

Kalp Kası Enfeksiyonlarına Yönelik Üç Boyutlu Biyofonksiyonel Doku İskelesi Üretimi ve Karakterizasyonu

Fabrication and Characterization of Three-Dimensional Biofunctional Tissue Scaffolds for Myocardial Infections

Songül ULAĞ¹ 

¹Marmara Üniversitesi Nanoteknoloji ve Biyomalzemeler Uygulama ve Araştırma Merkezi (NBUAM), 34722, İstanbul, Türkiye

Öz

Miyokardit, kalp kası iltihabı olarak tanımlanır ve akut yetmezlik vakalarının %10' unu oluşturur. Kalp kası iltihaplanmalarının oluşmasına başta virüsler olmak üzere bakteri, mantar ve otoimmün hastalıklar sebep olmaktadır. Doku mühendisliği, herhangi bir nedenle yapısı bozulmuş biyolojik dokuları yeniden eski haline getirmeyi, yapısal ve fonksiyonel özelliklerini onarmayı amaçlayan multidisipliner bir bilim dalıdır. Bu çalışmada, kalp kası enfeksiyonlarına yönelik doku mühendisliği yaklaşımı ile kurkumin (KUR) yüklü üç boyutlu polilaktik asit (PLA) doku iskeleleri üretilmiş ve morfolojik, kimyasal, mekanik ve biyolojik özellikler bakımından test edilmişlerdir. KUR'un etkisini incelemek için üç farklı miktar (10, 15 ve 20 mg) %17 PLA içerisine eklenip, üç boyutlu doku iskeleleri üretilmiştir. Taramalı elektron mikroskop (SEM) ile yapılan morfolojik analizler, tüm iskele yapılarının homojen por dağılımına sahip olduklarını göstermiştir. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ile yapılan kimyasal analiz sonucunda, KUR eklenmesinin matriks yapıya ait pikleri kaydırdığı gözlenmiştir. Çekme testi sonuçları incelendiğinde KUR eklenmesinin %17 PLA'nın çekme dayanımını arttırdığı gözlenmiş ve en yüksek çekme dayanımı (12.51±1.3 MPa) 20 mg KUR içeren doku iskelesine ait olarak bulunmuştur. H9C2 kardiyomiyosit hücre hattı ile yapılan 1, 3 ve 7 günlük MTT testi sonuçlarına bakıldığında, en yüksek hücre canlılığı (%124.12) 15 mg KUR içeren iskeleye ait olarak bulunmuştur. *S. aureus* ve *C. albicans* suşlarına karşı yapılan antimikrobiyal test sonucuna bakıldığında, KUR yüklenmesinin iskelelere antimikrobiyal özellik kazandırmadığı gözlenmiştir. *In vitro* ortamda yapılan biyobozunurluk testi sonucunda, KUR yüklenmesiyle bozunma oranının arttığı gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Doku iskelesi; kardiyomiyosit; kurkumin; miyokardit; PLA; üç boyutlu yazıcı

Abstract

Myocarditis is defined as inflammation of the heart muscle and accounts for 10% of acute failure cases. Inflammation of the heart muscle is caused mainly by viruses, bacteria, fungi, and autoimmune diseases. Tissue engineering is a multidisciplinary science that aims to regenerate the structural and functional properties of biological tissues that have been damaged for any reason. In this study, three-dimensional polylactic acid (PLA) scaffolds loaded with curcumin were fabricated and tested in terms of morphological, chemical, mechanical, and biological properties with a tissue engineering approach for cardiac muscle infections. In order to examine the effect of curcumin (CUR), three different amounts (10, 15, and 20 mg) were added into 17% PLA, and three-dimensional scaffolds were produced. The morphological analyses with the scanning electron microscope (SEM) showed that all the scaffolds had homogeneous pore distributions. As a result of chemical analysis with fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), it was observed that the addition of CUR shifted the peaks of the matrix structure. When the tensile test results were examined, it was observed that the addition of CUR increased the tensile strength of 17% PLA and the highest tensile strength (12.51±1.3 MPa) was found in the 17% PLA/20 CUR scaffolds. When the results of the 1, 3, and 7 days MTT test performed with the H9C2 cardiomyocyte cell line were examined, the highest cell viability (124.12%) was found in the 17% PLA/15 CUR scaffold. When the antimicrobial test results against *S. aureus* and *C. albicans* strains were examined, it was observed that the loading of CUR did not impart antimicrobial properties to the scaffolds. As a result of the *in vitro* biodegradability test, it was observed that the rate of degradation increased with the loading of CUR.

Keywords: Cardiomyocyte; curcumin; myocarditis; PLA; tissue scaffold; 3D printing

I. GİRİŞ

Miyokard kalp kası olarak bilinir ve kalbin büyük bir bölümü miyokarddan oluşmaktadır. Miyokardit, kalp kasının (miyokard) iltihaplanması olarak bilinmektedir. Miyokardit iltihabı, kalp kası hücrelerinin ölümüne ve dejenerasyonuna neden olabilmektedir. Kalp kası iltihaplarının oluşmasının başlıca nedenlerinin arasında virüsler olmak üzere bakteri, mantar, otoimmün hastalıklar yer almaktadır.

Oluşan kalp kası iltihapları hızla ilerleyebilir ve hatta ölümcül sonuçlanabilir [1, 2]. Kalp nakli, kök hücre tedavisi, hidrojel enjeksiyonu ve kardiyak doku mühendisliği dahil olmak üzere klinik ve klinik öncesi çalışmalarda kardiyak rejenerasyona yönelik birçok

yaklaşım bulunmaktadır. Doku mühendisliği, herhangi bir nedenle yapısı bozulmuş biyolojik dokuları yeniden eski haline getirmeyi, yapısal ve fonksiyonel özelliklerini onarmayı amaçlayan multidisipliner bir bilim dalıdır ve mühendislik bilgileri ile biyomalzemeleri kullanarak doku hasarlarına alternatif çözüm sunmaktadır [3]. Doku mühendisliğinin hızlı gelişimi, doku hasarlarının tedavisi için yeni yöntemler sağlamıştır. Kök hücre teknolojisindeki büyük başarılar, rejenerasyon amacıyla sınırsız sayıda kök hücre türevi kalp hücresinin sağlanabilmesini mümkün kılmaktadır [2, 4]. Bir başka yeni yöntem, hücre büyümesini ve entegre hücre oluşumunu destekleyen iskele veya yamaların üretilmesidir [5, 6]. Doku iskeleleri kullanılırken malzeme seçimi, mekanik özellikler, yüzey özellikleri, bozunma hızı ve hücre kültür koşullarına dikkat etmek gerekmektedir [7]. Biyomalzemeler, insan vücudundaki canlı dokuların işlevlerini yerine getirmek amacıyla kullanılan doğal ya da sentetik malzemelerin tümüne denmektedir. Bu malzemeler, sürekli olarak veya belli bir süre için vücut içindeki akışkanlar ile temas halindedir. Vücudun bu malzemelere karşı verdiği tepkiler son derece önemlidir. Son yıllarda biyomalzeme/doku etkileşimleri üzerinde önemli çalışmalar yapıldığı ve bu çalışmalar neticesinde, vücudun doğal dokularını yeniden yapılandırmaya yönelik biyoyumlu malzemelerin geliştirildiği görülmektedir [7, 8]. Bu çalışmada, PLA taşıyıcı malzeme olarak, KUR ise biyoyumluluğu artırıcı etken madde olarak seçilmiştir. Kolajen, fibrinojen, kitosan ve jelatin, kalp kası doku mühendisliğinde kullanılan tipik doğal polimerlerdir. Kollajen, fibrin ve polisakaritler, etkili hücre farklılaşmasını destekleme ve kalp hücreleriyle teması geliştirme kapasitelerini gösteren doğal polimerlerin örnekleridir. Bununla birlikte, doğal polimerlerin çoğu, ortalamanın altında mekanik niteliklere sahiptir [9]. PLA gibi sentetik biyoyumlu polimerler, daha yüksek mekanik özellikler gerektiğinde alternatif bir çözümdür. PLA'nın endüstriyel uygulamaları incelendiğinde medikal malzeme, yapı iskelesi, implant, medikal dikiş ipliği, hijyen ürünleri ve kontrollü ilaç salımı gibi çok çeşitli uygulamalarına rastlanmaktadır [10]. PLA biyobozunur, biyoyumlu, yüksek gerilme ve bükülme gücü gibi kabul edilebilir fiziko-mekanik özelliklere sahiptir [11]. KUR, 1,6-heptadien-3,5-dion-1,7-bis(4-hidroksi-3- metoksifenil)-(1E,6E) veya diferülolmetan olarak tanımlanmıştır [12]. Yaygın olarak zerdeçal ismi ile bilinen KUR, zencefilgiller ailesine (*Zingiberaceae*) ait olan zerdeçal (*Curcuma longa*, *turmeric*, *zerdeçöp*, *safran kökü*, *sarıboya*, *zerdeçav*, *hint safranı*) bitkisinin köklerinden elde edilir. KUR, hidrofobik yapıya polifenolik bir bileşik olup sarı-turuncu pigmentli bir maddedir [13]. Steroidler, büyüme faktörleri, heparin, nitrik oksit, gen aktarımı gibi kalp hastalıklarında kullanılan bazı ilaçlar ve moleküller vardır [14]. Son çalışmalar, KUR'un kanser, artrit, inflamatuvar bağırsak hastalığı, kardiyovasküler hastalıklar ve diğerleri dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların tedavisi için umut

verici bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir [15]. Biyofonksiyonel doku iskelesi üretimi için üç boyutlu yazıcı teknolojisi kullanılmıştır. Üç boyutlu yazıcı teknolojisi, doku mühendisliği uygulamalarında iskele üretmek için kullanılan yeni nesil bir teknolojidir. Geleneksel üretim teknikleri arasında emülsifikasyon, faz ayırma/ters çevirme, fiber bağlama, partikül/tuz süzme, dondurarak kurutma ve gazla köpürtme yer alır. Bu teknikler gözenek şeklini, gözenekliliği ve geometriyi yönetmekte zorlanabilir. Geleneksel prosedürlerin avantajları, 3D baskı adı verilen son teknoloji bir teknoloji ile aşılabılır. Bu teknolojinin yardımıyla, daha iyi hücre gelişimi ve yenilenmesini destekleyen, belirli formlara ve gözeneklere sahip yapı iskeleleri oluşturulmaktadır [16]. Üç boyutlu yazıcı ile üretilen iskeleler, mükemmel hücrel etkileşimler ve yeni fonksiyonel dokuların oluşumu için gerekli olan küçük gözenek boyutlarına ve geniş bir yüzey alanına sahiptir [17]. Son zamanlarda 3 boyutlu baskı teknolojisinin hızlı gelişimi ile karmaşık üç boyutlu karmaşık yapıların tasarımı kolaylaşmış ve 3 boyutlu yazıcı teknolojisi ile gözenekli kompozit malzemelerin hazırlanması uygun hale gelmiştir [18, 19].

II. MATERYAL VE METOD

2.1. Malzeme

PLA 2003D, Nature Works LLC, ABD' den tedarik edilmiştir. Kloroform ($CHCl_3$), Sigma Aldrich, St. Louis, MO, ABD tarafından sağlanmıştır. KUR, Sigma-Aldrich firmasından tedarik edilmiştir.

2.2. %17 PLA ve %17 PLA/(10, 15, 20) KUR Solüsyonların Hazırlanması

Hazırlanan ilk kontrol çözeltisinde, 10 ml kloroform çözücüsü içine 1.7 gram PLA eklenmiştir ve manyetik karıştırıcıda 1.5 saat, 400 dönme hızında karıştırılmıştır. Ardından KUR yüklü solüsyonlar için, 10, 15 ve 20 mg KUR %17 PLA çözeltisi içine ayrı ayrı eklenmiş ve 1 saat süresince 400 rpm hızda karıştırılmıştır.

2.3. Üç Boyutlu Yazıcı İle %17 PLA, %17 PLA/(10, 15, 20) KUR Doku İskelelerinin Üretimi

Üç boyutlu doku iskelesi modeli, üç boyutlu bir çizim programı (Solidworks) kullanılarak tasarlanmıştır ve Slic3r yazılımı tarafından G koda dönüştürülmüştür. İskele konfigürasyonu, 20 mm × 20 mm x 0.1 mm boyutlarında kare şekilde tasarlanmıştır. Üç boyutlu doku iskelesi üretimi için ekstrüzyon tabanlı Hyrel 3D (Engine HR, SDS-5 Extruder, GA, ABD) cihazı kullanılmıştır. Hazırlanan çözelti 10 ml hacimli şırıngaya koyulmuş ve cihazın haznesine yerleştirilmiştir. 0.2 mm çapındaki iğne ile 10 mm/sn yazım hızında ve 1 ml/saat akış miktarında tüm iskeleler üretilmiştir. İskele doluluk oranı %96 olarak ayarlanmış ve toplam 7 katmana sahip iskeleler üretilmiştir.

2.4. Üretilen Üç Boyutlu Doku İskelelerinin Karakterizasyonu

2.4.1. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi ile kimyasal analiz

Üretilen üç boyutlu doku iskelelerinin kimyasal karakterizasyonu, fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR, JASCO-4000) ile incelenmiştir. Tüm spektrumlar absorbands modunda 4 cm^{-1} çözünürlük ile $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ tarama aralığında alınmıştır.

2.4.2. SEM analizi

Üretilen üç boyutlu doku iskelelerinin mikroyapı morfolojilerini gözlemek için SEM kullanılmıştır. SEM ile analize başlamadan önce tüm iskeleler Au ile 60s boyunca kaplanmıştır. Por boyutları Image J programı ile ölçülmüş ve SPSS programı ile histogram oluşturulmuştur.

2.4.3. Üç boyutlu doku iskelelerinin diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) cihazı ile termal analizi

$25\text{-}200\text{ }^{\circ}\text{C}$ sıcaklık aralığı ve kalorimetrik ölçüm aralığı: $\pm 150\text{ mW}$ olan Shimadzu DSC-60 Plus cihazı kullanılarak, üretilen üç boyutlu doku iskelelerinin termal davranışı gözlenmiştir. Yapılar, $25\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{dakikalık}$ sabit bir ısıtma hızında taranmıştır.

2.4.4. Üç boyutlu doku iskelelerinin çekme cihazı ile mekanik analizi

Doku iskelelerinin gerilme-gerinim eğrisi, tek eksenli Shimadzu çekme cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Yapılar doğrudan çenelerin arasına yerleştirilmiştir. Analizden önce tüm örneklerin boyutları ve kalınlıkları ölçülüp sistem yazılımına kaydedilmiştir. Analiz 5 kN kuvvet altında $5\text{ mm}/\text{dakika}$ çekme hızında gerçekleşmiştir.

2.4.5. MTT testi

H9C2 hücresi, Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonun' dan (ATKK' dan) satın alınan bir insan kardiyomiyosit hücre dizisidir. Hücreler, %10 fetal sığır serumu (FBS), %1 Penisilin/Streptomisin ile desteklenmiş Dulbecco' nun Değiştirilmiş Kartal Ortamı (DMEM) içinde ve $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de ve %5 CO_2 atmosferinde inkübe edilmiştir. Hücre canlılığını görmek için; tüm iskeleler 96 kuyucuklu plakalara konulmuş ve UV ile sterilize edilmiştir. Kuyu başına 20.000 hücre olacak şekilde 1 mL %10 fetal sığır serumu (FBS), %1 Penisilin/Streptomisin takviyeli DMEM içerisinde, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve %5 CO_2 atmosferinde tüm iskeleler inkübe edilmiştir. DMEM gün aşırı değiştirilmiştir. Hücre canlılığı, PBS ($5\text{ mg}/\text{ml}$) içinde çözülmüş MTT reaktifi (Sigma-Aldrich) kullanılarak ölçülmüştür. Hazırlanan ana stoktan $100\text{ }\mu\text{L}$ alınmış ve %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin ile desteklenmiş DMEM içindeki hücreler ve iskeleler üzerine eklenmiş ve $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, %5 CO_2 ' de 3 saat süresince inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası, DMEM hücre ortamından geri çekilmiş ve formazan kristalleri $500\text{ }\mu\text{L}$ dimetil sülfoksit (DMSO) çözeltisi içinde çözülmüştür, ardından 570 nm ' de absorbands değerleri ölçülmüştür. Üretilen iskeleler üzerinde hücre ekimi ve proliferasyonunu gözlemek için floresan mikroskopisi kullanılmıştır. İskeleler kültürden 1. ve 3. gün sonra alınmış ve üç kez

PBS solüsyonu ile yıkanmıştır. Hücrelerin malzemeler üzerinde fiksasyonu %4 paraformaldehit ile 30 dakika süresince yapılmış, DAPI solüsyonu ($1\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$, Invitrogen) ile boyanıp 10 dakika karanlık odada tutulmuştur. Görüntüler, Andor DSD2 konfokal birimi ile yapılandırılmış Olympus BX-51 mikroskobu ile çekilmiştir.

2.4.6. KUR'un iskelelerden salım davranışının incelenmesi

İlaç salım testinde ilk olarak 5 farklı miktardaki ilacın (0.2 , 0.4 , 0.6 , 0.8 ve 1 mL) absorbands değerleri ölçülerek ilaca ait lineer kalibrasyon eğrileri belirlenmiştir. KUR'a ait absorbands piki 428 nm 'de gözlenmiştir. Daha sonra ilaç salımı için, 5 mg KUR yüklü üç boyutlu iskeleler hazırlanmış ve 1 mL fosfat tamponlu salin (PBS) solüsyonu içeren eppendorf tüplere yerleştirilmiştir. Tüpler, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 300 rpm ' de bir termal çalkalayıcıya yerleştirilmiştir. UV-görünür spektrofotometre ile farklı zaman aralıklarında ölçümler alınmış ve numunelere her ölçümden sonra taze PBS eklenmiştir.

2.4.7. Antimikrobiyal aktivite testi

S. aureus (ATCC 29213) için, bir gün önce %5 koyun kanlı Columbia Agar (COS; Biomerieux, Fransa) besiyerlerine azaltma ekimleri yapılmıştır. $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de bir gece inkübasyona bırakıldı. Mueller Hinton sıvı besiyerinde (MHB; Biomerieux, Fransa), 0.5 McFarland ($1\text{-}5\times 10^8\text{ cfu}/\text{mL}$) bulanıklığında bakteri süspansiyonları hazırlanmıştır. Süspansiyonlar Mueller Hinton E Agar (MHE; Biomerieux, Fransa) besiyerinin tüm yüzeyi kaplayacak şekilde yayılmıştır. Daha önce UV ışık altında 10 dk sterilize edilen disk şeklinde kesilmiş iskeleler eşit mesafede olacak şekilde besiyerleri üzerine yerleştirilmiştir. Kontrol amaçlı olarak %17 PLA diskler ve $30\text{ }\mu\text{g}$ amikasin kullanılmıştır. Besiyerler $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de $16\text{-}20$ saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası disk çevresindeki üreme inhibisyonuna ait zon çapı mm cinsinden belirlenmiştir. *C. albicans* (SC5314) saboraud dekstroz agar (SDA; Biomerieux, Fransa) besiyerine ekilmiş ve $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ etüvde bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Üreyen koloniler ile serum fizyolojik içerisinde 0.5 McFarland ($1\text{-}5\times 10^6\text{ cfu}/\text{mL}$) bulanıklığında süspansiyon hazırlanmıştır. Mantar süspansiyonları MHE agar besiyerine yayılmıştır. Diskler eşit mesafede olacak şekilde yerleştirilmiştir. Kontrol disk olarak %17 PLA kullanılmıştır. Diskler, $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de $20\text{-}24$ saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası disk çevresindeki üreme inhibisyonuna ait zon çapı mm cinsinden ölçülerek saptanmıştır.

2.4.8. In vitro biyobozunurluk testi

Üretilen doku iskelelerinin biyolojik bozunma davranışı in vitro koşullarda test edilmiştir. Yapı iskelelerinin bozunma özellikleri, zaman içinde kütlelerindeki değişiklikler izlenerek belirlenmiştir. Bozunma testi, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de 1 mL PBS solüsyonunda (pH 7.4) yapılmıştır. İskeleler PBS ile birlikte eppendorf tüp içerisinde termal çalkalayıcıya konulmuştur. Belirli zaman aralıklarında, doku iskelelerinin kurumuş

ağırlıkları, bozunma davranışlarını değerlendirmek için ölçülmüştür. İskeleler bir gün PBS içinde kaldıktan sonra, diğer gün PBS'den ayrılıp etüvde 37°C'de 24 saat kurutulmuştur ve kuru ağırlıkları not edilmiştir. Bozunma değeri (BD), aşağıdaki denklem kullanılarak belirlenmiştir.

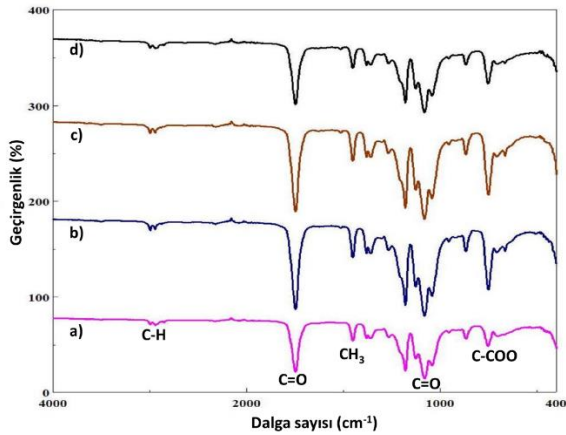
$$BD = \frac{W_1 - W_2}{W_1} \times 100 \quad (1)$$

Bu denklem, sırasıyla W_1 ve W_2 ile temsil edilen, bozulmadan önceki ve sonraki yapı iskelelerinin ağırlıklarını temsil etmektedir.

III. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

3.1. FTIR Analizi

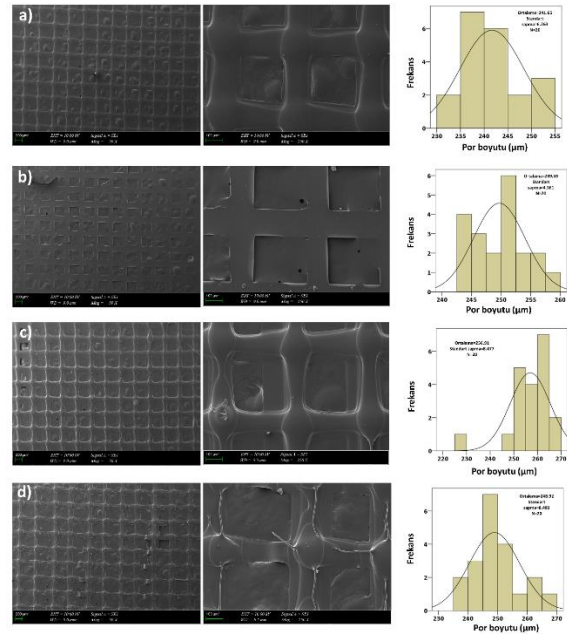
Şekil 1 üç boyutlu doku iskelelerine ait FTIR spektrumlarını göstermektedir. %17 PLA'ya ait temel absorpsiyon pikleri, 1749 cm^{-1} (C=O titreşimi), 1453 cm^{-1} (CH_3 asimetrik makaslama), 1080 cm^{-1} (C-O, C-O-C, germe), 1042 cm^{-1} (C- CH_3 , germe) ve 867 cm^{-1} (C-COO, esneme) dalga sayılarında gözlenmiştir [11]. Şekil 1 (b, c, d), %17 PLA' sırasıyla 10, 15 ve 20 mg KUR eklenmesiyle oluşan spektrumları temsil etmektedir. Genel olarak bakıldığında, KUR eklenmesi %17 PLA'ya ait temel pikleri önemli olmayan derecede sağa ve sola kaydırmıştır. %17 PLA'ya KUR eklenmesiyle spektrumdaki değişimler önemsiz düzeyde olmuştur. Bunun sebebi ana polimer olan PLA, ilaca göre daha fazla oranda kullanıldığından, PLA'ya ait pikler baskın gelmiştir [20]. Mai ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, %5 KUR %8 PLA içerisine konulup elektroçerme tekniği ile nanofiber üretilmiştir. Çalışmada yapılan FTIR analizine göre, yüksek PLA/KUR oranı nedeniyle, PLA'nın tipik pikleri hem saf PLA'da hem de KUR-yüklü PLA'da net ve güçlü bir şekilde gözlenmiştir [21]. Reddy ve Kim tarafından yapılan bir çalışmada, PLA/KUR kompozit filmler çift vidalı ekstruder ile üretilmiştir ve FTIR ile yapılan kimyasal analiz sonucunda, KUR ilavesinin PLA'nın temel piklerinde bazı kaymalara sebep olduğu gözlenmiştir [22].



Şekil 1. %17 PLA (a), %17 PLA/10 KUR (b), %17 PLA/15 KUR (c) ve %17 PLA/20 KUR (d) iskelelerine ait FTIR spektrumları.

3.2. SEM Analizi

3B baskı iskelelerinin gözenek boyutunun, doku mühendisliği uygulamaları sırasındaki işlevleri üzerinde doğrudan etkileri vardır. Açık gözenekli ve birbirine bağlı ağlar, hücre beslenmesi, göçü, çoğalması ve geçirgenliği nedeniyle doku oluşumu için gereklidir [23]. Şekil 2, üretilen %17 PLA ve KUR yüklü %17 PLA doku iskelelerine ait SEM görüntülerini temsil etmektedir. İskelelere ait SEM görüntülerine bakıldığında, tüm iskelelerin homojen por boyutlarına ve pürüzsüz morfolojilere sahip oldukları gözlenmektedir. Şekil 2a, %17 PLA doku iskelesine ait morfolojik yapıyı temsil etmektedir. 250X büyütmeyle ait görüntüye bakıldığında, iskelelerin porlarının tüm iskele boyunca homojen olduğu söylenebilmektedir. Şekil 2 (b, c, d), 10, 15 ve 20 mg KUR eklenerek üretilen %17 PLA doku iskelesine ait morfolojik görüntüleri temsil etmektedir. İskelelere ait por boyutları %17 PLA, %17 PLA/10 KUR, %17 PLA/15 KUR ve %17 PLA/20 KUR için sırasıyla $241.65 \pm 6.7 \mu\text{m}$, $249.69 \pm 4.3 \mu\text{m}$, $256.91 \pm 8.4 \mu\text{m}$, $248.92 \pm 8.4 \mu\text{m}$ olarak ölçülmüştür. Sonuçlara bakıldığında, tüm yapı boyunca iskelelerin homojen porlara ve por boyutlarına sahip oldukları söylenebilmektedir. Ek olarak, KUR yüklü iskelelerin %17 PLA'ya ait morfolojiyi değiştirmediği gözlenmektedir.

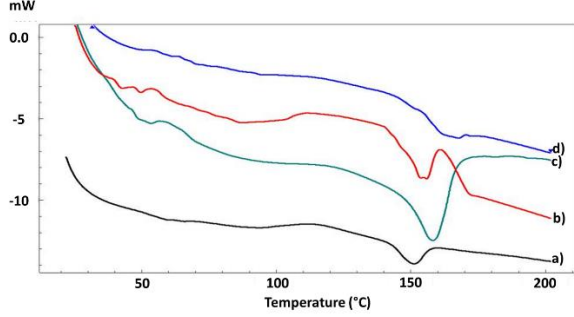


Şekil 2. Üretilen doku iskelelerine ait SEM görüntüleri, %17 PLA (a), %17 PLA/10 KUR (b), %17 PLA/15 KUR (c) ve %17 PLA/20 KUR (d).

3.3. DSC Analizi

Şekil 3, üç boyutlu doku iskelelerine ait DSC eğrilerini göstermektedir. %17 PLA'ya ait erime sıcaklığı yaklaşık 150°C 'de gözlenmiştir (Şekil 3a) [24]. Şekil 3b, %17 PLA/10 KUR doku iskelesine ait DSC eğrisini göstermektedir. Şekil 3b'de görüldüğü üzere, %17 PLA'ya 10 mg KUR eklenmesi, erime sıcaklığını

yaklaşık 155 °C'ye çıkarmıştır. 15 mg KUR eklenmesi ise, %17 PLA'nın erime sıcaklığını tekrar sola kaydırmıştır (Şekil 3c). Öte yandan 20 mg KUR eklenmesi tekrar erime sıcaklığını sağa doğru kaydırmıştır (Şekil 3d). Sonuçlara bakıldığında, %17 PLA'ya KUR eklenmesi, PLA'nın erime sıcaklığını kısmi ölçüde arttırmıştır fakat önemli derecede etkilememiştir.



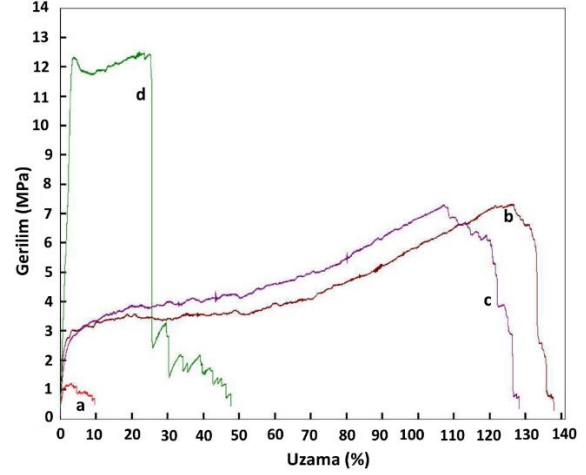
Şekil 3. Üretilen %17 PLA (a), %17 PLA/10 KUR (b), %17 PLA/15 KUR (c) ve %17 PLA/20 KUR (d) doku iskelelerine ait DSC eğrileri.

3.4. Çekme Test Analizi

Çeşitli konsantrasyonlarda KUR katkılı iskelelerin mekanik özellikleri çekme testi ile incelenmiştir. Tablo 1 ve Şekil 4 çekme testi sonucunda malzemenin sahip olduğu mekanik dayanımı göstermektedir. Sonuçlara bakıldığında, %17 PLA'nın çekme dayanımı 1.21 ± 0.5 MPa ve kopma uzaması 31.2 ± 11 olarak bulunmuştur. %17 PLA'ya KUR eklenmesi genel olarak çekme dayanımını arttırmıştır. Fakat 10 mg KUR ile 15 mg KUR eklenmiş üç boyutlu doku iskeleleri arasında çekme dayanım değerleri açısından çok fazla fark yoktur. %17 PLA'ya KUR eklenmesi kopma uzamasını büyük oranda arttırmaktadır. En yüksek uzama (137 ± 23), 10 mg KUR eklendiği zaman gözlenmiştir. 20 mg KUR eklenmesi ise malzemenin kopma uzamasında gözle görülür bir düşüşe neden olmuştur. Bu durum, 20 mg KUR ilavesinin esnekliği düşürmeye başladığını göstermiştir. İskele bütünlüğünü korumak için yara tedavisinde yüksek gerilme mukavemeti değerleri ve kopmada yüksek uzama değerleri gereklidir [16]. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar ile üretilen üç boyutlu yara örtülerinin yara tedavisinde kullanılabilme potansiyelini göstermektedir.

Tablo 1. Üretilen %17 PLA, %17 PLA/10 KUR, %17 PLA/15 KUR ve %17 PLA/20 KUR doku iskelelerine ait çekme dayanım ve kopmada uzama değerleri.

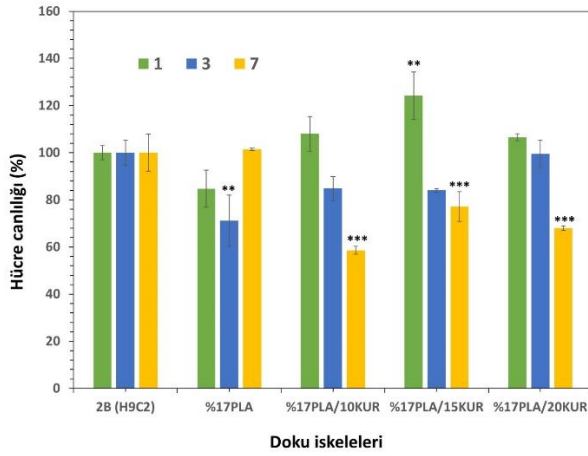
	Çekme Dayanımı (MPa)	Kopmada Uzama (%)
%17 PLA	1.21 ± 0.5	31.2 ± 11
%17 PLA+10 mg KUR	7.32 ± 0.3	137 ± 23
%17 PLA+15 mg KUR	7.29 ± 0.6	128.3 ± 15
%17 PLA+20 mg KUR	12.51 ± 1.3	47.4 ± 17



Şekil 4. Üretilen %17 PLA (a), %17 PLA/10 KUR (b), %17 PLA/15 KUR (c) ve %17 PLA/20 KUR (d) doku iskelelerine ait çekme dayanım grafikleri.

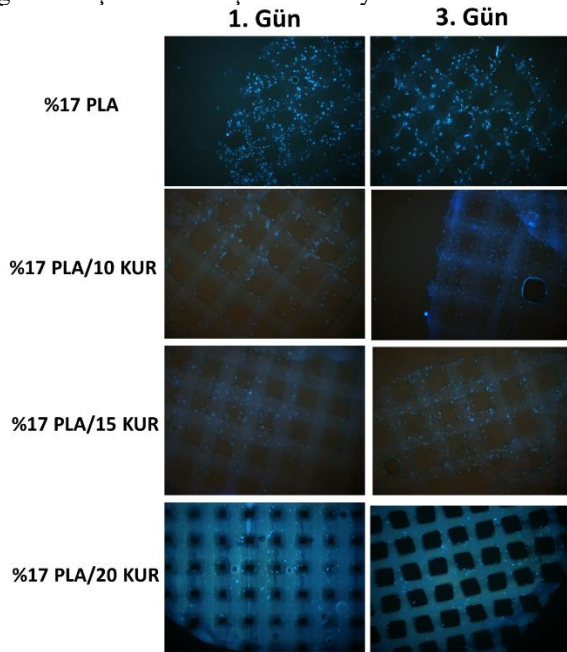
3.5. MTT Analizi

Üretilen doku iskeleleriyle kültürlenmiş hücrelerin canlılık değerleri 1, 3 ve 7 günlük inkübasyon sonrası incelenmiştir ve sonuç Şekil 5'te verilmektedir. 1. Gün sonrası elde edilen canlılık değerlerine bakıldığında, en yüksek hücre canlılığı (%124.12) %17 PLA/15 KUR içeren doku iskelesinde gözlenmiştir. En düşük hücre canlılığı (%84.71) kontrol grubu olan %17 PLA doku iskelesinde gözlenmiştir. Bu sonuca bakıldığında, KUR ilavesinin kardiyomyosit hücrelerin canlılığına olumlu yönde etki ettiğini ve hücrelerin çoğalmasını arttırdığı söylenebilir. Üç günlük kültürden sonra, genel olarak tüm iskeleler için hücre canlılığı ilk güne göre düşmüştür. Üçüncü günde en yüksek hücre canlılık oranı (%99.56) %17 PLA/20 KUR doku iskelesine ait olarak bulunmuştur. İnkübasyondan 7 gün sonra hücrelerin canlılık değerleri incelendiğinde, %17 PLA doku iskelesi hariç, KUR yüklü tüm iskeleler için hücre canlılık değeri düşmeye devam etmiştir. Üçüncü ve yedinci günde hücre canlılığının azalması, ölü hücrelerin ayrılmasından kaynaklanabilir [25]. %17 PLA ile kültürlenmiş hücrelerin canlılık değerleri 7. günde, 3.güne göre tekrar artışa geçmiştir. Genel olarak, tüm sonuçlar incelendiğinde, tüm iskeleler için hücre canlılık değerleri %70 ve yukarıdır ve bu durum iskelelerin toksik olmadığını ve biyouyumlu olduklarını göstermektedir.



Şekil 5. Kardiyomiyosit hücreleriyle kültürlenmiş iskelelerin 1, 3 ve 7. gün sonrası hücre canlılık oranları.

İskeleler üzerinde kültürlenmiş kardiyomiyosit hücrelerinin morfolojisini gözlemek için yapılan floresan boyama görüntüleri Şekil 6' da verilmiştir. Sonuçlara bakıldığında, hücrelerin iskeleler üzerinde homojen bir şekilde dağıldığı ve hücre dağılımının en az olduğu iskelelerin %17 PLA/20 KUR olduğu gözlenmiştir. Bu sonuç MTT ile uyumludur.

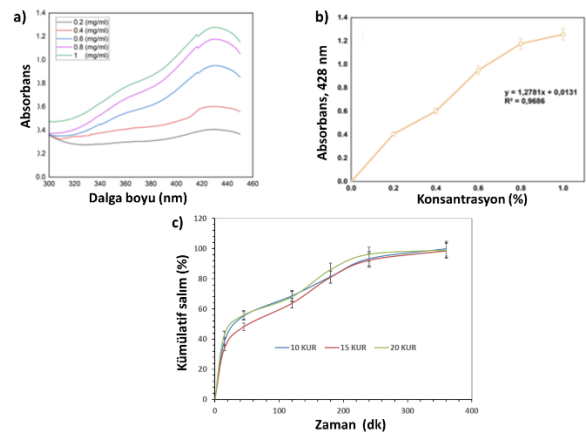


Şekil 6. Üretilen üç boyutlu iskelelerin kardiyomiyosit hücreleriyle 1. ve 3. gün inkübasyonu sonrası floresan mikroskop görüntüleri.

3.6. KUR'un İskeleden Salım Davranışı

KUR'un salım profili, KUR yüklü %17 PLA doku iskelelerinin belirli zamanlarda UV-spektrofotometre ile alınan absorbans değerleri kullanılarak belirlenmiştir (Şekil 7). Şekil 7a KUR'a ait kalibrasyon eğrisini göstermektedir. Kalibrasyon eğrisinin en yüksek pik noktasının sahip olduğu absorbans değerlerini kullanarak elde edilen absorbans grafiği Şekil 7b' de verilmiştir. Şekil 7c KUR'un iskeleden

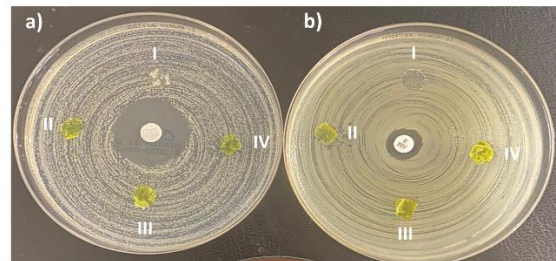
salım davranışını göstermektedir. İnkübasyonun ilk 45 dakikası boyunca, %17 PLA/10 KUR, %17 PLA/15 KUR ve %17 PLA/20 KUR iskelelerine ait kümülatif salım değerleri yaklaşık %55, %48 ve %56 olarak bulunmuştur. İlk ani salımın nedeni doku iskelesi yüzeyinde bulunan KUR'un öncelikli salımından kaynaklı olabilir [26]. 6 saatlik inkübasyondan sonra, kümülatif salım değerleri %17 PLA/10 KUR, %17 PLA/15 KUR ve %17 PLA/20 KUR doku iskeleleri için sırasıyla %99, %98 ve %99 olarak bulunmuştur. Sonuca bakıldığında, 6 saat içinde doku iskeleleri içerisinde bulunan farklı miktarlardaki KUR'un tamamen salındığı söylenebilir. Üç boyutlu doku iskelelerinin ilaç taşıma kapasitesi, katman sayısı ve kalınlığı ile kontrol edilebilir [27], fakat bu çalışmada tüm doku iskeleleri aynı katman sayısı ve kalınlığında üretildiğinden benzer salım davranışı göstermişlerdir.



Şekil 7. KUR'un %17 PLA doku iskelesinden kümülatif salım davranışı.

3.7. Disk Difüzyon Test Sonuçları

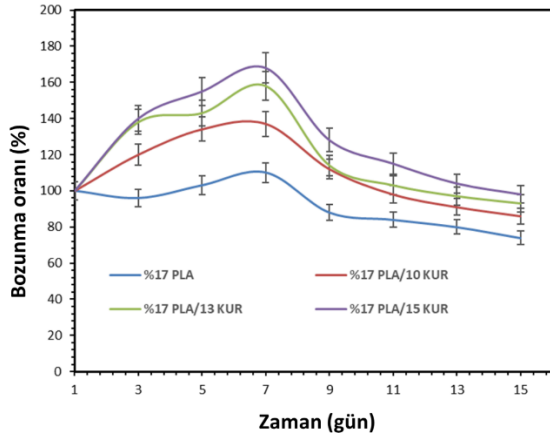
Şekil 8 üç boyutlu iskelelere ait antimikrobiyal aktivite test sonuçlarını göstermektedir. İnkübasyon sonrası KUR yüklü iskelelerin *S. aureus* ve *C. albicans* suşlarına karşı antimikrobiyal aktivite göstermedikleri gözlenmiştir. Bu sonuç, KUR'un miktarının az olmasından ya da KUR'un orijini ve bileşimi, kullanılan ekstraksiyon teknikleri, test edilen mikroorganizmalar vb. gibi bazı farklılıklardan kaynaklanabilir [28].



Şekil 8. Üç boyutlu iskelelerin *C. albicans* (a) ve *S. aureus* (b) suşlarına karşı gösterdikleri antimikrobiyal aktiviteleri: %17 PLA (I), %17 PLA/10 KUR (II), %17 PLA/15 KUR (III) ve %17 PLA/20 KUR (IV).

3.8. Üç Boyutlu Doku İskelelerinin Biyobozunurluk Davranışları

İskele bozunma süreci, doku mühendisliği alanında çok önemli bir rol üstlenir ve yeni doku mühendisliği stratejilerinin geliştirilmesine ve iyileştirilmesine önemli ölçüde katkıda bulunur [29]. Şekil 9 üç boyutlu doku iskelelerine ait bozunma davranışını göstermektedir. Sonuçlara bakıldığında, üçüncü gün sonunda en yüksek bozunma oranının (%140) %17 PLA/20 KUR iskelesine ait olduğu gözlenmiştir en düşük bozunma oranı (%96) ise %17 PLA doku iskelesine ait olarak gözlenmiştir. 5., 7., 9., 11., 13. ve 15. günler için de aynı bozunma davranışı devam etmiştir. Saylam ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, üç boyutlu %17 PLA doku iskeleleri üretmiş olup içine levedopa ilacını koymuşlardır. *In vitro* koşullarda PBS içerisinde yapılan bozunma testi sonucuna göre en düşük bozunma oranının %17 PLA doku iskelesine ait olduğunu ve ilaç içeren %17 PLA iskelelerinin %17 PLA iskelesine göre daha fazla bozunma oranına sahip olduklarını bulmuşlardır [29].



Şekil 9. Üretilen üç boyutlu doku iskelelerin bozunma davranış grafiği.

IV. SONUÇ

Sunulan çalışmada üç boyutlu yazıcı ile PLA ve KUR içeren üç boyutlu doku iskeleleri üretilmiştir. KUR ilavesi ile biyoaktivitenin artırılması amaçlanmıştır. Sonuçlar incelendiğinde, mekanik dayanım özelliklerinin KUR eklenmesiyle arttığı gözlenmiştir. FTIR analizi ile kimyasal etkileşimler incelenmiş ve sonuçlara bakıldığında KUR ilavesiyle %17 PLA matrisine ait piklerin kaydığı gözlenmiştir. DSC ile yapılan termal analiz sonucuna bakıldığında, KUR eklenmesiyle termal geçiş noktalarında önemli bir değişiklik olmamıştır. Biyoyumurluluk sonuçları incelendiğinde, 15 mg KUR ilaveli %17 PLA doku iskeleleri ile kültürlenmiş kardiyomyosit hücrelerinin canlılık değerleri diğer iskelelerle kültürlenmiş hücrelerin canlılık değerine göre daha fazladır. *S. aureus* ve *C. albicans* suşlarına karşı yapılan antimikrobiyal aktivite testi sonucunda KUR yüklü iskelelerin antimikrobiyal özellik göstermediği bulunmuştur. Hücre canlılık değerleri ile antimikrobiyal aktivite test sonuçları beraber

incelendiğinde, 20 mg KUR içeren iskelelerin hücre canlılığını düşürmeye başladığı ve daha fazla miktarda KUR eklenmesinin antimikrobiyal aktivite sağlayabileceği fakat hücre canlılığını olumsuz etkileyebileceği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

- [1] Ayhan, E., Işık, T. MİYOKARDİT. *Balikesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 1, (2012).
- [2] Feldman, A.M., McNamara, D. Myocarditis. *N Engl J Med.*, 343 (19), 1388-98, (2000).
- [3] Ramanan, V., Scull, M. A., Sheahan, T. P., Rice, C. M., Bhatia, S. N. New Methods in Tissue Engineering: Improved Models for Viral Infection. *Annu. Rev. Virol.*, 1:475-99, (2014).
- [4] Blauwet, L. A., Cooper, L.T. Myocarditis. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 52, 274-88, (2010).
- [5] Brady, W.J., Ferguson, J.D., Ullman, E.A., Perron, A.D. Myocarditis: emergency department recognition and management. *Emerg Med Clin North Am.*, 22 (4): 865-85, (2004).
- [6] Liu, P.P., Schultheiss, H.P. Myocarditis. In: Braunwald's heart disease: a textbook of cardiovascular medicine. *Philadelphia*, 2, 1784-5, (2008).
- [7] Lanza, R. Methods of Tissue Engineering, Elsevier, 23-29, 463-471, 2006.
- [8] Kular, J. K., Basu, S., Sharma, R. The extracellular matrix: Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering*, 5: 1-17, (2014).
- [9] Kitsara, M., Agbulut, O., Kontziampasis, D., Chen, Y., Menasché, P. Fibers for hearts: A critical review on electrospinning for cardiac tissue engineering, *Acta Biomaterialia*, 48, (2017).
- [10] Graupner, N., Herrmann, A. S., Müssig, J. Natural and man-made cellulose fibre-reinforced poly(lactic acid) (PLA) composites: An overview about mechanical characteristics and application areas, *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 40 (6-7), (2009).
- [11] Cesur, S., Ulag, S., Ozak, L., Gumussoy, A., Arslan, S., Yilmaz, B. K., Ekren, N., Agirbasli, M., Gunduz, O. Production and characterization of elastomeric cardiac tissue-like patches for Myocardial Tissue Engineering. *Polymer Testing*, 90, 106613, (2020).
- [12] Aggarwal, B.B., Sundaram, C., Malani, N., Ichikawa, H., Kurkumin: the Indian solid gold, in The molecular targets and therapeutic uses of kurkumin in health and disease. Springer. p. 1-75, (2007).
- [13] Shen, L., Ji, H.-F. Theoretical study on physicochemical properties of kurkumin, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 67, 619-623, (2007).
- [14] Spadaccio, C., Chello, M., Trombetta, M., Rainer, A., Toyoda, Y. and Genovese, J.A. Drug releasing

- systems in cardiovascular tissue engineering. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13: 422-439, (2009).
- [15] Song, Y., Ge, W., Cai, H., Zhang, H. Curcumin protects mice from coxsackievirus B3-induced myocarditis by inhibiting the phosphatidylinositol 3 kinase/Akt/nuclear factor- κ B pathway. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.*, 18 (6): 560-9, (2013).
- [16] Aki, D., Ulag, S., Unal, S., Sengor, M., Ekren, N., Lin, CC., Yılmaz, H., Ustundag, C. B., Kalaskar, D. M., Gunduz, O. 3D printing of PVA/hexagonal boron nitride/bacterial cellulose composite scaffolds for bone tissue engineering. *Materials & Design*, 196, 109094, (2020).
- [17] Ayran, M., Dirican, A. Y., Saatcioglu, E., Ulag, S., Sahin, A., Aksu, B., Croitoru, AM., Fikai, D., Gunduz, O., Fikai, A. 3D-Printed PCL Scaffolds Combined with Juglone for Skin Tissue Engineering. *Bioengineering*, 9(9), 427, (2022).
- [18] Ulag, S., Sahin, A., Guncu, M.M., Aksu, B., Ekren, N., Sengor, M., Kalaskar, DM., Gunduz, O. A novel approach to treat the Thiel-Behnke corneal dystrophy using 3D printed honeycomb-shaped polymethylmethacrylate (PMMA)/Vancomycin (VAN) scaffolds. *Bioprinting*, 24, e00173, (2021).
- [19] Ulag, S., Uysal, E., Bedir, T., Sengor, M., Ekren, N., Ustundag, C. B., Midha, S., Kalaskar, DM., Gunduz, O. Recent developments and characterization techniques in 3D printing of corneal stroma tissue. *Polym Adv Technol.*, 32:3287–3296, (2021).
- [20] Altan, E., Karacelebi, Y., Saatcioglu, E., Ulag, S., Sahin, A., Aksu, B., Croitoru, AM., Codrea, C. I., Fikai, D., Gunduz, O., Fikai, A. Fabrication of Electrospun Juglans regia (Juglone) Loaded Poly(lactic acid) Scaffolds as a Potential Wound Dressing Material. *Polymers*, 14 (10), 1971, 2022.
- [21] Mai, T. T. T., Nguyen, T.T.T., Le, Q. D., Nguyen, T. N., Ba, T. C., Nguyen, H. B., Phan, T. B. H., Tran, D. L., Nguyen, X. P., Park, J. S. A novel nanofiber Cur-loaded polylactic acid constructed by electrospinning. *Adv. Nat. Sci: Nanosci. Nanotechnol.*, 3, 025014, (2012).
- [22] Ranjeth Kumar Reddy, T., Kim, HJ. Mechanical, Optical, Thermal, and Barrier Properties of Poly (Lactic Acid)/Curcumin Composite Films Prepared Using Twin-Screw Extruder. *Food Biophysics*, 14, 22–29, (2019).
- [23] Ilhan, E., Ulag, S., Sahin, A., Yilmaz, B. K., Ekren, N., Kilic, O., Sengor, M., Kalaskar, D. M., Oktar, F. N., Gunduz, O. Fabrication of tissue-engineered tympanic membrane patches using 3D-Printing technology. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 114 104219, (2021).
- [24] Croitoru, AM., Karaçelebi, Y., Saatcioglu, E., Altan, E., Ulag, S., Aydoğan, H. K., Sahin, A., Motelica, L., Oprea, O., Tihauan, B. M., Popescu, RM., Savu, D., Trusca, R., Fikai, D., Gunduz, O., Fikai, A. Electrically triggered drug delivery from novel electrospun poly (lactic acid)/graphene oxide/quercetin fibrous scaffolds for wound dressing applications. *Pharmaceutics*, 13(7), 957, (2021).
- [25] Chhabra, P., Tyagi, P., Bhatnagar, A., Mittal, G., Kumar, A. Optimization, characterization, and efficacy evaluation of 2% chitosan scaffold for tissue engineering and wound healing. *J Pharm Bioallied Sci.*, 8(4): 300-308, (2016).
- [26] Karuppanan, S. K., Raghavendra, R., SB Mohamed, K., Shazia Anjum, M., Mohammed Junaid Hussain D., Ganesh, MR., Kantha Deivi, A. Copper oxide nanoparticles infused electrospun polycaprolactone/gelatin scaffold as an antibacterial wound dressing. *Materials Letters*, 294: 129787, (2021).
- [27] Somayeh Baghersad, S., Hajir B., Marziyeh Ranjbar, M., Mohammad Reza Mohaddes M., Peiman Brouki, Milan. Development of biodegradable electrospun gelatin/aloe-vera/poly(ϵ -caprolactone) hybrid nanofibrous scaffold for application as skin substitutes. *Materials Science and Engineering: C*, 93, 367-379, (2018).
- [28] Saatcioglu, E., Koyun, M., Ulag, S., Sahin, A., Yilmaz, B.K., Aksu, B., Gunduz, O. 3D printing of Osage orange extract/Chitosan scaffolds for soft tissue engineering. *Food Hydrocolloids for Health*, 1, 100039, (2022).
- [29] Saylam, E., Akkaya, Y., Ilhan, E., Cesur, S., Guler, E., Sahin, A., Cam, M. E., Ekren, M., Oktar, F. N., Gunduz, O., Fikai, D., Fikai, A. Levodopa-Loaded 3D-Printed Poly (Lactic) Acid/Chitosan Neural Tissue Scaffold as a Promising Drug Delivery System for the Treatment of Parkinson's Disease. *Appl. Sci.*, 11(22), 10727, (2021).