

HİBRİT KİTOSAN/PCL DOKU İSKELELERİNİN ELEKTRO-EĞİRME TEKNİĞİ ile ÜRETİMİ ve HÜCRE KÜLTÜRÜ UYGULAMALARI

Yrd. Doç Dr. Hilal Türkoğlu Şaşmazel
Atılım Üniversitesi
Malzeme Mühendisliği Bölümü Öğretim Üyesi

Doku mühendisliği, hücrelerin, *doku iskelelerinin* ve büyüme faktörlerinin tek başına veya birlikte kullanımıyla dokuların onarımını ya da yenilenmesini amaçlayan; bu amaca ulaşmak için biyoloji, kimya ve mühendislik prensiplerini kullanan oldukça yeni bir alandır [1]. Doğal ECM (extracellular matrix=hücre dışı matris), hücreleri bir doku oluşturmak üzere bir araya getirir, doku yapısını kontrol eder ve hücre fenotipini düzenler [2]. Doku mühendisliğinde yapay ECM'ler olarak görev yapan *doku iskeleleri* ise hücrelerin ve/veya biyoaktif faktörlerin vücutta istenilen bölgelerde lokalizasyonunu ya da taşınımını sağlar. In vivo (vücut içi) güçlere karşı mekanik destek vererek doku büyümesi süresince önceden belirlenmiş yapının sürdürülmesine katkıda bulunur [3,4]. Söz konusu doku iskelelerinin tasarımında en önemli kriter malzemenin seçimidir. Malzeme öncelikle biyoyumlu olmalıdır, yani vücuda yerleştirildiğinde istenmeyen doku tepkilerine yol açmamalıdır ve aynı zamanda hücre yapışmasını ve fonksiyonunu artırıcı yüzey kimyasına sahip olmalıdır. Biyobozunurluk da istenilen bir diğer özelliktir. Fakat malzeme bozunurken, biyoyumluluğunu kaybetmemeli, toksik ürünler oluşturmamalı ve yeni doku için uygun çevreyi sağlayacak mekanik özelliklere sahip olmalıdır. Ayrıca, hücrelerin ve besinlerin geçişini sağlayacak gözenekli yapıda olmalıdır. Bu özelliklere sahip malzemeler arasında polimerler, seramikler, metaller ve bu malzemelerin bileşimi sayılabilir [5].

Metal, seramik ve polimer gibi biyoyumlu malzemelerin cerrahi implantlar olarak kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır. Metal ve seramikler özellikle ortopedik doku implantları olarak kullanılmaktadırlar. Kullanılan tipik metaller, paslanmaz çelik, kobalt bazlı alaşımlar ve titanyum bazlı alaşımlardır. Seramikler ise alüminyum, zirkonyum, kalsiyum fosfat ve biyocamlardır. Fakat, metaller doku mühendisliği uygulamaları için başlıca iki dezavantaja sahiptir. İlk olarak biyobozunur değildirler ve istenilen formda işlenebilmeleri için yöntemler sınırlıdır. Seramiklerin ise α -trikalsiyum fosfat, β -trikalsiyum fosfat gibi biyobozunur türleri mevcuttur. Ancak metaller için sözü edilen işleme zorlukları seramikler için de geçerlidir. Bu nedenle polimerik malzemeler bilimsel ve tıbbi çalışmalarda artan bir ilgiye maruz kalmışlardır [6].

Doku iskelesi uygulamalarında aljinat, jelatin, nişasta, kollajen, kitin ve kitosan gibi biyobozunur doğal polimerler ve polikaprolakton, polilaktik-ko-glikolik asit, polietilenglikol, polivinilalkol ve poliüretan gibi biyobozunur sentetik polimerler kullanılmaktadır [7]. Doğal polimerler biyoaktif/biyofonksiyonel olmaları, biyolojik ve kimyasal olarak doğal dokulara benzerlikleri nedeniyle tercih edilirler. Fakat, kollajen ve kitin gibi doğal polimerlerden yapılan biyomalzemelerin mekanik dayanımı zayıftır ve genellikle ısıyla eritilemezler ve özel bir çözücüye ihtiyaç duyarlar. Öte yandan doku mühendisliği alanında kullanılan sentetik polimerler doğal kaynaklardan elde edilememesi dezavantajlarına karşılık, kolay proses edilebilmeleri ve doğal polimerlerden farklı olarak kimyasal hidroliz yoluyla bozunabildikleri ve enzimatik proseslerden etkilenmedikleri için bozunma hızlarının hastadan hastaya

değişmemesi gibi avantajlara sahiptir. Doğal polimerlerden doku iskelesi üretimi için sınırlı sayıda üretim tekniği kullanılırken (sulu çözelti içerisinde dondurarak kurutma/çapraz bağlama), sentetik polimerlerden doku iskelesi üretimi için pek çok metot kullanılmaktadır (çözücü döküm, partikül uzaklaştırma, faz ayırımı, elektro-eğirme (electrospinning) tekniği) [8].

Elektro-eğirme tekniği son on yılda doku mühendisliği uygulamaları için mikrometre ya da nanometre boyutunda fiber çapına sahip biyobozunur ve/veya biyoyumlu ipliksi yapıların üretimi için geliştirilmiştir. Polimer çözeltisi başlık/uç kısımda polimer damlacığı oluşacak şekilde kapiler boyunca gönderilir. Uç kısımla topraklanmış toplama bölgesi arasına yüksek voltaj uygulanır. Eğer elektrik alan gerilimi damlacığın yüzey geriliminin üzerindeyse polimer çözelti fıskiyesi toplama bölgesine doğru hızlandırılır. Fıskiye havada yol aldıkça yapıdan çözücü uzaklaşır ve toplama bölgesinde dokunmamış fabrik yapı oluşur. Eğer yönlendirilmiş ve tübüler yapılar hazırlanmak istenirse toplama bölgesi olarak topraklanmış döner silindir kullanılabilir. Kollajen ve fibrinojen gibi doğal makromoleküller ve polikaprolakton, poliglolik asit, polilaktik-ko-glikolik asit ve sentetik polipeptitler gibi sentetik polimerler kullanılarak doku mühendisliği uygulamaları için dokunmamış fibröz yapıları elde etmek mümkündür. Yöntemde proses parametrelerine (uygulanan voltaj, polimer akış hızı, vb.) ve çözelti parametrelerine (polimer konsantrasyonu, çözücünün uçuculuğu vb.) bağlı olarak fiber oryantasyonu (düzenli ve rastgele dizilmiş), gözeneklilik/gözenek çapı (hücre infiltrasyonu) ve fiber çapı (nanometre/mikrometre boyutunda) değiştirilebilmektedir [9].

Doğal polimerler içinde yer alan kitosan (poli[β -(1,4)-2-amino-2-deoksi-D-glukoz]), kitinin kısmi deasetilasyonu sonucu elde edilen lineer bir polisakarittir. Hem kimyasal olarak modifiye edilebilen reaktif amino ve hidroksil grupları içerdiğinden, hem de fiziksel olarak farklı gözenek yapıları için manipüle edilmesinin kolaylığından dolayı doku mühendisliği uygulamaları için yüksek potansiyele sahiptir. Kitosan, kabukluların dış iskeleti ile fungusların hücre çeperinde bulunur ve farklı sayıda rastgele konumlanmış N-asetil-glikozamin ve D-glikozamin kalıntılarından oluşur. Bu nedenle eklem kıkırdağında bulunan glikozaminoglikanlarla ve hiyaluronik asitle benzer karakteristikleri paylaşır. Kitosanın biyolojik olarak yenilenebilir olması; biyobozunur, biyoyumlu, nonantijenik, nontoksik ve biyofonksiyonel özellikleri, bu polimerin ve bu polimer kullanılarak elde edilen komplekslerin yara örtü malzemesi, ilaç dağıtım sistemleri gibi biyomedikal uygulamalarda kullanılmasına olanak sağlamıştır. Kitosan zayıf asitlerde çözülebilmektedir ve bunun sonucunda yüksek yük yoğunluğuna sahip, katyonik bir polimer oluşmaktadır. Bu özelliğinden dolayı kitosan, birçok anyonik polimerle polielektrolit kompleksler oluşturabilmektedir. Vücut içinde lizozim ile parçalanması, makrofajları aktive eden oligomerlerin oluşmasını sağlamaktadır. Parçalanma, dermal dokuların önemli bir bileşeni olan N-asetilglikozaminlerin oluşumunu sağlayarak yara dokusunun iyileşmesine katkıda bulunmaktadır. DNA ile kompleksler oluşturabilme özelliğinden dolayı da viral olmayan gen taşınım araçları olarak kullanılmaktadır. Özellikle osteoyumlu ve osteoindüktif özellikleri nedeniyle kemik doku mühendisliği çalışmalarında tercih edilmektedir. Kitosanın dezavantajları içerisinde en önemlisi zayıf fiziksel özellikleridir. Bu dezavantajının ortadan kaldırılması amacıyla literatürde birçok çalışma yapılmıştır. Özellikle kitosanın diğer polimerlerle ya da seramiklerle kompozitlerinin oluşturulması sıkça kullanılan yaklaşımlar arasında yer almaktadır. Literatürde kollajen/kitosan/heparin kompleksleri, kitosan-

kalsiyum fosfat, kitosan/jelatin/hiyaluronik asit, kitosan kondroitin sülfat kompozitleri gibi yapılarla gerçekleştirilen çalışmalar rapor edilmiştir [10].

Doku iskelesi uygulamalarında kullanılan sentetik polimerler içinde yer alan poli(ϵ -kaprolakton) (PCL), hidrofobik, biyobozunur alifatik bir poliesterdir ve -60°C civarında camı geçiş sıcaklığına ve 60°C 'de erime noktasına sahiptir. PCL genellikle ϵ -kaprolaktonun halka-açılma polimerizasyonu ile hazırlanır. Biyobozunurluk çalışmalarında substrat ve kontrollü ilaç salım sistemlerinde matris olarak kullanılmaktadır. PCL'nin in vivo ortamda bozunması poli(α -hidroksi asit)'den daha yavaş olduğu için 1-2 yıla varan uzun süreli kontrollü salım cihazı olarak kullanımı daha caziptir. PCL'nin ilaç salım sistemleri dışındaki çalışmalarda kullanımı gittikçe yaygınlaşmaktadır. Bunlar arasında doku mühendisliği ile yapay deri üretimi (düz film halinde), üretal stentlerin kaplanması, kas-iskelet doku mühendisliği uygulamaları ve en önemlisi osteoblast ve fibroblast hücre üremesi için destek malzemesi (doku iskelesi) olarak kullanımı sayılabilir. Dondurarak kurutma tekniğiyle üretilen PCL doku iskelelerinin kondrosit hücre kültüründe kullanımı şu an için dikkati çeken doku mühendisliği uygulamaları arasındadır. Son zamanlarda yumuşak doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere elektro-eğirme tekniği ile PCL fiberler üretilmiştir. Isıyla baskılama tekniği ile hazırlanan PCL filmler üzerinde L929 hücre yapışma ve üremesinin çok iyi olduğu gözlemlenmiştir. Literatürde çeşitli araştırmacılar ısıyla baskılama ve partikül uzaklaştırma tekniğiyle gözenekli, mikro/desenli PCL doku iskeleleri hazırlamış ve geliştirdikleri bu doku iskelelerini damar doku mühendisliği uygulamalarında kullanmışlardır [7].

Yard. Doç. Dr. Hilal Türkoğlu Şaşmazel 2009 yılı Türkiye Bilimler Akademisi/Loreal Genç Bilim Kadını (Malzeme Bilimi alanında) Ödülünü aldığı projesinde doku iskelesi üretiminde sıklıkla tercih edilen biyobozunur doğal bir polimer olan kitosan ve biyobozunur sentetik polimer PCL polimerlerinden kitosan/PCI hibrit doku iskeleleri üretimini hedeflemiştir. Kitosanın sahip olduğu avantajlar; ucuz olması, kolay elde edilebilir oluşu (kitinin deasetilasyonu ile elde edilen ve en bol bulunan ikinci doğal polimer), pozitif yüklü oluşu (ECM'de bulunan negatif yüklü glikozaminoglikanlarla etkileşimi sağlar), biyoyumluluğu, anti-mikrobiyal aktivitesi, zayıf asitlerde çözünür oluşu, film ve gözenekli doku iskelesi olarak kolaylıkla proses edilebilmesidir. Fakat mekanik özellikler açısından çok az esnek oluşu ve biyobozunurluk limitleri en önemli dezavantajları arasındadır. Kitosan filmler ıslak halde oldukça kırılıgandır. Diğer yandan PCL, erime sıcaklığının düşük olması nedeniyle kolaylıkla proses edilebilmektedir. Mekanik özellikleri ve enzimatik olmayan bozunurluğu (hidrolizle bozunur) PCL'nin kristalin yapısıyla düzenlenebilir. Fakat PCL, sınırlı biyoaktivitesi, hidrofobik ve yüksüz oluşu, bakteri-aracılığıyla bozunurluğa hassasiyeti gibi dezavantajlara sahiptir. Çalışmada belirlenen hedef doğrultusunda üretilen kitosan/PCL hibrit yapı sayesinde mekanik dayanımı iyi ve biyoyumluluğu/biyoaktivitesi yüksek doku iskeleleri elde edilecektir. Ayrıca üretim tekniği olarak elektro-eğirme tekniği seçilmiş ve bu yöntemle üretilen doğal ECM'e benzer 3-boyutlu (3B), dokunmamış ağ yapılarda yüksek yoğunlukta hücre üremesi/göçü sağlanacağı düşünülmüştür.

REFERANSLAR

- [1] Laurencin CT, Ambrosio AM, Borden MD, Cooper Jr JA, Annual Review of Biomedical Engineering 1, 19-46, 1999.
- [2] Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD, Molecular biology of the cell, Garland, New York, 971-995, 1994.
- [3] Kim BS, Money DJ, Trends in Biotechnology 16, 224-230, 1998.
- [4] Kim BS, Baex CE, Atala A, World Journal of Urology 18, 2-9, 2000.
- [5] Sacholos E, Czernuszka JT, Eur. Cell. Mater. 5, 29-40, 2003.
- [6] Shoufeng Y, Kah-Fai L, Zhaohui DU, Chee-Kai C, Tissue Engineering 7(6), 679-687, 2001.
- [7] Lakshmi S. Nair and Laurencin CT, Prog. Polym. Sci. (2007), doi:10.1016/j.progpolymsci.2007.05.017.
- [8] Jung Chung P, Park TG, Advanced Drug Delivery Reviews 59, 249-262, 2007.
- [9] Huang ZM, Zhang YZ, Kotaki M, Ramakrishna S, Composites Science&Technology 63, 2223-2253, 2003.
- [10] Kim IY, Seo SJ, Moon HS, Yoo MK, Park IY, Kim BC, Cho CS, Biotechnology Advances 26, 1-21, 2008.