

# Üç Boyutlu Hücre Kültürü İçin Polimer Esaslı Ekstrasellüler Matriks Mimetiği

## Polymer Based Extracellular Matrix Mimetics For 3D Cell Culture

Esra Türker<sup>1</sup>, Ümit Hakan Yıldız<sup>2</sup>, Ahu Arslan Yıldız<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Biyomühendislik Bölümü, <sup>2</sup> Kimya Bölümü, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, İzmir, Türkiye  
{esraturker, ahuarslan, hakanyildiz}@iyte.edu.tr

**Özetçe**—Elektro-eğime metodu gelişmiş üretim teknolojilerindedir ve biyomedikal uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle doku mühendisliğinde amaç, çalışılacak doku üzerine doğal veya sentetik destek materyali (iskele) üreterek hücrenin uyum sağlayabileceği bir ortam oluşturmaktır. Bu projenin amacı üç boyutlu (3D) hücre kültürü çalışmaları için elektro-eğirme-metodu ile poli(L-laktik-co-epsilon-kaprolakton) (PLLCL) kullanılarak iskele üretilmesidir. Homojen lifler ve uygun gözenek boyutu elde etmek amacıyla optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen liflerin çapı, akış hızı ve voltajın artmasıyla azalmaktadır. Taramalı uç elektron mikroskop incelemeleri (SEM) lif morfolojik yapılarının doku iskelesi fabrikasyonu için ideale yakın olduğunu ortaya çıkarmıştır.

**Anahtar Kelimeler**—Doku mühendisliği, 3D hücre kültürü, Ekstrasellüler Matriks, Elektro-eğirme

**Abstract**—Electrospinning method is one of the advanced manufacturing technologies that widely used in biomedical applications. Especially the aim of tissue engineering is to fabricate naturally or synthetic support material (scaffold) for a tissue which is studied to provide suitable environment for cells. The aim of the project is producing poly (L-lactide-co-epsilon-caprolactone) (PLLCL) nanofibers as a scaffold by using electrospinning method in order to three dimensional (3D) cell cultures studies. Optimization studies were made in order to obtain homogeneous fibers and suitable pore size. The obtained fibers diameter decreases by increasing flow rate and voltage. By scanning electron microscopy (SEM) morphological structures of fibers examined that exhibiting nearly perfect conditions for scaffold.

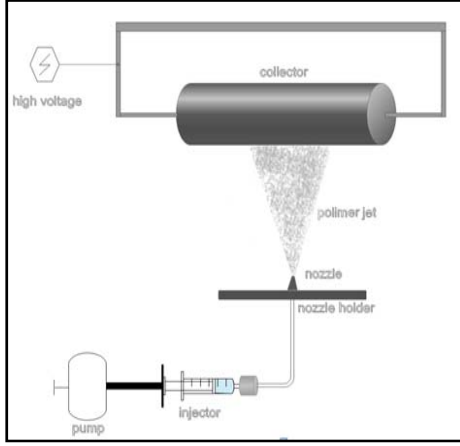
**Keywords**—Tissue Engineering, 3D Cell Culture, Extracellular Matrix, Electrospinning

### I. GİRİŞ

Doku mühendisliğinde destek materyalinin (iskele) tasarım prensibi, uygun mekanik ve biyolojik özelliklere sahip doğal ekstrasellüler matriks (ECM) yapısı ve biyolojik fonksiyonunu taklit etmektir. Nanolif iskeleleri ECM' in geometrisi, hücre yapışması ve çoğalması gibi özelliklerini yansıtabilecek şekilde tasarlanmıştır. Günümüzde faz ayrımı, kendiliğinden düzenlenme (self assembly), elektro-eğirme gibi birçok teknik polimer nanolif üretimi yapmaktadır. Bunların arasında elektro-eğirme tekniği kolay, ekonomik ve çeşitli polimer çözeltilerinden iskele yapı üretimi yapılabilmektedir [1]. Ayrıca, üretilen polimer lif çapları yüz nanometreden az ya da birkaç mikrometre arasında değişebilmektedir [2]. Elde edilen yapay iskeleler sadece ECM yapısını taklit etmiyor aynı zamanda yüksek yüzey-hacim oranı, yüksek gözeneklilik ve gözeneklerin birbirine bağlanmasını sağlayarak hücre büyümesi ve çoğalmasını desteklemektedir [1]. Geleneksel elektro-eğirme sistemlerinde uygulanan polimeri zayıflatma amacıyla hava ya da mekanik basınç ve gerilme kuvveti uygulamak yerine şırınga ucu ile metal toplak arasına yüksek voltaj uygulanarak elektrostatik alan oluşturulur ve farklı görünüme sahip nanolifler elde edilir (Şekil 1). Üretilen liflerin, nano ölçekli çapı ve dokunmamış ağ yapısı ECM' in supramoleküler özelliklerine benzemektedir. Bunun nedeni ise ECM' deki bazal membran yapısının nano ölçek boyutunda bulunan lifler, gözenekler, sırtlar ve oluklardan oluşmasıdır [2].

Doku mühendisliği uygulamalarında doğal ve sentetik olmak üzere farklı özelliklerde biyomalzemeler kullanılmaktadır [3]. Sentetik malzemeler yaygın olarak medikal uygulamalarda dikiş, ortopedi, ilaç aktarma sistemi (drug delivery) ve doku mühendisliği alanında ise iskele

yapımında kullanılmaktadır. Poliglikolid (PGA), polilaktik (PLA), poli ( $\epsilon$ -kaprolakton) (PCL) ve kopolimerleri sentetik malzemelere örnek verilebilir [4]. Doğal biyomalzemeler ise doğal ECM yapısında bulunan protein ve polisakaritler olabilmektedir [3].



Şekil 1. Elektro-eğirme tekniğinin şematik gösterimi

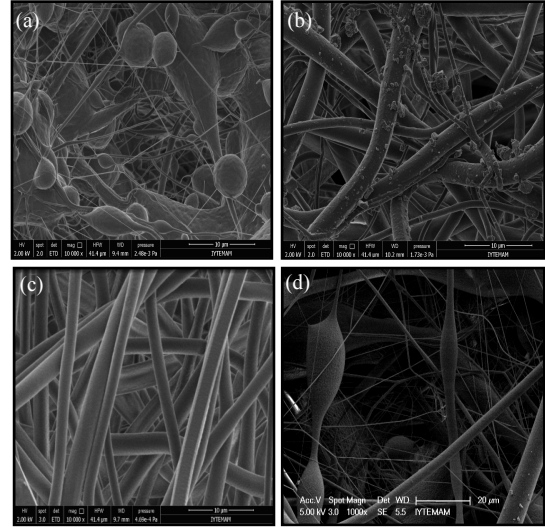
Doku mühendisliğinde iskele yapısının uygun mekanik kararlılık, bozunurluk oranı, özel hücre büyümeleri ve farklılaşması için hücre uygunluğuna ihtiyaç duyulmaktadır [4].

Sentetik biyobozunur poliesterler, özellikle poli (L-laktik) (PLLA) ve poli ( $\epsilon$ -kaprolakton) (PCL) biyobozunurluk, biyoyumluluk ve minimum doku reaksiyonu göstermesi gibi özellikleri nedeniyle birçok çalışmada yaygın olarak kullanılmaktadır. PLLA kırılkan, PCL ise elastik özellik göstermektedir. Bu nedenle PLLA ve PCL kopolimerizasyon yapılması sonucunda poly (L-laktik-co- $\epsilon$ -kaprolakton) (PLLCL) elde edilerek fiziksel ve biyobozunurluk özelliği polimerlerin tek başına gösterdikleri özelliklere kıyasla iyileştiği gözlemlenmiştir [5].

Bu çalışmada sentetik polimer modeli olarak poli (L-laktik-ko- $\epsilon$ -kaprolakton) (PLLCL) kullanılmıştır. İlk aşamada elektro-eğirme yöntemi ile lif üretimi yapılarak uygun lif çapı, homojen lif yapısı ve uygun gözenek boyutu ayarlamak amacıyla optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. İkinci aşamada ise PLLCL 'un biyobozunurluk özellikleri incelenecektir. Ayrıca 3D hücre kültürü çalışmaları yapılacaktır.

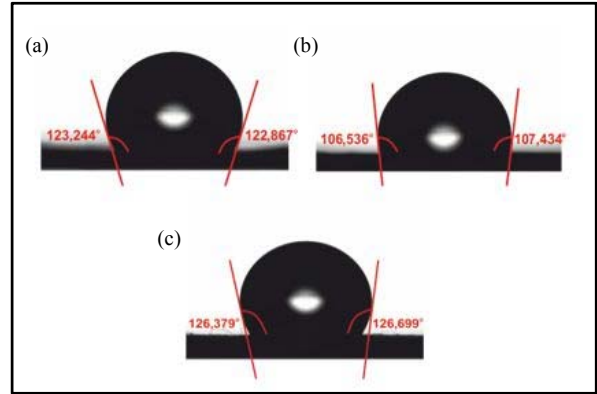
## II. SONUÇLAR

Elektro-eğirme işlemi için PLLCL farklı konsantrasyonlar da hazırlanarak uygun parametre bulma çalışmaları yapılmıştır. Başlangıçta kütlece 15%, 17%, 18% ve 20% PLLCL çözeltileri farklı oranda çözücülerle (diklorometan (DCM), dimetilformamid (DMF)) hazırlanmıştır (Şekil 2). Her konsantrasyon için jet oluşumu farklı parametrelerde



Şekil 2. PLLCL 'a ait SEM mikrograf görüntüleri. (a) 15% wt, (b) 17% wt, (c) 18%wt, (d) 20% wt.

gözlenmiştir. Akış hızı, voltaj, şırınga ucu ile toplaç arasındaki mesafe, ortam sıcaklığı vb. parametrelere bağlı olarak jet oluşumu değişebilmektedir. Kütlece 15% ve 17% olan çözeltilerde tane (elongated bead) oluşumu gözlenirken, 18% ve 20% ' lik çözeltilerde gözlenmemiştir. Konsantrasyonun artması ve çözücü türü ve miktarına bağlı olarak değişmesi tane oluşumunu azaltarak daha düzgün lif oluşumunu sağlamıştır. Sonuç olarak 18% (w/w) PLLCL ' un çözeltilisinin 5mL/h akış hızında, 27 kV voltaj uygulanması durumunda düzenli jet oluşumu gözlemlenmiştir.



Şekil 3. 18% PLLCL ' un farklı elektro-eğirme parametrelerine bağlı hava su temas açısı gösterimi, (a) 5 ml/h 27kV, (b) 5 ml/h 23kV, (c) 4 ml/h 27kV

Şekil 3 'de elektro-eğirme parametrelerine bağlı olarak hava-su temas açısı değişimi incelenerek yüzey ıslanabilirliği tespit edilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda temas açısının yaklaşık 90° büyük olması, lifin hidrofobik yapıda olduğunu göstermektedir. Diğer basamaklarda ise, PLLCL ' un biyobozunurluk, gözeneklere mikrotane nüfuz ederek çap çalışmaları yapılacak olup aynı zamanda

biyomimetik malzemeler kullanılarak doğal ECM yapısına benzer iskele yapı üretilip 3D hücre kültürü çalışmaları yapılacaktır.

### III. TEŞEKKÜR

İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Malzeme Araştırma Merkezi'ne analizlerime yardımcı oldukları için teşekkür ederiz. Bu proje Bilimsel Araştırma Proje Fonu (İYTE BAP 2015-05) tarafından desteklenmiştir.

### KAYNAKÇA

- [1] Z. Fang, W. Fu, Z. Dong, X. Zhang, B. Gao, D. Guo, H. He, and Y. Wang, "Preparation and biocompatibility of electrospun poly(l-lactide-co-ε-caprolactone)/fibrinogen blended nanofibrous scaffolds," *Applied Surface Science*, vol. 257, no. 9, pp. 4133-4138, 2011.
- [2] S. Chung, A. K. Moghe, G. A. Montero, S. H. Kim, and M. W. King, "Nanofibrous scaffolds electrospun from elastomeric biodegradable poly(L-lactide-co-epsilon-caprolactone) copolymer," *Biomed Mater*, vol. 4, no. 1, pp. 015019, Feb, 2009.
- [3] A. Salerno, and C. D. Pascual, "Bio-based polymers, supercritical fluids and tissue engineering," *Process Biochemistry*, vol. 50, no. 5, pp. 826-838, 2015.
- [4] S. I. Jeong, B.-S. Kim, Y. M. Lee, K. J. Ihn, S. H. Kim, and Y. H. Kim, "Morphology of elastic poly (L-lactide-co-ε-caprolactone) copolymers and in vitro and in vivo degradation behavior of their scaffolds," *Biomacromolecules*, vol. 5, no. 4, pp. 1303-1309, 2004.
- [5] B. Thapsukhon, D. Daranarong, P. Meepowpan, N. Suree, R. Molloy, K. Inthanon, W. Wongkham, and W. Punyodom, "Effect of topology of poly(L-lactide-co-epsilon-caprolactone) scaffolds on the response of cultured human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells and neuroblastoma cell lines," *J Biomater Sci Polym Ed*, vol. 25, no. 10, pp. 1028-44, Jul, 2014.