



L929 Fibroblast Hücrelerinin PEGDMA İçerisine Enkapsülasyonuna Atmosferik Soğuk Plazma Uygulamasının Etkisi

The Effect of Cold Atmospheric Plasma to Encapsulation of L929 Fibroblast Cells in PEGDMA

Çağla Yıldırım¹, Günnur Onak^{1,2}, Ozan Karaman^{1,2}, Utku Kürşat Ercan^{1,2}

¹ Biyomedikal Teknolojiler A.B.D., İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi, İzmir, Türkiye

² Biyomedikal Mühendisliği Bölümü, İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi, İzmir, Türkiye
caglayildirim.4@gmail.com, gunnur.onak@ikc.edu.tr, ozan.karaman@ikc.edu.tr, utkuk.ercan@ikc.edu.tr

Özetçe— Polimerler ve hidrojeller 3 boyutlu doku iskelesi oluşturmada kullanılmaktadır. PEGDMA polimeri kullanılarak oluşturulmak istenen hidrojel solüsyonlarına soğuk atmosferik plazma uygulanarak antimikrobiyal etki kazandırılmaya çalışılmıştır. Ayrıca L929 hücreleri kullanılarak enkapsülasyon yapılmış, hücre canlılığı kontrol edilmiştir.

Anahtar Kelimeler — PEGDMA, soğuk atmosferik plazma, antimikrobiyal etki, hidrojel.

Abstract— Polymers and hydrogels are used to create 3D tissue scaffolds. The hydrogel solutions that are formed using PEGDMA polymer were tried to be given antimicrobial effect by applying cold atmospheric plasma. In addition, L929 cells were encapsulated and cell viability was checked.

Keywords — PEGDMA, cold atmospheric plasma, antimicrobial effect, hydrogel.

I. GİRİŞ

Hidrojeller kovalent, iyonik, hidrojen bağı ya da van der Waals kuvveti ile çapraz bağlar oluşturan, yüksek miktarda su ya da biyolojik sıvı tutabilen, hücreleri, besin maddelerini, ilaçları ya da proteinleri hem muhafaza edebilen hem de kontrollü salınımlarını gerçekleştiren 3 boyutlu, biyouyumlu polimerik yapılarıdır [1-5].

Poli(etilen glikol) dimetakrilat (PEGDMA) polimerinin hidrojel olarak kullanımından sonra toksik etki yaptığı görülmüştür. Aynı zamanda yapısı gereği de grede olmadığı halde de grede olabilir malzemeler (poliester, polipropilen

fumarat, asetal ve disülfid) ile birlikte kullanılması sonucu de gradasyon oranının artırılabilirdiği belirlenmiştir [2, 6].

PEGDMA monomerlerinin iki ucunda bulunan metakrilat grupları ultraviyole (UV) uygulaması ile birlikte diğer metakrilat grupları ile kovalent bağ oluşturur. Her monomer 4 monomere kovalent bağ ile bağlanarak çapraz bağlı dallanmış ağlar oluşturur [7].

Soğuk plazmada iyonların ve yüksüz moleküllerin soğutulması ile düşük sıcaklıklarda elektronlara ve gazlara enerji transferinin daha etkili olduğu belirtilmektedir [8]. Plazma uygulaması sonucu açığa çıkan serbest radikaller malzeme ile etkileşime geçerek, biyomateryalin mekanik ve kimyasal özelliklerini değiştirir. Oluşan serbest radikaller tüketilmez ya da uzaklaştırılmaz ise sterilizasyon etkisinin daha uzun süreli olacağı belirtilmiştir [1]. Fakat bakteriyel inaktivasyon mekanizması anlaşılammış olmasına rağmen, plazmanın aşındırma etkisi, yüklü parçacıklar ve radikaller ile moleküllerin oksitlenmesi sonucu antibakteriyel etki yaptığı düşünülmektedir[4].

Klinik çalışmalarda en çok kullanılan etilen oksit (EtO) ve gama radyasyonu gibi sterilizasyon teknikleri biyobozunur doku iskelelerini steril etmek amacıyla kullanılmaktadır. Fakat kullanılan teknikler sterilizasyonda başarılı olamamıştır. Biyobozunur doku iskeleleri kimyasal yapıları dolayısıyla sterilizasyon tekniklerine karşı duyarlıdır [4]. Yeni sterilizasyon tekniklerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Biyomalzeme 2

14 Ekim 2017 - 09.00-10.30 - Salon B



Şekil 1. Plazma cihazı.

Bu çalışmanın amacı halihazırda kullanılan ve sterilizasyonda yetersiz kalan tekniklere alternatif olarak önerilen soğuk atmosferik plazmanın hem antimikrobiyal özelliklerinin belirlenmesi hem de PEGDMA içerisine enkapsüle edilen L929 fibroblast hücrelerine etkisinin incelenmesidir.

II. MATERYAL-METOT

A. Plazma Muamelesi

Bu çalışmada atmosferik soğuk plazma, mikrosaniye darbeleri bir güç kaynağı kullanılarak elde edilmiştir. Plazma uygulaması 1, 5 kHz ve 31 kV değerlerinde 2 mm deşarj aralığında yapılmıştır.

B. Bakteri Kültürü Hazırlanması

Cryo tüpler içinde -80°C 'de saklanan *Escherichia coli* (*E. coli*) bakterisi için 1 tüp alınarak 9 ml Tryptic Soy Broth (TSB) içerisine konuldu ve 36°C 'de 24 saat çalkalayıcı inkübatörde inkübe edildi. 24 saat sonunda içerisinden 1 ml alınarak tekrar 9 ml TSB içerisine konuldu ve 24 saat daha çalkalayıcı inkübatörde inkübe edildi ve kullanıma hazır hale getirildi. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) için de aynı işlemler gerçekleştirildi.

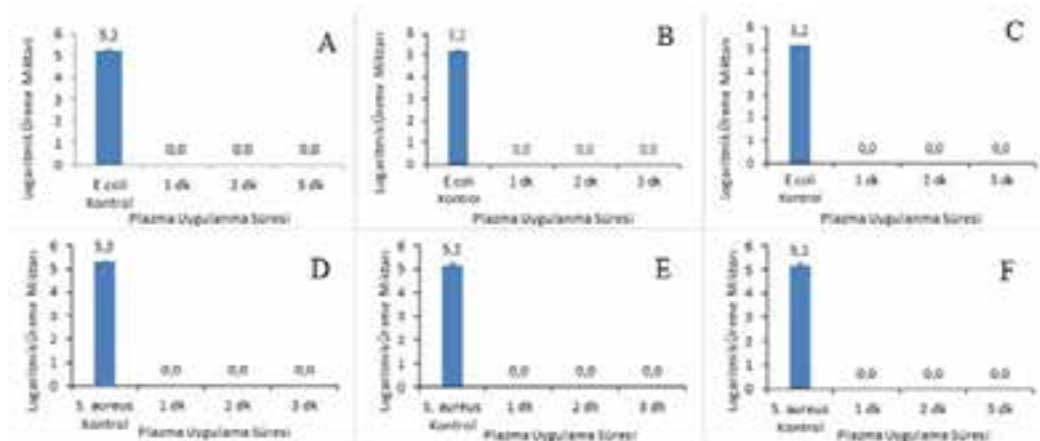
C. PEGDMA Solüsyonunun Hazırlanması

Foto başlatıcı olarak kullanılan Irgacure® 2959 (BASF, Almanya) 50 mg olarak tartılıp 10 ml steril phosphate buffered salinin (PBS) içerisinde ultrasonik su banyosu (Elmasonic, Türkiye) yardımıyla çözdürüldü. Denemelerde 3 farklı PEGDMA konsantrasyonu (%1, %5 ve %10 (w/v)) kullanıldığı için tartılan PEGDMA 1,5 ml'lik santrifüj tüplerine alındı ve Irgacure içeren 1 ml PBS içerisinde çözdürülerek hazırlandı.

D. Antimikrobiyal Testler

İlk antimikrobiyal deneme için hazırlanan PEGDMA solüsyonları plazma uygulaması için 500 μl 'lik hazneye alındı. Solüsyonlara her konsantrasyon için sırasıyla 1, 2 ve 3 dakika dielektrik bariyer deşarjları (DBD) elektrot ile plazma uygulandı (Şekil 1). Plazma uygulanan PEGDMA (PT-PEGDMA) solüsyonlarından 100 μl alınarak, 100 μl 10^6 CFU/ml (koloni oluşturan birimler) konsantrasyonda hazırlanan *E. coli* ve *S. aureus* solüsyonları ile 1,5 ml'lik santrifüj tüplerinde karıştırıldı ve 15 dakika bekletildi. PT- PEGDMA solüsyonları ile kontrol olarak plazma uygulanmamış olan PEGDMA solüsyonundan ve 10^3 CFU/ml *E. coli* ve *S. aureus* solüsyonlarından 100 μl alınıp petri kaplarında bulunan Tryptic Soy Agar (TSA) ortamına ekildi. Petri agar sıvıyı tamamen çektikten sonra 37°C 'de 24 saat inkübe edildi.

Diğer antimikrobiyal çalışma için hazırlanan %1, %5 ve %10 (w/v) oranlarında PEGDMA solüsyonlarından 250 μl alınarak 10^6 CFU/ml *E. coli* ve *S. aureus* solüsyonları ile karıştırıldı. PEGDMA- organizma solüsyonuna 500 μl hacimli haznede 1, 2 ve 3 dakika DBD elektrot ile 5.0'da plazma uygulandı. PT-PEGDMA-organizma solüsyonları 10^3 CFU/ml'ye seyreltildi. Daha sonra 1, 2 ve 3 dakika plazma uygulanan PT-PEGDMA-organizma solüsyonları ile kontrol olarak plazma uygulanmamış olan PEGDMA solüsyonundan ve 10^3 CFU/ml *E. coli* ve *S. aureus* solüsyonlarından 100 μl



Şekil 2. Plazma uygulanan PEGDMA ile *E. coli* (A, B, C) ve *S. aureus* (D, E, F) bakterilerinin logaritmik üreme eğrileri.

Biyomalzeme 2

14 Ekim 2017 - 09.00-10.30 - Salon B

alınarak petri kaplarında bulunan TSA ortamına ekildi, agar sıvıyı tamamen çektikten sonra 37°C'de 24 saat inkübe edildi.

E. Hücre Enkapsülasyonu ve Canlılığı

Jelleşme için uygun güç yoğunluğunun ve UV uygulama süresinin belirlenmesi için PT-PEGDMA solüsyonları farklı güç yoğunluğuna ve değişken sürelerle maruz bırakıldı ve optimum parametreler belirlendi.

-80 °C'de cryo tüp içerisinde muhafaza edilen L929 fibroblast hücreleri deneyde kullanılmak üzere %10 FBS içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) ortamında çoğaltıldı. Çoğalan hücreler tripsin yardımıyla flask yüzeyinden kaldırıldı. Hücre konsantrasyonu 5×10^6 hücre/ml olacak şekilde kontrol grubu olan plazma uygulanmamış PEGDMA solüsyonu ve PT-PEGDMA solüsyonları ile karıştırıldı. UV, 550 mW/cm²'de 110 s uygulandı ve jelleşme gerçekleştirildi. Kalıp ile çıkarılan jeller çok gözlü pleytlere alınarak PBS ile yıkandı. PBS uzaklaştırıldıktan sonra üzerlerine besin ortamı eklendi. 36 °C'de %5 CO₂'li inkübatöre kaldırıldı. 1. gün hem MTT hem de LIVE/DEAD yapılırken 4. gün sadece MTT (3-(4,5 - Dimethylthiazol -2- yl) - 2,5 -Diphenyltetrazolium Bromide) yapıldı. Hücre kontrolü amaçlı yalnızca L929 hücreleri ekilerek MTT testi uygulandı.

III. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

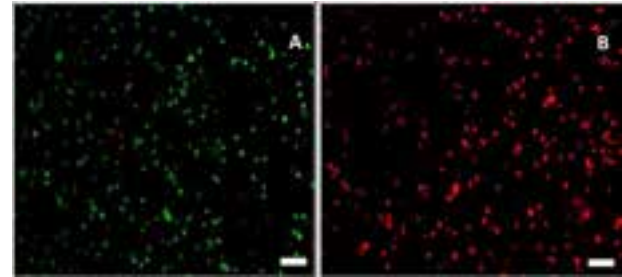
A. Antibakteriyel Testler

İlk antimikrobiyal deneme olarak plazma uygulanan %1, %5 ve %10 PEGDMA solüsyonları ile kontrol grubu olan plazma uygulanmamış PEGDMA solüsyonu *E. coli* ve *S. aureus* ile karıştırılıp, TSA ortamına ekildi. Diğer antimikrobiyal çalışmada ise PEGDMA ile 10^6 CFU/ml'ye seyreltilmiş olan bakteri kültürleri karıştırılıp plazma uygulandı, seyreltilerek ekildi. İnkübasyon sonucunda her iki deneme için de bütün konsantrasyonların kontrol grubunda üreme görüldü. Plazma uygulanmayan

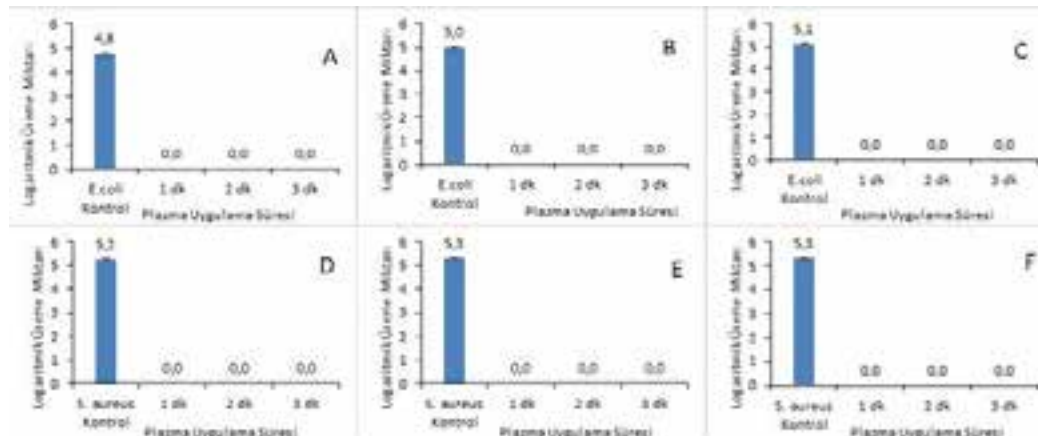
PEGDMA solüsyonunun her iki bakteri için de antimikrobiyal etkiye sahip olmadığı, değişen PEGDMA konsantrasyonunun bakterilerin çoğalma oranını etkilemediği belirlendi. PT-PEGDMA solüsyonlarında ise her konsantrasyon ve plazma uygulama süresi için her iki bakteri miktarında 5 log'dan fazla düşüş gözlemlendi (Şekil 2 ve Şekil 3). Oluşan antimikrobiyal etkinin plazma uygulaması sonucunda açığa çıkan reaktif oksijen ve azot türlerinden (ROS ve RNS) kaynaklandığı düşünülmektedir.

B. Hücre Enkapsülasyonu ve Canlılığı

Yapılan denemeler sonucunda jelleşme parametreleri optimize edilerek belirlendi. Fakat %1 ve %5 PEGDMA içeren plazma uygulanmış solüsyonlarda jelleşme hiçbir sürede gerçekleşmedi. Hücre çalışmalarına bu iki grup elenerek sadece %10 PEGDMA konsantrasyonu ile devam edildi. Kontrol olarak plazma uygulanmamış PEGDMA ile hazırlanan jellerde hücrelerin canlılıklarını sürdürdükleri belirlendi. Ayrıca kontrol grubundaki hücrelerin proliferasyonları MTT testi sonuçları ile desteklendi. 1. gün sonuçlarında PT-PEGDMA ile hazırlanan jelle hücrelerin canlı olmadıkları LIVE/DEAD testi ile görüldü. 1. ve 4. gün MTT testlerinin sonuçlarında PT- PEGDMA jellerinde hücrelerin canlı olmadıkları görülerek, LIVE/DEAD testi MTT testleri ile desteklenmiş oldu.



Şekil 4. %10 PEGDMA 1. gün LIVE/DEAD sonuçları, kontrol grubu (A), 3 dakika plazma uygulanan %10 PEGDMA (B), ölçek çubuğu 100 µm'dir.



Şekil 3. PEGDMA ile bakteri solüsyonları karıştırıldıktan sonra plazma uygulanması logaritmik üreme eğrileri, sırasıyla *E. coli* (A, B, C) ve *S. aureus* (D, E, F) bakterileri.



TIP TEKNO'17

TIP TEKNOLOJİLERİ KONGRESİ

12-14 Ekim 2017 / TRABZON

Karadeniz Teknik Üniversitesi, Prof.Dr. Osman Turan Kongre Merkezi



Biyomedikal ve Klinik
Mühendisliği Derneği



Elektrik-Elektronik Mühendisliği Bölümü
Bilgisayar Mühendisliği Bölümü

Biyomalzeme 2

14 Ekim 2017 - 09.00-10.30 - Salon B

Şekil 4'te plazma uygulanmamış kontrol grubu %10 PEGDMA ve 3 dakika plazma uygulanan %10 PEGDMA hidrojel çalışmasının 1. gün LIVE/DEAD sonuçları verilmiştir. Kontrol grubunda hücrelerin canlı olduğu, 3 dakika PT- PEGDMA hidrojelinde ise hücrelerin canlı olmadıkları (canlı hücreler floresan ışık ile yeşil, canlı olmayan hücreler kırmızı renk vermektedir) görülmüştür.

Hücrelerin plazma uygulaması sonucunda açığa çıkan ROS ve RNS'ten etkilendiği, bunun sonucunda hücrelerin canlılıklarını kaybettikleri, kontrol grubunda ise hücre canlılığının yüksek olması dolayısıyla PEGDMA'nın hücre proliferasyonunu desteklediği düşünülmektedir. Ayrıca ileride yapılacak çalışmalarda farklı sürelerde soğuk atmosferik plazma uygulanarak hücre denemelerine devam edilecektir.

KAYNAKÇA

- [1] Kanjickal, D., Lopina, S., Evancho-Chapman, M. M., Schmidt, S., Inbaraj, J. J., Cardon, T. B., Lorigan, G. A., "Electron spin resonance studies of the effects of sterilization on poly(ethylene glycol) hydrogels", 2008. *J Biomed Mater Res A*.
- [2] Killion, J. A., Geever, L. M., Devine, D. M., Kennedy, J. E., Higginbotham, C. L., "Mechanical properties and thermal behaviour of PEGDMA hydrogels for potential bone regeneration application", 2011. *JBMMB*, Vol. 4, 1219-1227.
- [3] Aragão-Neto, A. C., Soares, P. A. G., Lima-Ribeiro, M. H. M., Carvalho, E. J. A., Correia, Carneiroda-Cunha, M. G., "Combined therapy using Low Level Laser and Chitosan-Policaju Hydrogel for Wound Healing", 2016. *Int J Biol Macromol*.
- [4] Dai, Z., Ronholm, J., Tian, Y., Sethi, B., Cao, X., "Sterilization techniques for biodegradable scaffolds in tissue engineering applications", 2016. *J Tissue Eng*, Vol. 7: 1-13.
- [5] González-Henríquez, C. M., Sarabia-Vallejos, M. A., Rodríguez-Hernandez, J., "Advances in the Fabrication of Antimicrobial Hydrogels for Biomedical Applications", 2017. *Materials*, 10, 232.
- [6] Zhu, J., "Bioactive modification of poly(ethylene glycol) hydrogels for tissue engineering", 2010. *Biomaterials*, 31, 4639-4656.
- [7] Bäckström, S., Benavente J., Berg, R, V, Stibius K., Larsen M. S., Bohr, H., Hélix-Nielsen, C., "Tailoring Properties of Biocompatible PEG-DMA Hydrogels with UV Light", 2012. *Materials Sciences and Applications*, 3, 425-431.
- [8] Fridman, G., Friedman, G., Gutsol, A., Shekhter, A. B., Vasilets, V. N., Fridman A., "Applied Plasma Medicine", 2008. *Plasma Process. Polym.*, 5, 503-533.