

**POLİKAPROLAKTONUN ELEKTROSTATİK EĞİRMESİ VE
RGD YÜZEY MODİFİKASYONU İLE PERİFERİK SİNİR
İYİLEŞME KANALLARI ÜRETİM VE
KARAKTERİZASYONU**

**PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF NERVE
REGENERATION CONDUITS BY ELECTROSPINNING OF
POLYCAPROLACTONE AND RGD SURFACE
MODIFICATION**

ERDİNÇ POLAT

Prof. Dr. ERHAN BIŞKİN

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2013

ERDİNÇ POLAT'ın hazırladığı "**Polikaprolaktonun elektrostatik eğirmesi ve RGD yüzey modifikasyonu ile periferik sinir iyileşme kanalları üretim ve karakterizasyonu**" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **NANOTEKNOLOJİ ve NANOTIP ANABİLİM DALI**'ında **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan

(Prof. Dr. Tülin KUTSAL)

Danışman

(Prof. Dr. Erhan BİŞKİN)

Üye

(Prof. Dr. Ayşe Kevser ÖZDEN)

Üye

(Doç. Dr. Mustafa TÜRK)

Üye

(Yrd. Doç. Sinan EĞRİ)

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

.... / / 20...

İmza

Öğrenci Adı ve Soyadı

ÖZET

POLİKAPROLAKTONUN ELEKTROSTATİK EĞİRMESİ VE RGD YÜZEY MODİFİKASYONU İLE PERİFERİK SİNİR İYİLEŞME KANALLARI ÜRETİM VE KARAKTERİZASYONU

ERDİNÇ POLAT

Yüksek Lisans, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. ERHAN BİŞKİN

İkinci Tez Danışmanı: Prof. Dr. DELING KONG

Ağustos 2013, 91 sayfa

Periferik sinir yaralanmaları, trafik kazaları, spor yaralanmaları, doğum sırasında oluşan komplikasyonlar ve çatışmalardan kaynaklanan yaralanmalar gibi çeşitli nedenlerle oluşabilen, klinikte cerrahların en sık karşılaştıkları sağlık problemleri arasındadır. Araştırmacılar, sinir fonksiyonlarının geri kazanımı için çeşitli yaklaşımlar geliştirmişlerdir. Bunlar içerisinde, uzun sinir kesilerinin iyileştirilmesi için uygulanan otolog sinir greftleri "altın standart" tedavi olarak kabul edilmektedir. Ancak bu tedavi yönteminin beraberinde getirdiği, greft materyalinin sınırlı olması, uygulanacak doku ile arasında yapı ve ölçü uyumsuzluğu, donör alan morbiditesi ve çoklu cerrahi müdahalelere gereksinim duyulabilmesi gibi dezavantajları mevcuttur. Sinirin proksimal ve distal segmentleri arasındaki boşlukta bir köprü görevi görerek rejenerasyonu sağlayacak alternatif tedavilerin geliştirilmesi gerekmektedir. Otogreftlerin yarattığı kısıtlamaların üstesinden gelmek amacıyla yapay sinir kanalları üzerine kapsamlı araştırmalar yapılmaktadır. Tez çalışmasının amacı, elektrostatik eğirme (elektrospinning) yöntemi ile biyobozunur, biyoyumlu, uygun mekanik özelliklere sahip arjinin-glisin-aspartik asit (RGD) hücre tanıma sekansı ile kaplanmış poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) sinir kanallarının oluşturulmasıdır. Çalışma kapsamında, elektrostatik eğirme yöntemiyle 2 mm iç çap ve 500 μ m duvar kalınlığına sahip biyoyumlu PCL

sinir kanalları hazırlanmıştır. PCL sinir kanalları, ortalama çapı 500 - 650 nm aralığında olan PCL fiberlerinden oluşmaktadır. Hazırlanan doku iskeleleri, PCL fiberler üzerinde RGD tabakası oluşturmak için Nap-FFGRGD (hidrofobik naftalin grubu ve RGD üçlü peptid dizisi içeren bir molekül) molekülü ile muamele edilmiştir. Sistemde kullanılan solüsyonun nanofiber yapıları üzerindeki etkisini değerlendirmek, başarılı bir periferik sinir rejenerasyon süreci için gerekli olan uygun fiber ölçülerini ve kanal duvar kalınlığını belirlemek amacıyla PCL nanofibröz doku iskeleleri taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile karakterize edilmiştir. PCL membran ve kanalların mekanik özelliklerinin değerlendirilmesi çekme testi ile gerçekleştirilmiştir. PCL kanalların azami gerilme gücü 5.9206 ± 0.8437 MPa, elastisite modülü ise $0,24844 \pm 0,00152$ MPa'dır. Oluşturulan kanalın termal özellikleri ve biyobozunurluk oranı, büyük sinir kesili şiddetli yaralanmaların tedavisi için uygun ortamın sağlanabileceğine işaret etmektedir. PCL fiberler üzerine RGD kaplamanın etkinliğini gözlemlemek, PCL ve RGD kaplı PCL doku iskelelerinin hidrofilitelerini değerlendirmek amacıyla su değme açısı testi yapılmıştır. Sonuçlar, RGD ile kaplamanın değme açısını $120,284 \pm 5,162^\circ$ 'den $40,583 \pm 3,589^\circ$ 'ye düşürdüğü bu sayede hücrelerin doku iskelesi üzerine tutunması ve yayılmasına olanak sağlayacağı düşünülmektedir. PCL fiberler üzerindeki RGD peptid tabakasının görüntülenmesi, floresan özellikteki FITC probu ile işaretlenmiş Nap-FFGRGD molekülü ile kaplama işlemi yapılarak gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan doku iskelelerinin hücreler ile etkileşimi L929 hücreleri ile yapılan uygulamalarla değerlendirilmiştir. WST-1 analizi ile L929 hücrelerinin PCL ve RGD kaplı PCL doku iskeleleri üzerindeki metabolik aktivitesi ölçülmüştür. Sonuçlar, 48 saatlik periyot sonunda RGD kaplı PCL doku iskelesi üzerinde hücrelerin metabolik aktivitesinin daha yüksek olduğunu göstermektedir. Nekrotik hücrelerin oranını belirlemek ve morfolojik değerlendirmesini yapabilmek için Hoechst/PI (ikili boyama solüsyonu) kullanılmıştır. İkili boyama analizi sonuçları, PCL kanallar ile karşılaştırıldığında, RGD ile kaplı PCL kanallar üzerinde nekrotik hücrelerin oranının önemli ölçüde azaldığını göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Biyobozunur polimerler, PCL, Elektrostatik eğirme, Nap-FFGRGD, RGD modifikasyonu, Sinir kanalı, L929 fibroblast hücreleri

ABSTRACT

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF NERVE REGENERATION CONDUITS BY ELECTROSPINNING OF POLYCAPROLACTONE AND RGD SURFACE MODIFICATION

ERDİNÇ POLAT

Master of Science, Nanotechnology and Nanomedicine Division

Supervisor: Prof. Dr. ERHAN BİŞKİN

Co-Supervisor: Prof. Dr. Deling Kong

August 2013, 91 pages

Peripheral nerve injuries that clinical surgeons are facing today are among the most frequently occurring health problems which are the results of several very unpleasant incidents including traffic accidents, sports injuries, complications at birth, and unfortunately, woundings that result from fights. Researchers have developed various strategies for recovery of nerve functions. Autologous nerve grafts are considered as “gold standard” for bridging long gaps, but this method has inherent disadvantages, such as limited supply, potential mismatch of tissue structure and size, donor site morbidity and need for multiple surgeries. Development of alternative treatments is necessary to bridge the gap between the proximal and the distal nerve stumps. To overcome the limitations of autografts, intensive researches are being conducted investigating artificial nerve conduits. The aim of this study is to produce a biodegradable, biocompatible, having a proper mechanical properties poly(ϵ -caprolactone) (PCL) electrospun fibrous nerve conduits coated with arginine-glycine-aspartic acid (RGD) cell recognition sequence. In this thesis, biocompatible nanofibrous PCL nerve conduits with a 2 mm inner diameter and about 500 μm wall thicknesses were prepared by electrospinning. PCL nerve conduits were composed of polymer nanofibers with average diameters in the range of 500 - 650 nm. These scaffolds were further

treated with Nap-FFGRGD (a molecule containing RGD tripeptide and hydrophobic naphthalene groups) thereby soaking in required solution to form an RGD layer on PCL nanofibers. Morphology of the PCL nanofibrous scaffolds were characterized to evaluate the effect of solution system on nanofibers structure and to find suitable size of fibers, wall thickness of conduits for a successful peripheral nerve regeneration by scanning electron microscopy (SEM). Tensile test was used to assess the mechanical properties of PCL membranes and conduits. PCL conduits having ultimate tensile strength of 5.9206 ± 0.8437 MPa and young modulus of 0.24844 ± 0.00152 MPa. The thermal properties and *in vitro* biodegradability rate of scaffolds indicated that the RGD modified nerve conduits could provide appropriate conditions to recover severe nerve injuries with long gap. The contact angle of the scaffolds was tested to assess hydrophilicity of PCL and RGD/PCL samples and get information about the effectiveness of RGD coating on PCL surfaces. Our results showed that by addition of RGD, water contact angle was decreased from $120.284 \pm 5.162^\circ$ to $40.583 \pm 3.589^\circ$ which could facilitate cells to attach and spread. RGD peptides layer was visualized on surface of PCL fibers with coating FITC-labeled Nap-FFGRGD as fluorescent probe. The metabolic activity of L929 cells on PCL and RGD/PCL scaffolds was measured using WST-1 assay. Data shows that cell metabolic activity on RGD coated PCL scaffolds at 48-h period was higher than PCL scaffolds. Hoechst staining combined with propidium iodide (double staining solution) was used for necrosis quantification and morphological examination of L929 fibroblasts. According to double staining assay, the average number of necrotic cells on RGD functionalized PCL nerve conduits was decreased significantly as compared to PCL nerve conduits.

Keywords: Biodegradable polymers, PCL, Electrospinning, Nap-FFGRGD, RGD modification, Nerve conduit, L929 fibroblast cells

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim sürecinde, engin bilgi ve tecrübeleri ile bana aydınlatıcı bir yol çizen ve tez çalışmamın her aşamasında çok büyük katkısı bulunan değerli Hocam **Prof. Dr. Erhan Bişkin'e**,

Tez çalışmamın ortak danışmanı olarak her türlü yardımı sağlayan, evimden çok uzaklarda dahi olsam bana bunu hissettirmeyen, laboratuvarında çalışma imkanı sunan kıymetli Hocam **Prof. Dr. Deling Kong'a**,

Tezim kapsamında bulunan *in vitro* çalışmalardaki değerli katkılarından dolayı **Doç. Dr. Mustafa Türk'e**,

Bilim anlayışımın şekillenmesinde değerli katkıları bulunan, yüksek lisans eğitimimin belirli bir aşamasında çalışma şerefine nail olduğum **Dr. Nurşen Sözer**, **Dr. Leilei Zhu** ve **Prof. Dr. Ulrich Schwaneberg'e**,

Hiçbir konuda yardımlarını esirgemeyen, aynı çalışma ortamını paylaşmaktan zevk duyduğum kıymetli arkadaşlarım **Araz, Atakan, Ayfer, Behzad, Duygu, Erhan, İlyas, Kourosh, Mehmet, Selçuk, Duo Mao, Meifeng Zhu, Wang Kai, Wenting Zheng, Meng Xu, Hong Su, Jie Gao** ve **Yinxing Wu'ya**,

Tez çalışmamda ve her konuda, her zaman yanımda olduklarını bildiğim yol arkadaşlarım **Özge Ekin Tunçay, Özgür Yenidoğan** ve **Sitem Şahin'e**,

İhtiyaç duyduğum her an değerli fikirleri ile bana destek olan, kadim dostum **Tansel Uyar'a**,

Tüm hayatım boyunca en büyük destekçim olan, verdikleri sonsuz emek ve sevgi için ne kadar minnet duysam az olduğunu bildiğim **Annem, Babam** ve **Ablam'a**

TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Sinir Sistemine Genel Bir Bakış	5
2.1.1. Periferik Sinir Sisteminin Yapısı ve İşleyişi	6
2.2. Periferik Sinir Yaralanmaları	7
2.2.1. Periferik Sinir Yaralanmasında Dejenerasyon ve Rejenerasyon Süreci	8
2.2.2. Periferik Sinir Yaralanmalarında Tedavi Yaklaşımları	10
2.2.2.1. Nörorafi	11
2.2.2.2. Nörotizasyon	11
2.2.2.3. Sinir Greftleri	11
2.2.2.4. Sinir Kanalları	12
2.3. Sinir Kanalı Üretiminde Kullanılan Biyomalzemeler	16
2.3.1. Doğal Polimerler	16
2.3.2. Sentetik Polimerler	17
2.4. Nanofibröz Sinir Kanalları Üretim Teknikleri	19
2.4.1. Çekme Yöntemi	19
2.4.2. Kalıp Sentezi Yöntemi	19

2.4.3.	Kendiliğinden Düzenlenme Yöntemi	19
2.4.4.	Faz Ayırımı Yöntemi	20
2.4.5.	Elektrostatik Eğirme	20
2.5.	Sinir Kanalı Yüzeyinin Fonksiyonlandırılması	27
2.5.1.	RGD Peptid Dizisi	27
3.	MATERYAL VE METOD	30
3.1.	RGD ile Kaplanmış PCL Sinir Kanallarının Hazırlanmasında Kullanılan Kimyasal Maddeler	30
3.2.	RGD Kaplı PCL Sinir Kanallarının Hazırlanması	32
3.2.1.	Elektrostatik Eğirme Sistemi Parametrelerinin Optimizasyonu	32
3.2.2.	Elektrostatik Eğirme Yöntemi ile Sinir Kanallarının Hazırlanması	35
3.2.3.	Sinir Kanallarının Yüzeyinin RGD ile Kaplanması	39
3.3.	Karakterizasyon Testleri	40
3.3.1.	Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM)	40
3.3.2.	Gerilme - Uzama Testi	42
3.3.3.	PCL Membran ve Kanalların <i>In vitro</i> Koşullarda Biyobozunurluğunun Değerlendirilmesi	45
3.3.4.	Diferansiyel Taramalı Kalorimetri	45
3.3.5.	Su Temas Açısı Testi	48
3.3.6.	FITC İşaretli Nap-FFGRGD ile PCL Kanalların Kaplanması	50
3.4.	<i>In Vitro</i> Çalışmalar	52
3.4.1.	Hücre Canlılık Analizi	52
3.4.2.	İkili Boyama Tekniği ile Hücre Ölüm Oranının Belirlenmesi	55

4.	DENEYLER SONUÇLAR VE TARTIŞMA	57
4.1.	Elektrostatik Eğirme Sistemi ile Hazırlanmış RGD Kaplı PCL Periferik Sinir Rejenerasyon Kanalları	57
4.2.	Taramalı Elektron Mikroskopu Analizi	58
4.3.	Doku İskelelerinin Mekanik Özellikleri	65
4.4.	Doku İskelelerinin <i>In vitro</i> Koşullarda Biyobozunurluk Özellikleri	68
4.5.	Doku İskelelerinin DSC Yöntemiyle Saptanan Isıl Özellikleri	69
4.6.	RGD ile Kaplanmış PCL Kanalların Hidrofilitesi	72
4.7.	FITC İşaretli Nap-FFGRGD ile Kaplanan PCL Kanallar	74
4.8.	<i>In vitro</i> Çalışmaların Sonucu	76
4.8.1.	WST-1 Analizi Sonuçları	76
4.8.2.	Doku İskeleleri Üzerindeki L929 Hücrelerinin Canlılık Durumu	77
5.	GENEL SONUÇLAR	80
	KAYNAKLAR	84
	ÖZGEÇMİŞ	91

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Merkezi ve Periferik Sinir Sisteminin Temel Yapısı.....	6
Şekil 2.2. Periferik Sinirin Çapraz Kesit Anatomisi.....	7
Şekil 2.3. Periferik sinir sisteminde aksonun kesilmesi sonucu oluşan yanıt. Çoğalan Schwann hücreleri, makrofajlar ve monositler ayrılmış miyelin kılıf parçalarını ortadan kaldırmak, nörotropinleri salgılamak ve aksonlara sinaptik hedeflerine doğru rehberlik etmek için birlikte çalışarak nöronal fonksiyonun geri kazanılmasını sağlarlar.....	9
Şekil 2.4. Seddon ve Sunderland'in bulgularına göre sinir yaralanmasının sınıflandırılması.....	10
Şekil 2.5. Sinir kaybının tedavisi için sinir kanalı kullanımı.....	13
Şekil 2.6. Poli-ε-kaprolakton (PCL) polimerinin açık formülü.....	18
Şekil 2.7. Elektrostatik eğirme düzeneği.....	21
Şekil 2.8. Taylor Konisinin oluşumu ve jet akışının başlaması: Elektrik alan şiddetinin zamanla artırılması ile polietilen oksit (PEO) çözeltisinin damlacığında meydana gelen değişimler.....	22
Şekil 2.9. a) Polimer jetinin hareketi boyunca izlediği yörünge: Doğrusal yörünge kırmızı, birinci bükülme sarmalı sarı ve üçüncü bükülme sarmalı mavi renk ile belirtilmiştir b) PCL çözeltisinden oluşturulmuş nanofiberler: Polimer jetinin karakteristik hareketi sonucu toplayıcı yüzeye varması ile oluşan mikro/nano ölçekte fiberler.....	23
Şekil 2.10. Nap-FFGRGD molekülünün kimyasal formülü.....	28
Şekil 2.11. Nap-FFGRGD molekülünün hücre tutunmasındaki rolü I) Nap-FFGRGD molekülünün hidrofobik yüzey üzerinde kendiliğinden düzenlenerek tekli katman oluşturması II) RGD sekansının integrin aracılı hücre yapışması için ligand görevi görmesi.....	29
Şekil 3.1. Elektrostatik eğirme işleminde kullanılan 21 gauge'lik paslanmaz çelik iğne.....	33
Şekil 3.2. Elektrostatik eğirme sistemi ile polimer çözeltisinden membran oluşturmak için kullanılan döner çelik silindir toplayıcı a) Toplayıcının şematik resmi b) Tez çalışmasında kullanılan toplayıcının bir örneği (sarı dikdörtgen içerisinde belirtilmiştir).....	34
Şekil 3.3. Tübüler yapılar oluşturmak için tasarlanmış olan toplayıcı sistemi a) Solda şırıngalı pompa, pompaya yerleştirilmiş olan şırınganın 21 gauge'lik iğnesinin ucuna takılı güç kaynağından çıkan elektrot; sağ tarafta iğneden belli bir	

uzaklıkta konumlandırılmış toplayıcı sistemi b) Toplayıcı sisteminin daha yakından görüntüsü c) Toplayıcı sisteminin rodu üzerinde PCL fiberlerin biriktirilmesi d) Spiral bir yörünge izleyerek rod üzerine sarılan PCL polimerin jet akışı	36
Şekil 3.4. Çelik rodlar üzerine sarılmış PCL fiberler	37
Şekil 3.5. Taramalı Elektron Mikroskopisi	41
Şekil 3.6. a) Çekme-Uzama Grafiği b) 1- Malzemenin çekme-uzama testi öncesinde ve elastik esneme anındaki durumu 2- Malzeme üzerindeki yükün en üst seviyeye ulaştığında daha fazla homojen uzama gerçekleşmediğinden malzemede boyun oluşumu meydana geliyor 3- Kopma anına dek plastik bölge aralığında malzemenin boyun kısmında uzama devam ediyor 4- Uzamanın yalnızca boyun kısmında gerçekleştikten belirli bir süre sonra kopma gerçekleşiyor	43
Şekil 3.7. Testometric M500-25 CT Materials Testing Machine (The Testometric Company Ltd, İngiltere)	44
Şekil 3.8. Amorf ve kristalin özellikteki polimer zincirlerinin yapısı	46
Şekil 3.9. DSC sisteminin temel üniteleri	47
Şekil 3.10. DSC analizinden elde edilen ısı akışı-sıcaklık grafiği	47
Şekil 3.11. Sessile Damla Yöntemi	49
Şekil 3.12. Değme açısı (θ)' nın genişliğine bağlı olarak değerlendirilen hidrofobik ve hidrofilik yüzey	50
Şekil 3.13. Floresin molekülünün yapısının alt halkasında bulunan bir hidrojen atomunun yerine izotiyosiyanat grubu eklenmesiyle FITC molekülünün oluşumu	51
Şekil 3.14. Mitokondriyal süksinat dehidrogenaz enzimi ile WST-1'den formazan tuzu oluşumu. (EC: Elektron bağlayıcı reaktif, RS: Mitokondriyal süksinat-tetrazolyum-redüktaz sistemi)	53
Şekil 3.15. Farklı ağırlıkta doku iskelelerinin bulunduğu 24 kuyucuklu mikroplaka	54
Şekil 4.1. Elektrostatik eğirme yöntemiyle oluşturulmuş PCL kanallar a) 2 cm uzunluğunda PCL kanal b) 2 cm uzunluğunda ve 2 mm iç çapa sahip PCL kanallar c) 2 mm çapında farklı uzunluktaki PCL kanallar	58
Şekil 4.2. Farklı parametreler kullanılarak hazırlanmış PCL filmlerin görüntüsü. Görüntüde her bir satırın başında o satırdaki örneklerin oluşturulmasında uygulanmış olan akış hızı ve her bir sütunun üzerinde o sütundaki örneklerin oluşturulmasında uygulanmış olan gerilimler gösterilmektedir	59

Şekil 4.3. İki farklı PCL membranının SEM görüntüsü a) Membran parametreleri; Akış Hızı: 4 ml/sa, Gerilim: 12 kV. Boncuk yapılarından bir kaç sarı halkaların içerisinde gösterilmiştir. b) Membran parametreleri; Akış Hızı: 2 ml/sa, Gerilim: 18 kV. (Tez çalışmasında nihai kanalları oluşturmak için tercih edilen) PCL kanallarının oluşturulması için seçilen parametrelerdir. Boncuk oluşumu gözlenmemiştir, yapı daha homojendir	61
Şekil 4.4. Farklı sürelerde oluşturulmuş, farklı duvar kalınlığına sahip PCL kanallar a) 40 dakika, duvar kalınlığı: $740,75 \pm 87,910 \mu\text{m}$ b) 35 dakika, duvar kalınlığı: $698,75 \pm 34,712 \mu\text{m}$ c) 25 dakika, duvar kalınlığı: $550 \pm 53,410 \mu\text{m}$ d) 20 dakika, duvar kalınlığı: $424 \pm 35,534 \mu\text{m}$	62
Şekil 4.5. PCL sinir kanalının yapısal görüntüsü a) Kanalın enine kesiti b) Kanal duvarı c) Kanalı oluşturan fiberlerin enine kesiti d) Kanalın dış yüzeyi e) Kanalın iç yüzeyi	63
Şekil 4.6. RGD ile kaplanmış olan PCL fiberler çaplarının, normal PCL fiberler ile karşılaştırılması; PCL: Ortalama fiber çapı $590,25 \pm 21,612 \text{ nm}$, RGD/PCL: Ortalama fiber çapı $545,6 \pm 25,816 \text{ nm}$	64
Şekil 4.7. PCL membranının gerilme - uzama grafiği	65
Şekil 4.8. PCL kanalın gerilme - uzama grafiği	66
Şekil 4.9. PCL membranının DSC termogramı	70
Şekil 4.10. RGD ile kaplı PCL membranının DSC termogramı	71
Şekil 4.11. PCL ve RGD kaplı PCL membran üzerindeki su damlacığının durumu	72
Şekil 4.12. PCL ve RGD kaplı PCL kanalın su değme açısı testi	73
Şekil 4.13. FITC-işaretleli RGD peptidi ile kaplanmış PCL fiberlerin konfokal mikroskop görüntüsü a) PCL membran b) RGD ile kaplanmış PCL membran c) PCL kanalın enine kesiti d) RGD ile kaplanmış PCL kanalın enine kesiti e) RGD ile kaplanmış PCL kanalın daha yakından enine kesiti f) RGD ile kaplanmış PCL kanalın daha yakından enine kesiti	75
Şekil 4.14. İkili boyama tekniğiyle boyanmış L929 hücrelerinin kontrol grubu ve farklı ağırlıklardaki doku iskeleleri üzerindeki durumu. Mavi olarak görünenler Hoechst ile boyanmış canlı veya apoptotik hücreler, kırmızı olarak görünenler PI ile boyanmış nekrotik hücreler	78

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. FDA onaylı sinir kanalları.....	15
Çizelge 2.2. Elektrostatik eğirme parametreleri ve fiber morfolojisi üzerine etkileri.....	24
Çizelge 2.3. Nanofibröz doku iskelesi üretim tekniklerinin karşılaştırılması.....	26
Çizelge 3.1. Doku iskelelerinin sentezi için kullanılan kimyasallar.....	31
Çizelge 4.1. PCL membranın gerilme - uzama grafiği ve mekanik test sonuçları.....	66
Çizelge 4.2. PCL kanalın gerilme - uzama grafiği ve mekanik test sonuçları.....	67
Çizelge 4.3. Doku iskelelerinin bozunma testi öncesi ve sonrasında ağırlıklıkları.....	69
Çizelge 4.4. PCL ve RGD ile kaplı PCL doku iskelelerinin ısıl özellikleri.....	71
Çizelge 4.5. L929 hücrelerinin PCL ve RGD kaplanmış PCL doku iskeleleri üzerindeki % metabolik aktivite sonuçları.....	77
Çizelge 4.6. Doku iskeleleri üzerinde % nekrotik L929 hücre oranları.....	79

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

θ : Su değme açısı

A: Yükün uygulandığı kesit alanı

E: Elastisite modülü

J: Joule

L: Uzunluk

P: Yük

ΔL : Uzama miktarı

ε : Uzama

σ : Gerilme

Kısaltmalar

ASTM: American Society for Testing and Materials

C_2H_6O : Etanol

CH_3OH : Metanol

$CHCl_3$: Kloroform

DSC: Diferansiyel Taramalı Kalorimetri

ECM: Ekstraselüler Matriks

FDA: The Food and Drug Administration

FITC: Floresan izotiyosiyanat

FITC: Floresan izotiyosiyanat

kN: Kilonewton

kV: Kilowatt

LSCM: Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop

MPa: Megapaskal

MSS: Merkezi Sinir Sistemi

MTT: [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid]

N: Newton

N₂(l):Sıvı Azot

Na₂CO₃: Sodyum Karbonat

NaCl: Sodyum Klorür Çözeltisi

Nap-FFGRGD: Hidrofobik naftalin grubu ve RGD üçlü peptid dizisi içeren molekül

Pa: Paskal

PBS: Fosfat Tampon Çözeltisi

PCL: Poli-ε-kaprolakton

PEO: Polietilen glikol

PGA: Poliglikolik asit

PI: Propidyum iyodür

PLA: Polilaktik asit

PLGA: Polilaktik-ko-glikolik asit

PSS: Periferik Sinir Sistemi

RGD: Arjinin-Glisin-Aspartik asit

SEM: Taramalı Elektron Mikroskobu

Tc: Kristalizasyon Sıcaklığı

Tg: Camsı Geçiş Sıcaklığı

Tm: Erime Sıcaklığı

UV: Ultraviyole

WST-1 : (4-[3-4-iyodofenil]-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolium)- 1,3-benzen disülfonat)

1. GİRİŞ

Periferik sinir yaralanmaları; trafik kazaları, iş kazaları, spor yaralanmaları, doğum esnasında oluşabilecek travmalar gibi çok çeşitli nedenlerden doğabilecek sık rastlanan ciddi bir sağlık problemidir. İlerleyen aşamalarda hastada kalıcı fonksiyon kayıplarına, günlük işlerini yapamaz, engelli hale gelmesine yol açmaktadır.

Periferik sinirin basit kesilerinin onarımı nörorafi olarak adlandırılan bir mikrocerrahi tekniği ile primer onarım şeklinde gerçekleştirilebilirken, kayıplı periferik sinir yaralanmalarının tedavisi için sinirin proksimal ve distal uçları arasında birleştirici görev yapacak, doğru yönlendirilmiş bir rejenerasyonu sağlayabilecek çeşitli yöntemler geliştirilmiş ve geliştirilmeye de devam etmektedir. Kayıplı periferik sinir yaralanmalarının tedavisi için klinik uygulamalarda “sinir greftlerinin” kullanılması “altın standart” olarak kabul edilmektedir. Ancak greftlerin beraberinde getirdiği birtakım eksiklikleri ve olumsuzlukları da mevcuttur. Sinir grefti kaynağının kısıtlı ve boyutunun yetersiz olması, greftin alındığı alanda oluşabilecek morbidite ve kalıcı fonksiyon kaybı, greft ile uygulanacağı alan arasında ki yapısal ve boyutsal farklılıklar bilinen sorunlar arasındadır. Başka bir uygulama da farklı vericilerden elde edilen allogreftlere karşı alıcıda oluşabilecek immün yanıt, rejeksiyon, enfeksiyon taşıma riski gibi birçok dezavantaj mevcuttur. Ayrıca sinir greftinin boyu ve kalınlığı arttıkça başarısızlığının artması, alıcı yatağa bağlı yetersizliklerden (skarlı bölge, hipovasküler alanlar, enfeksiyon vb.) kaynaklanan sorunlar başarıyı doğrudan olumsuz yönde etkilemektedir.

Bu olumsuzluklar araştırmacıları daha geçerli, daha sağlıklı, fizyolojik mekanizmalara dayanabilecek, daha az yan etkiye sahip bir tedavi yöntemi geliştirmeye teşvik etmiş, doğan ihtiyaç sonucu doku mühendisliği teknolojilerine yönelinmiş ve ilk kez 1980’lerde sinir kanalları kullanılması yoluna gidilmiştir. Sinir kanalları diğer tekniklerle kıyaslandığında uygulama açısından daha yeni, pratik ve farklı bir yöntem olmuştur. Bu amaçla sıklıkla birçok doğal (kolajen, kolajen, kitosan, ipek vb.) ve sentetik (polilaktik asit (PLA), polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA), polikaprolakton (PCL) vb.) polimer kullanılmıştır. Mevcut sinir

kanalları, hala sinir otogreftleri kadar başarılı sonuçlar sağlayamamış ve bunlara ideal özellikler kazandırılmamıştır. Ayrıca bunlar daha çok 30 mm'den daha kısa periferik sinir kayıplarının onarımında kullanılmaktadır. İlk zamanlarda sinir köprüsü mantığıyla otolog damar greftleri (biyolojik malzeme) kullanılmıştır; ancak damar greftleri yeterli mekanik dayanıma sahip olmadığından, dokunun içinde içe çökerek rejenerasyonu sekteye uğratmıştır. Altın standart olan otogreftlerin özellikle uzun sinir kayıplarının onarımındaki başarısı düşerek sinir kanallarının değerlerine yaklaşması dikkatlerin sinir kanallarına yönelmesine neden olmuş ve yeni sinir kanalları geliştirme çalışmalarına ağırlık verilmeye başlanmıştır. Tez çalışmasının amacı mevcut sinir kanallarından daha iyi özelliklere sahip, aksonal büyümeyi optimum seviyede destekleyecek daha geçerli bir kanal oluşturmaktır. Sinir rejenerasyonu için ideal bir sinir kanalı; biyoyumlu, gerekli mekanik desteği sağlayabilecek dayanıma sahip, uygun sürede bozunabilen, esnek, uygun çap-kalınlık ve uzunluğa sahip, gerekli ölçüde porları olan, sinir kaybı bölgesinde rejenerasyon için gerekli nörotrofik ve trofik faktörleri muhafaza edebilecek, 3 boyutlu doğal ekstraselüler matriks (ECM) özelliklerine sahip olmalıdır.

Uygun degradasyon özelliğine sahip, rejenerasyon aksonların yüksek afinite göstereceği, nörotrofik faktörler gibi yönlendirici özellikte etmenleri muhafaza edebilen, FDA onaylı yeni malzemeler ve yeni bir bakış açısı ile rekonstrüksiyonlar hedeflenmiştir. Bu doğrultuda, tez çalışmasında nanofibröz temelli sinir kanallarının oluşturulması için biyoyumlu, biyobozunur, yüksek fiziksel özellikleri olan ve FDA onaylı PCL polimeri seçilmiştir. PCL gibi sentetik polimerler doğal polimerlere göre daha yüksek mekanik dayanıma, çok daha uygun bozunma hızına sahip olmalarının yanı sıra birçoğu biyoyumlu ve FDA onaylı olmasından dolayı doku mühendisliği çalışmalarında halihazırda kullanılmaktadır.

Tez kapsamında ilk olarak periferik sinir yaralanmaları ve rejenerasyonuna dair temel literatür bilgileri sunulmuş, mevcut çalışmalardan örnekler verilmiştir. Bu çalışmalar değerlendirilerek en geçerli üretim tekniği ve biyomalzemeler ile daha iyi verim alınabilecek bir sinir kanalının nasıl tasarlanabileceği planlanmıştır. PCL sinir kanallarının oluşturulması için geçerliliği kanıtlanmış, toplu üretim yapmaya oldukça müsait bir doku mühendisliği tekniği olan elektrostatik eğirme yöntemi

kullanılmıştır. Elektrostatik eğirme (elektrospinning) yöntemi ile son derece pratik, etkili, otojen ekstraselüler matriks (ECM) yapısına en yakın ve nanofibröz örgü özelliğinde doku iskelesi üretilecek, bunlardan sinir kanalları elde edilecektir. Elektrostatik eğirme yöntemiyle oluşturulacak doku iskelelerinin yapısını etkileyen çeşitli parametreler vardır. Öncelikle bu parametrelerin amaca uygun olarak çok iyi optimize edilmesi gerekmektedir. Çalışmada birbirinden farklı PCL membranlar oluşturulup analiz edilerek, sinir rejenerasyonuna uygun kanalların hazırlanabileceği parametreler belirlenmiştir. Ardından bu parametreler uygulanarak duvar kalınlığı, iç çapı ve meydana geldiği nanofiberlerin çapı sinir rejenerasyonunu destekleyebilecek nitelikte kanallar oluşturulmuştur.

Genellikle sentetik polimerlerin taşıdığı hidrofobik yüzey özelliklerinden dolayı, doku mühendisliğinde son derece önemli olan hücre - yüzey etkileşimini verimli ve etkin bir şekilde gerçekleştirememektedirler. Bu olumsuzluğu gidermek için aktif grupların eksikliğinden kaynaklanacak hücresel tutunma ve rejenerasyonun aksinlerin doğrusal yönelme sorunlarının üstesinden gelebilmek için çeşitli biyolojik temelli polipeptidler ile yüzeylerin modifiye edilmesi gerekmektedir. Yüzey modifikasyonu için en uygun yapı, laminin yapısında bulunan ve nöral hücrelerin ve rejenerasyonun aksinlerin afinitesinden sorumlu olan, birçok integrin reseptörü tarafından tanınan, oldukça küçük molekül yapısına sahip, sentetik olarak üretildiği için enfeksiyon riski yok denecek kadar az ve diğer yöntemlere göre ucuz olan RGD (Arjinin-Glisin-Aspartik Asit) üçlü peptid dizisi tez çalışmada kullanılmıştır. PCL fiber yüzeylerin modifikasyonu için hidrofobik bir naftalin grubu ve RGD sekansından oluşan Nap-FFGRGD molekülü kullanılarak kendiliğinden düzenlenme yaklaşımı ile hidrofobik yüzeyler üzerinde hidrofilik nitelikte bir RGD tabakası oluşturulmasına çalışılmıştır. PCL doku iskelesinin RGD hücre tanıma sekansı ile kaplanmasının, doku iskelesinin yüzey karakteristiği üzerinde yarattığı etki su değme açısı testi ile ortaya konulmuştur.

Yukarıda verilen bilgiler doğrultusunda hazırlanan doku iskelelerinin ayrıntılı karakterizasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. PCL membranların ve kanalların morfolojik yapısı hakkında bilgi edinebilmek amacıyla taramalı elektron mikroskop altında incelenmiştir. Buradan elde edilen fotoğraflarla, sinir kanalı oluşturmak için gerekli olan elektrostatik eğirme sistemi parametreleri

saptanmıştır. Bu parametrelere Sinir kanalının, sinir rejenerasyon sürecini desteklemek için doğal yapıya uygun mekanik özelliklerde dayanıklılığının yanı sıra esnek karakterde olması gerekmektedir. Oluşturulan kanalların elastisite modülü gibi karakteristik mekanik özelliklerinin tayin edilmesi gerilme - uzama testleri ile gerçekleştirilmiştir. PCL polimerinin uzun bir bozunma süresi olduğu bilinmektedir. Bu süre, polimerin moleküler ağırlığı, işlenişi ve deneyin genel parametrelerine göre değişiklik gösterebilmektedir. Kullanılan biyomalzemenin iyileşme süreci boyunca yapısını muhafaza etmesi gerekmekte, bozunma ürünlerinin vücuda toksik etki yaratmaması istenmektedir. Bozunma derecesi doku iskelesinin mekanik özelliklerini de doğrudan etkilemektedir. Hazırlanan PCL kanalın *in vitro* koşullarda biyobozunurluğu değerlendirilmiştir. PCL fiber yüzeylerin RGD sekansı ile kaplanmasının malzemenin termal özellikleri üzerinde bir etki yaratıp yaratmadığı diferansiyel kalorimetri testi ile gözlenmiştir. Floresan bir ajan olan FITC ile işaretlenmiş Nap-FFGRGD molekülü kullanılarak kaplanan PCL kanallar, konfokal mikroskop altında analiz edilerek, fiberler etrafındaki RGD tabakası net bir şekilde gözlenmiştir.

Tez çalışmasının son aşaması olarak, RGD ile kaplanmış nanofibröz PCL kanalların L929 fare fibroblast hücreleri ile etkileşimine dair çalışmalar gerçekleştirilmiştir. WST-1 testi ile oluşturulan doku iskelesinin hücreler üzerinde yarattığı sitotoksik etki saptanmıştır. İkili boyama yöntemi kullanılarak doku iskelesi üzerindeki L929 hücrelerinin morfolojisi gözlenerek canlı, apoptotik veya nekrotik olma durumu belirlenmiştir.

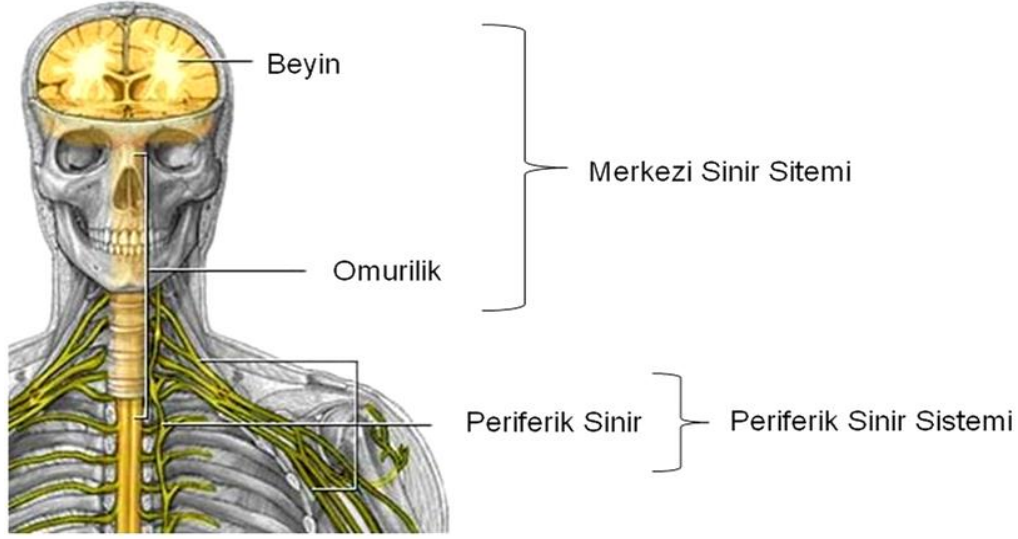
Hazırlanan bu tezde, temel literatür bilgilerinden edinilen konuya ilişkin mevcut çalışmalardan örnekler sunulan bir derleme verildikten sonra yukarıda bahsedilen doğrultuda tez çalışmasında kullanılan malzemeler ve uygulanan yöntemlerle ilgili ayrıntılı bilgiler sunulmuştur. Bir sonraki bölümde bu yöntemlerden elde edilen bulgular ortaya konulmuştur. Son olarak da çalışmadan çıkarılan genel sonuçlar ana bir başlık altında verilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Sunulan tez çalışması ile ilgili temel bilgiler, literatür bilgileri ışığında ana başlıklar halinde sunulmuştur. İlk olarak sinir sistemi, özellikle de periferik sinir sistemine ilişkin genel bilgiler verilmiş; periferik sinir yaralanmaları, mekanizması, çeşitleri ve patofizyolojisine dair açıklamalar yapılmıştır. Takip eden bölümde tezin esas amacını oluşturan periferik sinir yaralanmalarının tedavileri anlatılmış; klinikte halihazırda uygulanmakta olan yöntemlerden, bu yöntemlerin yetersizliklerinden bahsedilmiş ve kısmen daha yeni bir yaklaşım olan sinir kanallarına değinilmiştir. Sinir kanalları oluşturulmasında genellikle tercih edilen malzemeler, polikaprolakton başta olmak üzere sentetik polimerler ve kanalı üretmek için kullanılan belli başlı yöntemler anlatılmıştır. Bu yöntemler arasında yer alan, tez çalışmasında da tercih edilen elektrostatik eğirme tekniğine ilişkin bilgilerin verilmesinin ardından sentetik polimerlerin yetersiz yüzey fonksiyonlarının nasıl geliştirilebildiği mevcut çalışmalardan örneklerle sunulmuştur. Bir yüzey fonksiyonlandırma ajanı (hücre tanıma motifi) olan RGD peptid dizisi hakkında ayrıntılı bilgiler verilmiştir.

2.1. Sinir Sistemine Genel Bir Bakış

Sinir sistemi genel anlamıyla; beyin, omurilik ve duyu sistemlerini içeren Merkezi Sinir Sistemi (MSS) ile beyinden çıkan kranial sinirler, omurilikten çıkan spinal sinirler ve duyu sinir hücrelerinin gövdeleri (dorsal kök gangliyonları) nin oluşturduğu Periferik Sinir Sistemi (PSS) 'nden meydana gelir (Şekil 2.1.). Merkezi Sinir Sistemi, sinyallerin yönetilmesi ve yorumlanmasının yanında uyarıcı sinyallerin periferik sinir sistemine iletimini sağlamakla görevlidir. Periferik sinirler kas dokusunu sinirle donatmasının yanında spinal kolondan aldığı duylara ilişkin verileri ve uyarıcı girdileri iletirken, aynı şekilde dışarıdan gelenleri de spinal kolona götürür. Sinir sisteminin yapısal ve fonksiyonel esas hücreleri nöronlardır. Nöronların yanı sıra vücutta nöronlardan daha fazla bulunan ve nöronların fonksiyonlarına yardımcı olan glial hücreler bulunmaktadır [1].



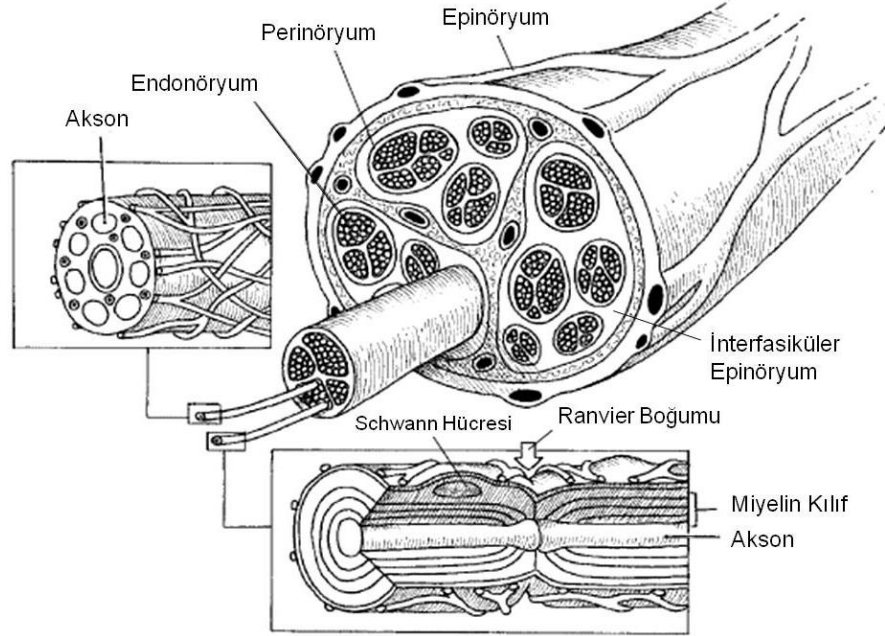
Şekil 2.1. Merkezi ve Periferik Sinir Sisteminin Temel Yapısı [2]

2.1.1. Periferik Sinir Sisteminin Yapısı ve İşleyişi

Periferik sinir sistemi, duyu sinirleri sayesinde çeşitli çevresel değişiklikleri algılayıp MSS'ne bilgileri iletir. Beyin ve omurilikteki merkezi sinir hücreleri motor komutları oluşturur, periferik sinirler de bu komutların işletilmesini sağlar [3,4]. Sinir Sistemi, işlevsel birimler olan nöronlar ve çeşitli şekillerde nöronal faaliyetleri destekleyen glial hücreler olmak üzere iki ana hücre tipinden oluşur. Nöronlar; hücre gövdesi (soma), akson (sinir lifi) ve dendrit olarak adlandırılan kısımlardan meydana gelir [3-5]. Dendritler, sinapslar sayesinde çevredeki hücrelerden sinyallerin alınmasını sağlarken, hücre gövdesi ve akson ise elektriksel uyarılar halinde bu sinyallerin taşınmasını sağlarlar. PSS'nin esas glial hücrelerini ise aksonları sararak izole eden ve miyelin tabakasını oluşturan Schwann hücreleri teşkil eder [3]. Miyelin tabakası akson boyunca devamlı değildir, Ranvier boğumları olarak adlandırılan boşluklar ile birbirlerinden ayrılırlar [6]. Miyelinli aksonlarda, akson boyunca ilerleyen sinyaller ranvier boğumları sayesinde sıçramaya uğratarak daha hızlı bir iletim sağlar [7].

Sinirler, liflerin bir araya gelerek oluşturdukları demetlerden meydana gelir. İçten dışa doğru periferik sinirin yapısına bakacak olursak, en küçük birim olan her bir akson bir lifi teşkil eder ve endonöryum tabakası içerisinde bulunur. Sinir lifi demetleri, kan damarları ve kapillerini içeren perinöryum olarak adlandırılan bağ doku tabakası ile birbirinden ayrılır. Bu lif demetleri, intrafasiküler epinöryum

içerisine gömülü haldedir. En dışta ise siniri saran, epinöryum olarak adlandırılan bir diğer bağ doku tabakası bulunur [6] Şekil 2.2' de periferik sinirin anatomik yapısı görülmektedir [8].



Şekil 2.2. Periferik Sinirin Çapraz Kesit Anatomisi [8]

2.2. Periferik Sinir Yaralanmaları

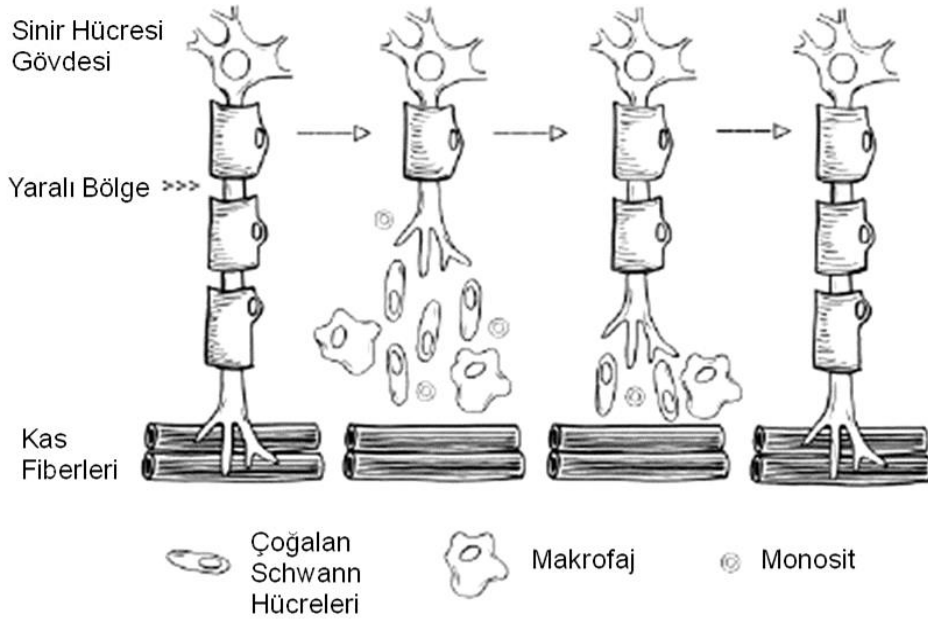
Periferik sinir lezyonları başlıca; trafik kazaları, tümör rezeksiyonu veya çeşitli ameliyatlara (ortopedik müdahaleler, intravenöz aspirasyon, kozmetik yüz cerrahisi) sonucu oluşan yan etkilerle meydana gelmektedir. Doğum sırasında (tüm doğumların %0,12' si) çekiştirmeye bağlı olarak meydana gelen komplikasyonlar da periferik sinir hasarlarına yol açabilmektedir. Trafik kazaları ve spor yaralanmaları sonucu ekstremitelerde gözlemlenen açık yaralar periferik sinir travmalarının %5'ini kapsamaktadır [9]. Periferik sinir yaralanmaları sonucunda yaklaşık 8,5 milyon insanın günlük aktiviteleri kısıtlanırken, her yıl ortalama 5 milyon kişi yatalak veya engelli hale gelmektedir [10]. Yalnızca Avrupa'da yılda 300.000'in üzerinde vaka ile periferik sinir hasarı çok sık karşılaşılan bir travma türüdür. Birleşmiş Milletler'de de bu gibi hasarlardan dolayı her yıl 200.000 hasta cerrahi müdahalelere tabi tutulmaktadır [9]. 2010 yılında yapılan araştırmalara

göre Birleşmiş Milletler'de nüfusun ortalama 265.000'inin spinal kord hasarlı olduğu tahmin edilmektedir [11].

2.2.1. Periferik Sinir Yaralanmasında Dejenerasyon ve Rejenerasyon Süreci

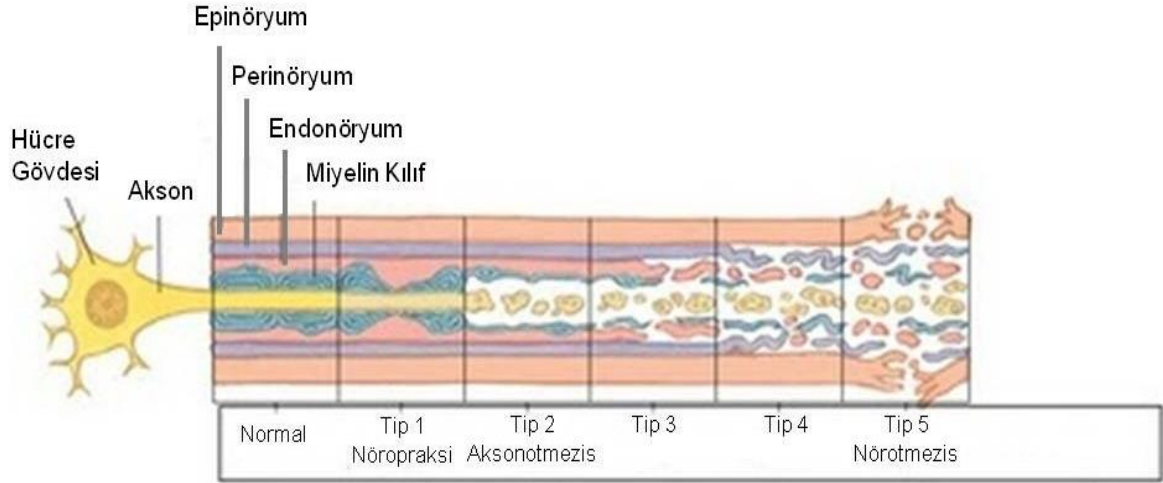
Birçok durumda sinir yaralanmaları, aksonun proksimal ve distal segment olmak üzere iki parçaya ayrılması ile sonuçlanır. Distal segment, hücre gövdesinden koparak ayrılan kısım iken; proksimal, sinir yenilenmesi (rejenerasyonu) sürecinin başlayacağı, hücre gövdesi ile bağlantısını sürdüren uçtur [12,13].

Periferik sinir yaralanmasını takiben, etkilenen sinir bölgesinin içerisinde ve çevresinde ekstraselüler matriks (ECM), nöronal hücreler ve Schwann hücreleri arasındaki etkileşimlere dayanan karmaşık fizyolojik değişiklikler meydana gelir [14]. İlk olarak yaralı bölgenin distal ucundaki tüm aksonlarda Wallerian dejenerasyonu gözlenir. Wallerian dejenerasyonu sırasında kalsiyum aracılı proteolitik bir sürece bağlı olarak aksonal mikrotübüller ve nörofilamentler parçalanır [15,16]. Sonraki birkaç saat içerisinde, sinir hücre gövdesinin şişmesi, dendritte bulunan Nissl cisimciklerinin parçalanarak dağılması ve hücre çekirdeğinin merkezin dışına itilmesi ile seyir eden kromatolizis olayı başlar. Rejeneratif elemanların üretimi çoğalırken nörotransmitter üretimi azalarak protein metabolizması değişir. Takip eden birkaç gün boyunca, distal sinir ucundaki aksonlar dejenere olur ancak Schwann hücreleri ve bazal laminası devamlılığını sürdürür. Yaralı bölgeye makrofajlar toplanarak, kopan miyelin kılıflarının fagositozunu gerçekleştirirler. Bu fagositotik işlem Schwann hücrelerinin çoğalmasını teşvik eder. Schwann hücreleri bir araya gelerek bands of Büngner olarak isimlendirilen ve aksonların rejenerasyon için önemli bir rehberlik sağlayan tübüler yapıları oluştururlar. Zarar görmüş aksonlar dejenerasyona giderken, ranvier boğumlarının uçlarından doğan çoklu aksonal uzantılar rejenerasyon için uygun koşullara sahip distal çevreye ulaşmaya çalışırlar [14] (Şekil 2.3.). Eğer rejenerasyon aksonlar distal segmentteki uygun çevreye ulaşamazlarsa (örneğin, yara dokusu ile engellenirlerse) olası sinir fonksiyon kayıplarıyla sonuçlanabilecek nöroma denilen yapıları oluştururlar [15]. Nöroma, aksonal gelişmeyi engeller ve kalıcı sinir fonksiyon kayıplarına yol açar [17].



Şekil 2.3. Periferik sinir sisteminde aksonun kesilmesi sonucu oluşan yanıt. Çoğalan Schwann hücreleri, makrofajlar ve monositler ayrılmış miyelin kılıf parçalarını ortadan kaldırmak, nörotropinleri salgılamak ve aksonlara sinaptik hedeflerine doğru rehberlik etmek için birlikte çalışarak nöronal fonksiyonun geri kazanılmasını sağlarlar [1].

Yaralanmanın anatomik boyutlarına göre, sinir yaralanmaları sınıflandırılmıştır. Seddon ve arkadaşları [18] sinir yaralanmalarını; nöropraksi (yapısal süreklilik korunurken sinyal iletiminde hata olması), aksonotmezis (aksonun sürekliliğini kaybetmesi) ve nörotmezis (sinirin parçalanması) olarak 3 madde halinde sınıflandırmışlardır. Sunderland [19], Seddon ve arkadaşlarının sınıflandırmasını mikroskopik gözlemlere, histolojik bulgulara dayanarak 5 tip olacak şekilde genişletmiştir. Tip 1, Seddon ve arkadaşlarının nöropraksi olarak tanımladıkları duruma karşılık gelmektedir. Tip 2 ve 3, sırasıyla bozulmamış endonöryum ile seyreden aksonotmezis ve bozulmuş endonöryumlu aksonotmezisi tanımlamaktadır. Tip 4'te hem endonöryum hem de perinöryum tabakası hasar görmüştür. Epinöryum da dahil olmak üzere tüm tabakaların parçalanması durumu ise nörotmezise denk gelen Tip 5'tir [17] (Şekil 2.4.). Seddon ve arkadaşlarının nörotmezis, Sunderland'in ise Tip 5 olarak tanımlamış olduğu kayıplı periferik sinir yaralanmalarının tedavisi için farklı yöntemler denenmiş ve denenmeye de devam etmektedir.



Şekil 2.4. Seddon ve Sunderland'in bulgularına göre sinir yaralanmasının sınıflandırılması [20]

2.2.2. Periferik Sinir Yaralanmalarında Tedavi Yaklaşımları

Periferik Sinir Sistemi'nde yaralı alanı saran mikroçevre MSS ile karşılaştırıldığında aksonal rejenerasyon için daha elverişlidir. Genellikle 5 mm'den daha kısa sinir kayıplarında aksonlar kendiliğinden rejenere olabilmeye kabiliyetine sahiptir. Buna rağmen, aksonal rejenerasyon gerçekleşse dahi, aksonların uygun olmayan hedefe doğru yanlış yönlendirmelerine bağlı olarak tam bir fonksiyonel geri kazanım sağlanamayabilmektedir [21].

Periferik sinir yaralanmalarının tedavisi için ilk girişimler 17. yüzyıla dayanmaktadır [15,22]. 19. yüzyılda Huber tarafından periferik sinir kayıplarının tedavisine yönelik çeşitli cerrahi uygulamalar ve bunlardan alınan sonuçları içeren bir derleme sunulmuştur [15,23].

Periferik sinir kayıplarının onarılabilmesi için birçok uygulama bulunmasına rağmen, bunları genel anlamda 2 kategoriye ayırmak mümkündür [24]:

- 1) Ayrılmış olan sinir segmentlerinin uç uca getirilerek birleştirilmesine dayanan manipülatif sinir operasyonları,
- 2) Ayrılmış sinir segmentlerini birleştirmek amacıyla bir köprü görevi görecek olan greftlerin ve tübülizasyon yöntemlerinin kullanılmasıdır.

2.2.2.1. Nörorafî

Periferik sinir yaralanmaları için uygulanan cerrahi yöntemler arasında ilk olarak nörorafî gelmektedir. Bu uygulamada, herhangi bir greft materyali kullanmadan, ayrılmış olan sinir gövdesinin iki ucu bir araya getirilerek doğrudan dikilir; ancak yalnızca 5 mm'den daha küçük sinir kayıpları için uygulanabilir. Daha büyük kayıplarda, dikilen bölge üzerinde aşırı bir gerginlik oluşacağından düşük cerrahi yanıtlar alınmasına sebebiyet verir [10]. Yapılan pekçok çalışma sinir üzerinde %10'luk bir gerginlik oluştuğunda yaklaşık %50 oranında kan akışının azaldığını göstermektedir. Driscoll ve arkadaşları, %15'lik bir uzamanın sinir üzerinde geri dönülemez iskemik hasarlar yarattığı sonucuna varmışlardır [17].

2.2.2.2. Nörotizasyon

Nörotizasyon (sinir transferi) bir diğer klinik metottur. Proksimal sinir ucunun doğrudan denerve bir kasın gövdesine bağlanmasını sağlar ve yalnızca çok istisnai durumlarda uygulanabilir. Genellikle nörorafî ve sinir greftlerine göre daha zayıf sonuçlar alınır. Bahsedilen bu kısıtlamalar ve daha büyük defektlerin tedavisi için doğan klinik ihtiyaçlar doğrultusunda greft uygulamaları gerekli hale gelmiştir [10].

2.2.2.3. Sinir Greftleri

Özellikle büyük sinir kayıplarının olduğu durumlarda, periferik sinir yaralanmasının tedavisi için greftler cerrahide sıklıkla kullanılmaktadır [10].

- **Sinir Otogreftleri:** Kayıplı periferik sinir tedavisinde, cerrahi alanında 'altın standart' tedavi olarak kabul edilmektedir. Otogreft tekniği ilk olarak 1870-1900 yılları arasında rapor edilmiştir. Millesi ise yaptığı detaylı çalışmalar ile sinir greftlerinin üstünlüğünü gözler önüne sermiştir [10,25]. Sinir otogreftleri sural ve safenöz sinir gibi uzunluğu 40 cm'ye varan çapı ise 2-3 cm olan çeşitli kutanöz sinirlerden elde edilmektedir. Sinir greftlerine ek olarak otolog kas ve damar greftleri gibi farklı doğal dokularda klinikte kullanılmaktadır. Dahası, bazı mevcut çalışmalar periferik sinir onarımı için; epinöral kılıf, tendon greftleri, kas-damar greftleri, tersine çevrilmiş damar

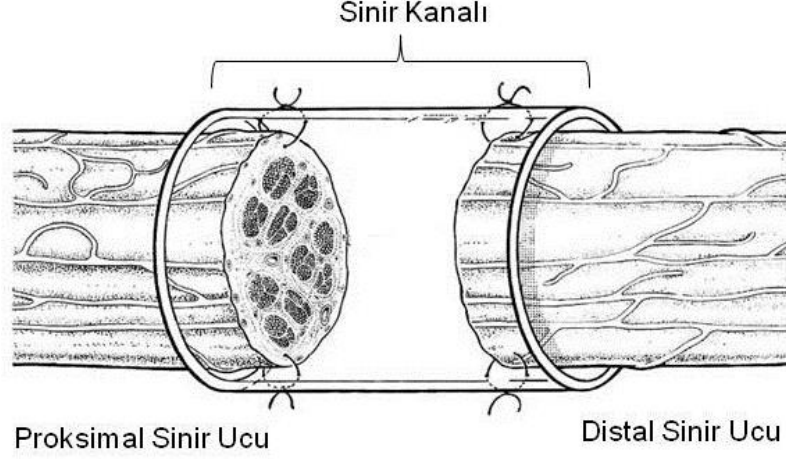
greftleri ve otolog Schwann hücreleri ile doyurulmuş damar greftleri gibi doğal doku greftlerinin kullanımı üzerine yoğunlaşmışlardır [1].

Bununla birlikte, bu uygulamaların beraberinde getirdiği birçok dezavantaj vardır. donör bölgede morbidite ve fonksiyon kayıpları, ağrılı nöroma oluşması olasılığı, donör ve alıcı bölge arasında yapısal farklılıklara bağlı uyumsuzluk, greft materyalinin az olması, greft dokusunun çıkarılması için ikinci bir cerrahi operasyona gerek duyulması, ikincil cerrahi müdahaleye de bağlı olarak artan iyileşme süreci ve sağlık bakım ücretleri bu olumsuzluklar arasındadır [10].

- **Sinir Allogreftleri:** Otogreftlere alternatif olarak, çoğunlukla kadavralardan elde edilerek kullanılan greftlerdir [1]. Ancak, bu dokuların hastalık taşıma riski olduğundan immünsupresanlarla birlikte kullanılması gerekmektedir. Yaklaşık 18 ay boyunca hasta sistemik immünsüpresif tedavi almalıdır fakat bu supresanların uzun süreli kullanımı fırsatçı enfeksiyonlara ve hatta tümör oluşumlarına yol açabilir [10].
- **Sinir Zenogreftleri:** Hayvanlardan elde edilerek kullanılırlar. Allogreftlerde olduğu gibi hastalık taşıma riski vardır [1].

2.2.2.4. Sinir Kanalları

Çeşitli şekillerde elde edilen sinir greftlerinin yarattığı olumsuzluklar neticesinde proksimal ve distal sinir uçları arasındaki boşluğu doldurarak, sinir rejenerasyonunu teşvik edebilecek bir doku iskelesi niteliğinden olan yapay sinir kanallarının geliştirilmesi alternatif bir onarım metodu olarak ortaya çıkmıştır [14,26]. Sinir kanalları, doğal veya sentetik biyomalzemelerden oluşturulan küçük silindirik yapılardır. Şekil 2.5.'te görüldüğü üzere kesilmiş sinirin her iki ucu, sinir kanalının uç kısımlarından içerisine tutturulmak suretiyle iki sinir ucu arasında (proksimal ve distal uç) bir köprü, aynı zamanda yeni oluşan aksonlar için de koruyucu bir kılıf oluşturulmuş olur [14].



Şekil 2.5. Sinir kaybının tedavisi için sinir kanalı kullanımı [27]

Sinir dokusunun rejenerasyonu için gereken özel koşulların sağlanması amacıyla nano ölçekte fiberlerden oluşan sinir kanalları oluşturulmaktadır [28]. Bu yapay sinir kanalları akson göçünü yönlendirip, rejenerasyonun aksonların tutunabildiği sinirin ve distal kısımdan gelen düzenleyici faktörlerin devamlılığını sağlarken, ekzojen hücre ve dokuların yaralı bölgeye invazyonunu önleyebilmektedir [29].


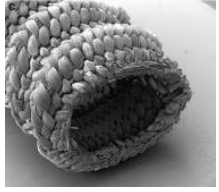
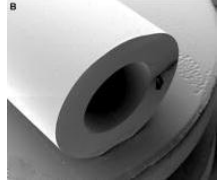
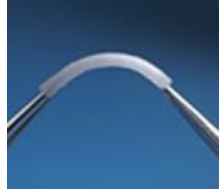
İdeal bir sinir kanalının sahip olması gereken özellikler şu şekilde tanımlanmıştır [10] :

- Seçilen biyomalzeme biyouyumlu olmalı ve inflamasyonel yanıtı tetiklememeli
- Biyomalzeme; rejenerasyon süreci boyunca doku inflamasyonu ve dikişlerden kaynaklanabilecek aşınmalara karşı stabil yapısını korurken bir yandan da biyobozunurluğunu sürdürebilmeli
- Yeni oluşan aksonların kompresyonunu önlemek ve doku inflamasyonunu sınırlandırabilmek için esnek ve yumuşak bir yapıya sahip olmalı,
- Sinir kanalı, yanlış yönlendirmeleri önlemek için üç boyutlu yapısı ile büyüyen sinire rehberlik sağlamalı
- Sinir dokusunun devamlılığını sürdürebilmesi için gerekli olan oksijen ve nütrientlerin dokular arası sıvıdan kanal üzerinde ki porlar vasıtasıyla difüzyonuna müsaade edecek şekilde yarı geçirgen olmalı

- f) Sinir kanalı fibröz dokunun, hasarlı bölgenin içine doğru büyümesini önlemeli ve sinir uçlarından salgılanan nörotropik faktörleri muhafaza edebilmeli
- g) Sinir kanalı üretim devamlılığı, sterilizasyon, uzun süreli muhafaza edilebilme ve dikiş gibi cerrahi işlemlerde oluşacak gerginlik aşınma gibi unsurlara dayanabilecek gerekli teknik özelliklere sahip olmalıdır.

Şu anda mevcut Salubridge, Neurotube, Neurolac, NeuroMatrix/Neuroflex ve NeuraGen olmak üzere 5 farklı çeşit, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylı sinir kanalı klinikte kullanılmaktadır. Salubridge, hidrojelden oluşup esnek bir yapıya sahip olmasına rağmen, degradasyon özelliği olmamasından dolayı kalıcı bir implanttır. Bozunma özelliği olmayan kanallar, implant malzemesiyle de alakalı olarak fibrozis gelişmesine ve sonucunda sinir kompresyonuna yol açabilecek riskler taşımaktadırlar. NeuraGen ve Neurotube sırasıyla çapraz bağlı kolajen ve poliglikolik asitten (PGA) oluşmaktadırlar. Yapılan çalışmalar operasyondan sonra 12.haftada PGA'in ve 8.haftada ise kolajenin başarıyla bozunduğunu göstermektedir. Fakat bu bozunma süreleri uzun bir sinir kesisinde akson büyümesinin desteklenmesi için kısa olabilmektedir [30]. Ayrıca, Neurotube (Synovis), Neurolac (Ascension), ve NeuraGen (Integra) gibi sinir kanalları yalnızca 3 cm'den daha kısa sinir kaybı olduğu durumlarda başarılı olmaktadır [31]. Çizelge 2.1.'de, mevcut FDA onaylı sinir kanallarının bir listesi görülmektedir [32].

Çizelge 2.1. FDA Onaylı Sinir Kanalları

Sinir Kanalı / Firma	Malzeme	Sinir Kanalı Görüntüsü
Salubridge™ / SaluMedica	Polivinilalkol Hidrojel	
NeuroTube® / Synovis Micro	Poliglikolik asit	
Neurolac® / Polyganics	Poli(ε-kaprolakton)-ko-(DL-Laktik asit) (50:50)	
NeuroFlex™ / Collagen Matrix Inc.	Kolajen Tip 1	
NeuroGen® / Integra	Kolajen Tip 1	

2.3. Sinir Kanalı Üretiminde Kullanılan Biyomalzemeler

Biyomalzemeler, vücudun herhangi bir doku, organ ya da fonksiyonunun değerlendirilmesi, tedavi edilmesi veya yerine geçirilmesi amacıyla tasarlanmış biyolojik sistemlerle etkileşim halinde bulunan materyallerdir. Bir malzemenin biyomalzeme olarak kabul edilebilmesi için gereken önşart biyoyumlu olmasıdır. Biyoyumluluk, kullanılan malzemenin etkileşim içerisinde bulunduğu canlı sisteme uygun immünolojik yanıtı sebebiyet verebilme yeteneğidir. Biyomalzeme olarak metaller, seramikler, camlar ve polimerler gibi çok çeşitli malzemeler üzerine çalışmalar yürütülmektedir. Bunlar arasında vücudun farklı doku veya organlarının fiziksel ve mekanik özellikleri ile uyuşacak şekilde sentezlenebilme ve değiştirilebilme niteliğine sahip olmasından dolayı medikal uygulamalar için üzerinde geniş kapsamlı araştırmalar yapılan polimerler, biyomalzemelerin çok yönlü bir sınıfını teşkil etmektedirler [33].

Kayıplı periferik sinir yaralanmaları tedavisinde sinir kanalı oluşturulması için sıklıkla doğal veya sentetik polimerlerden yararlanılmaktadır [34].

2.3.1. Doğal Polimerler

Kitosan, kolajen, jelatin, hyalüronik asit ve ipek fibroini sinir kanalı üretiminde sıkça kullanılan doğal polimerlerdir.

Kitosan, bir D-glukozamin ve N-asetil-D-glukozamin kopolimeridir. Yengeç ve karides gibi canlıların kabuğundan ekstraksiyonu yapılan biyobozunur bir polisakkarit olan kitinin N- deasetilasyonu ile elde edilir. Kitosan, oldukça iyi biyoyumluluğu ve antibakteriyel özelliği dolayısıyla sinir kanalları ve doku iskeleleri oluşturulmasında tercih edilmektedir [35]. Diğer yandan, kısmen kırılğan ve fizyolojik koşullarda hızlı bozunan bir karakterdedir [34].

Kolajen, üçlü helikal yapıda, 28 farklı çeşidi olan ve insan vücudunda en fazla bulunan proteindir. Kolajen, ECM yapısının esas proteini olarak üstün biyoyumluluk ve zayıf antijenik özellik sağlamaktadır [36]. Zayıf mekanik dayanımı ve hızlı bir şekilde bozunmasına rağmen sinir rejenerasyonu için tübüler yapılar oluşturulmasında sıklıkla kullanılmaktadır [34]. Şu an klinikte kullanılmakta olan FDA onaylı, çapraz bağlı bovin kolajeninden yapılmış NeuraGen olarak da bilinen bir sinir kanalı mevcuttur [37].

Jelatin, termal denatürasyon yoluyla kolajenden geri dönüşümsüz olarak elde edilen biyobozunur bir polimerdir. Biyoyumluluğu, esnekliği ve yapıştırıcı özelliği nedeniyle doku iskelesi oluşturmak için tercih edilmektedir. Ancak, diğer doğal polimerler gibi mekanik dayanımı zayıf ve işlenmesi zordur [35].

Hyalüronik asit (Hyalüronan), insan ECM yapısında bulunan yüksek molekül ağırlığına sahip bir glikozaminoglikandır [38]. Esterleştirilmiş bir hyalüronik asit türevi olan Hyaff kullanılarak oluşturulmuş olan sinir kanalı oldukça iyi bir biyoyumluluk göstermesine rağmen, hücrelerin kitlesek olarak içe büyümesi ve fibröz doku oluşumu gibi periferik sinir tedavisini aksatacak bulgular gözlenmiştir [39].

İpek fibroini, doğal ipeğin yapısında bulunan, tekstil sanayinden kullanılan temel bir proteindir. İpek fibroini de sinir rejenerasyon uygulamalarında kullanılmaya aday bir biyomalzemedir. Elektrostatik eğirme ile fibroinden oluşturulmuş bir sinir kanalının geliştirilmiş mekanik özelliklere sahip olmasına rağmen kolaylıkla parçalandığı gözlenmiştir [40].

Genel hatlarıyla bakacak olursak bu doğal polimerler, mükemmel biyoyumluluğu, hücre tutunması ve fonksiyonlarını desteklemesi, ciddi immün yanıtları önlemesi, büyüme faktörlerine gerek duymadan hücrelere uygun sinyalleri sağlaması ve doğal bir şekilde enzimler tarafından bozunması sebebiyle tercih edilmektedirler. Ancak, doğal polimerler seriden seriye farklılık göstermekte ve geniş çaplı saflaştırma/karakterizasyon işlemlerinin yapılmasını gerektirmektedir. Dahası birçoğu *in vivo* koşullarda nispeten hızlı bozunma derecesine ve düşük mekanik dayanıma sahiptir [34].

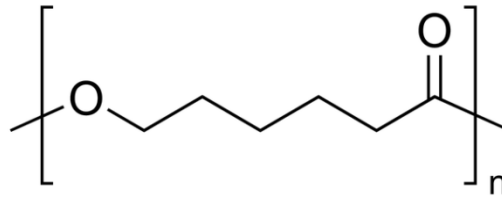
2.3.2. Sentetik Polimerler

Sinir kanalı olarak kullanılan ilk sentetik polimer silikondur [14]. Merle ve arkadaşları ilk defa sinir rejenerasyonu için klinikte silikon kanal kullanmışlardır [41]. Ancak silikon biyobozunur nitelikte değildir; uzun süreli kullanımda sinir kompresyonuna ve bazı durumlarda fibrozise yol açtığı gözlenmiştir [14].

Poliesterlerden, polilaktik asit (PLA), poli-ε-kaprolakton (PCL) ve poli-d,l-lactid-koglikolik asit (PLGA) gibi sentetik polimerler sinir rejenerasyonu için gerekli olan

yavaş bozunma hızı ve uygun mekanik özelliklerinden dolayı, fibröz doku iskelesi oluşturmada kullanılmaktadırlar [28]. Poliesterler, ester bağı hidrolizi ile degrede oldukları ve oluşan degradasyon ürünleri metabolik yollarla absorbe edilebildiği başka bir ifade ile mümkün olan en düşük seviyede toksik etki yarattıkları için oldukça avantajlıdırlar [14].

Bunlar arasında PCL biyouyumluluk, düşük maliyet, kolay işlenebilirlik, üstün mekanik özellikler ve toksik etki yaratmadan degradasyonunu tamamlaması gibi birçok avantaja sahip olmasından dolayı kemik, deri, sinir, retina ve benzeri çeşitli dokuların yeniden oluşturulması için doku mühendisliği uygulamalarında ve biyomedikal alanda sıkça kullanılmaktadır [42,43]. Degradasyon ürünleri süksinik asit, bütirik asit, valerik asit ve kaproik asittir. Bu ürünler toksik olmayan niteliktedirler ve inflamasyonel yanıtı sebep olmazlar. PLA ile kıyaslandığında bu degradasyon ürünleri daha az asidik karakterdedir [10]. Bunun yanında, kristalin lastiksi özelliğinden dolayı elastisiteyi geliştirmek için de kullanılır. Birçok sentetik polimer yarıkristalin özelliklerinden dolayı doğal polimerlere göre daha yavaş bozunma hızına sahiptir. Diğer taraftan PCL nanofiber matrisler tekrarlayan birimlerinde bulunan 5 hidrofobik –CH₂ yapısından dolayı (Şekil 2.6.) PGA, PLGA, PLA gibi biyobozunur poliesterler ile kıyaslandığında daha yavaş aşınma oranına sahiptir [43].



Şekil 2.6. Poli-ε-kaprolakton (PCL) polimerinin açık formülü [44]

PCL gibi sentetik hidrofobik polimerlerden oluşturulan doku iskelelerinin sahip olduğu düşük hidrofilik özellikleri ve yüzeylerinde yetersiz hücre tutunma bölgesi bulunması dolayısıyla, rejenere hücrelerin bu materyallere afinitesi düşüktür [42]. Bu yüzden, sinir kanalları oluşturulması gibi çeşitli uygulamalar için, biyolojik aktivatörler ile destelenerek yüzey özelliklerinin ve biyolojik etkinliklerinin artması sağlanır [45].

2.4. Nanofibröz Sinir Kanalları Üretim Teknikleri

Langer ve Vacanti, hastalıklı doku veya organın yitirilmiş fonksiyonlarının yerine getirilebilmesi için klinik uygulamalarda doku mühendisliğinin umut verici alternatif bir tedavi olduğunu kanıtlamışlardır [46]. Nanofiberler, doğal ECM' e benzedikleri için doku mühendisliği uygulamalarında en çok umut vaad eden materyaller olarak görülmektedir. Üstün mekanik dayanıklılığı ve yüksek yüzey hacim oranı nanofiberleri, nöral doku mühendisliği için daha uygun hale getirmektedir [47]. Hücre büyümesinin teşvik edilmesi ve uygun hücre fenotipinin sürdürülmesinde nanofibröz doku iskelelerinin avantajları birçok çalışmayla kanıtlanmıştır [46]. Nanofiberlerden oluşan sinir doku iskeleleri üretmek için son yıllarda kullanılan başlıca yöntemler; çekme, kalıp sentezi, kendiliğinden düzenlenme, faz ayırımı ve elektro-üretim yöntemidir [48].

2.4.1. Çekme Yöntemi

Çekme yöntemi, fiber sanayisinde kullanılan kuru lif çekme yöntemine benzer, birer birer oldukça uzun tekli nanofiberler oluşturmaya olanak sağlayan bir tekniktir [48]. Bir mikropipetin, silikon dioksit yüzey üzerindeki damlacığa daldırılıp 100 mm/s hızla geri çekilmesiyle nanofiber oluşturulmuş olur [49]. Ancak yalnızca, çekme esnasında fiber oluşurken gelişen strese dayanabilen, kuvvetli deformasyonlara uğrayabilen viskoelastik karakterde malzemeler bu metod dahilinde kullanılabilir [48]. Ondarcuhu ve arkadaşları yaptıkları çalışmada çekme yöntemi ile sodyum sitrat nanofiberler sentezlemişlerdir [50].

2.4.2. Kalıp Sentezi Yöntemi

Bu yöntem dahilinde, nano boyutta porlara sahip bir membranın kalıp olarak kullanılması ile polimerler [51], metaller, yarıiletkenler ve seramikler [48] gibi çeşitli hammaddelerden nanofiberler veya tübüler yapılar üretilebilir. Ancak birer birer devamlı nanofiberler oluşturmak için uygun değildir [49].

2.4.3. Kendiliğinden Düzenlenme Yöntemi

Moleküllerin hidrojen bağı, van der Waals kuvvetleri, hidrofobik etkileşimler ve elektrostatik kuvvetler gibi kovalent olmayan etkileşimler ile kendiliğinden

düzenlenerek nanofiberleri oluşturması tekniğidir. Bu aşağıdan-yukarı (bottom-up) sentezleme yöntemi ile küçük yapıtaşları, moleküller, peptidler ve nükleik asitlerden nanofiberler meydana getirilebilir. Peptid ampifiller bu yöntem dahilinde sıklıkla kullanılan yapıtaşlarıdır [52,53]. Bu üretim metodunun, kendiliğinden düzenlenecek molekül seçeneğinin kısıtlı olması ve nanofiber oluşumunun zaman alması gibi dezavantajları vardır [52].

2.4.4. Faz Ayırımı Yöntemi

Faz ayırımı yöntemi çözünme, jelleşme, farklı bir çözücü kullanarak özütleme, dondurma ve kurutma basamaklarından oluşur [48]. Son zamanlarda alifatik polimerlerden nanofibröz yapılar oluşturmak için kullanılmaktadır. Bununla birlikte, sadece sınırlı sayıda polimer üzerinde kullanılabilen ve ticari düzeyde üretim yapılabilmesi zordur ve kendiliğinden düzenlenme metodu gibi zaman alan bir yöntemdir [48,54].

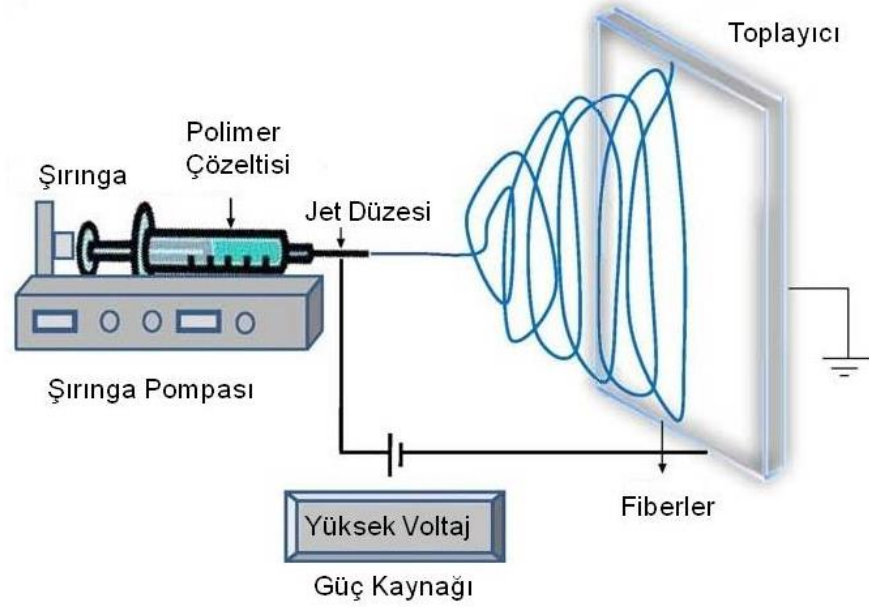
2.4.5. Elektrostatik Eğirme

Elektrostatik eğirme (electrospinning), doğal veya sentetik polimerler kullanılarak hazırlanmış çözeltilere elektrostatik kuvvetler uygulanarak, çapları 2 nm'den birkaç mikrometreye kadar uzanan kalınlıklarda polimer fiberler üretme tekniğidir. Bu yöntemle üretilmiş fiberler, nanokataliz, doku mühendisliği, koruyucu kıyafet, filtrasyon, biyomedikal, farmasötik, optik elektronik, sağlık bakımı, biyoteknoloji, çevre mühendisliği, savunma ve güvenlik alanında başarıyla kullanılmaktadır [55].

İlk kez Cooley ve Morton polimer çözeltilerinin elektrostatik eğilmesi üzerine yaptıkları çalışmalar ile patent almışlardır [56,57]. İlerleyen yıllarda bu teknik daha da geliştirilmiş, 1934-1944 yılları arasında electrospinning süreci ve düzenineğinin geliştirilmesine dair yaptığı çalışmalar, elektrostatik kuvvetler kullanarak polimer filamentleri üretilmesi için oluşturduğu sistem ile Formhals bir dizi patent almıştır [58,59]. Taylor, belirli bir elektrik alan içerisinde polimer çözeltisinin damlacığının konik şeklini alarak jet akışı oluşturduğunu göstermiştir [60]. Daha sonraki yıllarda konik biçimindeki bu damlacık "Taylor Cone" (Taylor Konisi) olarak adlandırılmıştır [61]. 1990'larda Reneker ve arkadaşları nanofiber üretmek için kullanılan bu

tekniki "electrostatic spinning" yerine "electrospinning" olarak adlandırarak mevcut terimi bilim dünyasına kazandırmışlardır [62,63].

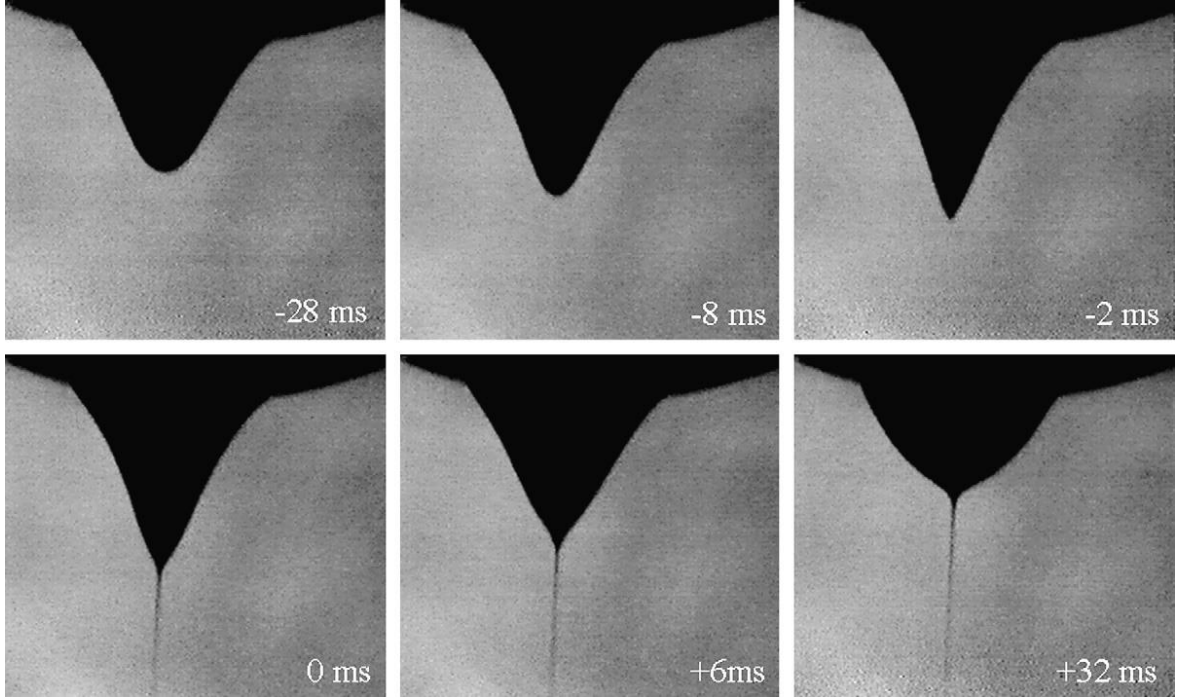
En temel elektrostatik eğirme düzeneği üç ana parçadan oluşmaktadır: yüksek voltajlı güç kaynağı, elektriksel iletkenliğe sahip bir jet düzesi (spinneret) ve belirli bir uzaklıkta bulunan toplayıcı [61] (Şekil 2.7.).



Şekil 2.7. Elektrostatik Eğirme Düzeneği [55]

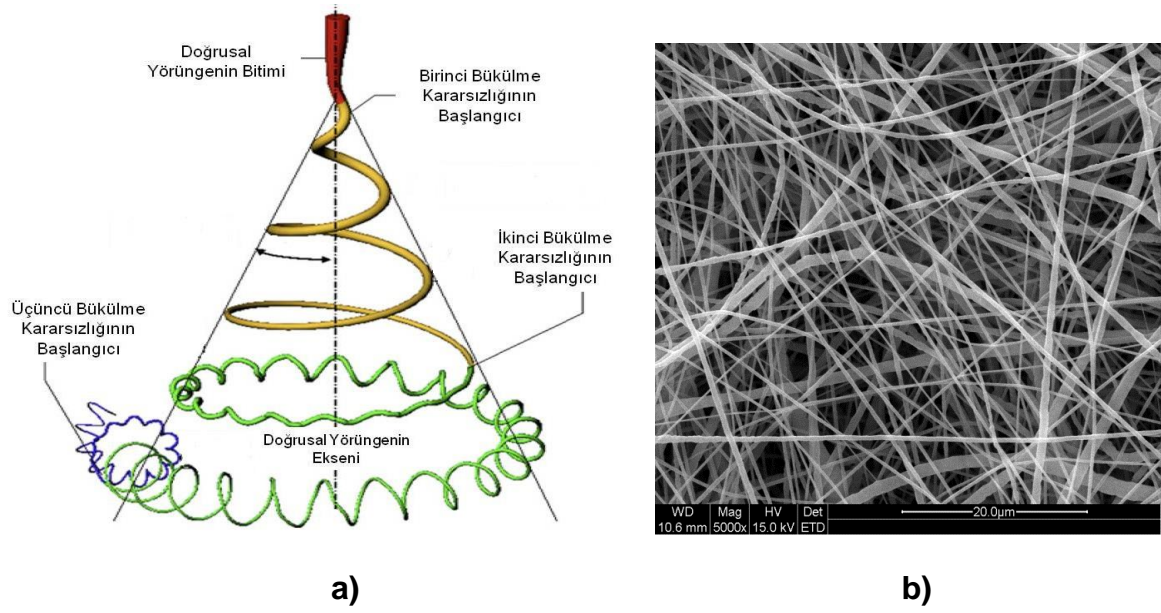
Sistemin çalışma prensibi en temel haliyle şu şekildedir: polimer çözeltisi spinneret olarak görev alacak küt uçlu bir iğneye sahip şırınga içerisinde muhafaza edilir. Şırınga pompası kullanarak, belirli ve ayarlanabilir bir oranda şırınga içerisindeki polimer çözeltisi beslenir. Güç kaynağından çıkan elektrodlardan biri eğirilecek polimer çözeltisini elektriksel olarak yüklemek için küt uçlu iğneye diğeri ise zıt kutuplu toplayıcıya (genellikle topraklanmış bir toplayıcı kullanılır) tutturulur. Şırınga ucunda bulunan iğneye 0-30 kV aralığında yüksek bir gerilim uygulandığında, iğne ucundaki belirli bir yüzey gerilimine sahip sıvı damlacığın yüzeyi elektrostatik olarak yüklenir. Damlacık yüzey yükleri arasındaki karşılıklı elektrostatik itme ve harici elektrik alan tarafından uygulanan coulomb kuvveti olmak üzere iki çeşit elektrostatik kuvvete maruz kalır. Bu elektrostatik

etkileşimlere bağlı olarak, sıvı damlacık Taylor konisi olarak adlandırılan konik biçimli bir hal alır. Bu aşamadan sonra elektrik alan şiddeti arttırılmaya devam eder; mutlak kritik bir değere ulaştığında elektrostatik kuvvetler polimer çözeltisinin yüzey gerilimini yenerek Taylor konisinin ucundan toplayıcıya doğru çözeltinin jet akışının başlamasına sebep olur [61] (Şekil 2.8.).



Şekil 2.8. Taylor Konisinin Oluşumu ve Jet Akışının Başlaması [64]: Elektrik alan şiddetinin zamanla arttırılması ile polietilen oksit (PEO) çözeltisinin damlacığında meydana gelen değişimler

Polimer jeti toplayıcıya ulaşırken izlediği yörünge başta doğrusal iken spinneret ve toplayıcı arasındaki uzaklığa da bağlı olarak daha sonra sarmal bir hal alır. Bu durum bükülme kararsızlığı olarak adlandırılır. Jetin birkaç dönüş oluşturmasının ardından, yeni bir elektriksel bükülme geniş bir sarmaldan daha küçük bir sarmal oluşmasına neden olur. Sıvı jet akışı katılaşıp (çözücünün buharlaşması ile) kadar küçük sarmal dönüşüne devam ederek daha küçük sarmalları oluşturur (Şekil 2.9.a). Sıvı jet toplayıcıya ulaşmadan önce uzamasını sürdürürken aynı anda çözücüsü de buharlaşır; bu sayede ince polimer fiberlerin oluşması ve toplayıcı yüzey üzerinde birikmesi sağlanmış olur [61,64] (Şekil 2.9.b).



Şekil 2.9. a) Polimer jetinin hareketi boyunca izlediği yörünge [58]: Doğrusal yörünge kırmızı, birinci bükülme sarmalı sarı ve üçüncü bükülme sarmalı mavi renk ile belirtilmiştir b) PCL çözeltilisinden oluşturulmuş nanofiberler: Polimer jetinin karakteristik hareketi sonucu toplayıcı yüzeye varması ile oluşan mikro/nano ölçekte fiberler

Dikey (polimer jetinin yukarı veya aşağı doğru dikey eksen üzerinde akışını gerçekleştirerek toplayıcıya ulaştığı sistem) ve yatay (polimer jetinin sağa veya sola doğru yatay eksen üzerinde akışını gerçekleştirerek toplayıcıya ulaştığı sistem) olmak üzere şu anda mevcut iki tip elektrostatik eğirme düzeneği vardır. Bu teknolojinin gelişmesi ile, birçok araştırma grubu daha kontrol edilebilir ve etkin şekilde karmaşık nanofibröz yapıların üretilebileceği sistemler oluşturmuşlardır [65,66]. Sistemin önemli noktalarından biri kullanılan toplayıcının çeşididir. Genellikle toplayıcı yüzey olarak alüminyum folyo kullanılmaktadır. Ancak folyo üzerinde biriken fiberlerin başka bir yere aktarımı ve hizalı fiberler oluşturma gereksinimi nedeniyle daha farklı, gelişmiş toplayıcılar tasarlanmıştır. Bunlar; iletken kağıt, iletken kumaş, tel örgü, yassı plaka, paralel demir çubuklar; dönen rod (tüp), çark, silindir ve dönen tel çubuklardan oluşmuş silindir gibi aparatlardır [55,67].

Elektrostatik eğirme sürecinde, oluşturulan polimer fiberlerin morfolojilerini etkileyen birçok parametre mevcuttur. Bu parametreler ve yaptıkları etkiler Çizelge 2.2' de özetlenmiştir [55,67].

Çizelge 2.2. Elektrostatik eğirme parametreleri ve fiber morfolojisi üzerine etkileri

Parametreler	Fiber Morfolojisi Üzerine Etkileri
<u>Çözelti Parametreleri</u>	
Viskozite / Konsantrasyon	Azaldıkça yapıda boncuklar, defektler oluşur Arttıkça defektler azalır, fiberlerin çapı artar
Polimerin Moleküler Ağırlığı	Artması ile boncuk ve damlacık miktarı azalır
İletkenlik	Artması, birbirine benzer, boncuksuz fiberlerin oluşmasına yardımcı olur Artması genellikle fiberlerin çapının azalmasına neden olur (Poliakrilik asit ve Poliamid-6 hariç)
Yüzey Gerilimi	Fiber morfolojisi ile arasında kesin bir bağlantı olmamakla birlikte, yüksek yüzey gerilimi jet akışında kararsızlığa neden olur

İşlem Parametreleri

Uygulanan Voltaj (Gerilim)	Fiber çapı ile arasındaki ilişki tam belirgin olmamakla birlikte genellikle gerilim arttıkça fiberlerin çapı azalır ancak çok yüksek gerilim boncuk oluşumuna yol açar
İğne ile Toplayıcı Arası	Çok büyük veya küçük mesafeler boncuk oluşumuna yol açar, birbirine benzer fiberler elde etmek için minimum uzaklık gereklidir
Mesafe	oluşumuna yol açar, birbirine benzer fiberler elde etmek için minimum uzaklık gereklidir
Besleme Oranı / Akış Hızı	Azaltılması ile fiberlerin çapı azalır Çok yüksek akış hızı boncuk oluşumuna yol açar

Çevresel Parametreler

Sıcaklık	Arttırılması ile çözelti viskozitesi ve fiber çapı azalır
Nem	Arttıkça, fiberler üzerinde dairesel porlar gözlenmeye başlanır

Elektrostatik eğirme ile üretilen fibröz doku iskelelerinin üstün mekanik ve fiziksel özelliklerinin yanında, doğal ECM yapısına olan benzerliği sayesinde hücre tutunması için yüksek yüzey alanı ve hücresel fonksiyonların yönlendirilebilmesi için gerekli topografik sinyalleri sağlayabileceği anlaşılmıştır. Yapısında ki bu eşsiz karakteristik özelliği sinir doku mühendisliğinde kullanımı için geniş araştırmaların başlamasına neden olmuştur [68]. Elektrostatik eğirme tekniği kullanılarak

PCL/Kolajenden [68] ve PCL/PLGA [69] oluşturulmuş sinir kanallarının siyatik sinir rejenerasyonunun sağlanmasında başarıyla uygulandığı mevcut çalışmalarla gösterilmiştir.

Diğer yöntemlerle kıyaslandığında, elektrostatik eğirme tekniğinin genel anlamda daha avantajlı olduğu Çizelge 2.3' de gösterilmektedir [49,67].

Çizelge 2.3. Nanofibröz doku iskelesi üretim tekniklerinin karşılaştırılması

Üretim Teknikleri	Avantajları	Dezavantajları
Çekme	Pratik	Üretim devamlı olmaması, Fiber boyutunun kontrol edilememesi
Kalıp Sentezi	Farklı kalıplar kullanarak fiber çaplarının değiştirilebilmesi	Karmaşık olması, Sürekli fiberler üretilmemesi
Kendiliğinden Düzenlenme	Belirli şartlar altında biyolojik süreçleri taklit edebilme	Karmaşık olması, Az sayıda polimer ile kullanılabilme, uzun ve devamlı fiberler üretilmemesi, Fiber boyutunun kontrol edilememesi
Faz Ayırımı	Pratik, uyarlanabilir mekanik özellikler	Az sayıda polimer ile kullanılabilme, zaman alma, uzun ve devamlı fiberler üretilmemesi, Fiber boyutunun kontrol edilememesi
Elektrostatik Eğirme	Pratik, Ekonomik, uzun ve devamlı fiberler üretilbilme, Birçok polimer ile kullanılabilme	Yüksek gerilim kullanılması

Tüm bu yöntemler arasında, ticari üretim potansiyeline sahip tek yöntem elektrostatik eğirmedir. Bu özelliğinden dolayı, nanofiber üretimi ile ilgili basılmış olan araştırma makalelerinin %50'den fazlası elektrostatik eğirme yöntemine dayanmaktadır [49].

2.5. Sinir Kanalı Yüzeyinin Fonksiyonlandırılması

Doku mühendisliği ve hücre kültürü açısından, hücrelerin yüzeye tutunması temel ve önemli bir özelliktir [70]. Doku mühendisliği uygulamalarının başarısı için doku iskelesi ile hücreler arasındaki etkileşimlerde, doku iskelesinin yüzey özellikleri büyük önem taşımaktadır. Sentetik hidrofobik polimerlerin (PCL gibi) düşük hidrofilik özelliklerinden ve yetersiz yüzey hücre tutunma bölgesine sahip olmalarından dolayı hücrelerin bu polimerlere afinitesi düşüktür [48]. Bu karakterde yüzeylere hücre tutunmasını artırmak amacı ile ECM proteinleri, poli-L-lizin (PLL), Cell-Tak (midye adesiv proteininin doğal ekstresi), Arjinin-Glisin-Aspartik asit (RGD) üçlü peptid dizisi gibi çeşitli hücre adezyon molekülleri ile yüzeyler modifiye edilmektedir [70].

Sinir rejenerasyonu göz önüne alındığında, ECM proteinlerinden özellikle laminin büyük bir rol oynamaktadır. Laminin; nöronal hücrelerin tutunması ve yayılmasını teşvik edici fonksiyona sahiptir. Laminin-1 proteini, schwann hücrelerinin büyümesini, nöronal göçü, merkezi ve periferik sinir sisteminin rejenerasyonunu artırır [71]. Ancak, ECM proteinleri kısmen pahalıdır ve farklı türde hayvanlardan elde edildikleri için enfeksiyon riski taşımaktadırlar.

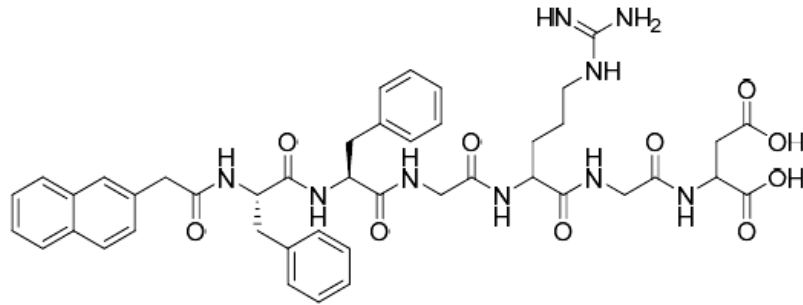
PLL ekonomik olmasına rağmen spesifik olmayan hücre adezyonu, sitotoksikite ve düzensiz hücre dağılımı gibi özelliklerinden dolayı etkin bir hücre adezyon materyali değildir.

Cell-Tak, doğal bir biçimde elde edilmektedir ve midye adesiv proteini karışımı olarak ticarileştirilmiştir. Diğer hücre adezyon materyallerine oranla daha az sitotoksiktir. Bununla birlikte verimsiz ve yoğun emek isteyen üretim sürecine bağlı olarak yüksek üretim maliyetine sahiptir. Midyeler, midye tutunma proteinleri sayesinde dalgalı deniz ortamındaki ıslak yüzeylere güçlü bir şekilde bağlanabilmektedir. Bunun yanında ekstraksiyonunun sınırlı olması ve fonksiyonel bir rekombinantının da henüz üretilmemiş olmasından dolayı tercih edilmemektedir [70].

2.5.1. RGD Peptid Dizisi

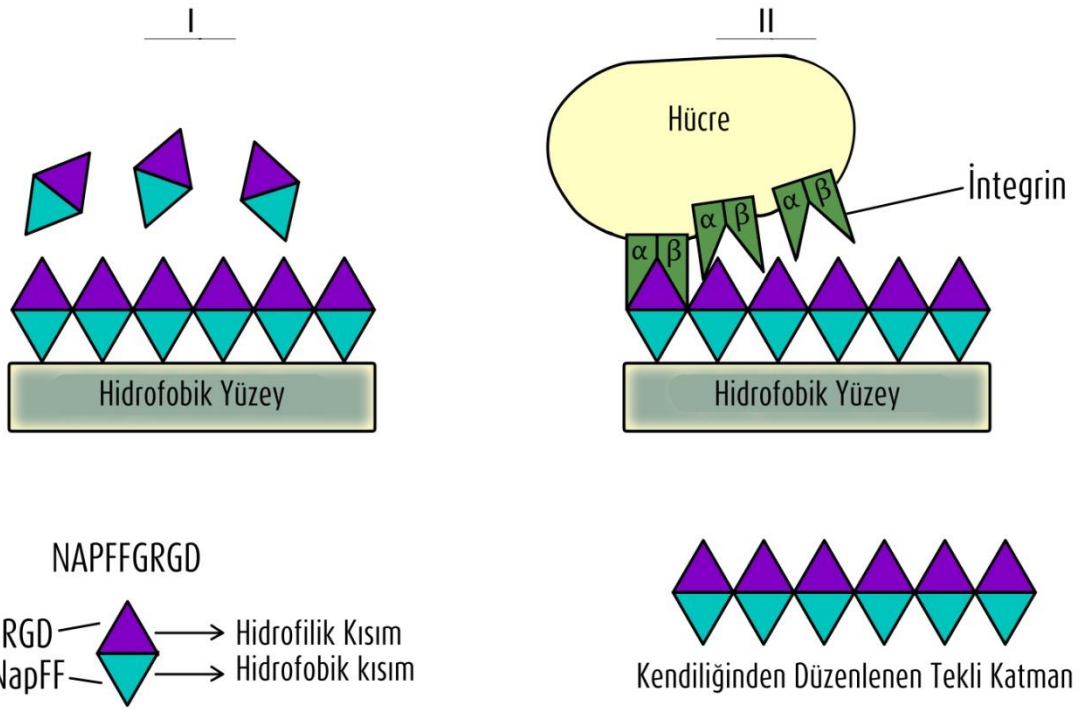
Arjinin-Glisin-Aspartik asit (RGD), ilk defa 1980'lerde Pierschbacher ve Ruoslahti tarafından, birçok ekstraselüler matriks proteini ve kan proteininde de bulunan en

küçük hücre tanıma sekansı olarak tanımlanmıştır [72]. RGD sekansı; kolajen, fibronektin, laminin [73], tenascin C gibi materyaller içinde bulunan, hücrelerin tutunmalarını sağlayan tanıma motifidir. RGD sekansı; hücrelerin tutunmaları, yayılmaları, aktin iskeleti oluşumu ve fokal yapışmanın gerçekleşmesi şeklindeki 4 ardışık basamaktan oluşan integrin aracılı hücre yapışması için ligand görevi görmekte, aynı zamanda hücre davranışı ve hücre döngüsü ile ilgili sinyallerin iletilmesinde önemli rol oynamaktadır [70]. Özellikle zenoogreft veya allogreftlerden elde edilen ECM proteinleri patojen transferi ya da immün sistem reaksiyonu gibi riskler doğururken, RGD kullanımı bu riskleri en aza indirir. RGD peptid dizisinin kullanılmasının bir diğer avantajı ise sentezinin basit ve ucuz olmasıdır [74]. RGD sekansı sentetik yüzeyler üzerine hücrelerin tutunmasını teşvik eden en etkin peptid dizisidir. RGD peptidi yalnızca hücre tutunmasını uyarmakla kalmaz ayrıca spesifik hücre yanıtını da sağlar [75]. Ancak, PCL yüzeyindeki aktif grupların eksikliğinden dolayı RGD'nin yüzey üzerine doğrudan kimyasal olarak immobilizasyonu zordur [76]. Wang ve arkadaşları PCL sinir kanallarını RGD ile kaplayabilmek için olan Nap-FFGRGD molekülü (Şekil 2.10.) ile RGD yüzey kaplama metodunu tanımlamışlardır.



Şekil 2.10. Nap-FFGRGD molekülünün kimyasal formülü

Nap-FFGRGD, hidrofobik naftalin grubu ve RGD tripeptid yapısından oluşan bir moleküldür. Bu molekül kendiliğinden düzenlenerek, PCL gibi hidrofobik yüzeylerde yüksek RGD yoğunluklu bir tabaka oluşturabilmektedir [77] (Şekil.2.11).



Şekil 2.11. Nap-FFGRGD molekülünün hücre tutunmasındaki rolü I) Nap-FFGRGD molekülünün hidrofobik yüzey üzerinde kendiliğinden düzenlenerek tekli katman oluşturması II) RGD sekansının integrin aracılı hücre yapışması için ligand görevi görmesi

3. MATERYAL VE METOD

Bu bölümde, sunulan tez çalışması kapsamında seçilmiş olan materyaller ile gerçekleştirilen deneysel çalışmalar hakkında ayrıntılı bilgi verilmiştir.

İlk olarak literatür verileri ışığında, biyobozunur ve biyouyumlu bir polimer olan PCL'dan uygun niteliklerde (kanalın duvar kalınlığı, iç çapı, fiberlerin morfolojisi) sinir kanalları üretimini gerçekleştirebilmek amacıyla elektrostatik eğirme sisteminin parametreleri, yapılan farklı denemeler ve Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) analizlerine dayanarak optimize edilmiştir. Periferik sinir rejenerasyonunu sağlayabilecek parametreler belirlendikten sonra kanal üretimi gerçekleştirilmiştir. Oluşturulan bu sinir kanallarının yüzeyi RGD üçlü peptid dizisi ile kaplanmıştır. Hazırlanan kanalların hücreler üzerindeki etkisini değerlendirmek için L929 fare fibroblast hücre kültür modeli kullanılmıştır. Hücrelerin metabolik aktivitesinin ölçümü WST-1 analizi ile yapılmıştır. Hücrelerin % nekrotiklik oranı ve morfolojik gözlemi ise Hoechst ve propidyum iyodür ikili boyama tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Doku iskelelerinin karakterizasyonu taramalı elektron mikroskopu (SEM) analizleri, biyobozunurluk testi, çekme-uzama testleri, değme açısı testi, diferansiyel taramalı kalorimetre, floresan izotiyosiyanat (FITC) işaretli Nap-FFGRGD ile kaplanmış PCL sinir kanallarının konfokal mikroskop ile görüntülenmesi ile gerçekleştirilmiştir.

Son kısımda ise üretilen biyomalzemelerin doku mühendisliği alanındaki kullanım potansiyeli *in vitro* hücre çalışmaları ile değerlendirilmiştir.

Bu aşamalar aşağıdaki başlıklarda detaylı olarak incelenmiştir.

3.1. RGD ile Kaplanmış PCL Sinir Kanallarının Hazırlanmasında Kullanılan Kimyasallar Maddeler

Tez kapsamında hazırlanan RGD üçlü peptid dizisi ile yüzeyleri fonksiyonlandırılmış PCL sinir kanallarının oluşturulmasında kullanılan kimyasallar Çizelge 3.1.'de sunulmuştur.

Çizelge 3.1. Doku iskelelerinin sentezi için kullanılan kimyasallar

Kimyasal Adı	Kullanım Amacı	Firma Adı
Poli-ε-kaprolakton (PCL)	Doku İskelesi Oluşturulması	Sigma (Almanya)
Polietilen Glikol (PEO)	Sinir Kanalı Oluşturulması	Sigma (Almanya)
Kloroform (CHCl ₃)	Çözücü	Tianjin Chemical Reagent Company (Çin)
Metanol (CH ₃ OH)	Çözücü	Tianjin Chemical Reagent Company (Çin)
Etanol (C ₂ H ₆ O)	Sinir Kanalı Oluşturulması ve Sterilizasyonu	Tianjin Chemical Reagent Company (Çin)
Sıvı Azot (N ₂ (l))	Sinir Kanalı Yapısının Korunması	Tianjin Chemical Reagent Company (Çin)
Sodyum Klorür Çözeltisi (NaCl)	Sinir Kanallarının Sterilizasyonu	Tianjin Chemical Reagent Company (Çin)
Nap-FFGRGD	Yüzey Kaplanması	Prof. Zhimou Yang Laboratuvarı Nankai Üniversitesi
Sodyum Karbonat (Na ₂ CO ₃)	pH Dengeleyici	Tianjin Chemical Reagent Company (Çin)
Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS)	Sterilizasyon	Tianjin Chemical Reagent Company (Çin)

3.2. RGD Kaplı PCL Sinir Kanallarının Hazırlanması

3.2.1. Elektrostatik Eğirme Sistemi Parametrelerinin Optimizasyonu

Sinir kanallarının üretimi için literatürde de belirtilen avantajları dolayısıyla PCL (Moleküler Ağırlığı = 80.000) polimeri seçilmiştir. Elektrostatik eğirme sistemi kullanılarak PCL polimerinden kanallar oluşturulmuştur. Genel bilgiler kısmında da bahsedildiği üzere oluşturulacak elektrostatik eğirme sisteminde doku iskelesinin yapısını etkileyen farklı parametreler mevcuttur. Çözelti başlangıç viskozitesi önemli bir parametre olduğundan, 80.000 molekül ağırlığında PCL polimeri için en uygun çözücü 5:1 oranında Kloroform/Metanol karışımı, başlangıç derişimi de %10 PCL olarak belirlenmiştir. PCL çözeltisi hazırlamak için, mevcut tez çalışması deneylerinin büyük bir bölümünün gerçekleştirildiği Nankai Üniversitesi (Çin)'nden Prof. Deling Kong ve grubunun da [76] başarıyla kullanmakta oldukları oranlar tercih edilmiştir.

Oluşturulacak doku iskelesinin temelini teşkil eden nano/mikro ölçekte fiberlerin çapı, yapısı ve birbirlerine olan benzerliği üzerinde etkili olan voltaj değeri, iğne ile toplayıcı arası mesafe ve akış hızı gibi işlem parametreleri amaca uygun farklı denemeler yapılarak optimize edilmiştir.

- **Voltaj:** Güç kaynağı üzerinden 12, 14, 16 ve 18 kV'luk farklı gerilimler ayarlanarak polimer çözültisine uygulanmıştır.
- **İğne ile Toplayıcı Arası Mesafe:** 12-15 cm arası uzaklıklar ile çalışmalar yapılmıştır. Elektrostatik eğirme sisteminde çevresel etmenlerin (sıcaklık, nem vb.) değışmesi polimerin jet akışını etkilemektedir. Bu faktörler göz önünde bulundurularak, şırıngalı pompa stabil bir polimer jet akışı sağlayacak mesafeye getirilmiştir.
- **Akış Hızı:** Şırıngalı pompa sisteminden saatte 1, 2 ve 4 ml olacak şekilde çözelti akış hızları ayarlanarak çalışmalar yapılmıştır.

Şekil 2.7.'de de görüldüğü gibi elektostatik eğirme sistemi bir güç kaynağı, bir şırıngalı pompa ve bir toplayıcı olmak üzere üç temel kısımdan oluşmaktadır. Sistem ile çalışırken sırası ile şu işlemler gerçekleştirilmiştir:

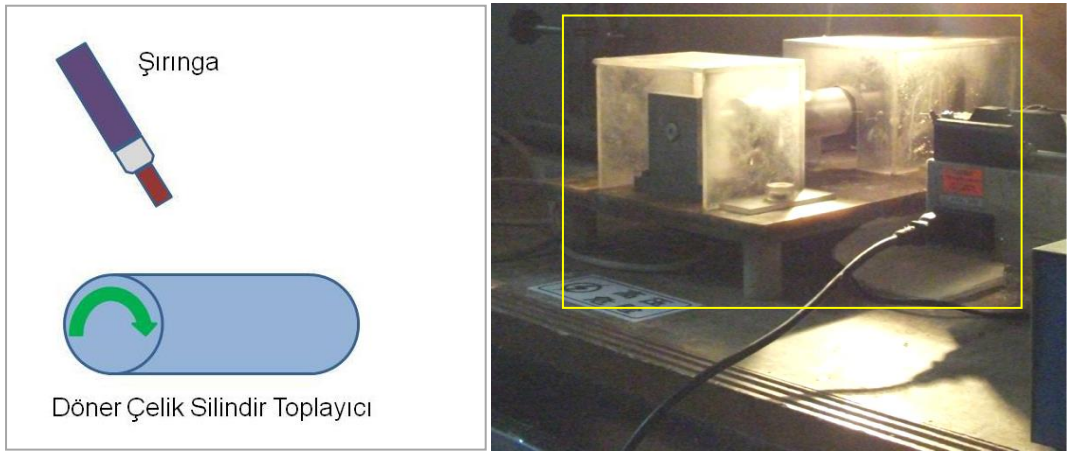
- 1,2 g PCL polimerinin 10 ml kloroform / 2 ml metanol içerisinde 12 saat boyunca karıştırılmasıyla polimer çözeltisi hazırlanmıştır. Polimer çözeltisi 1 hafta süre ile oda sıcaklığında muhafaza edilerek kullanılabilir.
- Hazırlanmış olan PCL çözeltisi 15 mm çap ve 10 ml'lik hacme sahip plastik şırınga içerisine çekilmiştir. Şırınganın ucuna spinneret görevini görecekt ucu düzleştirilmiş 21 gauge'lik (0,0285 inç = 0,724 mm çapa sahip) paslanmaz çelik bir iğne (Şekil 3.1.) [78]. 3-4 cm'lik teflon (politetrafloroetilen) bir tüp ile arabağlantı yapılarak tutturulmuştur.



Şekil 3.1. Elektostatik eğirme işleminde kullanılan 21 gauge'lik paslanmaz çelik iğne

- Şırınga, şırıngalı pompaya yerleştirildikten sonra gerekli ayarlar yapılmıştır. Kullanılan şırınganın iç çapı, şırınga içerisinde bulunan çözeltinin hacmi ve belirli uzaklıkta bulunan topraklanmış toplayıcıya doğru çözeltinin akış hızı cihaza girilmiştir.

- Yüksek voltajlı güç kaynağından çıkan artı (+) yüklü elektrot şırınga ucundaki iğneye, eksi (-) yüklü elektrot ise topraklanmış toplayıcıya tutturulmuştur.
- Sıcaklık ve nem de elektrostatik eğirme işleminde jet akışını ve oluşan fiber kalitesini etkileyen faktörlerdir. Tez kapsamında PCL için oda sıcaklığı ve yaklaşık %40-55 nemliliğin uygun olduğu gözlenmiş ve bu şartlar altında çalışılmıştır.
- Bu aşamalardan sonra önce şırıngalı pompa ardından da güç kaynağı çalışmaya başlatılarak alüminyum folyo ile sarılmış olan döner çelik silindir toplayıcı (Şekil 3.2.) üzerinde PCL fiberlerin biriktirilmesi sağlanmıştır. Oluşturulan PCL membranların taramalı elektron mikroskopunda fiber yapıları gözlemlenerek en uygun olan parametreler sinir kanalı üretimi için seçilmiştir.



(a)

(b)

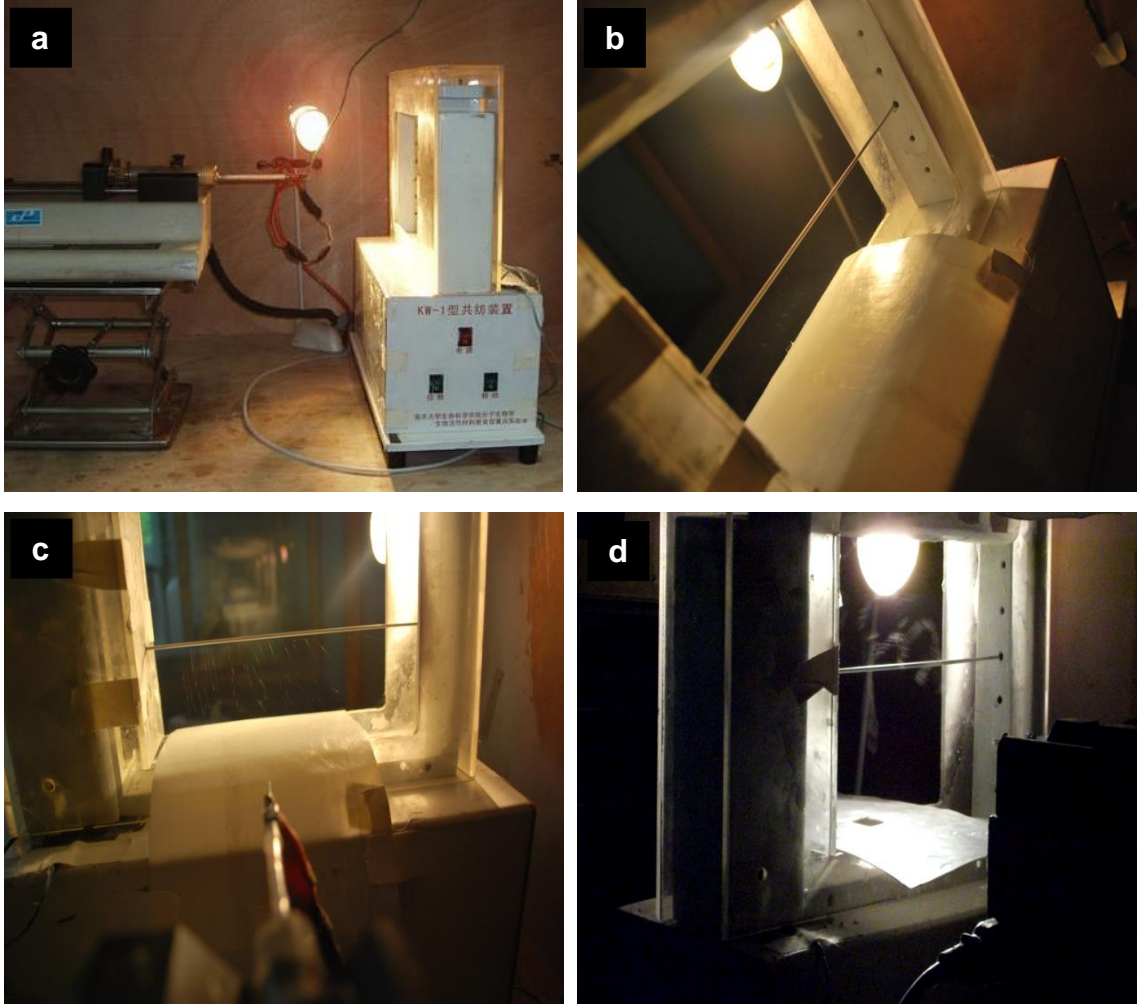
Şekil 3.2. Elektrostatik eğirme sistemi ile polimer çözeltilisinden membran oluşturmak için kullanılan döner çelik silindir toplayıcı a) Toplayıcının şematik resmi b) Tez çalışmasında kullanılan toplayıcının bir örneği (sarı dikdörtgen içerisinde belirtilmiştir)

- PCL membranlar bir gece boyunca vakum desikatöründe bekletilerek toksik çözücülerin uzaklaşması ve membranların kuruması sağlanmıştır. Bu aşamanın sonunda membranlar kullanılabilir hale gelmektedir.

3.2.2. Elektrostatik Eğirme Yöntemi ile Sinir Kanallarının Hazırlanması

Sinir kanalları üretiminde Prof. Deling Kong' un grubu tarafından tübüler yapılar oluşturmak için özel olarak tasarlanmış olan toplayıcı sistemi kullanılmıştır. Toplayıcı hem radyal hem de aksiyal hareket edebilen bir merdane sistemidir. Fiberler, sisteme entegre edilebilen farklı çaplarda (1-4 mm) paslanmaz çelik rodlar üzerinde biriktirilerek tübüler yapılar oluşturulabilmektedir. Sistem, tek bir seferde 6 adet rod ile çalışmaya imkan sunmaktadır. Toplayıcı sistemi ve rodlar üzerine sarılan PCL fiberler Şekil 3.3.'te görülmektedir.

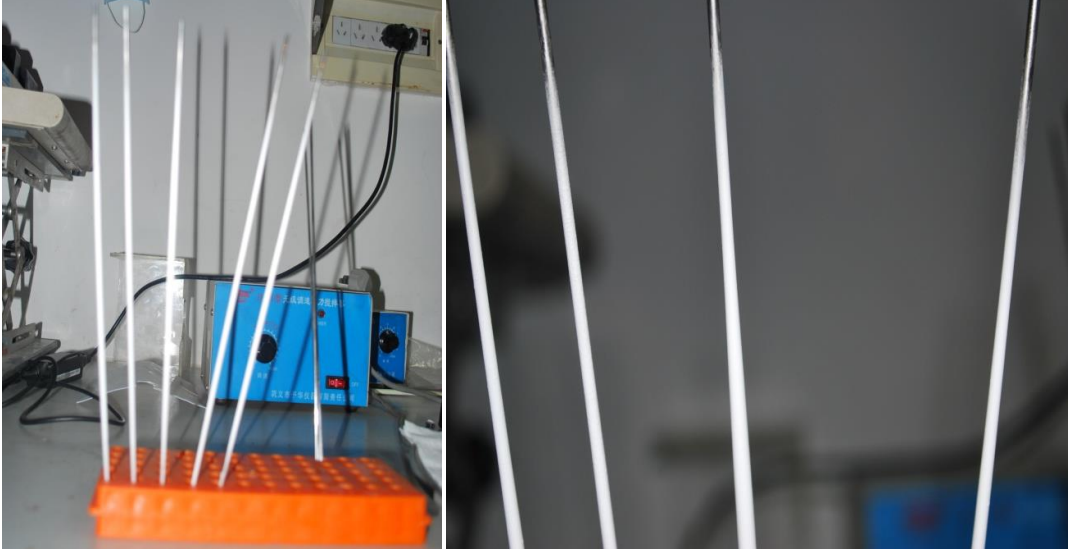
Sunulan tez kapsamında, 2 mm çaplı paslanmaz çelik rodlar üzerinde, PCL nanofiberler ile sarılmadan önce PEO tabakası oluşturulacaktır. Bu amaçla etanol içerisinde çözünmek suretiyle %10'luk PEO (2000 Molekül Ağırlığında) çözeltisi hazırlanmıştır. PEO çözeltisine, sistemde kullanılacak olan her bir çelik rod sırası ile 10 saniye kadar daldırılarak yüzeyde ince bir PEO tabakası oluşturulması sağlanmıştır. Elektrostatik eğirme işlemine başlamadan önce rodlar üzerinde ki PEO çözeltisinin kuruması için 15 dakika oda sıcaklığında bekletilmesi gerekmektedir. Kurutmanın ardından, polimer fiberlerin rodlar üzerinde homojen dağılmayacağı göz önünde bulundurularak her seferinde (her bir kanal oluşturulmasında) tek bir çelik rod toplayıcı sistemine entegre edilmiştir.



Şekil 3.3. Tübüler yapılar oluşturmak için tasarlanmış olan toplayıcı sistemi
a) Solda şırıngalı pompa, pompaya yerleştirilmiş olan şırınganın 21 gauge'lik iğnesinin ucuna takılı güç kaynağından çıkan elektrot; sağ tarafta iğneden belli bir uzaklıkta konumlandırılmış toplayıcı sistemi b) Toplayıcı sisteminin daha yakından görüntüsü c) Toplayıcı sisteminin rodu üzerinde PCL fiberlerin biriktirilmesi d) Spiral bir yörünge izleyerek rod üzerine sarılan PCL polimerin jet akışı

PCL membranların analizi sonucu tez çalışması için uygun olduğu belirlenen 18 kV gerilim, 2 ml/saat akış hızı ve iğne - toplayıcı arası 12 cm mesafe ile sistem başlatılarak 25 dakikalık bir süre boyunca, yaklaşık 0,83 - 0,85 ml'lik polimer çözeltisinin kullanılması ile rod üzerinde PCL fiberlerin biriktirilerek kanalın

oluşması sağlanmıştır. Şekil 3.4.'te 2 mm çaplı çelik rod üzerine sarılarak biriktirilmiş polimerik fiberler görülmektedir.



Şekil 3.4. Çelik rodlar üzerine sarılmış PCL fiberler

Periferik sinir rejenerasyonunda kullanılacak sinir kanallarının fiziki olarak sinir yapısına uyumlu olması gerekmektedir. Kanalın duvar kalınlığı ve kanalın çapı aksonların yönlenebilmesinde ve kanalın fizyolojik etkilere karşı stabilitesini koruyabilmesinde önemlidir. Mevcut çalışmalar kalın duvarlı sinir kanallarının implantasyon esnasında zor işlenebildiğini ve dikişin zor olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, duvar kalınlığı arttıkça sertliği de artacağından *in vivo* koşullarda doku uyumluluğu zayıftır bu yüzden inflamasyonel yanıtları tetikleyebilir [41]. Ortalama 0,81 mm'lik bir duvara sahip sinir kanallarının akson büyümesi için elverişli olduğu, bundan daha kalın duvarlı kanalların akson büyümesini azalttığı gözlenmiştir [79,80]. İnce duvarlı kanallar daha az nöroma oluşumuna sebebiyet verirken, elastisitesi de daha yüksektir [41,81]. Çelik rodlar üzerinde toplanan PCL fiber miktarı (kullanılmış olan polimer çözeltisinin hacmi) üretmiş olduğumuz kanal kalınlığını etkilemektedir. Dolayısıyla istenen kalınlık süre değişken parametre olarak kullanılmıştır. Farklı zaman aralıkları boyunca işlem devam ettirilerek, farklı kalınlığa sahip kanallar oluşturulmuş, SEM analizlerine dayanarak literatür verileri ışığında sinir rejenerasyonu için uygun olan tercih edilmiştir.

Belirli miktarda fiber rod üzerinde biriktirilerek istenilen kalınlıkta kanal teşkil edecek hale geldikten sonra çelik rodlar sistemden ayrılarak bir gece boyunca desikatörde kurumaya bırakılmıştır. Kurutma işlemi sonunda üzerine PCL fiberler sarılmış olan rodlar %100'lük etanol içerisinde 2 saniye kadar daldırılarak önceden oluşturulmuş olan PEO tabakası uzaklaştırılmış, çelik rod ile PCL kanallar arasında oldukça ince boş bir tabaka meydana getirilmiştir. Bu sayede PCL kanallar yapıları herhangi bir deformasyona uğramadan, çelik rod üzerinden kolayca ayrılarak elde edilebilmiştir. Kullanılan bu yöntemle, daha uzun sinir kesileri ile karşılaşıldığında, pratik bir şekilde uzunluğu 10 cm'e kadar varan kanallar oluşturmak mümkündür.

Çelik roddan ayrılan PCL kanallar, her birinde 5 dakika olmak üzere %100'den %50'ye kadar olan alkol serilerinden geçirilmiştir. Bunu yaparken farklı oranlarda seyreltilmiş etanol, falkon tüpler içerisinde doldurulmuş, tüpler de içerisinde konularak oda sıcaklığında karıştırıcı üzerinde bırakılmıştır. Sonrasında aynı işlem 3 saat boyunca distile su ile yapılmıştır. Ardından kanallar sıvı azot ile dondurulup bir gece boyunca -80°C'de muhafaza edilmiştir. Dondurulmuş halde bulunan kanalların çözülmesi, kuru bir şekilde elde edilmesi için 2 gün süre ile liyofilizatörde bırakılarak "dondurarak kurutma" işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu proses sonucunda PCL sinir kanallarından PEO tamamen çözünerek uzaklaştırılmış, kanalların fiziki yapısı korunarak elde edilebilmiştir.

Sinir kesisinin teknik boyutlarına bağlı olarak 2 cm'den daha büyük kesilerin etkili bir biçimde tedavi edilmesinin son derece zor olduğu bilinmektedir. 2 cm'den daha büyük kesilerde iyileşmenin değerlendirilebilmesi için köpek, tavşan veya primat gibi hayvan modelleri kullanılmalıdır. Ancak bu hayvan modelleri ile çalışma gerçekleştirmenin beraberinde getirdiği etik problemler, istatistiksel olarak güvenilir veriler elde etmek için yeterli hayvan olmaması ve iki yıla varabilecek klinik olarak uzun süreli çalışma gereksinimi doğurması gibi dezavantajları mevcuttur [41]. Çalışmalarda üzerinde en çok uygulama yapılan hayvan modeli rat siyatik siniridir. Bu modelde 15 mm'den daha büyük sinir kesisi ile çalışmak olası değildir [82]. Bu veriler dikkate alınarak, *in vivo* koşullarda sinir kanallarının etkinliğinin değerlendirilmesi çalışmalarına yönelik olarak, 2 cm uzunluğunda kanallar hazırlanmıştır.

3.2.3. Sinir Kanallarının Yüzeyinin RGD ile Kaplanması

Prof. Deling Kong ve grubu, RGD adsorbe edilmiş PCL kanalların vasküler greft uygulamalarında çok daha başarılı olduğunu göstermişlerdir [76]. RGD'nin sinir kanalları içinde de rejenerasyon üzerinde etkili olabileceği görüşü ile sunulan tez kapsamında RGD modifikasyonunun da uygulanması öngörülmüştür. Bunun için Nankai Üniversitesi'nden Prof. Zhimou Yang'ın laboratuvarında sentezlenecek ve onlardan temin edilecek olan RGD' nin modifiye formu "Nap-FFGRGD" molekülü kullanılacaktır [77]. Sinir kanallarının RGD sekansı ile fonksiyonlandırılması işleminde sırası ile şu basamaklar izlenmiştir:

- RGD ile kaplama işleminden bir gün önce sterilizasyon için, laminar flow altında PCL kanallar önce %75'lik etanol ile 15 dakika yıkanmıştır. Ardından 4-5 kez steril NaCl solüsyonu ile kanalların içi ve dışı yıkandıktan sonra bir gece boyunca ultraviyole (UV) ışığı altında kurumaya bırakılmıştır.
- RGD çözeltisi hazırlamak için 3 mg Nap-FFGRGD ve 24,5 mg Na₂CO₃ tartıldıktan sonra 30 dakika UV ışığı altında bekletildi. Nap-FFGRGD 15 ml, Na₂CO₃ 10 ml steril su içerisine boşaltılarak çözünme işlemine başlanmıştır.
- Na₂CO₃, çalkalayarak su içerisinde kolaylıkla çözülmemektedir. Kanalların RGD ile kaplanması için en uygun pH 7,4 olarak belirlenmiştir. Ancak Nap-FFGRGD solüsyonunun pH değeri 7,4'ten düşüktür. Solüsyon asidik olduğu zaman Nap-FFGRGD molekülünün çözünmesi zorlaşmaktadır. Çözünürlüğü artırmak amacıyla pH değeri değiştirilmiş ve bunun için Na₂CO₃ çözeltisinden 150 µl, Nap-FFGRGD çözeltisi içerisine aktarılmıştır.

- Nap-FFGRGD molekülünü steril su içerisinde çözmek için önce sonikatör içinde 10-15 dakika çalkalanarak bekletilmiş ardından 70°C'lik sıcak su banyosunda 10 dakika süre ile çözme işlemine devam edilmiştir.
- 2 cm'lik bir PCL kanalın kaplanabilmesi için 1,5-2 ml RGD çözeltisinin uygun olduğu gözlenmiştir. Bu doğrultuda 2 ml eppendorf tüpleri RGD çözeltisi ile doldurulup içlerine kanallar yerleştirildikten sonra 12 saat süre ile 37°C'lik etüve kaldırılmıştır.
- 12 saatlik süre sonunda RGD ile kaplanmış olan kanallar 5 kez PBS çözeltisi ile yıkanıp, aseptik koşulları sağlamak amacıyla ultraviyole (UV) ışık altında kurumaya bırakılmıştır. Kurutma işlemi tamamlandığında steril tüpler içerisinde, -20°C'de yapısı korunarak muhafaza edilebilmektedir.

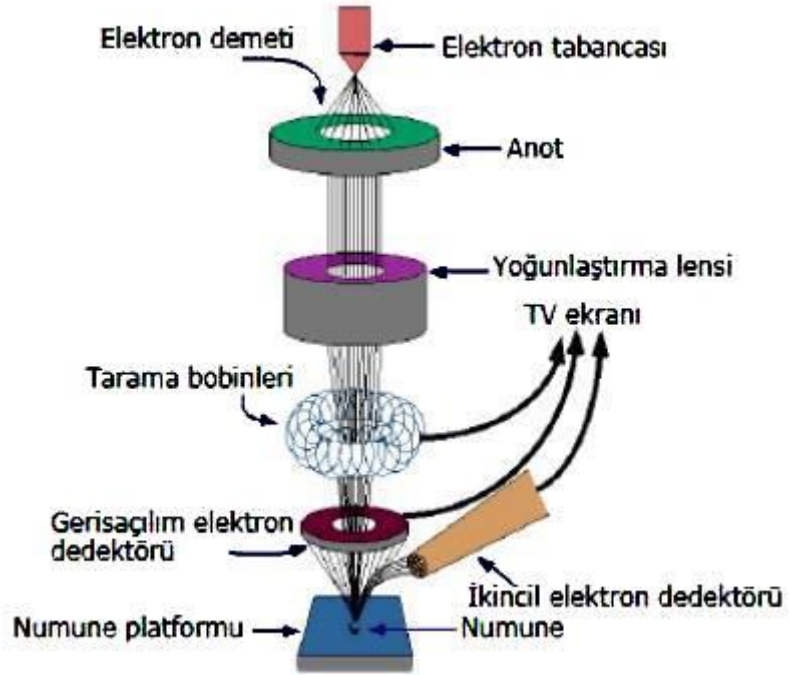
3.3. Karakterizasyon Testleri

3.3.1. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM)

Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) biyolojik bilimler, çeşitli tıp dalları, kriminal, malzeme bilimleri, mikroelektronik gibi farklı alanlarda yapıların yüzeyleri hakkında fikir edinebilmek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. En temel haliyle, bir elektron demetinin incelenecek numunenin elektronları ile etkileşmesi sonucunda örneğin yüzey yapısı hakkında nanometre seviyelerine kadar bilgi edinebilmeyi sağlamaktadır.

SEM'de incelenecek numunelerin vakum altında buharlaşmayan, kuru, iletken, temiz ve katı halde olmaları gerekmektedir. Eğer numune yalıtkan özellikte ise iletken bir tabaka oluşturmak, iletken ancak topografisi fazla ise mümkün olduğunca düz bir tabaka meydana getirmek amacıyla yüzeyinin kaplanması gerekmektedir. Kaplama işlemi için vakum altında yüksek sıcaklık ile kaplama ve yüksek hızlı iyonlardan yararlanılarak sputter yöntemiyle kaplama olmak üzere iki şekilde yapılabilir. Altın, bakır, paladyum, alüminyum, gümüş gibi metaller veya karbon ile kaplanmaktadır. Bunlar arasında oksitlenmez olması, elektron ışınları altında stabilitesini koruması, kaplama işleminin kolay olması nedeniyle sputter yönteminde standart olarak altın ile kaplama en çok tercih edilendir.

Taramalı Elektron Mikroskobu optik kolon, örnek haznesi ve görüntüleme sistemi olmak üzere 3 ana kısımdan oluşur. Numune yüzeyinden alınan sinyalin kalitesini arttırmak için optik kolon içerisindeki elektron tabancasından çıkan kararlı bir elektron demeti anot plakası tarafından örneğe doğru hızlandırılır. Yoğunlaştırıcı lensler ile ince bir elektron demeti elde edilir. Tarama bobinleri ile bu elektronların örneğin yüzeyini taraması sağlanır. Optik kolon ve örnek 10^{-4} Pa gibi bir vakum altında tutulmaktadır. Örnek haznesinde, SEM için özel hazırlanmış örnek bulunmaktadır. Elektron demeti örnek atomlarının elektrostatik alanı veya örnek atomlarının yörüngesindeki elektronlar ile etkileştikten sonra ortaya çıkan ikincil elektronlar, geri saçılan elektronlar, soğurulan elektronlar, Auger elektronları ve X-ışınları gibi kaydedilen sinyaller görüntü oluşturmada kullanılır. Görüntü sistemi dahilindeki dedektörler ile bu sinyaller algılanıp sinyal güçlendiriciler vasıtasıyla güçlendirildikten sonra ekranda görüntü elde edilmiş olur (Şekil 3.5.).



Şekil 3.5. Taramalı Elektron Mikroskopisi

Tez kapsamında oluşturulan PCL membranların ve kanalların yüzey morfolojileri hakkında bilgi edinebilmek için numuneler sputter yöntemi ile altın kaplanarak SEM (FEI Quanta 200, Çek Cumhuriyeti) ile görüntüleme gerçekleştirilmiştir. Öncelikle, farklı parametreler kullanılarak ("Elektrostatik Eğirme Sistemi Parametrelerinin Optimizasyonu" bölümünde belirtildiği üzere) hazırlanmış PCL membranlar küçük parçalar halinde numune tablası üzerine tutturulmuş uygun şekilde kaplama yapıldıktan sonra analiz edilerek görüntüleri elde edilmiştir. Membranların SEM görüntülerine dayanarak nano/mikrofiberlerin kalınlıkları, fiberlerin birbirlerine benzer oluşları, boncuk yapılarının oluşumu gibi kriterler ImageJ yazılımı ile değerlendirilip, kanal oluşturmak için uygun olan yapı ve sistem değerleri belirlenmiştir. Bu değerlere göre farklı duvar kalınlığına sahip kanallar oluşturulduktan sonra yapılarını muhafaza edebilmek amacıyla sıvı azot ile dondurularak 2 mm'den küçük olmak üzere enine kesitler alınmıştır. Aynı PCL membranların incelenmesinde olduğu gibi, alınan kesitler kullanılarak SEM ile görüntüleri elde edilmiştir. Bu görüntüler üzerinden kanalların morfolojisi, duvar kalınlıkları, gözenek yapıları aynı şekilde ImageJ yazılımı ile değerlendirilmiştir.

3.3.2. Gerilme - Uzama Testi

Gerilme - Uzama deneyi ile malzemelerin statik yük altındaki elastik ve plastik davranışları belirlenmektedir. Malzemeye kuvvet uygulandığı zaman malzemede meydana gelen uzamalar elastik sınırlar içinde gerilmelerle orantılıdır. Bu durum "Hooke Kanunu" ile ifade edilmektedir. Hooke kanunundan faydalanılarak malzemenin elastisite modülü bulunabilir.

Hooke Kanununun ifadesi şu şekildedir [83]:

$$1-) \sigma = E \cdot \epsilon$$

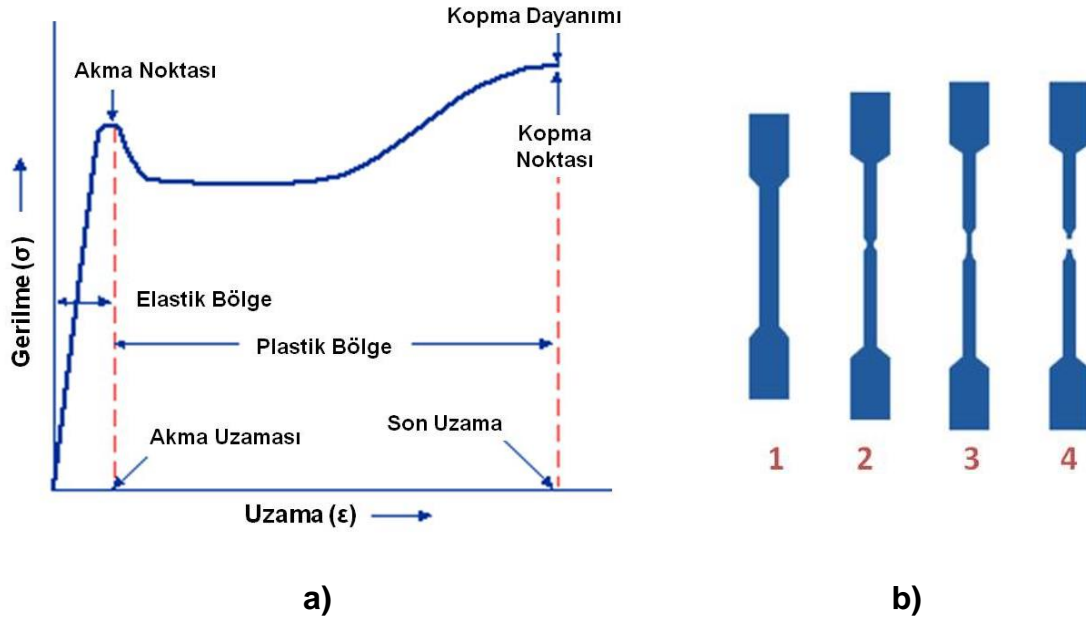
$$2-) \epsilon = \frac{\Delta L}{L}$$

$$3-) \sigma = \frac{P}{A}$$

$$4-) E = \frac{P \cdot L}{A \cdot \Delta L}$$

σ : Gerilme (MPa)
E: Elastisite modülü (MPa)
 ϵ : Uzama
 ΔL : Uzama miktarı (mm²)
L: Uzunluk (mm²)
P: Yük (N)
A: Yükün uygulandığı kesit alanı (mm²)

Elastisite modülü malzemeye ait karakteristik bir özelliktir ve malzemenin dayanımının ölçüsüdür. Bir malzemenin yük altında ne kadar uzayacağını gösterir. Gerilme ve birim uzama arasındaki doğrusal ilişkinin bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Şekil 3.6.a.'da görülen çekme-uzama grafiğinin eğrisi (elastik bölgesi içerisinde kalan) elastisite modülünü vermektedir. Elastik bölge malzemenin geriye dönemeyecek şekilde deformasyona uğradığı andır. Bu andan sonra plastik deformasyona uğramaya başlar. Malzemeyi plastik deformasyona uğratabilmek için gereken minimum gerilim miktarı akma noktası olarak ifade edilir. Çekme-Uzama testi esnasında malzemede oluşan değişimler Şekil 3.6.b.'de görülmektedir.



Şekil 3.6. a) Çekme-Uzama Grafiği b) 1- Malzemenin çekme-uzama testi öncesinde ve elastik esneme anındaki durumu 2- Malzeme üzerindeki yükün en üst seviyeye ulaştığında daha fazla homojen uzama gerçekleşmediğinden malzemede boyun oluşumu meydana geliyor 3- Kopma anına dek plastik bölge aralığında malzemenin boyun kısmında uzama devam ediyor 4- Uzamanın yalnızca boyun kısmında gerçekleşmesinden belirli bir süre sonra kopma gerçekleşiyor

Çekme cihazında numunenin bağlanacağı birbirine göre aşağı yukarı dikey ekseninde hareket eden iki adet çene bulunmaktadır. Çenelerden birisi sabit hızda hareket ettirilerek numuneye değişen miktarlarda çekme kuvveti uygulanır ve bu kuvvete karşılık gelen uzama kaydedilir. Bu yolla malzemenin elastik ve plastik deformasyona uğradığı, koptuğu gerilmeler ve uzama miktarları gözlemlenebilir. Elde edilen PCL membranların ve kanalların mekanik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla Testometric M500-25 CT test cihazı (The Testometric Company Ltd, İngiltere) kullanılmıştır (Şekil 3.7.). Test kapsamında 5 cm boyunda, 1 cm eninde ve 80 µm kalınlığında 5 adet PCL membran ASTM E4 standartlarına göre analiz edilmiştir. PCL membranlar 5 kN kuvvet ve 5 mm/dak. sabit çekme hızıyla çekilerek oda sıcaklığında testler gerçekleştirilmiştir. PCL kanallar için ise testler 5 kN çekme kuvveti ve 50 mm/dak. sabit çekme hızıyla oda sıcaklığında yapılmıştır. Testlerden çekme gerilimine karşı % uzama grafikleri bulunmuştur. Elde edilen sonuçların ortalamaları alınarak değerler saptanmıştır.



Şekil 3.7. Testometric M500-25 CT Materials Testing Machine (The Testometric Company Ltd, İngiltere)

3.3.3. PCL Membran ve Kanalların *In Vitro* Koşullarda Biyobozunurluğunun Değerlendirilmesi

Hazırlanan örneklerin sinir rejenerasyon sürecini sekteye uğratmayacak oranda bir bozunma hızına sahip olması gerekmektedir. Bunu anlamak için *in vitro* koşullarda bozunma oranları değerlendirilmiştir. 6 adet, 1 cm en x 5 cm boy ölçülerinde PCL membran, 6 adet de tez kapsamında üretimine karar verilmiş olan niteliklerde PCL kanal hazırlanmıştır. Membranlar ve kanallar iki ayrı grup halinde, PBS (pH 7,4) içeren 50 ml'lik falcon tüpler içerisine konulmuştur. Haftada bir PBS yenilenmek suretiyle 1 ay süre boyunca tüpler 37°C'lik çalkalamalı su banyosunda, sabit bir çalkalama hızı (dakikada 60 kez) ile tutulmuştur. Test başında kuru ağırlıkları ölçülmüş olan örnekler 1 aylık süre sonunda çalkalamalı su banyosundan çıkarılıp distile su ile yıkanmıştır. Daha sonra vakumlu desikatöre kurumaları sağlanmıştır. Kurutma işleminin ardından her bir örneğin ağırlığı hassas terazi ile tekrar ölçülmüştür.

Testin öncesi ve sonrasında ölçülen örnek ağırlıklarının farkından yola çıkarak biyobozunma derecesi saptanmıştır. Yüzde ağırlık kaybını belirlemek için aşağıda verilen eşitlik kullanılmıştır.

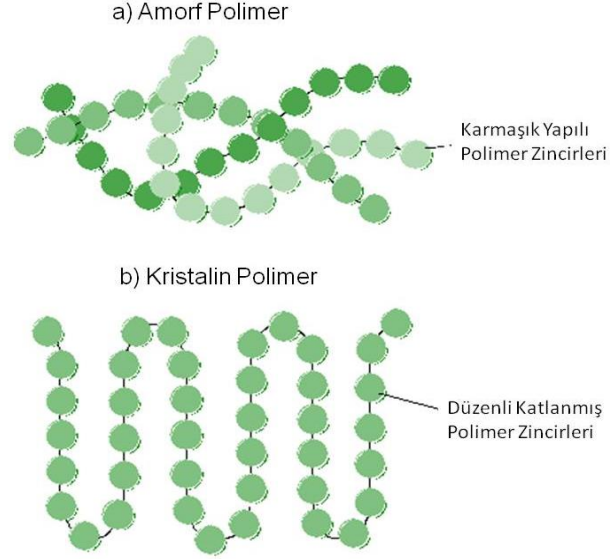
$$\% = \left(\frac{W_i - W_t}{W_i} \right) \cdot 100$$

Verilen eşitlikte W_i , örneklerin başlangıçtaki kuru ağırlıkları; W_t , örneklerin test sonundaki kuru ağırlıklarını belirtmektedir.

3.3.4. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri

Polimerler, büyük uzun molekül zincirlerinden oluşurlar. Polimerler, amorf, yarı-kristalin veya kristalin özellikte olabilirler. Amorf yapıda polimer molekülleri karmaşık bir şekilde rasgele dizilmiş haldedir ve polimerin şekil değiştirmesi kolaydır. Kristalin yapı polimerlerde moleküller düzenli bir şekilde dizili halde bulunurlar ve polimer sağlam bir yapıdadır (Şekil 3.8.). Yarı kristalin polimerlerde

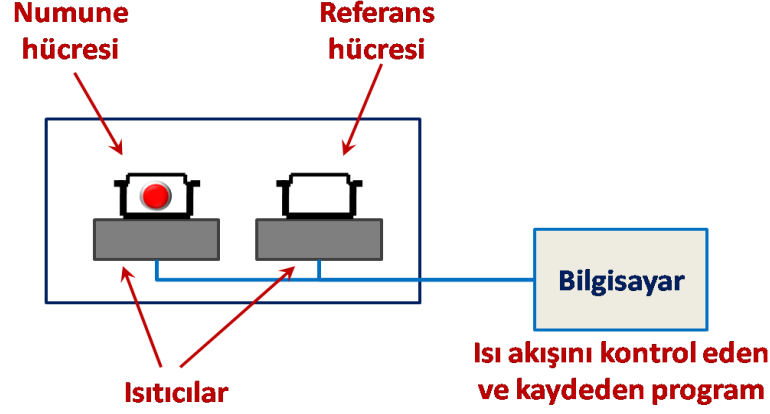
ise amorf ve kristalin bölgeler birlikte bulunur. Tez kapsamında tercih edilen PCL polimeri yarı-kristalin özelliindedir.



Şekil 3.8. Amorf ve kristalin özellikteki polimer zincirlerinin yapısı

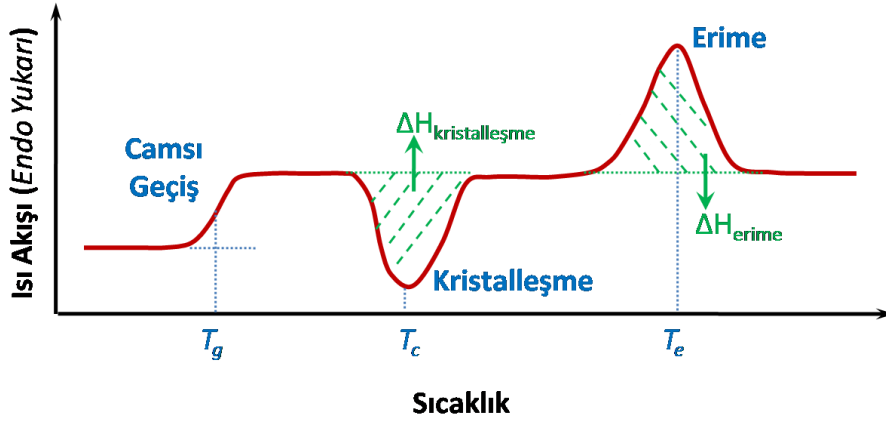
Kalorimetreler, biyomoleküllerin ve nano boyutta malzemelerin termodinamik özelliklerin ölçülmesi için kimya, biyokimya, biyoteknoloji, hücre biyolojisi, farmakoloji ve nanobilimlerde sıklıkla kullanılmaktadırlar. Kalorimetreler arasında Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) özellikle amorf veya kristalin yapıda malzemelerin termal analizi için en çok kullanılan yöntemlerdendir [84]. DSC, polimerlerin ve plastiklerin ısı analizi, saflık tayini, faz geçişi, kalite kontrol gibi alanlarda kullanılmaktadır.

DSC ile belirli bir zaman aralığında ısıtılan bir polimerin fiziksel özelliklerinin değişimini gözlemleyebiliriz. Başka bir ifade ile zamana ve sıcaklığa bağlı olarak enerjideki değişim gözlemlenebilir. DSC sistemi bir örneğin koyulacağı bir de referans maddenin konacağı iki ısıtıcı, sistemdeki ısıyı koruyan bir hücre ve analiz boyunca örnek ile referans maddenin aynı ısıda kalmasını kontrol eden bir bilgisayardan meydana gelmektedir (Şekil 3.9.).



Şekil 3.9. DSC sisteminin temel üniteleri

Referans madde, analiz boyunca fiziksel ve kimyasal hiçbir değişikliğe uğramayacak özelliğindedir. DSC, örnek ile referansı aynı sıcaklıkta tutmak için gereken enerji miktarı ve ısı akışındaki farkı ölçer ve karşılaştırır. Analiz sonunda sıcaklık-ısı akışı grafiği elde edilir (Şekil 3.10.). Bu analiz ile malzemenin camsı geçiş sıcaklığı, kristallenme sıcaklığı, erime ve kaynama noktaları, yüzde kristallenme derecesi, ısı kapasitesi, oksidatif ve termal stabilite, saflık ve reaksiyon kinetikleri gibi özellikleri saptanabilir.



Şekil 3.10. DSC analizinden elde edilen ısı akışı-sıcaklık grafiği

Camsı geçiş sıcaklığı (T_g) ve kristal erime sıcaklığı (T_m) polimerlerin ayırt edici, karakteristik özelliklerindedir. Hidrofobik ve yarı-kristalin bir polimer olan PCL'un camsı geçiş sıcaklığı -60°C erime noktası aralığı ise $59 - 64^\circ\text{C}$ arasındadır. Yarı kristalin polimerlerin kristalin nitelikteki zincirlerinin erimeye başladığı sıcaklığa erime sıcaklığı denir. Amorf polimerler gibi kırılma özelliklerini kaybederek,

zincirlerin birbirlerinden ayrılmasıyla kauçuğumsu özellikler kazanmaya başladığı sıcaklık camsı geçiş sıcaklığı olarak adlandırılır. Yüksek bir sıcaklıkta bulunan polimer soğutulmaya başlandığında moleküllerinin toplam enerjisi düşer, moleküller düzenli kristal bir yapı oluşturmaya başlarlar. Bu yapının oluştuğu sıcaklığa kristalleşme sıcaklığı (T_c) denir.

Tez çalışması kapsamında, 2 adet PCL membran ile 2 adet RGD ile kaplanmış PCL membran DSC 200 F3 Maia[®] (Netzsch, Almanya) cihazı ile analiz edilmiştir. Analiz edilen PCL membranların ağırlığı yaklaşık 4,8 mg, RGD ile kaplı olanların ise 5,8 mg'dır. Örnekler, 10°C/dak. ısıtma hızıyla, -90 - 150°C aralığında, sistemdeki azot akış hızı 100 ml/dak. olacak şekilde test edilmişlerdir.

3.3.5. Su Temas Açısı Testi

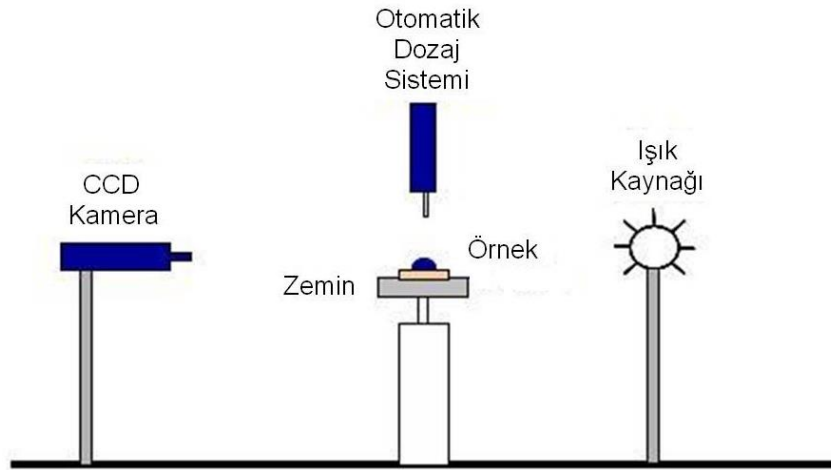
Bir biyomalzemenin verimliliği genellikle, biyoyumluluğunun derecesi başka bir deyişle biyomalzeme ile etkileşimde bulunacağı spesifik hücreler arasındaki ilişkinin başarısı ile ifade edilebilir. Hedefe uygun biyomalzeme seçilerek tasarlanan doku iskelesi, desteklemesi için oluşturulduğu spesifik bölgedeki doğal biyolojik süreci sekteye uğratıyorsa vücut için uyumlu olmadığı düşünülür.

Vücut hücreleri ve sıvıları ile doğrudan temas edecek olan ilk kısım biyomalzemenin yüzeyidir. Biyomalzeme, hücrelerin tutunması, büyümesi, göçü ve farklılaşmasına olanak sağlıyorsa biyoyumlu olduğu düşünülmektedir. Belli bir dereceye kadar ıslanabilen (hidrofilik) yüzeylerin biyoyumluluğunun da fazla olduğu gözlenmiştir. Hidrofilik karakterde yüzeylere sahip biyomalzemelerin vücut içerisindeki sıvılarla daha uyumlu bir davranış sergilediği, hidrofobik karakterde malzemelere göre infalamasyonel yanıtı daha az tetiklediği, genel anlamda üzerlerine hücre tutunmasının daha fazla olduğu bu sayede daha biyoyumlu oldukları gözlenmiştir [85,86].

Islanabilirlik "wettability" terimi bir sıvının katı bir yüzey üzerinde yayılışını, yüzeye nasıl bağlandığını ifade etmek için kullanılır. Katı bir malzemenin ıslanabilirliği; katının yüzey gerilimi, üzerindeki sıvının yüzey gerilimi ve arayüzey gerilimi olmak üzere 3 esas faktörden etkilenir. Yüksek yüzey gerilimine sahip bir katı bu gerilimi azaltmak için sıvıyı yüzey üzerine çekme eğilimindedir. Katının bu yüzey gerilimine

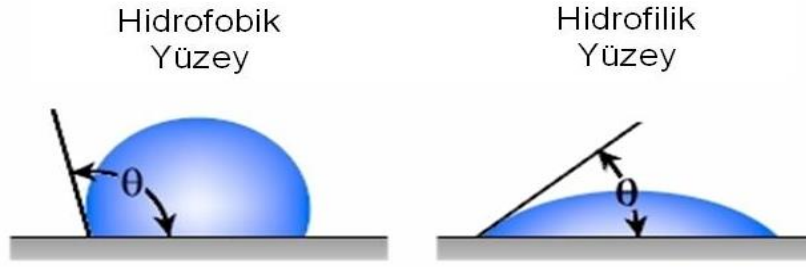
aksi yönde sıvıyı katıdan uzaklaştıracak arayüzey gerilimi denilen bir çekim gücü mevcuttur. Ara yüzey geriliminin düşük olması sıvının katı yüzey üzerinde daha fazla yayılmasına olanak tanır.

Biyomalzemelerin ıslanabilirliğinin *in vitro* ölçümü, sıvı-katı ara yüzeyindeki değme açısının ölçümü ile değerlendirilir. Islanabilirliğin *in vitro* ölçümü için 3 ana yöntem kullanılmaktadır. Bunlar; Sessile damla yöntemi, Wilhelmy yöntemi ve Maksimum kabarcık yöntemidir. Malzemenin yüzeyi üzerine bir şırınga ile bir sıvı damlasının damlatılması ve bu damlanın yüzeydeki şekline bağlı olarak değerlendirilen sessil damla yöntemi (Şekil 3.11.) uygulamada en sık kullanılandır. Damlanın damlatılmasının ardından bir kamera ile çekilen fotoğraflarla damlanın geçirdiği değişiklikler gözlenir. Bu sayede oluşan değme açısı, damlanın çap uzunluğu ölçülür. Bu yöntemle yüzeylerarası gerilim saptanır.



Şekil 3.11. Sessile Damla Yöntemi

Değme açısı, " θ " teta ile ifade edilir. Genellikle, teta açısı 90° 'den dar ise yüksek ıslanabilirliği yani hidrofilik yüzeyi, bunun aksine açı geniş ise düşük ıslanabilirliği başka bir deyişle hidrofobik yüzey olduğunu gösterir (Şekil 3.12.).



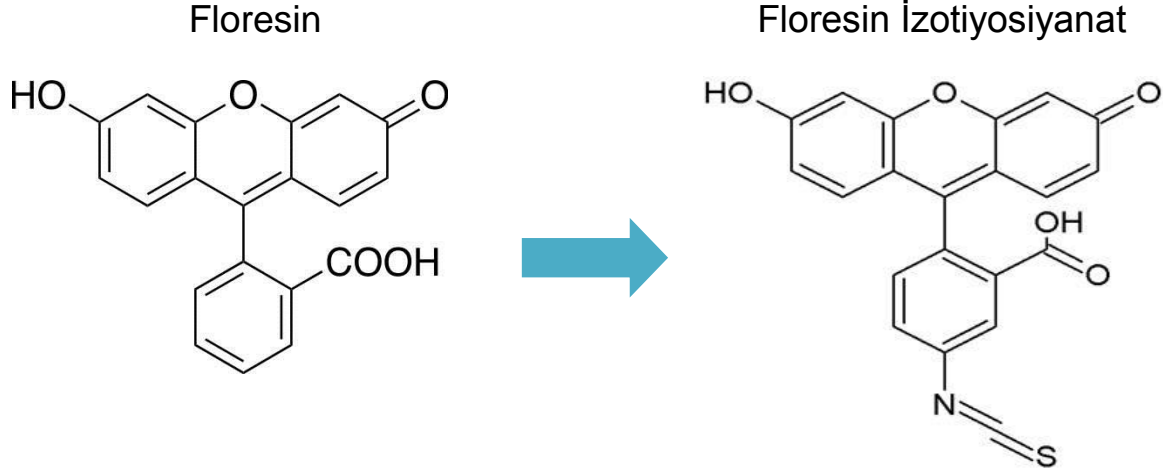
Şekil 3.12. Değme açısı (θ)' nın genişliğine bağlı olarak değerlendirilen hidrofobik ve hidrofilik yüzey

Tez kapsamında, değme açısı testi için 5 adet PCL, 5 adet de RGD kaplı PCL membran kullanılmıştır. Membranların çapı 7 mm olup, sesil damla yöntemiyle üzerlerine su damlası damlatılarak ölçüm gerçekleştirilmiştir. Ölçüm için Harke-SPCA (Beijing, Çin) değme açısı analizörü kullanılarak saniye saniye su damlasının değişimi ile ilgili görüntüler alınmıştır. Bu görüntüler "wettability pro classic" yazılımı ile analiz edilmiştir. Sonuçlara dayanarak RGD sekansının PCL yüzeylerin hidrofilitesi üzerindeki etkisi ve buna bağlı olarak da biyoyumluluğunu nasıl etkilediği yorumlanmıştır.

3.3.6. FITC İşaretli Nap-FFGRGD ile PCL Kanalların Kaplanması

Floresan izotiyosiyanat (FITC) bir floresin türevidir. Floresin çok çeşitli uygulamalarda floresan işaretleyici olarak kullanılan bir florofordur. FITC antikor, protein ve diğer moleküllerin işaretlenmesi amacıyla kullanılmaktadır.

FITC, floresin molekülünün yapısının alt halkasında bulunan bir hidrojen atomunun yerine bir izotiyosiyanat grubunun ($-N=C=S$) gelmesiyle işlevselleştirilmiş halidir (Şekil 3.13.). İzotiyosiyanat, pH 7-9 aralığında biyolojik bileşiklerin yapısında bulunan primer aminler ile reaksiyona girebilmektedir. FITC, 495 nm dalga boyunda eksitasyon, 519 nm de emisyon yapma özelliğindedir.



Şekil 3.13. Floresin molekülünün yapısının alt halkasında bulunan bir hidrojen atomunun yerine izotiyosiyanat grubu eklenmesiyle FITC molekülünün oluşumu

Tez kapsamında, PCL kanalların RGD ile ne derece kaplandığını, RGD' nin doku iskelesi üzerinde dağılımını gözlemlemek için Nap-FFGRGD molekülü FITC ile işaretlenerek yüzeyler kaplandıktan sonra lazer taramalı konfokal mikroskop (LSCM) ile inceleme yapılmıştır. LSCM, floresan ajanlar ile işaretli dokuların görüntülenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, PCL membran ve kanallar ile RGD kaplanmış olan PCL membran ve kanalların karşılaştırması yapılmıştır. Bu işlem için sırasıyla şu basamaklar izlenmiştir:

- RGD kaplanacak örnekler için, konsantrasyonu 20 mg/ml olan 15 µl FITC solüsyonu (Sigma, Almanya) ile bir gün önceden hazırlanmış olan ("3.2.3. Sinir Kanallarının Yüzeyinin RGD ile Kaplanması" başlığı altında anlatılan şekilde) 0,2 mg/ml konsantrasyonda 3 ml RGD solüsyonu karıştırılarak yeni bir solüsyon hazırlanmıştır.

RGD kaplaması yapılmayacak örnekler için ise aynı miktar ve konsantrasyonda FITC solüsyonu 3 ml distile su ile karıştırılarak ikinci bir

solüsyon hazırlanmıştır. Hazırlanan bu iki ayrı solüsyon bir gece boyunca +4°C'de ışık almayacak bir şekilde muhafaza edilmiştir.

- 24 saat sonra hazır hale gelen solüsyonlardan, her bir membran için 400 µl, her bir kanal için ise 1 ml kullanılmıştır. Kanallar eppendorf tüplerine, membranlar ise 96 kuyucuklu mikropalakaya yerleştirilerek 37°C'de bir gün boyunca yine ışık almayacak şekilde bekletilmiştir.
- 24 saatlik bekleme süresi sonrasında örnekler laminar flow altında PBS ile birkaç kez yıkanmış ve kurumaya bırakılmıştır. Kurutma işleminden sonra membranlar %50 gliserol (Sigma, Almanya) ile mikroskop lamına yerleştirilerek TCS SP5 (Leica, Almanya) lazer taramalı konfokal mikroskop altında incelenmiştir. Kanalların incelenmesi için ise su bazlı kriyoprotektif bir gömme ortamı olan OCT'ye gömülerek elde edilen donmuş kesitler kullanılmıştır.

3.4. *In vitro* Çalışmalar

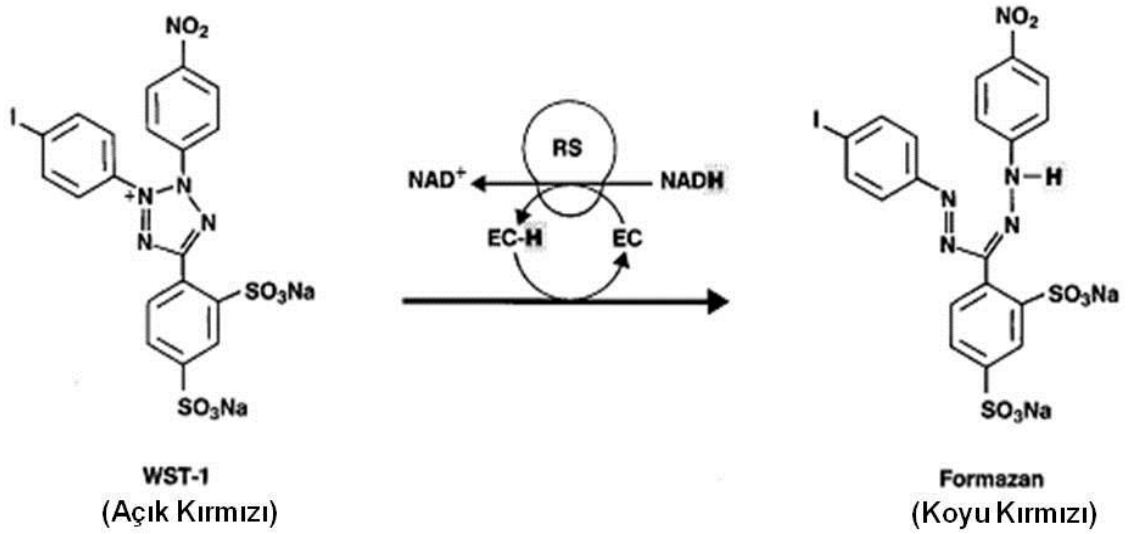
Tez kapsamında gerçekleştirilen hücre kültür çalışmalarında, PCL doku iskeleleri ve RGD kaplanmış olan PCL doku iskelelerinin L929 fare fibroblast hücreleri ile etkileşimleri incelenmiş, karşılaştırmalı olarak değerlendirmeler yapılmıştır.

3.4.1. Hücre Canlılık Analizi

Hücre kültür çalışmalarının ilk aşamasında olarak hazırlanan PCL ve RGD kaplı PCL kanalların *in vitro* ortamda L929 fare fibroblast hücreleri üzerindeki toksik etkileri incelenmiştir. L929 hücreleri, sitotoksisite testi için ASTM tarafından önerilen standart hücrelerdir [87]. Sinir doku mühendisliğinde üretilen doku iskelelerinin değerlendirilmesi için de tercih edilmektedir [88,89]

Tez kapsamında doku iskelelerinin L929 hücreleri üzerindeki toksik etkilerinin incelenmesi amacıyla suda çözünme özelliğine sahip bir ajan olan WST-1 (4-[3-4-iyodofenil]-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolium)-1,3-benzen disülfonat) kullanılmıştır. Hücrelerin mitokondrilerinde bulunan süksinat dehidrogenaz enzimi WST-1'de bulunan tetrazolium halkasını parçalayarak formazan tuzlarını

oluştururlar. Açık kırmızı bir renkte olan WST-1'den koyu kırmızı renkte formazan tuzları oluşur (Şekil 3.14.). Oluşan formazan tuzu miktarı ile yaşayan hücre sayısındaki artış (mitokondriyal dehidrogenaz enziminin aktivitesinde artış) doğrudan ilişkilidir. Canlı hücre oranı ile doğrudan bağlantılı olan formazan tuzlarının miktarı taramalı spektrofotometre ile tayin edilebilir. Formazan tuzu oluşumuyla ilişkili olarak artan absorbans değeri ölçülerek sonuçlar elde edilmektedir.

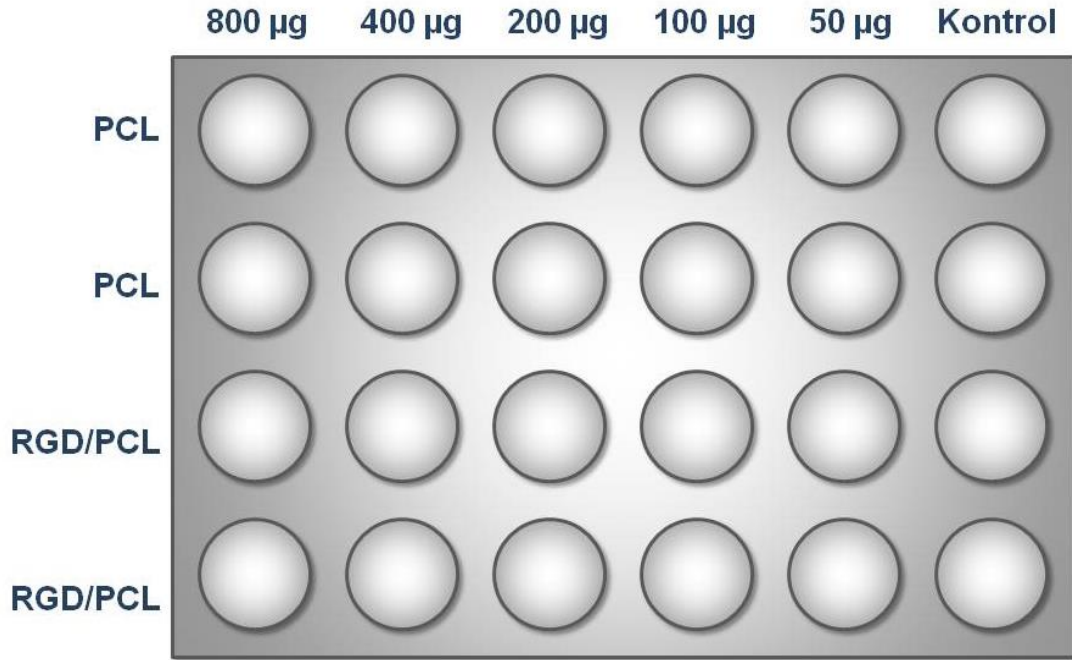


Şekil 3.14. Mitokondriyal süksinat dehidrogenaz enzimi ile WST-1'den formazan tuzu oluşumu. (EC: Elektron bağlayıcı reaktif, RS: Mitokondriyal süksinat-tetrazolyum-redüktaz sistemi)

WST-1 analizi ile sitotoksosite testlerinde sıkça kullanılmakta olan MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid]'in aksine çözünürleştirme basamağına gerek duyulmadan doğrudan okuma yapılabilen, daha etkili sinyal alınmakta ve hücrelere daha az toksik etki yaratmaktadır.

Hazırlanan doku iskeleleri işlem öncesinde sterilizasyon için 30 dakika etanol (EtOH) ile muamele edilmiş ve 3 kez steril PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra UV ışığı altında 30 dakika bekletilmiş ve sterilizasyon basamağı tamamlanmıştır. WST-1 analizi 24 kuyucuklu mikropalakada gerçekleştirilmiştir. Birinci pasaj L929 hücreleri, 24 kuyucuklu mikropalakanın her kuyucuğunda 1×10^4 hücre olacak

şekilde ekilerek 37°C ve %5 CO₂ ortamında DMEM, %10 FBS, %1 penislin/streptomisin ve %1 L-glutamin içeren besiyerinde 48 saat inkübe edilmiştir. Test iki tekrarlı olmak üzere, doku iskeleleri ağırlıkları üzerinden Şekil 3.15.'de görüldüğü gibi 24 kuyucuklu mikropalakaya yerleştirilmiştir. PCL örnekler, mikropalakanın ilk iki sırasının 5'er kuyucuğuna her bir kuyucukta sırasıyla 800 µg, 400 µg, 200 µg, 100 µg ve 50 µg olacak şekilde değişen miktarlarda, kuyucuklarda bulunan hücrelerin üzerine yerleştirilmiştir. Aynı şekilde RGD kaplı PCL örnekler de diğer iki sıraya yerleştirilmiştir. Her sıranın en son kuyucuğu ise kontrol grubu için ayrılmıştır.



Şekil 3.15. Farklı ağırlıkta doku iskelelerinin bulunduğu 24 kuyucuklu mikropalaka

Örnekler 37°C ve %5 CO₂ ortamında 48 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra besi ortamı uzaklaştırılmış yerine her kuyucuğa 200 µl besiyeri ve 10 µl WST-1 (Roche, Almanya) eklenmiştir. 4 saat boyunca 37°C ve %5 CO₂ ortamında ışık almayacak şekilde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi tamamlanınca 24 kuyucuklu mikropalaka, PowerWave XS2 mikropalaka okuyucu (BioTek, ABD) ile 440 nm dalga boyunda okunarak canlı hücre miktarı tayin edilmiştir. Yüzde canlılık değerleri belirlenirken kontrol grubunun bulunduğu kuyucuğun optik

yoğunluğu %100 kabul edilerek referans alınmıştır. Diğer her bir kuyucuğun ölçülen optik yoğunluğu da referansa göre değerlendirilmiştir.

3.4.2. İkili Boyama Tekniği ile Hücre Ölüm Oranının Belirlenmesi

Tez çalışmasında hazırlanan PCL ve RGD kaplı PCL doku iskeleleri üzerinde bulunan L929 hücrelerinin apoptoza veya nekroza uğrayıp uğramadığının gözlenmesi için Hoechst / Propidyum iyodür (PI) ikili boyama tekniği kullanılmıştır.

Apoptoz hücre gelişiminde normal olarak seyreden programlı ve kontrollü hücre ölüm tipidir. Daha fazla gereksinim duyulmayan hücrelerin ortadan kaldırılması için gelişen bir süreçtir. Bu süreçte oluşan karakteristik morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler ile nekroz tipi hücre ölümünden ayrılmaktadır. Nekroz, geri dönüşü olmayacak derecede hasar görmüş hücrelerin ortadan kaldırılması için gerçekleşir.

Mavi floresan bir boya olan Hoechst, canlı hücrelerin ve apoptotik hücrelerin çekirdeklerini mavi renge boyarken, propidyum iyodür yalnızca ölü hücrelerin (nekrotik) nükleuslarını kırmızıya boyamaktadır. Mavi floresan Hoechst 33342 boyası apoptotik hücrelerin yoğunlaşan kromatin bölgelerini boyayarak canlı hücrelere oranla daha parlak mavi bir renkte ışımaya yapar. DNA'ya bağlandığı durumda eksitasyon dalga boyu 350 nm, emisyon dalga boyu ise 461 nm'dir. Kırmızı floresan karakterde olan PI boyası ise yalnızca ölü hücrelerle etkileşerek kırmızı renkte ışık yayma özelliğindedir. DNA'ya bağlandığı durumda eksitasyon dalga boyu 535 nm, emisyon dalga boyu ise 617 nm'dir. İki boya da farklı dalga boylarında eksitasyon gerçekleştirdikleri için floresan mikroskop altında boyanmış oldukları hücreler kolaylıkla ayırt edilmektedir.

Öncelikle ikili boyama solüsyonu hazırlanmıştır. Bunun için 10 ml PBS içerisine, 500 µl Hoechst (Invitrogen, ABD), 100 µl PI (Invitrogen, ABD) ve 100 µl Ribonükleaz A (Sigma, Almanya) ilave edilmiştir. WST-1 analizinin ardından besi ortamı uzaklaştırılarak yerine her bir kuyucuğa 80 µl olmak üzere ikili boyama solüsyonu eklenmiştir. Solüsyon içerisindeki Ribonükleaz A sitoplazmik RNA'yı yok etmek amacıyla kullanılmaktadır. 15 dakikalık inkübasyon (37°C ve %5 CO₂) sürecinden sonra 24 kuyucuklu mikropakanın her bir kuyucuğu, Leica DM6000B inverted mikroskop (Leica Microsystems, Almanya) altında incelenerek görüntüler

elde edilmiştir. Alınan görüntülerdeki hücreler canlı, apoptotik ve nekrotik olma durumlarına göre sayılarak belli bir % değere ulaşılmıştır.

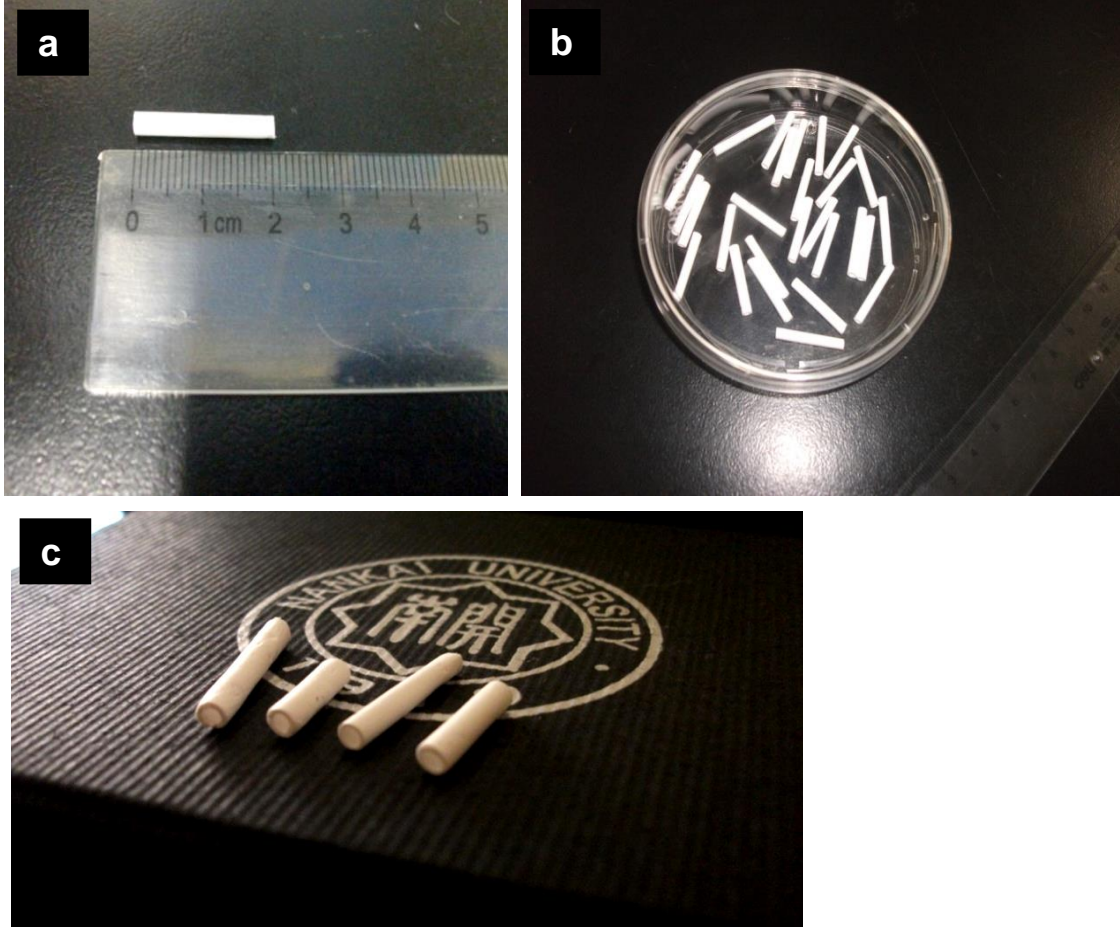
4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Tez kapsamında gerçekleştirilen ve bir önceki bölümde açıklanan çalışmalara ilişkin sonuçlar bu başlık altında sunulmuştur. Oluşturulan periferik sinir rejenerasyon kanallarının görüntüsü, membran ve kanalların taramalı elektron mikroskopu ile çekilen görüntüleri, mekanik dayanımlarına ilişkin veriler, *in vitro* koşullarda bozunurluk özellikleri ve termal özellikleri bu bölümde verilmiştir. Bunların yanında PCL doku iskelelerinin yüzeyleri üzerine RGD kaplanmasının etkinliği hakkında bilgi edinebilmek amacıyla gerçekleştirilen su değme açısı testinin sonuçları ve FITC işaretli Nap-FFGRGD molekülü ile kaplanan doku iskelelerinin konfokal mikroskop görüntüleri ile veri analizleri de bu kısımda yer almaktadır. Son olarak, hazırlanan doku iskelelerinin L929 fibroblast hücreleri ile etkileşimleri sonucu hücrelerin canlılıklarıyla ilgili elde edilen veriler bu bölümde sunulmuştur.

4.1. Elektrostatik Eğirme Sistemi ile Hazırlanmış RGD Kaplı PCL Periferik Sinir Rejenerasyon Kanalları

Tez çalışması kapsamında, elektrostatik eğirme yöntemi ile çapları 200 nm'den 1,5 µm'ye varan kalınlıklarda, ortalama 500 nm çapa sahip düzensiz fiberlerden meydana gelen RGD peptid dizisi ile kaplanmış PCL kanallar oluşturulmuştur. 2 cm uzunluğunda 2 mm iç çapa sahip yüzeyleri RGD ile kaplanmış PCL kanallar Şekil 4.1.a ve b'de görülmektedir. Şekil 4.1.c'de 2 mm çapında farklı uzunluktaki PCL kanalların içi boş silindirik yapıları daha net görünmektedir.

Periferik sinir rejenerasyonu çalışmalarında en sık kullanılan hayvan modeli ratlardır [90]. Ratlar üzerinde uygulanan kritik defekt ölçüsü ise 1 cm'lik sinir defektidir [81]. Tez kapsamında oluşturulan RGD ile fonksiyonlandırılmış PCL sinir kanallarının etkinliğinin *in vivo* olarak değerlendirilmesi açısından gerçekleştirilebilecek olan hayvan deneyleri göz önünde bulundurularak 2 cm uzunlukta kanallar hazırlanmıştır. Bunun yanında, "3.2.2. Elektrostatik Eğirme Yöntemi ile Sinir Kanallarının Hazırlanması" bölümünde de bahsedildiği gibi gerek duyulduğunda tez çalışmasında kullanılan sistemle uzunluğu 10 cm'ye kadar varan kanallar oluşturulabilir.

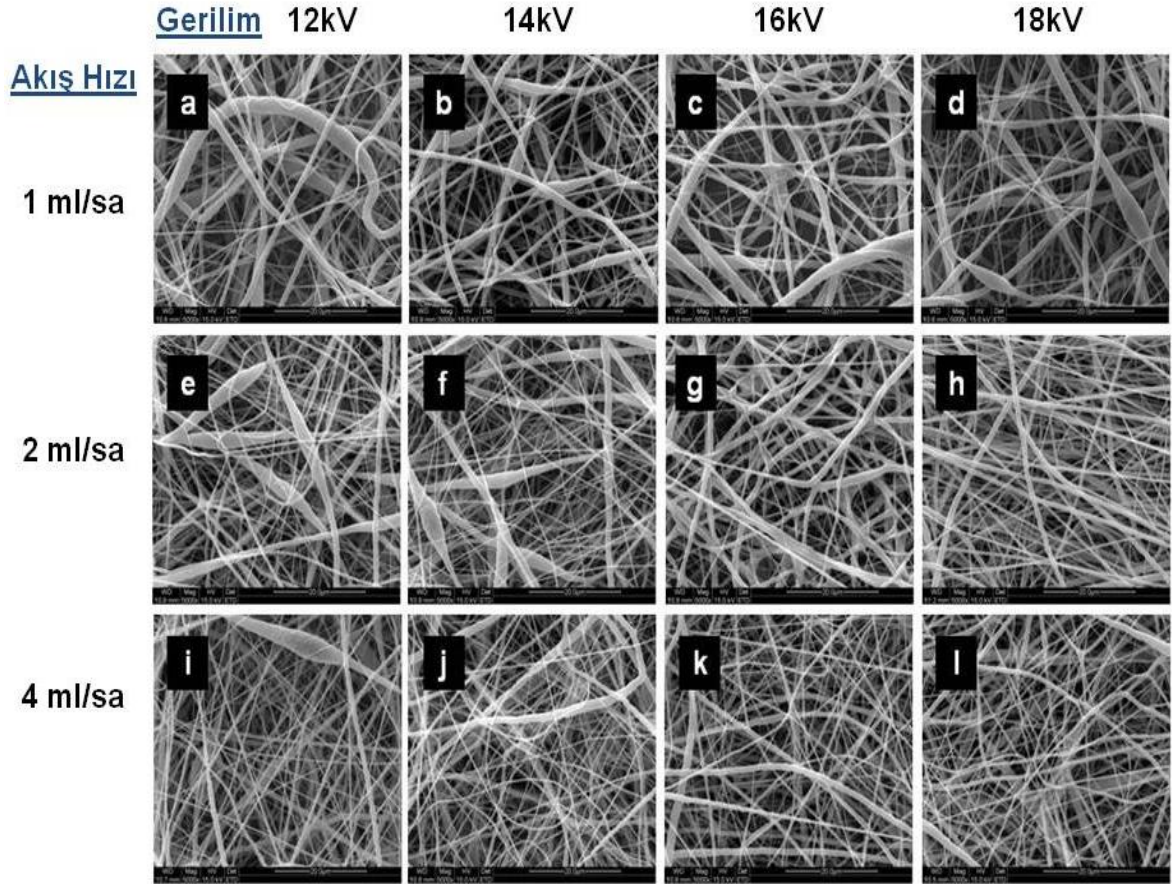


Şekil 4.1. Elektrostatik eğirme yöntemiyle oluşturulmuş PCL kanallar a) 2 cm uzunluğunda PCL kanal b) 2 cm uzunluğunda ve 2 mm iç çapa sahip PCL kanallar c) 2 mm çapında farklı uzunluktaki PCL kanallar

4.2. Taramalı Elektron Mikroskobu Analizi

Tez çalışmasının esas hedefi olan RGD üçlü peptid dizisi ile yüzeyleri kaplanmış PCL periferik rejenerasyon kanallarının oluşturulmasının ilk basamağı olarak elektrostatik eğirme sistemi parametrelerinin (voltage değeri, iğne ile toplayıcı arası mesafe, akış hızı) farklı kombinasyonları ile döner çelik silindir toplayıcı üzerinde PCL membran hazırlama çalışmaları yapılmıştır. PCL membranların SEM analizlerinden elde edilen bilgiler doğrultusunda tezin amacına uygun nitelikte kanallar oluşturulabilecek parametreler kesinleştirilmiştir. Tez kapsamında elde edilen tüm SEM görüntüleri ImageJ yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir.

PCL membranları oluştururken, saatte 1, 2 veya 4 ml hızlarında; 12, 14, 16 ve 18 kV gerilimlerde ve çevresel koşullara göre 12-15 cm arasında değişebilen iğne ile toplayıcı arası uzaklıklarda çalışmalar yapılmıştır. Çalışmaya ilişkin SEM fotoğrafları Şekil 4.2.'de görülmektedir.

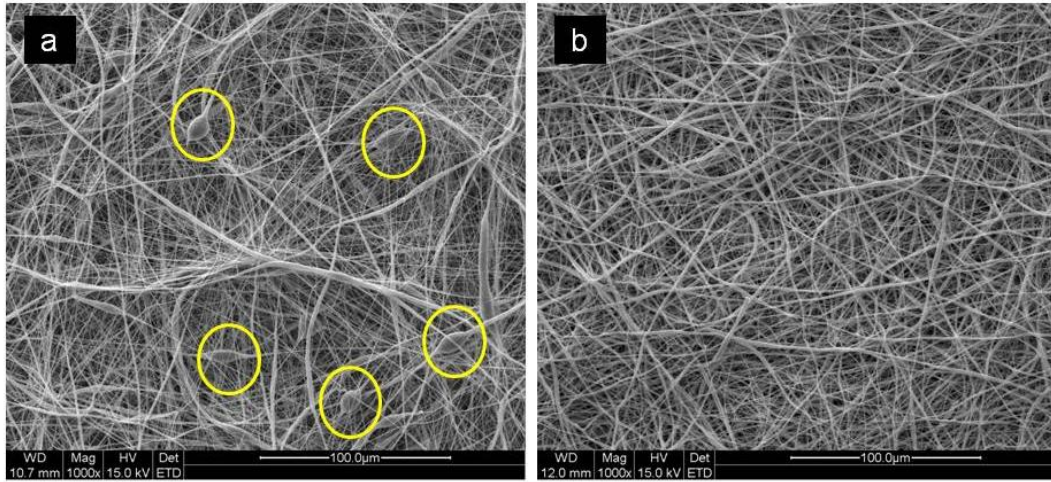


Şekil 4.2. Farklı parametreler kullanılarak hazırlanmış PCL membranların görüntüsü. Görüntüde her bir satırın başında o satırdaki örneklerin oluşturulmasında uygulanmış olan akış hızı ve her bir sütunun üzerinde o sütundaki örneklerin oluşturulmasında uygulanmış olan gerilimler gösterilmektedir.

Farklı örneklere ait SEM fotoğrafları; doku iskelesini oluşturan fiberlerin benzer çap ve yapıda olmaları, boncuk oluşumlarının bulunmaması ve yapının homojen oluşu kriterlerine göre değerlendirilmiştir.

Elektrostatik eğirme sistemi ile oluşturulan doku iskelelerinin yapısında gözlenen boncuk oluşumu genellikle; düşük solüsyon konsantrasyonu ve viskozitesi, düşük polimer molekül ağırlığı, çok yüksek gerilimler, iğne ile toplayıcı arası mesafenin çok kısa veya uzun olması ve solüsyonun düşük iletkenlikte olması gibi çeşitli parametrelere bağlı olarak meydana gelmektedir [67]. Bu etkiler söz konusu olduğunda, iğne ucundaki damlacığın hacmi küçülmeye başlar ve Taylor konisi olarak adlandırılan, iğne ucundaki polimer damlasının karakteristik konik hali kararsızlaşarak asimetric bir hal alır. Bu da boncuk oluşumuna neden olur [61]. Boncuk oluşumu, elektrostatik eğirme ile üretilen fiberlerin özgün özelliklerinden olan yüksek yüzey alanını azaltmak gibi olumsuz etkilere neden olur [91]. Boncukların bozunma hızı da fiberlerden farklı seyretmektedir. Bunların yanında ilaç taşıma ve salma hazneleri olarak boncuklardan faydalanılan çalışmalar da mevcuttur [92].

Farklı parametreler uygulanarak oluşturulan PCL doku iskelelerinin SEM fotoğraflarının değerlendirilmesi sonucu, sisteme 18 kV gerilim uygulayarak, 12-13 cm uzaklıktan toplayıcıya doğru 2 ml/sa polimer jet akış hızıyla, uygulanan parametreler birlikte düşünüldüğünde oda sıcaklığı ve %40-55 nemlilik altında stabil bir polimer jet akışı sağlanarak oluşturulmuş olan PCL membran (Şekil 4.2.h), fiberlerin benzer yapıda olmaları, boncuk oluşumlarının görülmemesi nedeniyle, tez çalışması dahilinde PCL kanalların oluşturulması için uygun görülümüştür. Örneklerin ortalama fiber çapı değeri, görüntü üzerinden 15 adet fiberin kalınlığı ölçülüp ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Membranı oluşturan fiberlerin ortalama çapı $510 \pm 26,120$ nm'dir. Tez çalışmasında oluşturulmuş olan doku iskelesine hücrelerin tutunup doğru bir şekilde büyüyerek çoğalabilmeleri için yeterli yüzey alanını sağlaması, bunun yanında sinir kanalının sinir rejenerasyonu boyunca fiziksel özelliklerini muhafaza etmesi açısından düzenli bir bozunma göstermesi önemlidir. Bu yüzden boncuk oluşumu bu çalışmada istenmeyen bir etmendir. Aşağıdaki SEM fotoğraflarında farklı parametreler ile oluşturulan iki ayrı fibröz membranın yapısı arasındaki fark ve net bir şekilde boncuk oluşumları gösterilmiştir (Şekil 4.3.).

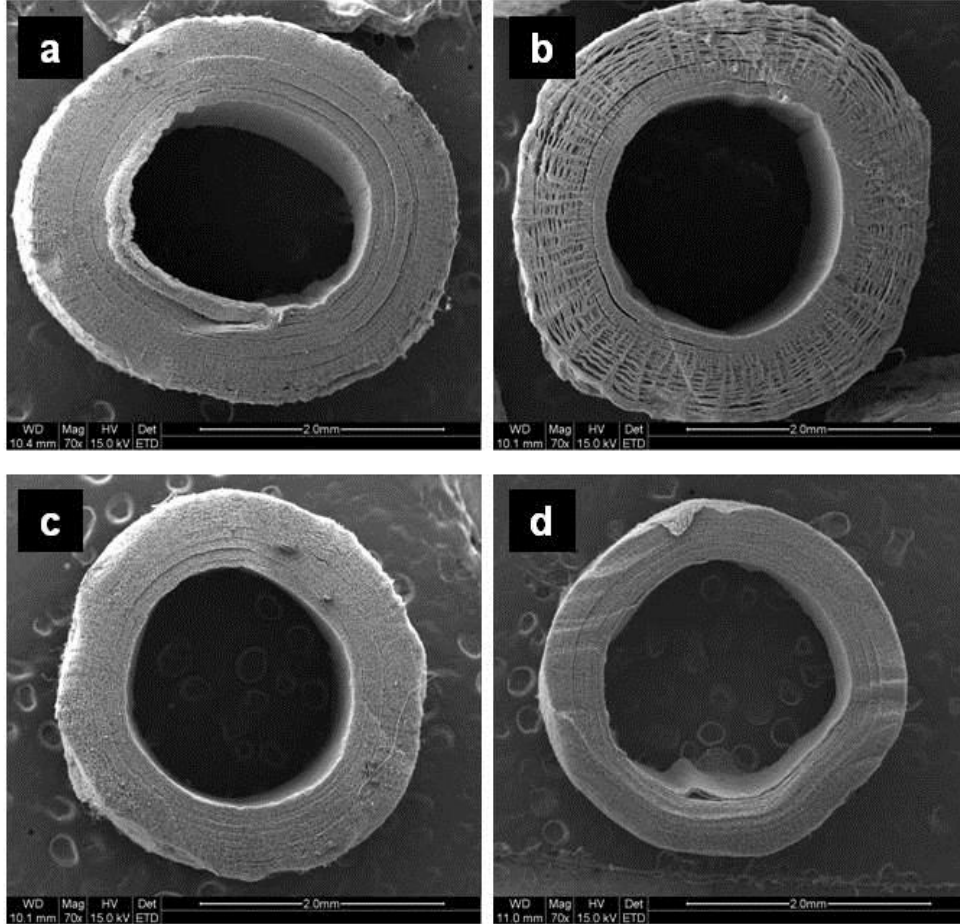


Şekil 4.3. İki farklı PCL membranın SEM görüntüsü a) Membran parametreleri; Akış Hızı: 4 ml/sa, Gerilim: 12 kV. Boncuk yapılarından bir kaç sarı halkaların içerisinde gösterilmiştir. b) Membran parametreleri; Akış Hızı: 2 ml/sa, Gerilim: 18 kV. (Tez çalışmasında nihai kanalları oluşturmak için tercih edilen) PCL kanalların oluşturulması için seçilen parametrelerdir. Boncuk oluşumu gözlenmemiştir, yapı daha homojendir.

Yapılan araştırmalar, ortalama duvar kalınlığı 0,81 mm olan bir sinir kanalı üzerinde, duvar kalınlığı 1,1 mm, 1,28 mm ve 1,44 mm gibi daha kalın olan kanallara oranla rejenere aksonların önemli ölçüde daha uzun olduğunu göstermektedir [79]. İnce duvar kalınlığına sahip sinir kanallarının yüksek elastiklik özelliğine bağlı olarak daha az nöroma oluşumuna sebebiyet verdiği görülmüştür [93]. Bunun yanında, çok ince duvarlı kanalların ise *in vivo* koşullarda çökebileceği bilinmektedir. Simon ve arkadaşlarının PCL ile hazırladıkları ortalama 170 µm gibi ince bir duvara sahip sinir kanalının, implantasyonu takip eden 26.haftada çökmeye uğradığı gözlenmiştir [94]. Meek ve arkadaşları, elektrostatik eğirme yöntemiyle PCL/PLGA fiberlerden oluşturulmuş 150 µm duvar kalınlığında sinir kanallarının implantasyondan sonra ki 4. ayda %40 çöküşe uğradığını rapor etmişlerdir [95].

Farklı çalışmalardan elde edilmiş bu sonuçlar göz önünde bulundurularak bir önceki basamakta belirlenmiş olan parametrelerin uygulanması ile 20, 25, 35 ve 40 dakikalık işlemler yapılarak farklı duvar kalınlığında kanallar üretilmiştir (Şekil 4.4.). Kanalların duvar kalınlığı hesaplanırken, görüntüdeki kanalların 8 farklı

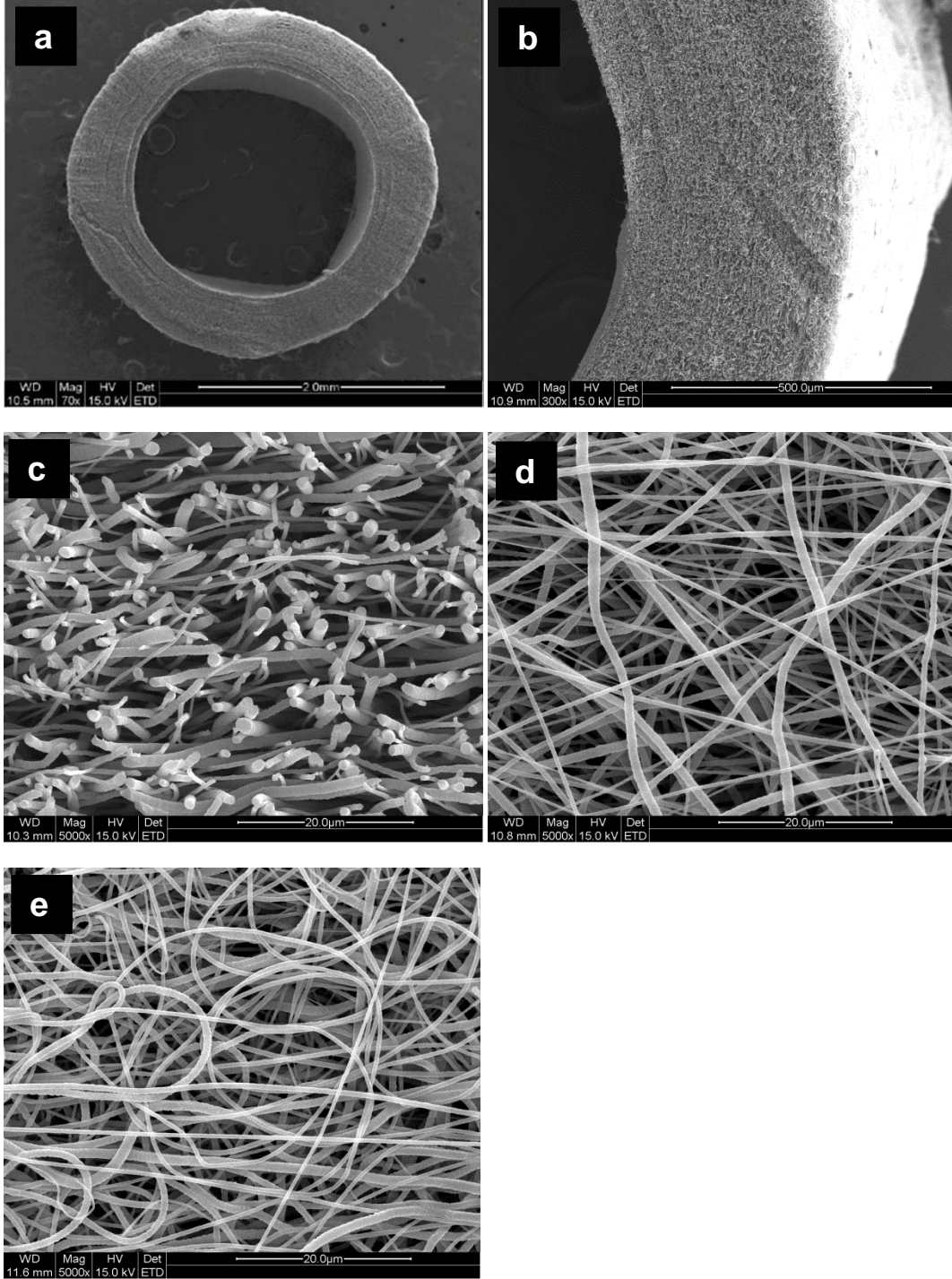
noktasından duvar kalınlığı ölçölüp ortalaması alınmıştır. Literatür bilgileri değerlendirilerek, sinir rejenerasyonu için en uygun olacağı düşünölen kalınlığa sahip kanal seçilmiştir.



Şekil 4.4. Farklı sürelerde oluşturulmuş, farklı duvar kalınlığına sahip PCL kanallar
a) 40 dakika, duvar kalınlığı: $740,75 \pm 87,910 \mu\text{m}$ b) 35 dakika, duvar kalınlığı: $698,75 \pm 34,712 \mu\text{m}$ c) 25 dakika, duvar kalınlığı: $550 \pm 53,410 \mu\text{m}$ d) 20 dakika, duvar kalınlığı: $424 \pm 35,534 \mu\text{m}$

Kanalların SEM görüntüleri üzerinden duvar kalınlıkları ölçölerek ve yapı bütünlüğü dikkate alınarak uygun olan seçilmiştir. Buna göre, Şekil 4.4.c'de görölen kanalın yapısı ve kalınlığı uygun görölmüştür. Tüm bu belirlenen parametrelere göre oluşturulan kanalın detaylı görüntüleri Şekil.4.5.'de verilmiştir. Şekildeki kanalın duvar kalınlığı $515,55 \pm 37,670 \mu\text{m}$, dış yüzeyini oluşturan

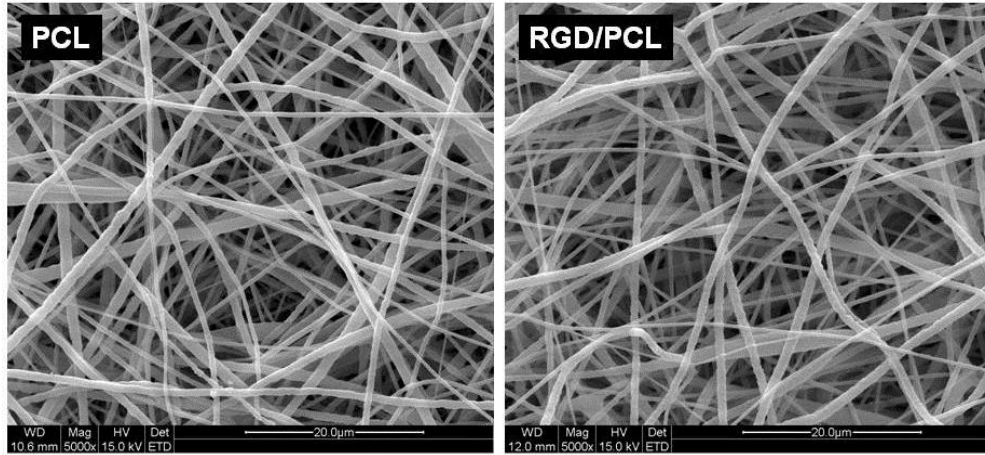
fiberlerin ortalama çapı $552,533 \pm 31,418$ nm, iç yüzeyini oluşturan fiberlerin ortalama çapı $645,45 \pm 26,541$ nm'dir.



Şekil 4.5. PCL sinir kanalının görüntüsü a) Kanalın enine kesiti b) Kanal duvarı c) Kanalı oluşturan fiberlerin enine kesiti d) Kanalın dış yüzeyi e) Kanalın iç yüzeyi

Tez çalışmasında hazırlanan 515 µm duvar kalınlığına sahip kanal üzerinde aksonal büyümenin daha etkili gerçekleşeceği, elastikiyeti ve dayanıklılığı sayesinde *in vivo* koşullarda çökme oluşmayacağı beklenmektedir.

Son olarak Nap-FFGRGD molekülü kullanılarak PCL kanalların yüzeylerinin RGD sekansı ile kaplanması gerçekleştirilmiştir. SEM fotoğraflarına baktığımızda, aynı sistem parametreleri kullanılarak hazırlanmış iki farklı membrandan; PCL membranı oluşturan fiberlerin ortalama çapı $590,25 \pm 21,612$ nm iken, RGD ile kaplanmış olan fiberlerin ortalama çapının $565,6 \pm 25,816$ nm olduğu görülmektedir. Bu sonuca dayanarak RGD ile kaplama işlemi sonrasında fiberlerin morfolojisini ve çapını değiştirici herhangi bir etki oluşmadığı söylenebilir (Şekil 4.6.)



Şekil 4.6. RGD ile kaplanmış olan PCL fiberler çaplarının, normal PCL fiberler ile karşılaştırılması; PCL: Ortalama fiber çapı $590,25 \pm 21,612$ nm, RGD/PCL: Ortalama fiber çapı $565,6 \pm 25,816$ nm

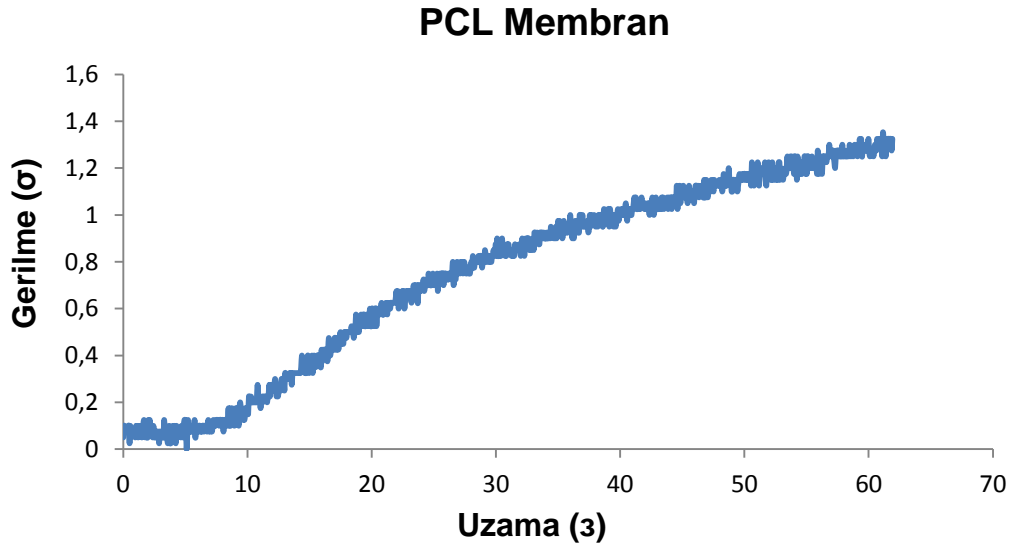
Yapılan birçok çalışma nano/mikro ölçekte fiberlerin *in vitro* [96] ve *in vivo* [97] koşullarda periferik sinir büyümesinin yönlendirilmesinde başarılı bir şekilde rol aldığını ortaya koymaktadır. Bu çalışmaların çoğunda aksonlara rehberlik eden fiberlerin ortalama çapı 100-250 µm olmasına rağmen [98], 100 µm veya daha geniş çaplı fiberlere oranla hücre boyutunda ya da daha küçük olan 500 nm ile 30 µm arasında çapa sahip fiberler üzerinde sinirsel uzantıların daha hızlı büyüdüğü

görülmüştür [99]. Buradan yola çıkarak, hazırlanmış olan PCL kanalların temelini teşkil eden ortalama 500-600 nm çapa sahip fiber yapılarının sinir rejenerasyon sürecinde bir avantaj sağlayacağı beklenmektedir.

4.3. Doku İskelelerinin Mekanik Özellikleri

İdeal bir sinir kanalının elastisite modülü, sinir rejenerasyonu boyunca vücut içindeki fizyolojik yüklenmelere dayanabilecek ve implantasyon sürecinde kolay işlenebilmesi için yeterli dayanıklılık ve esnekliği sağlayabilecek şekilde doğal sinir dokusunun modülüne mümkün olduğunca yakın değerde olmalıdır [28]. Bu şekilde aksonal büyümeyi destekleyebilir.

Çalışma dahilinde ASTM E4 standartlarına uygun gerilme - uzama testi gerçekleştirilerek 5 adet PCL membranın mekanik özellikleri hakkında veriler elde edilmiştir. Membranlar 1 cm en, 5 cm boy ve 80 µm kalınlığında olup, 5 kN çekme kuvveti ve 5 mm/dak. sabit çekme hızıyla oda sıcaklığında test edilerek bir gerilme - uzama grafiği oluşturulmuştur (Şekil 4.7). Grafiğin eğiminden malzemenin elastisite modülü elde edilmektedir.



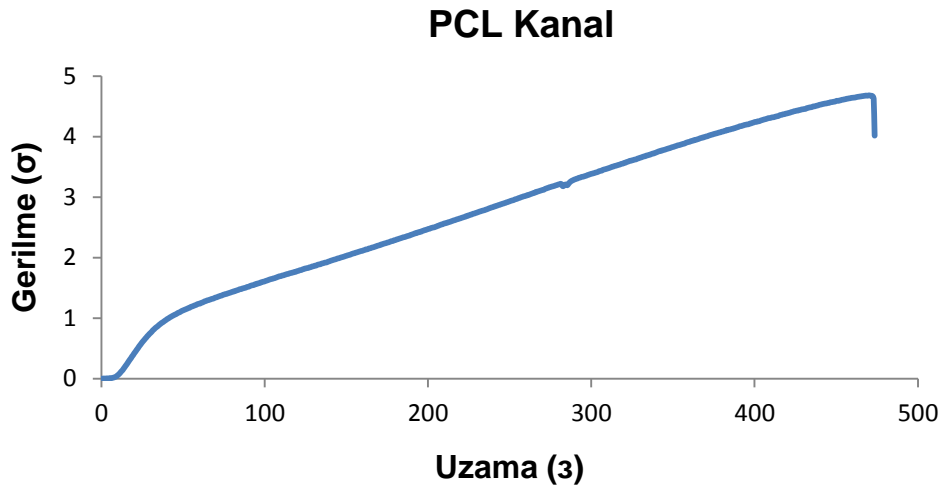
Şekil 4.7. PCL membranın gerilme - uzama grafiği

PCL membranların mekanik özelliklerine ilişkin saptanan değerler Çizelge 4.1.'de verilmiştir. PCL membranların azami gerilme gücü $3,0563 \pm 0,1068$ MPa, koptuğu andaki toplam uzama miktarı $33,930 \pm 0,749$ mm, elastisite modülü ise $0,23481 \pm 0,00154$ MPa'dır.

Çizelge 4.1. PCL membranın gerilme - uzama grafiği ve mekanik test sonuçları

Mekanik Özellikler	PCL Membran 5kN ve 5.00 mm/dak.
Azami Gerilme Gücü (MPa)	$3,0563 \pm 0,1068$
Kopma Anında Uzama Miktarı (mm)	$33,930 \pm 0,749$
Elastisite Modülü (MPa)	$0,23481 \pm 0,00154$

İç çapı 2 mm, duvar kalınlığı 500 μ m, dış çapı 3 mm ve uzunluğu 1,5 cm olan 5 adet PCL kanalın gerilme-uzama testi, 5 kN çekme kuvveti ve 50 mm/dak. sabit çekme hızıyla oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. PCL kanallara ilişkin gerilme - uzama grafiği Şekil 4.8.'de verilmiştir.



Şekil 4.8. PCL kanalın gerilme - uzama grafiği

PCL kanalların mekanik özelliklerine ilişkin değerler Çizelge 4.2.'de sunulmuştur. PCL kanalların azami gerilme gücü $5,9206 \pm 0.8437$ MPa, koptuğu andaki toplam uzama miktarı $65,313 \pm 4.086$ mm, elastisite modülü ise $0,24844 \pm 0,00152$ MPa'dır.

Çizelge 4.2. PCL kanalın gerilme - uzama grafiği ve mekanik test sonuçları

Mekanik Özellikler	PCL Kanal 5kN ve 50.00 mm/dak.
Azami Gerilme Gücü (MPa)	$5,9206 \pm 0,8437$
Kopma Anında Uzama Miktarı (mm)	$65,313 \pm 4,086$
Elastisite Modülü (MPa)	$0,24844 \pm 0,00152$

Literatürde, normal sinirin azami gerilme gücü 2,7 MPa, elastisite modülü 0,580 MPa; aselüler sinirin ise azami gerilme gücü 1,4 MPa, elastisite modülü 0,576 MPa olarak belirtilmiştir [100]. Tez kapsamında hazırlanan kanallara baktığımızda, azami gerilme gücünün normal sinir ve aselüler sinirden daha fazla olduğu, bu sayede daha dayanıklı olduğu gözlenmektedir. Çalışmada oluşturulan sinir kanallarının $0,24844 \pm 0,00152$ MPa olan elastisite modülünün periferik sinirin elastisite modülü değerinden düşük olduğu bu sayede daha esnek bir yapıya sahip olduğu gözlenmiştir. Azami gerilme gücü, elastisite ve mevcut duvar kalınlığı göz önüne alındığında, implantasyon sonrasında vücut içerisindeki ağır baskılar ve hareketlere karşı mekanik açıdan yapısını muhafaza edebileceği ve esnek bir yapıya sahip olduğunu söylenebilir.

Sinir kanalının *in vivo* ortamda etkinliğinin değerlendirilmesi için genellikle tercih edilen hayvan modeli siyatik sinir kesili ratlardır. Sonuçlar hazırlanan doku iskelesinin azami gerilme gücünün F344 rat siyatik sinirinden de (2,72 MPa) daha fazla olduğunu ortaya koymaktadır [101].

4.4. Doku İskelelerinin *In vitro* Koşullarda Biyobozunurluk Özellikleri

Periferik sinir kesilerinin fonksiyonel iyileşmesi üzerine yapılan çalışmalar ilk 10-12 haftalık sürecin yenilenen aksonların distal segmente doğru yönleneceği açısından oldukça önemli olduğunu göstermektedir [102,103]. Bu zaman boyunca, yenilenen sinirler için yapısını tamamen koruyacak bir mikroçevre oluşturmak esastır. Şiddetli aksonal yaralanmalarda ise klinik olarak iyileşme sağlanmasının 18 ayı bulabildiği gözlenmiştir [104]. Kullanılacak olan sinir kanalının bu süre zarfında rejenerasyonu destekleyecek şekilde yapısını koruması gerekmektedir. Bu amaçla sinir kanalı hazırlanmasında seçilen malzeme, periferik sinir rejenerasyonu sürecinden verimli sonuçlar alınabilmesi açısından son derece önemlidir. Bu malzeme ile oluşturulacak olan sinir kanalı, rejenerasyon boyunca gerilme, itme, çekme gibi fiziki etkiler karşısında yapısal sürekliliğini muhafaza edebilecek şekilde iyi bir esnekliğe ve doğru bir bozunma oranına sahip olmalıdır [105].

PCL, mekanik olarak dayanıklı, alifatik ve biyobozunur bir polimerdir. PCL polimerinin bozunma ürünleri toksik olmayan ve inflamasyonel yanıtı tetiklemeyen süksinik asit, bütirik asit, valerik asit ve kaproik asitten oluşmaktadır [10]. Yapısında bulunan alifatik ester bağlarına bağlı olarak hidrolitik bozunmaya uğrayabilmektedir. Bununla birlikte tamamen bozunması 2-3 yılı bulabilmektedir [106]. Doku iskelesinin boyutu, moleküler ağırlığı ve kristalinitesine bağlı olarak bozunma hızı değişiklik gösterebilmektedir.

Tez kapsamında hazırlanan PCL doku iskelelerinin *in vitro* olarak bozunma oranı değerlendirilmiştir. Test için 6 adet 1 cm en 5 cm boyunda 80 µm kalınlığında PCL membran ile 6 adet 2 cm iç çapa, 500 µm duvar kalınlığına ve 2 cm uzunluğa sahip PCL kanal kullanılmıştır. Örnekler, PBS içerisinde olacak şekilde 37°C sıcaklığında çalkalamalı su banyosunda tutulmuştur. Haftada bir kez örneklerin içerisinde bulunduğu PBS yenilenmiştir. 1 aylık periyotun sonunda örnekler desikatörde kurutulduktan sonra hassas terazide ağırlıkları ölçülmüştür. Testin öncesinde de yapılan ölçümler ile kıyaslanarak ortalama ağırlık değişimi gözlenmiştir (Çizelge 4.3.). Bir aylık periyot sonunda, PCL membranın ağırlığında %0,248 oranında bir azalma gözlenirken, PCL kanalda ise %0,270'lik bir azalış görülmektedir. Sonuç olarak doku iskelelerinin ağırlığında herhangi önemli bir değişiklik gözlenmemiştir.

Çizelge 4.3. Doku iskelelerinin bozunma testi öncesi ve sonrasında ağırlıklıkları

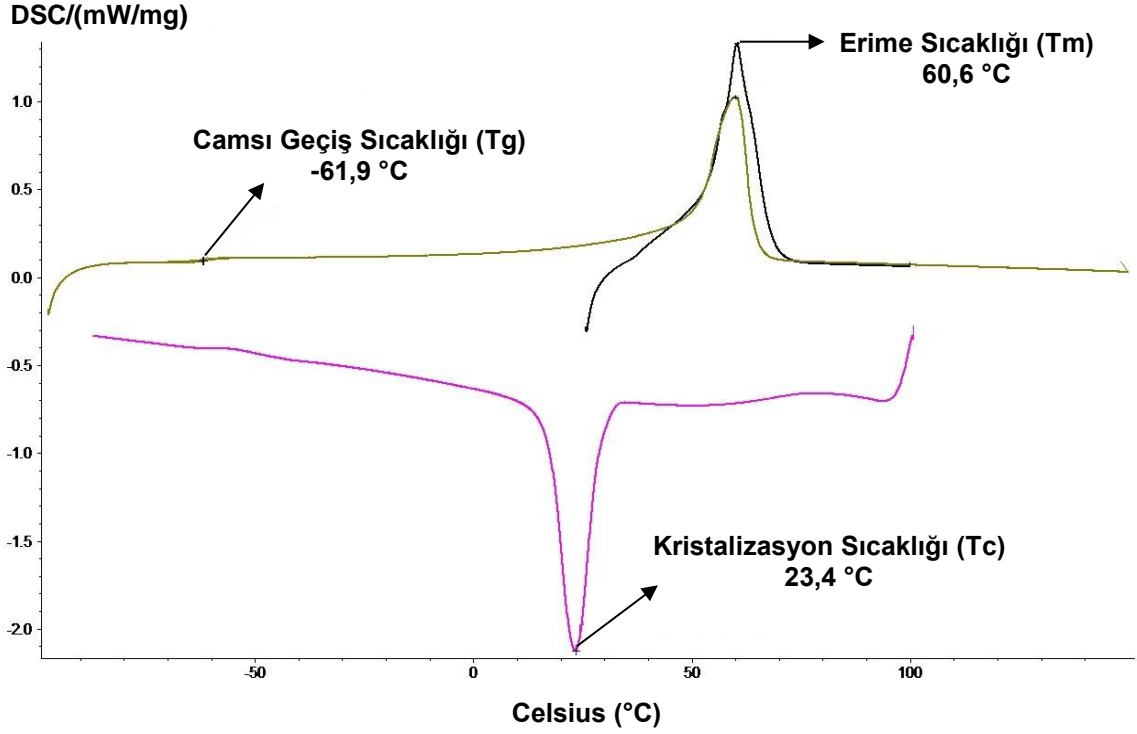
	<u>Test Öncesi</u>	<u>Test Sonrası</u>	<u>% Ortalama Fark</u>
PCL Membran	6,833 ± 0,488 mg	6,816 ± 0,691 mg	% 0,248
PCL Kanal	8,516 ± 0,624 mg	8,493 ± 0,633 mg	% 0,270

Sonuçlar, biyobozunurluk karakteri bakımından PCL kanalın, iyileşme için uzun zaman gerektiren şiddetli yaralanmalarda ve büyük sinir kayıplı kesilerin tedavisinde bütünlüğünü koruyarak aksonal yenilenmeyi destekleyeceğine işaret etmektedir.

4.5. Doku İskelelerinin DCS Yöntemiyle Saptanan Isıl Özellikleri

Sinir kanalı üretiminde seçilen polimerik malzemenin kristalinite özelliği, elde edilen doku iskelesinin kimyasal, mekanik, ısı ve bozunma hızı gibi diğer karakteristik özelliklerini etkilemektedir. Bu yüzden oluşturulan doku iskelelerinin ısı özellikleri, DSC yöntemi ile incelenmiştir.

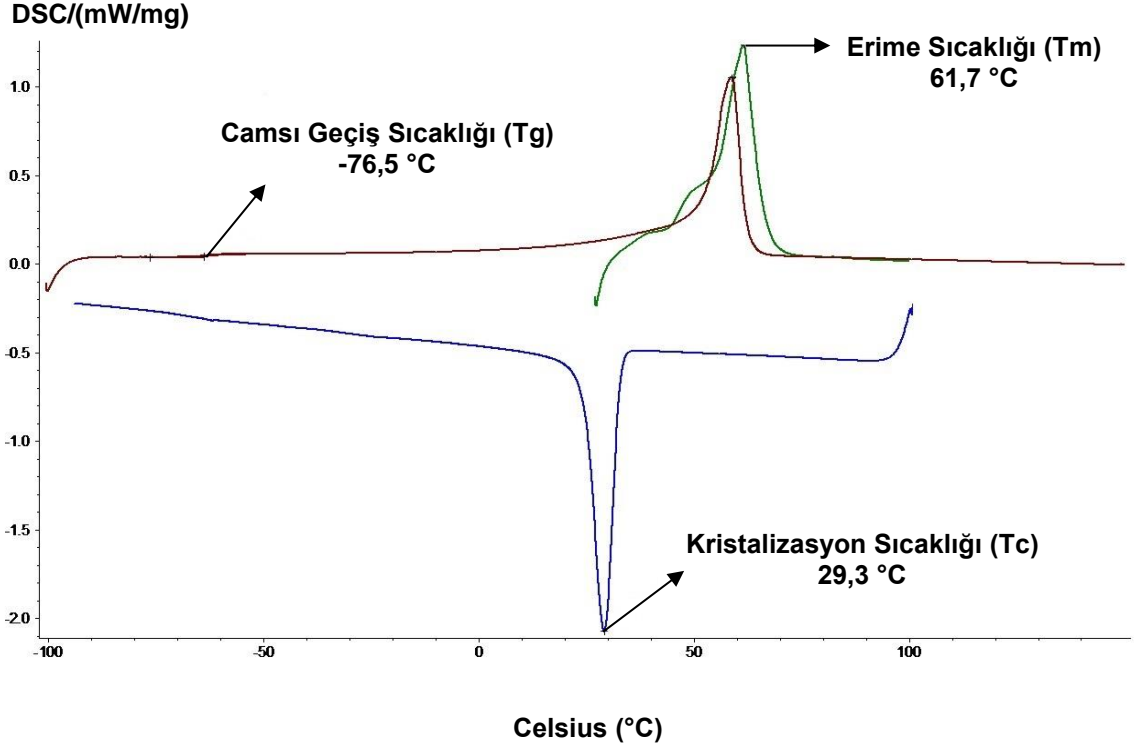
Çalışma kapsamında hazırlanan PCL ve RGD ile kaplanmış PCL membranların DSC yöntemi ile ısı analizleri gerçekleştirilmiştir. Analiz için 2 adet 4,8 mg ağırlığında PCL membran ve 2 adet de 5,8 mg ağırlığında RGD kaplı PCL membran hazırlanmıştır. Hazırlanan doku iskelelerinin DSC termogramları -90 - 150°C aralığında 10°C/dak. ısıtma hızıyla ve 100 ml/dak. azot akış hızı olan sistemde çekilmiştir. PCL membranın DSC termogramı Şekil 4.9.'da görülmektedir. Yarı-kristalin PCL polimeri için literatürde belirtilmiş olan camsı geçiş sıcaklığı -60°C, erime sıcaklığı ise 59°C ile 65°C arasındadır [10]. Tez çalışmasında elektrostatik eğirme sistemi ile oluşturulmuş olan PCL membranın -61,9°C'lik camsı geçiş sıcaklığı literatürde belirtilen değere oldukça yakındır. Erime sıcaklığı ise literatürde rapor edilmiş olan aralıktadır.



Şekil 4.9. PCL membranının DSC termogramı

RGD ile kaplı PCL membranlara baktığımızda, RGD peptid dizisinin doku iskelesinin camsı geçiş sıcaklığı, erime sıcaklığı ve kristalizasyon sıcaklığında değişikliğe yol açtığını görüyoruz. Camsı geçiş sıcaklığı $-76,5^{\circ}\text{C}$ 'ye düşerken, erime sıcaklığı $61,7^{\circ}\text{C}$ kristalizasyon sıcaklığı ise $29,3^{\circ}\text{C}$ 'ye yükselmiştir (Şekil 4.10.).

Yarıkristalin polimerlerin kısmen güçlü moleküllerarası kuvvetleri, polimerin camsı geçiş sıcaklığı üzerinde dahi yumuşamasını önlemektedir. Bu karakterde polimerlerin elastisite modülü yalnızca yüksek erime sıcaklığında önemli ölçüde değişebilir [107]. Bunun yanında kristalinite derecesine bağlı olarak, yüksek kristalinite malzemenin daha sert ve termal olarak daha kararlı bir hal almasını sağlarken diğer taraftan malzeme daha kırılabilir bir karakter kazanır [108,109]. RGD'nin PCL doku iskeleleri üzerinde malzemenin sağlamlığını ve sıcaklık altında yapısını muhafaza edebilmesini destekleyecek bir etki yarattığı yorumu çıkarılabilmektedir.



Şekil 4.10. RGD ile kaplı PCL membranın DSC termogramı

PCL ve RGD ile kaplı PCL doku iskelelerinin camsılaşma geçişlerine ilişkin karakteristik değerler Çizelge 4.4'te sunulmuştur.

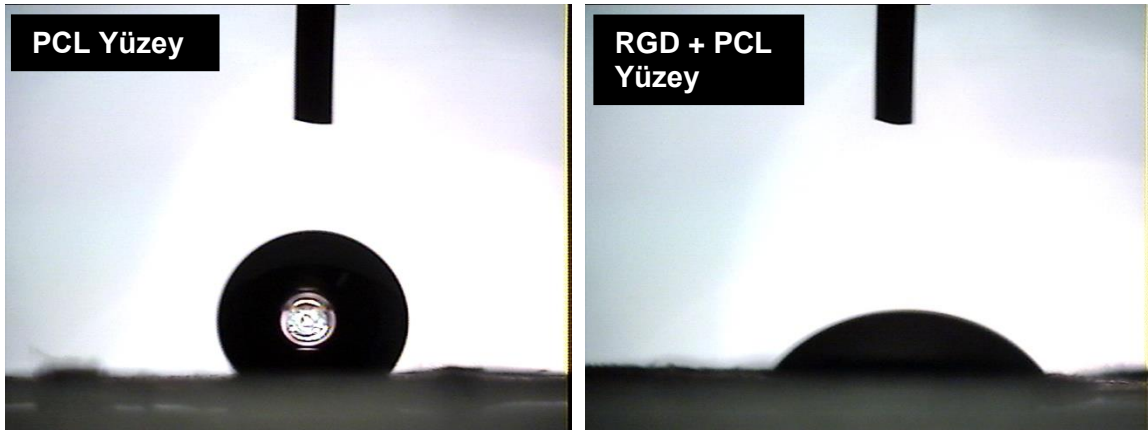
Çizelge 4.4. PCL ve RGD ile kaplı PCL doku iskelelerinin ısıl özellikleri

	PCL	RGD/PCL
Camsılaşma Geçişi		
Başlangıç Noktası	-65,6°C	-76,2°C
Orta Nokta	-61,9°C	-63,8°C
Bükülme Noktası	-61,9°C	-76,5°C
Bitiş Noktası	-58,2°C	-44,8°C
Özgül Isı Değişimi	0,110 J/g	0,071 J/g

4.6. RGD ile Kaplanmış PCL Kanalların Hidrofilitesi

Doku mühendisliği kapsamında tasarlanan, hidrofilik yüzey özelliğine sahip doku iskelelerinin hücrelerin tutunması ve büyümesi için daha elverişli olduğu bilinmektedir. Tez çalışmasında sinir kanallarını oluşturmak için tercih edilen PCL polimeri hidrofobik karakterdedir. Hücrelerin tutunabilmesi için gerekli olan yüzey aktif grupları bakımından yetersizdir. Bu dezavantajını gidermek, hidrofilik bir karakter kazandırmak amacıyla PCL kanalların yüzeyleri RGD peptid dizisi ile kaplanmıştır.

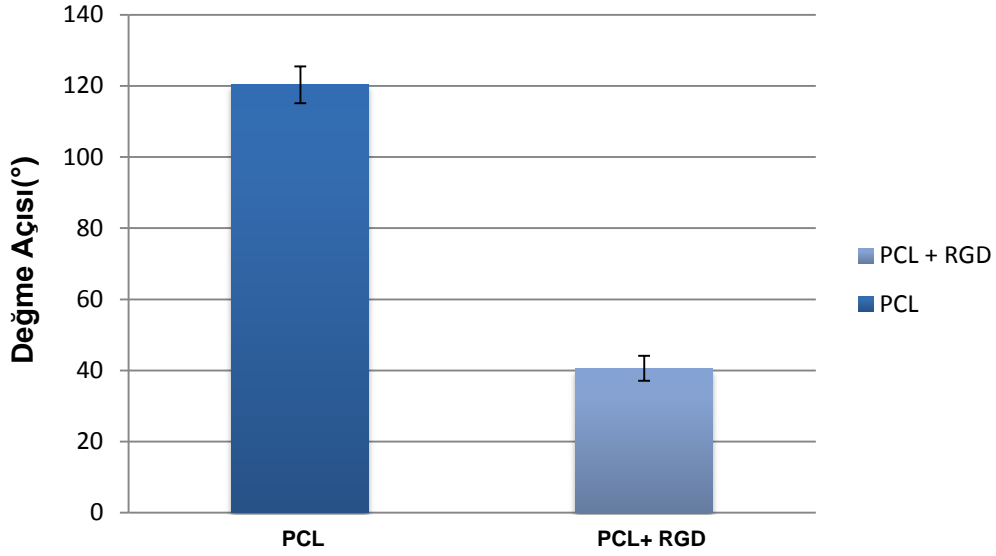
RGD kaplama işleminin etkinliğini gözlemleyebilmek, RGD ile kaplanmış ve kaplanmamış olan PCL kanalların kıyaslamasını yapabilmek için su değme açısı testi gerçekleştirilmiştir. Testte iki farklı gruptan 80 µm kalınlığında 5'er adet örnek kullanılmıştır. Test boyunca su damlacığının yüzeyler üzerindeki durumu görüntülerle saptanmıştır (Şekil 4.11.). PCL membran üzerindeki su damlası yayılma eğilimi göstermezken, RGD kaplanmış olan PCL membranın yüzeyi üzerinde yayılmıştır.



Şekil 4.11. PCL ve RGD kaplı PCL membran üzerindeki su damlacığının durumu.

Su damlasının yüzeyler üzerindeki görüntülerinden damla ile yüzey arasındaki açı değerleri analiz edilerek ortalama bir sonuç elde edilmiştir. Sonuçlar, PCL kanalların yüzeylerinin su değme açısı $120,284 \pm 5,162$ iken, RGD ile kaplanmış olanlarda bu açı değerinin $40,583 \pm 3,589$ 'a kadar düştüğünü, hidrofobik nitelikteki PCL kanalların hidrofilitesinin büyük oranda arttığını açıkça göstermektedir (Şekil 4.12.).

Su Değme Açısı Testi



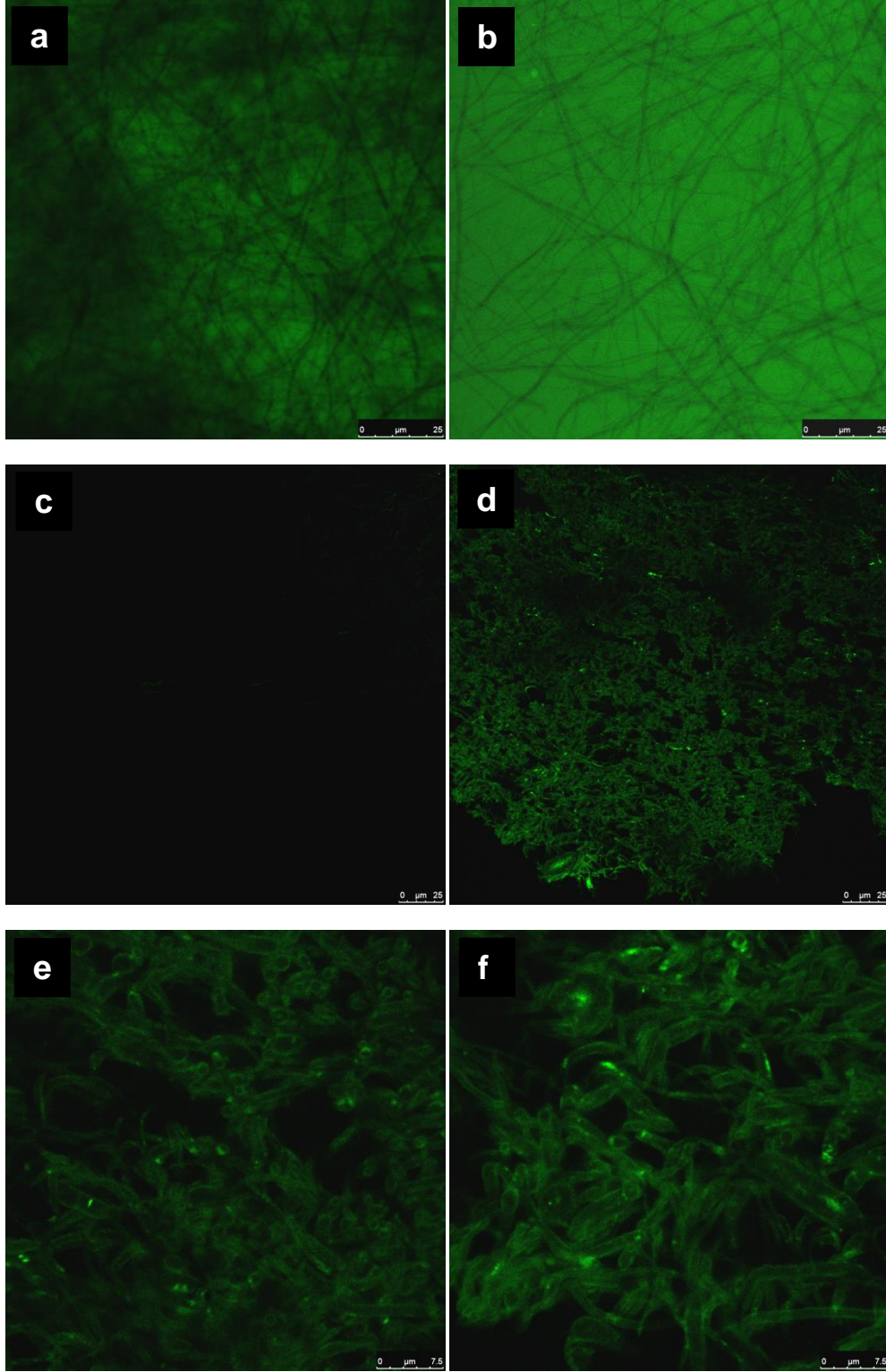
Şekil 4.12. PCL ve RGD kaplı PCL kanalın su değme açısı testi

Doku iskelelerinin yüzeyi, uygulanacağı spesifik alandaki doğal mikroçevre ile direkt etkileşimde bulunan birincil kısmı teşkil ettiğinden, yüzey fonksiyonları son derece önemlidir. Yüzeyi hidrofolik nitelikte olan biyomalzemelerin buna paralel olarak biyoyumluluğunun da yüksek olduğu rapor edilmiştir [85,86]. Sentetik polimerlerin hidrofobik karakterdeki yüzeyleri hücre tutunması için yeterli etkinliği sağlayamadığından, yüzeylerin hücre tanıma ajanları ile modifiye edilmesi yaygın olarak uygulanan bir yaklaşımdır. Yin ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, sentetik bir polimer olan poli-DL-laktik asit tabanlı RGD ile desteklenmiş doku iskelelerinden sinir büyüme faktörü salınması ile sinir rejenerasyonunu desteklemeyi amaçlamışlardır. Schwann hücrelerinin çoğalması ve gelişmesini teşvik edici özellikteki glial hücrelerin afinitesi için son derece uyumlu olduğu gözlenen bu doku iskelesinin değme açısının $55,67 \pm 1,6$ olduğu görülmüştür [110]. Tez kapsamında, sentetik bir polimer olan PCL temelli doku iskelelerinin, hücre tutunması bakımından yetersiz olan hidrofobik yüzeyi [42], RGD üçlü peptid dizisi ile fonksiyonlandırılmıştır. Değme açısı testi sonuçlarına göre, RGD ile kaplanmış PCL sinir kanalları, Yin ve arkadaşlarının oluşturmuş olduğu kanallara oranla daha hidrofilik özelliktedir. Literatür bilgilerine dayanarak, değme açısı testinin sonuçları bakımından, tez çalışmasında oluşturulan sinir kanallarının RGD

ile desteklenerek daha biyouyumlu bir hale geldiğini, bu sayede sinir rejenerasyon sürecini destekleyici bir rol oynayacağını söylemek mümkündür.

4.7. FITC İşaretli Nap-FFGRGD ile Kaplanan PCL Kanallar

Çalışmada hazırlanan PCL doku iskeleleri, floresan özellikteki FITC molekülü ile işaretlenmiş RGD peptidi kullanılarak kaplanmıştır. Konfokal mikroskop altında analiz yapılarak RGD kaplanmış fiberler görüntülenmiştir. RGD ile kaplanmış olan fiberler yeşil renkte görünmektedir. PCL membran (Şekil 4.13.a) ile RGD kaplı PCL membranın (Şekil 4.13.b) karşılaştırması yapıldığında, 630x büyütme altında görüntülerdeki yeşil alanlar baz alındığında yorumda bulunulmuştur. RGD ile kaplanmış olan membranda görüntüdeki siyah fiberlerin etrafı nano ölçekte kalınlığa sahip bir RGD tabakasıyla sarılmıştır. Bu nedenle, görüntüdeki yeşil alan varlığı RGD kaplanmamış olan membrana göre çok daha fazladır. Kanalların enine kesitine bakıldığında (630x büyütmede) ise RGD ile kaplanmamış olan PCL kanalda herhangi bir floresan renk gözlenmezken (Şekil 4.13.c) RGD kaplı örnekte yeşil ışımaya yapan bölgeler mevcuttur (Şekil 4.13.d). Şekil 4.5.c'de olduğu gibi RGD kaplanmış olan PCL kanalın enine kesitine daha yakından (3000x büyütmede) bakıldığında fiberlerin etrafında oluşan RGD tabakası çok daha net görülmektedir (Şekil 4.13.e ve Şekil 4.13.f).



Şekil 4.13. FITC-işaretili RGD peptidi ile kaplanmış PCL fiberlerin konfokal mikroskop görüntüsü a) PCL membran b) RGD ile kaplanmış PCL membran c) PCL kanalın enine kesiti d) RGD ile kaplanmış PCL kanalın enine kesiti e) RGD ile kaplanmış PCL kanalın enine kesitinin daha yakından görüntüsü f) RGD ile kaplanmış PCL kanalın enine kesitinin daha yakından görüntüsü

Zheng ve arkadaşları, vasküler greftleri RGD ile fonksiyonlandırarak hayvan modeli üzerinde başarılı şekilde uyguladıkları çalışmalarında, benzer biçimde FITC işaretleme yöntemini kullanarak, polimer fiberleri üzerinde oluşturulan RGD tabakalarını göstermişlerdir [76]. Tez çalışmasında elde edilen sonuçlar, Zheng ve arkadaşlarının bulguları ile son derece uyuşmaktadır. Konfokal mikroskop analizi PCL fiber yüzeylerinin başarıyla RGD peptid dizisi ile kaplanmış olduğunu kanıtlamaktadır.

Xiao ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada, RGD peptidi ile desteklenmiş kolajen ve kitosandan oluşan doku iskelesiyle, özellikle yeni oluşan sinir fiberlerinin uzaması ve miyelin kılıfın oluşması ile sağlanacak olan siyatik sinirin fonksiyonel olarak iyileşmesi ve hızlı bir rejenerasyon süreci sağlanabilmesi bakımından, RGD desteği olmayan örneğe göre daha kuvvetli sonuçlar alındığını göstermişlerdir [111]. Benzer şekilde, tez kapsamında hazırlanmış olan RGD ile fonksiyonlandırılmış doku iskeleleri sayesinde, hasarlı sinir bölgesi üzerinde yapısal ve fonksiyonel olarak desteklenmiş bir rejenerasyon sürecinin oluşturulması beklenmektedir.

4.8. *In vitro* Çalışmaların Sonucu

4.8.1. WST-1 Analizi Sonuçları

Tez çalışmaları kapsamında son olarak doku iskeleleri ile L929 fibroblast hücrelerinin etkileşimi incelenmiştir. L929 hücreleri çalışmadan 2 gün önce 24 kuyucuklu mikropakanın her bir kuyucuğuna 10^4 hücre ekilerek inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra her iki deney doku iskelesi grubu için birer de kontrol grubu olmak koşuluyla sırasıyla 800 µg, 400 µg, 200 µg, 100 µg, 50 µg ağırlığında PCL ve RGD kaplanmış PCL doku iskeleleri kuyucuklara yerleştirilmiştir. Sitotoksisite testi her iki doku iskelesi grubu için iki tekrarlı olmak üzere bölüm 3.4.1.'de anlatılan şekilde gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubundan elde edilen optik yoğunluk değeri referans alınarak (%100) elde edilen sonuçlar Çizelge 4.5.'te görüldüğü gibidir. Bu sonuçlara göre 800 µg örnek grubu haricinde tüm gruplarda RGD kaplanmış olan PCL kanalların L929 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin daha düşük olduğu görülmektedir. Özellikle 200 µg örnek grubunda yaklaşık %45'lik bir

fark gözlenmektedir. Bu genel sonuç, RGD'nin L929 fibroblast hücrelerinin metabolik aktivitesini desteklediğini ortaya koymaktadır.

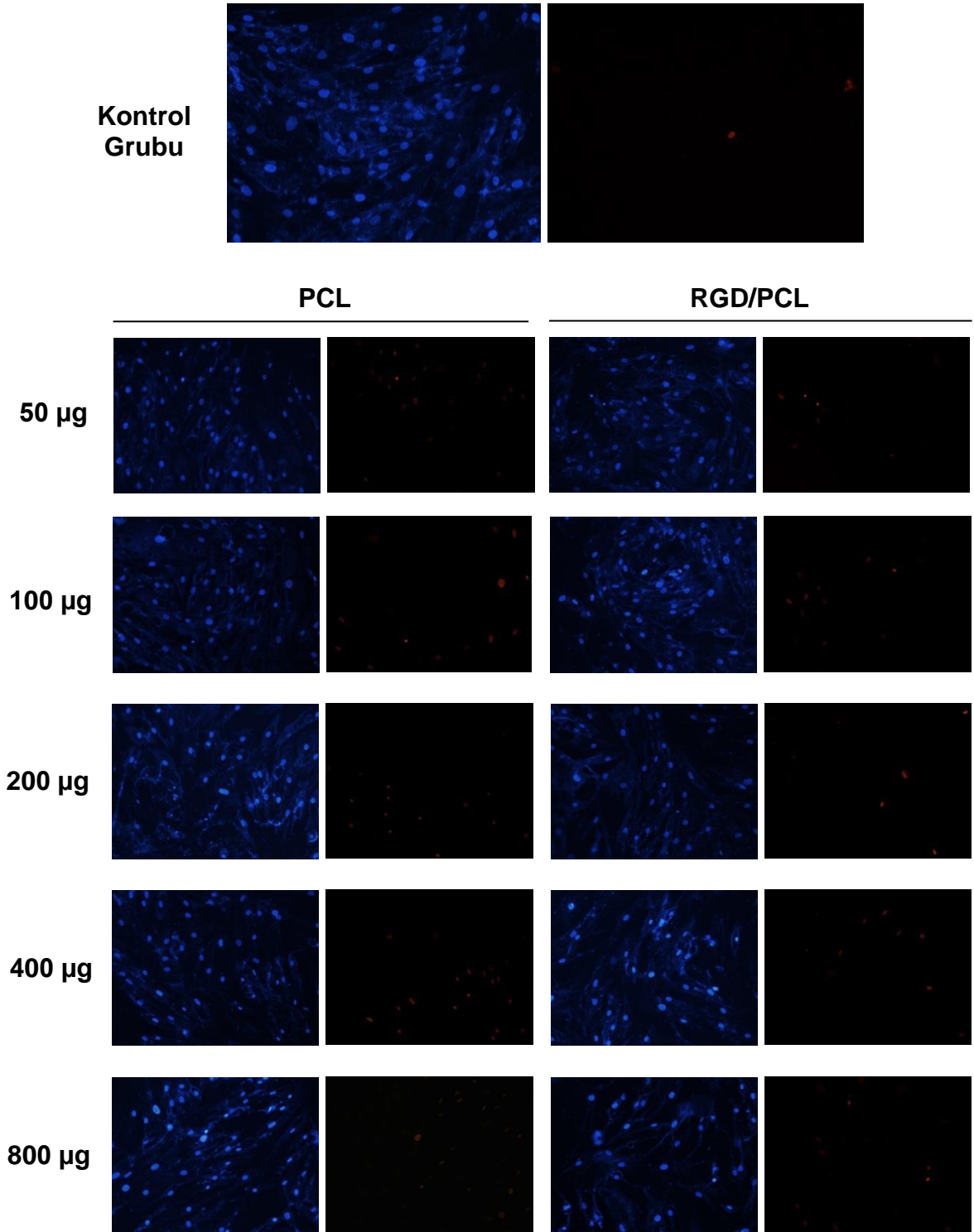
Çizelge 4.5. L929 hücrelerinin PCL ve RGD kaplanmış PCL doku iskeleleri üzerindeki % metabolik aktivite sonuçları

% Metabolik Aktivite	50µg	100µg	200µg	400µg	800µg
PCL	92,086331	88,84892	91,00719	114,3885	129,4964
RGD/PCL	112,23022	107,9137	132,0144	133,8129	86,33094

4.8.2. Doku İskeleleri Üzerindeki L929 Hücrelerinin Canlılık Durumu

Çalışmada hazırlanan RGD kaplı PCL doku iskeleleri üzerindeki L929 fare fibroblast hücrelerinin ne oranda nekroza uğradığını görmek ve morfolojik değerlendirmesini yapabilmek amacıyla Hoechst/PI ikili boyama yöntemi kullanılmıştır. WST-1 analizinde olduğu gibi kontrol gruplarının yanında, 800 µg, 400 µg, 200 µg, 100 µg, 50 µg ağırlığında PCL ve RGD kaplanmış PCL doku iskelelerinin L929 hücrelerinin morfolojik yapısına etkisi bölüm 3.4.2.'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiş olup inverted mikroskop altında hücrelerin durumu analiz edilmiştir. Deneye ilişkin mikroskop görüntüleri Şekil 4.14.'te sunulmuştur.

İlk olarak referans niteliğindeki kontrol grubuna ait fotoğraflar verilmiş, daha sonra 50 µg'dan başlamak üzere 800 µg'a kadar olan deney gruplarının, aynı bölgeden alınmış karşılaştırmalı fotoğrafları sunulmuştur. Şekil 4.14.'te karşılaştırmalı fotoğraflardan sol tarafta bulunanları, Hoechst ile mavi renkte boyanmış büyük çoğunluğu canlı olan hücreleri, sağ taraftakiler ise PI ile kırmızı renkte boyanmış nekrotik hücreleri göstermektedir. Elde edilen sonuçlarda, RGD ile kaplanmış olan PCL kanallar üzerinde, kaplanmamış olan PCL kanala nazaran daha az nekrotik hücre olduğu, dolayısıyla bu RGD'li kanalların hücrelerin yaşayabilmesi için daha elverişli olduğu anlaşılmaktadır.



Şekil 4.14. İkili boyama tekniğiyle boyanmış L929 hücrelerinin kontrol grubu ve farklı ağırlıklardaki doku iskeleleri üzerindeki görüntüsü. Mavi olarak görünenler Hoechst ile boyanmış canlı veya apoptotik hücreler, kırmızı olarak görünenler PI ile boyanmış nekrotik hücreler

Mikroskop fotoğrafları üzerinden, hücrelerin nekrotik olma durumlarına göre istatistiksel analiz gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.6.'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Doku iskeleleri üzerinde % nekrotik L929 hücre oranları

% Nekrotik Hücre	Kontrol	50µg	100µg	200µg	400µg	800µg
PCL	4,6	13,23	10,43	7	14,6	14,87
RGD/PCL	4,6	6,67	9,6	5,3	7,7	6,76

Williams ve arkadaşları, sinir kanalı ile desteklenen rat siyatik sinir rejenerasyonu modelinde fibroblastların önemini gözlemlemişlerdir [112]. Sinir kanalı implantasyonunu takip eden ilk haftada, sinir boşluğunu köprüleyici aselüler fibrin bir matriksin olduğu gözlenmiştir. İkinci haftada, fibrin matriks içerisinde Schwann hücreleri, fibroblastlar, endotelyal hücreler ve perinöral hücreler çoğalmaktadır. Bunu izleyen haftalarda akson göçünü yönlendirmek, akson miyelinizasyonunu düzenlemek, yeni kan damarlarının oluşumunu desteklemek için Schwann hücrelerinin ve fibroblastların aktivitesi devam etmektedir [110].

Periferik sinir, fibroblastlar, endotelyal hücreler ve ekstraselüler matriksin oluşturduğu bağ dokusu ile çevrelenmiş halde bulunmaktadır [113]. Fibroblastlar ve endotelyal hücreler, sinir büyüme faktörlerinin ve aksonal büyümeyi aktive ettiği kanıtlanmış olan vasküler büyüme faktörlerinin üretimini gerçekleştirmektedirler [113,114].

Yapılan çalışma, tez kapsamında hazırlanmış olan RGD ile fonksiyonlandırılmış nanofibröz PCL sinir kanallarının, sinir rejenerasyon sürecinde temel rol oynayan fibroblastların canlılığı için uygun olduğunu kanıtlamaktadır.

5. GENEL SONUÇLAR

Tez çalışmasından elde edilen genel sonuçlar bu bölümde maddeler halinde sunulmuştur.

- Tez çalışması kapsamında, elektrostatik eğirme sistemi kullanılarak, sentetik bir polimer olan Poli-ε-kaprolakton'dan hazırlanmış, sinir rejenerasyon sürecini destekleyecek kalınlıkta, 500-600 nm ortalama çapa sahip fiberlerden meydana gelen, 2 mm iç çap ve 2 cm uzunluğunda sinir rejenerasyon kanalları hazırlanmıştır.
- PCL kanalların temelini oluşturan fiber yapılarının yüzeyinde, Nap-FFGRGD molekülünün hidrofobik yüzeyler üzerinde kendiliğinden düzenlenmesi yaklaşımından faydalanarak, doğal ekstraselüler matriks içerisindeki proteinlerin yapısında bulunan ve hücre tutunması aşamasında primer rol oynayan "RGD üçlü peptid dizisi"nden meydana gelen bir tabaka oluşturulmuştur.
- Çalışma dahilinde hazırlanan membranlar ve kanalların morfolojilerinin belirlenmesi amacıyla taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılmıştır. Elektrostatik eğirme sisteminde gerilim, akış hızı, iğne ile toplayıcı arası uzaklık, sıcaklık ve nem gibi temel parametrelerin farklı değerleri uygulanarak gerçekleştirilen ön çalışmalarda, farklı fiber morfolojisine sahip PCL membranlar hazırlanmıştır. Hazırlanan membranların SEM analizlerine dayanarak, literatür bilgileri dahilinde sinir rejenerasyonu için uygun niteliklerde olduğu düşünülen kanalın tasarlanması için gerekli parametrelerin 18 kV gerilim, 12-13 cm uzaklık, 2 ml/sa polimer jet akış hızı, oda sıcaklığı ve %40-55 nemlilik olduğu sonucuna varılmıştır.

- Belirlenen sistem parametreleri ile benzer yapıda fiberlerden oluşan, nano ölçekte fiberlerin sağlamış olduğu yüksek yüzey alanı avantajını sekteye uğratabilecek boncuk oluşumlarının görülmediği, mevcut çalışmalara göre implantasyon sonrasında fizyolojik etkilerle çökmeye uğramayacak kalınlığa sahip, dikiş için elverişli, duvar kalınlığı 515 µm olan PCL kanallar oluşturulmuştur.
- Aynı sistem parametreleri kullanılarak hazırlanmış olan PCL ve RGD ile kaplanmış PCL kanalların SEM görüntüleri, PCL fiberlerin ortalama çapının $590,25 \pm 21,612$ nm, RGD'li fiberlerin ise $565,6 \pm 25,816$ nm olduğunu ortaya koymuştur. Mevcut değerlere ve fiberlerin görüntüsüne bakarak RGD ile kaplama işleminin fiberlerin morfolojisini ve çap kalınlığını değiştirici herhangi bir etki yaratmadığı sonucuna ulaşılmıştır.
- Tez kapsamında hazırlanan PCL kanalların mekanik özellikleri gerilme - uzama testi ile belirlenmiştir. Kanalların, $5,9206 \pm 0,8437$ MPa değerindeki azami gerilme gücünün normal sinir ve aselüler sinirden daha fazla olduğu, $0,24844 \pm 0,00152$ MPa'lık elastise modülü bakımından da daha esnek bir yapıya sahip olduğu görülmüştür. Bu veriler, kanalların implantasyon işlemi sonrası vücut içerisindeki ağır baskılar ve hareketler karşısında mekanik açıdan dayanıklılığı ve elastisite modülü değerinden de anlaşılacağı üzere esnekliği sayesinde yapısını koruyabileceğini göstermektedir.
- Oluşturulan PCL kanalların *in vitro* koşullarda bir aylık periyotta biyobozunurluğu değerlendirilmiştir. Deney süreci sonunda doku iskelesinin ağırlığında %0,27'lik bir azalma gözlenmiştir. Bu sonuç, oluşturulan sinir kanallarının, rejenerasyon için kritik olan ilk 4 aylık süreçte yapısını muhafaza edebileceğini bunun yanı sıra iyileşme için uzun süreler gerektiren şiddetli aksonal yaralanmalarda ve sinir kaybının büyük olduğu durumlarda fiziki açıdan rejenerasyonu destekleyebileceğini göstermektedir.
- Oluşturulan sinir kanallarının ısı özellikleri DSC ile karakterize edilmiştir. Sinir kanalı hazırlanması için seçilen polimerlerin kristaliniteleri; kimyasal, mekanik, ısı ve bozunma hızı gibi karakteristik diğer özelliklerini de

etkilemektedir. Hazırlanan doku iskelelerinin DSC termogramları -90 - 150°C aralığında, 10°C/dak. ısıtma hızıyla ve 100 ml/dak. azot akış hızı olan sistemde çekilmiştir. PCL'un yarıkristalin özelliği malzemenin camsı geçiş sıcaklığı üzerinde dahi yumuşamasını önlemektedir. Tezde, PCL ile oluşturulan sinir kanalının termal özellikleri, literatürde PCL ile belirtilmiş olan ısı özellikleriyle uyumaktadır. RGD ile kaplanmış olan PCL sinir kanallarının ise yüksek sıcaklık altında yapısını daha iyi muhafaza edebileceği yorumu çıkarılabilmektedir.

- Sessile damla yöntemi kullanılarak RGD ile kaplanan PCL doku iskeleleri yüzeyinin hidrofilitesine dair bilgiler edinilmiştir. RGD ile kaplama işlemi yapılmasının örneklerin su değme açısını $120,284 \pm 5,162$ dereceden $40,583 \pm 3,589$ dereceye kadar düşürdüğü, bu sayede hidrofobik nitelikteki PCL kanalların yüzeyinin hidrofilik bir karakter kazanarak hücre tutunması, çoğalması ve farklılaşması için elverişli, daha biyoyumlu bir hale geldiği sonucu çıkarılabilmektedir.
- PCL fiberlerin üzerindeki RGD sekansının dağılımını görebilmek amacıyla FITC floresan probu ile işaretlenmiş Nap-FFGRGD molekülü kullanılarak fiberler kaplanmıştır. FITC probu, RGD peptid dizisinin primer amini ile reaksiyona girerek yeşil floresan renk vermektedir. Konfokal mikroskop altında incelenen FITC işaretli örneklerde PCL fiber yüzeylerinin başarıyla RGD peptid dizisi ile kaplanmış olduğu görülmüştür.
- Çalışma kapsamında hazırlanan RGD sekansı ile fonksiyonlandırılmış PCL doku iskeleleri üzerine hücrelerin tutunması, çoğalması ve farklılaşmasının büyük oranda destekleneceği, hasarlı sinir bölgesi üzerinde yapısal ve fonksiyonel rejenerasyonun sağlandığı bir iyileşme sürecinin oluşması beklenmektedir.
- RGD ile kaplı PCL sinir kanallarının hücreler üzerindeki etkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla, ASTM tarafından sitotoksikite testleri için kullanılması önerilen L929 fibroblast hücreleri ile *in vitro* çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Deney kapsamında oluşturulan grupların geneline

bakıldığında RGD ile kaplanmış olan PCL kanalların, kaplanma yapılmamış olan kanallara göre 48 saatlik periyotta L929 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisinin daha düşük olduğu saptanmıştır. RGD peptid dizisinin L929 fibroblast hücrelerinin metabolik aktivitesini desteklediği sonucuna varılmıştır.

- Sinir kanallarının, sinir rejenerasyon sürecinde aksonal uzantıların büyümesi, bu uzantıların yönlendirilmesi, myelin kılıf ve kan damarları oluşumunu desteklediği bilinen fibroblast hücrelerinin canlılık durumuna yaptığı etki Hoechst/PI ikili boyama tekniği ile belirlenmiştir. Yapılan analiz, RGD ile kaplanmış olan PCL kanallar üzerinde, RGD ile desteklenmemiş kanallara oranla daha fazla canlı L929 fibroblast hücrelerinin olduğunu ortaya koymuştur. RGD sekansı ile fonksiyonlandırılmış nanofibröz PCL sinir kanallarının, sinir rejenerasyon sürecinde son derece önemli rol oynayan fibroblastların canlılığını koruyabilmesi için elverişli olduğu belirlenmiştir.
- Sonuç olarak tez çalışması kapsamında, periferik sinir rejenerasyonunun sağlanabilmesi için, nano ölçekte PCL fiberlerinden meydana getirilmiş RGD sekansı ile destekli, biyoyumlu ve biyobozunur nitelikte umut verici alternatif bir sinir kanalı oluşturulmuştur.

KAYNAKLAR

- [1] Schmidt, C.E., Leach, J.B., Neural tissue engineering: strategies for repair and regeneration, *Annual Review of Biomedical Engineering*, 5, 293-347, **2003**.
- [2] Nervous System, <http://www.adamimages.com/Nervous-system-Illustration/PI9683/F4> (Temmuz, **2013**).
- [3] Willis, W.D., The Nervous System. *Physiology*, (eds: Berne, R.M., Levy, M.N., Koeppen, B.M., Stanton, B.A.), Mosby, St. Louis, 81-226, **1998**.
- [4] Thomas, M.J., Sanes, J.R., The Development of the Nervous System. *Principles of Neural Science*, (eds: Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M.) McGraw-Hill Health Professions Division, New York, 1019-1161, **2000**.
- [5] Guyton, A.C., Hall, J.E., *Textbook of Medical Physiology*. 10th edition, Saunders, Philadelphia, xxxii, 1064, **2000**.
- [6] Topp, K.S., Boyd, B.S., Structure and biomechanics of peripheral nerves: nerve responses to physical stresses and implications for physical therapist practice. *Physical Therapy*, 86, 92-109, **2006**.
- [7] Verkhratsky, A., Butt, A.M., *Glial Neurobiology*, 1st edition, John Wiley & Sons Inc., Chichester, **2007**.
- [8] Lee, S.K., Wolfe, S.W., Peripheral nerve injury and repair, *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 8, 243-252, **2000**.
- [9] Ichihara, S., Inada, Y., Nakamura, T., Artificial nerve tubes and their application for repair of peripheral nerve injury: an update of current concepts, *Injury*, 39S4, 29-39, **2008**.
- [10] Kehoe, S., Zhang, X.F., Boyd, D., FDA approved guidance conduits and wraps for peripheral nerve injury: a review of materials and efficacy, *Injury*, 43, 553-572, **2012**.
- [11] National Spinal Cord Injury Statistical Center, Spinal cord injury facts and figures at a glance, *The Journal of Spinal Cord Medicine*, 34, 620-621, **2011**.
- [12] Geuna, S., Raimondo, S., Ronchi, G., Di Scipio, F., Tos, P., Czaja, K., Fornaro, M., Chapter 3: Histology of the peripheral nerve and changes occurring during nerve regeneration. *International Review of Neurobiology*, 87, 27-46, **2009**.
- [13] Kingham, P.J., Terenghi, G., Bioengineered nerve regeneration and muscle reinnervation. *Journal of Anatomy*, 209, 511-526, **2006**.
- [14] Pabari, A., Yang, S.Y., Mosahebi, A., Seifalian, A.M., Recent advances in artificial nerve conduit design: strategies for the delivery of luminal fillers, *Journal of Controlled Release*, 156, 2-10, **2011**.
- [15] Belkas, J.S., Shoichet, M.S., Midha, R., Peripheral nerve regeneration through guidance tubes, *Neurological Research*, 26, 151-160, **2004**.
- [16] Waller, A., Experiments on the section of the glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog, and observations of the alteration produced thereby in the structure of their primitive fibers, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 140, 423-429, **1850**.
- [17] Rivlin M., Sheikh E., Isaac R., Beredjikian P.K., The role of nerve allografts and conduits for nerve injuries, *Hand Clinics*, 26, 435-446, **2010**.
- [18] Seddon, H.J., Medawar, P.B., Smith, H., Rate of regeneration of peripheral nerves in man, *The Journal of Physiology*, 102, 191-215, **1943**.

- [19] Sunderland, S., *Nerves and nerve injuries*, 2nd edition, Churchill Livingstone, London, 120-127, 134-140, **1978**.
- [20] Greene, W.B., *Netter's Orthopaedics*, 1st edition, Philadelphia, Saunders Elsevier, **2006**.
- [21] Jiang, X., Lim, S.H., Mao, H.Q., Chew, S.Y., Current applications and future perspectives of artificial nerve conduits, *Experimental Neurology*, 223, 86-101, **2010**.
- [22] Ferrara, G., Nuova Selva di Chirurgia Divisia tre Parti. Venice, Italy, S Combi, **1608**.
- [23] Huber, G.C., A study of the operative treatment for loss of nerve substance in peripheral nerves. *Journal of Morphology*, 11, 629-735, **1895**.
- [24] Belkas, J.S., Shoichet, M.S., Midha R., Axonal guidance channels in peripheral nerve regeneration, *Operative Techniques in Orthopaedics*, 14, 190-198, **2004**.
- [25] Millessi, H., Techniques for nerve grafting. *Hand Clinics*, 16, 73-91, **2000**.
- [26] Yan, Q., Yin, Y., Li, B., Use new PLGL-RGD-NGF nerve conduits for promoting peripheral nerve regeneration, *Biomedical Engineering Online*, 11, 36, **2012**.
- [27] Biomaterial Scaffold, <http://bme240.eng.uci.edu/students/06s/jdiomamp/biomaterial.htm> (Temmuz, **2013**)
- [28] Cooper, A., Bhattarai, N., Zhang, M., Fabrication and cellular compatibility of aligned chitosan–PCL fibers for nerve tissue regeneration, *Carbohydrate Polymers*, 85, 149-156, **2011**.
- [29] Madison, R.D., Archibald, S.J., Krarup, C., Peripheral nerve injury. *Wound Healing: Biochemical and Clinical Aspects*, (eds: Cohen, I.K., Diegelmann, R.F., Lindblad, W.J.) Saunders, Philadelphia, 450-489, **1992**.
- [30] Huang, W., Begum, R., Barber, T., Ibba, V., Tee, N.C., Hussain, M., Arastoo, M., Yang, Q., Robson, L.G., Lesage, S., Gheysens, T., Skaer, N.J., Knight, D.P., Priestley, J.V., Regenerative potential of silk conduits in repair of peripheral nerve injury in adult rats, *Biomaterials*, 33, 59-71, **2012**.
- [31] Pabari, A., Yang, S.Y., Seifalian, A.M., Mosahebi, A., Modern surgical management of peripheral nerve gap, *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, 63, 1941-1948, **2010**.
- [32] Shan, K.H., *Polymeric Nanofiber Conduits for Peripheral Nerve Regeneration*, Doktora Tezi, National University of Singapore, Graduate School for Integrative Sciences and Engineering, Singapore, **2009**.
- [33] Nair, L.S., Laurencin, C.T., Polymers as biomaterials for tissue engineering and controlled drug delivery. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 102, 47-90, **2006**.
- [34] Wang, S., Cai, L., Polymers for Fabricating Nerve Conduits, *International Journal of Polymer Science*, 1-20, **2010**.
- [35] Chiono, V., Tonda-Turo, C., Ciardelli, G., Artificial scaffolds for peripheral nerve reconstruction, *International Review of Neurobiology*, 87, 173-198, **2009**.
- [36] Ciardelli, G., Chiono, V., Materials for peripheral nerve regeneration, *Macromolecular Bioscience*, 6, 13-26, **2006**.

- [37] Yao, L., de Ruiter, G.C., Wang, H., Knight, A.M., Spinner, R.J., Yaszemski, M.J., Windebank, A.J., Pandit, A., Controlling dispersion of axonal regeneration using a multichannel collagen nerve conduit, *Biomaterials*, 31, 5789-5797, **2010**.
- [38] Nisbet, D.R., Crompton, K.E., Horne, M.K., Finkelstein, D.I., Forsythe, J.S., Neural tissue engineering of the CNS using hydrogels, *Journal of Biomedical Material Research Part B*, 87, 251-263, **2008**.
- [39] Jansen, K., van der Werff, J.F., van Wachem, P.B., Nicolai, J. P., de Leij, L.F., van Luyn, M.J., A hyaluronan-based nerve guide: *in vitro* cytotoxicity, subcutaneous tissue reactions, and degradation in the rat, *Biomaterials*, 25, 483-489, **2004**.
- [40] Yang, Y., Ding, F., Wu, J., Hu, W., Liu, W., Liu, J., Gu, X., Development and evaluation of silk fibroin-based nerve grafts used for peripheral nerve regeneration, *Biomaterials*, 28, 5526-5535, **2007**.
- [41] Stang, F., Keilhoff, G., Fansa, H., Biocompatibility of Different Nerve Tubes, *Materials*, 2, 1480-1507, **2009**.
- [42] Ghasemi-Mobarakeh, L., Prabhakaran, M.P., Morshed, M., Nasr-Esfahani, M.H., Ramakrishna, S., Bio-functionalized PCL nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering, *Materials Science and Engineering C*, 30, 1129-1136, **2010**.
- [43] Kanani, A.G., Bahrami, S.H., Effect of changing solvents on poly(ϵ -caprolactone) nanofibrous webs morphology, *Journal of Nanomaterials*, 1-10, **2011**.
- [44] Polycaprolactone, http://www.sigmaaldrich.com/medium/structureimages/05/a_____704105.png (Temmuz, **2013**).
- [45] Chung, T.W., Yang, M.C., Tseng, C.C., Sheu, S.H., Wang, S.S., Huang, Y.Y., Chen, S.D., Promoting regeneration of peripheral nerves in-vivo using new PCL-NGF/Tirofiban nerve conduits, *Biomaterials*, 32, 734-743, **2011**.
- [46] Yang, X., Wang, H., Electrospun Functional Nanofibrous Scaffolds for Tissue Engineering, *Tissue Engineering*, (ed: Eberli, D.), InTechOpen, 159-178, **2010**.
- [47] Subramanian, A., Krishnan U.M., Sethuraman, S., Development of biomaterial scaffold for nerve tissue engineering: Biomaterial mediated neural regeneration, *Journal of Biomedical Science*, 16, 108, **2009**.
- [48] Huang, Z.M., Zhang, Y.Z., Kotaki, M., Ramakrishna, S., A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites, *Composites Science and Technology*, 63, 2223-2253, **2003**.
- [49] Nayak, R., Kyratzis, I.L., Truong, Y.B., Padhye, R., Arnold, L., Recent advances in nanofibre fabrication techniques, *Textile Research Journal*, 82, 129-147, **2012**.
- [50] Ondarcuhu, T., Joachim, C., Drawing a single nanofiber over hundreds of microns, *Europhysics Letters*, 42, 215-218, **1998**.
- [51] Tao, S.L., Desai, T.A., Aligned arrays of biodegradable poly(ϵ -caprolactone) nanowires and nanofibers by template synthesis. *Nano Letters*, 7, 1463-1468, **2007**.
- [52] Zhang, Z., Hu, J., Ma, P.X., Nanofiber-based delivery of bioactive agents and stem cells to bone sites, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 1129-1141, **2012**.

- [53] Cui, H., Webber, M.J., Stupp, S.I., Self-assembly of peptide amphiphiles: from molecules to nanostructures to biomaterials, *Biopolymers*, 94, 1-18, **2010**.
- [54] Dahlin, R.L., Kasper, F.K., Mikos, A.G., Polymeric nanofibers in tissue engineering, *Tissue Engineering Part B Reviews*, 17, 349-364, **2011**.
- [55] Bhardwaj, N., Kundu, S.C., Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique, *Biotechnology Advances*, 28, 325-347, **2010**.
- [56] Cooley, J.F., Apparatus for electrically dispersing fluids, US Patent Specification 692631, **1902**.
- [57] Morton, W.J., Method of dispersing fluids, US Patent Specification 705691, **1902**.
- [58] Formhals, A., Process and apparatus for preparing artificial threads, US patent, 1,975,504, **1934**.
- [59] Formhals, A., Production of artificial fibers from fiber forming liquids, US patent, 2,323,025, **1943**.
- [60] Taylor, G., Electrically driven jets, *The Royal Society of London Proceedings Series A Mathematical Physical and Engineering Sciences*, 313, 453-475, **1969**.
- [61] Garg, K., Bowlin, G.L., Electrospinning jets and nanofibrous structures, *Biomicrofluidics*, 5, 013403, **2011**.
- [62] Doshi, J., Reneker, D.H., Electrospinning process and applications of electrospun fibers, *Journal of Electrostatics*, 35, 151-160, **1995**.
- [63] Reneker, D.H., Chun, I., Nanometer diameter fibres of polymer, produced by electrospinning, *Nanotechnology*, 7, 216-223, **1996**.
- [64] Reneker, D.H., Yarin, A.L. Electrospinning jets and polymer nanofibers, *Polymer*, 49, 2387-2425, **2008**.
- [65] Kidoaki, S., Kwon, I.K., Matsuda, T., Mesoscopic spatial designs of nano and microfiber meshes for tissue-engineering matrix and scaffold based on newly devised multilayering and mixing electrospinning techniques, *Biomaterials*, 26, 37-46, **2005**.
- [66] Stankus, J.J., Guan, J., Fujimoto, K., Wagner, W.R., Microintegrating smooth muscle cells into a biodegradable, elastomeric fiber matrix, *Biomaterials*, 27, 735-474, **2006**.
- [67] Murugan, R., Ramakrishna, S., Design strategies of tissue engineering scaffolds with controlled fiber orientation, *Tissue Engineering*, 13, 1845-1866, **2007**.
- [68] Yu, W., Zhao, W., Zhu, C., Zhang, X., Ye, D., Zhang W., Zhou Y., Jiang X., Zhang Z., Sciatic nerve regeneration in rats by a promising electrospun collagen/poly(epsilon-caprolactone) nerve conduit with tailored degradation rate, *BMC Neuroscience*, 12, 68, **2011**.
- [69] Panseri, S., Cunha, C., Lowery, J., Carro, U.D., Taraballi, F., Amadio, S., Vescovi, A., Gelain, F., Electrospun micro- and nanofiber tubes for functional nervous regeneration in sciatic nerve transections, *BMC Biotechnology*, 8, 39-50, **2008**.
- [70] Hwang, D.S., Sim, S.B., Cha, H.J., Cell adhesion biomaterial based on mussel adhesive protein fused with RGD peptide, *Biomaterials*, 28, 4039-4046, **2007**.
- [71] Murtomaki-Repo S., *The role of laminin in development, regeneration and injuries of the nervous system*, Doktora Tezi, University of Helsinki, Faculty of Medicine, Institute of Biomedicine, Helsinki, **2000**.

- [72] Zhang, P., Wu, H., Lu, Z., Deng, C., Hong, Z., RGD-conjugated copolymer incorporated into composite of poly(lactide-co-glycolide) and poly(L-lactide)-grafted nanohydroxyapatite for bone tissue engineering, *Biomacromolecules*, 12, 2667-2680, **2011**.
- [73] Ananthanarayanan, B., Little, L., Schaffer, D.V., Healy, K.E., Tirrell, M., Neural stem cell adhesion and proliferation on phospholipid bilayers functionalized with RGD peptides, *Biomaterials*, 31, 8706-8715, **2010**.
- [74] Bellis, S.L., Advantages of RGD peptides for directing cell association with biomaterials, *Biomaterials*, 32, 4205-4210, **2011**.
- [75] Hersel, U., Dahmen, C., Kessler, H., RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond, *Biomaterials*, 24, 4385-4415, **2003**.
- [76] Zheng, W., Wang, Z., Song, L., Zhao, Q., Zhang, J., Li, D., Wang, S., Han, J., Zheng, X.L., Yang, Z., Kong, D., Endothelialization and patency of RGD-functionalized vascular grafts in a rabbit carotid artery model, *Biomaterials*, 33, 2880-2891, **2012**.
- [77] Wang, Z., Wang, H., Zheng, W., Zhang, J., Zhao, Q., Wang, S., Yang, Z., Kong, D., Highly stable surface modifications of poly(3-caprolactone) (PCL) films by molecular self-assembly to promote cells adhesion and proliferation, *Chemical Communications*, 47, 8901-8903, **2011**.
- [78] 21 Gauge Needle, Hamilton, <http://www.hamiltoncompany.com/item/view/c/376/p/1918/> (Temmuz, **2013**)
- [79] Nicoli Aldini, N., Fini, M., Rocca, M., Giavaresi, G. Giardino, R., Guided regeneration with resorbable conduits in experimental peripheral nerve injuries, *International Orthopaedics*, 24, 121-125, **2000**.
- [80] Rutkowski, G.E., Heath, C.A., Development of a bioartificial nerve graft. II. Nerve regeneration in vitro, *Biotechnology Progress*, 18, 373-379, **2002**.
- [81] Nectow, A.R., Marra, K.G., Kaplan, D.L., Biomaterials for the development of peripheral nerve guidance conduits, *Tissue Engineering Part B Reviews*, 18, 40-50, **2012**.
- [82] Hsu, S.H., Chan, S.H., Chiang, C.M., Chen C.C., Jiang, C.F.. Peripheral nerve regeneration using a microporous polylactic acid asymmetric conduit in a rabbit long-gap sciatic nerve transection model, *Biomaterials*, 32, 3764-3775, **2011**.
- [83] Liu, G.Y., Zhang, Q., Jin, Y., Gao, Z.L., Stress and strain analysis on the anastomosis site sutured with either epineurial or perineurial sutures after simulation of sciatic nerve injury, *Neural Regeneration Research*, 7, 2299-2304, **2012**.
- [84] Pooria G., Moghadam T.T., Ranjbar B., Differential scanning calorimetry techniques: applications in biology and nanoscience, *Journal of Biomolecular Techniques*, 21, 167-193, **2010**.
- [85] Hezi-Yamit, A., Sullivan, C., Wong, J., David, L., Chen, M., Cheng, P., Shumaker, D., Wilcox, J.N., Udipi, K., Impact of polymer hydrophilicity on biocompatibility: implication for DES polymer design, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 90, 133-141, **2009**.
- [86] Menzies, K.L., Jones, L., The impact of contact angle on the biocompatibility of biomaterials, *Optometry & Vision Science*, 87, 387-399, **2010**.

- [87] Brown S.A., Lemons, J.E., Mateo, N.B., New Products and Standards, *Biomaterials Science, An Introduction to Materials in Medicine*, (eds: Ratner B.D., Hoffman, A.S., Schoen, F.J., Lemons, J.E.), Elsevier Academic Press, New York, 457-464, **2004**.
- [88] Griffin, J., Delgado-Rivera, R., Meiners, S., Uhrich, K.E., Salicylic acid-derived poly(anhydride-ester) electrospun fibers designed for regenerating the peripheral nervous system, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 97, 230-242, **2011**.
- [89] Yingsukwattana, K., Agthong, S., Mongkonnarin, R., Tabata, Y., Kanokpanont, S., Development of a protein-filled conduit for peripheral nerve regeneration, *Advanced Materials Research*, 55-57, 701-704, **2008**.
- [90] Angius, D., Wang, H., Spinner, R.J., Gutierrez-Cotto, Y., Yaszemski, M.J., Windebank, A.J., A systematic review of animal models used to study nerve regeneration in tissue-engineered scaffolds, *Biomaterials*, 33, 8034-8039, **2012**.
- [91] Zhang, D., Karki, A.B., Rutman, D., Young, D.P., Wang, A., Cocke, D., Ho, T.H., Guo, Z.H., Electrospun polyacrylonitrile nanocomposite fibers reinforced with Fe₃O₄ nanoparticles: fabrication and property analysis, *Polymer*, 50, 4189-4198, **2009**.
- [92] Qi, H., Hu, P., Xu, J., Wang A., Encapsulation of drug reservoirs in fibers by emulsion electrospinning: morphology characterization and preliminary release assessment, *Biomacromolecules*, 7, 2327-2330, **2006**.
- [93] Meek, M.F., Robinson, P.H., Stokroos, I., Blaauw, E.H., Kors, G., den Dunnen, W.F., Electronmicroscopical evaluation of short-term nerve regeneration through a thin-walled biodegradable poly(DLLA-epsilon-CL) nerve guide filled with modified denatured muscle tissue, *Biomaterials*, 22, 1177-1185, **2001**.
- [94] Simon, D., Shanks, R.A., Poly(caprolactone) thin film preparation, morphology and surface texture, *Journal of Applied Polymer Science*, 103, 1287-1294, **2007**.
- [95] Meek, M.F., Den Dunnen W.F., Schakenraad, J.M., Robinson, P.H., Long-term evaluation of functional nerve recovery after reconstruction with a thin-walled biodegradable poly (DL-lactide-epsilon-caprolactone) nerve guide, using walking track analysis and electrostimulation tests, *Microsurgery*, 19, 247-253, **1999**.
- [96] Rangappa, N., Romero, A., Nelson, K.D., Eberhart, R.C., Smith, G.M., Laminin-coated poly(L-lactide) filaments induce robust neurite growth while providing directional orientation, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 51, 625-634, **2000**.
- [97] Lundborg, G., Dahlin, L., Dohi, D., Kanje, M., Terada, N., A new type of "bioartificial" nerve graft for bridging extended defects in nerves, *The Journal of Hand Surgery: British Volume*, 22, 299-303, **1997**.
- [98] Smeal, R.M., Rabbitt, R., Biran, R., Tresco, P.A., Substrate curvature influences the direction of nerve outgrowth, *Annals of Biomedical Engineering*, 33, 376-382, **2005**.
- [99] Wen, X., Tresco, P.A., Effect of filament diameter and extracellular matrix molecule precoating on neurite outgrowth and Schwann cell behavior on multifilament entubulation bridging device in vitro, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 76, 626-637, **2006**.

- [100] Borschel, G.H., Kia, K.F., Kuzon, W.M. Jr., Dennis, R.G., Mechanical properties of acellular peripheral nerve, *Journal of Surgical Research*, 114, 133-139, **2003**.
- [101] Sun, M., Downes, S., Physicochemical characterisation of novel ultra-thin biodegradable scaffolds for peripheral nerve repair, *The Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 20, 1181-1192, **2009**.
- [102] Krarup, C., Archibald, S.J., Madison, R.D., Factors that influence peripheral nerve regeneration: an electrophysiological study of the monkey median nerve, *Annals of Neurology*, 51, 69-81, **2002**.
- [103] Harley, B.A., Spilker, M.H., Wu, J.W., Asano, K., Hsu, H.P., Spector, M., Yannas, I.V., Optimal degradation rate for collagen chambers used for regeneration of peripheral nerves over long gaps, *Cells Tissues Organs*, 176,153-165, **2004**.
- [104] Quan, D., Bird, S.J., Nerve conduction studies and electromyography in the evaluation of peripheral nerve injuries, *The University of Pennsylvania Orthopaedic Journal*, 12, 45-51, **1999**.
- [105] Wang, W., Itoh, S., Matsuda, A., Ichinose, S., Shinomiya, K., Hata, Y., Tanaka, J., Influences of mechanical properties and permeability on chitosan nano/microfiber mesh tubes as a scaffold for nerve regeneration, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 84, 557-566, **2008**.
- [106] Nair, L.S., Laurencin, C.T., Biodegradable polymers as biomaterials, *Progress in Polymer Science*, 32, 762-798, **2007**.
- [107] Ehrenstein, G.W., *Polymeric Materials: Structure, Properties, Applications*, Hanser Gardner Publications, Munich, 67-78, **2001**.
- [108] Carraher, C.E., Seymour, R.B., *Seymour/Carraher's Polymer Chemistry*, CRC Press, New York, 43-45, **2003**.
- [109] Menges, G., Haberstroh, E., Michaeli, W., Schmachtenberg, E., *Plastics Materials Science*, Hanser Verlag, Munich, 68-70, **2002**.
- [110] Yin, Y., Yan, Q., Yan, Y., Chen, X., Li, S., In vitro biocompatibility assessment of a novel PRGD/PDLLA/NGF composite material, *Journal of Wuhan University of Technology-Materials Science Edition*, 26,1059-1063, **2011**.
- [111] Xiao, W., Hu, X.Y., Zeng, W., Huang, J.H., Zhang, Y.G., Luo, Z.J., Rapid sciatic nerve regeneration of rats by a surface modified collagen-chitosan scaffold, *Injury*, 44, 941-946, **2013**.
- [112] Williams, L.R., Longo, F.M., Powell, H.C., Lundborg, G., Varon, S., Spatial-temporal progress of peripheral nerve regeneration within a silicone chamber: parameters for a bioassay, *The Journal of Comparative Neurology*, 218, 460-470, **1983**.
- [113] Gingras, M., Bergeron, J., Déry, J., Durham, H.D., Berthod, F., In vitro development of a tissue-engineered model of peripheral nerve regeneration to study neurite growth, *The Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB) Journal*, 17, 2124-2126, **2003**.
- [114] Sondell, M., Sundler, F., Kanje, M., Vascular endothelial growth factor is a neurotrophic factor which stimulates axonal outgrowth through the flk-1 receptor, *European Journal of Neuroscience*, 12, 4243-4254, **2000**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Erdinç Polat
Doğum Yeri : Ankara / Altındağ
Medeni Hali : Bekar
E-posta : erdincpolat@hacettepe.edu.tr
Adresi : Tunahan Mah. Öztaş Sitesi 17660 Ada No: 8/11 4.Etap
Eryaman - Ankara

Eğitim

Lise : 2001-2005 Yenimahalle Y.D.A. Mustafa Kemal Lisesi
Lisans : 2005-2010 Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji
Bölümü
Yüksek Lisans : 2010-2013 Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri
Enstitüsü Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı

Yabancı Dil ve Düzeyi : İngilizce (İleri Seviye), Çince (Başlangıç)

İş Deneyimi

-

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

-

Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

Deneyim Alanları : Nanobiyomalzemeler, Sinirbilim

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu İle Katıldığı Toplantılar

- **Production of RGD Coated PCL Nerve Conduits by Electrospinning**
18. Uluslararası Biyomedikal Bilim & Teknoloji Sempozyumu
10.09 - 13.09.2012, Tokat - Türkiye
- **RGD Coated PCL Nerve Regeneration Conduits**
TERMIS - EU 2013, 17.06 - 20.06.2013, İstanbul - Türkiye