi] Antalya: Akdeniz Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Ekonometri Anabilim Dalı; 2012.
- Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, et al. Heart disease and stroke statistics--2015 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2015;131:e29-322.
- Sawa Y, Miyagawa S, Sakaguchi T, Fujita T, Matsuyama A, Saito A, et al. Tissue engineered myoblast sheets improved cardiac function sufficiently to discontinue LVAS in a patient with DCM: report of a case. *Surg Today* 2012;42:181-4.
- Wystrychowski W, Cierpka L, Zagalski K, Garrido S, Dusserre N, Radochonski S, et al. Case study: first implantation of a frozen, devitalized tissue-engineered vascular graft for urgent hemodialysis access. *J Vasc Access* 2011;12:67-70.
- Cleary MA, Geiger E, Grady C, Best C, Naito Y, Breuer C. Vascular tissue engineering: the next generation. *Trends Mol Med* 2012;18:394-404.
- Pan J, Fukuda K, Saito M, Matsuzaki J, Kodama H, Sano M, et al. Mechanical stretch activates the JAK/STAT pathway in rat cardiomyocytes. *Circ Res* 1999;84:1127-36.
- Leor J, Patterson M, Quinones MJ, Kedes LH, Kloner RA. Transplantation of fetal myocardial tissue into the infarcted myocardium of rat. A potential method for repair of infarcted myocardium? *Circulation* 1996;94:332-6.
- Soonpaa MH, Koh GY, Klug MG, Field LJ. Formation of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium. *Science* 1994;264:98-101.
- Delcarpio JB, Claycomb WC. Cardiomyocyte transfer into the mammalian heart. Cell-to-cell interactions in vivo and in vitro. *Ann N Y Acad Sci* 1995;752:267-85.
- Roy NS, Wang S, Jiang L, Kang J, Benraiss A, Harrison-Restelli C, et al. In vitro neurogenesis by progenitor cells isolated from the adult human hippocampus. *Nat Med* 2000;6:271-7.
- Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997;276:71-4.
- Rickard DJ, Sullivan TA, Shenker BJ, Leboy PS, Kazhdan I. Induction of rapid osteoblast differentiation in rat bone marrow stromal cell cultures by dexamethasone and BMP-2. *Dev Biol* 1994;161:218-28.
- Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet* 1987;20:263-72.
- Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998;279:1528-30.
- Umezawa A, Maruyama T, Segawa K, Shaddock RK, Waheed A, Hata J. Multipotent marrow stromal cell line is able to induce hematopoiesis in vivo. *J Cell Physiol* 1992;151:197-205.
- Ashton BA, Allen TD, Howlett CR, Eaglesom CC, Hattori A, Owen M. Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *Clin Orthop Relat Res* 1980;151:294-307.
- Wang HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM, Guo YJ, et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells* 2004;22:1330-7.
- Supokawej A, Kheolamai P, Nartprayut K, U-Pratya Y, Manochantr S, Chayosumrit M, et al. Cardiogenic and myogenic gene expression in mesenchymal stem cells after 5-azacytidine treatment. *Turk J Haematol* 2013;30:115-21.
- Sacks MS, Schoen FJ, Mayer JE. Bioengineering challenges for heart valve tissue engineering. *Annu Rev Biomed Eng* 2009;11:289-313.

21. Schoen FJ. Evolving concepts of cardiac valve dynamics: the continuum of development, functional structure, pathobiology, and tissue engineering. *Circulation* 2008;118:1864-80.
22. Marron K, Yacoub MH, Polak JM, Sheppard MN, Fagan D, Whitehead BF, et al. Innervation of human atrioventricular and arterial valves. *Circulation* 1996;94:368-75.
23. Schoen FJ. Aortic valve structure-function correlations: role of elastic fibers no longer a stretch of the imagination. *J Heart Valve Dis* 1997;6:1-6.
24. Vesely I. Heart valve tissue engineering. *Circ Res* 2005;97:743-55.
25. Elkins RC. Is tissue-engineered heart valve replacement clinically applicable? *Curr Cardiol Rep* 2003;5:125-8.
26. Hammermeister KE, Sethi GK, Henderson WG, Oprian C, Kim T, Rahimtoola S. A comparison of outcomes in men 11 years after heart-valve replacement with a mechanical valve or bioprosthesis. *Veterans Affairs Cooperative Study on Valvular Heart Disease. N Engl J Med* 1993;328:1289-96.
27. Sacks MS, Schoen FJ. Collagen fiber disruption occurs independent of calcification in clinically explanted bioprosthetic heart valves. *J Biomed Mater Res* 2002;62:359-71.
28. Vesely I, Barber JE, Ratliff NB. Tissue damage and calcification may be independent mechanisms of bioprosthetic heart valve failure. *J Heart Valve Dis* 2001;10:471-7.
29. Breuer CK, Mettler BA, Anthony T, Sales VL, Schoen FJ, Mayer JE. Application of tissue-engineering principles toward the development of a semilunar heart valve substitute. *Tissue Eng* 2004;10:1725-36.
30. Lee YU, Yi T, James I, Tara S, Stuber AJ, Shah KV, et al. Transplantation of pulmonary valve using a mouse model of heterotopic heart transplantation. *J Vis Exp* 2014;89.
31. Shinoka T, Breuer CK, Tanel RE, Zund G, Miura T, Ma PX, et al. Tissue engineering heart valves: valve leaflet replacement study in a lamb model. *Ann Thorac Surg* 1995;60:513-6.
32. Fallon AM, Goodchild TT, Cox JL, Matheny RG. In vivo remodeling potential of a novel bioprosthetic tricuspid valve in an ovine model. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2014;148:333-40.