



Stereolitografi Yöntemi ile Çok Katmanlı Kalp Kası Dokularının Üç Boyutlu (3B) Olarak Üretilmesi

Three Dimensional (3D) Fabrication of Multilayered Heart Valve Tissues by Stereolithography technique

Ali Akpek¹

1. Gebze Teknik Üniversitesi,
Biyomühendislik Bölümü,
Kocaeli Türkiye
aliakpek@gtu.edu.tr

Özetçe-Kardiyovasküler hastalıklar dünya çapında insanların ölümüne neden olan en yaygın hastalıklardır. Bu hastalıklar her yıl yaklaşık 20 milyon insanın ölümüne neden olurlar. Kardiyovasküler sistemlere her yıl 600,000 cerrahi müdahalede bulunmaktadır ve bunun maliyeti yaklaşık olarak 200 milyar dolar civarındadır. Kardiyovasküler hastalıklar arasında en yaygın olanları ise kalp krizine neden olan kalp kası hastalıklarıdır. Bu sorunun en önemli çözüm metodlarından birisi başta biyoyazıcılar olmak üzere çeşitli 3B organ biyofabrikasyonu metodları ile üretilmiş kalp dokusunun geliştirilmesidir. Bu çalışmanın amacı; 3B organ baskısı metodları arasında güncel metodlardan olan stereolitografi ile yüksek dayanım ve yüksek biyoyumumluluğa sahip endotelial miyokard dokusu ve aortik kalp kapakçıkları üretilmesini sağlamaktır.

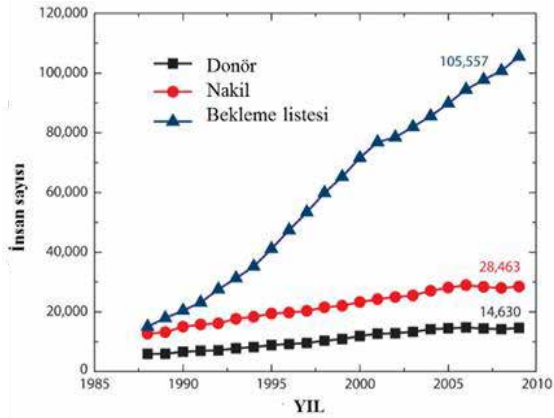
Abstract-Cardiovascular diseases represent the leading causes of worldwide morbidity and mortality. These diseases causes death of more than 20 million people annually. More than 600,000 cardiovascular surgical interventions are performed every year and this costs around 200 billion dollars. The most prevalent cardiovascular diseases are heart tissue diseases which cause heart attack. One of the most prominent solution for this problem is to develop heart valves and heart tissues that are fabricated by 3D organ biofabrication methodologies such as bioprinters. The purpose of this research is; to fabricate heart valves and endothelial myocard tissues that have high durability and high biocompatibility by the help of stereolithography which is the most trending technique among other 3D bioprinting techniques.

I. Giriş

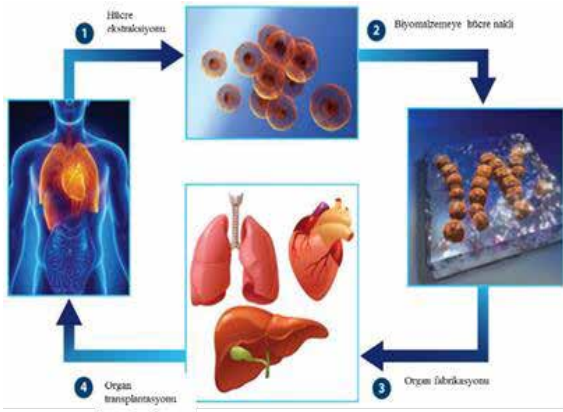
Geçen yıllar içerisinde organ transplantasyonu konusunda ihtiyaç sürekli olarak artmıştır. Organ nakline ihtiyaç sürekli olarak artarken organ bağıışı sayısında ciddi bir artış gözlenmemiştir. Bu sebeple her sene yüzbinlerce insan organ nakli için sırada beklerken hayatlarını kaybetmektedir. Bu sayı her yıl artmaktadır. **US Sağlık Bakanlığının (2017)** bu konu ile ilgili olarak gerçekleştirdiği çalışma **Şekil 1**'de görülmektedir [1]. Organ naklinin kendisini bir ihtiyaç olarak en çok belli ettiği alanlardan bir tanesi de kardiyovasküler hastalıklarıdır. Kardiyovasküler hastalıklar arasında en sık rastlanılan hastalıklar kalp kası dokusu rahatsızlıklarıdır. **Simionescu vd. (2012)** bildirdiğine göre kalp dokusundan kaynaklanan hastalıklar her yıl dünya genelinde 20 milyon insanın hayatına mal olmaktadır [2]. Her yıl 600,000 cerrahi müdahalede bulunmaktadır ve bu müdahaleler toplamda 200 milyar dolara mal olmaktadır. Öte yandan **Yacoup ve Takenberg (2005)**'in raporladığına göre her yıl 290,000'den fazla hasta kalp kapakçığı ameliyatı geçirmektedir [3]. Mevcut trend göz önünde bulundurulduğunda kardiyovasküler hastalıkların 2050 yılına kadar yılda üç katına ulaşacağı tahmin edilmektedir.

Kalp kası dokusunu çok katmanlı yapısı nedeniyle yapay olarak üretmek oldukça zordur. Miyokard dokular endotel katmanlarla kuşatılmalı ve bu dokular kan damarları ile beslenmelidir. **Chiu vd. (2011)** bu nedenlerden dolayı kalp kası dokularının laboratuvar ortamında üretilmelerinin ve klinik deneyler için kullanılmasının son derece güç olduğunu raporlamıştır [4]. Ancak kalp dokusu üretme çalışmaları gerek patoloji, gerek kardiyotoksisite gerekse de yeni ilaç geliştirilmesi çalışmaları için kritik ehemmiyete sahiptir.

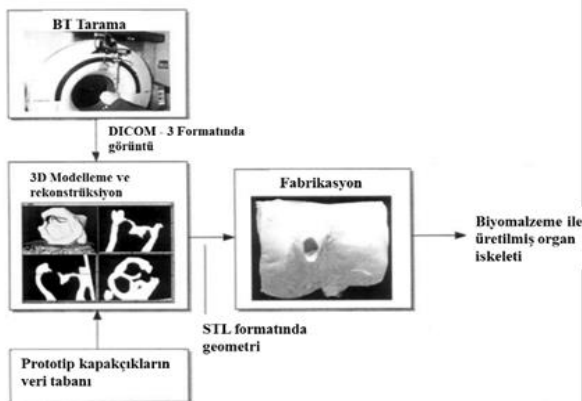
Bütün bu sebepler dolayısıyla stereolitografi gibi en güncel 3B biyoyazıcı teknikleri aracılığı ile biyoyumluluk ve biyomekanik özellikleri yüksek kalp kası dokuları üretilmeye çalışılması mecburidir. Bu araştırmanın motivasyonu bu özelliklere sahip endotel hücreler ile çevrelenmiş miyokard dokuları üretebilmek ve kardiyovasküler hastalıkların tedavisine yardımcı olmaya çalışmaktır. 3B organ biyofabrikasyonunun temel ilkeleri **Şekil 2'**de görülebilmektedir.



Şekil. 1: Yıllara göre donör ve nakil listesi [1]



Şekil 2 Biyofabrikasyon süreci [5]



Şekil. 3 Stereolitografi tekniğinin işlem süreci [6]

II. Materyal/Metod

2.1. MATERYAL

2.1.1. PEGDA-GELMA Karışımı Hazırlığı

PEGDA (Polyethylene Glycol Diacrylate: Type A: M_n 700) Sigma-Aldrich şirketinden edinildi ve 30% oranında sulandırıldı. 0.5% photoinitiator hazırlandı ve sulandırılmış PEGDA ile kullanıldı.

GelMA Hosseini *et al.* [7] tarafından belirtildiği gibi hazırlandı. 10 g gelatin domuz derisi, 8 mL methacrylic anhydride ve 100 mL PBS karıştırıldı. Acrylation reaksiyonu 50°C altında 3 saat karıştırılarak elde edilmiştir. Reaksiyon karışım ıltılmış PBS (40°C) ile karıştırıldıktan sonra sona ermiştir. Karışım daha sonra 40°C'ye ıltılmış damıtılmış su ile 1 hafta süre ile 12-14 kDa'luk süzme tüplerinde süzülmüştür. Akabinde bir hafta süre ile liyofize edilmiştir.

2.1.2. 3D Yazıcı

FormLabs Form 1+ üç boyutlu yazıcısı stereolitografi adı verilen bir teknoloji kullanmaktadır. Bu teknoloji ile yazıcı başlığı sıvı reçine dolu bir rezervuarın içerisine daldırılmakta ve ağır ağır yukarı hareket ettirilerek katı bir üç boyutlu yapının ortaya çıkması sağlanmaktadır. Daha detaylıca açıklamak gerekirse, yazıcı başlığı yavaşça rezervuardan yukarı doğru kaldırıldıkça bir ultraviyole lazer ışını cam olan rezervuar tankın altından sıvı reçineye ulaşmakta, buradan geçerek yazıcı başlığına ulaşmaktadır. Ultraviyole lazere maruz kalmış olan reçine sertleşmektedir. Katman katman reçine sertleştikçe yavaş yavaş yazıcı başlığı yukarı çekilmekte ve her katman birbiri ile bağ yapılar oluşturarak üç boyutlu şekli oluşturmaktadır. Bu şekilde bir süre sonra üç boyutlu yapı tamamen rezervuar tankından ayrılmakta ve yazıcı başlığı üzerinde şekillenmektedir [8].



Şekil. 4 Formlabs 1+ 3D Yazıcı [8]



2.1.3. Hücre Kültürü

Kardiyak Fibroblast hücreleri (NIH-3T3) DMEM, 10% (v/v) FBS ile 5% CO₂ atmosfer basıncı altında 37°C ve 1% (v/v) P/S ile kültür edilmiştir. Hücre mediası uzun inkübasyon süreci nedeni ile her üç günde bir taze media ile değiştirilmiştir. Hücreler 70-80% konfluens ile 0.25% (w/v) trypsin/0.1% (w/v) EDTA kullanılarak toplanmış ve deneyler için kullanılmıştır.

2.1.4. PEGDA-GELMA Karışımında Hücre Süspansiyonu Hazırlanması

Hücre yüklü yapıların oluşturulabilmesi için PEGDA:GelMA (1.5%:10% w/v) ve 0.5% (w/v) photoinitiator hazırlanmıştır. Akabinde oluşturulan hidrojel içerisinde hücre kültürü gerçekleştirilmiş, trypsin ile muamele edildikten ve hücre mediasında bir süre bekletildikten sonra 2-5×10⁶ cells mL⁻¹ konfluens ulaşması sağlanmıştır. Son olarak hücre yüklü hidrojel yapılar stereolitografi için özel olarak tasarlanmış rezervuara yerleştirilmiş ve cihazın UV ışınlarına maruz kalması ve arzulanan modelde kalp kası olması temin edilmeye çalışılmıştır. Model üretildikten sonra da hücre çoğalması ve bağlanmasının temin edilebilmesi maksadı ile inkubatörde 2-3 gün bekletilmiştir.

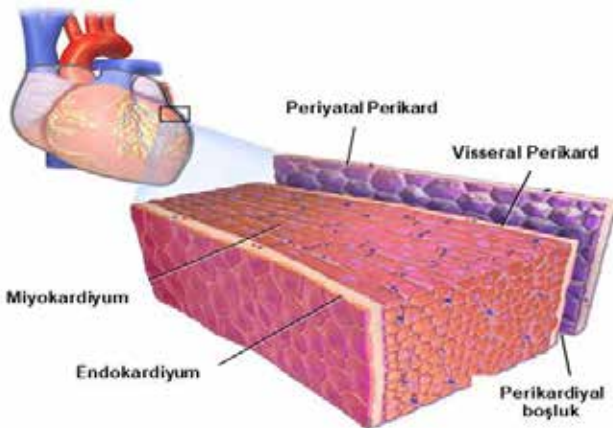
2.1.5. Mikroskop Analizi

Mikroskop görüntüleri Zeiss Axio Vert.A1 inverted mikroskop ve inverted Nikon Eclipse Ti mikroskop aracılığı ile elde edilmiştir. Mikroskopa bağlı bir CCD kamera görüntüleri kaydetmek için kullanılmıştır.

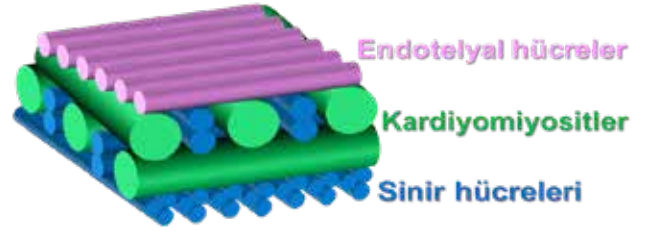
2.2. Deney

Şekil 3'te açıklandığı gibi BT görüntüsü stereolitografi amacı ile kullanılabilir. Ancak kalp hastaları için yüksek çözünürlükte kalp kası görüntüsü elde etmek kolay değildir. Bu nedenle bu çalışmada hali hazırda üretilmiş olan 3D CAM kalp kası modelleri kullanılmıştır.

2.2.1. Kalp Kası Dokusu Tasarımları



Şekil 5 Doğal kalp kası dokusunun 3 boyutlu olarak gösterilmesi

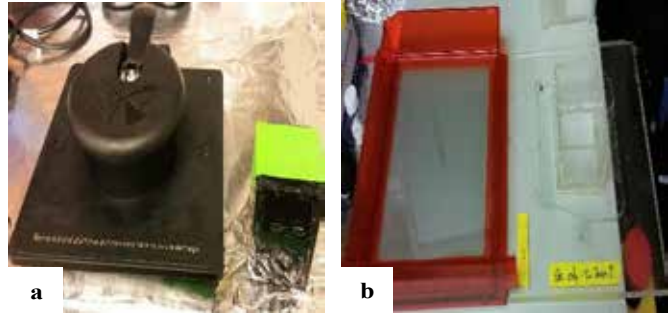


Şekil 6 Kalp kası dokusunun 3 boyutlu olarak üretilmesi için gerekli olan 3 boyutlu tasarım yöntemi

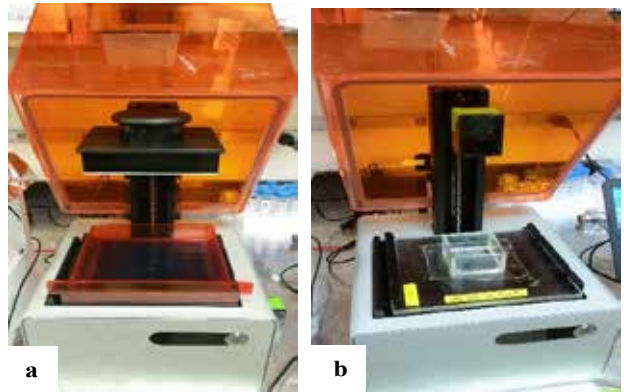
Kalp kası dokusu Şekil 5'te görüldüğü üzere temel olarak 3 katmandan oluşur. Bunlar perikardiyum katmanı, miyokardiyum katmanı ve endokardiyum katmanıdır.

Bu katmanlar üç boyutlu olarak üretmek için endotelyal doku olarak endotelyal hücreler ekilmeye çalışılmış, miyokardiyum dokusu olarak miyokardiyum hücreleri ekilmeye çalışılmış ve perikardiyal katman olarak sinir hücreleri ekilmeye çalışılmıştır. Bu durum Şekil 6'da gösterilmiştir.

2.2.2. 3D Yazıcının Biyoyazıcı olarak tasarlanması



Şekil 7 a) Yazıcı başlıkları. Soldaki Formlabs 1+ orijinal yazıcı başlığı sağdaki ise biyoyazıcı olması için yeniden tasarlanmış yazıcı başlığı b) Reseruar. Soldaki orijinal Formlabs 1+ rezervuarı, sağdaki biyoyazıcı olarak kullanılacak yeniden tasarlanmış rezervuar.

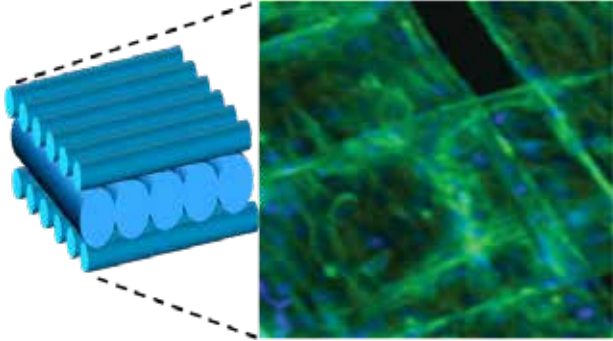


Şekil 8 a) Formlab Form 1+ 3D Yazıcı orijinal tasarım b) Biyoyazıcı olarak yeniden tasarlanmış

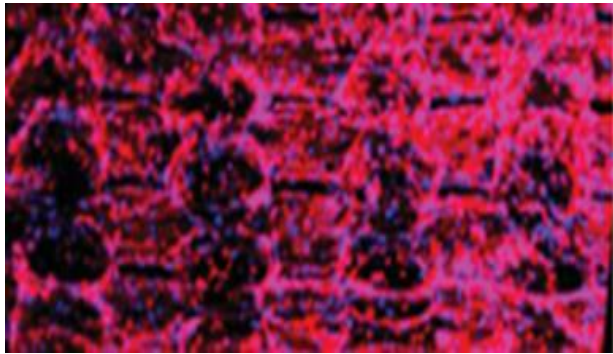
Formlab Form 1+, üç boyutlu yazıcılık işlemini gerçekleştirmek üzere tasarlanmıştır. Bu nedenle yazıcı başlığı ve rezervuarda bu amaca uygun olarak tasarlanmıştır. Ancak biyobaskılama amacıyla

kullanılacak biyomalzemeler oldukça pahalı ve üretilmesi güç olduğu için daha küçük bir rezervuar ve buna uygun daha küçük bir yazıcı başlığı tasarlamak şart olmuştur. Bu amaca uygun olarak tasarlanmış yazıcı başlığı ve rezervuar Şekil 7 ve Şekil 8'de gösterilmiştir.

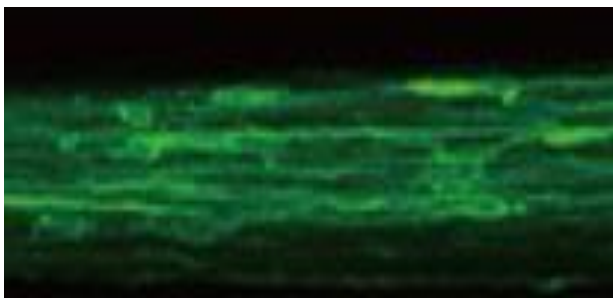
3. DENEY SONUÇLARI



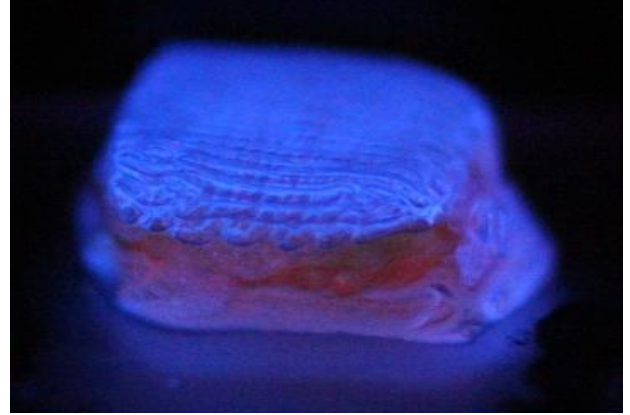
Şekil 9 Sinir hücreleri ekildikten sonra alınan görüntü



Şekil 10 Kardiyomiyosit hücreleri ekildikten sonra alınan görüntü



Şekil 11 Tek bir sinir lifinin yakından görüntüsü



Şekil 12 Bütün katmanlar ekildikten sonra ortaya çıkan çok katmanlı kalp kası dokusu

Şekil 9 üç boyutlu doku iskelesi oluşturulduktan ve sinir hücresi en alt katmana ekildikten sonra ekilmiş sinir hücrelerinin birbirleri ile ilişkisi gösterilmiştir. Hücrelerin canlı olduğu ve birbirleri ile bağ kurdukları görülebilir.

Şekil 10 yine aynı şekilde ikinci katmana kardiyomiyosit hücreleri ekilmesinden sonra elde edilmiş bir görüntüyü içermektedir. Hücrelerin sağlıklı ve birbirleri ile bağ kurdukları görülmüştür.

Şekil 11 bir tek sinir lifinin yakından görüntüsünü içermektedir. Sinir lifini oluşturan hücrelerin canlı oldukları görülebilir.

Şekil 12 ise üç katmanlı olarak kurgulanmış olan dokunun son şeklini göstermektedir. Üç boyutlu doku iskelesi hücre ekimlerinden sonra da yapısal olarak bütünlüğünü koruyabilmektedir.

4. SONUÇ

Çalışmada karşılaşılan en ciddi sorun baskı esnasında karşımıza çıkan üretime dair yapısal hatalardır. Özellikle biyouyumluluğu yüksek olan malzemeler stereolitografinin şiddeti düşük olan ultraviyole ışını altında yeteri kadar sertleşmemekte, bu nedenle de yapısal bütünlüğünü yeteri kadar koruyamamaktadır. Bu sorun temel olarak kardiyomiyosit hücrelerinin ekimine bir engel teşkil etmesinde kalp kasının klinik çalışmalar için kullanılmasına engel teşkil etmektedir. Yöntem ve malzemeler kusursuzlaştırmak üzere süreç iyileştirmelerinde bulunulmalıdır.

REFERANSLAR

- [1] US Dep. Health Hum. Serv. 2014. The need is real: data. Donate the gifts of life statistics and figures, US Dep. Health Hum. Serv., Washington, D.C, retrieved February 26, 2014. <http://www.organdonor.gov/about/data.html>
- [2] Simionescu, D.T., Chen, J., Jaeggli, M., Wang, B., Liao, J. 2012. "Form follows function: advances in trilayered structure replication for aortic hearth valve tissue engineering", J. Healthcare Eng., 3, 179-202.
- [3] Yacoub, M.H., Takenberg J.J.M. 2005. "Will heart valve tissue engineering change the world?", Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med. 2, 60-61.
- [4] Chiu, L., Lyer, R.K., Reis, L.A., Nunes, S.S., Radisic, M. 2011. "Cardiac tissue engineering: current state and perspectives",



Front. Biosci., 17, 1533-1550.

[5] Bajaj, P., Schweller, R.M., Khademhosseini, A., West, J.L., Bashir, R. 2014. 3D biofabrication strategies for tissue engineering and regenerative medicine. Annu. Rev. Biomed. Eng. 16: 247-76.

[6] Sodian, R., Loebe M., Hein, A., Martin, D.P., Hoerstrup S. 2002. Application of stereolithography for scaffold fabrication for tissue engineered heart valves. ASAIO Journal 48: 12-16.

[7] Hosseini, V., Ahadian, S., Ostrovidov, S., Camci-Unal, G., Chen, S., Kaji, H., Khademhosseini, A. (2012). Engineered contractile skeletal muscle tissue on a microgrooved methacrylated gelatin substrate. Tissue Engineering Part A, 18(23-24), 2453-2465

[8] Cnet, (2017, October 11) Retrieved from <http://www.cnet.com/products/formlabs-form-2-3d-printer/>