

**SİNİR DOKU MÜHENDİSLİĞİ İÇİN İLETKEN
POLİ(GLİSEROL-SEBAKAT) KOMPOZİTLERİNİN
GELİŞTİRİLMESİ**

**DEVELOPMENT OF CONDUCTIVE POLY(GLYCEROL-
SEBACATE) COMPOSITES FOR NEURAL TISSUE
ENGINEERING**

BENGİSU TOPUZ

PROF. DR. HALİL MURAT AYDIN

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

Canım Annem ve Babam'a

ÖZET

SİNİR DOKU MÜHENDİSLİĞİ İÇİN İLETKEN POLİ(GLİSEROL-SEBAKAT) KOMPOZİTLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

BENGİSU TOPUZ

Yüksek Lisans, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Halil Murat AYDIN

Ocak 2021, 163 sayfa

Periferik sinir yaralanması yaygın bir klinik sorundur ve hastaların yaşam kalitesini etkilemektedir. Geleneksel tedavi yöntemleri sinir hasarlarının giderilmesinde yetersiz kalması araştırmacıların doku mühendisliği alanına daha fazla odaklanmasını sağlamıştır. Periferik sinir yaralanmalarına yönelik geliştirilen sinir kondüitleri dokuya göre ayarlanabilen iskele özellikleri, hücresel olayları desteklemeleri, kolay erişilebilir olmaları gibi nedenlerden dolayı tercih edilmektedir. Bu tez çalışması periferik sinir yaralanmalarında sinir hasarlarının giderilmesini sağlayarak sinir rejenerasyonunu arttırıp doku bütünlüğünü korumayı amaçlamıştır. Bu doğrultuda yüzey desenli poli(gliserol-sebakat) (PGS) elastomerinin iletken materyallerle birleştirilerek sinir doku mühendisliğinde etkinliği değerlendirilmiştir. Çalışmanın ilk aşamasında PGS elastomeri sentezlenmiş ve özelliklerinin sinir dokuya uygunluğu ayarlanmıştır. İkinci olarak elastomer yüzeyine CO₂ lazer ile mikro kanallar oluşturulmuştur. Bu kanallar sinir hücrelerinin yönlenmesini sağlamak açısından oldukça önemlidir. Sinir hücrelerini desteklemesi amacıyla PGS elastomeri karbon nanofiber (KNF) ve magnezyum (Mg) alaşımı ile birleştirilmiştir. KNF, elastomerle birleştirilmesi için fonksiyonelleştirilmiş, bu işlemin KNF'nin özelliklerini iyileştirdiği belirlenmiştir. İki farklı AZ31 Mg alaşımı

çeşitli karakterizasyon testlerine tabi tutularak yapısal ve hücresele özellikleri daha iyi olan alaşım seçilmiştir. Optimize edilen iletken materyaller kullanılarak kompozit doku iskeleleri üretilerek çeşitli karakterizasyon testleri ile etkinlikleri değerlendirilmiştir. Buna göre iletken materyal katkısının PGS elastomerinin özelliklerinin sinir dokuya uygun olarak iyileştirildiği tespit edilmiştir. Çalışmanın son aşaması PC12 hücre hattı ve S42 hücre hattı ile yapılan *in vitro* çalışmaları kapsamaktadır. Buna göre iki hücre hattıyla yapılan çalışmada da doku iskeleleri üzerinde hücre proliferasyonunda artış gözlemlenmiş olup bu sonuç çeşitli boyama yöntemleri ve SEM analizi ile doğrulanmıştır. Özellikle PGS elastomerine Mg alaşımının katkısı hücre canlılığını olumlu yönde etkilemiştir. Sunulan bu tez çalışmasında yapılan bütün deneylerin sinir doku mühendisliği çalışmaları için önemli bir katkı olacağına inanılmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Periferik Sinir Yaralanmaları, PGS, Mikro Kanal, CO₂ Lazer, Karbon Nanofiber, Magnezyum, Schwann.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF CONDUCTIVE POLY(GLYCEROL-SEBACATE) COMPOSITES FOR NEURAL TISSEU ENGINEERING

BENGİSU TOPUZ

Master Degree, Bioengineering Division

Supervisor: Prof. Dr. Prof. Dr. Halil Murat AYDIN

January 2021, 163 pages

Peripheral nerve injury is a common clinical problem and affects the quality of patient life. The inadequacy of traditional restoration methods in treating nerve injuries has enabled researchers to focus more on tissue engineering. Nerve conduits developed for peripheral nerve injuries are preferred for reasons such as scaffolding properties that can be adjusted according to the tissue, support cellular events, and easy accessibility. This thesis study aimed to prevent nerve damage in peripheral nerve injuries by increasing nerve regeneration and preserving tissue integrity. Accordingly, the efficiency of surface patterned poly(glycerol-sebacate) (PGS) elastomer in nerve tissue engineering was evaluated by combining with conductive materials. First, PGS elastomer was synthesized and its properties were adjusted to fit the nerve. Secondly, micro channels were created on the elastomer surface with a CO₂ laser. These channels are very important in terms of directing the nerve cells. PGS elastomer is combined with carbon nanofiber (CNF) and Magnesium (Mg) alloy to support nerve cells. CNF has been subjected to a functionalization process for combining with elastomer and it has been determined that this process improved the properties of CNF. Two different AZ31 Mg alloys were

subjected to various characterization tests and the alloy with better structural and cellular properties was selected. Composite tissue scaffolds were produced using optimized conductive materials and their effectiveness was evaluated with various characterization tests. Accordingly, it has been determined that the conductive material additive improves the properties of the PGS elastomer compared to the nerve tissue. The final phase of the study includes *in vitro* studies with the PC12 cell line and the S42 cell line. Accordingly, both cell lines observed an increase in cell proliferation on tissue scaffolds, this data was confirmed by various staining methods and SEM analysis. Particularly, the contribution of the Mg alloy to the PGS elastomer has significantly affected the cellular behaviour. It is believed that all experiments performed in this presented thesis will be an important contribution to neural tissue engineering studies. Finally, it includes *in vitro* studies with the PC12 and the S42 cell lines. With the recruited cell lines, an increase in cell proliferation was observed and the outcomes were confirmed by various staining methods and SEM analysis. Particularly, the contribution of Mg alloy to PGS elastomer positively affected cell viability. It is believed that all experiments performed in this presented thesis will be an important contribution to neural tissue engineering studies.

Keywords: Peripheral Nerve Injuries, PGS, Micro Channel, CO₂ laser, Carbon Nanofiber, Magnesium, Schwann.

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca bilgi ve deneyimleri ile her zaman yol gösteren, gerekli koşulları özveriyle sağlayan, bana güvenen, konulara yenilikçi bir bakış açısı ile yaklaşmamı öğreten, problemleri omuzlamamda bana her zaman yardımcı olan ve desteğini bir gün bile esirgemeyen saygıdeğer hocam Prof. Dr. Halil Murat Aydın'a

2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında çalışmalarına verdiği destek için TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na,

Tez çalışmamı 'Sinir Doku Mühendisliği İçin İletken Poli(Gliserol-Sebakat) Kompozitlerinin Geliştirilmesi' adlı ve 17399 nolu Lisansüstü Tez Projesi kapsamında destekleyen Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Çocukluğumdan beri üzerime titreyen, emeklerini asla ödeyemeyeceğim, bütün hayatlarını bana adayan, benimle beraber üzülp benimle beraber sevinen, hücrelerimi benimle beraber takip eden tez çalışmamın asıl kahramanları annem Türkan Topuz'a, babam Mehmet Yusuf Topuz'a, her zaman idolüm olacak abim Mustafa Topuz, yengem Semra Topuz'a, evimizin biricigi Eymen Topuz'a ve bütün Topuz ailesine,

Belki de bana bu eğitimin en kıymetli hediyesi olan beraber bilim dünyasında kaybolduğum, zorlukları beraber göğüsleyip beraber çözümlediğim yol arkadaşım Melih Zeki Yıldırım ve değerli Yıldırım ailesine,

Her zaman varlıklarına şükrettiğim, bütün bu süreçte yanımda olan yılların eskitemediği kadim dostlarım Gizem Uğur ve Beste Saf'a,

Bana laboratuvar çalışma disiplini öğreten, mücadele etmenin ne olduğunu gösteren, gece-gündüz demeden her koşulda çalıştığımız sevgili Atakan Tevlek'e

Laboratuvarı evim gibi yapan desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen zor zamanların en büyük destekçileri laboratuvar ailem değerli dostlarım Gülçin Günel Karataş, Gizem Zihna ve Ahsen Seyrek'e,

Her zaman desteklerini hissettiğim İpek Akyılmaz, Gülgün Aylaz, Yağız Demir, Meltem Aydın ve diğer laboratuvar arkadaşlarıma,

Tez çalışmam boyunca destekleri ve sunduğu imkânlar için başta Sayın Levent Mete ÖZGÜRBÜZ'e, destekleri ve dostlukları için Ezgi Güler, Gizem Paracı'ya ve bütün BMT Calsis Sağlık Teknolojileri Sanayi Ticaret A.Ş çalışanlarına,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bengisu TOPUZ

Ocak 2021, Ankara

İÇİNDEKİLER

ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 Merkezi Sinir Sistemi	4
2.1.1 Periferik Sinir Sistemi	5
2.2 Periferik Sinir Yaralanmaları	5
2.3 PSS yaralanmalarına Yönelik Mevcut Tedavi Yaklaşımları.....	6
2.4 Sinir Konduitlerinde Kullanılan Materyaller.....	8
2.4.1 Poli(gliserol-sebakat) (PGS)	11
2.5 Hücre İskelesi Üretiminde Kullanılan Elastomerlerin Mikro Kanal Yapıları.....	12
2.6 İletken Malzemelerin Sinir Doku Mühendisliğindeki Önemi	13
2.6.1 Karbon Nanofiber (KNF)'lerin Sinir Doku Mühendisliğinde Kullanımı ..	15
2.6.2 Magnezyum (Mg) Alaşımlarının Sinir Doku Mühendisliği Çalışmalarında Kullanımı	16
2.7 Sinir Doku Mühendisliğinde Kullanılan Hücreler	17
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	19
3.1 Poli(gliserol-sebakat) (PGS) Doku İskelesinin Üretimi ve Optimizasyonu.....	19
3.1.1 Farklı Gliserol Derişimlerinin Elastomer Yapısına Etkisi	20
3.1.2 Farklı Çapraz Bağlanma Sürelerinin Elastomer Özelliklerine Etkisi	21
3.1.3 Farklı Çapraz Bağlanma Süresine Sahip PGS Elastomerlerin Karakterizasyonu	21
3.1.4 PGS Elastomeri Alkol Yıkama Methodu Optimizasyonu	27

3.2	CO ₂ Lazer Uygulamasıyla PGS Elastomer Yüzeyinde Mikro Kanalların Oluşturulması ve Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Etkinliğinin Değerlendirilmesi.....	28
3.3	Karbon nanofiber/ PGS Kompozitinin Geliştirilmesi.....	28
3.3.1	Homojen KNF Çözeltisinin Hazırlanması.....	29
3.3.2	Homojen KNF Çözeltisinin Mikro Kanallara Kaplanması ve Karakterizasyonu	32
3.4	Magnezyum/PGS Kompozitinin Geliştirilmesi	34
3.4.1	Magnezyum Alaşımlarının Karakterizasyonu	34
3.4.2	Mg/PGS Kompozitinin Geliştirilmesi	36
3.5	Doku İskelelerinin Karakterizasyonu.....	39
3.5.1	Doku İskelelerinin Morfolojik Olarak Değerlendirilmesi	40
3.5.2	Doku İskelelerinin Mekanik Özelliklerinin İncelenmesi.....	40
3.5.3	Doku İskelelerinin İletkenliğinin Ölçülmesi	40
3.5.4	Doku İskelelerinin Degradasyon Davranışlarının Değerlendirilmesi	40
3.6	<i>In Vitro</i> Çalışmalar.....	41
3.6.1	PC12 Hücre Kültürü	41
3.6.2	S42 Hücre Kültürü.....	44
4.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA	47
4.1	Poli(gliserol-sebakat) (PGS) Doku İskelesinin Üretimi ve Optimizasyonu	47
4.1.1	Farklı Gliserol Derişimlerinin Elastomer Yapısına Etkisi.....	48
4.1.2	Farklı Çapraz Bağlanma Sürelerinin Elastomer Özelliklerine Etkisi.....	51
4.1.3	Farklı Çapraz Bağlanma Süresine Sahip PGS Elastomerlerin Karakterizasyonu	52
4.1.4	PGS Elastomeri Alkol Yıkama Metodu Optimizasyonu.....	66
4.2	CO ₂ Lazer Uygulamasıyla PGS Elastomer Yüzeyinde Mikrokanalların Oluşturulması	68
4.3	Karbon nanofiber/ PGS Kompozitinin Geliştirilmesi.....	71
4.3.1	Homojen KNF Çözeltisinin Hazırlanması.....	71
4.3.2	Homojen KNF Çözeltisinin Mikro Kanallara Kaplanması	89
4.4	Magnezyum/PGS Kompozitinin Geliştirilmesi	92
4.4.1	Magnezyum Alaşımlarının Karakterizasyonu Çalışmaları.....	92

4.4.2	Mg/PGS Kompozitinin Geliştirilmesi.....	105
4.5	Doku İskelelerinin Karakterizasyonu	115
4.5.1	Doku İskelelerinin Morfolojik Olarak Değerlendirilmesi	115
4.5.2	Doku İskelelerinin Mekanik Özelliklerinin İncelenmesi	116
4.5.3	Doku İskelelerinin İletkenliğinin Ölçülmesi.....	118
4.5.4	Doku İskelelerinin Degradasyon Davranışlarının Değerlendirilmesi	120
4.6	<i>In Vitro</i> Çalışmalar	121
4.6.1	PC12 Hücre Kültürü	122
4.6.2	S42 Schwann Hücre Kültürü.....	130
5.	YORUM.....	141
6.	KAYNAKLAR.....	147
5.	EKLER	161
6.	ÖZGEÇMİŞ.....	163

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Periferik sinir anatomisi [5].	5
Şekil 2.2. Periferik sinir yaralanması sonrası dejenerasyon ve rejenerasyon [8].	6
Şekil 4.1. PGS elastomeri sentezinin şematik gösterimi.	47
Şekil 4.2. Farklı gliserol konsantrasyonları içeren PGS malzemeler (A-D elastomerler 12 saat çapraz bağlı: A-1:1, B-1:1,25, C-1:1,5, D-1;1,75; E-H elastomerler 24 saat çapraz bağlı: E-1:1, F-1:1,25, G-1:1,5, H-1;1,75).	49
Şekil 4.3. 10,12 ve 14 saat çapraz bağlanan PGS elastomerlerin fiziksel görünüşleri: 10 saat (A); 12 saat (B); 14 saat (C).	51
Şekil 4.4. PGS elastomerlerine ait FTIR spektrumları: 10 saat (A); 12 saat (B); 14 saat (C).	52
Şekil 4.5. PGS elastomerlerinin termal özelliklerini belirleyen DSC termogramları: 10 saat (A); 12 saat (B); 14 saat (C).	54
Şekil 4.6. PGS elastomerlerine ait temas açısı ölçüm sonuçları: 10 saat (A); 12 saat (B); 14 saat (C).	56
Şekil 4.7. Farklı çapraz bağlanma sürelerine sahip PGS elastomerlerin gerilim-gerinim eğrisi.	58
Şekil 4.8. Farklı çapraz bağlanma sürelerine sahip PGS elastomerlerin çapraz bağ yoğunlukları (n.s. için $p > 0,05$, ** için $p \leq 0,01$).	59
Şekil 4.9. Farklı çapraz bağlanma sürelerine sahip elastomerlerin farklı çözeltiler içerisinde su tutuma kapasitesinin belirlenmesi: Etil alkol (A); DI (B); PBS (C). (n.s. için $p > 0,05$, ** için $p \leq 0,01$).	60
Şekil 4.10. Farklı çapraz bağlanma sürelerine sahip PGS elastomerlerin beş farklı zaman noktasında ağırlık ölçümü sonucunda elde edilen yüzde kütle kaybının karşılaştırılması.	62
Şekil 4.11. 10,12 ve 14 saat çapraz bağlanma süresine sahip PGS elastomerlere ait sitotoksite analizi (** için $p \leq 0,01$, *** için $p \leq 0,001$, **** için $p \leq 0,0001$).	64
Şekil 4.12. 10,12 ve 14 saat çapraz bağlanma süresine sahip PGS elastomerlerine ait sırasıyla faz-kontrast ve apoptoz-nekroz boyamasına ait görüntüler: Kontrol (A-E); 10 saat (B-F); 12 saat (C-G); 14 saat (D-H).	65

Şekil 4.13. 24 saat DMEM besiyerinde bekletilen iskelelerin fiziksel görünümündeki değişim: Kontrol (A), DMEM besiyeri (B), 3 x Döngü (C), 16 saat (D) ve 24 saat (E) alkol yıkaması sonucunda elde edilen görüntülerdir.	67
Şekil 4.14. Farklı genişliklerde kanal yapısına sahip PGS elastomerler: Kanal genişlikleri: 50 µm (A),100 µm (B), 200 µm (C), 500 µm (D), 1 mm (E) ve 2 mm (F).	68
Şekil 4.15. 200 µm ve 500 µm genişlikte kanal içeren PGS elastomerlerinin CNF kaplaması sonrası kanal derinlik ve genişliğinin ölçümü ile ilgili SEM görüntüleri: 200 µm (A-B); 500 µm (C-D).....	69
Şekil 4.16. Lazer parametreleri optimize edilerek oluşturulan 500 µm genişlikte kanal içeren PGS elastomerlerin kanallarına ait SEM görüntüsü: Kanal ölçümleri (A); kanal morfolojisi (B).	70
Şekil 4.17. Farklı çözücüler içerisinde sonikasyona tabi tutulan KNF çözeltilerinin üç farklı zaman noktasında homojenliğinin değerlendirilmesi.	72
Şekil 4.18. Çeşitli organik çözücüler kullanılarak hazırlanan KNF çözeltilerinin mikroskop görüntüleri: tetrahidrofuran (THF, A), izopropanol (IPA, B), Etanol (C), DI (D), Gliserol (E).	73
Şekil 4.19. Kanalları KNF-Gliserol ve 1:1 eş molar KNF:SDS çözeltisi kaplı PGS iskelelerin sitotoksisite grafiği.	75
Şekil 4.20. Farklı uygulama süreleri ile muamele edilen kanal yapısında GelMA-KNF çözeltisi PGS elastomerler; 2 x 90sn (A), 4 x 90 sn (B), 6 x 90 sn (C).	76
Şekil 4.21. Önceki çalışmalarda organik çözücüler kullanılarak hazırlanan KNF çözeltisi ve f-KNF'in suda çözdürülmesi ile hazırlanan çözelti.....	78
Şekil 4.22. Farklı çözücüler kullanılarak hazırlanan CNF çözeltilerinin PGS yüzeyinde bulunan kanallara yüklenmesi sonucunda elde edilen görünüm: (DMA (A), THF (B), IPA (C), Gliserol (D), KNF-SDS (1:1, E), % 95 Etanol (F) ve f-KNF (G))......	79
Şekil 4.23. DI kullanılarak hazırlanan homojen F-KNF çözeltisinin morfolojik incelemesi: Optik mikroskop altında 10X (A), 20X (B) büyütmelemlerde alınan görüntüler; SEM analizinde sonucunda elde edilen görüntüler (C-D).....	80
Şekil 4.24. KNF ve f-KNF'ye ait TGA analiz sonuçları.....	83
Şekil 4.25. Karbon yapıların XPS sonuçları: KNF (A); f-KNF (B).....	85
Şekil 4.26. FTIR spektrumları: f-KNF(A); KNF(B).....	87
Şekil 4.27. PGS ve f-KNF iskelelerinin sitotoksisitesinin alamar mavisi yöntemi ile değerlendirilmesi (** için $p \leq 0,01$,**** için $p \leq 0,0001$)......	88

Şekil 4.28. f-KNF/PGS iskelesine ait sırasıyla faz-kontrast ve apoptoz-nekroz boyamasına ait görüntüler: Kontrol (A-C); f-KNF/ PGS (B-D).....	89
Şekil 4.29. Farklı yöntemlerle f-KNF'nin PGS kanallarına kaplanması: Sıcaklık (A); Vakum (B); Sıcak fan ile kurutma (C).....	90
Şekil 4.30. Kanalları f-KNF kaplı PGS elastomeri SEM görüntüleri ve EDX analizi ..	91
Şekil 4.31. Mg-I'nin morfolojik karakterizasyonu: SEM analizi görüntüleri (A); EDX analizi (B). Mg-K'nın morfolojik karakterizasyonu: SEM analizi görüntüleri (C); EDX analizi (D).....	93
Şekil 4.32. Mg-I (A) ve Mg-K (B) alaşımının XPS spektrumu.....	94
Şekil 4.33. Mg-I ve Mg-K alaşımlarının farklı çözeltiler içerisindeki bozunma davranışının incelenmesi.....	97
Şekil 4.34. Mg-I'ya ait SEM ve EDX analizleri: Mg-I (A); Mg-I-DMEM (B); Mg-I-PBS (C); Mg-I-DI (D); EDX analiz sonuçları (E).....	99
Şekil 4.35. Mg-I'ya ait SEM ve EDX analizleri: Mg-K (A); Mg-K-DMEM (B); Mg-K-PBS (C); Mg-K-DI (D); EDX analiz sonuçları (E).....	100
Şekil 4.36. Mg-I ve Mg-K alaşımların farklı çözeltiler içerisinde % kütle kaybının 28 günlük süreçte incelenmesi.....	101
Şekil 4.37. Mg-I ve Mg-K alaşımların farklı çözeltiler içerisinde 28 günlük degradasyon çalışmasında belirli zaman noktaların ölçülen çözelti pH değerleri.....	102
Şekil 4.38. Mg-I ve Mg-K alaşımların hücreler üzerindeki etkisinin incelenmesi (**** için $p \leq 0,0001$.).....	103
Şekil 4.39. Mg-I ve Mg-K alaşımlarına ait sırasıyla faz-kontrast ve apoptoz-nekroz boyamasına ait görüntüler: Kontrol (A-D); Mg-I (B-E); Mg-K (C-F).....	105
Şekil 4.40. Sıçrama (sputtering) yönteminin şematik gösterimi.....	106
Şekil 4.41. Püskürtme yöntemi ile farklı kalınlıklarda Mg alaşım ile kaplanmış PGS elastomerleri örnekleri; Yüzeyi kaplanmamış PGS (A), 15 μm kalınlıkta Mg alaşım ile kaplanmış elastomer (B), 250 nm kalınlıkla kaplanmış PGS elastomer (C), esnekliğin değerlendirilmesi (D), ve hedef olarak kullanılan Mg alaşımın deney öncesi ve sonrası halleri (E).....	107
Şekil 4.42. Mg alaşım kaplı PGS elastomer yüzeyinde bulunan kanal yapısının SEM görüntüsü; Genel görüntü (A), Kanal genişliğinin ölçülmesi (B).....	108
Şekil 4.43. Farklı sıvı ortamlar içerisinde Mg alaşım kaplı PGS 'nin davranışının incelenmesi.....	109

Şekil 4.44. Silanlama yöntemi ile hazırlanan ön işlemlenmiş, silanlanmış ve silanlanmamış diskler.....	111
Şekil 4.45. İşlem görmemiş Mg-PGS disk ve ısı muamele sonucu elde edilen Mg-PGS-H disk.	112
Şekil 4.46. İşlem görmemiş Mg-PGS disk ve yüzeyi plazma uygulamasına tabi tutulan Mg-PGS-P disk.	113
Şekil 4.47. İşlem görmemiş Mg-PGS disk ve yüzeyi lazer uygulamasına tabi tutulan Mg-PGS-L disk.	114
Şekil 4.48. Mg/PGS kompozitin 3D modellemesi.	115
Şekil 4.49. Geliştirilen doku iskeleleri ve kanallarının SEM görüntüleri: PGS (A); f-KNF/PGS (B); Mg/PGS (C).....	116
Şekil 4.50. Doku iskelelerine ait gerilim-gerinim eğrisi.	117
Şekil 4.51. Doku iskelelerinin dört noktalı prob analizi ile iletkenlik değerlerinin ölçülmesi: İskele-iletkenlik ve iskele-direnç grafikleri (A); Analiz görüntüsü (B). (**** için $p \leq 0,0001$).	119
Şekil 4.52. Germe işlemi sonrasında f-KNF'nin iletkenlik ve direnç değerinin değerlendirilmesi: İskele-iletkenlik ve iskele-direnç grafikleri (A); Analiz görüntüsü (B). (n.s. için $p > 0,05$, ** için $p \leq 0,01$, *** için $p \leq 0,001$).	120
Şekil 4.53. Doku iskelelerinin degradasyon davranışının incelenmesi.	121
Şekil 4.54. PC12 hücrelerinin faz-kontrast mikroskopu ile görüntülenmesi: 1. gün (A); 4. gün (B); 7. gün (C); 10. gün (D); 14. gün (E).	122
Şekil 4.55. PC12 hücrelerinin doku iskeleleri üzerinde hücre canlılıklarının değerlendirilmesi (n.s. için $p > 0,05$, * için $p \leq 0,005$, **** için $p \leq 0,0001$).	123
Şekil 4.56. Doku iskelelerinde hücre morfolojilerinin aşağıdan yukarı 1., 4., 7., 10. ve 14. günlere ait SEM ile görüntüleri: PGS (A-D-G-J-M); f-KNF/PGS (B-E-H-K-N); Mg/PGS (C-F-I-L-O).	125
Şekil 4.57. Doku iskelelerinde hücresel olayların aşağıdan yukarı 1., 4., 7., 10. ve 14. günlerde floresan boya ile incelenmesi: PGS (A-D-G-J-M); f-KNF/PGS (B-E-H-K-N); Mg/PGS (C-F-I-L-O).....	128
Şekil 4.58. Kültürlenmiş Schwann hücre hattının faz kontrast görüntüleri: 24 saat sonra (A); 48 saat sonra (B) ve 4 gün sonra (C).	130
Şekil 4.59. Doku iskelelerinin S42 hücreleri canlılıkları üzerindeki etkisinin incelenmesi.	131

Şekil 4.60. Doku iskelelerinde S42 hücre morfolojilerinin aşağıdan yukarı 1., 4., 7., 10. ve 14. günlerde görüntülenmesi: PGS (A-D-G-J-M); f-KNF/PGS (B-E-H-K-N); Mg/PGS (C-F-I-L-O).....	133
Şekil 4.61. Doku iskelelerinde S42 hücrelerinin floresan boyama ile davranışlarının incelenmesi: PGS (A-D-G-J-M); f-KNF/PGS (B-E-H-K-N); Mg/PGS (C-F-I-L-O).	136
Şekil 4.62. Doku iskelelerinde S42 hücrelerinin aşağıdan yukarı 1., 4., 7., 10. ve 14. günlerde konfokal mikroskobu ile görüntülenmesi: PGS (A-D-G-K); f-KNF/PGS (B-E-H-L); Mg/PGS (C-F-I-M).....	139

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Literatürde kullanılan biyomateryaller ve yöntemler.....	10
Çizelge 2.2. Literatürde bulunan sinir doku çalışmalarında kullanılan iletken materyallere örnekler.....	14
Çizelge 3.1. 1 M sebasik asit ve farklı molar oranlarında gliserol miktarlarının hesaplanması.	20
Çizelge 3.2. GelMA–KNF çözeltisi UV-çapraz bağlanma enerjisi ve farklı çapraz bağlanma süreleri.	31
Çizelge 4.1. Farklı gliserol konsantrasyonları içeren PGS malzemelerin fiziksel özellikleri.....	49
Çizelge 4.2. Farklı gliserol konsantrasyonları içeren PGS malzemelerin 24 saat inkübasyon sonrası ölçülen pH değerleri.	51
Çizelge 4.3. Farklı çapraz bağlanma sürelerine sahip PGS elastomerlerin mekanik test verileri.	58
Çizelge 4.4. Farklı çapraz bağlanma sürelerine sahip PGS elastomerlerin beş farklı zaman noktasında ağırlık ölçümü sonucunda elde edilen yüzde kütle kayıp ve standart sapma değerleri; 10 saat (A), 12 saat (B) ve 14 saat (B) çapraz bağlanma süresine sahip elastomerler.....	62
Çizelge 4.5. Alkol yıkaması sonucu elde edilen iskelelerin 24 saat besiyeri içerisinde bekletilmesi sonucu pH değerleri.	67
Çizelge 4.6. KNF ve f-KNF'ye ait Raman spektrofotometre sonuçları.	81
Çizelge 4.7. KNF ve f-KNF'ye ait elemental birleşimi (%).	86
Çizelge 4.8. Mg-I ve Mg-K alaşımlarının yüzey elemental bileşimi (%).	94
Çizelge 4.9. Doku iskelelerine ait Mekanik test verileri.	117
Çizelge 4.10. Çeşitli türlerin siyatik sinirlerine ait mekanik özellikler.....	118

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

W	Watt
dk	Dakika
sn	Saniye
Mw	Moleküler Ağırlık
d	Yoğunluk
m	Kütle
V	Hacim
mbar	Milibar
M	Molar
g	Gram
cm	Santimetre
nm	Nanometre
°C	Sıcaklık (Santigrat)
mL	Mililitre
µL	Mikrolitre
Tm	Erime Sıcaklığı
Tg	Camsı Geçiş Sıcaklığı
Tc	Kristallenme Sıcaklığı
N	Newton
mm	Milimetre
µm	Mikrometre
E	Young Modulüs
σM	Çekme Mukavemeti

ϵM	Uzama Miktarı
T	Mutlak Sıcaklık
R	Evrensel Gaz Sabitini
J	Joule
K	Kelvin
W_s	Son Ağırlık Değeri
W_i	İlk Ağırlık Değeri
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
M_s	Son Ağırlık Değeri
M_i	İlk Ağırlık Değeri
a/h	Ağırlık/Hacim
a/a	Ağırlık/Ağırlık
h/h	Hacim/Hacim
kV	Kilovolt
g	Yerçekimi
keV	Kiloelektrovolt
Σ	Elektriksel İletkenlik (S/Cm)
T	Kanalların Kalınlıkları (Cm)
I	Akım (A)
V	Voltaj (V)
W	Watt
dk	Dakika
sn	Saniye
Mw	Moleküler Ağırlık
d	Yoğunluk

m	Kütle
V	Hacim
mbar	Milibar
M	Molar
g	Gram
cm	Santimetre
nm	Nanometre
°C	Sıcaklık (Santigrat)
mL	Mililitre
µL	Mikrolitre
Tm	Erime Sıcaklığı

Kısaltmalar

PGS	Poli(Gliserol-Sebakat)
SA	Sebasik Asit
G	Gliserol
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
FTIR	Toplam Reflektansı Azaltılmış Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektrofotometresi
FBS	Fötal Sığır Serum
AA	Antibiyotik- Antimikotik
CO ₂	Karbondioksit
UV	Ultraviyole
MTT	3-(4,5-Dimetiltiyazol2- Y1)-2,5-Difeniltetrazolyum-Bromür
AO	Akridin Oranj

PI	Propidyum İyodür
Au-Pd	Altın-Paladyum
THF	Tetrahidrofuran
DMA	Dimetilasetamid
IPA	İzopropanol
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
KNF	Karbon Nanofiber
GelMA	Jelatin Metakrilat
COOH	Karboksilik Asit
HNO ₃	Nitrik Asit
H ₂ SO ₄	Sülfirik Asit
f-KNF	Fonksiyonelleştirilmiş Karbon Nanofiber
TGA	Termogravimetrik Analiz
XPS	X-Işını Foto Elektron Spektroskopisi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
EDX	Enerji Dağılım Spektrometre
Mg	Magnezyum
BE	Bağlanma Enerjisi
DI	Deiyonize Su
Ar	Argon
EtOH	Etil Alkol
PBS	Fosfat Tamponu
APTES	(3-Aminopropil) Trietoksisilan
NaOH	Sodyum Hidroksit
S	Silan

L929	Fare Fibroblast Hücre Hattı
PC12	Sıçan Adrenal Medulla Nöroendokrin Hücre Hattı
S42	Schwann Hücre Hattı
CMTPX	Celltracker Red
CaAM	Kalsein AM
EthH	Etidyum Homodimer-1
ECM	Ekstrasellüler Matriks
KNT	Karbon Nanotüp
G	Grafit
D	Düzensizlik
Mg-I	İnce Mg
Mg-K	Kalın Mg
ECM	Ekstrasellüler Matriks
PCL	Poli ϵ -Kapolakton
PLLA	Poli L-Laktik Asit
PPy	Polipirol
PANI	Polianilin
PGA	Poliglikolik Asit
PVA	Polivinil Alkol
MgO	Magnezyum Oksit
Mg(OH) ₂	Magnezyum Hidroksit
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
PSS	Periferik Sinir Sistemi
n.s	Anlamlı Olmayan (Not Significant)

1. GİRİŞ

Periferik sinir yaralanmaları (PSS), hasta refahını düşüren ve kalıcı hasarlarla sonuçlanan önemli klinik sorunlardandır. Hasarlı sinir sistemini eski haline getirmek, karmaşık fizyoloji sistemi ve sınırlı rejeneratif kapasite nedeniyle oldukça zordur. Primer onarımın yeterli olmadığı durumlarda başvuru alan allogreftler, immün yanıtı neden olmasa da cerrahi açıdan zorlukları sebebiyle sinir kondüitlerle tedaviye ilgi artmıştır. Bu yaralanmaların hasta refah düzeyinde meydana getirdiği olumsuzluklar bu yaralanmaların giderilmesine yönelik tedavilerin geliştirilmesini gerekli kılmaktadır. Günümüzde PSS tedavisi için birçok tedavi şekli uygulanmakla birlikte tedavi etkinliğini artması için yenilikçi yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu uygulamaların geliştirilmesi için sinir sisteminin yapısı anlaşılmalı ve hasar şekline göre hücrelerin proliferasyonunu teşvik edecek şekilde polimerik kondüitler hazırlanmalıdır.

Literatürde, sentetik veya doğal kaynaklı polimerler, hasar görmüş nöral dokulardaki fonksiyonları eski haline getirmeye yönelik sinir konduiti geliştirmek için bir çözüm olarak değerlendirilmiştir. Doğal doku yapısını en iyi şekilde taklit eden biyobozunur, biyoyumlu, dokuya uygun mekanik özelliklere sahip olan, doku rejenerasyonunu destekleyen bir doku iskelesi geliştirilmesi önemlidir. Özellikle sinir doku için doku iskeleleri ile iletken materyallerin birleştirilmesi malzeme başarısını arttıracak diğer bir adımdır. Doku iskelesi hücre üremesi için uygun mikro çevreyi sağlarken iletken materyaller hücreler arası iletimi destekleyerek hücrel aktivitenin artmasını sağlamaktadır.

Sinir doku mühendisliğine yönelik son yıllarda yapılan çalışmalar yüzey desenli iskelelerin hücrel aktiviteyi arttırdığını göstermiştir. Bu durum özellikle sinir hücrelerinin birbirleri ile etkileşim halinde durarak sinyal iletimi sırasında yönlenme isteğinden kaynaklanmaktadır. Sinir hücreleri bu mikro/nano kanallar sayesinde yönelimlerini arttırarak iletimi hızlandırır. İletimin hızlanması hücre rejenerasyonunu arttırdığı bilinen bir gerçektir.

Doku iskelesinin yanı sıra doku mühendisliği çalışmalarında önem verilen diğer bir unsur hücrelerdir. Periferik sinir yapısında bulunan Schwann hücreleri, sinir doku mühendisliği çalışmalarında da oldukça tercih edilmektedir. Bu hücreler akson rejenerasyonunu artırır ve miyelin oluşumunu hızlandırarak doku iyileştirilmesine yardımcı olurlar. Schwann hücreleri dışında *in vitro* çalışmalarda sinir doku modelleme çalışmalarında çeşitli hücre hatları kullanılmaktadır. Özellikle PC12 hücre hattı bu çalışmalarda en çok tercih edilen hattır. Sinir büyüme faktörü varlığında farklılaşarak sinir hücrelerine dönüşmesi ve nörosekresyon, nörotoksisite gibi çeşitli hücresel olayların takip edilmesi nedeniyle birçok çalışmada kullanılmaktadır.

Bu tez çalışması kapsamında doku iskelesi olarak poli(gliserol sebakat) (PGS) elastomeri üretilmiş ve üretimi sırasında farklı parametreler değerlendirilerek karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Optimize edilen PGS elastomeri yüzeyine sinir hücrelerinin yönelmesini sağlamak amacıyla CO₂ lazer ile mikro kanallar oluşturulmuştur. Kanal genişliği ve lazer parametreleri elastomer yapısına göre optimize edilmiştir. Çalışmada PGS'ye iletkenlik kazandırmak amacıyla iki farklı materyal kullanılmıştır. İlk olarak karbon nanofiber (KNF) kullanılarak PGS ile birleştirilmek amacıyla homojen bir çözelti elde edilmeye çalışılmış, farklı çözelti hazırlama yöntemleri denenerek KNF'nin fonksiyonelleştirilmesine karar verilmiştir. Fonksiyonelleştirme işleminin başarısı çeşitli karakterizasyon testleri ile kontrol edilmiştir. Hazırlanan çözelti kanala belirlenen yöntemle kaplanmıştır. İkinci olarak magnezyum (Mg) alaşımı iletken materyal olarak seçilmiştir. İki farklı kalınlıktaki Mg alaşımlarının etkinlikleri çeşitli analizlerle belirlenmiş, başarılı olan alaşım ile tez çalışması yürütülmüştür. Mg alaşımı PGS elastomeri ile birleştirilmesi için magnetron püskürtme yöntemi kullanılmış, bu yöntem bir dizi modifikasyonun yapılmasını beraberinde getirmiştir. Mg alaşımının PGS elastomeri ile birleştirilmesi sağlandıktan sonra elde edilen üç doku iskelesinin fiziksel, mekanik, kimyasal özellikleri karşılaştırılmış ve iskele etkinlikleri değerlendirilmiştir.

Tez çalışmasının son kısmı *in vitro* çalışmalardan oluşmaktadır. Bu çalışmalar PC12 ve S42 hücre hatları ile yürütülmüştür. Üç doku iskelesi üzerine ekilen iki hücre hattının hücre proliferasyonu, hücre morfolojisi, hücre göçü vb. gibi hücresel olayları çeşitli kantitatif ve kalitatif analizler yapılmıştır. Bu analizler sonucunda hem doku iskelelerinin

hücreler üzerindeki etkisi incelenmiş, hem de hücre hatları arasındaki farklar ortaya konmuştur. Yapılan bu çalışmanın periferik sinir yaralanmalarında kullanılmak üzere yeni fikirlere ışık tutacağı düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

Sinir sistemi, bir organizmanın çevresiyle etkileşime girmesini sağlayan karmaşık bir ağdır. Duyusal bileşenler ile çevreden gelen uyarıyı algılayarak motor bileşenlere ileten ve bu sayede düz kas, kalp ve iskeletin hareketini sağlayan önemli bir sistemdir [1].

Sinir sistemi, diğer hücrelerle yaptıkları sinapslarla vücuttaki elektriksel iletişimi sağlayan sinir hücrelerinden (nöronlar) oluşur. Bu nöronlar uyarılma veya engelleme üzerinde çalışırlar ve sinir hücrelerinin boyutları ve yerleri değişebilse de birbirleriyle olan iletişimlerini işlevlerini belirler. Sinir sistemi üç ana işlemi gerçekleştirir. Öncelikle vücuda gliolar ile duygusal girdiler toplanır. Bu girdiler, duygusal reseptörler yardımıyla beyin ve omuriliğe iletilir. Beyinde verilerin entegrasyonu ile işlenen girdiler, beyin ve omurilikten motor çıktısı adı ile çıkarak vücuda dağılır ve kaslara ve diğer organlara iletilir. Ayrıca sinir sisteminde sinyal iletiminde görev almayan Glia hücreleri bulunmaktadır. Bu hücreler de dokular içinde bulunur ancak miyelinleşme, iyonik düzenleme ve hücre dışı sıvıya yardımcı olmaktadır [2].

Sinir sistemi, vücudun sağ ve sol bölümünde simetrik şekilde bulunan ve vücudu ağ gibi saran bir düzene sahiptir. Genel olarak merkezi ve periferik sinir sistemi olarak ikiye ayrılır. Periferik sinir sistemi ise somatik sinir sistemi (fonksiyonel) ve otonomik (viseral) sinir sistemlerinden oluşmaktadır.

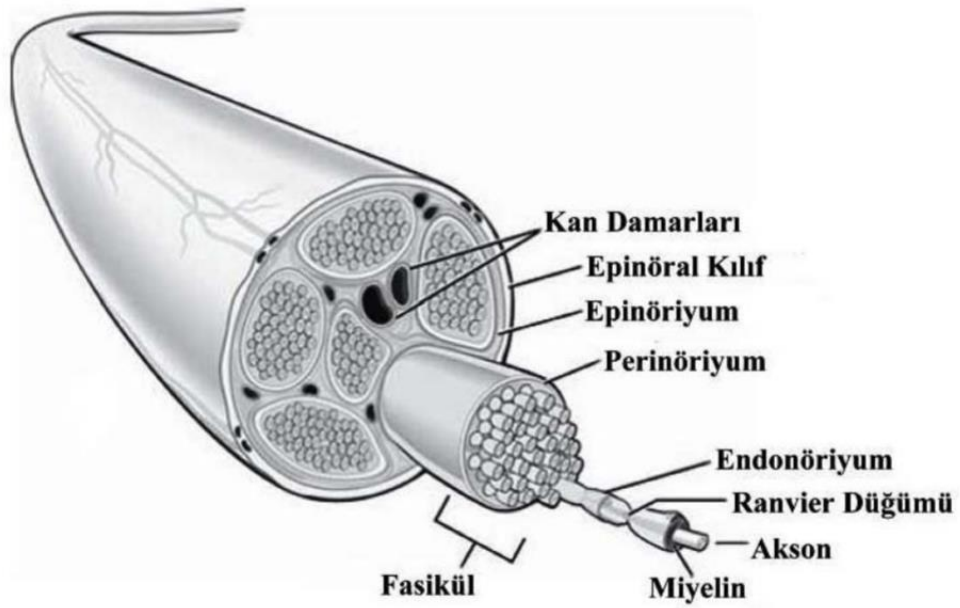
2.1 Merkezi Sinir Sistemi

Merkezi sinir sistemi, omurilik ve beyinden (beyin sapı, serebellum, diensefalonlar ve serebrum) oluşmaktadır. Omuriliğin ve beyin sapının 32 bölümünün hepsine bağlı, duyu sistemindeki ilk bağlantıyı oluşturan ve duygusal bilgiyi merkezi sinir sistemine getiren duygusal gangliyonlardır. Motor aksonlar, omuriliğin 32 bölümünün her birinden ve beyin sapının tüm seviyelerinden çıkar ve merkezi sinir sisteminin vücuttaki tüm kaslara ve organlara bağlar. Omurilikte, beyin sapının çoğunda ve diensefalonda, nöronlar çekirdekler halinde düzenlenmiştir; beyin sapı, serebellum ve serebrumun üst

kollikülüsünde, nöronlar anatomik olarak katmanlar halinde ve fonksiyonel olarak dikey kolonlar halinde dizilmektedirler [3].

2.1.1 Periferik Sinir Sistemi

Beyin ve omurilikten çıkan sinirler vücuda dağılır ve periferik sinir sistemi olarak adlandırılır. Bu sistemin yapısında bulunan aksonlar, sinir liflerinin birleşmesi ile oluşan sinir demetleri vücutta olan sinyalleri merkezi sinir sistemine iletirler. Periferik sinirler, aksonları çevreleyen az sayıda bağ dokusu katmanına sahiptir; tek tek aksonları çevreleyen endonöryum, perinöryum aksonları fasiküllere bağlar ve epinöryum fasikülleri bir sinire bağlar. Sinir demetleri bir yöne yönelimli düzenli yapıda ve kırılıgandır. Yapıda bulunan ve fasiküller arasında yer alan kan damarları sinir demetlerinin beslenmesi açısından önemlidir (Şekil 2.1) [4].



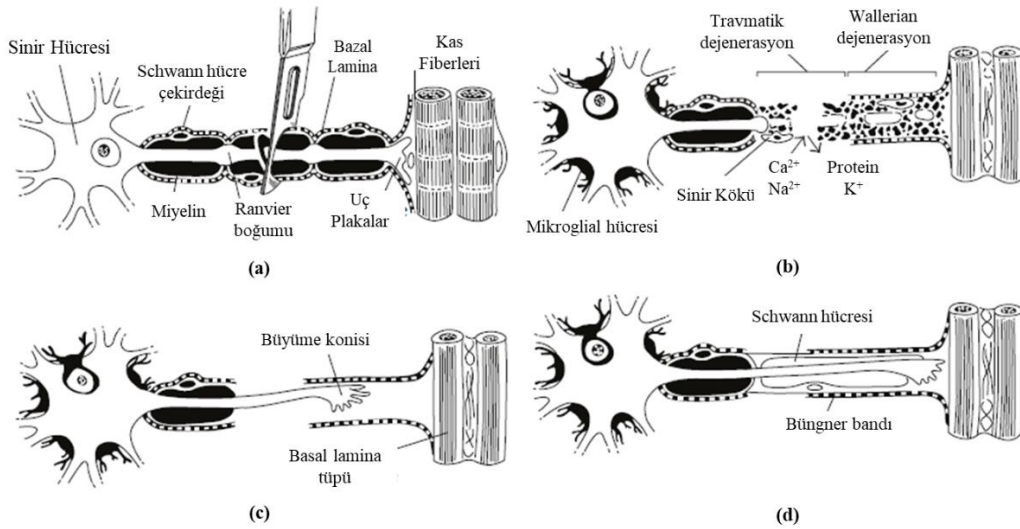
Şekil 2.1. Periferik sinir anatomisi [5].

2.2 Periferik Sinir Yaralanmaları

PSS yaralanmaları sık olarak gözlenen ve sistemik hastalıklar (örn. diyabet), enfeksiyonlar (örn. Lyme hastalığı), motorlu taşıt kazaları, düşmeler, spor gibi doğrudan travma şeklinde veya sinir üzerindeki baskı yaralanmaları, cerrahi müdahaleler gibi

nedenlerden kaynaklanan günümüzde hala çözüm bekleyen bir husustur [6]. Bu yaralanmalar sonucunda ağrı, bozulmuş hassasiyet, kas zayıflığı veya felç gibi birçok durumlar ortaya çıkmakta ve hasta refahını büyük ölçüde etkilemektedir. PSS yaralanmaları için ABD' de yılda yaklaşık 200.000 cerrahi işlemin yapıldığı ve Avrupa'da ise 300.000'e kadar vaka olduğu her yıl raporlanmaktadır [7].

PSS yaralanmalarında sinir yapısındaki aksonların yapısında kopmalar meydana gelir. Bu durumda akson tamamen hasar görürse, sinirin iki ucu geri çekilerek bir boşluğa neden olmaktadır. Proksimal uç, hücre gövdesine bağlı olan uçtur ve uzak uç, serbest yüzen uçtur. Yaralanma, yaralanan sinirin distal güdüğünde Wallerian dejenerasyonuna ve proksimal güdük yakınında aksonal retrograd dejenerasyona yol açar (Şekil.2.2). Wallerian dejenerasyonu periferik sinir hasarından 24-48 saat sonra başlamaktadır ve hem distal aksonlar hem de çevresindeki miyelin dejenere olur. Wallerian dejenerasyonu başladıktan sonra 1 mm/gün hızında yavaş aksonal rejenerasyon gerçekleşir. Yaralanma ve hedef doku arasındaki rejenerasyon mesafesine bağlı olarak iyileşme görülebilir [8].



Şekil 2.2. Periferik sinir yaralanması sonrası dejenerasyon ve rejenerasyon [8].

2.3 PSS yaralanmalarına Yönelik Mevcut Tedavi Yaklaşımları

PSS yaralanmaları için çeşitli tedavi yöntemleri mevcuttur. Bu tedaviler arasından sinir liflerinin doğrudan dikilmesi ile yapılan tedavi biçimidir. Ancak bu mümkün olmadığında

otogreftleme, allogreftleme ve sinir gdklerini kprlemek için sinir yönlendirme kanallarının implantasyonu gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır [9]. Otolog sinir greftleri mevcut standart tedavidir. Bununla birlikte, sınırlı bir donör aynı sıra sinir dokusu kaynağı için iki cerrahi kesi gereklidir ve genellikle tam işlevsel iyileşme elde edilemez. Allogreftler ve ksenograftlar, otogreftlere alternatif olabilir, ancak bunların ana dezavantajı bağışıklık sisteminin yanıtının uyarılmasıdır [10, 11].

PSS yaralanmalarının tedavisinde karşılaşılan bu problemler hasarın giderilmesinde doku mühendisliğine olan ihtiyacı beraberinde getirmiştir. Sinir rejenerasyonundaki son gelişmeler, doku mühendisliği ilkelerinin uygulanmasını ve böylece nöral terapiye yeni bir bakış açısı kazandırılmasını sağlamıştır. Sinir doku mühendisliği ile yapay bir sinir dokunun geliştirilmesi hücre dışı matriksi taklit edebilen bir iskelenin geliştirilmesi, hüresel ve biyolojik faktörlerle doku rejenerasyonunu desteklemesine dayanmaktadır. Doğal hücre dışı matris, nöral hücrelerin yapışması ve çoğalması için topografik, elektriksel ve kimyasal olarak ideal bir ortam sağladığından, biyolojik olarak uyumlu, immünolojik olarak inert, iletken, biyolojik olarak parçalanabilen ve enfeksiyona dirençli sentetik bir yapı iskelesi geliştirmeye ihtiyaç vardır [12].

Sinir konduitleri bu sorunların giderilmesi için son yıllarda yaygın olarak kullanılan bir yaklaşım olmuştur. Konduitler sini rejenerasyonunu destekleyen farklı yapıda iskelelerden oluşan kılavuz kanallardır [9]. Bu iskeleler zarar görmüş dokuyla entegre olabilen ve sinir lifleri bağlantıları eski haline gelene kadar bozulmadan kalabilen ve sonrasında biyolojik olarak parçalanabilen biyomateryallerden yapılması tercih edilmektedir. İdeal biyomateryal, periferik sinirin doğal bağ dokularına karşılıklı gelen özelliklere sahip olmalıdır. Son yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda geliştirilen konduitler, nöronal belirteçleri eksprese eden hücelere farklılaabilen ve sinir yenilenmesine katılabilen hücre bazlı terapi ile birletirilmilerdir [13]. Bunun bu konduitler yanı sıra sinir büyümesi, rejenerasyonu gibi faaliyetleri teşvik etmesi amacıyla sitokinler ve diğer sinyal molekülleri gibi büyüme faktörlerini içerebilmektedir [9].

2.4 Sinir Konduitlerinde Kullanılan Materyaller

Sinir sisteminde görülen hasarlar, gelişmekte olan aksonları hedeflerine doğru yönlendiren ve tek yönlü hizalanmış mimarinin bozulmasından kaynaklanmaktadır. Bu yapının kaybı, aksonların düzensizliğine yol açar. Yapıyı restore etmenin tek yolu tüm morfolojik, kimyasal ve biyolojik ipuçlarına sahip doğal doku mikro ortamını taklit eden ve lezyon boşluğunun yerini alan bir köprü oluşturmaktır [14].

Sinir doku mühendisliğinde sinir grefti üretimi için birçok doğal (kitosan, kitin, kolajen, jelatin, aljinat, vb.) ve sentetik polimerler (poli ϵ -kaprolakton (PCL), poli L-laktik asit (PLLA), polipirol (PPy), polianilin (PANI) vb.) kullanılmaktadır [15]. Bu polimerlerden üretilen doku iskelelerinin dokuya uyumlu olması için istenen bazı özellikleri vardır. Örneğin, biyouyumlu olması herhangi bir immün yanıt oluşturmaması açısından oldukça önemlidir. Ayrıca kronik iltihaplanmayı ve sinir sıkışmasını önlemek için bozunmayan malzemelerden yapılmış bir iskeleden de kaçınılmalıdır [16]. Biyolojik olarak parçalanabilen malzemelerde bile, yüzey erozyonu toplu erozyona göre belirlenmektedir, çünkü iskelelerin yapısal stabilitesini implantasyondan sonra daha uzun süre korumasına izin verir. Polimerik malzemenin yüzeyinin aşınması sonucunda sinir hücreleri ile temasının artması iskelenin sinir rejenerasyonunu desteklemesi açısından avantajdır.

İskele için istenen diğer bir özellik, iskelelerin mekanik stabilitesi ve uyumluluğudur. Sinir dokusu mühendisliği için, yapı iskelesi esnek olmalı, çevre dokulara zarar vermemeli, implantasyon sırasında nekroz ve inflamasyona yol açabilecek yapısal çökmeye direnç göstermelidir [17].

Bu özelliklerinin yanı sıra yük yoğunluğu ve ıslanabilirlik gibi yüzey özellikleri de hücresel faaliyetleri etkilemesi açısından önemlidir [18]. Biyobozunur özellik gösteren birçok sentetik polimer (PLGA, PCL, PHB vb.), yüzeyi hidrofobik özellik göstermektedir. Bu özellik, iskele-hücre etkileşimi kısıtlaması nedeniyle bu malzemelerin kullanımını kısıtlamaktadır. Dolayısıyla, yüzeyin laminin, fibronektin, kolajen gibi ekstrasellüler matriks (ECM) proteinleri ile kaplanması veya kimyasal bir yöntemle yüzey modifikasyonu yapılarak malzemenin hidrofiliğini artırılması gerekmektedir ve

bu da iskelenin hücre yapışma özelliğini geliştirmektedir. Bu nedenlerle konduit üretiminde kullanılacak materyalin fiziksel ve kimyasal özellikleri çalışmaya uygun olarak seçilmelidir.

Biyomalzemelerin özelliklerini nöral doku mühendisliğine uygun hale getirmek için birçok çalışma yapılmıştır. Esnekliğini ve gözenekliliğini artırmak için mikro örgü yöntemi ile oldukça esnek bir PLGA iskele geliştirilmiştir [19]. Ekstrüzyon tekniği ile üretilen PLLA gözenekli kanalların uygunluğu, iskele uygulamaları için *in vivo* değerlendirilmiştir [20]. Elektrospun PCL iskelelerinin biyomekanik özellikleri, yapısal stabilite, görünüm, gözeneklilik ve fiber çapını korurken ısı ile iyileştirilmiştir [21].

Doku iskelelerin özelliklerini iyileştirmek ve dokuyu taklit edebilmek amacıyla kompozit malzeme üretimi doku mühendisliği çalışmalarında başarılı iskele geliştirmek için tercih edilen bir yöntemdir [22]. Örneğin, kırılma özelliğinde olan PLGA ile poliüretan veya poli(etilenglikol) (PEG) gibi yumuşak, elastik bir polimerin bir polimer karışımının, PLGA'nın kendisinden çok daha fazla esneklik sergilediği görülmüştür [23]. Bir diğer çalışmada, yumuşaklık ve elastikiyeti nedeniyle tercih edilen kitosan-jelatin kompozit filmler, sinir dokuya uygun mekanik özellik göstermelerinin yanı sıra ve sinirlerinin de başarılı bir şekilde proliferasyonunu desteklemiştir [24]. Kitosan/poliglikolik asit (PGA) karışımının yapay bir sinir grefti, büyük bir hayvan modelinde 30 mm'lik siyatik sinir kusurunu köprülemek için kullanılmıştır [25]. Uzun dönem gecikmiş periferik sinir defektlerinin onarımı klinik olarak çok zordur ve hayatta kalan Schwann hücrelerinin mevcudiyeti, Schwann hücre taban zarının parçalanmasıyla büyümeye izin veren ortamın kötüleşmesi gibi çeşitli faktörleri içermektedir. Jiao ve arkadaşları yaptıkları çalışmada kitosan-PGA grefti üretmiş, bu greftin biyobozunur özelliğinin yanı sıra sıçanlar üzerinde yaptıkları *in vivo* çalışmalar kapsamında yapılan elektrofizyolojik ve histolojik testler sonucunda greft başarısını ortaya koyarak doku iyileşmesini kanıtlanmışlardır [26]. Bu çalışmalara benzer literatürde kompozit malzeme kullanımının iskele davranışını iyileştirdiğine yönelik birçok çalışma yer almaktadır. Çizelge 2.1'de, sinir rejenerasyona yönelik literatürde kullanılan biyomalzemeler ve üretim yöntemleri ile iyileştirilen özellikleri sunulmuştur.

Çizelge 2.1. Literatürde kullanılan biyomateryaller ve yöntemler.

Biyomalzemeler	Değişiklik / imalat yöntemi	Geliştirilmiş Özellikler	Referans
Kitosan	(γ -glisidoksipropiltrimetoksisilan (GPTMS) ile modifiye edilmiştir	Mekanik dayanım	[27]
PCL	Elektroçirime ve Termal elyaf bağlama	Mekanik dayanım	[21]
PLLA	Modifiye daldırma çökeltme yöntemi	Seçici geçirgenlik; hidrofiliklik	[28]
PDLLA / CL	PPy kaplama substratı ve PPy nanopartikül / PDLLA / CL kompozit	Çok sayıda hücre için elektriksel işaret	[29]
Kitosan	Polilizin fonksiyonlu termoreponsif kitosan hidrojel	Enjekte edilebilir iskele; Mekanik uyumluluğu; Yüzey özelliği (ıslanabilirlik, yük yoğunluğu)	[30]
PCL	Elektrospinning (Kolajen ile polimer kompozit)	Biyolojik özellik (Schwann hücre yapışması, göçü ve farklılaşması)	[31]
PGS	Kopya kalıplama	Mikro desenlenmiş substratlar; Esneklik; Yüzey bozunur; Güçlü iletişim rehberliği yanıtı	[32]
PLGA	Düşük basınçlı enjeksiyon kalıplama	Gözeneklilik; Boyuna hizalanmış kanallar; Doğal sinirlerin geometrisini taklit eder	[33]
Poli(2-hidroksietil metakrilat)	Elyaf şablonlama tekniği	Yönlendirilmiş iskele; Yumuşak dokuya benzer fiziksel özellikler.	[34]

2.4.1 Poli(gliserol-sebakat) (PGS)

Sebasik asit ve gliserol monomerlerinin polikondensasyon tepkimesi ile sentezlenen Poli(gliserol-sebakat) (PGS), elastomerik yapısı, ayarlanabilir mekanik özellikleri, biyouyumlu olması ve biyolojik olarak parçalanabilir olması ile çeşitli biyomedikal uygulamalar için tercih edilen bir polimerdir. Üretiminde kullanılan gliserol, farmasötik formülasyonlarda ve gıdalarda nemlendirici olarak kullanılan toksik olmayan, renksiz, kokusuz olmasının yanı sıra ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onaylıdır. Yapısında yer alan üç hidroksil grup sayesinde suda çözüdür. FDA onaylı sebasik asit ise, toksik özellik göstermeyen ve uzun zincirli yağ asitlerinin oksidasyonu sonucunda doğal bir metabolik ara ürün olarak oluşan bir monomerdir [35]. PGS, üretiminin uygun maliyetli olması nedeniyle endüstriyel üretimde de oldukça elverişlidir. Ayarlanabilir bozunma ve mekanik özellikleri, monomer konsatrasyonu, polimerizasyon parametreleri gibi faktörlerin değiştirilmesi ile istenilen özellikte malzeme üretimi için optimize edilebilmektedir.

Doku mühendisliğine yönelik çalışmalarda elastomerik yapılu PGS, sert (kemik, kırık, vb.) ve yumuşak doku (kalp kası, tendon, sinir doku, vb.) replasmanında dikkat çekici bir doku iskelesi materyali olmaya devam etmektedir. Bununla birlikte, yapılan son çalışmalar doku iskelesi üretiminde kullanılmasının yanı sıra nanoteknolojik sistemler, doku yapıştırıcıları, kontrollü ilaç salım sistemleri gibi yeni yaklaşımlarda da kullanılabileceğini göstermiştir [36].

Diğer sentetik elastomerlerin aksine, PGS, hücre dışı matrisin mekanik özelliklerini taklit etmek için tasarlanmıştır. Omurgasına hidroksil gruplarının bağlı olduğu kovalent olarak çapraz bağlı, üç boyutlu rastgele bobinlerden oluşan bir ağdır; hidroksil grupları arasındaki hem çapraz bağlanma hem de hidrojen bağlama etkileşimleri, elastomerik özelliklerine katkıda bulunur. PGS, emilim periyodu sırasında eş zamanlı doğrusal kütle ve mukavemet kaybıyla birlikte yüzey erozyonu ile bozulur. PGS'nin bozunma süresi, çapraz bağlanma derecesi ve sebasik asitin gliserole oranı değiştirilerek ayarlanabilmektedir [37]. Bu özellikleri nedeniyle PGS elastomeri sinir doku mühendisliğinde kullanılmak üzere uygun bir polimer olduğunu göstermiştir.

PGS elastomeri sinir doku hasarlarında kullanılmak üzere geliştirilen sinir kanalı için uygun fiziksel ve kimyasal özelliklere sahiptir. Bunu göstermek üzere yapılan bir çalışmada PGS kaynaklı bu sinir kanallarının biyouyumluluğunun yanı sıra nöral rejenerasyonu desteklediği de gözlenmiştir. Çalışma, *in vitro* olarak PGS sinir kanalı üzerinde Schwann hücrelerinin yapışmasını, çoğalmasını ve diğer hücrel aktivitesini değerlendirmiş ve doku iskelesinin başarısını ortaya koymuştur [37].

2.5 Hücre İskelesi Üretiminde Kullanılan Elastomerlerin Mikro Kanal Yapıları

Doku mühendisliğinde kullanılan doku iskeleleri mekanik olarak kararlı, gaz ve besin alışverişini sağlayan, hücre-hücre ve hücre-iskele etkileşimini destekleyen biyolojik faktörleri içinde barındırarak hücre rejenerasyonunu destekleyen gözenekli ve kontrollü bozunma özelliklerine sahip olması istenmektedir. İskele üretimi için köpük kopyalama yöntemi, partikül süzme, dondurarak kurutma, gazla köpürtme ve faz ayırma olarak sınıflandırılan bir dizi geleneksel doku iskelesi üretim yöntemi mevcuttur. Son yıllarda gelişmiş imalat (örneğin, 3B baskı ve robocasting), süper kritik akışkan teknolojisi ve mikro akışkanlar gibi yöntemlerin geliştirilmesi üretilen iskelelerin gözeneklilik, mekanik özellikler ve hücrel etkileşimlerin iyileştirilmesini sağlayarak doku rejenerasyonuna yönelik karmaşık yapıların üretimini kolaylaştırmıştır [38].

Biyomalzemelerin yüzey özelliklerinin hücrel aktiviteler ve hücre-substrat etkileşimleri üzerinde önemli bir etkisi olduğu bilinmektedir. Polimerik biyomalzemelerin yüzey desenlemesi, hücre bağlanması, yer değiştirmesi, toplanması, çoğalması ve farklılaşması dahil olmak üzere çok çeşitli hücre davranışını etkilediği ve yönlendirdiği bilinmektedir [39]. Nano ve mikro ölçekli teknolojilerdeki ilerlemelerle birlikte, hücrel göç ve morfogenezi yönlendirmek için önceden belirlenmiş yüzey özelliklerine sahip polimerik ara yüzler oluşturmak amacıyla mekanik yükleme, topografik modelleme ve yüzey kimyasal işlemi dahil olmak üzere çeşitli yaklaşımlar geliştirilmiştir [40].

Hücre hizalaması sinir dokularında önemli bir husustur. Tipik olarak, aksonal rejenerasyonda, nöral hücreler, *in vivo* yaralanmış periferik ve merkezi sinirde hizalanmış Schwann hücreleri kendiliğinden paralel olarak yönlenir. Sağlam sinirlerde miyelinden

farklılaşan Schwann hücreleri aksonal rejenerasyonda önemli rol oynarlar. Lezyonla indüklenen Wallerian dejenerasyonunun ardından, Schwann hücreleri çoğalmaya ve Büngner bantları olarak adlandırılan uzunlamasına hücre şeritleri oluşturmaya başlar. Bu nedenle gerçekleşen sinir rejenerasyonuna kılavuzluk ederek sinir hasarının tedavi edilmesini sağlayan yüzey desenli sinir greftleri geliştirilmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır [41]. Bu tür çok kanallı yapı iskeletlerinin, büyüyen nöronal süreçlerin yönlülüğünü koruma kabiliyetinin artması, periferik sinir ve omurilik yaralanmasının kemirgen modellerinde desteklenmiştir [42].

Son yıllarda doku iskelesi üretiminde ve şekillendirilmesinde lazer destekli sistemlere olan ilgi artmıştır. Lazer ışını yardımıyla doku iskelesinin yüzey deseninin oluşturulması, dokuya uygun olarak şekillendirilmesi, üç boyutlu olarak modellenmesi gibi avantajları sayesinde implante edilebilir tıbbi cihazlar ve rejeneratif tıp uygulamaları için oldukça tercih edilen iskele üretim yöntemi olmuştur [43]. Sinir doku çalışmalarına yönelik olarak, sinir rejenerasyonunu desteklemesi açısından polimerik substrat üzerinde istenen topografiyi oluşturmak ve üzerindeki hücreleri hizalamak için lazer sistemi kullanılmıştır. Basit ve temassız üretim süreci, üretim kaynaklı kontaminasyonu en aza indirmesi ve karmaşık desenleri kolaylıkla oluşturabilmesi nedeniyle istenen topografiyi elde etme de geleneksel litografi yöntemine göre lazer sistemi daha avantajlı hale gelmiştir [44].

2.6 İletken Malzemelerin Sinir Doku Mühendisliğindeki Önemi

İskelenin yüzey topografyası yanı sıra iletken materyal içeriği de sinir doku çalışmalarının vazgeçilmezidir. Bilindiği üzere insan vücudunda sinyal iletimi nöronların birbiri ile etkileşimi sonucunda oluşan sinapslar sayesinde hücreler arası aktarılan aksiyon potansiyeli şeklinde gerçekleşmektedir. Bu nedenle sinir dokuda kullanılacak doku iskeleleri bu aksiyon potansiyelinin iletilmesi ve bunun sonucunda gerçekleşecek sinir rejenerasyonunu desteklemesi için iletken materyal içerikli olmalıdır [12]. Nöronlar, hücrel aktiviteyi kontrol etmek için milivolt (mV) değerinde nispeten zayıf elektrokimyasal akımları kullanma potansiyeline sahiptir. Bu potansiyelin nöronlar arasında aktarılmasını destekleyen elektriksel açıdan iletken iskelelerin nöral hücreleri desteklemesine yönelik başarıları bilinmektedir [45]. Literatürde yaygın olarak kullanılan iletken materyallerden bazıları Çizelge 2.2’de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Literatürde bulunan sinir doku çalışmalarında kullanılan iletken materyallere örnekler.

İletken Malzeme	İskele Malzemesi	Fabrikasyon Yöntemi	Hücre Tipi	Sonuç	Referans
PPy	PPy/PCL- PLLA	Pirolün elektrospun PCL veya PLLA üzerinde polimerizasyonu	Dorsal kök gangliyon	İletken nanofiberlerin sinir dokusu mühendisliği gibi uygulamalarda iskele olarak potansiyel kullanımını önerir.	[46]
	PPy/PLLA	Elektro-eğirme	PC12	PPy-PLLA lifleri, PC12 nörit büyümesini ve genişlemesini destekler.	[47]
KNT	KNT/PVA	Silikon kalıba döküm tekniği	Mezenkimal kök hücreler (MKH)	MKH'ler ve PVA-KNT'lerin tüp kılavuzları ile tedavinin daha iyi sinir rejenerasyonunu indüklediğini ortaya koyar.	[48]
	KNF/PLLA	Elektro-eğirme	Fare Embriyonik Kök Hücre (fEKH)	İletken iskele, <i>in vitro</i> nöral doku taklitlerinin oluşturulması için ve potansiyel olarak <i>in vivo</i> nöral kusurların onarımı için bir iskele olarak yararlıdır.	[49]
	KNT	Yüksek basınçlı karbon monoksit dönüşüm sentezi	Schwann hücresi (SH) - glial	Elektriksel olarak iletken bir KNT, kolajen biyomateryali, sinir dokusu mühendisliği için uygun olabilmekte ve SH popülasyonlarını sürdürebilmektedir.	[50]
PANI	PANI/PCL	Elektro-eğirme	PC12	Elektro aktif fiberler nöral doku mühendisliği için bir kılavuz yapı iskelesi olarak kullanılır.	[51]
	PANI/PCL	Halka açma polimerizasyonu	HaCaT hücre hattı	Bozunabilir elektroaktif boru şeklindeki iskeleler, sinir dokusu mühendisliği için uygundur. Sitotoksik değildirler.	[52]

2.6.1 Karbon Nanofiber (KNF)'lerin Sinir Doku Mühendisliğinde Kullanımı

Karbon nanofiberler (KNF'ler) sadece benzer bir tek boyutlu nano yapıya, benzer özel özelliklere ve karbon nanotüplere benzer çok işleve sahip olmakla kalmaz, aynı zamanda daha kolay üretim, daha düşük maliyet, daha düşük kristallik gibi birkaç avantaj da sergiler [53]. KNF'ler pürüzsüz, gözenekli, içi boş, sarmal ve iyi ısıl iletkenliğe, elektrik iletkenliğine ve yüksek özgül yüzey alanına sahiptirler, bu da onları KNF tabanlı fonksiyonel nano malzemelerin sentezi için mükemmel nano ölçekli yapı taşları haline getirir [54]. Bunun yanı sıra kimyasal stabilitesi, biyoyumluluğu ve yüksek yüzey-hacim oranı gibi uygun özelliklerinden dolayı iskelelerin geliştirilmesi için tercih edilmektedir [55].

Genel olarak, KNF yapısında bitişik nanofiberler arasında yüksek van der Waals kuvvetine yol açan 1-100 nm çaplı ve birkaç mikro uzunlukta yüksek en-boy oranlarına sahip grafitik silindirlere oluşur. Yüksek van der Waals kuvvetleri ve yüksek en-boy oranları, yüksek esnekliklerin bir kombinasyonu ile nanofiberlerin kolayca toplanmasını sağlar. Sonuç olarak, KNF'lerin polimer içerisinde homojen dağılımını sağlamak oldukça zordur. Az miktarda KNF eklenmesi de polimerin viskozitesini önemli ölçüde artıracaktır. Özellikle fiber takviyeli polimer kompozitlerin işlenmesi sırasında fiber matlar içinden reçine akışı çok zorlaşır [56].

Karbon bazlı yapılar sinir patolojilerinin ve hasar görmüş sinir dokusunun tedavisinde çekici bir yaklaşım oluşturmaktadır. Bu yapılar, nöritlere morfolojik benzerlik gösterirler ve küçük demetleri dendritlere benzer boyutlara sahiptir, sinir onarımında bu materyallerin kullanımını cazip hale getirmektedir. Gopinathan ve arkadaşları, KNF'nin sinir büyümesi ve yenilenmesi üzerindeki etkisini bildirmişlerdir. Yüksek elektriksel aktiviteye sahip KNF bazlı iskelenin, hücre adezyon moleküllerinin yokluğunda en yüksek PC12 hücre bağlanma ve proliferasyonunu sergilediğini tespit edilmiştir [57]. Ayrıca osteoblast hücre bağlanmasının arttığını bildirdiler ve En yüksek elektriksel iletkenliğe sahip KNF bazlı nanokompozit üzerinde çoğalma. Ayrıca, en yüksek elektrik iletkenliğine sahip KNF bazlı nanokompozit üzerinde artmış osteoblast hücre bağlanması ve proliferasyonu göstermişlerdir [58]. Mirzaei ve ark. insan endometriyal kök hücrelerinin, KNF tabanlı bir iskelede nöron benzeri hücrelere başarılı bir şekilde

farklılaşabildiğini göstermiştir [59]. Farzamfar ve arkadaşları, bir sıçanda kritik boyutlu bir siyatik sinir kusurunda başarılı sinir rejenerasyonunu destekleyen benzer bir çalışma gerçekleştirdi. Önceki çalışmalar, iletken olmayan iskelelere kıyasla KNF iletken iskelelerin daha yüksek iyileştirme potansiyeli olduğunu bildirmiştir [60]. Yapılan bu çalışmalar KNF'lerin sinir doku mühendisliğinde başarısını göstermektedir.

2.6.2 Magnezyum (Mg) Alaşımlarının Sinir Doku Mühendisliği Çalışmalarında Kullanımı

Mg metal, inert metallere ve biyolojik olarak parçalanabilen plastiklere göre önemli avantajlar sağladığı için biyolojik olarak parçalanabilen bir tıbbi implant malzemesi olarak kullanılmaktadır [61]. Son 15 yılda biyolojik olarak parçalanabilen implantlar olarak Mg bazlı alaşımların geliştirilmesinde kaydedilen kayda değer ilerlemeye rağmen, bazı temel zorluklar hala çözülememiştir. Mg bazlı alaşımların geniş uygulama yelpazesi, esas olarak yüksek bozunma oranları ve bunun sonucunda 7.4 ile 7.6 arasındaki pH seviyelerinde ve fizyolojik sistemlerin yüksek klorlu ortamlarında mekanik bütünlükteki kayıp nedeniyle hala engellenmektedir. Bu nedenle araştırma, farklı alaşımlar, yüzey işlemleri ve kaplamalar kullanarak Mg gücünü iyileştirmeye ve emilim oranını kontrol etmeye odaklanmıştır [62].

Mg alaşımları, son zamanlarda, esas olarak Mg^{+2} iyonlarından oluşan bozunma ürünü ile biyolojik olarak parçalanabilen yeni metalik malzemeler olarak kapsamlı bir şekilde çalışılmıştır. Mg alaşımlarının, konduit uygulaması için polimerik malzemelere göre birkaç özel avantaja sahip olduğu bildirilmektedir [63]. İlk olarak, Mg alaşımları sinir onarımını destekleyen biyo-fonksiyonel metalik iyonları serbest bırakabilir. Önceki çalışmalar, Mg^{+2} iyonlarının hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak sinir hücreleri ve sinir sistemi üzerindeki olumlu etkilerini göstermiştir [64]. Mg^{+2} iyonlarının hem periferik sinir hem de omurilik hasarının onarımında önemli bir rol oynadığı bulunmuştur. Örneğin, Mg takviyesi sıçanlarda siyatik sinir rejenerasyonunu ve sinir ezilme hasarından sonra aşağı regüle edilmiş inflamatuvar yanıtı teşvik etmiştir [65]. Ek olarak, $MgSO_4$, sıçan omuriliğinde bir kontüzyon hasarından sonra vazo ve nöro koruyucu özellikler göstermiştir [66] ve uygun Mg^{+2} iyon konsantrasyonu nöral kök hücrelerin proliferasyonunu destekleyebildiği belirlenmiştir [67]. Bu nedenle, Mg alaşımlı implantın

bozunmasının, sinir onarımı veya rejenerasyonu için uygun bir iyonik ortam sağlaması beklenmektedir. İkincisi, Mg alaşımları, sinir hücrelerinde elektriksel uyarımı veya sinyal iletimini güçlendirmek için mükemmel iletkenler ve bildirildiğine göre yaralı sinirlerin yenilenmesini destekler. Örneğin, elektriksel stimülasyon kültürlenmiş dorsal kök ganglion nöronlarının nörit büyümesini büyük ölçüde destekleyebildiği belirlenmiştir [68]. Üçüncüsü, Mg alaşımları biyolojik olarak parçalanabilen organik malzemelerden önemli ölçüde daha sağlamdır ve bu da sinir rejenerasyonu veya onarımı için gelişmiş bir yapısal destek sağlayabilir. Son olarak, Mg alaşımlarının degradasyon oranı kolaylıkla ayarlanabilir ve böylece sinir onarımı ihtiyacını karşılamak için optimize edilebilir [69].

2.7 Sinir Doku Mühendisliğinde Kullanılan Hücreler

Nöral doku rejenerasyonunda özel olarak kullanılan hücreler arasında Schwann hücreleri, kemik iliğinden türetilen mezenkimal kök hücreler ve embriyonik kök hücreler, Sinir kök hücreleri, mezenkimal ve indüklenmiş pluripotent kök hücreler gibi diğer kök hücre kaynakları bulunur [70]. Ancak bunların arasında en yaygını Schwann hücreleridir. Schwann hücreleri, akson rejenerasyonu için uygun ortam oluşturma ve nöroproteksiyon sağlama yetenekleri nedeniyle PSS 'de rejenerasyonu teşvik eden hücrelerdir. Bu hücreler akson büyümesini destekler ve fibroblast büyüme faktörü (FGF), nörotrofin-3 (NT-3), beyinden türetilmiş nörotrofik faktör (BDNF), sinir büyüme faktörü (NGF) ve siliyer nörotrofik faktör (CNTF) dahil olmak üzere nörotrofik faktörler üretir ve proteinleri salgılar. Ayrıca, hasarın ardından miyelin kalıntılarını giderir ve yenilenen aksonları yeniden miyelinleştirir [71].

Mezenkimal kök hücreler, farklı hücre soylarına farklılaşma potansiyeline sahip olan stromal hücrelerdir ve bu nedenle Schwann hücrelerinin kullanımına makul bir alternatif olarak araştırılabilmektedirler. Bu hücre tipi, Schwann hücrelerinin kullanımının sunduğu dezavantajların çoğunun üstesinden gelir: çok yönlü farklılaşma potansiyeli ve erişilebilirlik kolaylığı, kültürde hızlı proliferasyon ve üstün bir bağışıklık üretmeden konakçı dokuya başarılı entegrasyon gibi birçok klinik avantaja sahiptir [70]. Mezenkimal kök hücreler, nöral kök hücreleri ve nöral progenitör hücreler dahil olmak üzere farklı kökenlerden yetişkin kök hücreler, pre-klinik çalışmalarda ve inme gibi çeşitli travmatik yaralanmalara ve nörodejeneratif hastalıklara yönelik çalışmalarda

kullanılmaktadır [72]. Mezenkimal kök hücreler ve nöral kök hücreleri multipotent hücrelerdir; Mezenkimal kök hücrelerde kullanılan belirli özellik, nörotrofik faktörleri salgılayan hücrelere farklılaşma yeteneğidir, nöral kök hücreleri ise hem glial hücrelerde hem de nöronlarda farklılaşabilir [73].

Sıçan feokromositoma hücreleri PC12 hücre hattı, nörotoksisite, nöroproteksiyon, nörosekresyon, nöroinflamasyon ve sinaptogenez üzerine yapılan çalışmalar dahil olmak üzere nörobilim araştırmalarında en yaygın kullanılanlardan hücre hatlarından bir tanesidir. Süspansiyon içinde büyütülen PC12 hücreleri toplanma eğilimindedir ve kaplanmamış yüzeylere zayıf bir şekilde yapışır. Bu nedenle, kültür kaplarının yüzeyini değiştirmek gerekir [74]. PC12 hücreleri, sinir büyüme faktörüne (NGF) maruz kaldıktan sonra çeşitli nöronal özellikleri tersine çevrilebilir şekilde benimsemeleri nedeniyle nöral hücre davranışının *in vitro* araştırmaları için önemlidir. Çeşitli NGF dozlarına karşı iyi karakterize edilmiş tepkileri nedeniyle, PC12 hücreleri, nörojenezde destekçi etkileri araştırmak için iyi bir deneysel model sistemi sağlar [75].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1 Poli(gliserol-sebakat) (PGS) Doku İskelesinin Üretimi ve Optimizasyonu

Tez çalışması kapsamında kullanılan Poli(gliserol-sebakat) elastomeri sebasik asit (Sigma, ABD) ve gliserol (Merck, ABD) monomerlerinden oluşan ve sentezi iki aşamada gerçekleşen bir polikondenzasyon tepkimesi ürünüdür. Elastomerin sentez işlemi ön polimerizasyon ve set etme (kürleme) olmak üzere iki basamaktan oluşmaktadır. İlk basamak olan Prepolimerizasyon işlemi monomerlerin polikondenzasyon basamağını içermektedir. Bu işlem mikrodalga reaktörü (Vestel Md 20 Mb, Türkiye) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Monomerler cam petri içerisinde optimize edilen oranlarda tartılarak karıştırılmış ve karışım 650 W'lık bir güç uygulanarak mikrodalga reaktörde 1dk x 5 kez ve her 1 dk süre sonrasında 10 saniyelik aralıklar olacak şekilde elektromanyetik dalgalara maruz bırakılmıştır. Katalizör kullanılmadan gerçekleştirilen bu reaksiyon sırasında tabi tutulan 10 sn'lik aralarda karışım, cam bir çubuk yardımıyla karıştırılarak karışımın homojen hale getirilmesi amaçlanmıştır. Sentezin ikinci aşaması ise ön polimerizasyon işlemi sonrası elde edilen viskoz haldeki karışımı set etme (kürleme) işlemini kapsamaktadır. Bu basamakta ön polimerizasyon işleminin ardından elde edilen yapıların çapraz bağlanması amacıyla vakum etüvü (Memmert, Almanya) içerisinde 50 mbar vakum altında ve 150 °C'de optimize edilen süre boyunca malzemenin çapraz bağlanması amaçlanmıştır. Çapraz bağlama işlemi tamamlandıktan sonra elastomer oda sıcaklığında soğutulmuş ve cam petriden mekanik kazıma işlemi ile çıkartılarak sonraki aşamalarda kullanılmak üzere +4 °C'de muhafaza edilmiştir. PGS elastomerin sentez metodu kullanılarak monomerlerin molar derişimleri ve polimerin çapraz bağlanma süresi optimize edilerek çalışmaya uygun özelliklere sahip elastomer belirlenmiştir.

3.1.1 Farklı Gliserol Derişimlerinin Elastomer Yapısına Etkisi

Bu aşamada PGS sentez metodu kullanılarak mikrodalga ön polimerizasyon süreleri, çapraz bağlanma süreleri, sıcaklık (150 °C) ve basınç parametreleri (50 mbar) sabit tutularak farklı gliserol derişimlerinin malzeme üzerindeki etkisi incelenmiştir ve uygun gliserol derişimi optimize edilmiştir. Bu amaçla elastomer içeriğinde bulunan sebasik asit monomeri molaritesi sabit tutularak sırasıyla farklı miktarlardaki gliserol konsantrasyonları (1:1, 1:1,25, 1:1,5, 1:1,75 SA:G) denenmiştir. Deneme grupları hesaplamalar sebasik asit molekül ağırlığından ($M_{wSA} = 202,25$ g) ve gliserol moleküler ağırlığı ($M_{wG}=92,09$ g) ile özkütlesinden ($d_G=1,25$ g/mL) yola çıkarak malzeme sentezinde kullanılacak sebasik asit kütlesi (m_{SA}) ve eklenecek gliserol hacmi (V_G) tespit edilmiştir. Sentez işlemi 5 cm'lik cam petride gerçekleştirilmiştir. Belirtilen petri boyutuna göre hesaplanan değerler Çizelge 3.1' de verilmiştir.

Çizelge 3.1. 1 M sebasik asit ve farklı molar oranlarında gliserol miktarlarının hesaplanması.

SA:G	1:1	1:1,25	1:1,5	1:1,75
m_{SA}	4,045 g	4,045 g	4,045 g	4,045 g
V_G	1,473 mL	1,84 mL	2,210 mL	2,578 mL

Elde edilen farklı monomer içeriğine sahip PGS elastomerlerin morfolojik değerlendirilmelerinin yanı sıra *in vitro* çalışmalarda önemli bir unsur olan malzemenin asidite kontrolleri için 24 saat besiyeri 37 °C'de ile inkübasyon sonucunda pH değerleri ölçülmüştür. Bu çalışma için PGS malzemeler hücre kültüründe inkübe edilmek üzere eşit ağırlıkta (1 g) olacak şekilde tartılmıştır. Sitotoksiste çalışmalarında dikkate alınan ASTM standardına göre belirlenen 0,2 g/mL değeri dikkate alınarak hesaplanan miktarda yüksek glikoz içerikli DMEM (Capricorn, Almanya) besiyeri eklenmiş ve 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda içerisindeki malzeme uzaklaştırılarak ekstraktın pH değerlerinin ölçümü pH metre (Hanna Instruments) ile gerçekleştirilmiştir.

3.1.2 Farklı Çapraz Bağlanma Sürelerinin Elastomer Özelliklerine Etkisi

Elastomer yapısındaki monomerlerin molaritesinin optimize edilmesi işleminden sonra üzerinde çalışması gereken diğer bir parametre malzemenin çapraz bağlanma süresinin çalışmaya uygun olarak tespit edilmesidir. Eş molar (1:1) olacak şekilde hazırlanan sebasik asit ve gliserol karışımı PGS sentez metodu ile üretilmiş, 150 °C ve 50 mbar'da vakumlu etüv ile gerçekleştirilen çapraz bağlanma işlemi süresiyle ilgili optimizasyon çalışması yapılmıştır. Bu çalışmada set etme basamağında 10, 12 ve 14 saatlik çapraz bağlanma süreleri denenmiştir.

Farklı çapraz bağlanma sürelerine sahip PGS elastomerin mekanik, fiziksel ve kimyasal özellikleri çeşitli karakterizasyon testlerinin uygulanmasının yanı sıra sitotoksisite analizi ve degradasyon testi ile *in vitro* etkinlikleri değerlendirilerek çalışmaya en uygun elastomer belirlenmiştir.

3.1.3 Farklı Çapraz Bağlanma Süresine Sahip PGS Elastomerlerin Karakterizasyonu

3.1.3.1 Toplam Reflektansı Azaltılmış Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektrofotometresi (ATR-FTIR) Analizi

Çalışma kapsamında hazırlanan 10,12 ve 14 saat çapraz bağlanma süresine sahip PGS polimerlerinin (n=3) moleküler yapılarının, kimyasal bağların ve çapraz bağlanma sonrası yapıda meydana gelen değişimlerin belirlenmesi için bir tür titreşim spektroskopisi olan FT-IR (Agilent Cary 630, ABD) cihazı ile 400-4000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında ölçüm gerçekleştirilmiştir. Elde edilen pikler karşılaştırılarak ve çapraz bağlanma süresinin malzeme yapısına etkisi incelenmiştir.

3.1.3.2 Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi

Yapılan çalışmada elde edilen farklı çapraz bağlanma sürelerine (10, 12 ve 14 saat) sahip olan PGS elastomerine ait erime sıcaklığı (T_m), camsı geçiş sıcaklığı (T_g) ve kristallenme sıcaklığı (T_c) değerlerinin belirlenmesi için örnek ve referans arasındaki ısı farkını, sıcaklığın fonksiyonu olarak inceleyen DSC (Perkin Elmer, ABD) analizi kullanılarak

yapılmıştır. Analiz, 0,5 -10 mg polimerlerin hazırlanması ardından -80'den 100 °C'ye kadar 10 °C/dk ısıtma hızında ısıtılmış ve polimerde meydana gelen faz değişimi DSC grafiğinde incelenmiştir.

3.1.3.3 Temas Açısı Ölçümü

Yüzey hidrofilitesi, hazırlanan PGS elastomerinin *in vitro* çalışmalarda doku iskelesi olarak kullanımında hücre adezyonu, proliferasyonu gibi malzeme yüzeyinde gözlenecek hücresel davranışları desteklemesi açısından önemli bir özelliktir [76].

Bu amaçla farklı çapraz bağlanma sürelerine sahip elastomerlerin temas açısı ölçümü ile gerçekleştirilmiş, yüzey hidrofiliteleri karşılaştırılmıştır. Yüzey ıslanabilirliği, her grup için (n=3) hava ortamında Biolin Scientific Attension Theta cihazı kullanılarak test sıvısı olarak ultra saf su kullanılarak uygulanmıştır. Her örnek için temas açıları 3 farklı nokta üzerinde ölçülmüş ve sonuç ortalama ve standart sapmaları olarak ifade edilmiştir.

3.1.3.4 Çekme Testi ile Mekanik Özelliklerinin Belirlenmesi

Farklı çapraz bağlanma sürelerine sahip PGS elastomerlerinin mekanik özelliklerinin değerlendirilmesi için çekme testi uygulanmıştır. Analiz için PGS elastomerlerin kalınlıkları 2 mm, 10 mm genişliğe ve 20 mm uzunluğa sahip olacak şekilde hazırlanmıştır (n=4). Hazırlanan malzemeler 50N'luk yük kapasitesine sahip çekme testi cihazı (Cell Scale, Kanada) ile çekme hızı 50 mm/dk olacak şekilde tek yönlü çekme işlemi malzeme kopana kadar uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre malzemenin çekme mukavemeti, % uzama miktarı ve Young modülüs değerleri karşılaştırılarak sinir dokuya uygun mekanik özellikler gösteren malzeme belirlenmiştir.

3.1.3.5 Elastomerlerin Çapraz Bağ Yoğunluklarının Belirlenmesi

Mekanik test sonucunda elde edilen elastomerlerin Young modülüs (E) değerlerinden yola çıkarak kauçuk elastikiyet teorisine malzemenin çapraz bağlanma yoğunluğu hakkında bilgi edinilebilmektedir. Elastomerin çapraz bağlanma yoğunluğu *Formül 1'* de verilen eşitlik kullanılarak hesaplanmaktadır [77].

Bu eşitlikte n değeri malzemenin çapraz bağlanma yoğunluğunu göstermektedir. T Mutlak sıcaklığı (K) ve R evrensel gaz sabitini (8,3144 J/molK) ifade ederken, E_0 malzemelerin mekanik test sonucunda hesaplanan Young modülüs (Pa) değerini simgelemektedir.

$$n = \frac{E_0}{(3RT)} \quad (1)$$

3.1.3.6 Elastomerlerin Su Tutma Kapasitesinin Belirlenmesi

Malzemenin su tutma kapasitesi malzemenin bozunum kinetiği, protein adsorpsiyonu ve malzeme-hücre ilişkisi hakkında bilgi veren önemli bir parametredir. Bu nedenle 10, 12 ve 14 saatlik çapraz bağlanan PGS elastomerlerin hidrasyonu ile şişme testi gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen malzemelerden 1 cm çapa sahip diskler kesilmiş ve bu disklerin kuru ağırlıkları ölçülmüştür. Hazırlanan numuneler her gruptan üç tane olacak şekilde 50 mL'lik falkonlara yerleştirilmiş, üzerine 20 mL çözelti eklenerek 24 saat boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Elastomerlerin farklı çözeltilerde şişme davranışının incelenmesi için PBS (fosfat tamponlu çözelti, Sigma, ABD), deiyonize su (DI) ve etanol olmak üzere üç farklı çözelti kullanılmıştır. 24 saat sonunda örnekler çözeltilerden çıkartılmış, filtre kâğıdına hafifçe bırakılarak fazla suyu alınmıştır. Islak ağırlık ölçümü gerçekleştirilen numunelerin *Formül 2*'den yararlanılarak yüzde (%) su tutma oranları tespit edilmiştir. Bu eşitlikte W_s değeri 24 saat sonunda şişmiş PGS ağırlığını, W_i değeri ise PGS başlangıçtaki kuru ağırlığını göstermektedir. Elde edilen yüzde şişme oranları çözeltilere göre üç farklı malzeme için karşılaştırılmış ve grafik elde edilmiştir.

$$\% \text{ Su Tutma Oranı} = \frac{(W_s - W_i)}{W_s} \times 100 \quad (2)$$

3.1.3.7 *In vitro* Etkinliklerinin Değerlendirilmesi

Malzemelerin Degradasyon özellikleri, bozunma ürünlerinin biyoyumluluğu doku mühendisliğinde dikkat edilen önemli diğer parametrelerdir. Bu doğrultuda farklı çapraz

bağlanma sürelerine sahip PGS elastomerlerin *in vitro* koşullarda bozunma davranışı incelenmiş, hücre kültürü çalışması ile hücre canlılığı üzerindeki toksik etkileri değerlendirilmiştir.

3.1.3.7.1 Degradasyon Özelliklerinin Belirlenmesi

PGS elastomerlerinin farklı zaman değerlerinde *in vitro* ortam taklit edilmeye çalışılarak ISO 10993-12 standardı dikkate alınarak hidrolitik degradasyon için numuneler 2 mm kalınlığında 10 mm çaplı eşit kalınlık ve ağırlıkta olacak şekilde diskler halinde hazırlanmış, çalışma 37 °C'de 30 rpm sabit karıştırma hızında pH değeri 7.4 olan ve sentetik vücut sıvısı olarak da bilinen Ringer (Sigma, ABD) çözeltisi içerisinde gerçekleştirilmiştir. Her bir doku iskelesi işlem öncesinde tartılmıştır ve başlangıç kuru ağırlıkları belirlenmiştir. 50 mL'lik falkon içerisinde bir numune olacak şekilde örnekler yerleştirilmiş üzerine Ringer solüsyonu eklenmiştir. Çalışma dört farklı zaman değeri için her gruptan dört örnek (n=4) olacak şekilde planlanmıştır. Örnekler üzerindeki çözeltiler haftada bir kez yenilenmiştir. Doku iskeleleri periyodik olarak her hafta (n=4) olmak üzere degradasyon solüsyonundan alınmış, malzemelerin üzerindeki çözelti filtre kâğıdı yardımıyla uzaklaştırıldıktan sonra 50 °C sıcaklıktaki vakumlu etüv içerisinde 5 saat kurutulduktan sonra son kuru ağırlıkları ölçülmüştür. Elde edilen değerler literatürde yaygın olarak kullanılan yüzde kütle kayıp formülü (*Formül 3*) koyularak her bir saat için çalışılan örneklerin belirlenen zaman noktalarında yüzde kütle kayıpları tespit edilmiş ve grafiğe dönüştürülmüştür. Bu formülde *M_i* değeri başlangıç ağırlığını gösterirken *M_f* ise belirli günlerde kurutularak tartılan numunenin ağırlığını ifade etmektedir.

$$\% \text{ K\u00fctle Kayb\u0131} = \frac{(M_i - M_f)}{M_i} \times 100 \quad (3)$$

3.1.3.7.2 Elastomerlerin Sitotoksik Özelliklerinin Değerlendirilmesi

PGS elastomerlerin sitotoksosite çalışmasında kullanılması planlanan L929 Fare Fibroblast Hücre Hattı (P20), altı gün boyunca kültüre edilerek hücre proliferasyon özellikleri incelenmiştir. Sıvı azotta (-196 °C) sıvı azotta kiritötüplerde dondurulmuş halde saklanan L929 hücresi, kontrollü şekilde çözdürülmüş ve 75 cm²'lik flasklarda kültüre edilmiştir. Hücre besiyeri olarak % 10 (h/h) fetal sığır serumu (FBS, Capricorn,

Almanya), % 1 (h/h) Antibiyotik- Antimikotik (Capricorn, Almanya) ve % 1 L-glutamin içeren yüksek glikozlu DMEM (Capricorn, Almanya) besiyeri hazırlanmış ve CO₂ etüvünde (Memmert, Almanya), % 95 nem, % 5 CO₂ ve 37 °C'de inkübe edilerek çoğaltılmıştır. Flaskların yüzeyi % 90 oranında hücreler tarafından kaplandıktan sonra Tripsin/EDTA Solution B (Capricorn, Almanya) çözeltisi ile hücreler flask yüzeyinden kaldırılmıştır. Hücre süspansiyonu 2500 rpm'de 3 dk santrifüjlenerek hücre pelleti elde edilmiştir. Supernatan atıldıktan sonra pellet miktarına göre belirli miktarda besiyeri eklenerek pipetle homojenize edilmiş, homojenize edilen hücre süspansiyonundan 10 µL alınarak hemositometre camında sayım yapılmıştır. Hesaplanan hücre miktarına göre 6 kuyucuklu kültür kabının her bir kuyucuğuna 2,5 x10⁴ hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. Kültürün 6. gününe kadar her gün faz kontrast mikroskobu ile morfolojik incelemeler yapılmış ve bir kuyuda bulunan hücreler Tripsin/EDTA Solution B çözeltisi ile yüzeyden kaldırılmıştır. Hücre süspansiyonu 2500 rpm'de 3 dk santrifüjlenerek hücre pelleti elde edilmiştir. Hücre pellet yoğunluğuna göre seyreltildikten sonra homojen hücre-besiyeri çözeltisinden 10 µL alınarak hemositometre camında sayım yapılmış, belirlenen hücre miktarına göre 24 kuyucuklu hücre kültürü kabının her bir kuyucuğuna 2x10⁴ hücre ekimi gerçekleştirilmiştir ve 24 saat kültüre edilmişlerdir.

Yapılan kültür çalışmalarında kullanılan doku iskelelerine uygun sterilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla iskeleler 2 saat %70 alkolde bekletilmiş ve bu işlem 2 kez alkol değişimi yapılarak tekrar edilmiştir. Alkol uzaklaştırıldıktan sonra PBS ile 4 kez yıkama yapılmış, ardından iskeleler steril pens yardımıyla 6 kuyucuklu kültür kabına yerleştirilerek her bir yüzeyi 30 dk UV ışık altında steril edilmiştir. Tez çalışması kapsamında yapılan bütün *in vitro* çalışmalarda kullanılan doku iskelelerinin sterilizasyon işlemi bu yöntemle gerçekleştirilmiştir.

Çalışma kapsamında steril haldeki iskeleler DMEM besi ortamı miktarı malzeme ağırlığına göre 0,2 g/mL olacak şekilde hesaplanmış, üzerine eklenerek 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası iskele üzerindeki ekstrakt toplanmış, 0,22 µm çaplı teflon filtreden geçirilmiştir. Üzerine ekstrakt miktarına göre hesaplanan % 10 (h/h) FBS, % 1 (h/h) AA ve % 1 L-glutamin (h/h) eklenerek besi ortamı hazırlanmıştır. Kültür kabında çoğaltılan hücreler üzerindeki besi ortamı uzaklaştırılmış, ekstrakt besi

ortamı eklenerek 24 saat etkileştirilmiştir. Kontrol grubu olarak herhangi bir ekstrakt içermeyen DMEM besi ortamında çoğaltılan hücreler kabul edilmiştir.

Farklı çapraz bağlanma oranlarına sahip PGS elastomerlerinin *in vitro* koşullarda L929 hücre hattı üzerinde sitotoksik etkisini incelemek için 3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür (MTT) analizi gerçekleştirilmiştir. ISO10993-2 standardına göre gerçekleştirilen elüsyon metodu eşit ağırlıkta olan 10, 12 ve 14 saat çapraz bağlanmış malzemelerin hücre canlılığını incelemek amacıyla kullanılmıştır.

Bu amaçla, 24 saat sonrasında kuyucuklardaki besi yerleri uzaklaştırılmış, 600 µL DMEM üzerine 60 µL konsantrasyonu 5 mg/mL olacak şekilde önceden hazırlanan ve – 20 °C’de saklanan MTT solüsyonu eklenmiş ve 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda karanlık ortam koşullarında kuyucuklar mikroskop altında incelenmiş ve siyah renkli tetrazolium tuzu gözlemlendikten sonra kuyucuklardaki besi ortamları uzaklaştırılmıştır. Oluşan formazan kristallerini çözmek amaçlı her bir kuyucuğa 400 µL dimetilsülfoksit (DMSO) eklenmiş ve çözünmeyi artırmak için pipetaj yapılmış ve renk değişimi gözlenmiştir. Elde edilen homojen çözeltilerden 200 µL’er alınarak ölçüm yapılacak 96 kuyucuklu kültür kabına aktarılmış, mikropilaka okuyucu yardımıyla (BioTek, ABD) ile Gen5 programı kullanılarak 570 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen absorbans verileri yüzde canlılık cinsinden grafiğe aktarılmıştır.

3.1.3.7.3 Elastomerlerin Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi

Sitotoksikite testinin yanı sıra elastomer yüzeyindeki hücresel olayları değerlendirmek için Akridin oranj (AO)/Propidyum iyodid (PI) ikili boyaması yapılmıştır. MTT analizine benzer olarak, 24 kuyucuklu kültür kabında 24 saat kültüre edilen L929 hücreleri elastomer ekstrakt besiyerleri ile 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda hücre morfolojileri faz-kontrast mikroskopunda görüntülenmiştir.

AO, hücre membranından geçebilen ve hücreleri yeşile boyayan katyonik bir boyadır ve canlı hücrelerin nükleik asitlere bağlanır. PI ise hücre membranından geçemeyen ancak

membran bütünlüğünü kaybetmiş ölü hücreleri zarlarına kolayca nüfuz ederek kırmızıya boyayan bir nükleer boyadır.

İkili boyama için hücreler üzerindeki besi ortamı uzaklaştırılarak yerine 1 mL 25 µg/mL AO (Thermo Fisher Scientific, Almanya) ve 25 µg/mL PI (Sigma Aldrich, Almanya) çözeltileri, 1:1 (h/h) oranında karıştırılarak eklenmiş ve 30 saniye boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Süre sonunda boya çözeltisi kuyucuklardan uzaklaştırılarak tekrar PBS yıkaması yapılmıştır. Hücreler görüntülemeye hemen önce boyanmış ve bu işlem ışığa hassasiyetinden dolayı karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir. Boyama sonrası hücreler FITC ve Rodamine filtresi (Leica DM IL Led, Hollanda) filtresi ile floresan mikroskopunda incelenerek görüntü alınmıştır.

3.1.4 PGS Elastomeri Alkol Yıkama Methodu Optimizasyonu

PGS elastomerleri yapısında bulunan bağlanmamış sebasik asit içeriği bakımından hücreler için toksik etki yaratabilmektedir [78]. Bu yüzden PGS elastomerlerin çapraz bağlanma sonrası içerisinde bağlanmamış halde bulunan monomerlerin uzaklaştırılması için yıkama protokolü optimize edilmiştir. Bu doğrultuda üç farklı alkol yıkama protokolü (n=3) uygulanmıştır.

İlk çalışmada PGS malzemeler manyetik karıştırıcıda 24 saat boyunca % 70 (h/h)'lik etil alkol içerisinde bekletilmiş, alkol bu süre boyunca 3 kez değiştirilmiştir. 24 saat sonunda iskeleler DI ile yıkanmış, 24 saat süren bu işlemde 3 kez su değiştirilerek alkolün tamamen uzaklaştırılması amaçlanmıştır. İşlem sonunda iskeleler 37 °C'de kurutulmuş ve hazır halde oda sıcaklığında bekletilmiştir.

İkinci çalışmada, daha kısa süreli ve daha az alkolle etkileşim sağlamak amacıyla %70'lik alkolde 16 saat bekletilmiş, bu süre boyunca üç kez alkol değişimi gerçekleştirilmiştir. 6 saat DI ile yıkamanın ardından (3 kez değişim) iskeleler 37 °C'de kurutulmuş ve hazır halde oda sıcaklığında bekletilmiştir. Son olarak, iskeleler 1 saat % 70 (h/h)'lik alkol, 1 saat DI ve 1 saat 50 °C kurutma olacak şekilde bir döngüye tabi tutulmuştur. Bu döngü art arda üç kez uygulanmış, kurutulan iskeleler hazır halde oda sıcaklığında bekletilmiştir. Her

gruptan (n=3) hazırlanan iskelelerin *in vitro* çalışmalarda hücre üzerindeki asidik etkisini incelemek amacıyla 1 g olarak tartılan malzemeler üzerine 0,2 g/mL değeri dikkate alınarak 5 mL DMEM besiyeri eklenmiş ve 37 °C de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. 24 saat sonunda besiyeri içerisindeki iskeleler uzaklaştırılmış ve pH değerleri ölçülmüştür. Elde edilen değerlerin karşılaştırılması sonucu protokol optimize edilmiştir.

3.2 CO₂ Lazer Uygulamasıyla PGS Elastomer Yüzeyinde Mikro Kanalların Oluşturulması ve Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Etkinliğinin Değerlendirilmesi

PGS optimizasyonu çalışmalarından sonra molar içeriği ve çapraz bağlanma süresi optimize edilen PGS elastomerler bisturi yardımıyla elastomer tabakası cam petriden çıkartılmış, 1,5 cm x 3 cm ölçülerinde dikdörtgen şeklinde boyutlandırılmıştır. Elastomer yüzeyinde mikro kanallar oluşturulması için 60 watt'lık Aeon Nova 7 CO₂ lazer cihazı kullanılmıştır. Elastomerin 1,5 cm x 3 cm kesimi için lazerin odak noktası 11 mm, lazer gücü % 50, prob hızı 15 mm/sn olarak ayarlanmış, kanalların oluşturulması için tarama parametreleri odak noktası 11 mm, % 40 lazer gücü, prob hızı 100 mm/sn, interval 0,1 olarak optimize edilmiştir. Bu parametreler kullanılarak iskeleler yüzeyinde 50 µm, 100 µm, 200 µm, 500 µm, 1 mm ve 2 mm genişliklerinde ve yaklaşık 500-600 mikron derinliğinde kanallar oluşturulmuştur.

CO₂ lazer cihazı ile kanal oluştururken lazerin PGS elastomeri yüzeyine etkisini incelemek amacıyla FEI Quanta 200 FEG taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılmış, böylece kanal yapıları görüntülenmiştir. PGS iskeleler herhangi bir biyolojik materyal içermediği için herhangi bir fiksasyon ve kurutma işlemine tabi tutulmadan SEM analizi uygulanmıştır. Analiz için malzeme yüzeyi PECS marka altın (Au)-paladyum (Pd) ile kaplanmıştır. Analiz sırasında farklı büyütme oranlarında malzemelerden görüntüler alınmış, kanal genişlikleri ve derinlikleri ölçülmüştür.

3.3 Karbon nanofiber/ PGS Kompozitinin Geliştirilmesi

Yüzey desenli PGS elastomere iletkenlik kazandırmak amacıyla karbon nanofiber (KNF) kullanılmıştır. Katı formdaki KNF (D×L, 100 nm×20-200 µm, Sigma, Almanya)'ler

kanal yüzeyine kaplanması için çözelti haline getirilmiş ardından kanal içerisine eklenecek çözelti miktarı belirlenerek kanal yüzeyi kaplanmıştır.

3.3.1 Homojen KNF Çözeltisinin Hazırlanması

3.3.1.1 Farklı Çözücüler ile KNF Çözeltisinin Hazırlanması

Homojen KNF çözeltisi elde etmek amacıyla farklı çözücüler kullanılarak hazırlanan çözeltilerin homojenlikleri değerlendirilmiştir. Bu amaçla organik çözücü tetrahidrofuran (THF, Sigma, ABD), dimetilasetamid (DMA, Sigma, ABD), izopropanol (IPA, VWR Prolabo, İngiltere), 1:1 eş molar gliserol – destile su karışımı (h/h), % 95'lik etil alkol (h/h) ve % 1 (a/h) sodyum dodesil sülfat (SDS, Sigma, ABD) – DI çözeltisi kullanılarak 0,3 mg/mL KNF- çözücü konsantrasyonu (a/h) hazırlanıp 50 °C'de 2 saat boyunca sonikatör (Elma S80-H) yardımıyla karıştırılmıştır. Ayrıca 1:1 eş molar KNF–SDS karışımı DI (a/h) içerisinde eklenerek yine aynı sonikatör parametreleri kullanılarak hazırlanmıştır. Çözeltilerin homojenliklerinin değerlendirilmesi amacıyla sonikasyon işlemi sonrası (t=0), sonikasyon işleminden iki saat sonra (t=2) ve bir gece sonrasındaki (t=16) homojenliği incelenerek karşılaştırılmıştır. Elde edilen çözelti içerisinde KNF dağılımının incelenmesi amacıyla sonikasyon işleminden sonra lam üzerine damlatılmış ve mikroskop (Leica, Almanya) aracılığıyla incelenmiştir.

Çalışma sonrasında elde edilen çözeltilerden KNF–SDS (1:1) ve KNF–gliserol/ DI karışımının *in vitro* etkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla PGS elastomerlerin üzerine CO₂ lazer cihazı ile açılan 500 µm kanal içerisine kaplanmıştır.

1 g olarak tartılan KNF – SDS (1:1) ve KNF–gliserol/DI karışımı kaplı malzemeler steril koşullar altında 2 saat boyunca % 70'lik etanol (h/h) içinde bekletilen doku iskeleleri steril PBS ile yıkanarak kurutulmuştur. Bu çözeltilerin hücre üzerindeki sitotoksik özelliğini incelemek amacıyla Bölüm 3.1.3.7.2'de anlatıldığı gibi farklı derişimlerde (% 100, % 50, % 25 ve % 12.5, h/h) ekstraksiyon ortamı ile MTT analizi gerçekleştirilmiştir.

3.3.1.2 Jelatin Metakrilat (GelMA) ile Homojen KNF Çözeltisinin Hazırlanması

ECM taklit eden hidrojeller, hücrelere davranışlarını için mekanik destek sağlar ve sinyal ipuçlarını düzenler. Bu nedenle çalışmada Jelatin metakrilat (GelMA)–KNF çözeltisi hazırlanarak KNF'in agrege olmadan homojen bir çözelti elde edilmesi amaçlanmıştır. Laboratuvarımızda öncesinde optimizasyonu yapılan GelMA üretim protokolü kullanılarak hazırlanmıştır [79].

Bu protokole göre % 8 (a/h) oranında jelatin tozu PBS içinde 50 °C'de kadar çözdürülmüştür. Karışım için sıcaklık 50 °C'de tutulmuş ve manyetik karıştırıcıda devam ettirilmiştir. Metakrilik anhidrit % 8 (h/h) oranında 0,5 mL/dk sabit akış hızıyla çözeltiye eklenmiş ve reaksiyon homojen bir apak çözelti olana kadar sürdürülmüştür. Fazla metakrilik anhidritin uzaklaştırılması için diyaliz membran kullanılarak diyaliz edilmiştir. Örnekler sonrasında toz haline gelmesi için liyofilize edilmiş ve bir sonraki işleme kadar -80 °C'de saklanmıştır.

Bu amaçla liyofilize halde bulunan % 2 (a/h) GelMA'nın UV etkisi altında çapraz bağlanabilmesi için % 0,5 (a/h) foto başlatıcı (irgacure-2959, Sigma, Almanya) PBS (pH 7.4) tamponunda sonikatör yardımıyla çözdürülmüştür. Hazırlanan çözelti içerisinde miktarı 5 mg/mL olacak şekilde KNF eklenmiş ve çözelti sonikatörde 1 saat homojenize edilmiştir. Elde edilen çözülden 20 µL alınarak PGS yüzeyinde bulunan kanallar içerisine mikropipet yardımıyla yüklendikten sonra çözelti kurumadan hızlı bir şekilde Çizelge 3.2 'de verilen koşullar altında UV enerjisi çapraz bağlanması denenmiştir. Her çapraz bağlanma işlemi 90 sn boyunca uygulanmış, farklı uygulama miktarları denenmiş ve uygulama aralarında 10 sn ara verilmiştir.

Çizelge 3.2. GelMA–KNF çözeltisi UV-çapraz bağlanma enerjisi ve farklı çapraz bağlanma süreleri.

Deneme	UV-Çapraz Bağlanma Enerjisi ($\mu\text{J}/\text{cm}^2$)	Çapraz Bağlanma Süresi (sn)
1	6900	2 x 90
2	6900	4 x 90
3	6900	6 x 90

3.3.1.3 Fonksiyonelleştirilmiş KNF Üretimi

Çalışma kapsamında KNF'in çözünürlüğü ile ilgili karşılaşılan problemin giderilmesi amacıyla KNF'lere fonksiyonel grup eklenmesine karar verilmiştir. Bu amaçla literatürde karbon nanotüp için yapılan yöntemler araştırılarak KNF fonksiyonelleştirilmesi için modifiye edilmiştir. KNF'lerin karboksilik asit (COOH) fonksiyonel gruplara sahip olması için, 0,2 g tartılan KNF 250 mL erlen içerisine konulduktan sonra çeker ocak altında üzerine 3:1 (h/h) oranında olacak şekilde 7,5 mL % 98 sülfirik asit (H_2SO_4 , Sigma, Almanya) ve 2,5 mL % 63 nitrik asit (HNO_3 , Sigma, Almanya) çözeltisi içerisine eklenmiştir. Karışım manyetik karıştırıcı üzerinde 110 °C'de 1 saat muamele edilmiştir. Sonrasında çözelti oda sıcaklığında soğuması için bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda, oksidasyon reaksiyonunu durdurmak için DI ile 1:1 oranında seyreltme işlemi gerçekleştirilmiştir. Seyreltilen çözelti 0,22 μm Teflon filtre (Filtropur, ABD) yardımıyla süzölmüş ardından tekrar yıkama işlemi gerçekleştirilmiş ve supernatant sıvının pH değeri 7.0 olana kadar devam edilmiştir. pH değeri 7.0'ye ulaştığında son kez yıkama işlemi gerçekleştirilmiş, yıkanan KNF'ler cam petriye dökülerek 80 °C'de vakum altında gece boyu kurutulmuştur. İşlem sonucunda elde edilen karboksilatlı KNF'ler (KNF-COOH), fonksiyonel gruplu KNF (f-KNF) olarak etiketlenmiştir.

Konsantrasyonu 0,3 mg/mL olacak şekilde hazırlanan f-KNF-DI, 2 saat sonikasyon işlemi ardından çözelti görünümü incelenmiştir. Ayrıca CO_2 lazer ile yüzeyinde kanallar oluşturulan PGS elastomerlerin kanallarına hazırlanan f-KNF çözeltisi 20 μL eklenerek kaplanmıştır. Hazırlanan KNF çözeltileri ve PGS kanallarındaki görüntüleri faz-kontrast mikroskopu ve SEM analizi ile karşılaştırılmıştır.

3.3.1.3.1 Karakterizasyon Testleri

Hazırlanan f-KNF'in yüzey fonksiyonelleştirme başarısını değerlendirmek amacıyla çeşitli karakterizasyon testleri yapılmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir. Testlerde işlem görmemiş KNF'ler ve f-KNF'ler karakterize edilerek karşılaştırılmış, fiziksel ve kimyasal değişiklikler incelenmiştir. Bunu için Raman spektroskopisi, KNF yapısında karakterize eden iki frekans bandının varlığına dayanarak, karbonlu malzemede herhangi bir yapısal değişikliğin varlığını belirleyebilmekte kullanılan bir yöntemdir. KNF ve f-KNF'e ait Raman spektrumları, Witec alpha 300 Raman mikroskobu ile ölçülmüştür. Toz halindeki KNF ve f-KNF örnekleri 0,2 mg tartılmış ve Termogravimetrik analiz (TGA) analizi için ölçüm panına yerleştirilmiştir. TGA, sürekli N₂ akışı altında oda sıcaklığından 900 °C'ye kadar 10 °C/dakikalık bir ısıtma hızında çalıştırılan bir TA Instruments TGA Q500 analizörü (TA Instruments, West Sussex, BK) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sıcaklığın bir fonksiyonu olarak ağırlık kaybı izlenmiştir. Yüzey element kompozisyonu ve tespit edilen elementlerin kimyasal ortamının değerlendirilmesi X-ışını foto elektron spektroskopisi (XPS) ile incelenmiştir. Toz halindeki f-KNF ve KNF ölçüm yüzeyine yerleştirilir. Ölçüm K-Alpha X-ışını fotoelektron spektrometresi sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Ölçülerde yüksek çözünürlük ve haritalama taramaları yapılmıştır. Yüklenme nötralizasyonu akış tabancası kullanılmıştır. Son olarak, KNF fonksiyonelleştirilmesi sırasında kimyasal yapıda meydana gelen değişimleri incelemek amacıyla FTIR analizi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla KNF ve f-KNF tozları oda sıcaklığında ATR-FTIR Spektrofotometre (Agilent Technologies, ABD) kullanılarak spektrumlar 4000 ve 600 cm⁻¹ aralığında ölçülmüştür.

3.3.2 Homojen KNF Çözeltisinin Mikro Kanallara Kaplanması ve Karakterizasyonu

PGS elastomerlerin kanallarına yüklenmesi yüklenen çözelti miktarının optimizasyonuna ve KNF'lerin kanal içerisinde homojen kaplanmasına dayanmaktadır. Kanal içerisine yüklenecek çözelti miktarının belirlenebilmesi için 500 µL kanallı elastomerin SEM görüntüsünde ölçülen değerlerden yola çıkarak hesaplanmıştır. Buna göre SEM analizinde kanalın üçgen prizma benzeri bir şekle sahip olduğu gözlenmiş ve üçgen prizma hacminden yola çıkarak kanal içerisinde yüklenecek miktar belirlenmiştir.

Yüklenecek çözelti miktarı optimize edildikten sonra kanal kaplanması için farklı metotlar denenmiştir. İlk olarak lazer ışını etkisiyle PGS elastomerin yüzeyinin degrade olmasından yararlanılarak KNF'in yapıştırılması amaçlanmıştır. Kaplama çalışmalarında kullanılmak üzere % 1'lik f-KNF-DI (a/h) çözeltisi 6 saat sonikasyon ile hazırlanmış ve optimize edilen yükleme çözeltisi miktarı kadar kanal içerisine eklenmiştir. Bu doğrultuda lazer kesimi ardından elastomer soğumadan çözelti kanala yüklenmiş ve iskeleler çeker ocak altında kuruması için bekletilmiştir. Diğer bir kaplama yöntemi olarak iskeleler lazer kesimi ardından soğutulmuş ve çözelti kanal içerisine mikropipet yardımıyla yüklendikten sonra 10 mbar altında vakumlu etüv (Memmert, Almanya) içerisinde 55°C'de 2 saat bekletilmiş, ardından çeker ocak altında soğumaya bırakılmıştır. Son olarak lazer ile kesilen elastomerler soğutulduktan sonra çözelti kanal içerisine yüklenmiş ve fan yardımıyla 50-60°C sıcaklığında hava ile kurutulmuştur. Kurutma işlemi sırasında kanal içerisinde oluşan baloncuklar 22 g iğne ucu yardımıyla kaldırılarak homojen bir kaplama yapılması sağlanmıştır. Ardından f-KNF'in tamamen yüzeye tutunması için elastomerler 55°C'de 2 saat bekletilmiş ve soğumaya bırakılmıştır.

Belirtilen yöntemler sonucunda elastomerlerin kaplama başarıları morfolojik olarak değerlendirilmiş ve optimize edilen kaplama yöntemi ile hazırlanan iskelelerden 1 cm²'lik örnek alınarak SEM ve enerji dağılım spektrometre (EDX) uygulanmıştır. Analiz için malzeme yüzeyi iletken altın (Au)-paladyum (Pd) ile kaplanmıştır. Analiz sırasında farklı büyütme oranlarında malzemelerden görüntüler alınmış ve yüzeydeki f-KNF kaplaması incelenmiştir.

3.3.2.1 PGS Elastomerinin Kanallarına Kaplanmış f-KNF'nin Sitotoksitesite Analizi

f-KNF materyalinin sitotoksitesitesini belirlemek ve çözelti konsantrasyonunu optimize etmek için f-KNF/PGS ve PGS elastomerleri MTT testine tabi tutulmuştur. % 0,5 (a/h) konsantrasyonda DI içerisinde hazırlanan f-KNF çözeltisi 6 saat sonikasyon ardından optimize edilen kaplama yöntemi ile kaplanmıştır.

Analiz için Bölüm 3.1.3.7.2' de anlatıldığı malzemeler sterilizasyon işlemine tabi tutulmuş ve ardından MTT analizi yapılmıştır. Analiz sonunda optik yoğunluk verileri,

kontrol olarak kabul edilen normal koşullarda kültür kabında çoğaltılan hücrelerin değerlerinden yola çıkarak hesaplanmış, % hücre canlılığı bulunmuştur.

3.3.2.2 Apoptoz ve Nekroz Boyama ile Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi

Hem canlı hem de cansız hücrelerin aynı anda görselleştirilmesi için floresan boyalar AO ve PI kullanılarak alternatif canlılık deneyleri geliştirilmiştir. Bölüm 3.1.3.7.3 'te anlatıldığı gibi L929 hücreleri f-KNF/PGS elastomerinin ekstraktı ile etkileştirilmiş ve AO/IP boyamasına tabi tutulmuştur. Elde edilen görüntüler kontrol grubu ile karşılaştırılarak sunulmuştur.

3.4 Magnezyum/PGS Kompozitinin Geliştirilmesi

Magnezyum (Mg) alaşımları, yüksek biyouyumluluk, kabul edilebilir mekanik özellikleri, aktif kimyasal özelliği, herhangi bir toksik ve yan etkiye neden olmadan implantasyondan sonra fizyolojik çevrede bozunabilirliği gibi benzersiz özellikleri sayesinde biyomedikal uygulamalar için dikkat çekici olmaya devam etmektedir [80, 81].

Bu nedenle tez çalışmasında kompozit üretiminde sinir hücrelerinin hücresel faaliyetlerini desteklemesi amacıyla ikinci iletken materyal olarak Mg alaşımı seçilmiştir. İki farklı firmadan ticari olarak satın alınan 0,25 mm (Mg-I, Goodfellow, İngiltere) ve 0,81 mm (Mg-K, Alfa Aesar, ABD) kalınlıklarındaki AZ31 Mg alaşım (Mg 96/Al 3/Zn 1) folyoları morfolojik, fiziksel ve kimyasal özellikleri karakterize edilerek etkinlikleri değerlendirilmiş ve karşılaştırılmıştır.

3.4.1 Magnezyum Alaşımlarının Karakterizasyonu

3.4.1.1 SEM ve EDX Analizi ile Morfolojik ve Yüzey Özelliklerinin Değerlendirilmesi

Ticari olarak satın alınan 0,25 mm (Mg-I) ve 0,81 (Mg-K) mm kalınlıklarına sahip magnezyum alaşım folyoların yüzey özelliklerinin (oksit vb.) gözlenebilmesi ve malzeme yüzeyindeki element dağılımı % olarak ölçmek için malzemelerde 1 cm²'lik örnekler alınmış SEM ve enerji yayımlı X-ışını (EDX) analizi uygulanmıştır. Mg folyolar

herhangi bir biyolojik materyal içermediği için herhangi bir fiksasyon ve kurutma işlemine tabi tutulmamış, iletkenliklerinden dolayı herhangi bir kaplama yapılmamıştır. Görüntüleme sırasında 15 kV hızlandırma voltajı ile 500X görüntü alınarak EDX analizi yapılarak elemental içerik belirlenmiştir.

3.4.1.2 XPS Analizi

Mg alaşımlarının yüzey elemental analizi XPS analizi ile belirlenmiş, yapıda bulunan atomlara ait bağlanma enerjisi (BE) pikleri incelenerek iki alaşım arasındaki farklılıklar değerlendirilmiştir.

3.4.1.3 Degradasyon Özelliklerinin Belirlenmesi

Çalışma kapsamında Mg alaşımları *in vitro* olarak bozunma davranışlarını incelemek amacıyla PBS, DI ve % 10 FBS (h/h), % 1 l-glutamin (h/h) ve % 1 AA (h/h) içerikli olarak hazırlanan DMEM besiyeri içerisinde 28 günlük degradasyon çalışmasına tabi tutulmuştur. Test öncesinde, numuneler 10 × 10 mm boyutlarında kesilmiş, izopropanol (Sigma, ABD) içinde ultrasonik olarak temizlenmiş ve kurutularak tartılmıştır. İnce ve kalın Mg grupları için her çözeltide 4 numune üzerinden yapılan çalışmada numuneler 15 mL falkon içerisine yerleştirilmiş, 37°C'de 30 rpm karıştırma hızında muamele edilmiştir. Degradasyon çalışmasının belirli günlerinde numuneler falkondan çıkartılarak inkübasyon çözeltilerinin pH kontrolü yapılmış, örnekler görüntülenerek kurutulmuştur. Tartım işlemi gerçekleştirilen numunelerin degradasyon çalışmasına devam edilmiştir. 28. gün sonunda elde edilen alaşımlara ait zamana göre % ağırlık kaybı grafiği çizilmiş, ilgili günlerde ölçülen pH değerleri paylaşılmıştır. Ayrıca 28 gün sonunda Mg alaşımlarda meydana gelen degradasyonun ayrıntılı olarak incelenebilmesi için SEM analizi ile görüntülenmiştir. Bunun yanı sıra numunelerin yüzey element kompozisyonu, 15 kV hızlandırma voltajı ile 1000X orijinal büyütmede EDX kullanılarak ölçülmüştür. SEM analizi öncesinde tamamen kuru halde olan numuneler iletken oldukları herhangi bir kaplama yapılmamıştır.

3.4.1.4 Mg Alaşımlarının Hücreler Üzerindeki Sitotoksite Analizi

Mg-I ve Mg-K alaşımlarının hücre canlılığı üzerindeki etkisinin değerlendirilebilmesi için Bölüm 3.1.3.7.2'de anlatıldığı gibi derişim bağımlı (% 100, % 50 ve % 25) ekstraksiyon ortamı ile MTT analizi gerçekleştirilmiştir.

3.4.1.5 Apoptoz ve Nekroz Boyama ile Mg Alaşımlarının Hücre Canlılığı üzerindeki Etkisinin Değerlendirilmesi

Apoptoz/nekroz boyama ile hücrel davranışlarının incelenmesi için Bölüm 3.1.3.7.3'te anlatıldığı gibi L929 hücreleri Mg-I ve Mg-K ile etkileştirilmiştir. Elde edilen görüntüler kontrol grubu ile karşılaştırılarak sunulmuştur.

3.4.2 Mg/PGS Kompozitinin Geliştirilmesi

Mg folyo ile PGS elastomerinin birleştirilmesi için çeşitli metotlar denenmiş ve en başarılı olan optimize edilmiştir.

3.4.2.1 Magnetron Püskürtme Yöntemi ile PGS Elastomerlerin Yüzeylerini İletken Mg alaşımı ile Kaplanması

Magnetron püskürtme, iyi homojenlik, düşük biriktirme sıcaklığı ve yüksek mekanik/optik bütünlük ve stabiliteye sahip kompakt filmleri çökeltme yeteneği gibi avantajları nedeniyle oksitleri, nitrürleri ve oksinitrür ince filmleri biriktirmek için etkili bir işlemdir [82].

Püskürtme odası, püskürtmeden önce $5.0E^{-5}$ Torr'a kadar boşaltılmış halde bekletilen cihazın basıncı ortam şartlarına getirilmiştir. Cihaz kapağı açıldıktan sonra PGS elastomerler plaka tutucu üzerine birbiri üzerini kapatmayacak şekilde yerleştirilir. Mg-K alaşımı ise kullanılacak magneton üzerine yerleştirilerek sabitlenir ve cihaz kapatılır. Cihaz vakumlanarak istenen basınç düşürülür ve içerisi Ar ile doldurulmuştur. Numunelere yapılan kaplamanın kalınlığının kontrolü için içeriğini sağlamak için bir püskürtme prosedürü sırasında aynı anda kontrol için metal disklerle aynı boyutta bir silika numunesi de örneklerin yanına konulmuştur.

Aşındırma işlemi için Mg alaşımı iletken olduğu için DC güç kaynağı kullanılmıştır. Her biriktirmeden önce, substratlar, oksitin Mg alaşım yüzeyinden uzaklaştırılması ve kaplama yapışmasının artırılması için 60 dakika süreyle DC iyon püskürtme ile aşındırılmıştır. Voltaj değeri düzene girdikten sonra örneklerin üzerindeki kapak açılarak kaplama işlemine başlanır. İstenen kalınlığa göre optimize edilen sürenin ardından aynı işlemler tam tersi şekilde yapılarak cihazdan numuneler çıkartılır.

Çalışma kapsamında püskürtme yöntemi ile PGS elastomer yüzeyleri farklı kalınlıklarda kaplanarak iskeleler görüntülenmiştir. Hazırlanan iskelelerin *in vitro* çalışmalarda davranışlarının incelenebilmesi için DMEM, EtOH ve PBS içerisine daldırılmış, çözelti içerisinde bekletildikçe kaplama özelliklerinde meydana gelen değişiklikler incelenmiştir.

Yüzeydeki kaplama davranışını daha iyi gözlemlemek adına 13 mm çaplı PGS elastomer diskler hazırlanmış ve optimize edilen püskürme ile kaplama parametreleri altında kaplama kalınlığı ~250 nm olacak şekilde yüzeyi Mg alaşım ile kaplanmıştır. Mg kaplamanın morfolojik olarak incelenebilmesi için hazırlanan bu disklere SEM ve EDX analizleri uygulanmıştır. PGS elastomerler yalıtkan olmasına rağmen yüzeyde iletken Mg alaşım kaplamasından dolayı analiz öncesinde herhangi bir kaplama yapılmamıştır.

3.4.2.1.1 Modifikasyonlar

Magnetron püskürtme işlemi sonucunda hazırlanan Mg-kaplı PGS iskelelerin yüzey kaplamalarının homojen ve başarılı olduğu belirlenmiştir. Ancak *in vitro* koşullarda bu kaplamanın PGS üzerinde çok hızlı çözüldüğünü gördükten sonra bu kaplamanın dayanımını arttırmak amacıyla literatürde de yaygın olarak bulunan çeşitli modifikasyon yöntemleri denenmiştir. Modifikasyonlar sonrasında elde edilen kompozitler DI içerisine bırakılarak modifikasyonun başarısı işlem görmemiş elastomere göre değerlendirilmiştir.

a. Silanlama İşlemi:

PGS elastomer yüzeyine kaplanan Mg alaşımının korozyon direncini arttırmak için (3-aminopropil) trietoksisilan (APTES) ile kaplama yapılmıştır. Oda sıcaklığında desikatör içerisinde teflon kaba 300 µL APTES eklenmiş ve malzemeler bu kabın etrafına yerleştirilmiştir. Oksijeni ortamdan uzaklaştırmak adına desikatör içerisindeki hava pompa yardımıyla çekilmiş daha sonrasında vakum altında inert argon gazı (Ar) ile desikatör doldurulmuştur. Tamamen Ar gazı ile doldurulduktan sonra desikatör vakumlanarak vakumlu ortamda 3 saat bekletilmiştir. Süre sonunda APTES'in bulunduğu teflon kalıp çıkartılmış, ortamdaki oksijeni uzaklaştırmaya yönelik aşamalar tekrarlandıktan sonra malzemeler 48 saat boyunca vakumlu haldeki desikatör içerisinde bırakılmıştır. Diğer bir açıdan, silan ile yapılan birçok çalışma silanlama prosesi öncesi alkali uygulamasının gerekli olduğunu göstermektedir. Bu nedenle silanlama işlemi öncesi 60°C'de 3 M NaOH uygulaması uygulanmış ve ardından malzeme kurutulmuştur. Ardından ön işlemlenmiş malzemeler bahsedilen yöntemle silanlanmıştır. Çalışma sonunda malzemelerin korozyon özellikleri değerlendirilmesi için ön işlemlenmiş silanlanmış (Mg-PGS-NaS), silanlanmış (Mg-PGS-S) ve işlem görmemiş diskler (Mg-PGS) karşılaştırılmıştır.

b. Isı ile Muamele:

In vivo koşullarda yüzey erozyonu tarzında bozulan PGS elastomeri düşük vakum ve yüksek sıcaklıkla polikondenzasyon tepkimesi ile sentezlenir. Yüzeyde bulunan Mg kaplamanın yüzeye daha sıkı bağlanabilmesi için PGS elastomeri sentezlenirken daha az miktarda çapraz bağlanmış ve kaplama sonrası çapraz bağlanma ortamı yaratılmıştır. 12 saat çapraz bağlanan PGS elastomerinden oluşturulan diskler üzerine Mg alaşımı kaplanmış, hazırlanan malzemenin yapısında bulunan monomerlerin çapraz bağlanması için vakumlu etüvde 150°C'de 2 saat bekletilmiştir. İşlem sonrası numune soğumaya bırakılmış ve etkinliği değerlendirilmiştir.

c. Yüzey Plazma Uygulaması:

Kaplama işlemini takiben yüzey çözünürlüğünü azaltmak için endüktif eşleşmiş plazma uygulanmıştır. Plazma, korozyon ve aşınmaya karşı koruma için kullanılan geleneksel anodlamadan türetilen umut verici bir yüzey işleme sürecidir. Kaplama sonrasında

iskeleler üzerine 300 W'da 6 dk plazma uygulanmış, işlem sonrası kompozit işlem görmemiş ile karşılaştırılmıştır.

d. Lazer Uygulaması:

Mg alaşımın korozyon direncini arttırmaya yönelik yapılan diğer bir çalışma lazer ile yüzey muamelesidir. PGS elastomeri yüzeyinde kanal yapısının oluşturulmasında kullanılan CO₂ lazer cihazı (Nova 7, Almira Lazer) ile 200 tarama hızında 12 Watt'da tüm yüzey taranmış ve elde edilen malzeme Mg-PGS-L'nin dayanımı değerlendirilmiştir.

3.4.2.2 Mg Tel Kullanılarak Mg/PGS Doku İskelesinin Üretimi

Magnetron püskürtme yöntemine ile iskele üretimine alternatif olarak Mg alaşım folyolarından tel olarak şekillendirilmesi ve bu şekilde PGS elastomeri ile birleştirilmesi düşünülmüştür. Bu amaçla Mg alaşımı giyotin (Mühlen Sage-GL-410-A4, Almanya) 400-500 µm kalınlığında Mg telleri kesilmiş uç kısımlarından birbiri etrafında 4 tur sarılmıştır. Bu 4 tur 30 mm uzunluğundaki PGS elastomerinin orta tarafındaki 10 mm'lik kısmında olacak şekilde sarım sıklığı ayarlanmıştır. Hazırlanan Mg telinin PGS elastomeri ile birleştirilmesi için CO₂ lazer yardımıyla PGS elastomeri 15 mm x 30 mm boyutlarında kesilmiş ve ardından iskeleler bir tutacak içine dik bir şekilde yerleştirilerek lazer cihazının Pulse modunda % 95 güç ile lateral dört adet delik açılmıştır. Delik kalınlığı 500 µm olarak belirlenmiştir.

Hazırlan birbirine sarılan Mg teller bu 4 kanaldan geçirilmiş ve CO₂ lazer yardımıyla PGS elastomer yüzeyinde kanal oluşturma parametreleri kullanılarak Mg telleri kanalın duvarına gelecek şekilde kanallar açılmış ve böylece Mg/PGS kompoziti üretilmiştir.

3.5 Doku İskelelerinin Karakterizasyonu

Çalışma kapsamında geliştirilen PGS, f-KNF ve Mg/PGS doku iskelelerinin morfolojik, fiziksel ve kimyasal özellikleri çeşitli analizlerle değerlendirilerek iskele başarıları karşılaştırılmıştır.

3.5.1 Doku İskelelerinin Morfolojik Olarak Değerlendirilmesi

Son hale getirilen PGS, f-KNF/PGS ve Mg/PGS doku iskeleleri görüntülenmiş, kanal içerisindeki yüzey morfolojileri SEM analizi ile ayrıntılı olarak incelenmiştir. Böylece f-KNF ve Mg katkısının elastomer görünümündeki değişiklik gösterilmiştir. İskeleler SEM analizi öncesinde Au/Pd kaplamaya tabi tutulmuş, kanalların genel görüntüleri alınmıştır.

3.5.2 Doku İskelelerinin Mekanik Özelliklerinin İncelenmesi

Geliştirilen iskelelerin mekanik dayanımlarını belirlemek ve materyal katkısını karşılaştırmak için elastomerler çekme testine tabi tutulmuştur. Analiz için her gruptan boyutları bilinen 4 adet doku iskelesi (10 mm x 20 mm x 2 mm) hazırlanmış ve 50N'luk yük hücresi altında 50 mm/dk çekme hızı koşullarında mekanik teste tabi tutulmuştur. Malzemenin çekme mukavemeti, % uzama miktarı ve Young modülüsleri elde edilen sonuçlardan hesaplanmıştır.

3.5.3 Doku İskelelerinin İletkenliğinin Ölçülmesi

Geliştirilen f-KNF/PGS ve Mg/PGS doku iskelelerinin kanalların iletkenlik ölçümü, ortam sıcaklığında sabit bir akımda standart bir dört noktalı bir prob yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her bir substrat grubunun farklı kanallarından çeşitli ölçümler alınmıştır. Dört noktalı prob cihazı, voltaj değerini ölçer. Doku iskelelerinin germe işlemi ardından iskele iletkenliğinde meydana gelen değişim iki noktalı prob yöntemi ile ölçülmüş çekme öncesi (çekme ö.), çekme sırasında (çekme) ve çekme sonrası (çekme s.) değerleri iletkenlik ve direnç değerleri belirlenmiştir.

3.5.4 Doku İskelelerinin Degradasyon Davranışlarının Değerlendirilmesi

PGS, f-KNF/PGS ve Mg/PGS iskeleleri *in vitro* koşulları taklit edilerek yapılan 28 günlük degradasyon çalışmasında 5 farklı zaman noktasında iskelelerin ağırlık değişimleri kontrol edilmiştir.

Çalışma öncesinde ağırlık ölçümleri yapılan iskeleler (her zaman noktası için n=4), 28 boyunca Ringer çözeltisi (pH=7) içerisinde 37 °C'de 30 rpm sabit karıştırma hızında

çalkalanmıştır. Dört farklı zaman noktasında örnekler 50 °C sıcaklıktaki vakumlu etüv içerisinde kurutulup tartılmıştır. Çözelti her hafta değiştirilerek taze çözelti eklenmiştir. Doku iskelelerinin yüzde kütle kaybının hesaplanması için Bölüm 3.1.3.8.1’de verilen *Formül 3* kullanılmıştır.

3.6 In Vitro Çalışmalar

Çalışma kapsamında geliştirilen doku iskeleleri üzerindeki kanallarda PC12 ve S42 hücrelerinin hücre proliferasyonu, iskele-hücre etkileşimi gibi hücresel davranışlarını incelemek ve karşılaştırmak amacıyla ayrı ayrı 14 günlük *in vitro* hücre kültürü çalışmaları yapılmış, karakterizasyon testleri incelenmiştir.

3.6.1 PC12 Hücre Kültürü

3.6.1.1 Hücrelerin Kültüre Edilmesi

Bu çalışma için sinir doku mühendisliği çalışmalarında sık kullanılan nöron benzeri hücre hatları arasında, sıçan adrenal medulla nöroendokrin hücrelerinden (feokromositoma) kurulmuş olan PC12 hücre hattı (PC12 (ATCC® CRL-1721™, ABD) ticari olarak satın alınmıştır. PC12 hücreleri, RPMI 1640 DMEM 4,5 g/L D-glukoz w L-Glutamin w 25 mM HEPES (ATCC, ABD) (h/h), % 10 at serumu (HS, Capricorn, Almanya) (h/h), % 5 FBS (h/h), % 0.5 AA (h/h) içeren kültür ortamında BioCoat™ kolajen I kaplı T75 ticari flasklar (Corning, Kanada) kullanılarak 37 °C’de % 95 nem ve % 5 CO₂ içeren ortamda inkübe edilmiştir. Hücre belirli bir yoğunluğa ulaştıktan sonra gerçekleştirilen pasajlanma sırasında hücrelere zarar vermemek adına Tripsin, EDTA gibi kimyasal ajanlar kullanılmadan hücre besiyeri ortamı basınçlı bir şekilde flask yüzeyine püskürtülerek hücreler yüzeyden kaldırılmıştır. 15 mL’lik falkona toplanan hücre süspansiyonu 220 g’de 8 dk santrifüjlenmiş, daha sonrasında hücre peleti üzerindeki süpernatant dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Taze besiyeri ile homojenize edilen hücrelerin kümelenmeye eğilimleri dolayısıyla hücre süspansiyonu 3 kez 22 ölçü şırıngadan geçirilmiş ve kolajen I kaplı flasklara ekilmiştir.

Çalışma kapsamında pasajlanan hücrelerin dondurularak muhafaza edilmesi için saklanabilmesi için besiyeri ve DMSO karışımından (9:1 (h/h)) oluşan dondurma vasatı

hazırlanmış, pasajlama sonrası hücreler dondurma vasatında süspanse edilerek kriyojenik tüplere 1 mL olarak eklenmiştir. Hazırlanan vialler kullanıma kadar sıvı azot içerisinde -196 °C'de içerisine saklanmıştır.

3.6.1.2 Doku İskelelerinde PC12 Hücreleri Kültür Çalışması

Yüzeyinde 4 adet 500 µL kanal bulunan PGS, f-KNF/PGS ve Mg/PGS doku iskelelerinin kanal içerisinde PC12 hücre davranışının değerlendirilmesi amacıyla iskeleler hazırlanmıştır. İskeleler 3.1.4.8.2'de bahsedilen sterilizasyon işlemi ile muamele edilmiştir.

Steril iskelelerin her bir kanala 20 µL hücre-besiyeri karışımı içerisinde 5×10^5 hücre olacak şekilde hücre ekimi gerçekleştirilmiş, hücre yapışması için 3 saat boyunca inkübe edilmiştir. Süre sonunda her bir iskele üzerine 3 mL besiyeri eklenmiş ve iki günde bir besiyeri değiştirilerek 14 günlük kültür çalışması yürütülmüştür.

3.6.1.2.1 Alamar Mavisi Yöntemi ile PC12 Hücrelerinin Proliferasyonun İncelenmesi

İskelelerin üzerinde PC12 hücrelerinin çoğalma kabiliyetinin değerlendirilmesi amacıyla kültürün 1., 4., 7., 10. ve 14. günlerinde iskelelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırılmış yerine alamar mavisi çözeltisi (Besi ortamı + % 10 alamar mavisi solüsyonu (h/h)) eklenmiştir. 6 saat inkübasyon süresi ardından her bir kuyucuktan 5 örneklem olacak şekilde 200 µL alınarak 96 kuyucuklu kültür kabına yerleştirilerek mikropilaka okuyucu yardımıyla okunmuştur. Çalışmada referans çözelti olarak her iskelenin hücresiz halinin aynı alamar mavisi çözeltisi ile 6 saat inkübasyonu sonucunda elde edilen çözelti kabul edilmiştir. Hücre üreme yüzdesinin hesaplanması için ilgili iskelenin referans çözeltisinin absorbans değerinden hücreli iskelenin absorbans değeri çıkartılmış ve sonuç kaydedilmiştir.

3.6.1.2.2 SEM Analizi ile Hücre Morfolojisinin Görüntülenmesi

Elastomer kanalları içerisinde hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerinin incelenebilmesi ve iskele başarısının değerlendirilmesi amacıyla alamar mavisi testinin yapıldığı kültür günlerinde SEM analizi gerçekleştirilmiştir. İlgili kültür günlerinde besi ortamları iskele üzerinden uzaklaştırılmış yerine % 4 paraformaldehit eklenerek 45 dk süresince hücreler fikse edilmiştir. Süre sonunda artık fiksasyon ajanının uzaklaştırılması amacıyla iskeleler 3 kez DI ile yıkanmıştır. İskelelerin analiz öncesinde kuru halde olması hücre görüntülemesi açısından oldukça önemlidir. Bu nedenle iskeleler dehidrasyon işlemi için kademeli alkol serisinden (% 30, % 50, % 70, % 90 ve % 100 (h/h)) geçirilmiş, ardından tamamen suyun buharlaştırılması için HMDS eklenerek iskeleler tamamen kuruyana kadar çeker ocak altında bekletilmiştir. Analiz öncesinde Au/Pd karışımı ile kaplanan örnekler görüntülenerek hücre davranışları incelenmiştir.

3.6.1.2.3 Floresans Boyama ile Hücre Davranışlarının İncelenmesi

Hücre hareketi ve davranışlarını görüntülemeye yönelik yapılan çalışmalar arasında canlı hücreler için toksik olmayan ve floresan ışığa yapan özel probalar gerektirir. CellTracker Red CMTPX floresan probu hücre hareketini, konumu, proliferasyonu, migrasyonu, kemotaksiyi ve istilayı izlemek için elverişli bir boyalardır.

Çalışma kapsamında hücresel olayların görüntülenmesi ve iskeleler üzerindeki PC12 hücre canlılığını karşılaştırılması için CMTPX boyası kullanılmıştır. Bu boya canlı hücrelerin kırmızıya boyanmasını sağlamıştır.

PC12 hücreleri T75 flask içerisinde hücre yoğunluğu % 90'a ulaştıktan sonra yüzeyden kaldırılmış, 220 g'de 8 dk santrifüjlenerek hücre çöktürülmüştür. Diğer tarafta CMTPX boyası çözeltisi hazırlanması için 1 mL PBS içerisine 5 µL CMTPX boyası eklenmiştir. Homojenize edildikten sonra çöktürülen hücre üzerine eklenmiştir. Hücreler boya çözeltisi içerisinde homojenize edildikten sonra inkübatörün içinde 45 dk inkübasyona bırakılmıştır. Bu işlemler boyanın ışık duyarlılığı nedeniyle karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda hücre-boya süspansiyonu 220 g'de 8 dk

santrifüjlendikten sonra boya çözeltisi uzaklaştırılmış, hücreler besi ortamında homojenize edilerek sayımı yapılmıştır.

Boyanan hücreler doku iskelelerine her kanal içerisinde 5×10^4 hücre olacak şekilde standart hücre ekim çalışması yapılarak 14 günlük kültürü başlatılmıştır. Görüntüleme günlerinde iskeleler üzerindeki besiyeri uzaklaştırılmış, iskeleler petri üzerinde ters bir şekilde konularak Texas Red filtresi kullanılarak 577 nm eksitasyon ve 602 nm emisyon aralığında görüntülenmiştir.

3.6.2 S42 Hücre Kültürü

3.6.2.1 S42 Hücrelerin Kültüre Edilmesi

Kültür çalışmaları için kullanılan ikinci hücre hattı sinir doku mühendisliği çalışmalarında kullanılan diğer bir hücre hattı S42 Schwann hücre hattı ATCC® CRL-2942™, ABD) ticari olarak satın alınmıştır. S42 hücreleri, yüksek glikoz içerikli DMEM, 1 mM sodyum pürivat ve 1500 mg/L sodyum bikarbonat (ATCC, ABD), % 10 FBS (h/h), % 1 AA (h/h) içeren kültür ortamında T75 flasklar içerisinde kullanılarak 37 °C’de % 95 nem ve % 5 CO₂ içeren ortamda inkübe edilmiştir. Belirli hücre yoğunluğuna ulaşıldıktan sonra Tripsin/EDTA Solution B ile hücreler yüzeyden tripsinlenerek kaldırılmıştır. Hücre süspansiyonu 130 g’de 8 dk santrifüjlendikten sonra süpernatant pastör pipet yardımıyla çekilmiş ve üzerine 2 mL besi ortamı eklenerek hücreler pipetaj işlemi ile homojenize edilmiştir. Elde edilen süspansiyon yeni bir T75 flaska eklenerek kültüre devam edilmiştir. Hücre dondurmak amacıyla hücreler dondurma vasatı (besiyeri:DMSO, 9:1 (h/h)) içerisinde süspansiyon edilerek kriyotüpler içerisinde -196°C’de içerisinde saklanmıştır.

3.6.2.2 Doku İskelerinde ile S42 Hücreleri Kültür Çalışması

Hazırlanan PGS, f-KNF/PGS ve Mg/PGS doku iskeleleri Bölüm 3.1.3.8.2’ e bahsedilen sterilizasyon işlemi ile steril edilmiş ve yüzey kanallarına 5×10^5 hücre ekimi yapılmıştır. Hücre yapışması için 3 saat inkübe edilmesinin ardından hazırlanan DMEM besi ortamı eklenerek CO₂ etüv içerisinde 14 gün kültüre edilmiştir.

3.6.2.2.1 Alamar Mavisi Yöntemi ile S42 Hücrelerinin Proliferasyonunun İncelenmesi

S42 hücrelerinin doku iskeleleri kanallarında proliferasyonun incelenmesi için Bölüm 3.6.2.2.1’ de anlatılan alamar mavisi yöntemi uygulanmıştır. İlgili kültür günlerinde iskeleler ile 6 saat etkileştirilen boya çözeltisi, süre sonunda toplanarak optik yoğunlukları ölçülmüş, bu değerlerden yola çıkarak hücre canlılığı değerlendirilmiştir.

3.6.2.2.2 SEM Analizi ile S42 Hücre Morfolojisinin Görüntülenmesi

Doku iskeleleri kanallarında bulunan hücrelerin görüntülenmesi için yapılan SEM analizi Bölüm 3.6.2.2.2’de bahsedilen şekilde yapılmıştır. Analiz sonrasında elde edilen görüntüler üç iskele içinde incelenmiş ve karşılaştırılmıştır.

3.6.2.2.3 Floresan Boya ile Hücresel Davranışın İncelenmesi

Alamar mavisi yönteminin yanı sıra hücre canlılığının değerlendirilmesi için uygulanan diğer bir yöntem CMTPX floresan boyamasıdır. Bölüm 3.6.2.2.3’ de anlatıldığı üzere doku iskelelerine hücre ekim işlemi öncesinde S42 hücreleri boya çözeltisi ile inkübe edilmiş, boyanan hücreler kanal içerisine ekilmiştir. 14 günlük kültür boyunca floresan mikroskobu ile hücrelerin kanal içindeki faaliyetleri değerlendirilmiştir.

3.6.2.2.4 Konfokal Analizi ile Hücre Canlılığının İzlenmesi

Hücre canlılığı, hücrelerin uzun vadeli sağ kalımını değerlendirmek için doku mühendisliği ve kültür çalışmalarında önemli bir parametredir. PGS, f-KNF/PGS ve Mg/PGS örneklerinin S42 hücrelerinin canlılığının değerlendirilmesi amacıyla uygulanan diğer bir yöntem, canlı/ölü boyama testi (Invitrogen, ABD) kullanılarak konfokal mikroskobunda incelenmesidir.

Kalsein AM (CaAM) / Etidyum Homodimer-1 (EthH) boya, canlı ve ölü hücreleri doğrudan doku veya yapı iskelesinde boyamak için kullanılmaktadır. CaAM enzimatik olarak canlı hücrelerde kalsein'e hidrolize edilir ve yeşil floresan ışığa yayılır. Öte yandan EthH, yalnızca riskli bir zara sahip hücrelere girebilir ve nükleik asit floresan kırmızısı

boyar. CaAM, 495 nm eksitasyon ve 515 nm emisyon aralığında incelenirken EtH, 495 nm eksitasyon, 635 nm emisyon aralığında ışımaya verir [83].

Kültür çalışmasının 1., 4., 7. ve 14. günlerinde canlı-ölü boyama analizi için yapabilmek için malzeme üzerindeki besi ortamı uzaklaştırılarak PBS yıkaması yapılmıştır. Diğer tarafta boya çözeltisini hazırlamak için 1 mL PBS içerisine 1 μ M CaAM ve 2 μ M EtH eklenmiştir. 6 kuyucuklu kültür kabında yapılan çalışmada hazırlanan bu boya çözeltisinden her örneğin üzerine 300 μ L olarak eklenmiştir. Yıkama işlemi tamamlanan örneklerin üzerine 1 mL PBS eklenmiş ve ardından boya çözeltisi her örnek üzerine eklendikten sonra 30 dakika boyunca CO₂ etüvünde inkübe edilmiştir. Süre sonunda boya çözeltisi kuyucuklardan uzaklaştırılarak örnekler 2 kez yavaşça PBS ile yıkanmıştır. Son olarak örneklerin üzerine 3 mL PBS ilave edilerek görüntüleme işlemine kadar muhafaza edilmiştir. İskeleler konfokal mikroskobu (SP8 X, Leica Model, Almanya) aracılığıyla incelenmiştir.

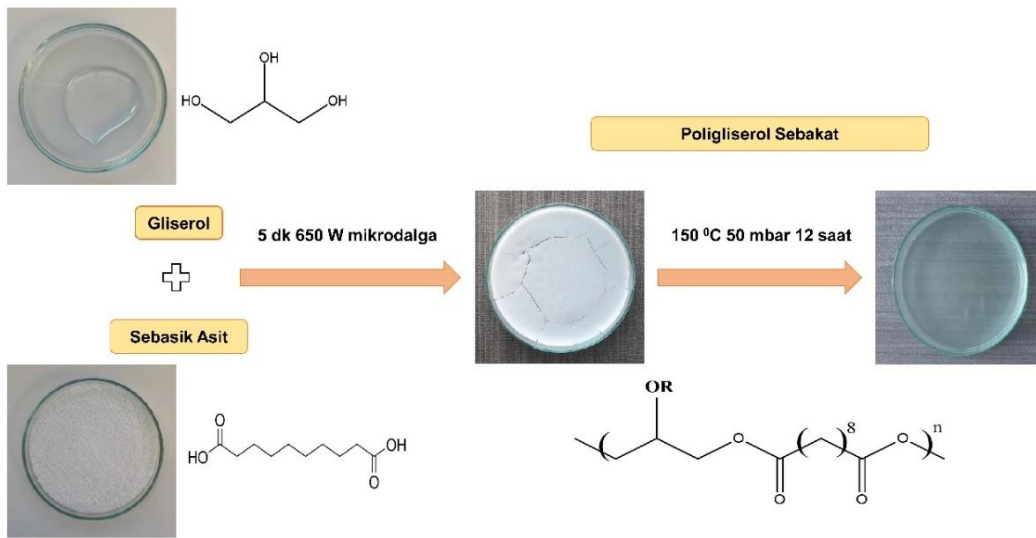
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Tez çalışması beş temel başlıkta oluşturulmuştur. Bunlar;

- PGS elastomerinin optimizasyonu ve karakterizasyonu;
- Karbon nanofiber/PGS kompozitinin geliştirilmesi ve f-KNF karakterizasyonu;
- Magnezyum/PGS kopolizinin geliştirilmesi ve Mg alaşımlarının karakterizasyonu;
- Doku iskelelerinin karşılaştırılması ve son olarak
- PC12 ve S42 hücreleri ile yapılan *in vitro* çalışmalarıdır.

4.1 Poli(gliseroil-sebakat) (PGS) Doku İskelesinin Üretimi ve Optimizasyonu

İki aşamalı bir sentez basamağı ardından elde edilen termoset yapılu PGS elastomeri, yapısında bulunan monomerlerin özellikleri nedeniyle elastomerik bir yapıya sahiptir. Bu fiziksel özellikleri, reaktan karışımının molar konsantrasyonu, çapraz bağlama süresi gibi parametreler ile ayarlanabilmektedir [84]. Çalışmada öncelikli olarak gliserolün molar oranı ve çapraz bağlanma süresindeki değişimin elastomer yapısındaki etkileri değerlendirilmiştir. Şekil 4.1'de PGS elastomerinin sentezlemesi şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 4.1. PGS elastomeri sentezinin şematik gösterimi.

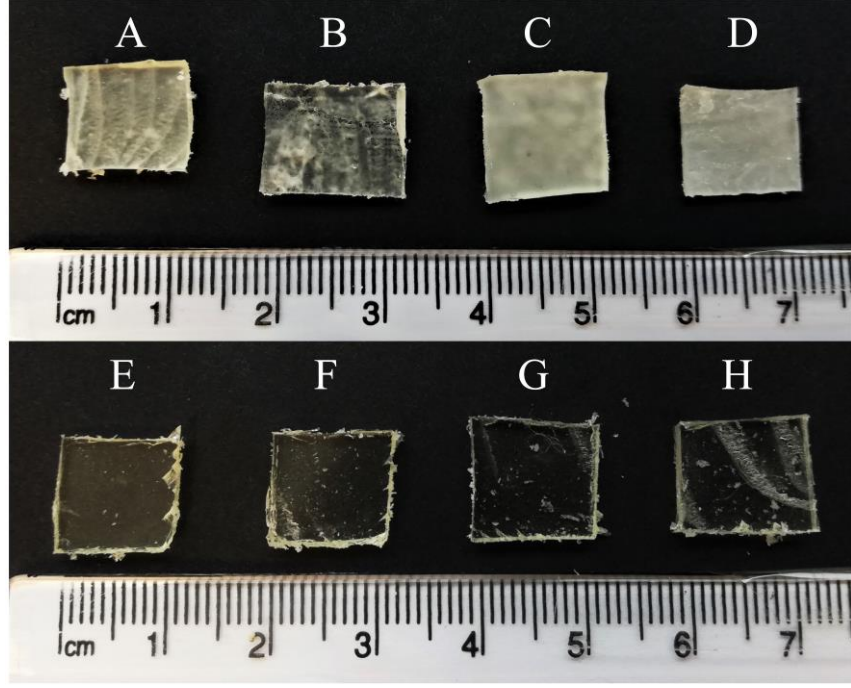
4.1.1 Farklı Gliserol Derişimlerinin Elastomer Yapısına Etkisi

Mekanik mukavemet, hidrofilitiklik, bozunma hızı ve selektivite gibi malzeme özellikleri, elastomerik dokuların işlevini taklit etmek için monomer oranının, polimerizasyon sonrası koşulların ve biyomoleküllerin aşılmasının modüle edilmesiyle uyarlanabilmektedir [85]. Bu anlamda elastomerin monomer oranlarını dokuya uygun şekilde ayarlamak malzeme başarısı bakımından büyük öneme sahiptir.

Gliserol, farmasötik formülasyonlarda ve gıdada yaygın olarak kullanılan ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) onaylı, toksik olmayan, renksiz, kokusuz bir poliol grubu bileşendir. Yapısındaki hidroksil grubunun varlığı nedeniyle suda çözünür. Öte yandan, orta ila uzun zincirli yağ asitlerinin oksidasyonunda doğal bir metabolik ara madde olarak elde edilen sebasik asit, FDA tarafından onaylanan toksik olmayan bir asit monomeridir [35]. Mikrodalga destekli ön polimerizasyon yöntemi kullanılarak sentezlenen bu yöntemde reaksiyon süresinin kısaltarak hem zamandan hem de enerjiden tasarruf sağlamaktadır [86]. Diğer açıdan ön polimerizasyon işlemi sırasında yoğun gliserol buharlaşmasının yol açmaktadır. Bu durum polimer sentezinde SA/G oranda bozulmalara yol açmaktadır [87].

Polikondenzasyon tepkimelerinde önemli bir unsur olan ve sebasik asitte karboksil grupları ile gliseroldeki hidroksil grupları arasındaki reaksiyonun derecesi olarak nitelendirilen esterleşme derecesi (DE), PGS'nin mekanik ve biyodegradasyon özelliklerini etkileyen önemli bir faktördür. Esterleştirme tepkimesi sırasında uçucu özellik gösteren gliserolün kaybı, DE değerini etkileyerek malzemenin fiziksel özelliklerini de etkilemektedir [88]. Mikrodalga destekli ön polimerizasyon işleminde kısa sürede yüksek derecede DE elde edilmesi dokuya uygun özelliklere sahip polimer sentezinde SA/G oranının optimize edilmesini gerektirmiştir.

Bu bilgiler ışığında PGS elastomerinin sentezinde çözücü olarak kullanılan gliserolün farklı kolantrasyonlar (1:1, 1:1,25, 1:1,5, 1:1,75 SA/G) halinde kullanılarak malzeme sentezi gerçekleştirilmiştir. 12 saat ve 24 saat çapraz bağlamanın ardından elde edilen malzemelerin morfolojik görüntüleri Şekil 4.2'de ve fiziksel özellikleri Çizelge 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.2. Farklı gliserol konsantrasyonları içeren PGS malzemeler (A-D elastomerler 12 saat çapraz bağlı: A-1:1, B-1:1,25, C-1:1,5, D-1;1,75; E-H elastomerler 24 saat çapraz bağlı: E-1:1, F-1:1,25, G-1:1,5, H-1;1,75).

Çizelge 4.1. Farklı gliserol konsantrasyonları içeren PGS malzemelerin fiziksel özellikleri.

SA / G	Kürlenme Süresi	Kürlenme Sıcaklığı	Kürlenme Basıncı	Fiziksel Özellikleri
1:1	12 saat	150 °C	50 mbar	Mat, Yapışkanlık az, Esnek
	16 saat			Mat, Yapışkanlık az, Esneklik az
	24 saat			Saydam, Yapışkanlık yok, Kırılğan
1:1,25	12 saat	150 °C	50 mbar	Mat, Yapışkan, Esnek
	16 saat			Mat, Yapışkanlık az, Esneklik az
	24 saat			Saydam, Yapışkanlık yok, Kırılğan
1:1,5	12 saat	150 °C	50 mbar	Mat, Yapışkanlık çok
	16 saat			Mat, Yapışkan, Esneklik az
	24 saat			Saydam ve çok kırılğan
1:1,75	12 saat	150 °C	50 m bar	Mat, Düzgün bir şekil yok
	16 saat			Mat, Yapışkan
	24 saat			Saydam, Şekilsel bozukluk

Buna göre 1:1 oranına sahip malzemelerin saydamlık özelliği düşükken diğer oranlardaki PGS'ler saydam özellik göstermişlerdir. Elastomer yapısındaki gliserol miktarının artması ile malzemenin daha akışkan ve zor işlenebilir hale geldiği tespit edilmiştir. Eş molar monomere sahip PGS'lere çekme kuvveti uygulandığında malzeme dayanımının daha yüksek olduğu gözlenirken 1:1,75 oranında monomere sahip gliserol molaritesinin yüksek gelmesi sonucunda çapraz bağlanmayan serbest -OH uçlarının fazla olması nedeniyle PGS'ler oldukça sünek ve yapışkan haldedir. Liu ve arkadaşlarının yürüttüğü çalışmaya göre SA/G molar oranı azaldığında sebasik asit ile daha fazla hidroksil grubu esterlendiği gözlenmiştir. Bu durum daha fazla çapraz bağlanma noktası oluşmasından veya belirli molekül ağırlığına sahip daha fazla çözünür oligomerler üretilmesinden kaynaklandığı öngörülmüştür. Çünkü hidroksil grupları esterleştirildiğinde, daha fazla reaksiyona girememişlerdir. Sonuç olarak SA/G molar oranı azalması Young modulüs (E) değerinin atmasına ve kopma uzaması (ϵ) değerinin azalmasına neden olduğu tespit edilmiştir [89]. Yapılan diğer çalışmalar SA/G molar oranı eş molar kullanıldığında malzemenin yüksek çapraz bağ yoğunluğu nedeniyle daha dayanıklı bir materyalin elde edildiğini göstermişlerdir [90], [91]. Bu durum gliserol miktarının artması ile malzeme dayanımının azalmasını doğrular niteliktedir. Morfolojik değerlendirme sonucunda literatürde doğrulanan şekilde mikrodalga yöntemi kullanılarak 1:1 eş molar malzeme içeren PGS doku iskelesinde üretiminde daha uygun olduğu tespit edilmiştir. Çizelge 4.1 'de farklı konsantrasyon sonrası elde edilen elastomerlerin fiziksel özellikleri verilmiştir.

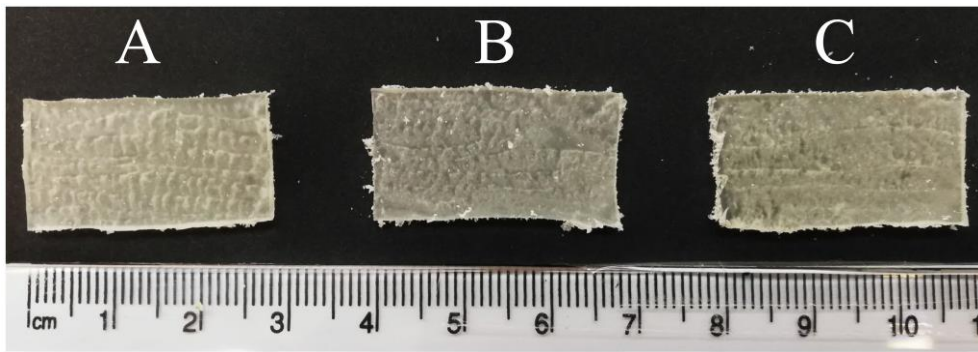
Vakumlu etüv ile işlem sonrası elastomer içerisindeki çapraz bağlanmamış monomer varlığından kaynaklanan düşük pH değerlerindeki değişimi hücre canlılığını olumsuz etkilediği bilinmektedir [92]. Bu amaçla morfolojik incelemenin yanı sıra *in vitro* çalışmalarda PGS elastomerlerin ortam pH üzerindeki etkisini değerlendirmek için elastomerlerin besiyeri içerisinde etkinlikleri incelenmiştir. pH değerlerinin ölçülmesi için malzemeler ağırlıkları 4,0 g olacak şekilde kesilip tartılmış ve hücre kültüründe sterilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Malzemelerle besi ortamı arasındaki etkileşimin incelenebilmesi için sterilizasyon işlemi sonrası 6'lık well plate alınan örnekler 5 mL DMEM besiyeri ile muamele edilerek 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonrasında ekstrakt besi yerleri toplanarak pH ölçümü gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Farklı gliserol konsantrasyonları içeren PGS malzemelerin 24 saat inkübasyon sonrası ölçülen pH değerleri.

SA / G	pH Değerleri
1:1	7.73
1:1,25	7.9
1:1,5	7.92
1:1,75	8.04

4.1.2 Farklı Çapraz Bağlanma Sürelerinin Elastomer Özelliklerine Etkisi

Yapılan karşılaştırma sonucu fiziksel özellikleri açısından eş molar (1:1) SA/G içeriğine sahip PGS elastomer sentezlenmesine karar verilmiştir. PGS elastomerin sentezinde önemli diğer bir parametre elastomerin çapraz bağlanma süresidir. 1:1 oranında sebasik asit ve gliserol içeren PGS elastomerlerin 10, 12 ve 14 saat olmak üzere farklı çapraz bağlanma süreleri denenmiş ve elde edilen malzemelerin görünüşleri Şekil 4.3'de sunulmuştur. 10 saatlik PGS, oldukça esnek, yapışkan ve mat bir halde olmasına rağmen, 14 saatlik malzeme diğerlerine göre daha transparan ve kırılğan özellik göstermiştir. Buna göre PGS elastomerlerin çapraz bağlanma süresinin artması ile yapışkanlık ve matlığın azaldığı ve bu özelliklerle beraber elastik özelliğini de kaybettiği tespit edilmiştir.

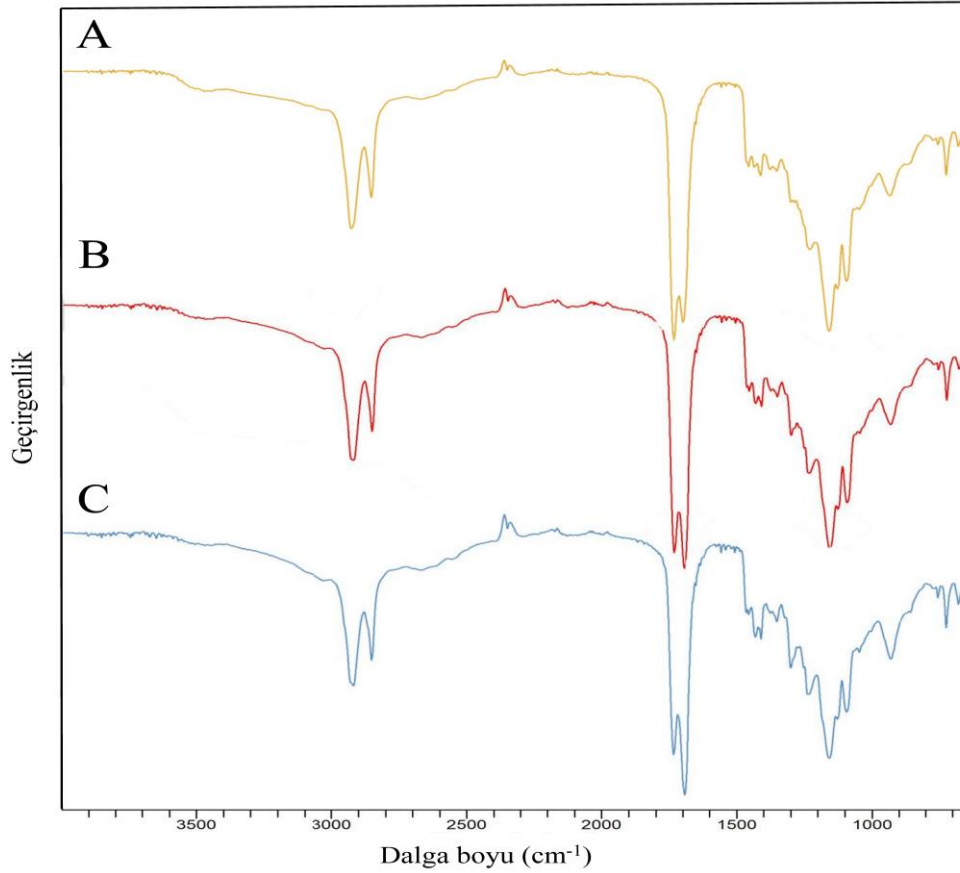


Şekil 4.3. 10,12 ve 14 saat çapraz bağlanan PGS elastomerlerin fiziksel görünüşleri: 10 saat (A); 12 saat (B); 14 saat (C).

4.1.3 Farklı Çapraz Bağlanma Süresine Sahip PGS Elastomerlerin Karakterizasyonu

4.1.3.1 ATR-FTIR Analizi

PGS doku iskelelerinin yapısında bulunan fonksiyonel gruplarını bağ durumu ve diğer yapısal özellikleri FTIR analizi ile belirlenmiştir. Gruplar karşılaştırılmalı olarak Şekil 4.4'de elastomerlere ait FTIR spektrumları incelendiğinde, 3500 cm^{-1} civarında hidroksil grupları (-O-H) absorpsiyon piki oluşturmuş ve alkan (-CH_2) gruplarının titreşimlerine ait keskin pikler 2930 ve 2855 cm^{-1} civarında gözlenmiştir. 1700 cm^{-1} civarında oluşan güçlü bir karboksil ve 1735 cm^{-1} 'deki belirgin tepe noktası yoğun gerilmeye sahip ester (-C=O) oluşumu ile ilişkilidir. Ayrıca 1450 cm^{-1} 'de görülen pik (-CH_3) metil gruplarını temsil ederken 1164 cm^{-1} 'deki keskin pik ester (-C-O) bağının varlığını işaret etmektedir. Benzer kimyasal yapıya sahip olduğu gözlenen PGS elastomerlerin spektrumlarında görülen piklerin literatürle uyumlu olduğu belirlenmiştir [93], [94].



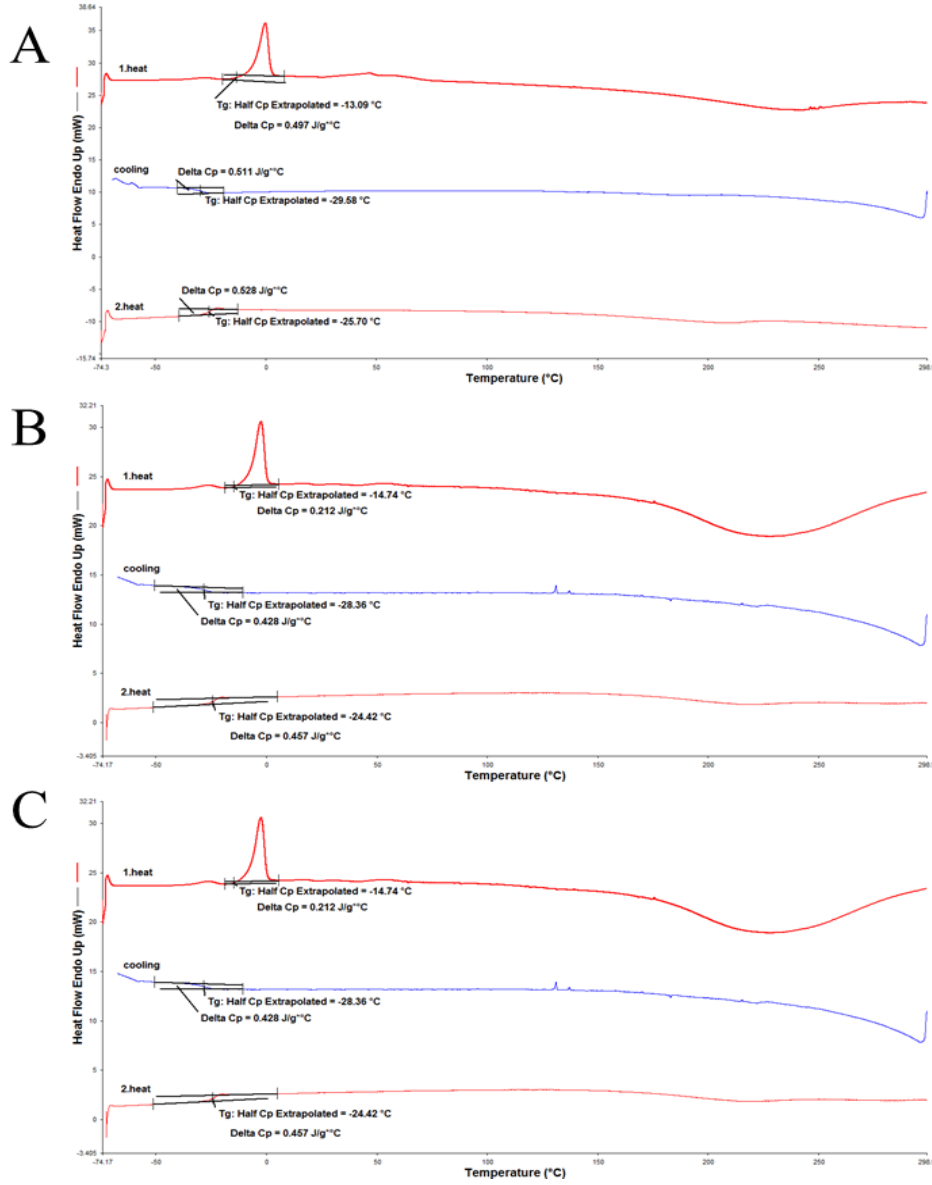
Şekil 4.4. PGS elastomerlerine ait FTIR spektrumları: 10 saat (A); 12 saat (B); 14 saat (C).

Üç farklı grup karşılaştırıldığında çapraz bağlanma süresinin artmasıyla hidroksil gruplarının absorpsiyon piklerinin daraldığı görülmüştür. Bu durum hidrojen bağlanma etkisinin hakkında fikir vermektedir. Polimer omurgasına bağlı hidroksil gruplarının artması malzemenin hidrofilitesini arttıracığından dolayı daha uzun çapraz bağlanan PGS elastomerlerin daha düşük hidrofilik özellik sahip olması beklenmektedir. Ayrıca hidroksillerin ester bazlı çapraz bağlar oluşturmak üzere tüketildiği yorumu yapılabilmektedir. Salehi ve arkadaşlarının yayınladığı çalışmada, çapraz bağlanma süresinin artması ile karboksil grubuna ait pik şiddetinin azalması son ürünün molekül zincir uçlarındaki karboksil grupların azalmasına bağlanmıştır [95]. Diğer açıdan, PGS elastomerlerinin yapısında keskin ester piklerinin görülmesi önemlidir. Çünkü bu ester bağlantıları için imza bantlarıdır, böylece polimerin bir polyester olduğunu doğrularlar [36]. Çapraz bağlanma süresi arttıkça karboksilik asit grubunun ve hidroksil grupları için pik şiddetleri azalırken ester bağı göstergesi olan 1164 cm^{-1} ve 1735 cm^{-1} 'de görülen absorbans piklerinin şiddeti artmıştır. Bu durum çapraz bağlı üç boyutlu PGS iskelesinin oluşumunun bir göstergesi olarak kabul edilebilmektedir.

4.1.3.2 Toplam Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi

Diferansiyel tarama kalorimetrisi (DSC), polimerlerin ısınmaya çeşitli geçiş sıcaklıklarını ölçerek fiziksel özelliklerinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan iyi yapılandırılmış bir termal karakterizasyon tekniğidir. DSC grafiğinde numune ısıyı çapraz bağlama reaksiyonu gibi bir termal işlemle açığa çıkardığında, DSC grafiği ısı akışında bir artış gösterir. Bu, ekzotermik bir olayın göstergesidir, çünkü numune sensörü tarafından kaydedilen sıcaklık referans için algılanan sıcaklıktan daha yüksektir. Numune, referanstan (erime gibi) daha fazla ısıyı emmesine neden olan bir termal olay geçiriyorsa, DSC grafiği ısı akışında bir azalma gösterir. Bu endotermik durumlarda sıcaklık sensörü, referansa kıyasla numune için daha düşük bir sıcaklığı ölçer [96].

PGS elastomerlere ait DSC diyagramlarında ekzotermik reaksiyon aşağıya doğru, endotermik reaksiyon yukarı doğru pik vermektedir. Ayrıca diyagramlarda camsı geçiş sıcaklığı (T_g) hariç herhangi bir termal davranış tespit edilmemiştir. Bir polimeri tanımlayan özelliklerden biri olan camsı geçiş sıcaklığı (T_g), erime sıcaklığından daha düşük ve polimerin camsı özellikleri yerine viskoz özellikler göstermeye başladığı sıcaklık değeri olarak bilinmektedir [97].



Şekil 4.5. PGS elastomerlerinin termal özelliklerini belirleyen DSC termogramları: 10 saat (A); 12 saat (B); 14 saat (C).

Şekil 4.5’deki diyagramlara göre birinci ısıtma 28,62 °C’den itibaren 147,31 °C’ye kadar sürmüştür. Birinci ısıtmada 10 saatlik PGS için -13,09 °C’de endotermik bir pik elde edilmiş olup bu sıcaklık malzemenin camsı geçiş sıcaklığı (T_g) değerini vermektedir. İkinci ısıtmada T_g değeri -25,70 °C olarak tespit edilmiştir. Analizden elde edilen termogram alanının hesaplanması ile 441,11 J/g ısı enerjisi açığa çıkmıştır. Birinci ısıtmada 12 saatlik PGS için -14,74 °C’de endotermik bir pik elde edilmiş olup bu sıcaklık malzemenin T_g değerini vermektedir. İkinci ısıtmada T_g değeri -24,42 °C olarak tespit edilmiştir. Analizden elde edilen termogram alanının hesaplanması ile 441,11 J/g

ısı enerjisi açığa çıkmıştır. Aynı şekilde birinci ısıtmada 14 saatlik PGS için $-14,45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de endotermik bir pik elde edilmiş olup bu sıcaklık malzemenin camsı geçiş sıcaklığı (T_g) değerini vermektedir. Analizden elde edilen termogram alanının hesaplanması ile $441,11\text{ J/g}$ ısı enerjisi açığa çıkmıştır. İkinci ısıtmada T_g değeri $-24,30\text{ }^{\circ}\text{C}$ olarak tespit edilmiştir.

DSC diyagramında iki ısıtma işlemi vardır. Genel olarak bakıldığında ikinci ısıtmada görülen T_g değerleri ilk ısıtmada ölçülen T_g değerlerine göre daha düşüktür. Birinci ısıtma malzemenin termal geçmişinin giderildiği bir basamak olarak kabul edilir. İkinci ısıtma ise termal geçmişi giderilmiş ve eşit koşullara sahip malzemelerin gerçek T_g değerini vermektedir. Polimerlerin C_p ısı kapasitesi genellikle T_g değerinin üstündedir. T_g 'nin altındaki daha düşük eğim, amorf polimer için düşük ısı kapasitesinden kaynaklanmaktadır. T_g 'nin üstünde, kauçuksu, esnek polimer daha yüksek bir ısı kapasitesine sahiptir. Ortam sıcaklığında kauçuk, esnek malzemeler tipik olarak $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ile $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ aralığında bir T_g 'ye sahip olduğu bilinmektedir.

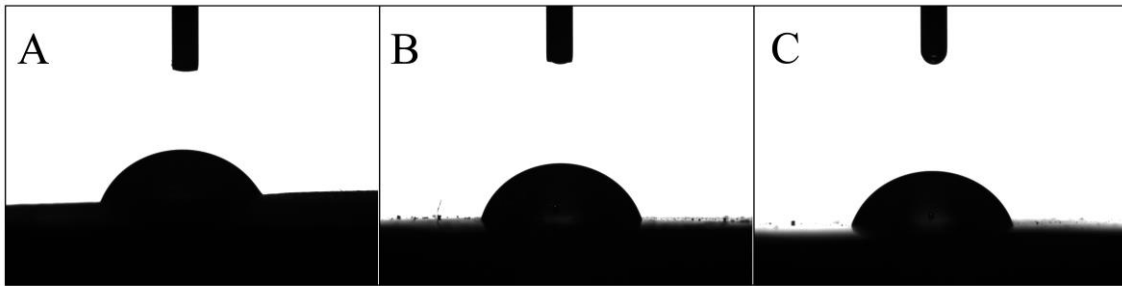
Bu bilgilerden yola çıkılarak PGS elastomerlerin DSC diyagramı incelendiğinde zincir hareketliliği değiştiği için T_g değerlerinin değiştiği tespit edilmiştir. Polimerlerde çapraz bağlanma miktarındaki artış zincir hareketini azalttığı için serbest hacimde azalmaya, esneklik için daha fazla enerjiye ihtiyaç duyulmasından dolayı T_g değerinde artışa neden olur. 14 saatlik PGS iskeleler daha çok çapraz bağlandığı için 10 ve 12 saatlik PGS malzemeye göre daha yüksek bir T_g değerine sahip olduğu gözlenmiştir. PGS kopolimerleri için literatürde bulunan T_g değeri $<- 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ olması gerektiği bildirilmiştir [98]. Üç farklı sıcaklıkta çapraz bağlanan PGS'lerin DSC grafiğinde camsı geçiş sıcaklığından sonra herhangi bir başka endotermik, ekzotermik reaksiyon gözlemlenmemiştir. Bu durum elastomer yapılarının amorf özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Literatürle yapılan karşılaştırmaya göre T_g değerlerini DSC grafiğinden elde edilen pikler literatür ile doğru orantılı olduğu tespit edilmiştir [86].

4.1.3.3 Temas Açısı Ölçümü

Hücrelerin biyomalzeme ile etkileşimi, tıbbi cihazların uzun süreli implantasyonu için öneme sahiptir. Bu açıdan bakıldığında malzemenin yüzey özellikleri polimerik iskelelerin kullanım ömürlerini belirleyen diğer önemli bir faktördür. Yüzey

ıslanılabilirlik derecesi olarak bilinen bu özelliklerin belirlenebilmesi için kullanılan en yaygın analiz temas açısı ölçümüdür. Bu analizde polimer yüzeyi ile temas eden sıvı, katı ve sıvı cinsine bağlı olarak yüzeye bir açı oluşturmaktadır. Büyüklüğü kohezyon ve adezyon kuvvetlerine bağlı olarak oluşan temas açısı, yüzeyin ıslanabilirlik davranışını incelemek ve hidrofilitik-hidrofobiklik dengesini tahmin etmek için yararlı bir yol sağlamaktadır. Bu noktada temas açısı eğer 90° büyükse bu malzeme yüzeyi hidrofobik özelliğe sahiptir. Bu sıvı yüzeyi ıslatmaz. Ancak küçükse hidrofilitik özelliğe sahiptir. Bu sıvı yüzeyi ıslatmaktadır [99].

Yapılan analize göre elde edilen görüntüler Şekil 4.6'da verilmiştir. Bu teknikte, polimerik yüzey üzerinde sabit bir su damlası gözlenmiş ve temas açısı, polimer yüzeyi ile su damlası yüzeyi arasındaki açı ölçülerek belirlenmiştir. 10, 12 ve 14 saat çapraz bağlanan malzemelerin sırasıyla temas açıları $72,87^\circ \pm 6,27$, $76,49^\circ \pm 1,96$ ve $79,70^\circ \pm 2,57$ olarak ölçülmüştür. Elde edilen PGS elastomerlerin hepsi 90 dereceden daha düşük bir temas açısına sahip olduğu için bu, daha önce bildirilen literatüre benzer şekilde malzemelerin hidrofilitik olduğu anlamına gelmektedir [100]. Diğer yandan birbirleri ile kıyaslandığında değerler yakın olmasına rağmen çapraz bağlanma süresinin artması ile malzemenin temas açısı değerinin yükseldiği ve bu durumda çapraz bağlanma süresinin artması malzeme yüzeyi ıslanabilirlik derecesinin düşük miktarda azaldığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.6. PGS elastomerlerine ait temas açısı ölçüm sonuçları: 10 saat (A); 12 saat (B); 14 saat (C).

Bir yüzeyin ıslanabilirliği kısmen yüzey kimyasına bağlı olduğu düşünülmesine rağmen yapılan diğer bir çalışmada PGS elastomerinin hidrofilitliğinin elastomer yapısındaki polar

terminal grupları arasındaki molekül içi ve moleküller arası hidrojen-bağlanma etkileşimlerinden de etkilendiği tespit edilmiştir [101]. Çapraz bağlanma süresinin artması ile yüzeyde ve moleküler yapıda bulunan serbest polar kimyasal grubunun (-OH) azalmasına neden olur. Böylece, yüzey hidrofobikliği artarken, su / matris polimer etkileşimleri azaltılmıştır.

Nöral doku mühendisliğinde iskele yüzeyinin ıslanabilirlik derecesi, nöritlerin sayısı ve uzunluğunda önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Yapılan çalışmalar polimerlerin hidrofilik özelliklerinin artırılmasının artan hücre yayılması ve yapışmasına yol açtığını göstermiştir [102, 103]. Elde edilen verilere göre hidrofilik yüzeye sahip elastomerlerin hücre kültürü çalışmalarında hücre davranışları destekleyeceği ön görülmüştür.

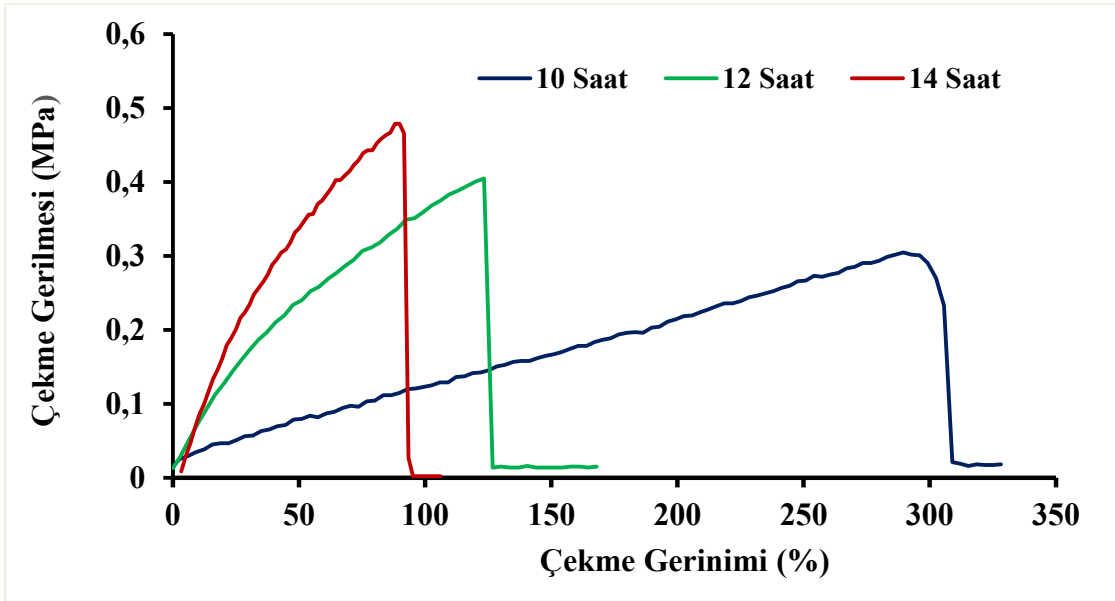
4.1.3.4 Çekme Testi ile Mekanik Özelliklerinin Belirlenmesi

Sentetik materyallerin doku mühendisliğinde başarılı bir şekilde uygulanmasında önemli bir engel, doğal dokunun mekanik özelliklerine uyumlu biyomalzemelerin eksikliğidir [104]. İskele ve doğal doku arasındaki uyumsuzluktan kaynaklanan mekanik tahriş, iltihaplanma ve yara oluşumuna yol açar, bu da implantın çevre doku ile etkili bir şekilde entegre olmasını önlemektedir [105, 106]. Bu durum iskelenin kullanılacak dokuya uyumlu elastik davranışa ve dayanıma sahip biyomateryalleri tasarlayabilmeye gerektirmektedir. PGS, ayarlanabilir çapraz bağlanma özelliği ile dokuya uygun elastikiyet göstermesi nedeniyle sinir doku mühendisliği için çeşitli çalışmalar ile geliştirilmiştir [37, 107].

Bu bağlamda PGS elastomerlerin çapraz bağlanma süresindeki farklılıkların çekme dayanımına olan etkisinin incelenmesi için mekanik test ile çekme mukavemeti (σ_M), % kopma uzamaları (ϵ_M) ve Young modülüsleri (E) ölçülmüş ve elde edilen veriler Çizelge 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Farklı çapraz bağlanma sürelerine sahip PGS elastomerlerin mekanik test verileri.

Süre	Çekme Mukavemeti (σ_M , MPa)	% Kopma Uzunlukları (ϵ_M)	Young Modülüs (E) (MPa)
10 Saat	0,31± 0,0360	277,48 ± 57,80	0,10 ± 0,008
12 Saat	0,36 ± 0,047	122,14 ± 13,02	0,27 ± 0,02
14 Saat	0,416 ± 0,0214	89,09 ± 1,067	0,41 ± 0,02



Şekil 4.7. Farklı çapraz bağlanma sürelerine sahip PGS elastomerlerin gerilim-gerinim eğrisi.

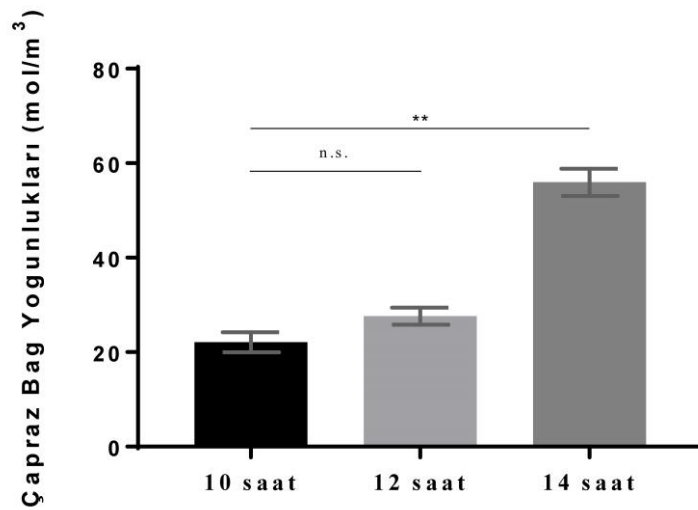
Elde edilen veriler ile çapraz bağlanmış PGS'nin ince şeritlerinin gerilim-gerinim eğrisi özelliğini ortaya çıkarmıştır (Şekil 4.7). Buna göre 14 saat sonucunda elde edilen elastomerin ($E=0,41\pm 0,02$), 10 saat çapraz bağlanmış malzemeye ($E= 0,10\pm 0,008$) göre daha yüksek Young modülüne sahip olması çapraz bağlanma süresinin malzeme elastikiyetini etkisini göstermektedir. Ayrıca çapraz bağlanma süresinin artması çekme mukavemetlerinde bir artış sağlamıştır. Bu durum, yüksek derecede çapraz bağlı bir polimerin daha sert ve daha dayanıklı bir malzeme elde edilmesine yardımcı olmaktadır. Ancak 10 ($\epsilon_M = \% 277,48\pm 57,80$), 12 ($\epsilon_M = \% 122,14\pm 13,02$) ve 14 saat ($\epsilon_M = \% 89,09\pm 1,067$)'lik elastomerler karşılaştırıldığında dayanıma ters olarak malzeme

uzamasında görülen azalma, kürlenme süresinin artışı ile birlikte malzeme elastikiyetinde bir kaybın gözlenmesine neden olmaktadır.

PGS elastomerine ait bu değerler literatürde yer alan çalışmalar incelendiğinde Chen ve ekibi, PGS elastomerlerinin farklı sıcaklıklar altında çapraz bağlanan PGS elastomerlerini karakterizasyonuna yönelik yaptığı çalışmada belirtildiği üzere PGS elastomerlerinin Young modülüs değerlerinin 0,04–1,2MPa ve çekme mukavemetinin de 0,2–0,5MPa aralığında olması gerektiğini öne sürmüşlerdir [108]. Li ve ekibinin farklı çapraz bağlanma özelliklerine sahip PGS elastomerlerinin mekanik özellikleri üzerine gerçekleştirdikleri bir raporda, malzeme gerinimlerinin % 100'ün üzerinde seyrettiği ifade edilmiştir [87]. Bu bilgiler göz önünde bulundurulduğunda, çalışma kapsamında elde edilen veriler literatür ile uyum içerisinde olduğu tespit edilmiştir.

4.1.3.5 Elastomerlerin Çapraz Bağ Yoğunluklarının Belirlenmesi

Polimer zincirlerinin değişik uzunluktaki zincir parçalarının birbirine kovalent bağlarla bağlanması ile oluşan yapıya çapraz bağlı polimer denir. Çapraz bağ sayısının fazla olması ağ yapılı polimer yapısına yol açar. Ağ yapılı polimerlerde tüm zincirler birbirlerine kovalent bağlarla bağlı olduğu için polimer sistem bir tek molekül gibi düşünülebilir.

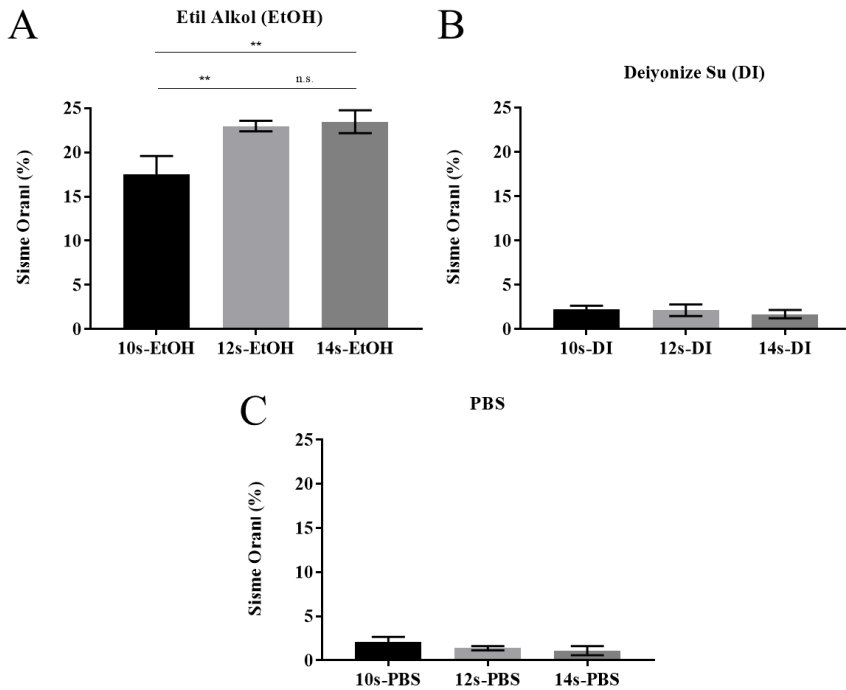


Şekil 4.8. Farklı çapraz bağlanma sürelerine sahip PGS elastomerlerin çapraz bağ yoğunlukları (n.s. için $p > 0,05$, ** için $p \leq 0,01$).

Şekil 4.8’de verilen grafikte görüldüğü üzere, farklı çapraz bağlanma sürelerine sahip elastomerlerin çapraz bağ yoğunlukları Young modülüs değerlerinden yola çıkarak hesaplanmış ve çapraz bağlanma miktarları doğrulanmıştır. Buna göre yapılan hesaplama sonucunda 10,12 ve 14 saat çapraz bağlı elastomerlerin çapraz bağ yoğunlukları sırasıyla $22,09 \pm 2,11$, $27,61 \pm 1,79$ ve $55,95 \pm 2,88$ olduğu belirlenmiştir. Sonuçlar 14 saat çapraz bağlı PGS’nin 10 saat’lik PGS’ye oranla 2 kat daha fazla çapraz bağ içerdiğini göstermiştir.

4.1.3.6 Elastomerlerin Su Tutma Kapasitesinin Belirlenmesi

Polimerlerin şişme karakteristikleri farklı çapraz bağlama süreleri karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Üç farklı grubun malzemeleri 3 farklı çözelti içerisinde 24 saat oda sıcaklığında bekletilmiş, süre sonunda fazla yüzey suyu filtre kağıdına emdirilerek uzaklaştırılmış ve şişmiş numunelerin ağırlığı ölçülmüştür. Şişme oranı, şişen (W_s) ve başlangıç ağırlığı (W_i)’dan yola çıkarak Formül 2 kullanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.9. Farklı çapraz bağlanma sürelerine sahip elastomerlerin farklı çözeltiler içerisinde su tutuma kapasitesinin belirlenmesi: Etil alkol (A); DI (B); PBS (C). (n.s. için $p > 0,05$, ** için $p \leq 0,01$).

Şekil 4.9'da gösterildiği gibi, elastomerler farklı çözeltiler içerisinde farklı şişme davranışı sergilemişlerdir [109]. Buna göre, % 70 etanol çözeltisi (h/h) içerisinde bekletilen 10, 12 ve 14 saat çapraz bağlanan PGS elastomerlerin sırasıyla şişme yüzdeleri yaklaşık % $17,49 \pm 1,219$, % $22,97 \pm 0,3429$ ve % $23,47 \pm 0,7438$; PBS çözeltisi içerisinde bekletilen numunelerin şişme yüzdeleri yaklaşık olarak % $2,093 \pm 0,3365$, % $1,403 \pm 0,1383$ ve % $1,117 \pm 0,2979$; DI içerisinde ise bu yüzdeler % $2,223 \pm 0,2349$, % $2,123 \pm 0,3831$ ve % $1,684 \pm 0,2708$ olarak tespit edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde % 70 etanol (h/h) içerisinde sterilizasyon aşamasında malzeme şişme davranışı göstereceği ve malzeme boyutlarında değişiklik olabileceği tespit edilmiştir. Diğer açıdan DI ve PBS içerisinde bekletilen malzemelerin çapraz bağlama süresinin artması ile anlamsal bir fark bulunmamasıyla birlikte şişme özelliklerinde önemli bir azalma olduğu gözlenmiştir. Hidrasyonun, ağ içinde mevcut iyonik yüklerin elektrostatik itilmesiyle indüklendiği iyi bilinmektedir [110]. Dolayısıyla çapraz bağlanmanın artması ile yüzeyde ve moleküler yapıda bulunan -OH gruplarının azalmasına ile malzemenin şişme davranışında azalamaya neden olmuştur.

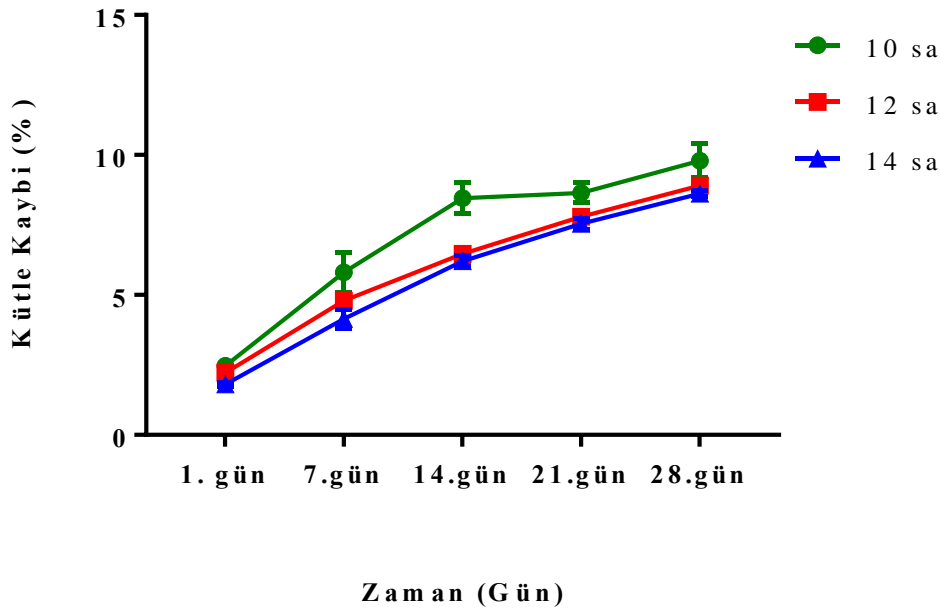
4.1.3.7 *In vitro* Etkinliklerinin Değerlendirilmesi

4.1.3.7.1 Degradasyon Özelliklerinin Belirlenmesi

PGS elastomerleri yüzey erozyonu şeklinde biyobozunur özellik gösteren biyouyumlu bir polimer oldukları bilinmektedir. Farklı çapraz bağlanma süreleri sonucu elde edilen PGS elastomerinin optimizasyonu için *in vitro* degradasyon testi yapılmıştır. Bu çalışmada Ringer çözeltisi içerisinde 37 °C'de tutulan 1 cm çaplı disklerin bozunma öncesi ve sonrası ağırlık değişimleri tespit edilmiştir. Elde edilen değerler Çizelge 4.4'de verilmiştir. Farklı çapraz bağlanma sürelerinin için elde edilen degradasyon değerleri karşılaştırılarak Şekil 4.10'da verilen grafik elde edilmiştir.

Çizelge 4.4. Farklı çapraz bağlanma sürelerine sahip PGS elastomerlerin beş farklı zaman noktasında ağırlık ölçümü sonucunda elde edilen yüzde kütle kaybı ve standart sapma değerleri; 10 saat (A), 12 saat (B) ve 14 saat (B) çapraz bağlanma süresine sahip elastomerler.

Zaman	10 Saat	12 Saat	14 Saat
1. Gün	2,47 ±0,05	2,21 ±0,12	1,8 ± 0,05
7. Gün	5,8 ± 0,61	4,78 ± 0,24	4,14 ± 0,28
14. Gün	8,46 ± 0,48	6,46 ± 0,28	6,21 ± 0,17
21. Gün	8,64 ± 0,31	7,78 ± 0,06	7,53 ± 0,16
28. Gün	9,79 ± 0,51	8,90 ± 0,13	8,62 ± 0,09



Şekil 4.10. Farklı çapraz bağlanma sürelerine sahip PGS elastomerlerin beş farklı zaman noktasında ağırlık ölçümü sonucunda elde edilen yüzde kütle kaybının karşılaştırılması.

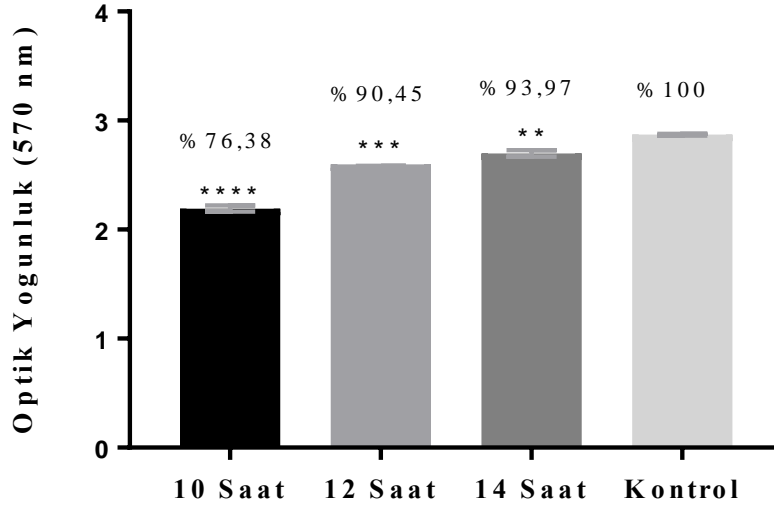
Yapılan degradasyon testine göre ilk kuru ağırlıkları bilinen PGS doku iskelelerin degradasyon oranları yüzde olarak belirtilmiştir. Buna göre farklı çapraz bağlanma sürelerine sahip PGS iskeleler (n=4) ilk günlerdeki degradasyon miktarları azalarak devam etmiştir. Genel olarak, 10–12–14 saatlik malzemeler birbiriyle karşılaştırıldığında 10 saat çapraz bağlanan PGS malzemeleri malzemelere göre en fazla degradasyon

miktarına sahip olan malzemelerdir. 14 saat çapraz bağlanan PGS malzemeleri ise en az bozunma göstermiş olup ilk günlerden sonra grafiğin eğimi azalarak degradasyon miktarı artmıştır. PGS elastomerleri yüzey erazyonu ile bozunan malzemelerdir. *In vitro* ve *in vivo* koşullar altında doğrusal bozunma davranışı sergiler. ECM biyosentez hızı ile doku tasarımı iskelelerin takip etmesi için doğrusal bir bozunma davranışı tercih edilir. Malzemelerin 28 gün sonrasında 10, 12 ve 14 saatlik PGS'ler sırasıyla % $9,79 \pm 0,51$, % $8,90 \pm 0,13$ ve % $8,62 \pm 0,09$ olarak bozunma davranışı göstermiştir. Ayrıca morfolojik olarak incelendiğinde genel olarak bakıldığında yapışkanlıkları artmış; 10 saatlik PGS malzemelerin başlangıç şeklini kaybetmiş ve malzemeyle çalışmak zorlaşmıştır. 12 ve 14 saatlik malzemeler şekil bütünlüklerini korumuş ve ölçümde problem yaratmamıştır. Bu konuyla ilgili yapılan literatür araştırmalarına malzemelerin degradasyon miktarları uyumluluk göstermiştir [111].

4.1.3.7.2 Elastomerlerin Sitotoksik Özelliklerinin Değerlendirilmesi

Hücre canlılığı ve proliferasyonu, hücreler ve biyomateryal yapı iskelesi arasındaki etkileşime bağlıdır. Bu nedenle farklı çapraz bağlama sürelerine sahip elastomerlerin hücre canlılığı üzerindeki etkisinin incelenmesi için MTT analizi yapılmıştır.

In vitro çalışmalarda MTT analizi, hala en çok yönlü ve popüler deneylerden biridir. MTT analizi, suda çözünür sarı boya MTT [3- (4,5 dimetiltiyazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolyum bromidin] mitokondriyal redüktazın etkisiyle çözünmez bir mor formazan kristallerine dönüştürülmesini içermektedir. Formazan daha sonra çözündürülür ve konsantrasyon 570 nm'de optik yoğunluk ile belirlenir [112].



Şekil 4.11. 10,12 ve 14 saat çapraz bağlanma süresine sahip PGS elastomerlere ait sitotoksosite analizi (** için $p \leq 0,01$, *** için $p \leq 0,001$, **** için $p \leq 0,0001$).

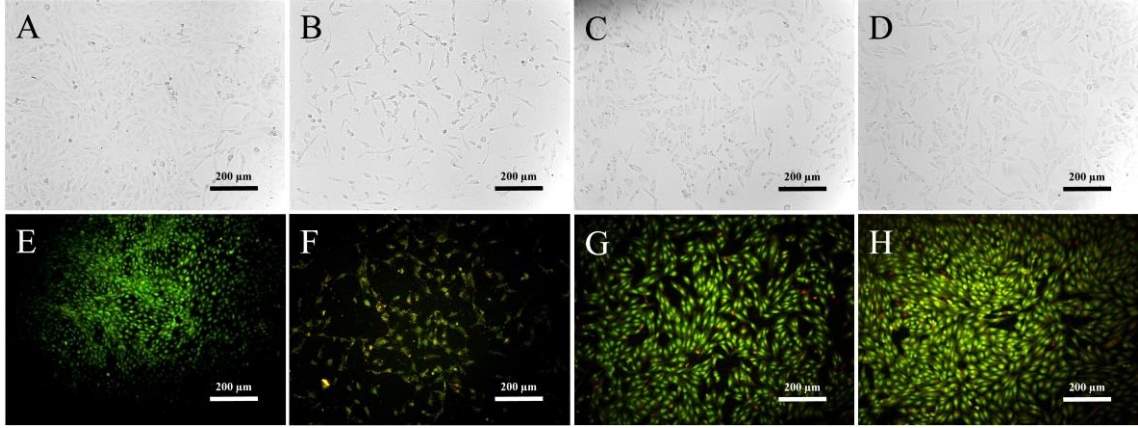
Şekil 4.11’de göre, kontrol grubundaki hücre canlılığı % 100 kabul edildiğinde ölçülen absorbans değerlerinden yola çıkarak 10 saat çapraz bağlanan elastomerin hücre canlılığı % 76,38, 12 saat çapraz bağlanan elastomerde ise % 90,45 bulunmuştur. 14 saat çapraz bağlanan elastomerde canlılığı miktarı % 93,97 olarak tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde Elde edilen sonuçlar, hücre canlılığı ISO 10993-5 standarta uygun olarak bulunmuştur. Standarda göre hücre canlılığının %30'dan fazla azalması, sitotoksik bir etki olarak kabul edilmektedir. Elde edilen sonuçlara göre iskelelerin toksik olmadığı belirlenmiştir. Bu bilgiler, çapraz bağlanma süresinin artması ile serbest monomerlerin uzaklaşmasına bağlı olarak hücre canlılığının arttırdığını göstermiştir.

4.1.3.7.3 Elastomerlerin Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi

Farklı çapraz bağlanma sürelerine sahip elastomerlerin sitotoksitesinin değerlendirilmesinin yanı sıra elastomerlerde gerçekleşen hücrel olayların değerlendirilmesi için canlı/ölü ikili boyama gerçekleştirilmiştir.

Bu amaçla 24 saat kültür kabında kültüre edilen L929 hücreleri iskele ekstresi ile etkileştirilerek 24 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda hücreler faz-kontrast mikroskobu ile görüntülenmenin yanı sıra canlı/ölü boyama gerçekleştirilerek L929 hücrelerinin

üzerinde elastomerlerin etkisi floresan mikroskop altında görüntülenmiş ve Şekil 4.12’de paylaşılmıştır.



Şekil 4.12. 10,12 ve 14 saat çapraz bağlanma süresine sahip PGS elastomerlerine ait sırasıyla faz-kontrast ve apoptoz-nekroz boyamasına ait görüntüler: Kontrol (A-E); 10 saat (B-F); 12 saat (C-G); 14 saat (D-H).

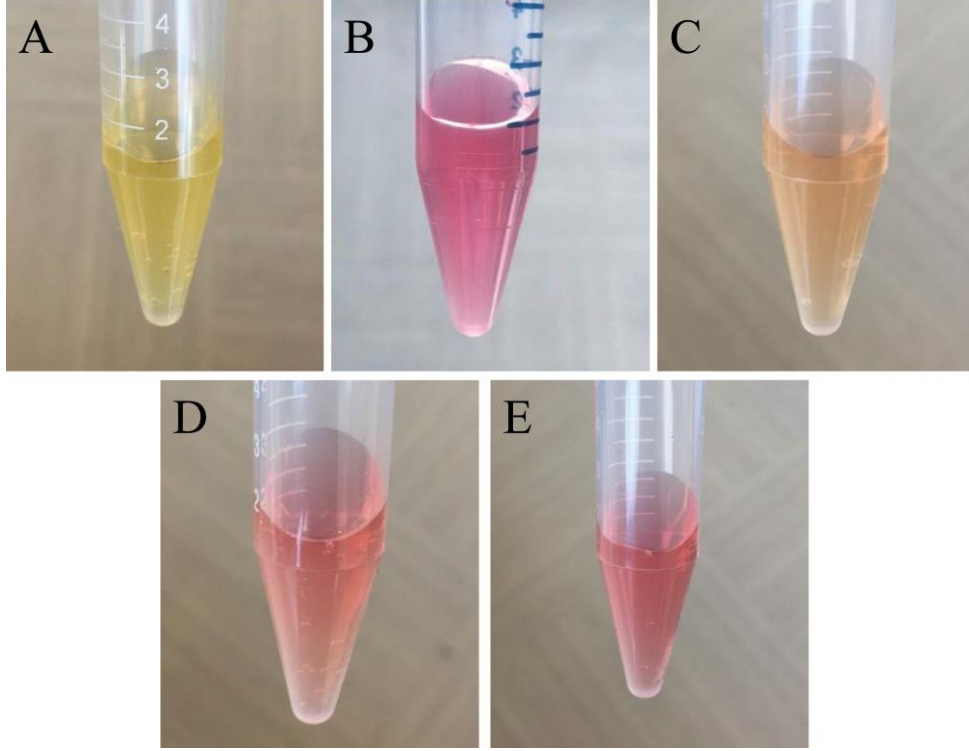
Çalışmada herhangi bir ekstrakt ile etkileştirilmemiş kültür kabında çoğaltılan hücreler kontrol grubu olarak kabul edilmiştir. Faz-kontrast görüntülerine göre 10 saat çapraz bağlanmış PGS elastomeri ekstrakt ile etkileştirilen hücre yoğunluğunda kontrole göre azalma ve hücre morfolojilerinde bozulmalar gözlenmiştir. Diğer yandan 14 saat çapraz bağlanan PGS elastomerinin hücre yoğunluğunun büyük oranda korunduğu ve hücre morfolojilerinin sağlıklı olduğu belirlenmiştir.

İkinci olarak hücreler apoptoz/nekroz özellikleri ikili boyama ile incelenmiş, ikili boyamaya göre canlı hücreler yeşile, ölü hücreler ise kırmızıya boyanmıştır. Apoptatik özellik gösteren hücreler ise turuncu renk almıştır. Buna göre 10 saat çapraz bağlanan elastomerde yeşil canlıların yanı sıra kırmızı renkli apoptatik hücre varlığı tespit edilmiş, hücresel yıkımlar sonucunda sarı ışımaya yapan hücreler gözlenmiştir. 12 saatlik PGS elastomerinde canlı ve yeşil hücre miktarının 10 saate göre daha arttığı ancak apoptatik ve nekrotik hücre varlığı az da olsa mevcuttur. 14 saat çapraz bağlanan elastomer beklenildiği gibi en yüksek hücre yoğunluğuna ve canlılığına sahiptir. Hücre morfolojileri kontrole oldukça yakın ve sağlıklıdır. Böylece artan çapraz bağlanma süresinin hücre canlılığı üzerindeki olumlu etkisi bir kez daha ortaya konmuştur.

4.1.4 PGS Elastomeri Alkol Yıkama Metodu Optimizasyonu

Polikondenzasyon tepkimesi sonrası yapıda bulunan çapraz bağlanmamış yapılar malzeme özelliklerinde ve hücre canlılığı üzerinde en büyük etkiye sahiptir [113]. Li ve ekibinin PGS elastomeri sentezine yönelik biyouyumluluk testleri sonucunda PGS'nin sitotoksitesine yapıdaki reaksiyona girmemiş karboksilik asit grupları ve/veya PGS ester gruplarının sulu hidrolizi ile üretilen serbest sebasik asit neden olduğu belirlenmiştir [92]. Bu açıdan PGS elastomeri ile yapılacak *in vitro* hücre kültürü çalışmalarına yönelik yapıdaki serbest monomerlerin uzaklaştırılmasına yönelik sentezlenen malzemeye uygun olarak alkol yıkaması protokolü optimize edilmiştir.

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan DMEM besiyeri içerisinde bulunan fenol red pH indikatörü sayesinde malzemelerin asitlik-bazlık özellikleri hakkında bilgi vermektedir. Besiyeri, pembe-mor renkliyse bazik ortam, sarıya dönükse asidik ortam yorumu yapılabilmektedir. Çapraz bağlanmamış monomerlerin uzaklaştırılması için PGS elastomerlerinin üç farklı yöntemle yıkanan PGS elastomerler, 24 saat DMEM'de bekletilmiştir. Süre sonunda malzemeler uzaklaştırılmış ve elde edilen ekstraktların renk değişimi incelenmiş ve pH değerleri ölçülmüştür. Buna göre hiçbir işlem görmeyen PGS içeren kontrol grubunda besiyeri sarı renkli olduğu gözlenmiştir. Şekil 4.13'de görüldüğü üzere, üç döngü, 16 saat alkol yıkaması ve 24 saat alkol yıkaması sonucunda elde edilen örneklerin ekstraktlarının renkleri sırasıyla sarıdan pembeye doğru yaklaştığı gözlenmiştir.



Şekil 4.13. 24 saat DMEM besiyerinde bekletilen iskelelerin fiziksel görünümündeki değişim: Kontrol (A), DMEM besiyeri (B), 3 x Döngü (C), 16 saat (D) ve 24 saat (E) alkol yıkaması sonucunda elde edilen görüntülerdir).

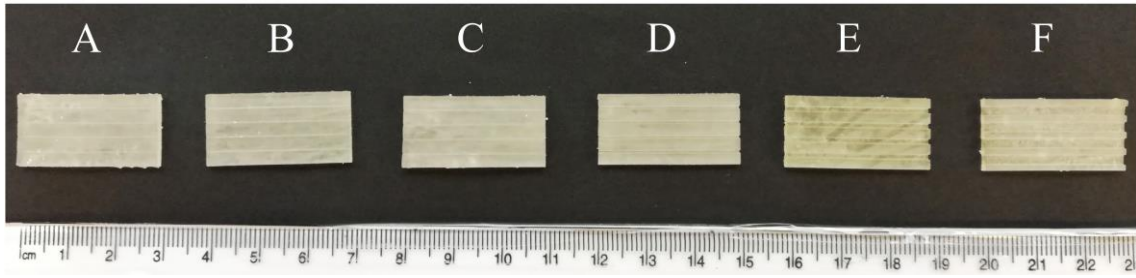
Ayrıca Çizelge 4.5’de verilen pH değerleri incelendiğinde 24 saat alkol yıkaması sonrasında elde edilen iskelenin ekstrakt rengi ve pH değerinin DMEM besiyerine en yakın olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.5. Alkol yıkaması sonucu elde edilen iskelelerin 24 saat besiyeri içerisinde bekletilmesi sonucu pH değerleri.

Örneklem	DMEM	Kontrol	16 Saat	3 x Döngü	24 Saat
1	7,41	6,25	7,29	6,99	7,41
2	7,45	6,45	7,36	7,01	7,41
3	7,43	6,26	7,3	7	7,41

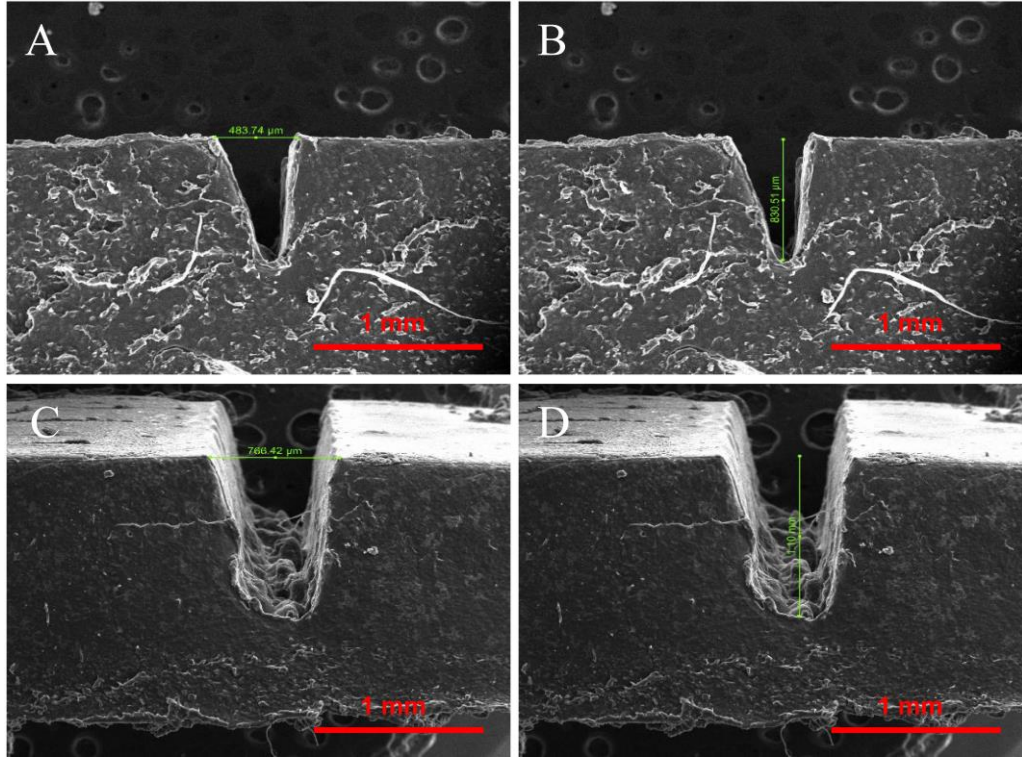
4.2 CO₂ Lazer Uygulamasıyla PGS Elastomer Yüzeyinde Mikrokanalların Oluşturulması

Sinir doku mühendisliğinde mikro kanal yapısının hücre yönelmesi ve rejenerasyonu üzerinde etkisi bilinmektedir [114]. Mikro kanallı modeller, hücre-hücre iletişimi, hücre farklılaşması veya polarizasyon gibi hücresele olayları kontrol edilmesinde etkilidir [115]. Bu doğrultuda *in vitro* çalışmaların başarısını arttırmak amacıyla PGS elastomerin yüzeyine mikro kanallar oluşturulmuştur. Yapılan çalışmalar sonucunda optimize edilen PGS elastomeri yıkama işlemi ardından CO₂ lazer cihazı ile çalışma boyunca kullanılacak nihai ürün boyutlarında şekillendirilmiş ve iskele yüzeyinde mikro kanallar açılmıştır. Şekil 4.14'de sırasıyla 50 µm, 100 µm, 200 µm, 500 µm, 1 mm ve 2 mm genişliklerinde yaklaşık 500-600 mikron derinliğinde mikro kanallar sahip elastomerlerin görüntüleri sunulmuştur.



Şekil 4.14. Farklı genişliklerde kanal yapısına sahip PGS elastomerler: Kanal genişlikleri: 50 µm (A), 100 µm (B), 200 µm (C), 500 µm (D), 1 mm (E) ve 2 mm (F).

Buna göre, 50 µm ve 100 µm genişliğinde kanala sahip olan PGS iskelelerin sıcaklık dolayısıyla elastomerin degrade olmasına bağlı olarak kanal boyunca bozulmaların meydana gelmesi sonucunda kanal bütünlüklerini kaybettiği homojen kanal derinliğinin oluşmadığı gözlemlenmiştir. 1 mm ve 2 mm genişliklerde kanal içeren malzemelerde ise 1,5 x 3 cm boyutundaki PGS yüzeyinde kanalların birbirine çok yakın olduğu için doku iskelesinin daha dayanıksız hale getirdiği tespit edilmiştir. 200 µm ve 500 µm kanal genişliklerine sahip elastomerler arasındaki farkın ayrıntılı olarak değerlendirilmesi için SEM analizi yapılmış ve elde edilen görüntüler Şekil 4.15'de sunulmuştur.

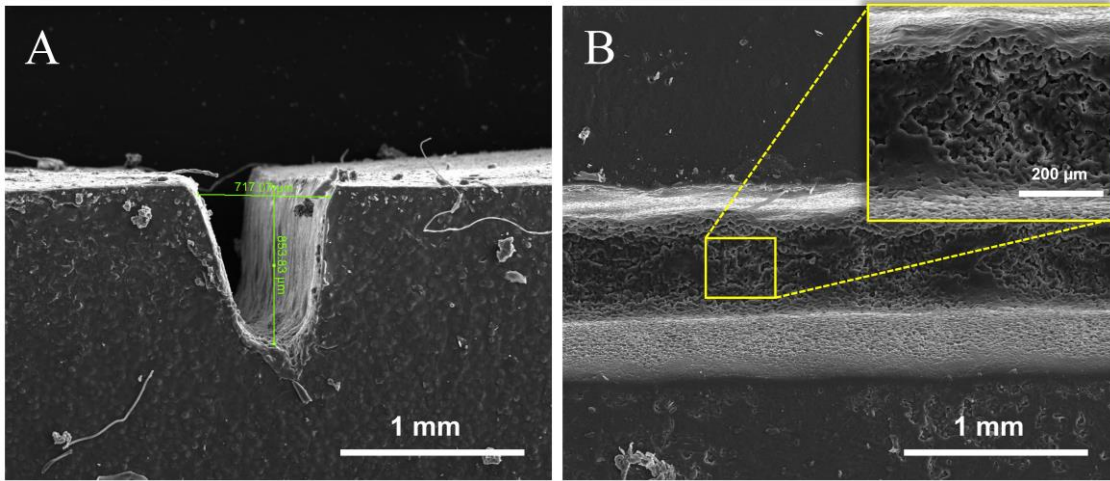


Şekil 4.15. 200 µm ve 500 µm genişlikte kanal içeren PGS elastomerlerinin CNF kaplaması sonrası kanal derinlik ve genişliğinin ölçümü ile ilgili SEM görüntüleri: 200 µm (A-B); 500 µm (C-D).

Analizde kanal genişlikleri ve derinlikleri incelenmiştir. Kanalların genişlik ve yükseklik ölçümü yapıldığında 200 µm genişliğindeki kanalların yaklaşık 400 µm'ye ulaştığı ve 500 µm genişlikteki kanalların ise yaklaşık 700 µm genişliğine ulaştığı görülmüştür. Kanal derinlikleri 800 µm–1 mm arasında olduğu gözlenmiştir. Bu durumun nedeni PGS malzemesinin CO₂ lazer ışını ile sıcaklığın artmasıyla elastomerlerin degrade olmasına bağlı olarak belirlenen değerlerden daha yüksek bir kanal genişlik ve derinlik değerine sahip olduğu gözlenmiştir.

Mahoney ve arkadaşlarının mikro kanallardaki PC12 hücreleri ile yaptıkları çalışmada mikro kanalların nörit büyümesinin yönü ve hücre somasından çıkan nöritlerin uzunluğu, sayısı ve açısı dahil olmak üzere nörit büyümesinin çeşitli özelliklerini etkilediğini gözlemlemiştirlerdir. Nörit büyümesi üzerindeki etkinin büyüklüğü, mikro kanal genişliğine bağlıdır. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar, mikro kanal genişliğinin,

nöronal mimariyi ve işlevi işlevsel olarak yeniden yapılandırmak için biyomalzemelerin tasarımında dikkate alınması gereken önemli bir tasarım parametresi olduğunu göstermektedir [116]. Bu bilgiler ışığında ve elde edilen veriler göz önüne alındığında 500 μm genişliğinde hazırlanan kanal genişliğinin tez çalışması kapsamında kullanılmasına karar verilmiştir. Bununla beraber Şekil 4.15C ve Şekil 4.15D’de gözlenen 500 μm ’luk kanal içerisinde lazer kaynaklı elastomerin erimesi sonucu gözlenen tepe ve çukur oluşumlarının giderilmesi için CO₂ lazer parametreleri tekrar optimize edilerek elastomer boyutlandırma parametreleri sabit tutularak kanal tarama parametreleri lazer gücü % 38, prob hızı 175 mm/sn ve interval 0,05 mm olarak değiştirilmiştir. Bu lazer parametreleri ile üretilen 500 μm ’lik kanal içerikli elastomere ait SEM görüntüsü Şekil 4.16’da verilmiştir.



Şekil 4.16. Lazer parametreleri optimize edilerek oluşturulan 500 μm genişlikte kanal içeren PGS elastomerlerin kanallarına ait SEM görüntüsü: Kanal ölçümleri (A); kanal morfolojisi (B).

Elde edilen görüntülere göre lazer parametrelerinin optimizasyonu kanal içerisindeki tepe-çukur oluşumunu azaltmış daha pürüzsü bir görünüm vermiştir. Buna rağmen bu parametrelerinde kanal genişliğini belirlenenden daha yüksek bir değerde olmasını sağlamıştır.

4.3 Karbon nanofiber/ PGS Kompozitinin Geliştirilmesi

Tez kapsamında PGS elastomerlere iletkenli kazandırmak amacıyla kullanılan ilk bileşen KNF'dir. KNF'ler, hidrofobik yapısı gereği çözünürlüğü düşük ve agrege olma özelliğine sahip bir kimyasaldır. İskeleyle iletkenlik kazandırmada KNF'in çözelti içerisinde homojen dağılımı önemlidir [117].

Bu durumda homojen bir KNF çözeltisi elde edilmesi çözeltinin kanala daha kolay yüklenmesini ve daha homojen kaplanmasını sağlayacaktır. Çalışma kapsamında farklı çözücüler içerisinde KNF homojenliği karakterize edilmiş ve değerlendirilmiştir. Ayrıca *in vitro* çalışmalarda çözücü kaynaklı sitotoksikite riskini azaltmak amacıyla KNF'ler, -COO ile fonksiyonelleştirilmiş ve işlemin etkinliği karakterize edilmiştir.

4.3.1 Homojen KNF Çözeltisinin Hazırlanması

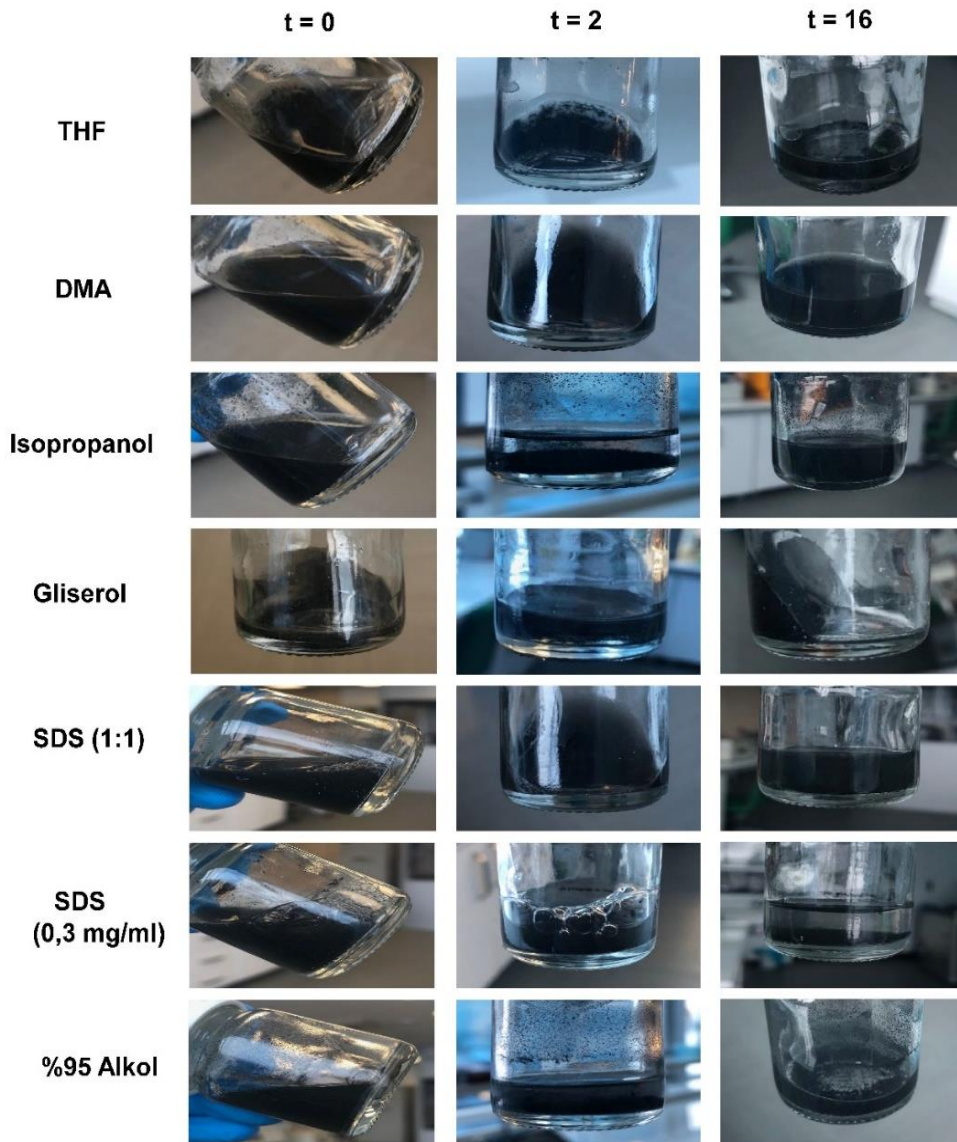
4.3.1.1 Farklı Çözücüler ile KNF Çözeltisinin Hazırlanması

KNF, hidrofobik özelliğinden dolayı suda ve organik çözeltilerde homojen dağılımı oldukça zordur. Bu yüzden karbon temelli yapılara yönelik çalışmalar bu yapıların homojen dağılımına yönelik farklı çözücülerin ve karıştırma yöntemlerin kullanılmasına dayanmaktadır [118-120]. KNF'ler ile ilgili literatürde çalışmaların sınırlı olmasından dolayı KNT'ler baz alınarak homojen bir çözelti elde edebilmek için literatürde yaygın olarak kullanılan çözeltiler (tetrahidrofur (THF), dimetilasetamid (DMA), izopropanol (IPA) vb. gibi.) seçilmiştir [121, 122].

Homojen KNF çözeltilerinin hazırlanmasında çözücü kadar karıştırma yönteminin etkisi büyüktür. Yapılan çalışmalar KNT ve KNF'lerin agrege olmalarını sağlayan güçlü Van der Waals bağlanma enerjileri nedeniyle, bir çözelti veya bir kompozit matris içinde kontrollü olarak dağılmasının zor olduğunu göstermektedir [123]. Yapılan araştırmalara göre sonikasyon, dağıtma işleminde karbon temelli yapıların demetlerini kırmak, dağıtmak için yaygın olarak kullanılan mekanik bir yöntem olarak kabul edilmiştir. Nanofiberlerin, bir karıştırıcı, sonikasyon vb. kullanılarak matris içerisinde dağıtılması, aglomeratları kırmak veya oluşumlarını önlemek için yüksek kayma gerilimi kullanarak

fiber dağılımını güçlendirmeye dayanmaktadır [124]. Bu doğrultuda çalışmada çözeltilerin homojen hale getirilmesi için sonikasyon yöntemi tercih edilmiştir.

Çözeltiler konsantrasyonu 0,3 mg/mL olacak şekilde THF, DMA, gliserol, % 95 (h/h) etil alkol, izopropanol, % 1 SDS ve KNF-SDS (1:1) -DI karışımları hazırlanmış ve hazırlanan çözeltilerin üç farklı zaman noktasında (t=0, 2 ve 16) homojenlikleri değerlendirilmiştir. Elde edilen görüntüler Şekil 4.17'de verilmiştir.

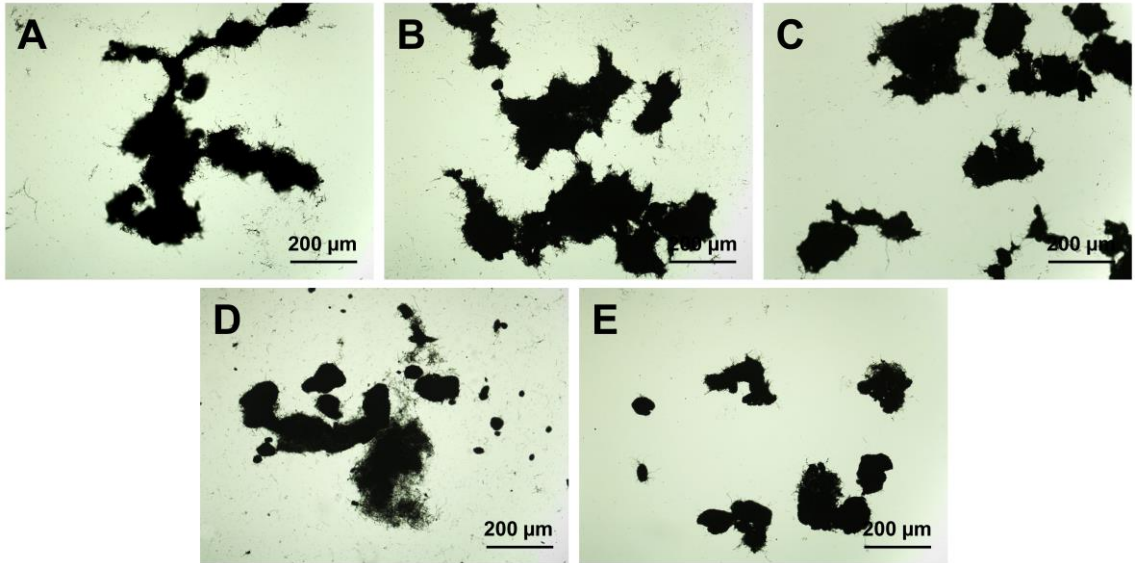


Şekil 4.17. Farklı çözücüler içerisinde sonikasyona tabi tutulan KNF çözeltilerinin üç farklı zaman noktasında homojenliğinin değerlendirilmesi.

Sonikasyondan hemen sonrası ($t=0$), çözeltilerde homojenlik görülmemiş, faz ayrımı belirgindir. Sonikasyon iki saat sonra ($t=2$), DMA, THF, ISO ve % 95 alkol içeren çözeltilerde KNF agrege olmuş ve kabın dibinde birikmiştir. Bu çözeltilerde gözle görülür bir faz ayrımı ile karşılaşmıştır. Gliserol içerisindeki KNF'in agrege olmamasına rağmen homojen bir dağılım gözlenmemiştir. % 1 SDS ve KNF-SDS (1:1) çözeltilerinin daha homojen bir görünüm kazandığı tespit edilmiştir.

Sonikasyon işleminden 16 saat sonra ($t=16$), gliserol içerisindeki KNF'ler homojen bir hale yakın olduğu ancak pipetaj işleminin zorluğu fark edilmiştir. DMA, THF, % 95 etanol ve IPA içerisindeki KNF'ler agrege olmuş ve faz ayrımı gözle görülür haldedir.

Farklı çözücülerle hazırlanmış KNF çözeltilerinin homojenlik durumunun daha ayrıntılı olarak değerlendirilmesi için hazırlanan çözeltilere ait mikroskop altındaki görüntüler Şekil 4.18'de sunulmuştur.

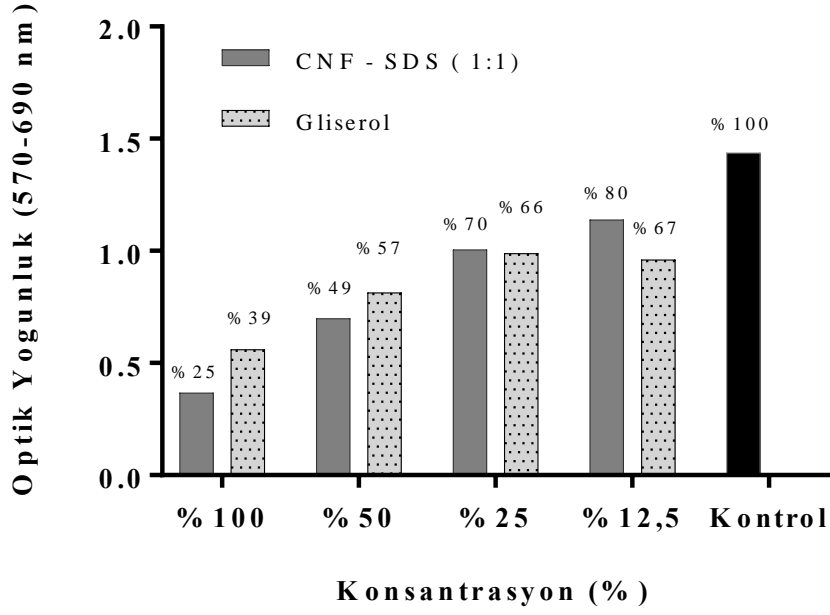


Şekil 4.18. Çeşitli organik çözücüler kullanılarak hazırlanan KNF çözeltilerinin mikroskop görüntüleri: tetrahidrofuran (THF, A), izopropanol (IPA, B), Etanol (C), DI (D), Gliserol (E).

Buna göre KNF'in hidrofobik özelliğinden dolayı suda ve organik çözeltilerde homojen dağılımı oldukça zor olduğu için önceki raporlarda bahsedildiği üzere farklı çözücüler kullanılarak KNF homojen bir çözelti haline getirilmeye çalışılmış, ancak istenilen homojenlikte iletken mürekkep üretilenmemiştir. Hazırlanan % 1 SDS ve KNF-SDS (1:1) karışımlarında da KNF'in DI içerisindeki homojen dağılımı gözlenmiş, bu ikisi arasından KNF-SDS (1:1) 'in daha başarılı bulunmuştur.

Deterjanlar, KNF etrafında misel yapısı oluşturarak su içerisindeki çözünürlüklerini arttırdıkları bilinmektedir [125]. Ancak yapılan çalışmalar deterjanla çözdürülmüş karbon temelli yapıların hücre canlılığı üzerinde sitotoksik etki gösterdiğini ileri sürmektedir [126].

Bu bilgiler ışığında hazırlanan çözeltiler arasında homojenliğe en çok yaklaşan gliserol ve 1:1 eş molar KNF:SDS çözeltileri elastomerlerin yüzeyindeki 500 µm kanallara yüklenmiş ve *in vitro* etkinliğinin değerlendirilebilmesi için L929 fibroblast hücre hattı ile sitotoksikite analizi yapılmıştır. 24 kuyucuklu kültür kabı içerisinde doz bağımlı yapılan MTT analizinde % 100, % 50, % 25 ve % 12.5 ekstrakt besiyeri ile etkileştirilen hücrelerin canlılıkları kültür kabında kültüre edilen hücre canlılığı ile karşılaştırılmış ve dozlara göre elde edilen 570 nm dalga boyunda absorpsiyon ölçümleri ve % hücre canlılığı Şekil 4.19'da paylaşılmıştır.



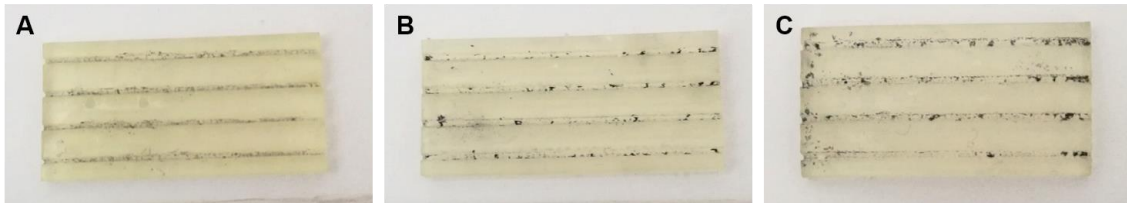
Şekil 4.19. Kanalları KNF-Gliserol ve 1:1 eş molar KNF:SDS çözeltisi kaplı PGS iskelelerin sitotoksosite grafiği.

Çalışma sonunda kontrol grubunda bulunan hücrelerin absorbans değeri $1,31 \pm 0,08$ olarak kaydedilmişken, KNF-SDS (1:1) çözeltisi için % 100 konsantrasyonda $0,36 \pm 0,002$ olarak; çözücüsü gliserol olan KNF çözeltisi için ise % 100 konsantrasyonda $0,56 \pm 0,03$ olarak kaydedilmiştir. En yüksek malzeme konsantrasyonuna sahip besi ortamında inkübe edilmiş hücrelerde, kontrol grubunun hücre canlılığı %100 kabul edildiğinde, KNF-SDS (1:1) çözeltisi % 25 canlılık, çözücüsü gliserol olan KNF çözeltisi için ise % 39 canlılık gözlenmiştir. ISO-10993 standardına göre, hücre canlılığı % 70'in altında bulunduğu malzemeler toksik olarak nitelendirilir. Çalışma kapsamında görülen yüzde canlılık değerleri KNF-SDS (1:1) ve çözücüsü gliserol olan KNF çözeltisinin hücre üzerinde toksik etkisinin olduğunu göstermektedir. Yapılan bu çalışmaya göre çözeltilerde homojenliğin etkin olarak çözünmemesi ve çözücü kaynaklı sitotoksiteden kaçınmak amacıyla alternatif metotlar araştırılmıştır.

4.3.1.2 Foto Çapraz Bağlanabilir Jelatin Metakrilat (GelMA) Çözeltisi ile KNF Çözeltisinin Hazırlanması

GelMA hidrojel, uygun biyolojik özellikleri ve ayarlanabilir fiziksel özellikleri nedeniyle, çeşitli biyomedikal uygulamalar için yaygın olarak kullanılmaktadır [127]. GelMA, RGD bağlayıcı sekanslar içeriği sayesinde hücrelerin hidrojel yüzeylerine bağlanmasına izin veren kolajen yapısına benzer biyoaktiviteye sahiptir [128]. Literatürde bulunan GelMA-KNT çalışmaları incelendiğinde GelMA'nın hidrofilik kısımları su ile etkileşime girerken polipeptit zincirinin hidrofobik bölümleri ise KNT'lerin etrafını etkili bir şekilde kaplayabildiği belirtilmiştir. Sonuç olarak, polipeptit zinciri ve KNT yan duvarları arasındaki hidrofobik etkileşimler nedeniyle GelMA kaplamasının nanotüplerin mekanik stabilitesini arttırdığı tespit edilmiştir [129]. Bu bilgilerden yola çıkarak jelatin polipeptitin bir türevi olan GelMA, KNT benzeri yapıya sahip KNF'lerin dispersiyonu için biyolojik olarak uyumlu bir yüzey aktif cisminin rolünü de oynayabileceği düşünülmüştür.

Buna göre GelMA sentezinin ardından 0,3 mg/mL konsantrasyona sahip KNF-GelMA çözeltisi hazırlanmış ve sonikasyon işlemi sonucunda çözeltinin organik çözücüler ile hazırlanan çözeltilere göre daha homojen halde olduğu görülmüştür. Bunun sonucunda çözelti PGS elastomeri yüzeyindeki kanallarına yüklenmiş, yüklenen çözelti miktarı küçük olduğu için yükleme sonrası UV çapraz bağlama işlemi oldukça hızlı gerçekleştirilmiştir. Kanal içerisindeki çapraz bağlanmış KNF-GelMA görüntüleri Şekil 4.20'de verilmiştir.



Şekil 4.20. Farklı uygulama süreleri ile muamele edilen kanal yapısında GelMA-KNF çözeltisi PGS elastomerler; 2 x 90sn (A), 4 x 90 sn (B), 6 x 90 sn (C).

Hazırlanan PGS elastomerlerin UV ışınına maruz bırakıldığında PGS yapısında gözle görülür bir değişim olmamasına rağmen kanallar da bulunan GelMA-KNF çözeltisinde belirlenen sürelerin hepsinde jelleşme gözlenmesi beklenirken kanal içerisinde çözeltinin kurumasından dolayı KNF 'in homojen olmayan bir dağılım sergilediği tespit edilmiştir.

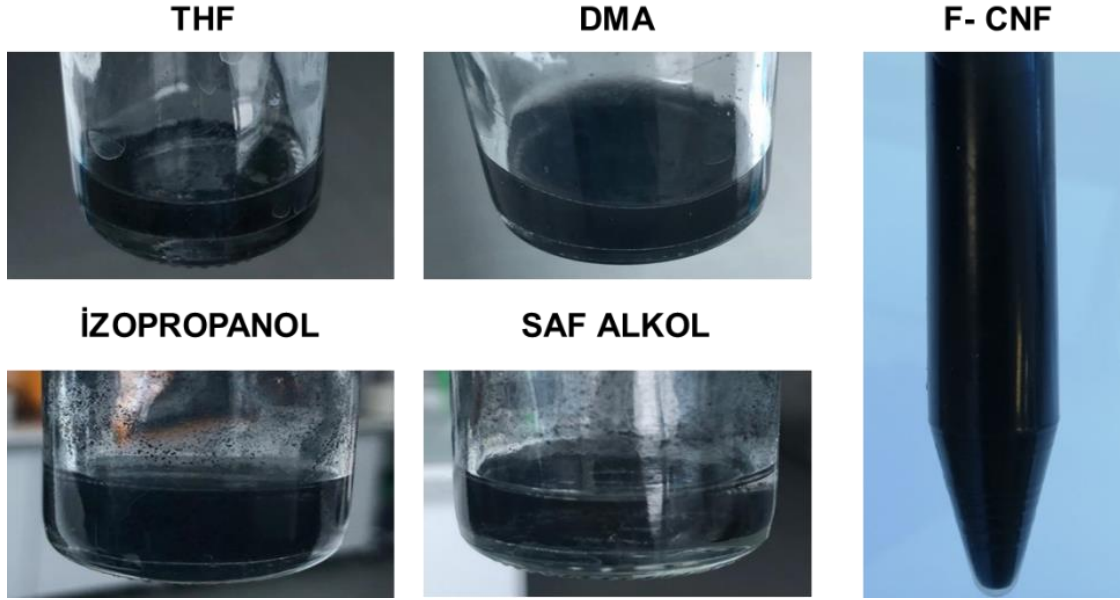
4.3.1.3 Fonksiyonelleştirilmiş KNF ve Karakterizasyonu

Karbon bazlı tüp ve fiberler inert yapıları nedeniyle, van der Waals kuvvetleri tarafından bir arada tutulduğu demetlere oluşturma eğilimindedir ve bu nedenle organik matrislerde iyi dağılmazlar. Birçok uygulama için, nanotüp ve fiberlerin demet yapısı oluşturması istenmemektedir. Bu nedenle, karbon yapıların yüzeyinin organik matrislerdeki dağılımını optimize etmek için uygun bir şekilde geliştirilmesi gerekir. Yüzey işlevselliği elde etmek için çeşitli yollar ile yüzey modifikasyon araçları oldukça yaygındır [130, 131].

İşlevselleştirme yoluyla KNF yüzeyinin modifikasyonu, dispersiyonu iyileştirmenin yaygın bir yolu olmuştur. Oksidasyon yoluyla üretilen karboksil gruplu işlevselleştirilmiş KNF'ler üzerinde yapılan farklı araştırmalara göre, KNF'nin yüzeyinde bulunan karboksil gruplarının, KNF ve diğer bileşikler arasındaki etkileşim için yararlı olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, asit muamelesi ile üretilen karboksil gruplarının kullanılması KNT-polimer kompozitlerinde "bağı" geliştirmek için bu parçaların kullanılması önerilmiştir [132]. Literatürde fonksiyonelleştirme ile ilgili yapılan çalışmalar KNF'lerde de olmakla beraber genel olarak KNT'ler üzerinde yoğunlaşmıştır. Yapılan kovalent modifikasyonlar, çeşitli fonksiyonel grupların, karbon yapıların uçlarına veya yan duvarlarına kovalent bağlar vasıtasıyla bağlanmasıyla kimyasal fonksiyonelleştirmeyi içerir. Çözünürlük ve işlenebilirliğin artırılmasının yanı sıra, kovalent modifikasyon aynı zamanda karbon bazlı yapıların yapısal ve elektronik özelliklerini değiştirmek ve faydalı özelliklere sahip yeni tip karbon bazlı materyaller elde etmek için bir fırsat sunmaktadır [133].

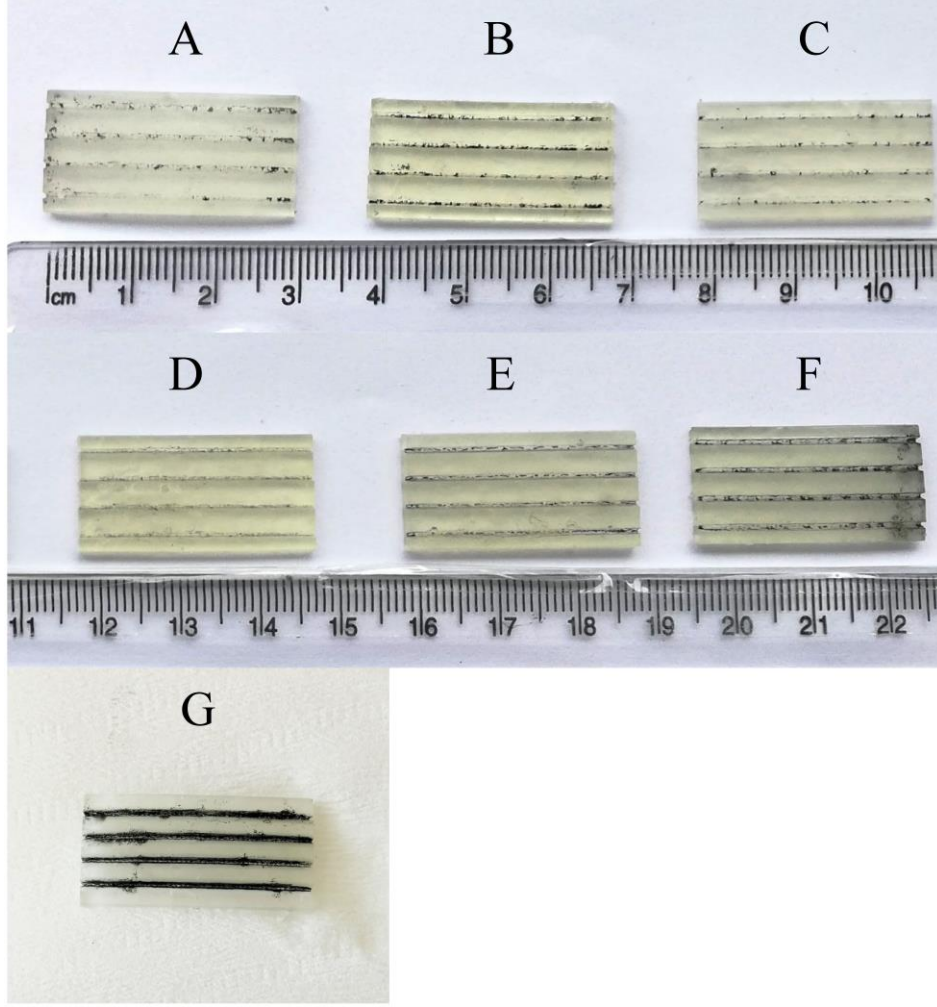
Bu bilgiler ışığında PGS elastomerin kanallarına daha homojen bir kaplama yapabilmek amacıyla KNF'ler asit muamelesine ile karboksilatlanmıştır. Elde edilen f-KNF'ler PGS kanallarına yüklenmek üzere iletken mürekkep hazırlanmasında kullanılmıştır.

Konsantrasyonu 0,3 mg/mL olan f-KNF-DI çözeltileri hazırlanmış ve 2 saat soniklenerek homojen hale getirilmiştir. Hazırlanan çözeltilerle diğer çözücülerde hazırlanan KNF çözeltilerinin homojenlik karşılaştırması Şekil 4.21’de verilmiştir.



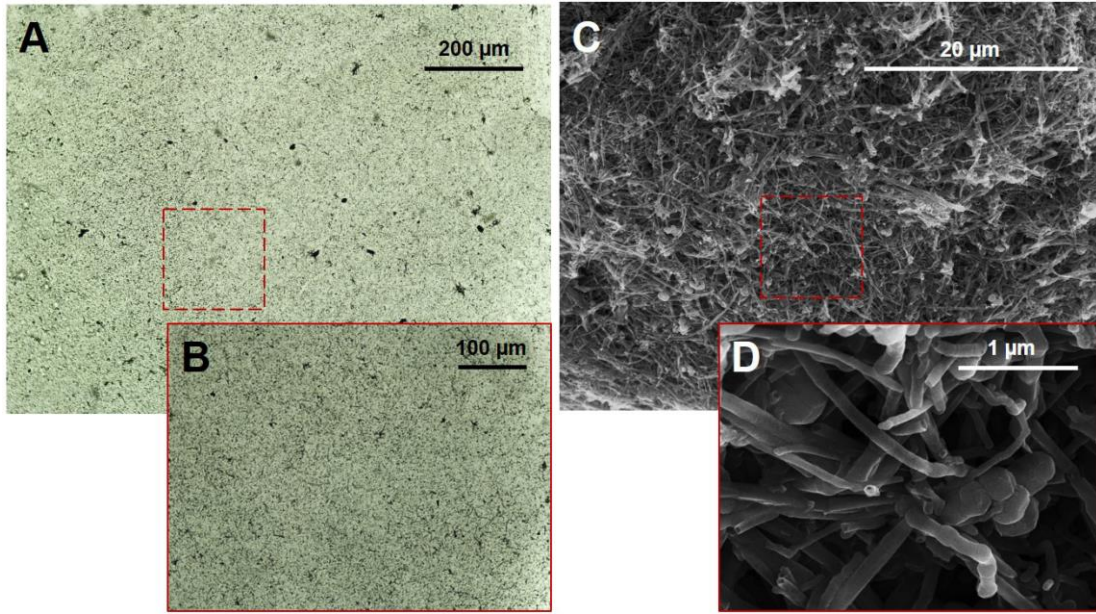
Şekil 4.21. Önceki çalışmalarda organik çözücüler kullanılarak hazırlanan KNF çözeltileri ve f-KNF’in suda çözündürülmesi ile hazırlanan çözeltiler.

CO₂ lazer ile yüzeyinde kanallar oluşturulan PGS elastomerlerin kanallarındaki görüntüsünü incelemek amacıyla hazırlanan f-KNF çözeltileri kanallara kaplanmış, işlem sonrası elde edilen doku iskelesi ve farklı çözücülerle hazırlanan KNF çözeltileri ile kaplanan PGS elastomerleri Şekil 4.22’de gösterilmiştir.



Şekil 4.22. Farklı çözücüler kullanılarak hazırlanan CNF çözeltilerinin PGS yüzeyinde bulunan kanallara yüklenmesi sonucunda elde edilen görünüm: (DMA (A), THF (B), IPA (C), Gliserol (D), KNF-SDS (1:1, E), % 95 Etanol (F) ve f-KNF (G)).

KNF'lerin asit karışımlarında karıştırma işlemi ile nanofiberlerin 100 nm ile 1 mikron arasında değişen uzunluklara oksitleme/dağlama etkisiyle fiber açık uçlarında karboksil grupları oluşturduğu, bu sayede DI içerisinde agrege olmadan homojen halde bir çözelti oluşturduğu tespit edilmiştir. Yapılan muamelenin başarısını göstermek adına 0,3 mg/mL f-KNF çözeltisi lam üzerine damlatılarak optik mikroskop altında incelenmiş, elde edilen görüntüler Şekil 4.22A ve Şekil 4.22B'de verilmiştir. Fiber morfolojisini daha yakından incelemek amacıyla f-KNF tozuna SEM analizi yapılarak fiber yapıları incelenmiştir (Şekil 4.22C ve Şekil 4.22D).



Şekil 4.23. DI kullanılarak hazırlanan homojen F-KNF çözeltisinin morfolojik incelemesi: Optik mikroskop altında 10X (A), 20X (B) büyütmelemlerde alınan görüntüler; SEM analizinde sonucunda elde edilen görüntüler (C-D).

Şekil 4.23A ve Şekil 4.23B incelendiğinde hazırlanan çözeltinin çok düşük miktarda agregasyon olmasına rağmen homojen bir dağılım sergilediği gözlenmektedir. Mevcut düşük miktardaki agregasyon çözelti hazırlanması sırasında sonikasyon süresinin uzatılmasının bu problemi gidereceği düşünülmüştür. Elde edilen f-KNF yapılarının SEM analizi gerçekleştirildiğinde (Şekil 4.23C ve Şekil 4.23D) fiber yapılarının korunduğu ve asit muamelesinin herhangi bir zarar vermediği gözlenmektedir [134].

Çalışmada elde edilen f-KNF'lerin DI içerisinde şimdiye kadar denenen bütün çözücülerden daha iyi dağılmış, daha homojen bir görüntüye sahip olduğu belirlenmiştir. Bu çözelti ile kaplanan kanallı PGS'lerin görüntüsü incelendiğinde de önceki aşamalarda organik çözücüler, alkoller vb. gibi çözücülerle hazırlanan çözeltilere ve GelMA hidrojeline göre daha homojen bir dağılıma sahip olduğu gözlenmiştir. Karbon nano yapıların işlevselleştirilmesi, kompozit iskele üretiminde önemli bir konudur. Yapıya eklenen fonksiyonel grupların PGS ile f-KNF birleştirilmesi aşamasında polimerik matris ile KNF'in arasında güçlü ara yüz bağı elde edilmesini bu sayede dağılımın başarılı olmasını sağlaması beklenmektedir.

4.3.1.3.1 Raman Spektrofotometresi

KNF'in fonksiyonelleştirilmesini incelemek amacıyla Raman spektroskopisi kullanılmıştır. Karbon kaynaklı malzemelerin karakterizasyonu için yaygın olarak kullanılan Raman spektrofotometresinde gözlenen bantların konumu, genişliği ve yoğunluğu karbon formları hakkında bilgi vermektedir. Çalışmada hazırlanan f-KNF yapılarının sonuçları işlem görmemiş KNF'ler ile karşılaştırıldığında D, G ve 2D bantlarının varlığı gözlenmiştir. Diyagramda 1282-1340 cm^{-1} civarında tanımlanan D (Düzensizlik) bandı, bozulmuş sp^3 karbon yapısının varlığını gösterir ve amorf karbondan kaynaklanan yapısal bozukluk ve diğer bazı yapısal kusurlarla ilişkilidir. Öte yandan, 1550-1600 cm^{-1} aralığında gözlenen G (Grafit) bandı ise C-C (sp^2) bağ germe titreşimlerine atanır ve sp^2 karbon atomlarının sıralı bir grafitik yapısı ile ilişkilidir. Son olarak gözlenen 2600 cm^{-1} 'de gözlenen 2D-bandı ise D-bandının fazla tonudur ve D ve G tepe noktalarına göre çok daha küçüktür.

Çizelge 4.6. KNF ve f-KNF'ye ait Raman spektrofotometre sonuçları.

	KNF			f-KNF		
	D Bandı	G Bandı	2D Bandı	D Bandı	G Bandı	2D Bandı
Raman Kayması	1333	1563	2669	1342/1346	1571	2690
Şiddet	223,6	365,9	266,3	248,5	364	1,42
ID/IG	0,611			0,68		
IG/I2D		1,37			1,42	

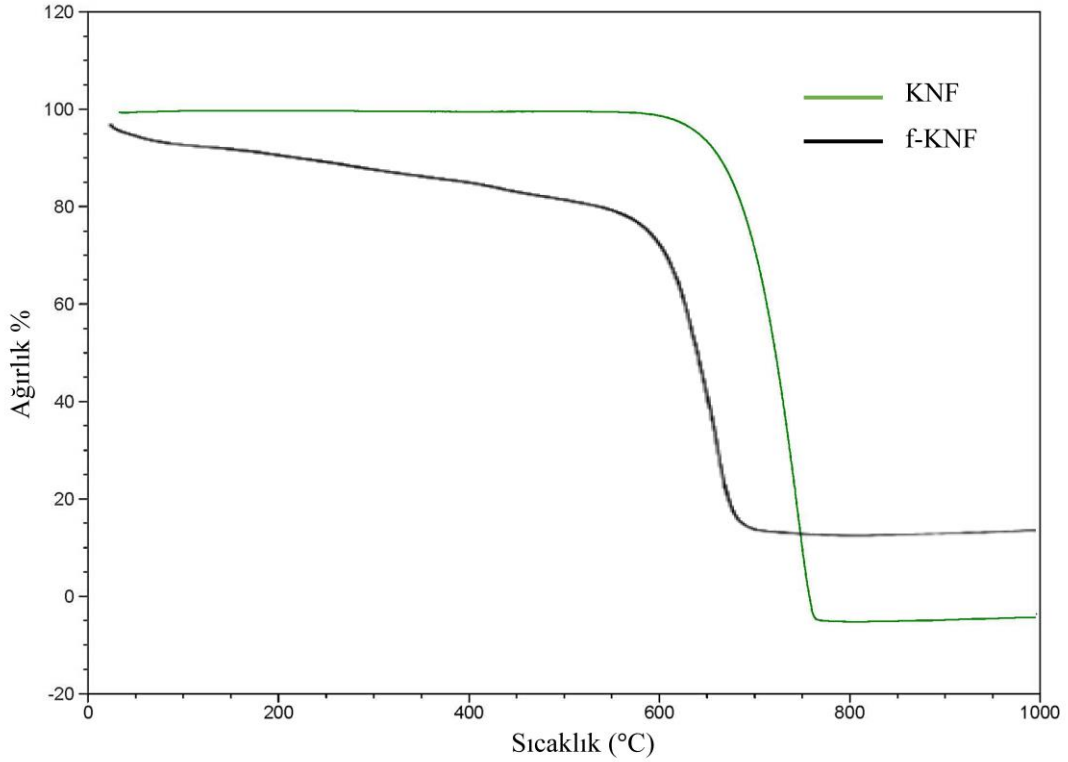
Çizelge 4.6'de verilen KNF ve f-KNF'nin Raman saçılma spektrumları dalga yoğunlukları G bandında birbirine göre normalleştirilmiştir. İki karbon yapısında da zayıf yoğunlukta D bandı gözlenmiştir. Genellikle karbon yapılarında G bandı ile karşılaştırıldığında büyük bir D zirvesi genellikle kötü bir rezonans durumu anlamına gelir. Bu durum genellikle amorf karbonun varlığını göstermektedir. F-KNF yapısındaki D bandının dalga yoğunluğu 223,6 olarak ölçülürken KNF'in dalga yoğunluğu 248,5 olarak belirlenmiştir. Bu durum yapıdaki düzensizliğin fonksiyonelleştirme ile arttığı bir göstergesidir.

D bandına kıyasla işlem sırasında meydana gelen bozulmalardan daha az etkilenen G bandının, tepe konumu KNF yapısında yaşanan gerilimi gösterir. KNF gerildiğinde, atomlar arası mesafeleri değişir ve böylece G-bandının titreşim frekansı değişir. Bu durum dalga sayısı değişmesine neden olur [135]. Gerilim daha büyük olduğunda, dalga sayısının kayması da değişir [136]. Çalışmada KNF'in fonksiyonelleştirme işleminden sonra dalga sayısı 1563 cm^{-1} 'den 1571 cm^{-1} 'e yükselmiştir. Bu küçük miktardaki artış atomlar arasındaki mesafenin azaltılmasından dolayı kaynaklanmaktadır.

KNF'lerin kimyasal fonksiyonelleştirilmesi, bu bantların yoğunluğunda ve genişliğinde değişikliklere yol açar. Raman Spektroskopisi ile karakterizasyonun kullanılmasındaki diğer nemli bir özellik ise karbon nanofiberlerin kalitesini belirlemede kullanılmasıdır. Karboksilik, karbonil, hidroksil, vb. gibi fonksiyonel grupların oluşumunun, yapı kusurlarının sayısındaki artış nedeniyle yüzey karbon sp^2 'sini bir sp^3 hibridizasyonuna değiştirebileceği iyi bilinmektedir. Bu nedenle, D-bandının G-bandına (ID/IG) yoğunluk oranının hesaplanması yapıdaki düzensizlik ve kusur yoğunluğunun belirlenmesinde önemlidir. Bu orandaki artış, fonksiyonel grubun yüzey karbon atomlarının daha büyük sp^3 karakterine doğru hibridizasyonunu değiştirerek kusurların sayısını arttırdığını göstermektedir [137, 138]. Bu bilgiye dayanarak sonuçlar incelendiğinde fonksiyonelleştirme işleminden sonra ID/IG oranı 0.61'den 0.68 yükselmiştir. Bu durum fonksiyonelleştirme işlemi sırasında uygulanan asit muamelesinin literatürde de gözlendiği gibi KNF yapısında bozukluk ve düzensizliklere neden olduğunu göstermektedir [139]. D/G oranındaki bu artışın, KNF'nin maruz kaldığı çeşitli tedaviler sırasında üretilen KNF yüzeyi üzerinde mevcut fonksiyonel grupların sayısında açıkça bir artış olduğu açıktır. Öte yandan 2D ve G-bantlarının (I2D/IG) yoğunluk oranı KNT'ler üzerindeki bozukluk derecesini belirleyebilmektedir [140]. Bu oranın fonksiyonelleştirme ile KNF'lerde 0,72'den 0,70'e düşmesi de yapıda az miktarda bozulmanın bir göstergesidir.

4.3.1.3.2 TGA

TGA analizleri, fonksiyonelleştirilmiş karbon nanofiber yapılarının yüzey oksijen fonksiyonel gruplarının ayrıştığı sıcaklıkların belirlenmesini sağlar. KNF ve f-KNF'nin TGA profilleri Şekil 4.24'te verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde KNF ve f-KNF'lerin benzer analog termal stabilitesine sahip olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.24. KNF ve f-KNF'ye ait TGA analiz sonuçları.

KNF'lerin TGA eğrisi ün ana bölge vardır. İlki su kaybı nedeniyle ilki 50 °C ile 200°C arasındadır. İkinci pik 200°C–500°C arasında görülen kolayca buharlaşan karbondioksitten hafif amorf polikarbonların ayrışmasını gösterir. Üçüncü bölge ise 500°C üzerinde karbonun aşamalı olarak yok edildiğini gösterir [141]. Buna göre KNF için ağırlık kaybının çoğunun yaklaşık 650 °C olduğu belirlenmiştir. 500 °C'nin üzerinde meydana gelen ağırlık kaybı, düzensiz veya amorf karbonun ve diğer metal safsızlıkların bozunmasına bağlanabilir [142].

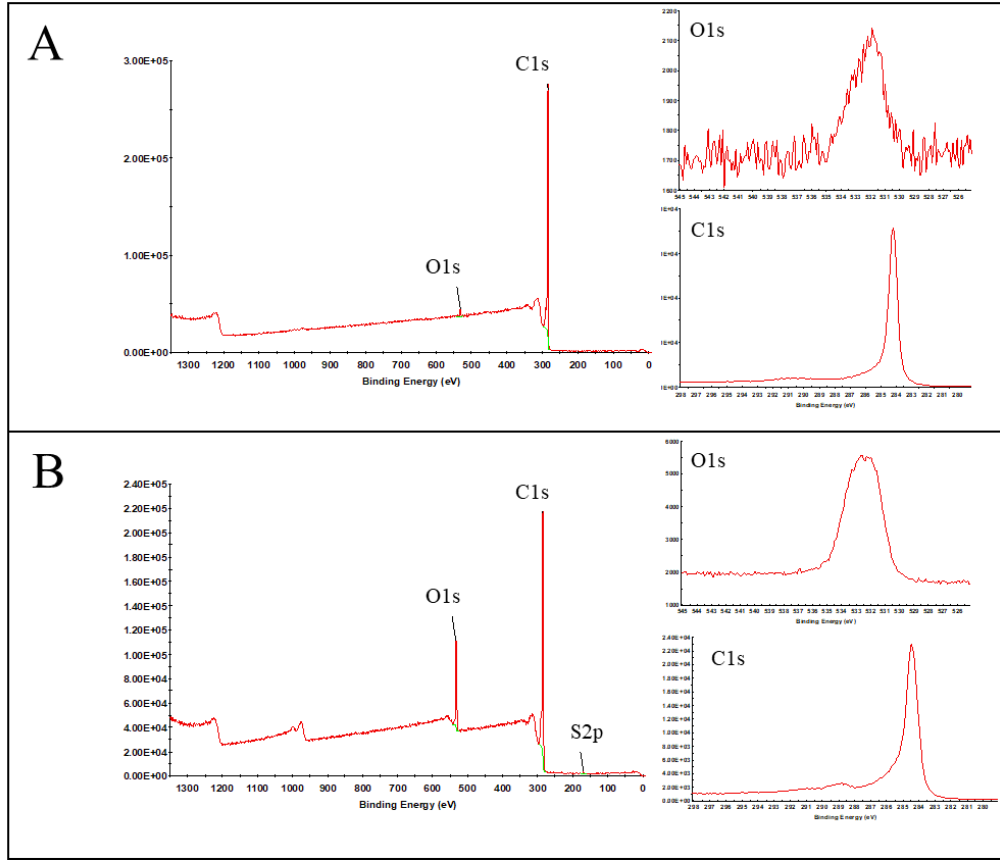
Diğer yandan f-KNF'nin termogramında görülen 65 °C'de gözlenen tepe, fiziksel soğurulmuş suyun desorpsiyonundan kaynaklanırken, ağırlık kaybının çoğunun yaklaşık 450 °C'de olduğu görülmüştür. KNF'nin yüksek sıcaklık direnci, nispeten iyi

kristalleşmiş yapıyı göstermektedir. Buna göre ham KNF'ler, f-KNF'lerden daha kararlıdır. Gözlenen stabilize edilmiş sıcaklığın, işlevselleştirme adımından güçlü bir şekilde etkilendiği bilinmektedir [143]. Bu sıcaklık değerindeki farklılık, f-KNF materyalindeki yüksek hidrofilik grup içeriğine atfedilir [144].

Malzemedeki hidrofilik grupların erken kaybindan kaynaklanan kusurlar, KNF'lere kıyasla daha düşük bir sıcaklıkta f-KNF bozunmasından sorumlu olabilir. İşlem görmemiş KNF, bu KNF'nin sentezinden kaynaklanan safsızlıklara ve aromatik bileşiklere atfedilebilen % 6,9'luk bir kütle kaybına sahiptir. f-KNF için kilo kaybı %14,72'ye yükselerek gözle görülür bir artış izlenmiştir. Kütle kaybındaki bu fark, her işlem için KNF'nin yüzeyinde biriken organik malzeme miktarına bağlanabilir [138].

4.3.1.3.3 XPS

XPS analizi enerji-elektron ilişkisine dayanan yüksek hassasiyet ile malzeme kompozisyonu ve yüzey bileşenlerinin karakterizasyonunda kullanılan spektroskopik bir analizdir. Çalışma kapsamında işlem görmemiş KNF ve f-KNF materyallerine XPS analizi yapılmış, elde edilen veriler karşılaştırılarak fonksiyonelleştirme işleminin etkinliği değerlendirilmiştir. Analize göre bütün materyallerin ana bileşenleri karbon ve oksijendir. XPS analizinde f-KNF'de gözlenen eser miktardaki S2p, asit muamelesi sonucunda yapıda kalan sülfürün göstergesidir. C1s ve O1s'in yüksek çözünürlüklü spektrumları Şekil 4.25'de verilmiştir.



Şekil 4.25. Karbon yapıların XPS sonuçları: KNF (A); f-KNF (B).

KNF'de C1s ve O1s'e ait pikler sırasıyla gravit zirvesini gösteren 284,1 eV piki ve 531,3 eV oksijen atomuyla (O^{2-}) ilişkili BE pikleri gözlenmiştir. Bu pikler f-KNF'de sırasıyla 284,4 eV ve 531,3 eV'de tespit edilmiştir. C1s'e ait pik yoğunlukları karşılaştırıldığında KNF malzemesine, f-KNF'deki C1s pik yoğunluğunun daha düşük olması, yüzey kusurlarına ve C-H terminallerine atfedilebilir. Bu durum asit muamelesi sırasında pH ölçümleri yapılarak pH değerinin nötr değere (~ 7.0) tutulmasına dikkat edilmesinin önemini vurgulamaktadır. Artan enerjiye doğru genişleme, tekli ve çoklu karbon-oksijen bağlarının varlığına bağlanır. Ayrıca f-KNF yapısında KNF'den farklı olarak C-O bağına ait 288,7 eV civarında gözlenen BE piki C-O bağına doğrulamaktadır. Bununla beraber O1s BE pikleri karşılaştırıldığında f-KNF'in beklenildiği üzere daha yoğun bir pike sahip olduğu tespit edilmiştir [145].

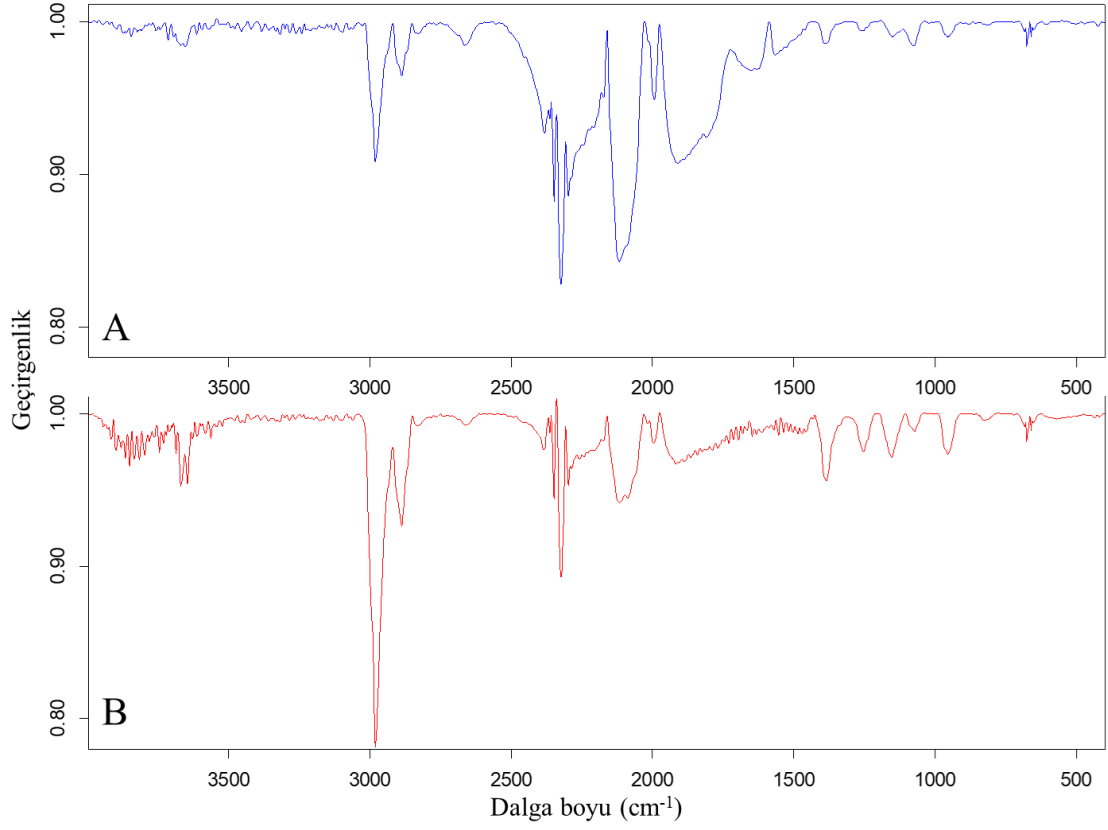
Çizelge 4.7. KNF ve f-KNF'ye ait elemental birleşimi (%).

Materyal	C	O	S
KNF	%98,07	%1,93	
f-KNF	%86,43	%13,31	%0,26

KNF örneğindeki C1s ve O1s ve bölgeleri için atomik konsantrasyonlar Çizelge 4.7'de verilmiştir. Buna göre f-KNF'in % oksijen oranının KNF'den daha fazla olması f-KNF'nin yüzeyinin grafit benzeri malzeme yerine birkaç oksijenli türden oluşan bir karbon oksit formuna benzediğini gösterir [139].

4.3.1.3.4 FTIR

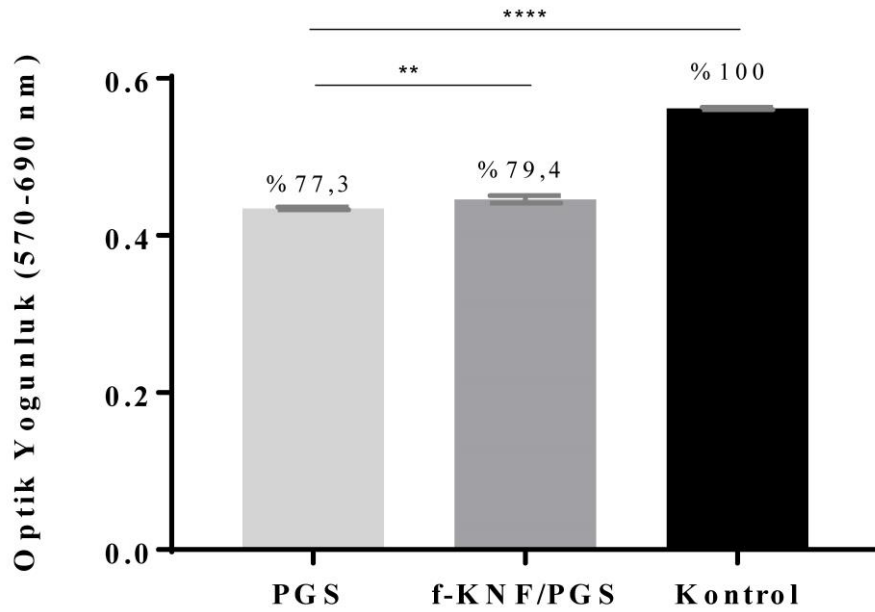
Kimyasal yapının değerlendirilmesi amacıyla yapılan FTIR analizine göre Şekil 4.26'da gösterildiği gibi, 3700 cm^{-1} civarındaki tepe, serbest hidroksil gruplarına atfedilmiştir. 2919 cm^{-1} 'deki pik, karbonil grubundaki $\text{H}-\text{C}=\text{O}$ 'nun C-H germeleri ve uzun zincirli bir alkil molekülünün varlığını göstermiştir. f-KNF'lerin IR spektrumları, 2300 cm^{-1} 'deki pik, güçlü hidrojen bağlı $-\text{COOH}$ ' dan O-H esnemesiyle ilişkilendirilebilir. Bu pik şiddeti belirgin şekilde f-KNF'de daha yüksek şiddettedir. KNF spektrumundan farklı olarak 1700 cm^{-1} civarında görülen pik f-KNF'nin yüzeyindeki karboksilik grupların gerilme modu ile ilişkilidir. Bu da f-KNF'nin yüzeyindeki karbon atomlarının oksidasyon nedeniyle oluştuğunu belirtmiştir. 1630 cm^{-1} 'deki tepe, CNT yapısının $\text{C}=\text{C}$ gerilmesine atanmıştır. KNT'lerin işlevselleştirilmesinden sonra karşılık gelen yeni yoğun bantlar $\text{C}=\text{O}$ (1636 cm^{-1}) ve $-\text{C}-\text{O}$ (1136 cm^{-1}) gruplarının gerilme titreşimleri ortaya çıkmıştır [146].



Şekil 4.26. FTIR spektrumları: f-KNF(A); KNF(B).

4.3.1.4 PGS Elastomerinin Kanallarına Kaplanmış f-KNF'nin Sitotoksite Analizi

Hazırlanan f-KNF çözelti konsantrasyonunun hücre canlılığı üzerindeki etkisinin incelenmesi amacıyla % 0,5'lik f-KNF-DI çözelti içeren PGS elastomer kanallarına L929 hücreleri ekilerek Alamar mavisi yöntemi uygulanmıştır.

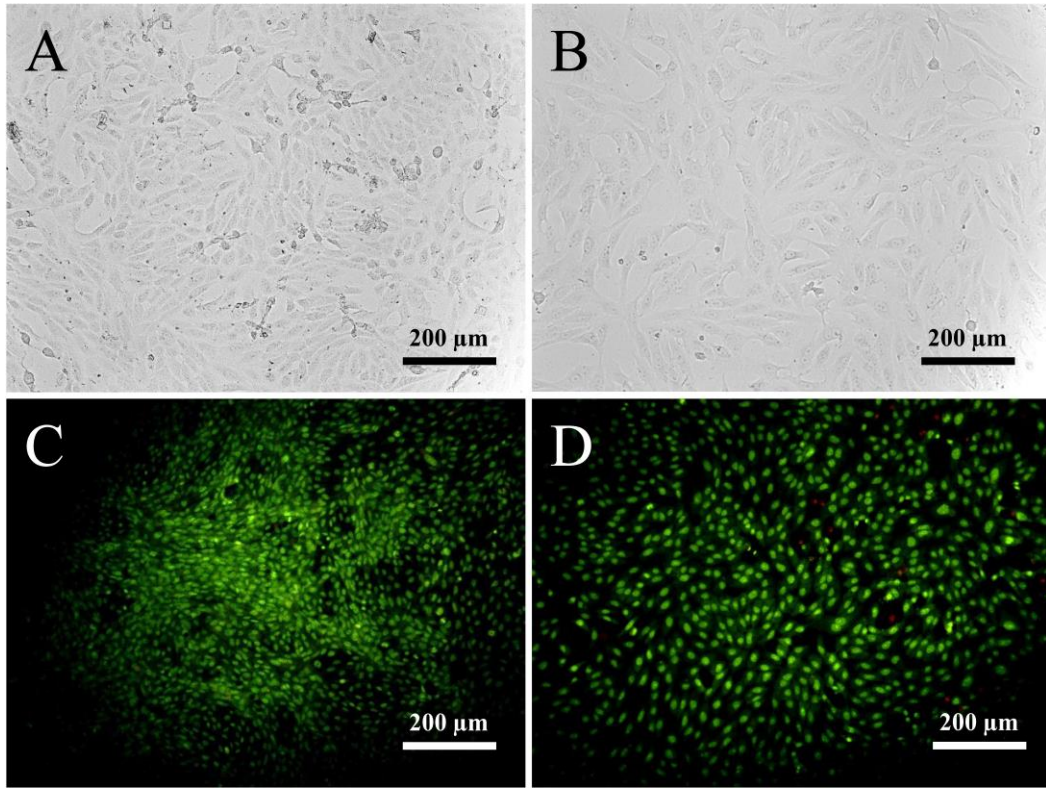


Şekil 4.27. PGS ve f-KNF iskelelerinin sitotoksitesinin alamar mavisi yöntemi ile değerlendirilmesi (** için $p \leq 0,01$, **** için $p \leq 0,0001$).

Şekil 4.27’de verildiği üzere, kültür kabında çoğaltılan hücre canlılığı %100 kabul edildiğinde PGS üzerindeki canlılık % 77,3, f-KNF/PGS üzerindeki canlılık ise % 79,4 bulunmuştur. Bu durumda iki iskelenin de toksik olmadığı, f-KNF katkısının hücre üremesini daha çok desteklediği belirlenmiştir. Diğer yandan Bölüm 4.1.3.7.3’de verilen PGS elastomeri üzerindeki canlılığın azalması CO₂ lazer ile kanal işleme sonucu yapıda gelen degradasyon ürünlerine bağlanmıştır.

4.3.1.5 Apoptoz ve Nekroz Boyama ile Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi

Sitotoksite analizinin yapılan f-KNF iskelelerin hücresel davranışlar üzerinde etkisini incelemek amacıyla canlı/ölü boyama yapılmıştır.



Şekil 4.28. f-KNF/PGS iskelesine ait sırasıyla faz-kontrast ve apoptoz-nekroz boyamasına ait görüntüler: Kontrol (A-C); f-KNF/ PGS (B-D).

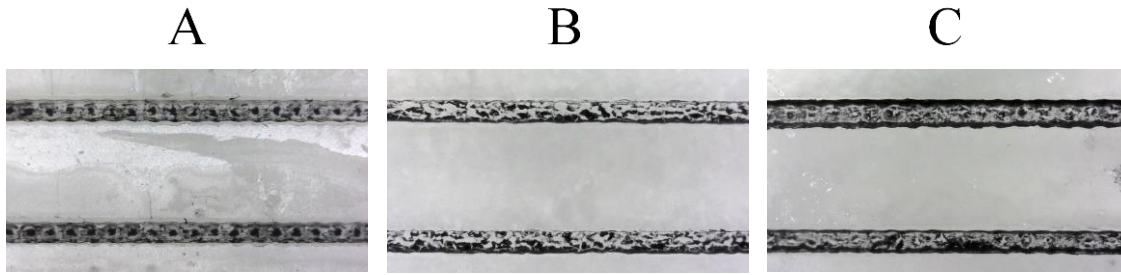
Şekil 4.28'de verilen görüntülere göre 24 saat inkübasyon ardından hücreler ait faz-kontrast görüntüleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hücre yoğunluğunda azalma gözlenmesine rağmen morfolojilerinin kontrol grubu ile aynı olduğu tespit edilmiştir. Canlı/ölü boyama sonrasında hücrelerin yeşil renge boyanması hücrelerin sağlıklı olduğunun bir göstergesidir. Bu sonuçlar toksik olmayan f-KNF'in hücre canlılığını desteklediğini göstermektedir.

4.3.2 Homojen KNF Çözeltisinin Mikro Kanallara Kaplanması

PGS elastomerlerin kanallarına yüklenen çözelti miktarı *in vitro* çalışmalarda hücre davranışını etkileyecek önemli bir parametredir. Bu nedenle ilk aşamada çözelti miktarı optimize edilmiştir. 500 µL kanallı elastomerin SEM görüntüsünde (Şekil 4.29) kanal şeklinin üçgen prizmaya benzediği gözlenmiştir. Analizde kanal genişliği 0,71 mm, derinliği ise 0,85 mm olarak ölçülmüştür. Kanal uzunluğunun da 30 mm olmasından yola

çıkarak yapılan hesaplamada kanala eklenmesi gereken çözelti miktarı $\sim 10 \mu\text{L}$ olarak hesaplanmıştır.

Çözelti miktarının belirlenmesinin ardından kaplama yöntemi ile ilgili çalışmalar başlatılmıştır. Bu aşamada kanallara $10 \mu\text{L}$ f-KNF çözeltisi eklenerek üç farklı kaplama yöntemi denenmiştir. Kaplama yöntemleri sonucunda iskele görüntüleri Şekil 4.29’da sunulmuştur.

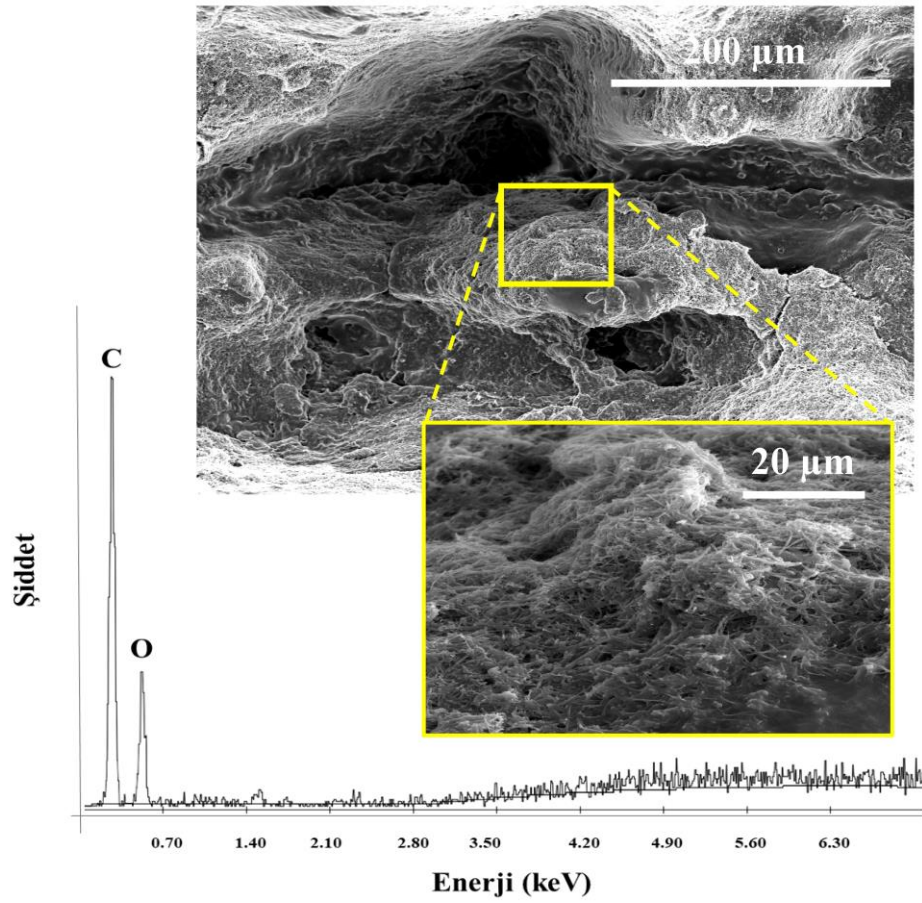


Şekil 4.29. Farklı yöntemlerle f-KNF’nin PGS kanallarına kaplanması: Sıcaklık (A); Vakum (B); Sıcak fan ile kurutma (C).

Kanal içerisine KNF kaplama işleminde homojenlik çok önemlidir. Çünkü yapılan çalışmalar fiber yapılarının birbiri ile teması ile iletkenliği arttığını göstermektedir.

İlk aşamada lazer ışınlarının elastomeri degrade etmesinden yararlanılarak kaplama denmiş ancak bu kaplama metodunda elastomer kanal içerisine yüklemenin hızlı olması ve elastomerin hızlı soğuması nedeniyle yer yer KNF birikmelerine ve boşlukların gözlenmesine neden olmuştur. Bu durum kanal iletkenliğini olumsuz etkilemektedir. Isı ile degradasyon sonucunda yapılan kaplamada karşılaşılan en büyük sorun f-KNF’in kanal duvarlarında kalması ve kanal dibine inememesidir. İkinci metot olarak kullanılan vakum etkisi ile kanala yüklendikten sonra düşen basınçla beraber kanal dibine çökmesi beklenmektedir. Bu sayede kanal dibine çöken f-KNF fiberleri arasında boşlukların azalması ve malzeme iletkenliğinin artması ve kanallar içerisinde uyumluluk göstereceği düşünülmüştür. Ancak vakum ortamında kanal genişliğinin dar olmasına ve ani basınç düşüşüne bağlı olarak kanal içerisinde oluşan hava baloncukları nedeniyle kaplama yüzeyinde mikro kırıklar gözlenmiştir. Bu durumda iletkenliği olumsuz olarak etkilemektedir. Son olarak denen sıcak fan ile kurutma işleminde ise hızlı kurutma işlemi

ile beraber iğne ucuyla sürekli baloncukların giderilmesi kanal içerisinde bütünlüğe sahip bir kaplama işleminin gerçekleştirilmesine sebep olmuştur. Bunun yanı sıra bu yöntemle kanalları kaplamış PGS iskeleler, kanal yüzeyine KNF'in tutunmasının kontrolü için 24 saat boyunca manyetik karıştırıcı yardımıyla DI ve alkolle yıkanmış ve bu süre sonunda KNF'in kanal yüzeyinde sabit durduğu gözlenmiştir. Optimize edilen yöntemle üretilen elastomerlerin kanal içerisinde görünülmesi ve f-KNF'in kanal içerisinde kaplanmasının doğrulanması amacıyla SEM analizi sırasında EdX analizi gerçekleştirilmiştir. Analizde elde edilen görüntüler Şekil 4.30'da verilmiştir.



Şekil 4.30. Kanalları f-KNF kaplı PGS elastomeri SEM görüntüleri ve EDX analizi.

Kanalları f-KNF kaplı PGS elastomerinin SEM görüntüleri incelendiğinde kanalın iç yapısında lazer kaynaklı yükselti ve çukurların bulunduğu, bu yükseltelerin f-KNF birikmelerinden kaynaklandığı gözlenmiştir. Bu durum yükselti yapılarının daha büyük büyütmelerde incelendiğinde fark edilmiştir. Kanal içerisinde belirtilen alanda uygulanan EDX analizine göre, % 56,25 karbon (C) ve % 43,75 oksijen (O) element oranı tespit

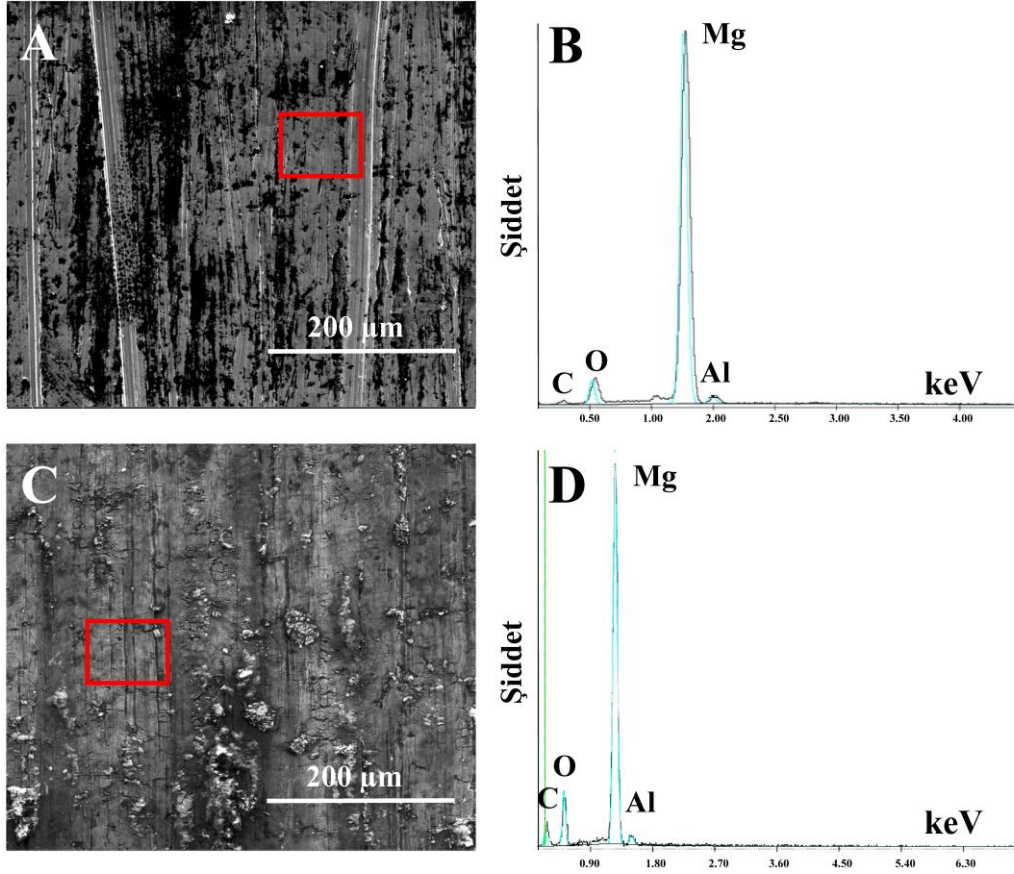
edilmiştir. Kanal içerisinde yüksek şiddetli C ve O pikleri ile fonksiyonelleştirme işleminin başarısını ve kanal içerisindeki kaplamanın varlığını gösteren bir parametredir. Diğer yandan f-KNF birikmesi sonucu oluşan tepe-çukur oluşumlarının giderilmesi amacıyla çözelti hazırlama aşamasında sonikasyon süresinin arttırılarak çözelti homojenliğine dikkat edilmesine karar verilmiştir. Bu veriler ışığında sıcak fan altında yapılan kaplama yöntemi çalışmalarda kullanılmak üzere seçilmiştir.

4.4 Magnezyum/PGS Kompozitinin Geliştirilmesi

4.4.1 Magnezyum Alaşımlarının Karakterizasyonu Çalışmaları

4.4.1.1 SEM ve EDX Analizi ile Morfolojik ve Yüzey Özelliklerinin Değerlendirilmesi

Şekil 4.31A'da Mg-I folyoya ait 500X büyütmede alınan SEM görüntüleri incelendiğinde Mg-I alaşımının yüzeyi, aşınma sonucu dikey çizgilere sahip olduğu izlemiştir. Bu durum Mg folyoların saklanma koşulları altında degradasyona eğilimli olduğunu göstermektedir (1). Ayrıca yüzeyde koyu renkli oksit tabakaların varlığı yüzeyin kolayca oksitlenebildiğini ve çalışma öncesinde malzemenin zımpara kâğıdı vb. gibi oksit uzaklaştırıcı işlemlere tabi tutulması gerektiğini göstermektedir. Şekil 4.31B'de belirtilen alanda yapılan EDX analizine göre yüzeyde yüksek miktarda magnezyum sinyali (Mg) ve düşük miktarda alüminyum sinyali (Al) saptanmıştır. EDX analizinde (Şekil 4.30B) çok küçük oksijen sinyalinin (O) varlığı, SEM görüntülerini doğrular nitelikte olup, metali çevreleyen hava ile reaksiyonlarının bir sonucu olarak Mg alaşımları üzerinde doğal olarak oluşan oksit tabakasına bağlanmıştır. EDX analizi, Mg-I alaşımında % 12,89 oksijen (O), % 83,48 Magnezyum (Mg) ve % 3,63 oranına alüminyum (Al) elementleri tespit edilmiştir.

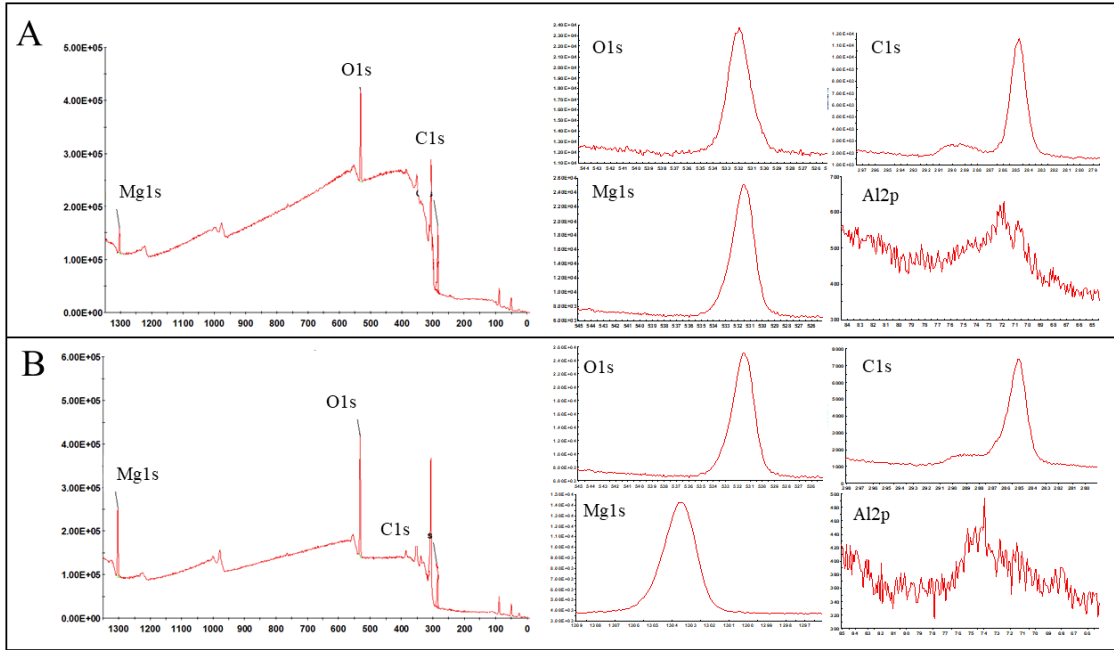


Şekil 4.31. Mg-I'nin morfolojik karakterizasyonu: SEM analizi görüntüleri (A); EDX analizi (B). Mg-K'nın morfolojik karakterizasyonu: SEM analizi görüntüleri (C); EDX analizi (D).

Mg-K folyoya ait Şekil 4.30C'de verilen SEM görüntülerinde görüldüğü üzere malzeme yüzeyinde belirgin halde mikro boyutlarda kırıklar ve çizikler saptanmıştır. Bu durum malzeme dayanımını etkileyebileceği gibi malzemenin iletkenlik özelliklerini de olumsuz etkileyebilmektedir. Bu kırıklar malzemenin Mg-I'e kalın olmasından dolayı daha zor işlenmesinden kaynaklanıyor olabilmektedir. EDX analizine göre (Şekil 4.31D) yüzeyde yüksek miktarda magnezyum sinyali (Mg) ve yine aynı şekilde düşük miktarda alüminyum sinyali (Al) saptanmıştır. Küçük oksijen sinyalinin (O) varlığı malzeme yüzeyindeki oksitlenmenin bir özelliği iken az miktarda az miktarda karbon (C) varlığı ise çevresel kirlilikten kaynaklandığı düşünülmektedir. EDX analizi, Mg-K alaşımında % 12,6 (O), % 68,71 Magnezyum (Mg) ve % 3,25 alüminyum (Al) ve %12,66 oranında karbon (C) elementleri tespit edilmiştir. İki metal birbiri ile karşılaştırıldığında ticari olarak satın alındığı için alaşım yüzeyleri homojen olarak kabul edildiğinde Mg-I'in magnezyum oranının Mg-K'ye göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir.

4.4.1.2 XPS Analizi

AZ31 Mg folyoların yüzey kimyasalını incelemek amacıyla iki farklı kalınlıktaki alaşıma XPS analizi yapılmıştır. Buna göre Mg1s, Zirkonyum (Zr)3d, Al2p, N1s, O1s ve C1s ile karşılık gelen XPS pikleri Şekil 4.32’de, analizden elde edilen temel bileşimi Çizelge 4.8’de paylaşılmıştır.



Şekil 4.32. Mg-I (A) ve Mg-K (B) alaışımının XPS spektrumu.

Çizelge 4.8. Mg-I ve Mg-K alaşımlarının yüzey elemental bileşimi (%).

Materyal	O1s	C1s	Mg1s	Ar2p1	Cl2p
Mg-I	33,87	59,95	5,16	1,02	-
Mg-K	45,11	37,83	15,24	0,92	0,9

Genel olarak, iki materyal türü içinde Mg, Al, Zr, N, O ve C elementleri varlığı gözlenmiştir. Mg-I folyoda kontaminasyondan kaynaklanabilecek küçük miktarlarda Ar tespit edilmiştir.

Mg-K’da Mg1s için BE piki 1303,4 eV’de ölçülürken Mg-I’da 1303,5 eV’de ölçülmüş bu pik, Magnezyum oksit (MgO)’ya atfedilebilecek tek bir zirve gözlemlenmiştir. Mg-I pik

yoğunluğu kalın Mg ile karşılaştırıldığında ~6 kat daha yüksek olduğu gözlenmiş, bu da Mg-K'nın yüzeyindeki yüksek oranda MgO oluşumunu göstermiştir [147]. Yapılan çalışmalar yüksek konsantrasyon MgO temasının hücre canlılığı için toksik etki yarattığını göstermektedir [148]. Bu durumda Mg-K için yüksek MgO oluşumu büyük bir dezavantaj oluşturmaktadır.

Diğer yandan, O 1s spektrumları üç tepe pik oluşumuna göre değerlendirilir. Buna göre yapıda kimyasal emilmiş OH⁻ ve C=O gruplarına karşılık gelen pikler Mg-I folyoda 533,0±0,1 eV düşük yoğunluklu bir pik olarak gözlenmiştir. İkinci olarak MgO oksijen atomuyla (O²⁻) ilgili pik, Mg-I ve Mg-K folyolarda sırasıyla 531,0 eV ve 531,5 eV'de yüksek yoğunluklu BE piki olarak tespit edilmiştir. Mg-K da bu pik yoğunluğunun ince folyoya göre daha yüksek olması yüzey oksitlenmesinin bir işaretidir. Diğer yandan bu piklerin ikisinin birden gözükmesi de, Magnezyum hidroksit (Mg(OH)₂) şelatlarının varlığını doğrular niteliktedir. Mg(OH)₂ varlığı, aktif bölgeleri korozyona karşı koruyarak agresif iyonların girişini yavaşlatır. Bu nedenle Mg-I folyonun korozyon direncinin Mg-K folyoya göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Üçüncü pik ise ince folyoda 534,0 eV'de, kalın folyoda ise 535,5 eV BE pikinde gözlenen bir C-O bileşeni (C1s piki ile gösterilir) ile karakterizedir.

Mg-I'ya ait XPS spektrumları incelendiğinde C1s spektrumları, aromatik halkayı, C-O bağını ve karboksilik grubu temsil eden 284,6, 287,3 ve 289,1 eV'de; kalın Mg, C1s spektrumları sırasıyla 285,08, 287,3 ve 288,8 eV'de ait üç zirveye ayrıştırılmıştır. Bu BE'deki piklere göre Mg-I'da serbest uçların daha fazla bulunması yüzeyin hidrojen bağ kurma eğiliminin daha yüksek olduğunun göstergesidir [149]. Diğer bir spektrum olan Al 2p, ince folyoda 72,1 eV'de ortalanmış geniş bir tepe gözlenirken Mg-K 'da 73,9 eV'de yüksek yoğunluklu bir pik olarak tespit edilmiştir. Bu pik, Al oksit ve/veya Al hidroksitin bir arada varlığını gösterir. Mg-K'daki yüksek yoğunluklu pik, Mg-I göre Al oksit oluşumunu doğrulamıştır [150].

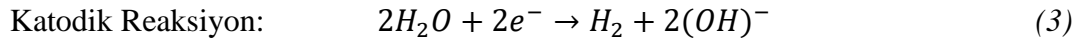
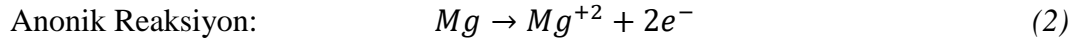
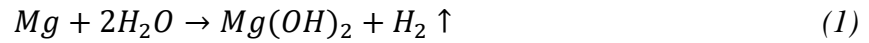
4.4.1.3 Degradasyon Özelliklerinin Belirlenmesi

Magnezyum (Mg) alaşımları, arzu edilen mekanik ve biyolojik özelliklerinden dolayı biyolojik olarak parçalanabilen tıbbi implantlar için umut verici malzemelerdir. Mg alaşımlarının klinik çevirisi, insan vücudundaki bozunma oranları üzerinde gelişmiş

kontrol gerektirir. Bununla birlikte, *in vitro* ile *in vivo* olarak ölçülen Mg alışı bozunmasında önemli farklılıklar bildirilmiştir [151, 152].

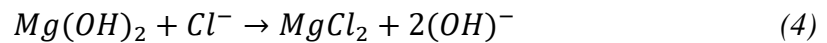
Fizyolojik sıvılar, Mg ve alışlarının bozunmasını teşvik eden agresif iyonlar açısından zengindir. Proteinler, fizyolojik sıvılardaki diğer bir önemli bileşendir, ancak bunların Mg bozunması üzerindeki etkileri hala tam olarak anlaşılammıştır. Bu nedenle, bu çalışmanın amacı, proteinlerin *in vitro* olarak Mg alışı bozunmasındaki rolünü araştırmak ve böylece Mg bazlı implantların *in vitro* ve *in vivo* çalışmaları arasındaki boşluğu doldurma yeteneğimizi geliştirmektir [153].

Mg, reaktif bir metal olduğu için sulu çözelti içine daldırıldığında (insan vücudunu taklit eden), su ile kolayca reaksiyona girerek ve aşağıda verilen *Denklem 1'e* göre hidrojen üretecektir [154].

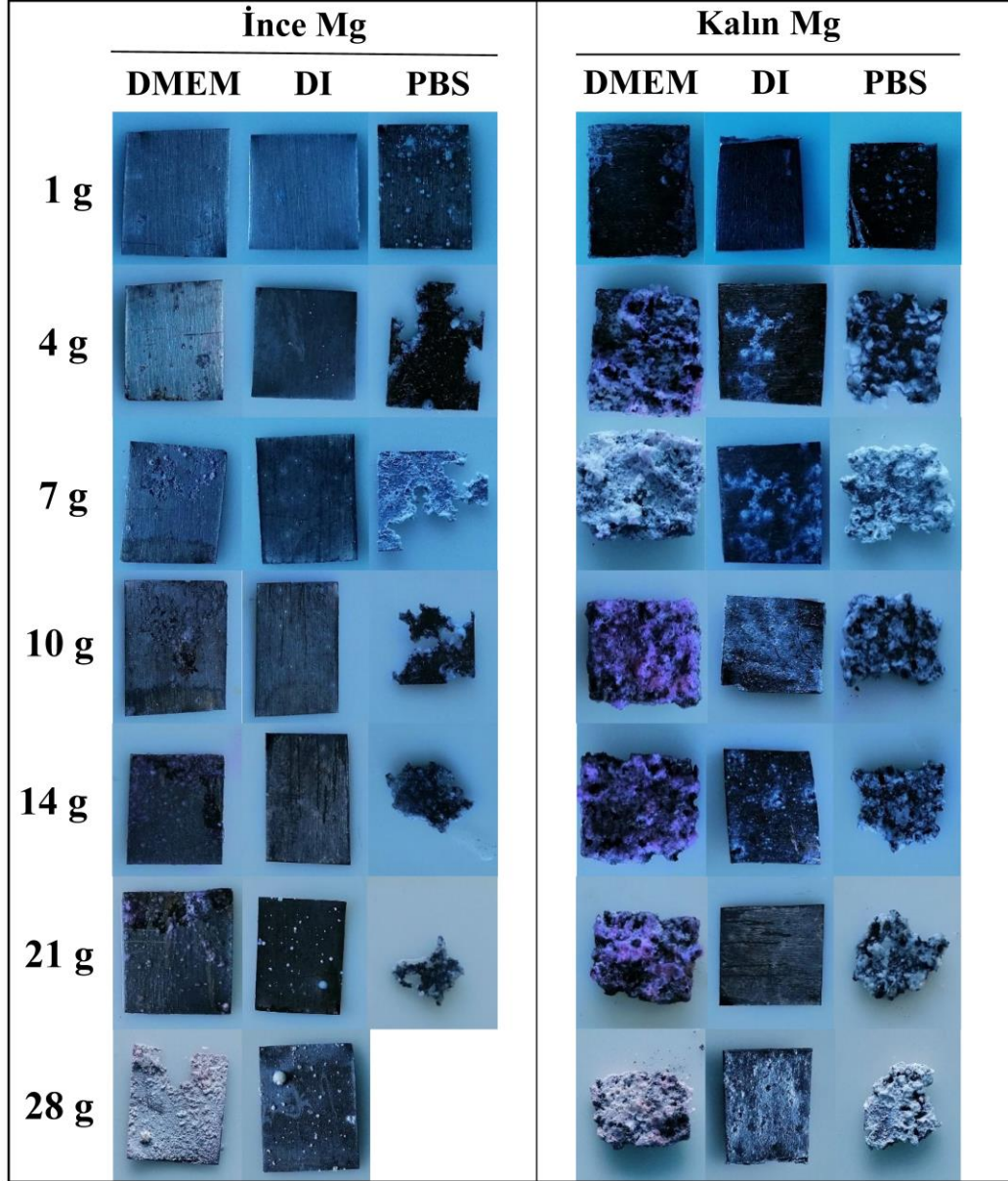


Korozyon reaksiyonu, *Denklemler (2) ve (3)* 'de verildiği üzere anodik ve katodik reaksiyona ayrılabilir [155].

Reaksiyonun başlangıcında, Mg^{+2} ve OH^- iyonlarının reaksiyonu sonucunda oluşan bir $Mg(OH)_2$ filminin, Mg alışının yüzeyinde adsorbe olacağı gözlenmiştir. Bu film sayesinde alışım suda çok az çözünür ve korozyonu kontrol altına tutulabilmektedir. Bununla birlikte, çözelti içerisinde zamanla $Mg(OH)_2$, *Denklem 4'te* sunulduğu üzere çözelti içerisindeki Cl^- tepkimeye girerek yüksek oranda çözünür Magnezyum Klorür ($MgCl_2$) oluşturmaktadır [156].



Mg alaşım içeriği bu tepkimelerin hızını belirlemektedir. Alaşım matrisine göre katodik fazların varlığı anodik reaksiyonları hızlandırması Mg(OH)₂ filmin daha hızlı yok edilmesine neden olacaktır. Koruyucu filmin kaldırılması ozeltinin alaşıma sürekli olarak nüfuz etmesi ile alaşım daha fazla ve hızlandırılmış korozyona maruz kalacaktır.



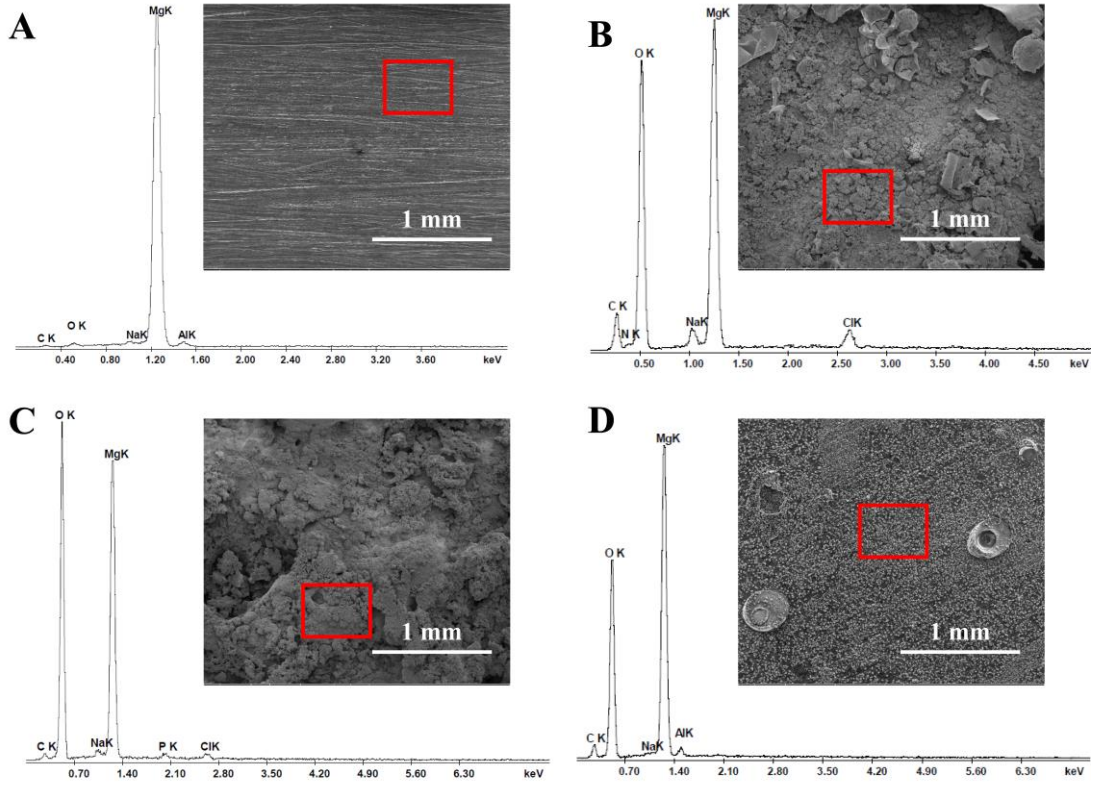
şekil 4.33. Mg-I ve Mg-K alaşımlarının farklı ozeltiler içerisindeki bozunma davranışının incelenmesi.

Şekil 4.33'e göre, Mg alaşımlarının DMEM, DI ve PBS'e daldırılması, yüzeyleri üzerinde önemli etkilere sahip olduğu belirlenmiştir. Mg-I alaşımında DMEM ve DI içerisinde ilk günlerde belirgin bozulmalar gözlenmese de PBS içerisinde ilk günden itibaren dikkate değer bir bozunma davranışı göstermiştir. PBS çözeltisi, alaşımın tüm kalınlığına nüfuz etmiş; bu, zamanla numune yüzeyi boyunca yanal olarak genişleyen büyük delikler yaratmıştır. 21. günden itibaren DMEM ve DI içerisinde bekletilen numunelerin yüzeylerinde gözle görünür bir şekilde lokalize bozunmanın olduğu birkaç beyaz çökelti gözlenmiştir. Özellikle DMEM içerisinde bozunmanın kenarlardan başladığı gözlenmiştir. Bu durum DMEM içerisindeki serumda bol miktarda bulunan negatif yüklü proteinlere uygulanan elektrostatik çekim sayesinde kenarlarda birikmesine dayanmaktadır.

PBS içerisinde inkübe edilen numunelerde ise 4. günden itibaren şekilsel bozukluklar gözlenmiş, degradasyonun 28. gününde numune tamamen toz forma dönüştüğü gözlenmiştir. DMEM içerisinde bekletilen numunelerde numune kalmayana kadar içe doğru çekilmeler gözlenirken, DI etkileşimi yüzeyde deformasyonlara neden olmuştur.

Mg-K alaşımında ise tüm yüzeyleri ilk muameleden itibaren kararmış ve bütün çözeltilerde önemli ölçüde lokalize bozunmanın olduğu birkaç yarı dairesel beyaz çökelti gözlenmiştir. 4. günden başlayarak DMEM ve PBS çözeltileri alaşımla tepkime sonucunda metal yüzeyinde hava kabarcığı oluşturması ile yüzeyde çukurlara ve beyaz bir tortu filmi oluşturmasına neden olmuş, yüzeyin tamamen bir tozla kaplandığı belirlenmiştir. Bu durum Mg-K'da Mg-I'dan farklı olarak proteinler için en büyük elektrostatik çekim, kenarlar boyunca yoğunlaşmak yerine numune yüzlerine yayılmış olabilir, bu da numune yüzlerinin merkezinde beyaz tortu filminin görünmesine yol açmıştır. Bu beyaz tortu tabakasının büyümesi, daldırma çalışması sırasında artan bozunmaya karşılık gelmektedir [157]. DI içerisinde bekletilen numunelerde 28. gün sonunda şekilsel bozukluk gözlenmeden yüzey deformasyonu gözlenirse de DMEM ve PBS içerisinde bekletilen numunelerde boyutsal kayıplar tespit edilmiştir.

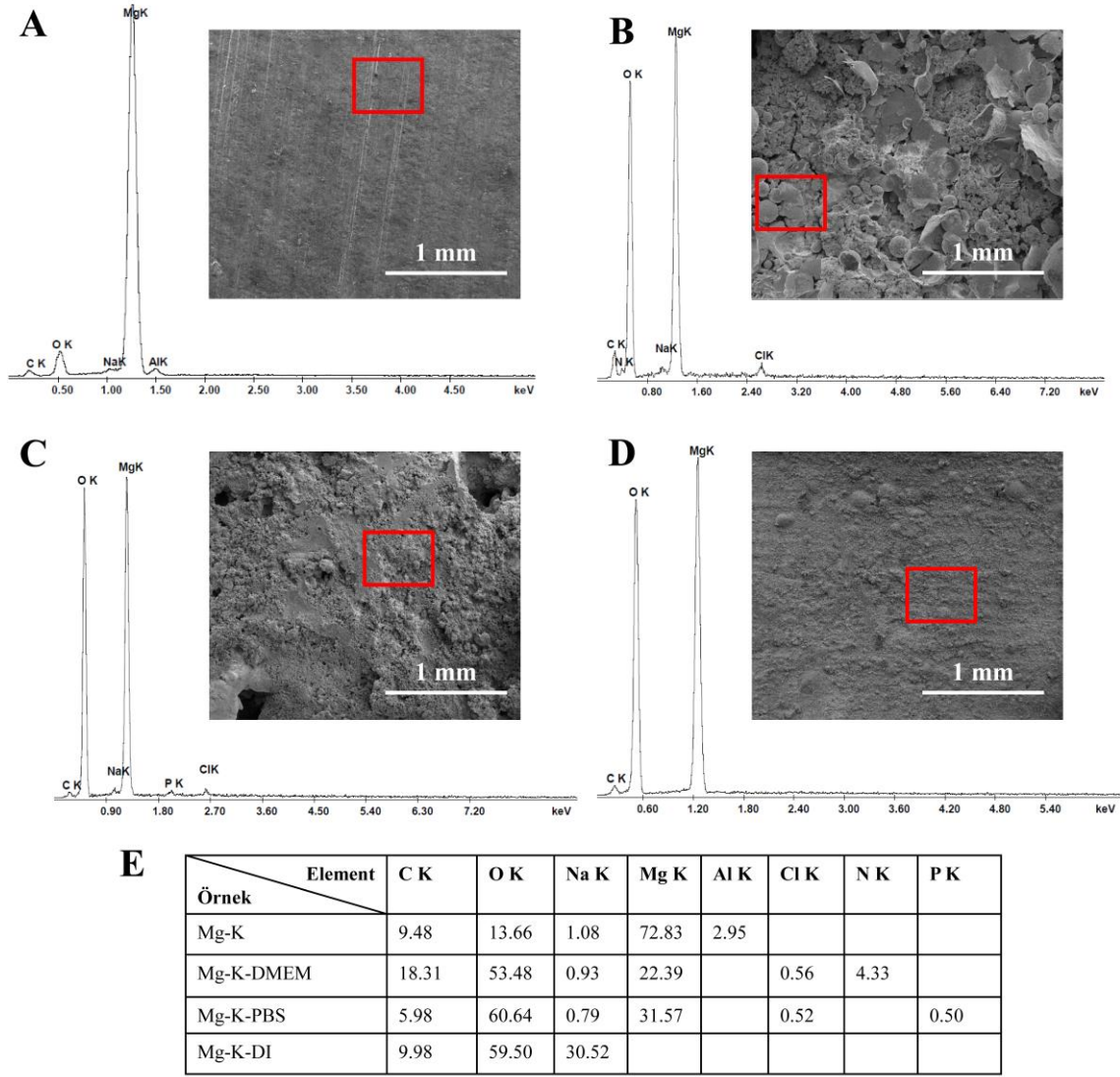
28. gün sonucunda Mg-I ve Mg-K alaşımlarına yapılan SEM analizi ve SEM analizi boyunca uygulanan EDX analiz sonuçları sırasıyla Şekil 4.34 ve Şekil 4.35'te sunulmuştur.



E

Element	C K	O K	Na K	Mg K	Al K	Cl K	N K	P K
Örnek								
Mg-I	7.65	3.36	1.40	84.23	3.35			
Mg-I-DMEM	22.32	50.30	1.76	21.02		0.98	3.61	
Mg-I-PBS	4.70	53.27	1.58	38.72		0.88		
Mg-I-DI	15.32	50.83	0.54	32.16	1.15			0.86

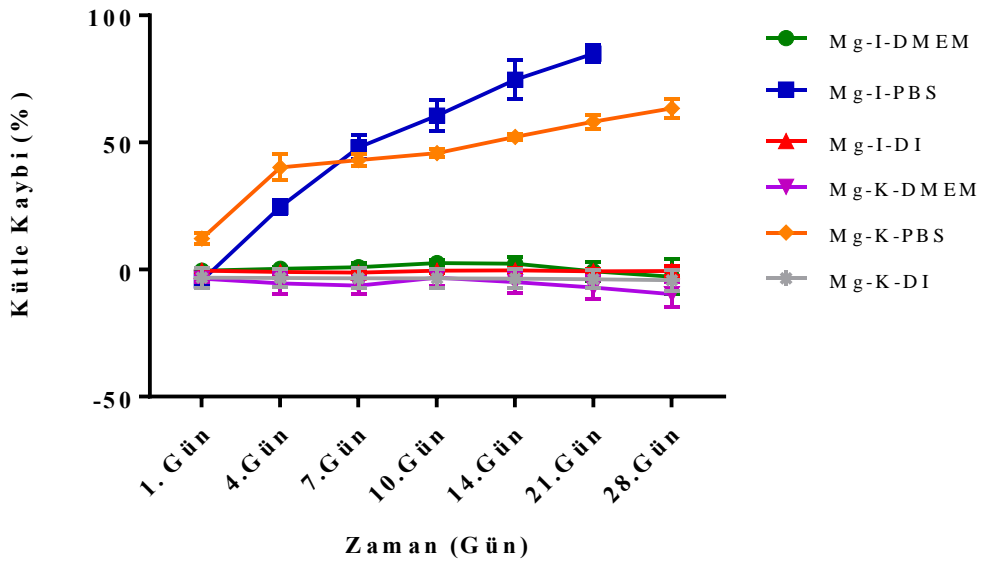
Şekil 4.34. Mg-I'ya ait SEM ve EDX analizleri: Mg-I (A); Mg-I-DMEM (B); Mg-I-PBS (C); Mg-I-DI (D); EDX analiz sonuçları (E).



Şekil 4.35. Mg-I'ya ait SEM ve EDX analizleri: Mg-K (A); Mg-K-DMEM (B); Mg-K-PBS (C); Mg-K-DI (D); EDX analiz sonuçları (E).

Mg-I ve Mg-K alaşımlarına ait sırasıyla SEM görüntüleri karşılaştırıldığında iki malzeme içinde DMEM, PBS ve DI muamelesinin yüzey morfolojisinde değişikliğe neden olduğu ortaya konulmuştur. Yüzey pürüzlülükleri PBS muamelesi ile büyük tepe-çukur oluşumuna neden olmuşken, iki yüzeyde de DMEM içerisinde oluşan beyaz çökeltiler SEM görüntülerinde belirgindir. İki alaşımda da en az deformasyon DI içerisinde olmuştur. Bu durum çözelti içerisindeki iyon varlığının Mg yüzeyinin korozyona uğramasında oldukça etkili olduğunu doğrulamıştır. EDX sonuçları karşılaştırıldığında Mg-I alaşımın yüzeyinde Mg ve Al atom miktarının Mg-K alaşıma göre daha fazla olduğu gözlenmiştir. Ayrıca ince alaşımın yüzeyindeki O atomu miktarın kalın alaşıma göre daha düşük olması Mg-K alaşımının yüzeyindeki oksit oluşumunun daha fazla olduğunu bir

göstergesidir. Mg-I alaşımı muhafaza edilmesi sırasında daha inert olarak davranmıştır. Diğer EDX analiz verilerine göre iki alaşımda da DMEM içerisinde bekletilen alaşımın Mg ve Al atom varlığının azaldığı, bunun yerine DMEM içerisindeki inorganik bileşenlerin etkisi ile C, O, Na, Cl ve N atom içeriğinin arttığı tespit edilmiştir. Aynı şekilde PBS ile etkileşim Mg atomlarının tepkimeye girmesi ile azalmasına ve yerine C, Na ve yüksek miktarda O atomunu barındıran bir tabakanın oluşmasını sağlamıştır. DI etkileşimi, C ve O atom varlığının yanı sıra Al ve P atomlarının da oluşmasına neden olmuş, Mg atomu yine tepkimeye girerek değeri düşmüştür. Morfolojik değerlendirmenin yanı sıra 28 günlük bozunma testi sonucunda farklı çözücüler içerisindeki alaşım ağırlıklarında meydana gelen değişim kaydedilerek % ağırlık kaybı belirlenmiş ve Şekil 4.36'da paylaşılmıştır.

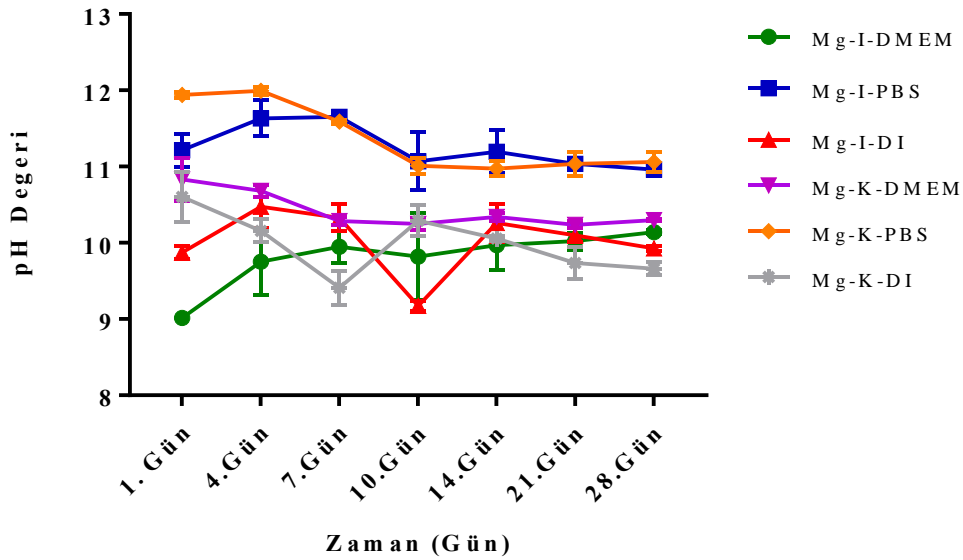


Şekil 4.36. Mg-I ve Mg-K alaşımların farklı çözeltiler içerisinde % kütle kaybının 28 günlük süreçte incelenmesi.

Verilen grafiğe göre ince ve kalın Mg alaşımlarına 28 günlük bozunma çalışmasında iki alaşım içinde DMEM ve DI içerisinde bekletilen numunelerin günler arasında % ağırlık kayıplarında artış ve azalışlar gözlenmiştir. Ancak iki alaşım içinde günler arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Grafikteki kütle kaybının artması malzeme degradasyonu ile açıklanırken, kaybın azalması reaksiyon sonucu oluşan korozyon

ürünlerinin (beyaz tortular) miktarının artmasına bağlanmıştır. PBS içerisinde ise iki, alaşımda da %kütle kaybında artış gözlenirken ($p<0,001$), 21. günde ince Mg tamamen çözülmüş, 28. günde ağırlık ölçümü yapılamamıştır. Mg alaşımların PBS içerisindeki iyonların varlığından kaynaklanan korozyona bağlı olarak bozunma miktarının yüksek olduğu belirlenmiştir.

Mg, insan plazma korozyon ürününe benzer bir aşındırıcı ortama maruz kaldığında, $Mg(OH)_2$ ve hidrojen salımı, çevrelenmiş çözeltinin pH değeri üzerinde etki eder. Bu nedenle degradasyon çalışması boyunca belirlenen zaman noktalarında pH ölçümleri gerçekleştirilmiş ve Şekil 4.37’de verilmiştir.



Şekil 4.37. Mg-I ve Mg-K alaşımların farklı çözeltiler içerisinde 28 günlük degradasyon çalışmasında belirli zaman noktalarının ölçülen çözelti pH değerleri.

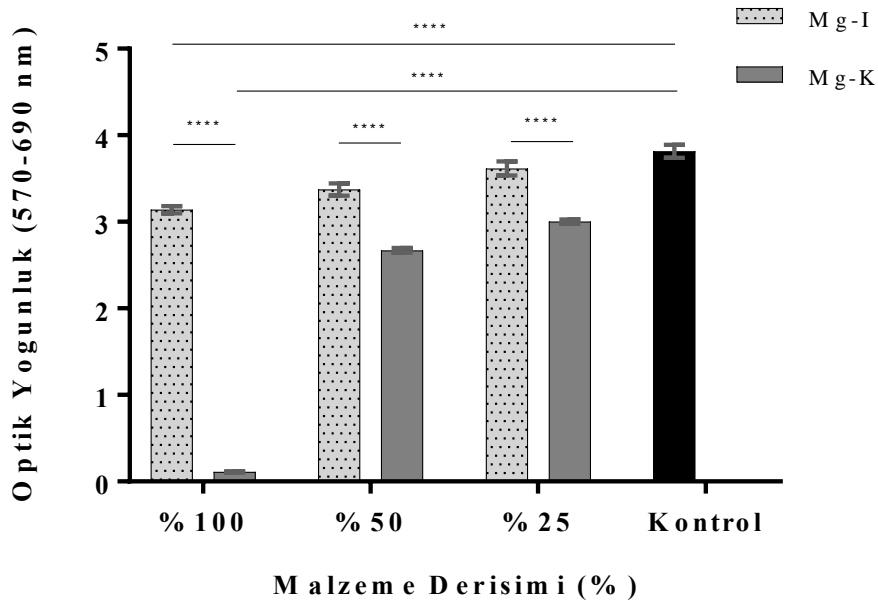
Buna göre Mg substratının sulu çözeltiye maruz bırakılması, ortam ile bozunma reaksiyonu sürecinde H_2 ve OH^- iyonları üretmesi sonucunda sıvı pH değeri, Mg yüzeyi etrafında artma eğilimindedir [158]. Bu nedenle pH değerleri ince alaşıma ait bütün çözeltilerde ilerleyen degradasyon günlerinde artmış ve bir noktada sabitlemiştir. İyon oluşmasına bağlı olarak Mg-I alaşımlarının pH değeri çözeltiler içerisinde öncelikle artmış, daha sonrasında sabitlemiştir. Bunun yanı sıra Mg-K alaşımlarının bulunduğu

çözeltilerde pH değerleri ilk günlerde yüksek iken daha sonra azalmıştır ($p < 0,001$). Bu durum alaşımın korozyona uğramasıyla oluşan iyonların tepkimeye girmesi sonucunda çözelti oluşturarak ortamdaki serbest iyonun azalmasına bağlanmıştır. Bununla birlikte, salınan Mg iyonları, Denklem 1'e göre sulu çözelti işleminde Mg'nin çözünmesini gösteren başka bir faktördür.

Yapılan ayrıntılı degradasyon çalışmasından elde edilen sonuçlar, tez çalışması kapsamında ileriki aşamalarda yapılacak hücre kültürü çalışmalarına yönelik olarak doku iskelesi tasarımı, sterilizasyonu gibi adımların optimizasyonu için de temel oluşturacaktır.

4.4.1.4 Mg Alaşımlarının Hücreler Üzerindeki Sitotoksikite Analizi

Kompozit geliştirilirken diğer bir önemli parametre alaşımlar ile hücre arasındaki etkileşimdir. Bu amaçla elüsyon metodu kullanılarak MTT analizi yapılmıştır.

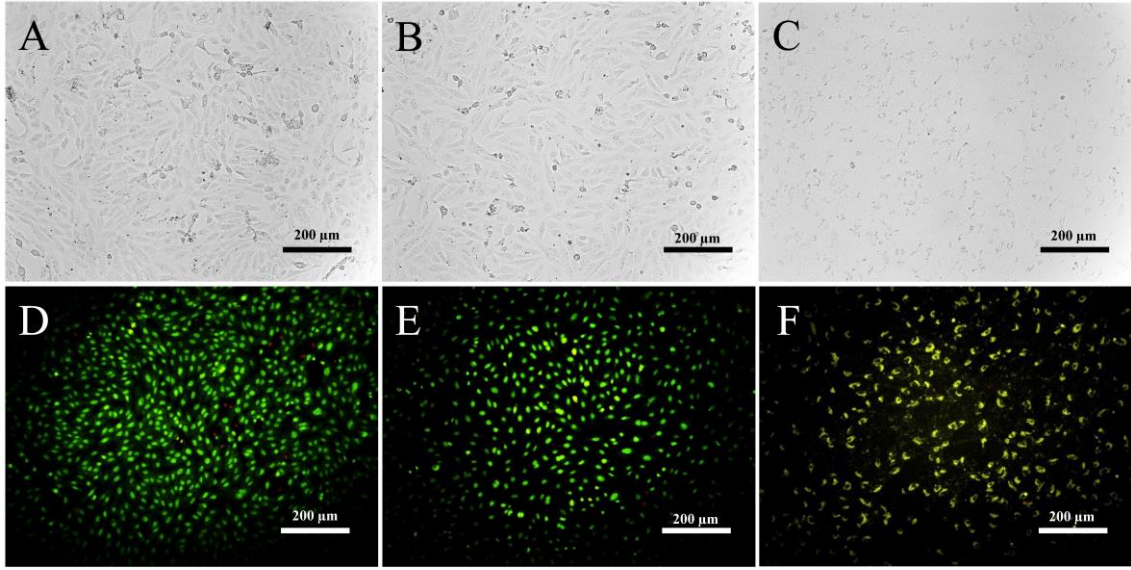


Şekil 4.38. Mg-I ve Mg-K alaşımların hücreler üzerindeki etkisinin incelenmesi (**** için $p \leq 0,0001$).

Şekil 4.38’de grafiği verilen sitotoksosite analizine göre kontrol grubu hücre canlılığı % 100 kabul edildiğinde Mg-I alaşımı % 100 konsantrasyonda hücrelerle etkileştirildiğinde % 86,65 canlılık göstermiştir. Azalan konsantrasyonda hücre canlılığı artsa da Mg-I hücreler üzerinde herhangi bir toksik özellik göstermediği belirgindir. Diğer yandan Mg-K, % 100 konsantrasyonda % 3,32 canlılığa sahip olduğu belirlenmiştir. Azalan konsantrasyonla hücre canlılığı artsa da düşük canlılık oranı Mg-K’ nın toksik olduğunu doğrulamıştır.

4.4.1.5 Apoptoz ve Nekroz Boyama ile Mg Alaşımlarının Hücre Canlılığı üzerindeki Etkisinin Değerlendirilmesi

Mg-I ve Mg-K alaşımların özelliklerinin karşılaştırılması amacıyla yapılan *in vitro* çalışmalardan bir tanesi de canlı/ölü boyamadır. Kültür kabında 24 saat çoğaltılan L929 hücreleri Mg-I ve Mg-K alaşımların ekstraktları ile etkileştirilmiştir. Bu etkileşimden 24 saat sonra faz-kontrast görüntüleri incelendiğinde kontrol grubuna göre Mg-I alaşımında herhangi bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 4.39). Hücreler morfolojileri kontrol grubu ile aynıdır. Diğer açıdan Mg-K alaşımın ekstraktı ile etkileşen hücrelerin yoğunluğunda gözlenen azalmanın yanı sıra hücre morfolojilerinde de önemli bir kayıp gözlenmiştir. Hücreler iğsi yapılarını kaybederek büzülme davranışı göstermiştir. Canlı/ ölü ikili boyamasında da Mg-I alaşım ekstraktı ile etkileştirilen hücreler gayet sağlıklı ve yoğun şekilde bulunurken Mg-K alaşım ekstraktı ile etkileştirilen hücrelerde morfolojik bozulmalar belirgindir. Hücreler parlak yeşil ışıklarını kaybederek apoptoza yönelik olarak sarı renk almaya başlamışlardır. Yapılan bu çalışma sitotoksite sonucunda toksik olarak bulunan Mg-K’nın hücresel davranışlar üzerindeki olumsuz etkisini de açıklamaktadır.



Şekil 4.39. Mg-I ve Mg-K alaşımlarına ait sırasıyla faz-kontrast ve apoptoz-nekroz boyamasına ait görüntüler: Kontrol (A-D); Mg-I (B-E); Mg-K (C-F).

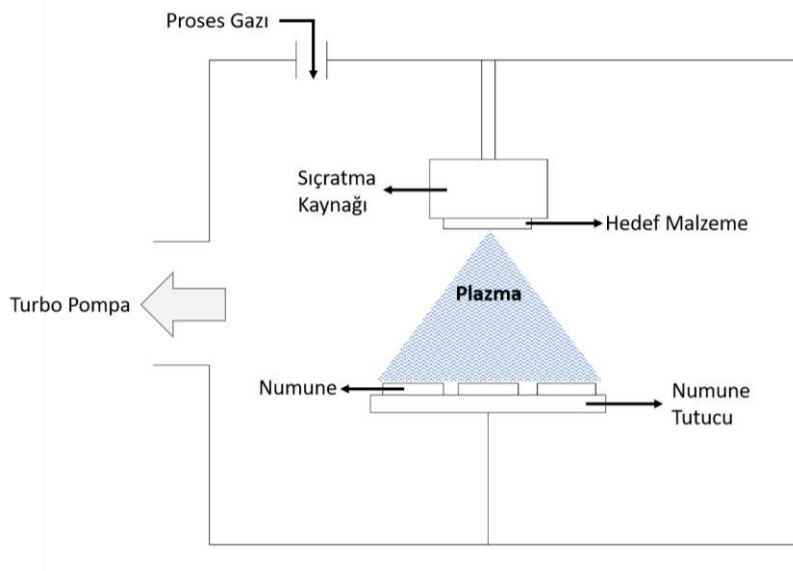
4.4.2 Mg/PGS Kompozitinin Geliştirilmesi

4.4.2.1 Magnetron Püskürtme Yöntemi ile PGS Elastomerlerin Yüzeylerini İletken Mg alaşımı ile Kaplanması

Vakum altında kaplama metali (hedef) yüzeyinin enerji yüklü iyonlar tarafından bombardıman edilmesi ile atomların, moleküllerin veya moleküler parçaların fırlatılmasına ve ardından bitişik yüzeylerde yoğunlaşmasına dayanan bir biriktirme işlemidir. Bu püskürtme yöntemi, ince film kaplama teknolojisinde en kullanılan proseslerden biridir. Özellikle sisteme manyetik alan katkısının eklenmesi yöntemin yaygın olarak kullanılmasını arttırmıştır. Spesifik olarak, yapılandırılmış bir manyetik alan, plazmayı katoda yakın bir şekilde sınırlar ve biriktirme hızını büyük ölçüde artırır. Tamamen "magnetron" olarak adlandırılan farklı konfigürasyonlar arasında, düzlemsel konfigürasyona sahip sistemler en önemliler gibi görünmektedir [159].

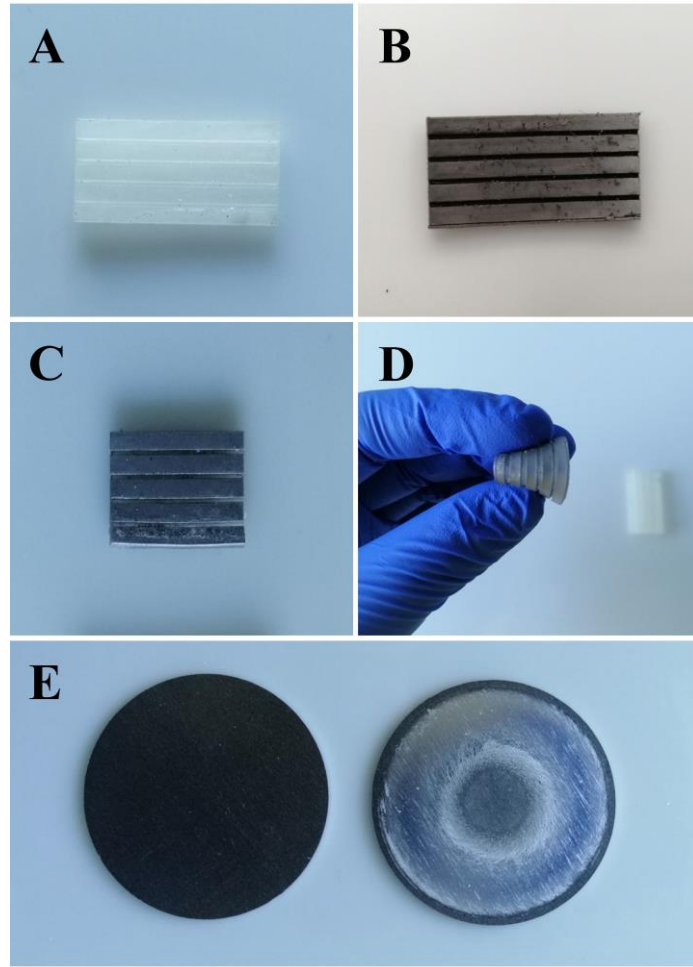
Genel olarak; cihaz vakumsuz bir kaplama ortamında çalışmaktadır. Ortam, hedeften malzemedan kopartma işlemi gerçekleştirecek argon gazı ile doldurulur. Plazmadaki iyonlar hedef malzeme yüzeyinden momentum değişim mekanizması ile atomları koparır. Bu işlem püskürtme olarak bilinir. Bu iyonlar kaplanacak yüzeye giderek birikir ve

burada ince bir film tabakası oluşturur [160]. Cihazın şematik gösterimi Şekil 4.40 'da verilmiştir.



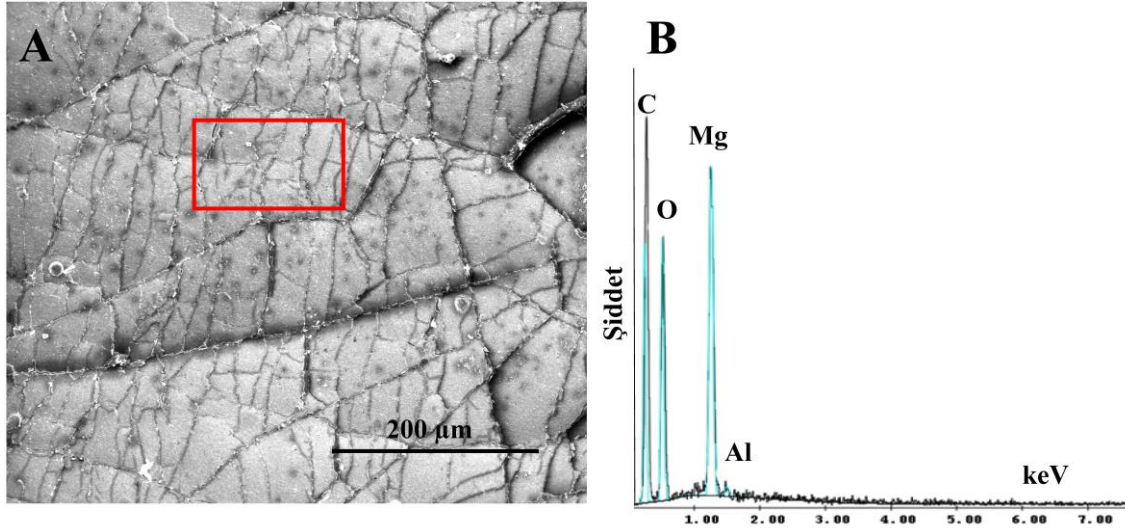
Şekil 4.40. Sıçrama (sputtering) yönteminin şematik gösterimi.

Püskürtme yöntemi ile kanallı PGS elastomeri yüzeyine Mg alaşım kaplama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada bu yöntemin ve Mg kaplamanın etkinliğinin incelenmesi için sadece PGS yüzeyindeki kanal içerisine değil PGS elastomerin bütün yüzeyine kaplama yapılmıştır. PGS elastomer yüzeyine farklı kalınlıklarda kaplamalar denenmiş kaplama sonucunda elde edilen görüntüler Şekil 4.41'de verilmiştir.



Şekil 4.41. Püskürtme yöntemi ile farklı kalınlıklarda Mg alaşım ile kaplanmış PGS elastomerleri örnekleri; Yüzeyi kaplanmamış PGS (A), 15 µm kalınlıkta Mg alaşım ile kaplanmış elastomer (B), 250 nm kalınlıkla kaplanmış PGS elastomer (C), esnekliğin değerlendirilmesi (D), ve hedef olarak kullanılan Mg alaşımın deney öncesi ve sonrası halleri (E).

Bu yöntemle kaplama işlemi ile PGS elastomer yüzeyleri başarılı bir şekilde kaplanması gerçekleştirilmiştir. Kaplamalar homojen görünmesinin yanı sıra elastomer yüzeyi hedef malzeme ile aynı renk olması yüzeyin kaplandığının göstergesidir. İşlem sonrası PGS elastomerinde gözle görülür bir değişiklik olmamasına rağmen kaplama kalınlığına bağlı olarak malzeme esnekliği azalmıştır. Malzeme iki ucundan çekilip bırakıldığında malzeme yüzeyinde mikro ve makro kırıkların oluştuğu görülmüştür. Malzeme esnekliği kaplama kalınlığının artması ile azalırken kırık büyüklüklerinin arttığı tespit edilmiştir. Kaplamanın ayrıntılı olarak incelenmesi ve esnetme sonrasında yüzeyde oluşan kırıkların incelenebilmesi için örnekler SEM analizine ve ardından EDX analizine tabi tutulmuştur.



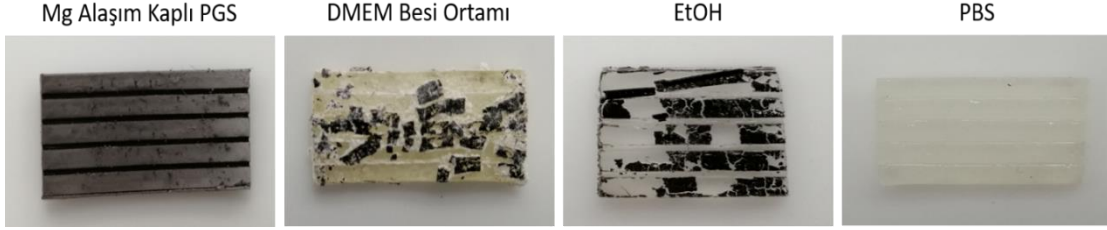
Şekil 4.42. Mg alaşım kaplı PGS elastomer yüzeyinde bulunan kanal yapısının SEM görüntüsü; Genel görüntü (A), Kanal genişliğinin ölçülmesi (B).

Şekil 4.42A'ya göre Mg alaşım kaplı PGS disklerin yüzeylerinde kaplamaya bağlı olarak Mg alaşım katmanları yüksek büyütmelemlerde görülebilen büyük adalardan (katmanlar) oluşmaktadır. Bu katmanlar Mg alaşımının vakum altında PGS yüzeyine enerji yüklü iyonlar tarafından bombardıman edilmesi ile oluşturulmuştur. Püskürtme sisteminde taşıyıcı kısmın dönmesi ile birlikte alaşımın yüzeye homojen kaplaması amaçlanmaktadır. SEM görüntüleri incelendiğinde kaplama katmanlarının aralarında belirgin kırıklar olmasına rağmen bütün PGS yüzeyinde Mg alaşım varlığını doğrulamaktadır.

Aynı şekilde PGS disklerin EDX analizi (Şekil 4.42B), yüzeyde kaplama varlığı doğrular niteliktedir. Buna göre yüzeyde Mg-K alaşımında % 36,69 oksijen (O), % 18,89 Magnezyum (Mg) ve % 0,64 alüminyum (Al) ve % 43,78 oranında karbon (C) elementleri tespit edilmiştir. Mg folyoları EDX verileri ile karşılaştırıldığında düşük Mg ve Al varlığı ince bir film olarak kaplamanın gerçekleştirildiğini yüksek C ve O varlığının ise PGS yapısından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bunun yanı sıra, hücre kültürü çalışması öncesinde üretilen Mg alaşım kaplı PGS elastomerlerin sıvı ortamda dayanıklılığı incelemek amacıyla PBS çözeltisi içerisine yerleştirilmiştir. Malzemeye PBS içerisine yerleştirilmesi ile birlikte kaplama sıvı

içerisinde çözülmeye başlamış, 2 saat sonunda PGS elastomerin yüzeyinde herhangi bir kaplama malzemesinin bulunmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.43).



Şekil 4.43. Farklı sıvı ortamlar içerisinde Mg alaşım kaplı PGS 'nin davranışının incelenmesi.

Karşılaşılan bu problem Bölüm 4.4.1.4'de yapılan degradasyon çalışmasında da gözlenen Mg alaşımlarının korozyon davranışlarından kaynaklanmaktadır. Bu çalışmada PGS elastomeri de biyobozunur olmasına rağmen Mg alaşımın bozunma hızı PGS 'ye göre oldukça hızlıdır. Bu problemi çözmek için Mg alaşımının biyobozunmasını yavaşlatılması gerekmektedir. Literatürde Mg alaşımlarını korozyona karşı korumak için Mg saflaştırma [161], florür muameleleri [162] ve anotlama [163] gibi birçok yöntem önerilmiştir [164]. Bu bilgiler yapılan püskürtme yöntemi ile kaplanan örneklerde modifikasyonlar yapılması gerektiğini göstermiştir.

4.4.2.1.1 Modifikasyonlar

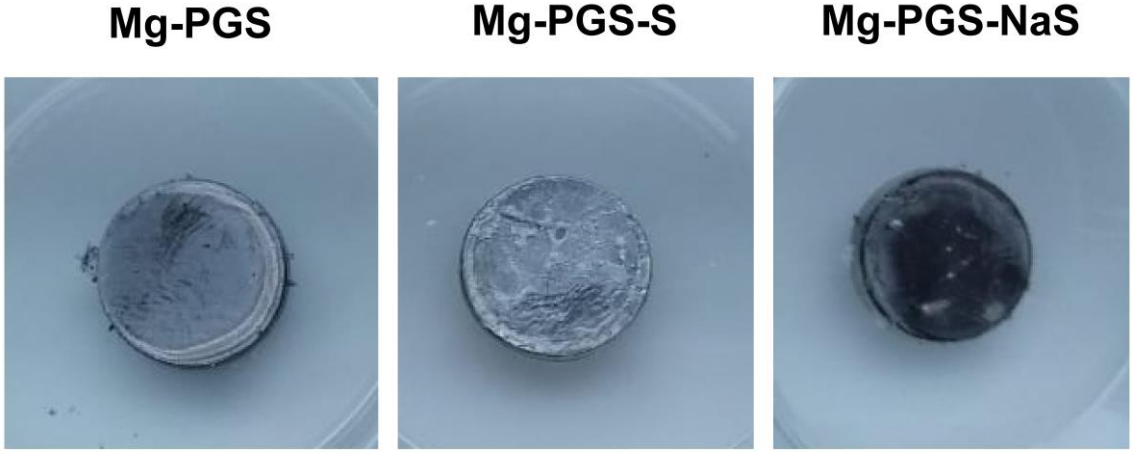
Magnezyum bazlı biyobozunur alaşımlar, mükemmel fiziksel ve mekanik özelliklerine rağmen bugüne kadar, klinik uygulamalarını engelleyen en büyük zorluk, fizyolojik koşullarda hızlı bozulmalarıdır. Özellikle, insan vücudu sıvıları ve kan plazması, hidrojen gazı üreten magnezyum alaşımlarının korozyonunu hızlandıran klorür iyonları içermektedir. Bu durum Mg alaşımların insan vücudunda kullanımını kısıtlayan en önemli sebeplerdendir [161]. Sonuç olarak, magnezyum alaşımlarının bozunma sürecinin uygun şekilde kontrol edilmesi zorunludur. Mg alaşımlarının bozunmasını kontrol etmek için çeşitli yaklaşımlar araştırılmıştır [63].

PVD tekniği, kaplamanın substrat atomu üzerinde atom atom büyüdüğü ince bir film biriktirme işlemdir. PVD, malzemenin genellikle hedef olarak adlandırılan katı bir kaynaktan atomizasyonunu veya buharlaşmasını gerektirir. İnce filmler genellikle birkaç mikron film için bazı atomik katmanlar kadar ince kalınlıklara sahip katmanlara sahiptir. Bu işlem, yüzeyin özelliklerinde ve substrat ile biriken malzeme arasındaki geçiş bölgesinde bir değişikliğe neden olur. Öte yandan, filmlerin özellikleri de substratın özelliklerinden etkilenebilir. Atomik biriktirme işlemi, vakum, gaz, plazma veya elektrolitik ortamda yapılabilir [165].

a. Silanlama İşlemi:

Mg alaşımların korozyon direnci sağlamada yüzey kaplaması olarak kullanılan organosilan bazlı kimyasallar, kimyasal kararlılıkları ve hafif metallerde etkili korozyon koruması nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır [166, 167] Organosilanlar fonksiyonel organik ve hidrolize olabilen alkoksi gruplarına sahiptir. Hidroliz üzerine, alkoksi grubu, metal yüzeyle -OH ile aktifleştirilmiş metal yüzey (M-OH) yoluyla termal ve kimyasal olarak stabil Si-O-M bağları oluşturabilen bir silanol grubu (Si-OH) üreten bir SN1 reaksiyonundan ayrılır. Silanol gruplarının başka yoğunlaşma reaksiyonları, ilgili organik gruplarla iç içe yoğun bir Si-O-Si-siloksan bağları açı oluşturur. Fonksiyonel silanların (ör: Serbest amin grubu) bir başka avantajı, diğer kimyalarla etkileşime girme ve yüzeyi daha fazla modifiye etme yeteneğidir [168].

Silanlama sonrası hazırlanan Mg-PGS-NaS, Mg-PGS-S ve işlem görmemiş Mg-PGS disklerin korozyon davranışı DI içerisinde değerlendirilmiş ve Şekil 4.44'de sunulmuştur.



Şekil 4.44. Silanlama yöntemi ile hazırlanan ön işlemlenmiş, silanlanmış ve silanlanmamış diskler.

Bu yöntemde Mg-PGS diskler silanın uçucu özelliğinden yararlanılarak 48 saat boyunca silan buhar fazı altında bırakılmış ve silanın yüzeyde birikerek bir kaplama filmi oluşturması planlanmıştır. İşlem sonrası Mg-PGS-S ve Mg-PGS malzeme yüzeyinde gözle görülür bir farklılık gözlenmezken, Mg-PGS-NaS malzemesinde yüzeyde ön işlem nedeniyle deformasyonlar tespit edilmiştir. Bu durum NaOH ile muamelelenin Mg alaşım kaplamasına zarar verdiğini göstermektedir. DI ile muamele edilen numunelerde 3 saat sonunda Mg alaşım PGS yüzeyinden tamamen uzaklaşmıştır.

b. Isı ile Muamele:

PGS elastomeri sentezi sonrasında yapıda bulunan çapraz bağlanmamış serbest monomer varlığından yararlanılarak ısı işlemi ile PGS yüzeyi eritilmesi ile kaplamanın yüzeye yapışması ve tutunması amaçlanmıştır.

Mg-PGS



Mg-PGS-H



Şekil 4.45. İşlem görmemiş Mg-PGS disk ve ısıl muamele sonucu elde edilen Mg-PGS-H disk.

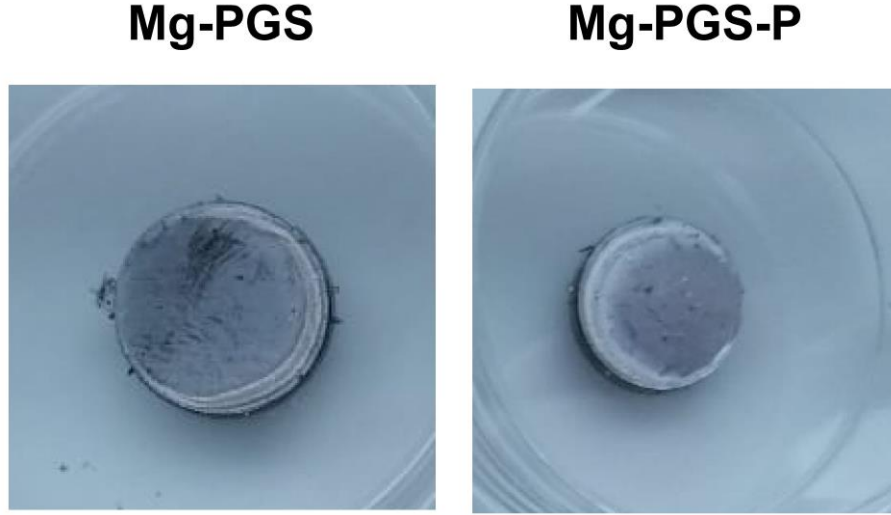
Şekil 4.45’de görüldüğü üzere 2 saat sonunda Mg-PGS-H kenarlarından itibaren kaplamanın uzaklaştığı ve kaplama dayanımının azaldığı gözlenmiştir. Bu durum, sebasik asit ve gliserol monomerlerinin düşük basınç ve yüksek sıcaklık altında polikondenzasyon tepkimesi sırasında su açığa çıkartması sonucunda Mg alaşım kaplamasının çözünmesinden dolayı kaynaklandığı düşünülmektedir.

c. Yüzey Plazma Uygulaması:

Yüzey özelliklerinin geliştirilmesi amacıyla kullanılan plazma tekniği geleneksel tekniklerle elde edilemeyen bazı yüzey özelliklerinin bu teknikle eldesinin mümkün olması ve ayarlanabilir gerilim, akım yoğunluğu, zaman gibi parametreleri nedeniyle tercih edilen bir yüzey modifikasyon yöntemidir. Bu yöntemde sulu bir ortama ihtiyaç duyulmadan reaksiyonlar gerçekleştirilmektedir. Malzeme yüzeyindeki zayıf kovalent bağlar koparılması ile aşınma veya plazma polimerizasyonu etkisiyle yüzeyde oluşturulan ince film tabakaları ile birikme işlemleri gerçekleştirilebilir [169].

Mg' un ortam havasında kendiliğinden oksidasyonu, malzeme üzerinde koruyucu (oksit) bir yüzey tabakası oluşturur. Bununla birlikte, bu oksit tabakası metale hızlandırılmış bozulmaya karşı uzun süreli koruma sağlamak için çok incedir. Bu nedenle, kontrollü bir şekilde koruyucu bir oksit tabakası oluşturan plazma uygulaması kullanılır [170].

Malzeme yüzeyine uygulama sonrasında Şekil 4.46’da görüldüğü üzere işlem sonrasında kaplama da herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir.



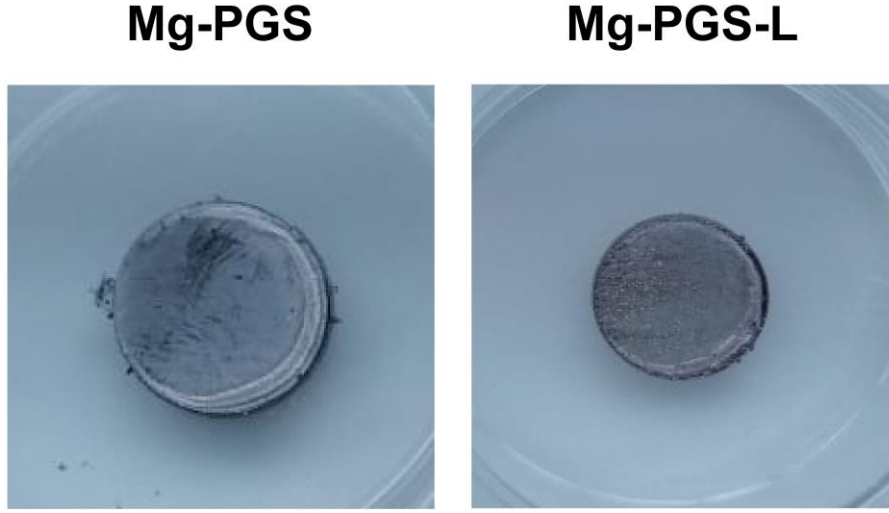
Şekil 4.46. İşlem görmemiş Mg-PGS disk ve yüzeyi plazma uygulamasına tabi tutulan Mg-PGS-P disk.

Degradasyon dayanımını görmek için DI içerisine bırakılan numunelerin (Mg-PGS-P) plazma uygulanmayanlara (Mg-PGS) göre kaplama çözünme hızları benzerdir.

d. Lazer Uygulaması:

Mg alaşımın korozyon direncini arttırmaya yönelik yapılan diğer bir çalışma lazer ile yüzey muamelesidir. Lazer ışınının kullanılması, yüzey karakteristiklerinin kontrol edilmesi açısından birçok olasılığa izin vermektedir. Bu teknoloji, diğer ışın teknolojilerinin (yani iyon ışını, elektron ışını) aksine vakumda çalışmayı gerektirmez ve işlenen malzeme ile doğrudan temas olmadığı için steril bir araç olarak kabul edilmektedir [171]. Yapılan bazı araştırmalara göre lazer uygulamasının bu tür alaşımların yüzeyinde oluşan oksit tabakalarını eritmesi amaçlanmıştır. Böylece kısa eritme işlemi, daha fazla korozyon direncine sahip daha yoğun bir oksit tabakasına yol açabileceği ön görülmektedir [172].

Bu bilgiler ışığında, PGS elastomeri yüzeyinde kanal yapısının oluşturulmasında kullanılan CO₂ lazer cihazı tüm yüzey taranan Mg/PGS elastomerleri (Mg-PGS-L), Şekil 4.47’de verilmiştir.



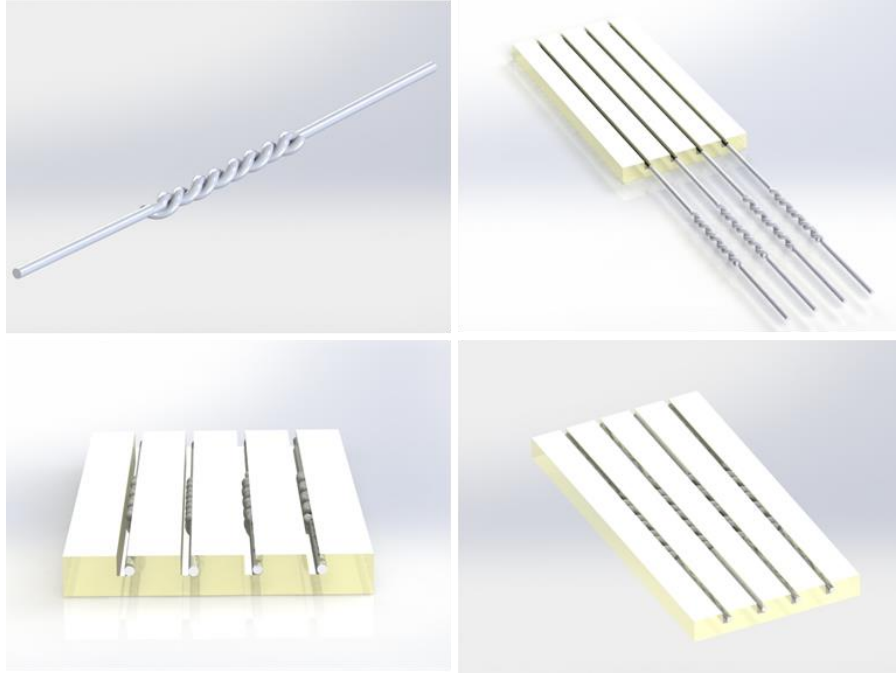
Şekil 4.47. İşlem görmemiş Mg-PGS disk ve yüzeyi lazer uygulamasına tabi tutulan Mg-PGS-L disk.

Lazer ile taranan malzemenin yüzeyinde gözle görülür bir oksit tabası oluşumu saptanmamasına rağmen lazer ışını malzeme yüzeyinde izler bırakmıştır. Ancak degradasyon dayanımını görmek için DI içerisine bırakıldığında, işlem görmemiş numuneye kaplama çözünme hızlarında herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir.

Yüzey modifikasyonuna yönelik yapılan bu çalışmaları Mg-PGS disk yüzeyindeki Mg alaşım kaplamasının korozyon direncini arttırmadığını, Mg alaşım kaplamanın modifikasyonlara karşı dayanıksız olduğunu göstermiştir. Ayrıca *in vitro* hücre kültürü çalışmalarının gerçekleştirilebilmesi için kaplamanın yeterli kalınlıkta olmadığına karar verilmiştir. Bunun üzerine Mg folyoların bütün olarak kullanılmasına yönelik araştırmalar başlatılmıştır.

4.4.2.2 Mg Tel Kullanılarak Mg/PGS Doku İskelesinin Üretimi

CO₂ yardımıyla PGS içerisinde oluşturulan deliklerden geçirilerek elastomer ile birleştirilen Mg tellerin *in vitro* koşullarda içerisinde konulacak çözeltilerden etkilenmesi düşürülmüştür. Mg telinin PGS kanalı duvarına yerleştirilmesi Mg telinin çoğu kısmının PGS elastomeri içerisinde kalarak çözeltiler ile minimum etkileşime girmesi ve kanal içerisine metalin sabitlenmesi sağlanmıştır. Tasarımda Mg telinin birbirine sarılması malzemenin uzama davranışında gösterirken Mg telinde uyumlu bir şekilde hareket etmesini ve aynı zamanda bu işlemde iletken özelliğinde korunması düşünülmüştür. Şekil 4.48'de geliştirilen Mg/PGS kompozitin Solidworks Premium 2018 ile yapılan modellemesi gösterilmiştir.



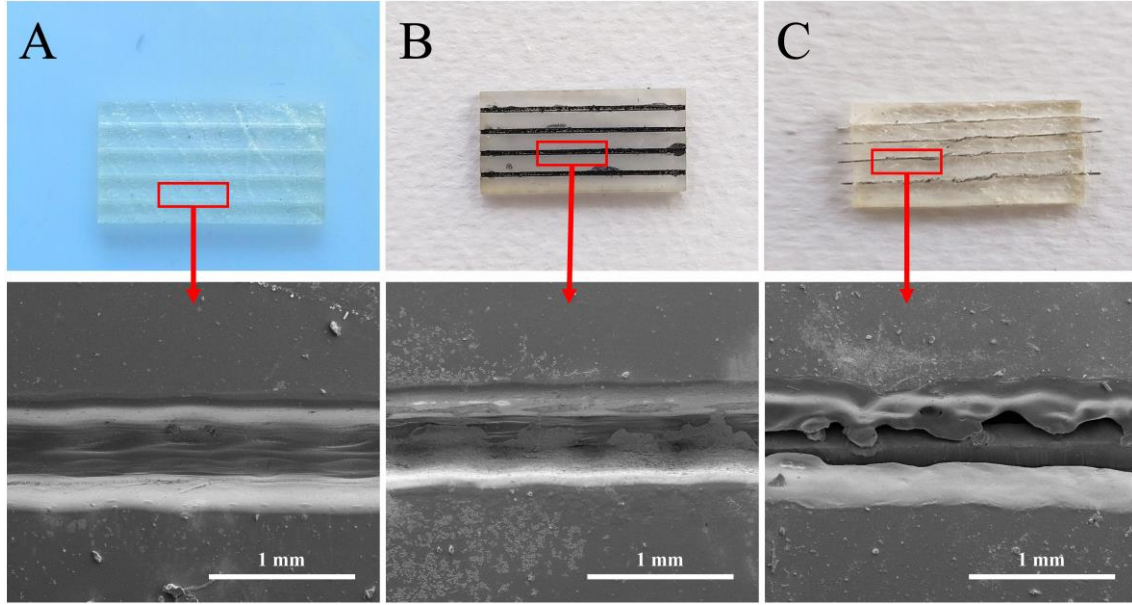
Şekil 4.48. Mg/PGS kompozitin 3D modellemesi.

4.5 Doku İskelelerinin Karakterizasyonu

4.5.1 Doku İskelelerinin Morfolojik Olarak Değerlendirilmesi

Şekil 4.49'da verilen doku iskeleleri ve ayrıntılı SEM analiz görüntüleri verilmiştir. Buna göre görüntüler incelendiğinde PGS elastomerin kanal içerisinde CO₂ lazer sonrasında elastomerin degrade olmasına bağlı olarak kanal içerisinde az da olsa tepe-çukur

oluşumları gözlenmiştir. Bu durum CO₂ lazer parametreleri optimize edilmesiyle minimuma indirildiği gözlenmiştir. Diğer yandan f-KNF/PGS iskelelerinde kaplama sonrasında f-KNF'lerin kanal iç kısmı yerine kanalın kenarına kaplandığı, kaplamanın kanal boyunca devam ettiği belirlenmiştir. Mg/PGS'ler de ise kanal duvarına yerleştirilen Mg teli kanal boyunca devam ettiği doğrulanmıştır.



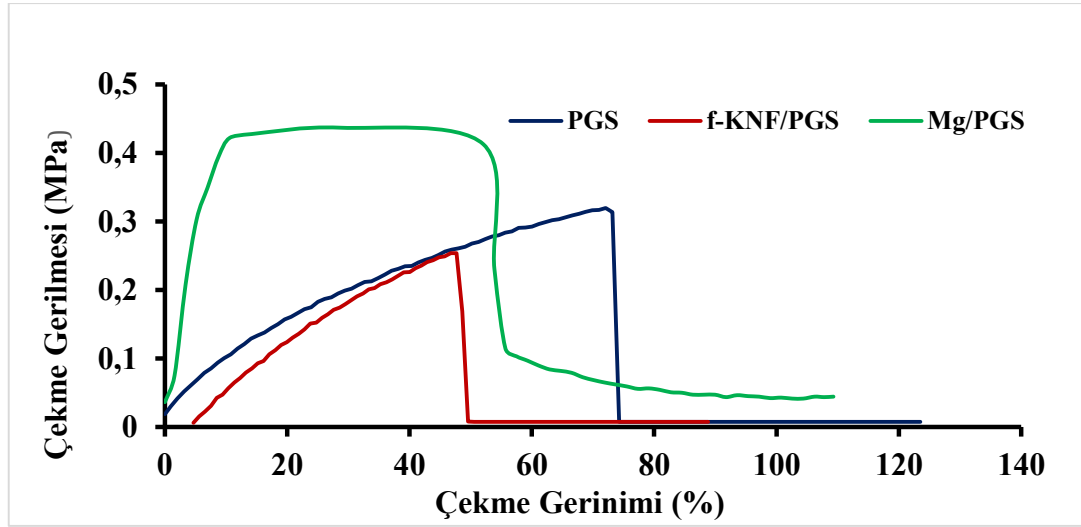
Şekil 4.49. Geliştirilen doku iskeleleri ve kanallarının SEM görüntüleri: PGS (A); f-KNF/PGS (B); Mg/PGS (C).

4.5.2 Doku İskelelerinin Mekanik Özelliklerinin İncelenmesi

Doku iskelelerinin mekanik test sonuçlarına göre (Çizelge 4.9), Mg/PGS kompoziti en yüksek Young modülüs değerine sahip olan en dayanıklı iskeledir. Bu durum kompozit içerisindeki Mg varlığından kaynaklanmıştır. Diğer yandan Mg varlığı malzemenin esnekliğini azaltmıştır. Yapıya f-KNF'nin katkısı elastomerin uzama miktarını ve dayanımını azaltırken Young modülüs değerini yükseltmiştir. Bu durum PGS elastomerinin esnek davranışını kaybettiğini bir göstergesidir. PGS elastomeri en fazla uzama davranışı gösteren iskeledir (Şekil 4.50).

Çizelge 4.9. Doku iskelelerine ait Mekanik test verileri.

Örnek	Çekme Mukavemeti (σ_M , MPa)	% Kopma Uzamları (ϵ_M)	Young Modülüs (E, MPa)
PGS	$0,34 \pm 0,044$	$82,53 \pm 16,34$	$0,36 \pm 0,028$
f-KNF/PGS	$0,22 \pm 0,036$	$43,77 \pm 4,15$	$0,57 \pm 0,007$
Mg/PGS	$0,47 \pm 0,070$	$12,10 \pm 0,41$	$4,42 \pm 0,134$



Şekil 4.50. Doku iskelelerine ait gerilim-gerinim eğrisi.

Hazırlanan doku iskelelerinin mekanik özellikleri literatürde bulunan verilerle karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.10). Buna göre PGS elastomerin mekanik özelliklerinin sınır dokusu için düşük olduğu yapılan iletken materyal katkısı ile daha da iyileştirildiği gözlenmiştir. Özellikle Mg alaşımının katkısı elastomerin mekanik özelliklerine dokuya daha uyumlu hale getirmiştir. Mg/PGS elatomeri kullanıma daha uygun olmakla birlikte insanda kullanım için Mg kalınlığının optimize edilmesi gibi düzenlemeler gerekmektedir.

Çizelge 4.10. Çeşitli türlerin siyatik sinirlerine ait mekanik özellikler.

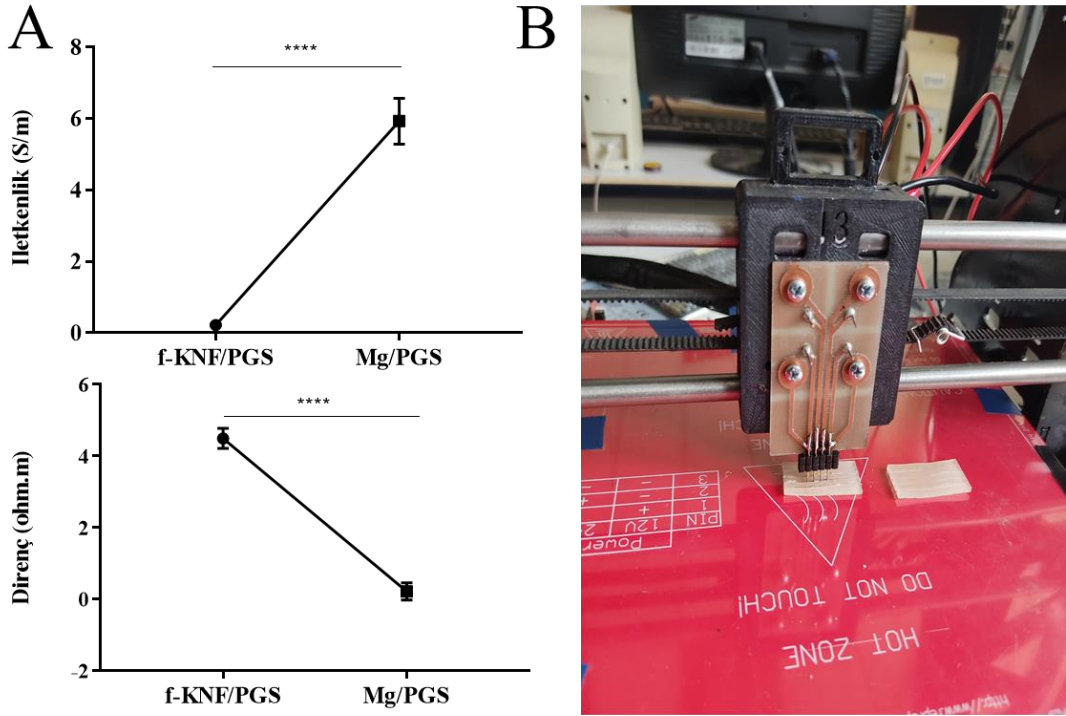
Tür	Çekme Mukavemeti (σ_M , MPa)	Kopma Uzamaları (ϵ_M)	Young Modülüs (E, MPa)	Ref.
Fare	2,72 MPa	0,810	-	[173]
Sıçan	3,66 MPa	0,91	6,58 MPa	[174]
Tavşan	11,7 MPa	38,5	-	[175]
İnsan-Peroneal Sinir	2,32–3,88 MPa	-	5,00–10,41 MPa	[176]
İnsan-Tibial Sinir	2,90-3,91 MPa	-	6,04-9,50 MPa	

4.5.3 Doku İskelelerinin İletkenliğinin Ölçülmesi

Her dokunun, kendine özgü gereksinimleri vardır. Sinir doku için, iskelenin rejenerasyon aksonlarını kılavuz boyunca yönlendirme ihtiyacının yanı sıra elektriksel olarak iletken bir doku olduğu için, yapı iskelesi de benzer şekilde bir elektrik sinyali iletebilmelidir. Doku mühendisliğinde kullanılan polimerlerin çoğu bunu yapamaz, ancak çalışma da yapılan iletkenlik ölçüm sonuçlarına göre iletken materyal olarak f-KNF ve Mg ilavesi iskelenin elektriksel özelliklerini büyük ölçüde artırdığı gözlenmiştir [177].

f-KNF/PGS ve Mg/PGS kompozitlerinin elektriksel iletkenlikleri, dört noktalı prob analizi kullanılarak ölçülmüştür (Şekil 4.51). f-KNF/PGS iskelelerinin iletkenliği $0,22 \pm 0,01$ S/m, direnç değeri $4,49 \pm 0,28$ $\Omega \cdot m$ ise olarak belirlenmiştir. Guadagno ve arkadaşları yaptıkları çalışmada KNF'nin iletkenliğini 10^{-3} S/m olarak tespit etmişlerdir [178]. Diğer yandan Hui-Sun ve arkadaşları, % 0,5 KNF çözeltisinin iletkenliğini $\sim 10^{-7}$ S/m olduğu belirtilmiştir [179]. Bu bilgiler değerlendirildiğinde çalışma kapsamında hazırlanan f-KNF'nin iletkenliğinin belirtilen değerden oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu durumun fonksiyonelleştirme sonrası KNF'nin iletkenliğinin arttığı belirlenmiştir. Kanalların elektriksel iletkenliğinin daha yüksek olması, f-KNF/PGS kompozitinin kanal boyunca homojen dağılıma sahip f-KNF'nin başarılı sentezine ve ayrıca iletken mürekkebin kanal içerisine düzgün kaplanarak nanofiberlerin birbirine bağlanmasına atfedilmiştir. Diğer yandan Mg/PGS iskelesinin iletkenlik değeri $5,92 \pm 0,64$

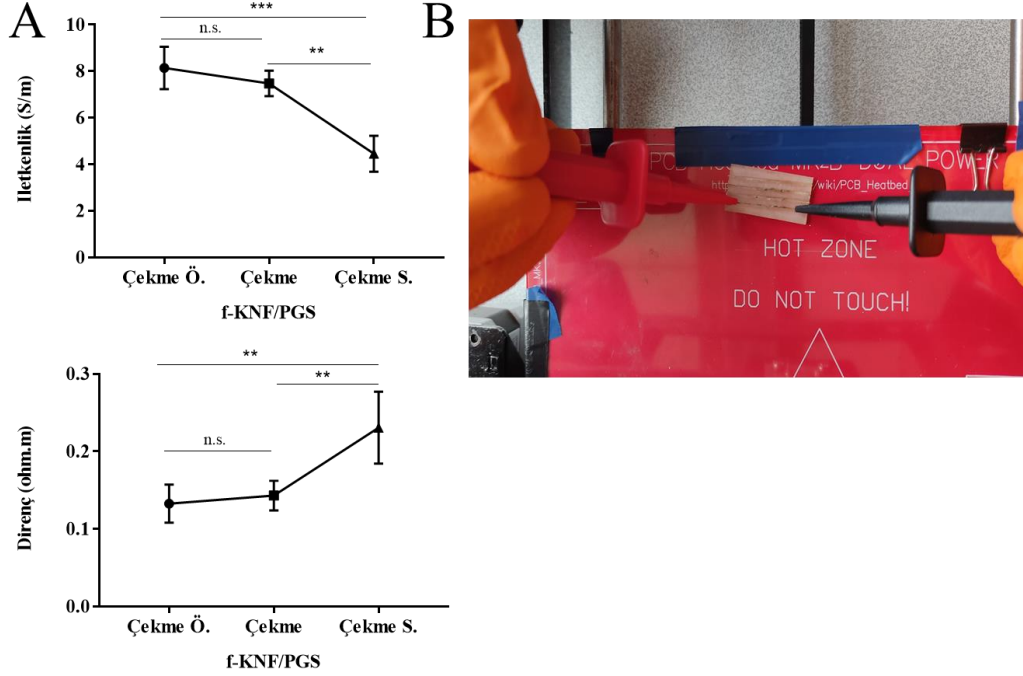
S/m ve direnç değeri $0,22 \pm 0,23 \Omega.m$ olarak ölçülmüştür. Buna göre PGS elastomeri yapısına Mg ilavesinin iletkenliği 5 kat arttırdığı bu sayede hücreyel olayları destekleyeceği öngörülmüştür.



Şekil 4.51. Doku iskelelerinin dört noktalı prob analizi ile iletkenlik değerlerinin ölçülmesi: İskele-iletkenlik ve iskele-direnç grafikleri (A); Analiz görüntüsü (B). (**** için $p \leq 0,0001$).

İki nokta prob yöntemiyle yapılan testlerde doku iskelelerinin çekme işlemi sonrasında kanal içerisindeki elektriksel iletkenlik değerlerindeki değişim incelenmiştir. Buna göre Mg/PGS, f-KNF/PGS kompozitleri yaklaşık 2 cm gerdirilmiş, kompozitlerin uzama formunda verdiği iletkenlik değerleri tartışılmıştır (Şekil 4.52). Bu değerlere göre Mg/PGS kompozitinin çekme öncesi, çekme sırası ve çekme sonrası değerlerine bakıldığında çekme sonrasında yapıdaki kapmada görülen mikro çatlaklar oluşumuna bağlı olarak fiber temasında azalmalar olması nedeniyle iletkenlik değerinde azalma tespit edilmiştir. Diğer yandan f-KNF/PGS kompoziti ise çekme öncesi iletkenlik değerinin çekme sırası ve çekme sonrasında az da olsa düşüş gözlenmiştir. Bu düşüş,

çekme hareketine bağlı olarak fiber yapılarının aralarında boşluk oluşması ile fiberlerin birbirine temasının azalmasına bağlanmıştır.

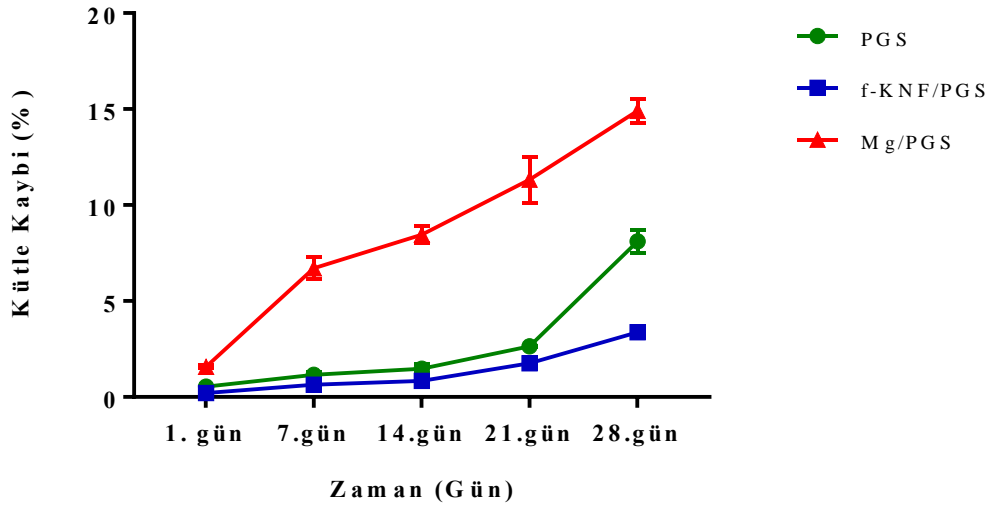


Şekil 4.52. Germe işlemi sonrasında f-KNF'nin iletkenlik ve direnç değerinin değerlendirilmesi: İskele-iletkenlik ve iskele-direnç grafikleri (A); Analiz görüntüsü (B). (n.s. için $p > 0,05$, ** için $p \leq 0,01$, *** için $p \leq 0,001$).

Analiz sonucunda, Mg/KNF kompozit malzemesinin sinir hücrelerinin proliferasyonunu hızlandırma ve hücreyel yönelime yardımcı olmak için gerekli iletkenliği sağladığı görülmektedir. Periferik sinir dokusundaki yapıların hepsinin farklı bir iletkenlik değeri vardır [180]. Buna göre geliştirilen doku iskelelerinin sinir doku iletkenlik değerlerine uygun olduğu görülmüştür.

4.5.4 Doku İskelelerinin Degradasyon Davranışlarının Değerlendirilmesi

In vitro etkinliklerinin değerlendirilmesi amacıyla PGS, f-KNF/PGS ve Mg/PGS'ye ait 28 günlük degradasyon sonucunda elde edilen grafik Şekil 4.53'de verilmiştir.



Şekil 4.53. Doku iskelelerinin degradasyon davranışının incelenmesi.

Buna göre Mg/PGS doku iskelesi 28 gün boyunca sürekli artan ağırlık kaybının yanı sıra son günlerde Mg alaşımının degradasyonuna bağlı olarak 28 gün sonunda en fazla ağırlık kaybını yaşamıştır ($p \leq 0,0001$). Diğer yandan PGS elastomerinin çalışmanın ilk günlerinde anlamlı bir ağırlık kaybı gözlenmese de 21. günde ($p \leq 0,001$), 28. günde degradasyon miktarı artmıştır ($p \leq 0,0001$). Aynı şekilde kütle kaybının ilk günlerde az olduğu f-KNF/PGS, 21. günden başlayan kütle kaybındaki artış ($p \leq 0,01$), 28. günde en yüksek değere ulaşmıştır ($p \leq 0,0001$). f-KNF/PGS iskelenin PGS elastomere göre daha az bozunma davranışı göstermesi f-KNF ilavesinin malzeme dayanımını artırdığına dair fikir vermiştir.

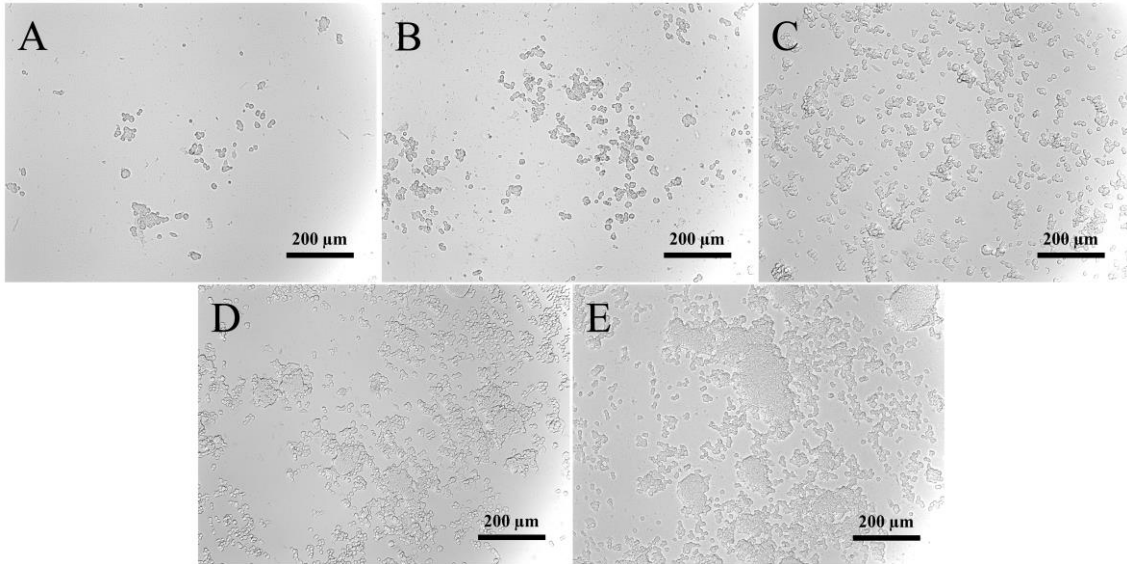
4.6 *In Vitro* Çalışmalar

Çalışma kapsamında geliştirilen doku iskeleleri üzerindeki kanallarda PC12 ve S42 hücrelerinin proliferasyonu, iskele-hücre etkileşimi gibi hücresel davranışlarını incelemek amacıyla ayrı ayrı 14 günlük *in vitro* hücre kültürü çalışmaları yapılmış, karakterizasyon testleri incelenmiştir.

4.6.1 PC12 Hücre Kültürü

4.6.1.1 Hücrelerin Kültüre Edilmesi ve Proliferasyonun İncelenmesi

PC12 hücre hattı, hücre farklılaşmasını ve nörit büyümesini araştırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır [75]. Bu nedenle çalışma kapsamında seçilen ilk hücre hattı olmuştur. PC12 hücreleri kültür koşullarında yarı süspansiyon hücreleri olarak kabul edildiği için PC12 hücrelerinin hücre kültür kabı yüzeyine tutunabilmesi için kapların bir kaplama materyali ile kaplanması gerekmektedir [181]. Bu nedenle çalışmalarda ticari olarak Kollajen I ile yüzeyi kaplanmış flasklar kullanılmıştır. Kültür süresinde PC12 hücrelerinin morfolojik görünümünde meydana gelen değişiklikleri faz-kontrast mikroskobu ile görüntülenmiş, elde edilen görüntüler Şekil 4.54’de verilmiştir.

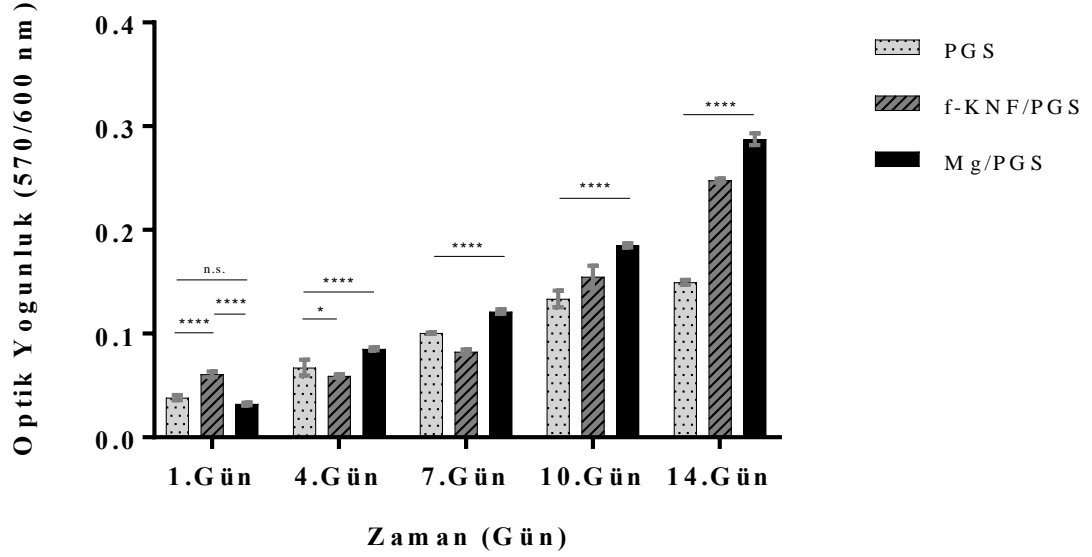


Şekil 4.54. PC12 hücrelerinin faz-kontrast mikroskobu ile görüntülenmesi: 1. gün (A); 4. gün (B); 7. gün (C); 10. gün (D); 14. gün (E).

4.6.1.2 Doku İskelelerinde Hücre Proliferasyonun Alamar Mavisi Yöntemi ile İncelenmesi

Kompozit doku iskeleleri üzerinde PC12 hücre canlılığının belirlenmesi için Alamar Blue kolorimetrik kantitatif yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemde bir resazurin indirgeme tepkimesine dayanmaktadır. Fizyolojik olarak aktif hücrelerde, resazurin boyası resorufine indirgenerek parlak kırmızı bir floresan verir [182]. Doku iskelelerine PC12 hücre ekimini takiben hücreler belirli kültür günlerinde alamar mavisi çözeltisi ile

etkileştirilmiştir. Hücrelerle inkübasyon sonucunda elde edilen çözeltiler spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve Şekil 4.55’de görüldüğü üzere elde edilen veriler günlere göre optik yoğunluk değerleri belirlenerek hücre proliferasyonu incelenmiştir.

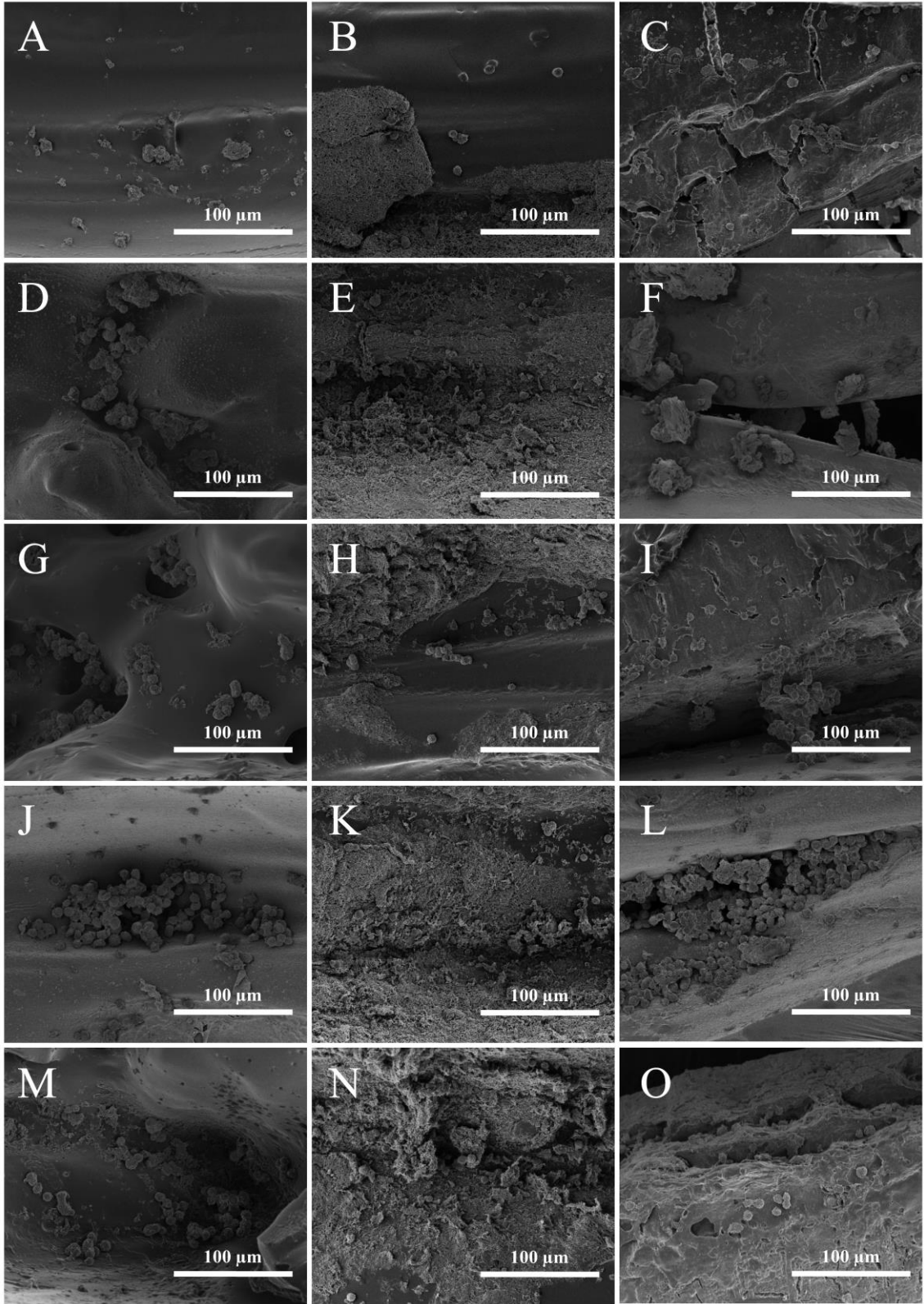


Şekil 4.55. PC12 hücrelerinin doku iskeleleri üzerinde hücre canlılıklarının değerlendirilmesi (n.s. için $p > 0,05$, * için $p \leq 0,005$, **** için $p \leq 0,0001$).

Hücre ekimini takiben 1. ve 4. günde yapılan analiz sonucunda iskele gruplarının hepsinde belirlenen düşük üreme hızı PC12 hücrelerinin bilinen düşük yüzey bağımlılıkları nedeniyle hücre kayıplarının fazla olmasına bağlanmıştır. Bu durum kültürün 7. gününde hücre üremesindeki artışla PC12 hücrelerinin iskelelere tutunduğunu ve hücre faaliyetlerini gösterir niteliktedir. Hücre üremesi 10. günden itibaren bütün gruplarda belirgin bir artmıştır. Özellikle f-KNF/PGS ve Mg/PGS iskelelerinde 14. günde artış miktarı PGS elastomerine göre oldukça yüksektir. Genel olarak PC12 hücrelerinin üç iskele grubunda da ürediği ancak bu üreme hızının Mg/PGS ‘de en yüksek iken PGS elastomerinde ise en düşük olduğu belirlenmiştir.

4.6.1.3 Doku İskelelerinde Hücre Morfolojilerinin SEM ile Görüntülenmesi

İskelelerdeki hücre-iskele ve hücre-hücre etkileşimlerini görselleştirmek ve hücre morfolojisinin daha yakından incelenmesi için SEM görüntüleri analiz edilmiş ve Şekil 4.56'da sunulmuştur.



Şekil 4.56. Doku iskelelerinde hücre morfolojilerinin aşağıdan yukarı 1., 4., 7., 10. ve 14. günlere ait SEM ile görüntüleri: PGS (A-D-G-J-M); f-KNF/PGS (B-E-H-K-N); Mg/PGS (C-F-I-L-O).

Genel olarak malzeme görüntüleri incelendiğinde üç farklı malzeme grubunda da herhangi bir hücre yapışmasını arttırıcı ajan olmadan (kolajen, RGD vb.) PC12 hücrelerinin proliferasyonu gözlenmiştir. Düşük büyütmelerde, PC12 hücrelerinin tipik olarak küçük kümeler halinde çoğaldığı tespit edilirken, daha yüksek büyütmelerde hücre kümelerinin esas olarak yuvarlak ve oval hücrelerden oluştuğu belirlenmiştir. Bu çoğalma PGS elastomerinde CO₂ lazer nedeniyle yüzeyinde oluşan çukur yapılarında olurken f-KNF/PGS kompozitlerde hücrelerin KNF kaplamasının üzerinde ve Mg/PGS kompozitinde ise Mg tel üzerinde belirgin bir çoğalma tespit edilmiştir. İlerleyen kültür süresi ile beraber Mg telin besi ortamı içerisindeki korozyona bağlı olarak tel yüzeyindeki çatlaklar oluşmuş, ancak bu durum hücre üremesi üzerinde olumsuz sonuçlanmamıştır.

Hücre ekimi sırasında hücrelerin agrege olma özelliklerini giderilmesi için 22 gauge'lık iğne ucundan geçirilerek homojenize edilmiştir. Buna rağmen kültürün 1. günü incelendiğinde küresel formdaki hücrelerin PGS elastomer yüzeyinde homojen olmayan dağılımı gözlenmiştir (Şekil 4.56A). CNF ve Mg kompozitlerinde ise hücre dağılımı daha homojendir (Şekil 4.56B ve 4.56C).

Kültürün 4. ve 7. günlerinde artan hücre üremesi ile birlikte PC12 hücrelerini f-KNF/PGS kompozitinde fiber yapıları üzerine hücresel uzantıları ile tutunduğu özellikle Mg/PGS'de hücrelerin kanalı içerisinde Mg teline yöneldiği izlenmiş, kanal içerisine göre tel üzerinde bulunan hücrelerin mikrovilluslar ile yüzeye yapıştığı tespit edilmiştir. Buna göre Mg tel Üzerindeki hücreler küresel formlarını kaybederek yayılma eğilimi gösterirken kanal içerisinde bulunan kümelenmiş halde bulunan hücrelerin küresel formlarını koruduğu belirlenmiştir.

Kültürün 10. gününde bütün iskele grupların da belirgin bir hücre üremesi tespit edilmiştir. Bu üreme PGS elastomerin de hücre kümeleri halindeyken f-KNF/PGS kompozitinde daha çok bireysel hücre formundadır. Mg/PGS kompozitinin kanal içerisinde hücre kümelenmeleri tespit edilmiştir. Buna rağmen 14. gün sonunda PC12 hücrelerinin Mg tel yüzeyini kaplayarak hücre-hücre ve hücre-iskele etkileşimi belirgin haldedir. f-KNF/PGS kompozitinde ise hücresel uzantıların artarak hücre yayılmaların artış gözlenmiştir. Diğer yandan desenli PGS'ler üzerindeki hücrelerde kısa boyutlu

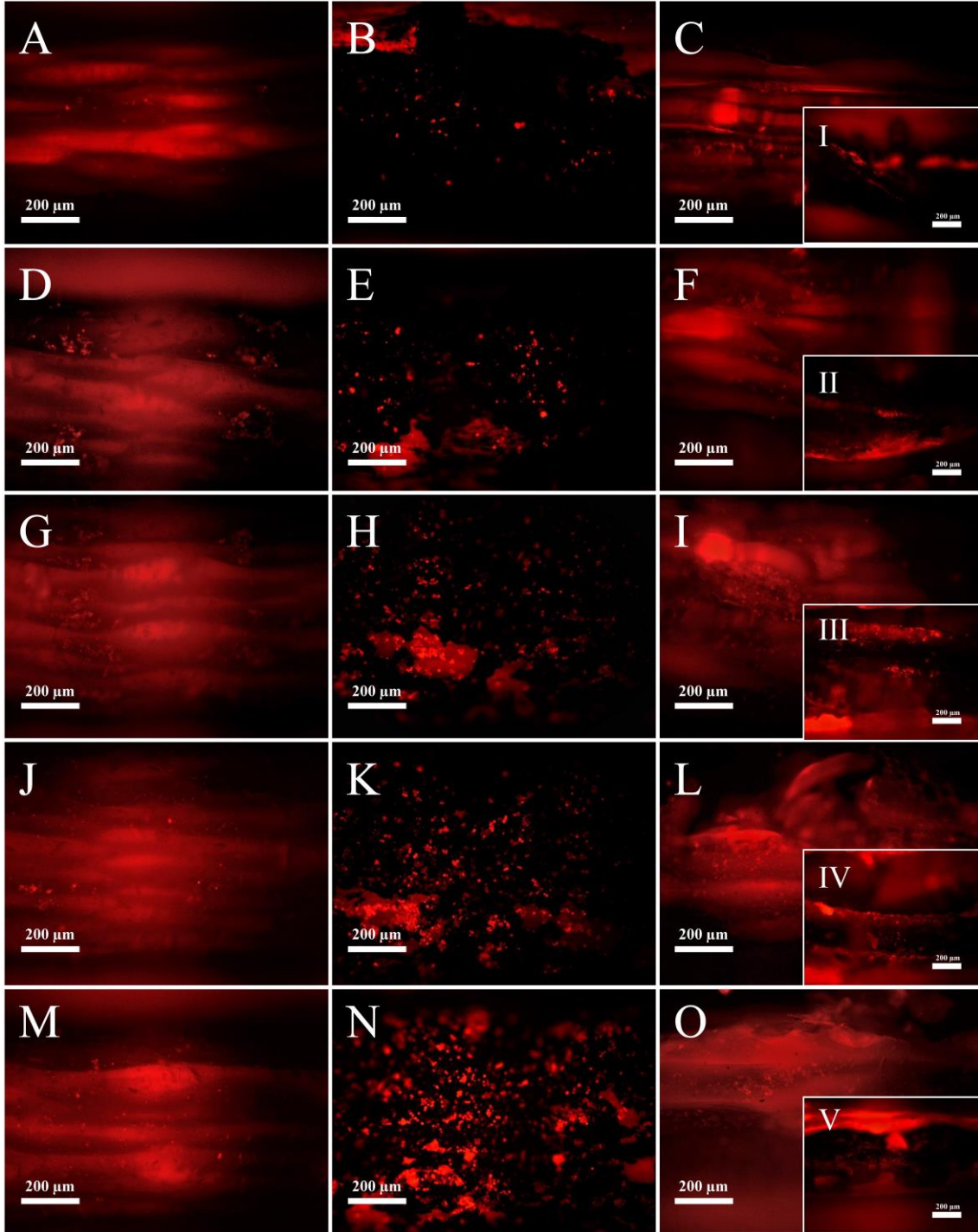
hücresel uzantıların 14. günde gözlenmesi PGS'nin herhangi bir iletken bir malzeme içermediğinde PC12 büyümesi için uygun bir yapı iskelesi olmadığını kanıtlamıştır. Literatürde yapılan çalışmalarda NGF indüksiyonu olmadan, PC12 hücrelerinin küçük ve küresel şeklini koruduğunu göstermektedir [183]. Buna rağmen Mg/PGS iskele üzerindeki PC12 hücre morfolojilerindeki değişim iskelenin hücresel davranışlar üzerindeki başarısını ortaya koymuştur.

4.6.1.4 Doku İskelelerinde Floresans Boyama ile Hücresel Davranışların İncelenmesi

Floresan hücre izleme boyları, canlı hücre görüntüleme reaktifleri olarak, özellikle hücre proliferasyonu, yer değiştirme, kemotaksis ve istila çalışmaları için *in vitro* çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır [184]. Bu boyların hücre izlemede kullanılabilmesi için hücrelerin boylarla verimli bir şekilde işaretlenebilmesi, ilerleyen kültür süresi ile birlikte boyanın hücreler içinde tutulması, toksik olmaması ve hücresel mikro ortamda stabilitesini koruması gibi gereksinimler bulunmaktadır [185].

Çalışma kapsamında kullanılan CMTPX hücre zarlarından serbestçe geçebilen; ancak hücre içine girdikten sonra hücre zarından geçemeyen reaksiyon ürünlerine dönüştürülen floresan ışını altında kırmızı ışığa veren bir boyadır. Yapısında bir glutatyon S-transferaz aracılı reaksiyon kullanarak tiyol gruplarıyla reaksiyona giren bir klorometil veya bromometil grubu içerir. Hücre içerisinde glutatyon seviyeleri yüksek ve glutatyon transferaz enziminin bulunması bu tepkimenin gerçekleşmesini sağlar. CMTPX boyası, yavru hücrelere aktarılır, ancak bir popülasyondaki bitişik hücrelere aktarılmaz. Yapılan çalışmalar CellTracker™ floresan boylarının hücre içerisinde en az 72 saat boyunca floresans ışığa yaptığını göstermiştir [186].

Çalışma kapsamında hazırlanan kompozitlerin kanal içerisine ekilen hücrelerin görüntülenmesi için CMTPX boyası ile floresan ışını altında kırmızı ışığa yapması sağlanmıştır. Boyama işlemi için hücre ekimi öncesinde hücreler boya ile inkübe edilmiş ve kanal içerisine normal hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. Kültürün belirli günlerinde floresans mikroskopunda görüntüler alınarak hücresel davranışlar değerlendirilmiştir.



Şekil 4.57. Doku iskelelerinde hücresel olayların aşağıdan yukarı 1., 4., 7., 10. ve 14. günlerde floresan boya ile incelenmesi: PGS (A-D-G-J-M); f-KNF/PGS (B-E-H-K-N); Mg/PGS (C-F-I-L-O).

Şekil 4.57’de sunulduğu üzere, PGS, f-KNF/PGS ve Mg/PGS kompozitleri yüzeyinde bulunan kanal içerisindeki PC12 hücrelerinin 14 günlük hücre kültürü çalışmasına ait farklı zaman noktalarında hücre davranışlarının görüntülenmiştir. Görüntüleme

çalışmalarında kanal içerisinde görülebilen tepe-çukur oluşumları, Mg telinin varlığı, PGS elastomerinin opak olmayan rengi nedeniyle oldukça zorlu olmuştur.

Kültürün ilk günleri incelendiğinde PGS elastomerinin bu boyayı da absorpladığı ve elastomerin kırmızıya boyandığı gözlenmiştir. Bunun yanı sıra hücresel oluşumlar kanal içerisinde ayırt edilebilir haldedir (Şekil 4.57A). Hücreler diğer gruplara göre daha az belirgin ve sayıca daha azdır. f-KNF/PGS’de kanal içerisinde siyah renkli olmasına bağlı olarak hücreler PGS’ye oranla daha belirgin ve ışımaya miktarı fazladır (Şekil 4.57B). Mg/PGS kompozitlerin kanal içi (Şekil 4.57C) ve Mg tel üzeri (Şekil 4.57D) olmak üzere iki farklı görüntüleme yapılmıştır. Çalışma kapsamında yapılan diğer görüntülemeler gibi tel varlığından dolayı görüntüleme oldukça zor olmuştur. Mg teli kısmen floresans altında ışımaya yapmasına rağmen kanal içerisinde ve tel üzerinde hücreler tek tek ve belirgindir. Kültürün ilk günündeki hücre dağılımları hücre ekiminin başarısını göstermektedir.

Kültürün 4. gününde her kompozit için hücre üremesinin az da olsa arttığı gözlemlenmiştir. Bu üreme PGS için (Şekil 4.57E) CO₂ lazer tarafından oluşturulan kanal içerisindeki çukurlarda birikmeye yönelik olurken f-KNF/PGS (Şekil 4.57F)’de daha homojen bir hücre dağılımı gözlenmiştir. Mg/PGS (Şekil 4.57G) hücre sayısının kanal içi ve tel üzerinde arttığı ve özellikle tel üzerinde (Şekil 4.57H) sarmal oluşum diplerinde belirgin hücre üremesinin olduğu gözlenmiştir.

Kültürün 7. Gününden itibaren bütün malzemelerde hücre sayısında belirgin bir artış gözlenmiştir. Bu durum PGS elastomerinde hücre agregasyonunun artması ile gözlenirken (Şekil 4.57I), f-KNF/PGS ‘de hücre dağılımı homojenliğini korumaktadır (Şekil 4.57J). Mg/PGS üzerinde hücre miktarı artmış, tel üzerinde hücreler küresel formlarını kaybederek yayılmaya başlamıştır (Şekil 4.57K-4.57L).

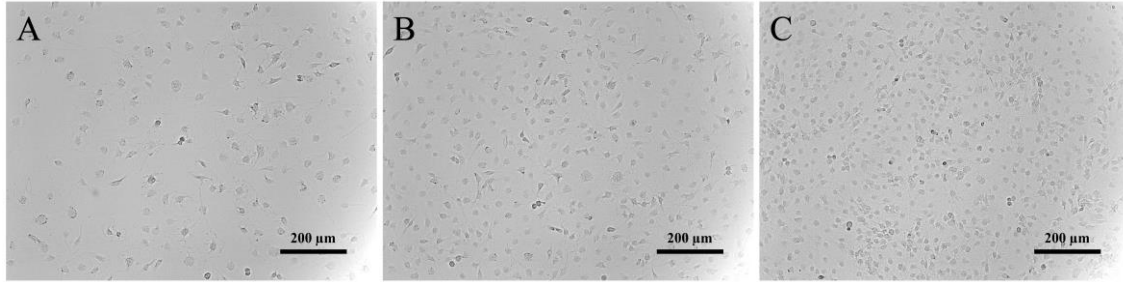
Kültürün 10.günüden itibaren PGS elastomerindeki PC12 hücreleri agrede oldukları noktalardan kanal boyunca birbirlerine doğru yöneldikleri (Şekil 4.57M) ve bu yönelim sonucunda 14. günde tamamen bir kanal boyunca dağıldıkları gözlenmiştir. Buna rağmen diğer iskelelerle karşılaştırıldıklarında hücre sayısının 14 gün sonunda en düşük olduğu

tespit edilmiştir (Şekil 4.57M). Diğer yandan f-KNF/PGS iskelelerde hücre üremesi zemin renginden dolayı diğer malzemelerden daha fazla gibi gözükse de 14 günün sonunda hücreler kanal içerisinde agrege olma eğilimi göstermişlerdir (Şekil 4.57K ve Şekil 4.57N). İskeleler arasından en başarılı olarak Mg/PGS belirlenmiştir. Çünkü hücre üremesinin belirgin artışının yanı sıra Mg teli üzerinde 10.günden itibaren hücreler tel yüzeyinde yayılmaya başlamış (Şekil 4.57L), 14. günde tel yüzeyini örtmenin yanı sıra kanal boyunca hücrel etkileşimler belirgin halde gözlenmiştir (Şekil 4.57O ve 4.57OV).

4.6.2 S42 Schwann Hücre Kültürü

4.6.2.1 Hücrelerin Kültüre Edilmesi ve Proliferasyonun İncelenmesi

Sinir doku mühendisliği çalışmalarında kullanılan Schwann hücreleri alt ailesinde yer alan S42 hücre hattı diğer Schwann alt üyelerine göre daha da yüksek bir miyelinle ilişkili glikoprotein (MAG) seviyesi eksprese ettiği için çalışma kapsamında ikinci hücre hattı olarak S42 hücre hattı seçilmiştir [187]. S42 hücreleri kültürü sırasında kültürün belirli günlerinde hücre morfolojileri faz-kontrast mikroskopisi ile incelenmiş, görüntüler Şekil 4.58'de sunulmuştur.



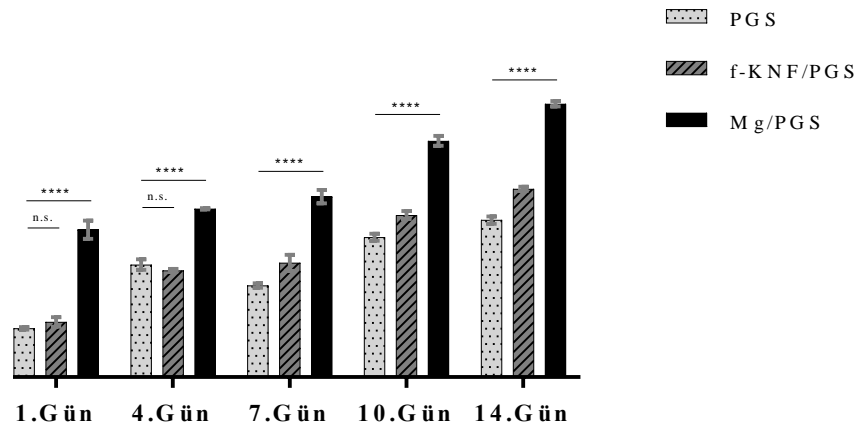
Şekil 4.58. Kültürlenmiş Schwann hücre hattının faz kontrast görüntüleri: 24 saat sonra (A); 48 saat sonra (B) ve 4 gün sonra (C).

Hücre çalışmasını takiben 24 saat sonra elde edilen görüntülere göre ilk günlerinde hücreler düşük yoğunlukta, bazı yerlerde hücrelerin iğsi formu belirgin ve dentritleri ile diğer hücreler ile temas halinde olduğu gözlenmiştir. Buna rağmen da bir miktar temas olmasına rağmen, tek tek hücreler genellikle çevrelerinde bol miktarda alana sahip olduğu görülmüştür (Şekil 4.58A). Düşük yoğunluklu hücreler genel olarak yüzeye yayılma

eğilimindedir. Artan kültür süresiyle beraber hücre yoğunluğu artmış, hücreler boş alanları doldurmaya devam etmiştir (Şekil 4.58B). Hücreler dendritleri yardımıyla belirli bölgelerde hücresel etkileşim halindedir. 4. gün sonunda esasen tüm hücreler birbiriyle temas halindedir ve etraflarında çok az görünür alan vardır (Şekil 4.58C). Hücre yoğunluğunun artmasına bağlı olarak hücreler, yüksek yoğunlukta nispeten düz ve çokgen formda olduğu gözlenmiş ancak morfolojilerini tam olarak kalabalıklaşma nedeniyle değerlendirmek zor olmuştur [188] Bununla birlikte kültür kabında yer yer hücresel yönelmelerin oluştuğu tespit edilmiştir.

4.6.2.2 4.6.2.2 Doku İskelelerinde Hücre Proliferasyonunun Alamar Mavisi Yöntemi ile İncelenmesi

Miyelin kılıfını oluşturan Schwann hücreleri, birçok miyelin gen ekspresyonunu regüle edebilir ve hasarlı nöronların tedavisi ve akson uzamasını kolaylaştırmak için çeşitli nörotrofinler salgılar [189]. Bu nedenle geliştirilen doku iskelesinin Schwann hücrelerinin büyümesini destekleme yeteneği, sinir rejenerasyonu için iskele başarısını belirleyen ana kriterlerinden biridir. Bu nedenle doku iskeleleri üzerinde hücre canlılığı alamar mavisi yöntemi ile araştırılmış, elde edilen veriler Şekil 4.59'da paylaşılmıştır.

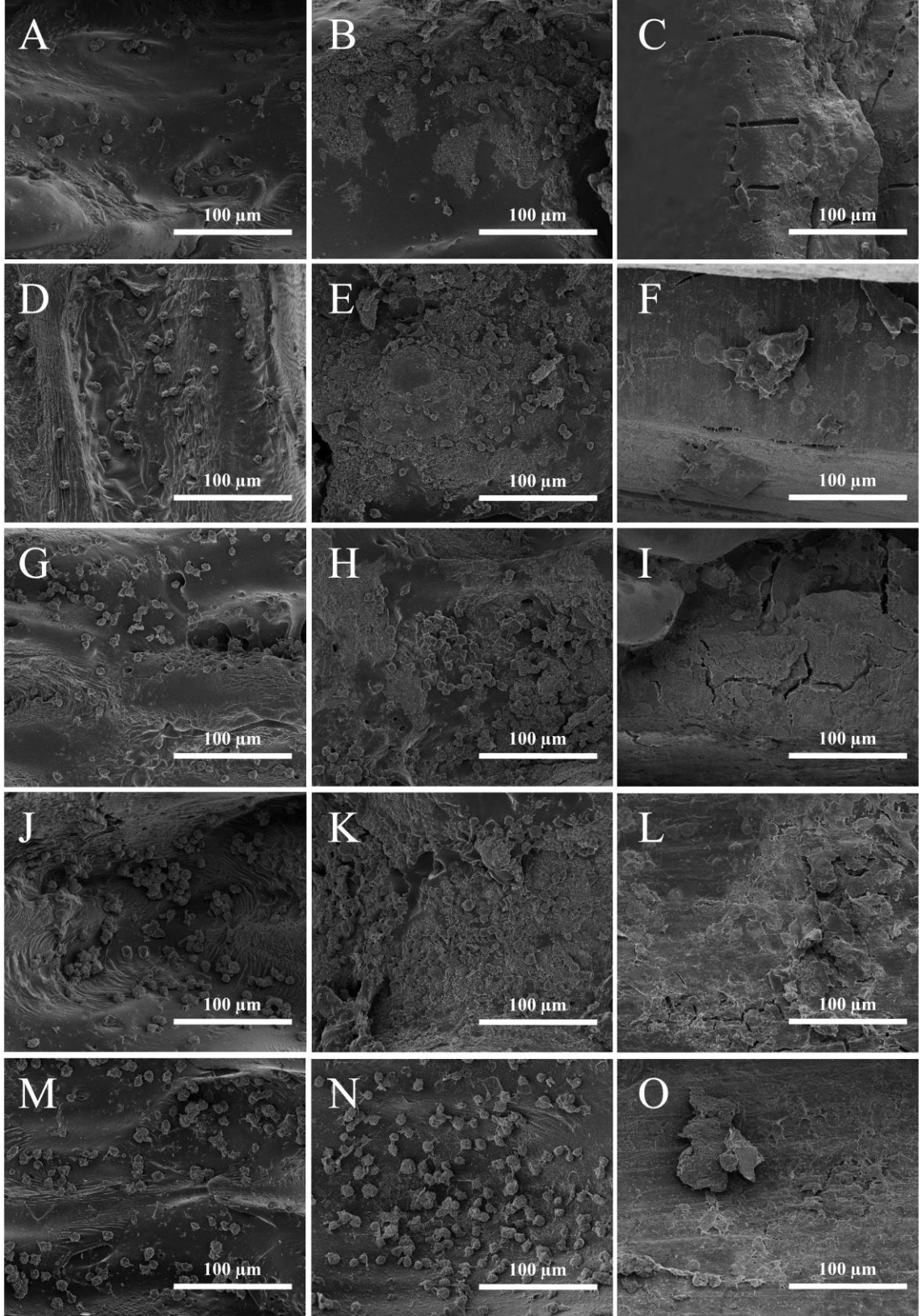


Şekil 4.59. Doku iskelelerinin S42 hücreleri canlılıkları üzerindeki etkisinin incelenmesi.

Schwann hücreleri, tüm iskelelerde 14 günlük kültürlenme ile S42'ler, biyouyumluluklarını ve toksik olmadıklarını belgeleyen iyi derecede çoğalmaya gözlenmiştir. 1. günden 4. güne kadar sürekli çoğalmış, bu artış 7. günden sonra daha yüksek bir ivme daha iyi proliferasyon davranışı tespit edilmiştir. Genel olarak sonuçlar incelendiğinde Yapı iskelelerindeki hücre sayıları üç iskele grubu içinde zamanla kademeli olarak artmıştır. Günler arası hücre üremesi anlamlı olarak farklı bulunmuştur. Bu artışın f-KCNF'de ve Mg/PGS'de belirgin olması iletken materyal eklenmesinin Schwann hücrelerinin çoğalmasını desteklediğini göstermiştir [190]. Mg/PGS iskelelerde hücre üremesindeki artış Mg telin sadece iyi biyouyumluluğa sahip olmadığını, aynı zamanda ayrıca S42 büyümesini ve çoğalmasını önemli ölçüde desteklediği anlaşılmıştır. Bunun nedeni, Mg'un hidrofiliğinin elastomer yüzey üzerinde hücre yapışmasını teşvik etmesi veya iletken etkinin S42 miyelin gen ekspresyonunu, nörotrofin salgılanmasını ve S42 proliferasyonunu teşvik etmesi olabilir.

4.6.2.3 4.6.2.3 Doku İskelelerinde Hücre Morfolojisinin SEM ile Görüntülenmesi

Nanofiber üzerindeki hücrelerin morfolojisi, SEM ile 14 günlük inkübasyondan sonra değerlendirilmiş Şekil 4.60'da karşılaştırmalı olarak sunulmuştur. Genel olarak, bütün iskelelerde hücre üremesi gözlenmiş, hücreler ve substrat nanofiberler arasındaki ilişkiler SEM görüntülerinden açıkça görülebilmektedir.



Şekil 4.60. Doku iskelelerinde S42 hücre morfolojilerinin aşağıdan yukarı 1., 4., 7., 10. ve 14. günlerde görüntülenmesi: PGS (A-D-G-J-M); f-KNF/PGS (B-E-H-K-N); Mg/PGS (C-F-I-L-O).

İletken materyalin hücre proliferasyonuna katkısı belirgin şekilde ortaya çıkarmıştır. Buna göre f-KNF/PGS iskelelerde S42 hücrelerinin nanolifler ile iyi etkileşime girdiği ve Mg/PGS üzerinde ise S42 hücrelerinin küresel formlarını kaybederek Mg tel üzerinde biyo-polar uzantılarla tipik iğ şekli sergilediği ve hatta kültür sonunda teli kapladığı gözlemlenmiştir.

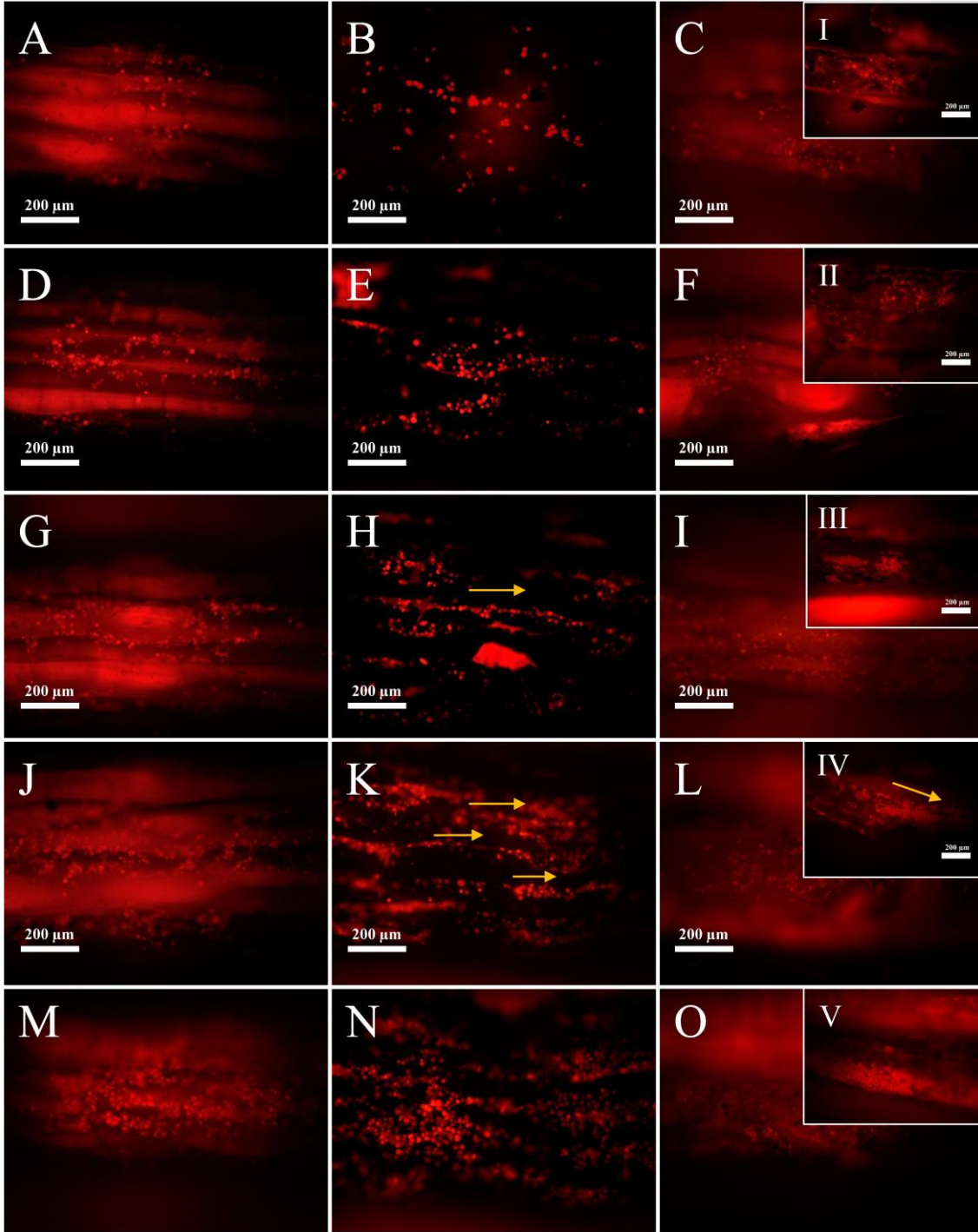
Kültürün 1. gününde PGS elastomeri üzerinde bireysel ve küresel formda olan hücreler PC12 hücrelerinde olduğu gibi f-KNF/PGS iskelelerde nanofiberlerin üzerinde toplanmış, Mg/PGS üzerinde ise 1. günden itibaren hücrelerin küresel formlarını kaybederek açılmaya başladıkları ortadır. Devam eden 4. ve 7. günlerde hücre proliferasyonu belirtilen şekilde artmış, f-KNF/PGS ve Mg/PGS iskelelerde hücre-hücre etkileşimleri hücre uzantılarla ile kurulduğu gözlenmiştir. Yine kültürün 10. gününde yüksek hücre artışı ile beraber PGS elastomerinde hücre kümelere gözlenirken, f-KNF/PGS membran yapısındaki fiberlerin içerisine S42'lerin iyice entegre olduğu ve Mg teli üzerinde hücre etkileşimlerinin oldukça yoğunlaştığı tespit edilmiştir. 14. sonunda PGS elastomerindeki hücrelerin küçük uzantılarının olduğu gözlemlenmiş, f-KNF/PGS iskelelerde uzun hücre uzantıları yardımıyla kendilerini çevreleyen nanoliflerle etkileşime girmiş ve sıkı bir şekilde tutunduğu fark edilmiştir.

14. günde Mg telinin tamamen S42 ile kaplandığı oldukça ilgi çekicidir. S42 hücreleri daha yüksek yoğunlukta büyümüş ve demetler halinde düzenlenmiştir. Bildiğimiz gibi, bir periferik sinir yaralandığında, Schwann hücreleri çoğalır ve yaralanma bölgesine göç ederek akson büyümesini ve ardından miyelinizasyonu desteklemek için uzunlamasına Büngner bantları olarak tanımlanan hücre sütunları oluşturur [191]. SEM görüntülerinde de Mg/PGS üzerinde S42'ler uçtan uca birbirine bağlanarak Büngner bantlarına benzeyen çok sayıda hücre sütunu oluşturmuş ve kanal boyunca gerildiğini göstermiştir. Sonuçlar ayrıca Schwann hücrelerinin, iskeleler üzerinde kültür sonrası fenotiplerini ve aktin hücre iskeletini koruduklarını kanıtlamıştır. Bunun yanı sıra f-KNF/PGS iskelelerde PGS'ye göre daha fazla S42 çoğalmış, Mg/PGS üzerinde ise çok daha iyi performans göstermiştir.

Bu bulgu, iletken materyal Mg'un S42 çoğalmasını arttırdığı önceki Alamar mavisi sonuçlarıyla tutarlıdır.

4.6.2.4 Doku İskelelerinde Floresans Boyama ile Hücresel Davranışların İncelenmesi

PC12 hücreleri ile karşılaştırılmak üzere S42 hücrelerin iskele üzerindeki davranışlarının görüntülenmesi için CMTPX boyası kullanılmış ve floresans mikroskobundan elde edilen görüntüler Şekil 4.61'de verilmiştir.



Şekil 4.61. Doku iskelelerinde S42 hücrelerinin floresan boyama ile davranışlarının incelenmesi: PGS (A-D-G-J-M); f-KNF/PGS (B-E-H-K-N); Mg/PGS (C-F-I-L-O).

Kültürün ilk günleri incelendiğinde PGS elastomerinde hücre ekimini takiben hücreler kümelenme davranışı göstermiş, ancak 4. günden itibaren kanal içerisinde oluşturulan mikro desenler sayesinde kanal boyunca proliferasyon olmuştur. Hücre parlaklığı PGS'nin boyayı absorplaması nedeniyle daha düşük olsa da hücre morfolojileri ayırt edilebilir ve

küresel formdadır. f-KNF/PGS iskelelerde hücreler diğer gruplara göre oldukça parlak gözlenmiştir. Bu durum daha önce bahsedildiği gibi siyah renkli nano fiber kaplamadan kaynaklanmaktadır. Mg/PGS kompozitlerin kanal içi (Şekil 4.61C) ve Mg tel üzeri (Şekil 4.61CI) olmak üzere iki farklı görüntüleme yapılarak hücre davranışları incelenmiş, hücrelerin ilk günden itibaren Mg teli üzerine yapışarak küresel morfolojilerini kaybettikleri gözlenmiştir.

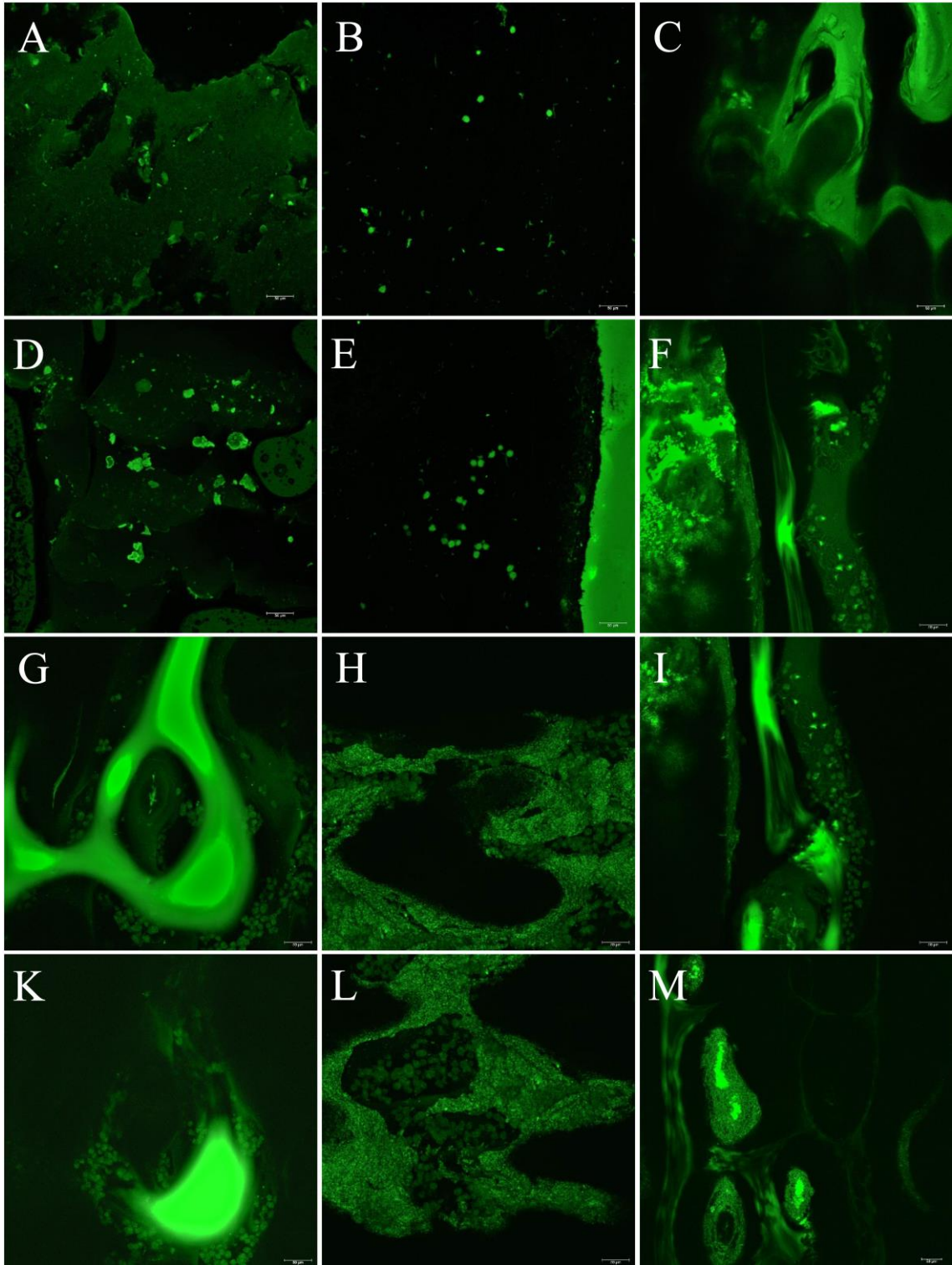
Bu iskelelerde hücre üremesinin yanı sıra 7. günden itibaren açık bir şekilde hücre yönelimleri gözlenmeye başlamıştır. Sarı oklarla gösterilen bu yönelimler kanal boyunca gerçekleşmektedir. Diğer yandan kültürün ilk günlerinden itibaren Mg teli üzerine yapışarak yayılma davranışının gözlemlendiği Mg/PGS iskelelerde 7. günden itibaren bireysel hücre yapıları SEM görüntülerini de doğrularak çoklu hücre etkileşimleri haline gelmiştir. Bu durum hem Mg teli altındaki kanal içerisinde uzantılara sahip hücre oluşmasından hem de Mg tel üzerindeki hücre etkileşimlerinden anlaşılmaktadır. Kültürün son günlerinde her iskele grubunda hücre proliferasyonundaki belirgin hücre artışı ile beraber bu çoğalmanın PGS elastomerinde kanal boyunca hücre yığınlarının oluşmasına neden olduğu, f-KNF/PGS yönelimlerin daha belirginleşerek hücrelerin birbiriyle iletişim halinde liflerinin etrafına sarılarak silindirik bir yapı oluşturarak kısmi yer yer hat boyunca ilerlediklerini ve Mg/PGS elastomerinde ise Mg telinin ve kanal içerisinde tamamen hücre yapıları ile kaplandığı gözlemlenmiştir.

Floresan görüntülerden, Mg teli üzerindeki S42 hücrelerinin telin yönelimine yanıt olarak iki kutuplu bir şekilde yapışarak neredeyse birbirine paralel oldukları görülebilir. S42 hücrelerinin hızlı bir şekilde yüzeye yapışarak birbiri ile hücre bağlanması ve nörit uzaması gibi hücre faaliyetlerini gerçekleştirme sinir rejenerasyonun tedavisine yönelik olarak umut vaat eden sonuç olmuştur.

Bunun yanı sıra iskelelerde beklenildiği üzere CO₂ lazer ile mikro kanallar oluşturularak hücrelerin bir kanal boyunca yönlendirilmesi hücre büyümesini daha da teşvik ettiği belirlenmiştir. Önceki çalışmalar da hizalanmış liflerin, rastgele olanlara kıyasla Schwann hücrelerinin göçüne rehberlik etmede daha etkili olduğunu bildirmiştir [192].

4.6.2.5 Doku İskelelerinde Konfokal Mikroskobu ile Hücresel Davranışların İncelenmesi

S42 hücrelerinin hücre canlılığının değerlendirilmesi için yapılan bir diğer görüntüleme konfokal mikroskobudur. Kültürün belirli günlerinde görüntüleme öncesinde CaAM/EthH boyaları ile boyanan iskeleler analiz sırasında kanal içerisinde görüntülenmesi amacıyla maksimum lazer gücünde cihaz çalıştırılmıştır. Analiz sonucunda elde edilen görüntüler gruplar arasında karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.



Şekil 4.62. Doku iskelelerinde S42 hücrelerinin aşağıdan yukarı 1., 4., 7., 10. ve 14. günlerde konfokal mikroskobu ile görüntülenmesi: PGS (A-D-G-K); f-KNF/PGS (B-E-H-L); Mg/PGS (C-F-I-M).

Şekil 4.62' e göre elde edilen görüntüler değerlendirildiğinde iskelelerin sadece CaAM kaynaklı yeşil ışığa yaptığı ve ölü hücreleri boyayan EthH kaynaklı herhangi bir kırmızı ışığa gözlenmemiştir. Bu durum analiz sırasında kullanılan ölçüm metodundan kaynaklandığı düşünülmüştür. Bir açıdan PGS elastomerin boyayı absorplayarak görüntüleri yansıttığı fark edilmiştir. Bu nedenle hem ölü hücrelerin tespiti hem de canlı hücrelerin iskeleden ayırt edilerek görüntülenmesi oldukça zor olmuştur. Diğer görüntüleme yöntemlerinde olduğu gibi f-KNF/PGS'ler siyah arka planı sayesinde daha belirgin hücre ışığı gözlenmektedir. Kültürün ilk gününde PGS elastomerinde az da olsa hücre gözlenmesine rağmen Mg/PGS iskelelerde boya absorplanması ve Mg telinin yansması nedeniyle hücreler belirgin bir şekilde gözlenmemiştir. Takiben 4. günden itibaren bütün gruplarda hücreler PGS elastomerinde kümeler halinde, f-KNF/PGS'lere de daha bireysel formlarda ve Mg/PGS'ler de ise Mg teli boyunca dizilmiş haldedirler. Doku iskelelerinde kültürün 7. gününde gözlenen hücre çoğalmasındaki artış, 14 günde de devam etmektedir. Bunun yanı sıra PGS yapı iskelelerinde gözlemlenen kümelenmiş morfoloji ile karşılaştırıldığında f-KNF/PGS iskelelerde fiber yapıları üzerinde hücre-hücre etkileşimlerin arttığı, Mg/PGS'ler de ise hücrelerin iyi yayılmasını ve uzatılmış morfolojileri ile tel boyunca yöneldiği açıkça ortaya konmuştur. Elde edilen sonuçlar yapı diğer analizleri doğrular niteliktedir.

5. YORUM

Tez çalışması kapsamında periferik sinir yarımalarında kullanılmak üzere iletken materyal içerikli PGS elastomer geliştirilmiş ve *in vitro* etkinlikleri değerlendirilmiştir. Çalışma beş aşamadan oluşmaktadır. İlk olarak PGS elastomerinin optimizasyonu ve üretimi yer almaktadır. Bu amaçla farklı gliserol içerikleri, farklı çapraz bağlanma süreleri ve elastomerin alkol yıkama metodu optimize edilmiştir. Farklı literatürde mevcut olan eş molar sebasik asit ve gliserol yerine PGS elastomerinin özelliklerini iyileştirebilmek için farklı gliserol oranları denenmiş, gliserol miktarının artması ile malzeme dayanımının azaldığı ve besi ortamının pH değerini yükselttiği belirlenmiştir. Buna göre PGS elastomeri sentezinde kullanılmak üzere sebasik asit ve gliserol oranı 1:1 kabul edilmiştir. Çapraz bağlanma süresi PGS elastomerinin özelliklerini değiştiren diğer önemli bir parametredir. Bu bağlamda eş molar monomer içeren PGS elastomeri 10, 12 ve 14 saat çapraz bağlanmış, fiziksel ve kimyasal karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Morfolojik özellikleri çapraz bağlanmanın artması ile daha kırılğan ve transparan bir elastomer haline geldiği belirlenmiştir. 10 saatlik PGS, oldukça esnek ve yapışkandır. Yapıdaki kimyasal bağların incelenmesi için yapılan FTIR analizine göre çapraz bağlanma süresinin artmasıyla 3500 cm⁻¹ civarında hidroksil grupları (-O-H) na ait absorpsiyon piklerinin daralması ortamdaki serbest bağların azaldığını gösterir. Diğer yandan ester bağı ile ilişkili 1735 cm⁻¹ ve 1164 cm⁻¹deki ester bağı ile ilişkili pik şiddetlerinin çapraz bağlanma süresinin artması ile çapraz bağlanma süresini onaylar niteliktedir. DSC analizi ile PGS elastomerleri yapısındaki incelendiğinde zincir hareketliliği değerlendirilmiş, buna göre çapraz bağlanma miktarındaki artış zincir hareketini azaltmasına dayanarak 14 saat çapraz bağlanan PGS'lerin daha yüksek bir T_g değerine sahip olduğu gözlenmiştir.

Hücre kültürü çalışmalarına yönelik olarak yüzey ıslanılabilirliğini değerlendirmek amacıyla temas açısı ölçümü gerçekleştirilmiş, bütün gruplar 90° dereceden küçük olduğu için hidrofilik olduğu tespit edilmiştir. FTIR analizinde de görüldüğü üzere yapıda bulunan serbest -OH gruplarının azalması ile yüzey açısının arttığı gözlenmiştir. Mekanik özelliklerin belirlenmesi elastomer davranışının belirlenmesi açısından oldukça önemlidir. Buna göre çapraz bağlanma miktarı arttıkça elastomer dayanımı artarken uzama miktarının azaldığı, Young modülüs değerlerinde de artış olduğu gözlenmiştir.

Mekanik test verilerinden yola çıkarak elastomer yapısındaki çapraz bağ yoğunlukları hesaplanmış, 14 saat çapraz bağlı elastomerin çapraz bağ oranı diğerlerine göre oldukça yüksek bulunmuştur. Şişme karakteristikleri farklı çapraz bağlama süreleri ile değişen bir olgudur. Farklı çözeltiler içerisinde incelenen çapraz şişme özelliklerine göre yapıdaki -OH gruplarının azalmasına bağlı olarak malzemenin şişme davranışında azalma tespit edilmiştir. *In vitro* çalışmalara yönelik olarak degradasyon çalışması ile elastomer bozunma davranışı incelenmiş, 28 günlük degradasyon çalışması yapılmıştır. Artan degradasyon süresi ile beraber bütün gruplarda bozunma hızı artmış, ancak en fazla bozunmayı 10 saat çapraz bağlanmış PGS elastomeri göstermiştir.

Elastomerlerin hücreler üzerindeki sitotoksik özelliklerini değerlendirmek amacıyla yapılan L929 hücreleri ile MTT analizine göre elastomerlerin toksik olmadığı ancak çapraz bağlanma süresinin artması ile hücre canlılığının da arttığı belirlenmiştir. Hücreler üzerinde elastomerlerin etkilerini incelemek için elastomerlerin DMEM içerisinde bekletilmesi ile elde edilen ekstraktlar L929 hücreleri ile etkileştirilmiş, faz-kontrast görüntülerinde kontrol grubuna göre 14 saatlik PGS'lerde hücre canlılığının korunduğu belirlenmiş, bu durum apoptoz-nekroz boyamasında da yeşil hücre yoğunluğunun fazlalığı ile doğrulanmıştır. Yapılan karakterizasyon testleri sonucunda çalışma kapsamında 14 saat çapraz bağlı elastomerin kullanılmasına karar verilmiştir. Bunun yanı sıra *in vitro* hücre kültürü çalışmaları için elastomerdeki serbest monomerlerin uzaklaştırılması için alkol yıkama metodu optimize edilmiştir. Üç farklı işlem sonrasında elastomerler DMEM içerisinde bekletilerek pH tayini yapılmıştır. Buna göre 24 saat alkol yıkama işleminin en etkili yöntem olduğu belirlenmiştir.

İkinci olarak CO₂ lazer cihazı ile PGS elastomeri yüzeyine mikrokanallar oluşturulmuştur. Bu amaçla farklı genişliklerde 200 µm ve 500 µm kanal genişliklerine sahip elastomerler morfolojik açıdan daha uygun görülmüş yapılan SEM analizinde de CO₂ lazer ışını ile PGS kanallarının degrade olmasına bağlı olarak genişlik ve derinlik değerlerinin belirlenen değerlerden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Buna göre son olarak 500 µm kanal genişliği seçilmiş ve kanal içerisinde girinti-çıkıntıların giderilmesi için CO₂ lazer parametreleri optimize edilmiştir.

Çalışmada PGS'ye iletkenlik kazandırmak amacıyla iki farklı materyal kullanılmıştır. Bunlardan birincisi karbon nanofiberdir. KNF'ler PGS yüzeyinde oluşturulan kanallar içerisinde kaplanarak hücrel olayları desteklemesi planlanmıştır. Bu amaçla homojen bir KNF çözeltisi elde edilmesi ilk adımdır. Homojen çözelti hazırlamak için farklı organik çözücüler denenmiş, karıştırma yöntemi optimize edilmiştir. Hazırlanan çözeltilerin homojen olmadığı mikroskop altında doğrulanmış, diğerlerine göre daha homojen bulunan gliserol ve SDS içerikli çözeltilerde L929 hücreleri üzerindeki MTT analizinde toksik bulunmuştur. Foto başlatıcı içerikli GelMA ile birleştirilen KNF materyalinin UV ile çapraz bağlanma işlemi sonrası kanal içerisinde çözeltinin jelleşme yerine kuruması KNF'lerin fonksiyonelleştirilmesini zorunlu hale getirmiştir. KNF'ler, asit muamelesi sonucunda -COO ile fonksiyonelleştirilmiş ve işlemin etkinliği karakterize edilmiştir. Yapılan bu işlemin homojenliği mikroskop altında ve SME analizi ile doğrulanmış, diğer çözeltilere göre homojen bir dağılım sergilediği kanıtlanmıştır.

Fonksiyonelleştirme işleminin başarısını değerlendirmek için yapılan Raman analizinde, KNF'nin maruz kaldığı metot ile f-KNF yüzeyi üzerinde mevcut fonksiyonel grupların sayısında açıkça bir artış olduğu belirlenmiştir. TGA analizi f-KNF yapısındaki hidroflik grupların varlığını ve KNF'nin kararlılığını doğrulamıştır. Ayrıca elemental analizin yapıldığı XPS analizinde f-KNF'in % oksijen oranının KNF'den daha fazla olması f-KNF'nin yüzeyinde meydana gelen karboksilleme işlemini doğrulamıştır. Ayrıca hücre canlılığı üzerindeki etkilerini incelemek adına L929 hücreleri üzerinde yapılan alamar mavisi yöntemi iskelenin de toksik olmadığını ve hücre üremesini daha çok desteklediği göstermiştir. Bu sonuçlar yapılan apoptoz/nekroz boyasında görülen canlı hücre yoğunluğu ile desteklenmiştir. Bu bilgiler ışığında f-KNF'nin fonksiyonelleştiği doğrulanmış ve hücre canlılığına uygun olarak f-KNF çözeltisinin konsantrasyonu % 0.5 olarak belirlenmiştir. Homojen çözeltinin kanallara kaplanması için yöntem optimize edilmiş ve etkinliği SEM ve EDX analizi ile doğrulanmıştır.

Çalışmanın üçüncü aşamasında iletken materyallerden bir diğeri olan Mg alaşımını içeren Mg/PGS elastomerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. İlk olarak farklı kalınlıklardaki iki farklı alaşım (Mg-I ve Mg-K) karakterizasyon testlerine tabi tutulmuştur. Buna göre alaşımlar SEM ile görüntülenmiş, morfolojik değerlendirmenin ardından EDX ile yüzey

kimyası incelenmiştir. EDX analizi Mg-I 'in magnezyum oranının Mg-K' ye göre daha yüksek olduğu ve Mg-K yüzeyinin oksitlendiğini göstermiştir. Bu verinin daha ayrıntılı olarak incelenmesi için yapılan XPS analizi gözlenmiştir. İki alaşımında elemental bileşiminin aynı olduğu ancak miktarlarında farklılıklar olduğu gözlenmiştir. Bu analizde Mg-I folyonun korozyon direncinin Mg-K folyoya göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Mg-K yüzeyinde MgO oluşumu alaşım için dezavantaj oluştururken Mg-I'da serbest uçların varlığı hidrojen bağ kurma ihtimalini arttırmaktadır. Mg alaşımlarının bozunma davranışları üzerine birçok çalışma yapılmaktadır. Bu nedenle çalışma kapsamında degradasyon davranışları, DMEM, PBS ve DI içerisinde 28 gün boyunca ayrıntılı olarak incelenmiştir. 28. gün sonunda iki alaşım içinde DI içerisinde sadece yüzey deformasyonu gözlenirse de DMEM ve PBS içerisinde bekletilen numunelerde boyutsal kayıplar tespit edilmiştir. Yapılan SEM analizi yüzeyde meydana gelen değişiklikleri göstermiştir. Aynı zamanda EDX analizi de İki alaşımında da en az deformasyonun DI içerisinde olduğunu göstermiştir. Ayrıca iyon varlığının Mg yüzeyinin korozyona uğramasında oldukça etkili olduğunu doğrulamıştır. İnce Mg alaşımı daha inert özellikleri ve Mg içeriğinin daha yüksek olduğu fark edilmiştir. Ağırlık kayıpları değerlendirildiğinde bozunma davranışının en çok PBS içerisinde olduğu tespit edilmiştir. Diğer yandan pH değerleri incelendiğinde Mg-I' da öncelikle artmış, daha sonrasında sabitlenmişken Mg-K'da ilk günlerde yüksek iken daha sonra azalmıştır. Bu durum ortamdaki serbest iyonlarla alakalıdır. Degradasyon çalışması sadece alaşımların korozyon özelliklerini göstermekle kalamamış aynı zamanda *in vitro* çalışmalarda iskele sterilizasyonu gibi işlemlerde PBS kullanılmasının yaratacağı problemleri de göstermiştir. Alaşımların sitotoksik özellikleri değerlendirildiğinde Mg-I'da yüksek hücre canlılığı gözlenirken Mg-K'nın toksik olduğu belirlenmiş, bu durum apoptoz/nekroz boyaması ile desteklenmiştir. Bu sonuçlara göre çalışma kapsamında Mg-I'nın kullanılmasına karar verilmiştir.

Mg/PGS kompozitinin geliştirilmesine yönelik diğer aşama Mg alaşımı ile PGS'nin birleştirilmesidir. Magnetron püskürtme yaygın olarak kullanılan kapla yöntemi olduğu için ilk olarak bu yöntem denenmiştir. Kaplamanın homojenliği SEM ve EDX analizi ile doğrulanmasına rağmen DI içerisinde yüzeyden çözünerek uzaklaşması yüzey modifikasyon gerekliliğini beraberinde getirmiştir. Bu doğrultuda yapılan silanlama, ısı muamele, lazer ve plazma iyileştirmeleri sonunda da sonucun değişmemesi Mg alaşımın

doğrudan PGS ile birleştirilmesini zorunlu kılmıştır. CO₂ lazer yardımıyla PGS elastomeri içerisinde yerleştirilmiş ve Mg/PGS kompoziti üretilmiştir.

Çalışmanın diğer bir adımın geliştirilmiş PGS, f-KNF/PGS ve Mg/PGS kompozitlerinin karşılaştırılması yer almaktadır. Buna göre kanal içerisi SEM analizi ile görüntülenmiş, mekanik özellikleri çekme testi ile değerlendirilmiştir. Buna göre PGS elastomerinin mekanik özelliklerinin iyileştirildiği hatta Mg/PGS ilavesinin sinir dokuya en yakın sonucu verdiği, insanda gözlenen periferik sinir yaralanmaları için iyileştirilmesi gerektiği öngörülmüştür. Sinir hücreleri için iletken bir PGS doku iskelesi üretiminde kullanılan materyallerin elektriksel özelliklerin incelenmiştir. Buna göre f-KNF/PGS iletkenlik özellikleri literatürde bulunan birçok KNF çalışmalarından daha yüksek iletkenliğe sahip olduğu gözlenmiştir. Çekme işlemi sonrasında KNF fiberleri arasında gözlenen kopmaların oluşması sonucunda iletkenlik değerinde azalmalar tespit edilmiştir. Diğer yandan beklenildiği üzere Mg/PGS doku iskelesi en iyi iletkenlik değerine sahip olduğu belirlenmiştir. Yapılan degradasyon çalışmasına göre Mg/PGS doku iskelesi Mg alışımının degradasyonuna bağlı olarak 28 gün sonunda en fazla ağırlık kaybını yaşarken f-KNF/PGS iskelenin PGS elastomere göre daha az bozunma davranışı göstermesi f-KNF ilavesinin malzeme dayanımının daha yüksek olduğunu göstermiştir.

Çalışmanın son aşamasında hazırlanan doku iskeleleri üzerinde *in vitro* çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla ilk olarak PC12 hücreleri iskeleler üzerinde çoğaltılmış, alamar mavisi ile canlılığı kontrol edilen hücrelerin morfolojileri SEM analizi ile görüntülenmiştir. Bu analizleri desteklemek amacıyla floresan boyama ile hücresel davranışlar incelenmiştir. Buna göre PC12 hücrelerinin kültür koşullarının zorlu olmasına rağmen doku iskelelerinde artan kültür günleri ile beraber hücre üremesini arttığı, hücrelerin kümeleşme davranışı gösterse de bütün iskelelerde yüzeye tutunduğu tespit edilmiştir. Hücrelerin en çok Mg/PGS'de üremiş ve morfolojilerinin daha iyi olduğu gözlenmiştir. Hücrelerin PGS elastomerinde ise hücre canlılığı açısından bir olumsuz sonucu olmadığı ancak diğer iskelelere göre hücresel aktiviteleri daha az desteklediği tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan diğer bir hücre hattı S42 Schwann hücreleridir. Bu hücreler diğer hücre hattı ile aynı olarak canlılıkları kantitatif olarak alamar mavisi yöntemi ile değerlendirilmiş, SEM analizi ile morfolojik olarak görüntülenmiştir. Bu

sonuçlar hücrelerin doku iskelelerinde proliferasyonun artan kültür süresi ile birlikte artış olduğunu ve bununla birlikte SEM görüntülerinde yer yer küresel formda hücrelerin yanı sıra hücrelerin yzeeye yayılan bir hücre morfolojiye de sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu durum yapılan floresan boyama ve konfokal analiz sonuçları ile desteklenmiştir. Benzer şekilde Mg/PGS doku iskelesi diğer iskelelere oranla hücreyel olayları büyük oranda desteklediği ve hücrelerin kültür süresi sonunda telin tamamen kapladığı ortaya çıkmıştır.

Bu tez çalışmasında yapılan bütün bu analizler sonucunda geliştirilen PGS, f-KNF/PGS ve Mg/PGS 'lerin fiziksel ve kimyasal özellikleri incelendiğinde PGS elastomerine f-KNF ve Mg ilavesinin PGS elastomerinin sinir doku mühendisliğinde kullanımını için daha uygun hale getirdiği fark edilmiştir. Bunla beraber yapılan *in vitro* alışmalar PGS yüzeyinde CO₂ lazer ile oluşturulan kanallar hücrelerin hat boyunca ilerlemesini arttırdığını ortaya koymuştur. PGS elastomerine f-KNF ve Mg iletken materyallerinin eklenmesi iki hücre hattının da gözle görünür şekilde proliferasyonu ve hücre-iskele etkileşimini arttırdığı belirlenmiştir. Yapılan *in vitro* alışmalar sonucunda hücrelerin yer yer kanal boyunca uzamaya başladığı tespit edilmiştir. Çalışma kapsamında geliştirilen doku iskelelerinin sinir doku mühendisliğinde kullanılmak üzere iyi birer örnek olduğunu dşnlmştir.

6. KAYNAKLAR

- [1] R.V. Ludwig PE, Varacallo M. N, Neuroanatomy, Central Nervous System (CNS), StatPearls2020.
- [2] M. L.K., Physiology of the autonomic nervous system, American journal of pharmaceutical education., 71 (2007) 78.
- [3] D.R. Soderquist, Introduction to the nervous system, SAGE Publications, Inc., 2002.
- [4] J. Moskow, B. Ferrigno, N. Mistry, D. Jaiswal, K. Bulsara, S. Rudraiah, S.G. Kumbar, Review: Bioengineering approach for the repair and regeneration of peripheral nerve, *Bioact Mater*, 4 (2019) 107-113.
- [5] S. M., Periferik Sinir Kesisinde Farklı Onarım Zamanlarında Melatoninin Sinir İyileşmesine Olan Etkisinin İncelenmesi, *Plastik Rekonstrüktif Ve Estetik Cerrahi Anabilim Dali, Selçuk Üniversitesi*, 2010, pp. 107.
- [6] R.M. Menorca, T.S. Fussell, J.C. Elfar, Nerve physiology: mechanisms of injury and recovery, *Hand Clin*, 29 (2013) 317-330.
- [7] S. Ichihara, Y. Inada, T. Nakamura, Artificial nerve tubes and their application for repair of peripheral nerve injury: an update of current concepts, *Injury*, 39 Suppl 4 (2008) 29-39.
- [8] D. Grinsell, C.P. Keating, Peripheral nerve reconstruction after injury: a review of clinical and experimental therapies, *Biomed Res Int*, 2014 (2014) 698256.
- [9] N. K., Current approaches to peripheral nervous tissue regeneration – mimicking nature. A review, *Journal of Research in Innovation*, 1 (2015) 16-33.
- [10] J. Isaacs, T. Browne, Overcoming short gaps in peripheral nerve repair: conduits and human acellular nerve allograft, *Hand (N Y)*, 9 (2014) 131-137.
- [11] M. Saheb-Al-Zamani, Y. Yan, S.J. Farber, D.A. Hunter, P. Newton, M.D. Wood, S.A. Stewart, P.J. Johnson, S.E. Mackinnon, Limited regeneration in long acellular nerve allografts is associated with increased Schwann cell senescence, *Exp Neurol*, 247 (2013) 165-177.
- [12] A. Subramanian, U.M. Krishnan, S. Sethuraman, Development of biomaterial scaffold for nerve tissue engineering: Biomaterial mediated neural regeneration, *J Biomed Sci*, 16 (2009) 108.
- [13] A. Faroni, S.A. Mobasser, P.J. Kingham, A.J. Reid, Peripheral nerve regeneration: experimental strategies and future perspectives, *Adv Drug Deliv Rev*, 82-83 (2015) 160-167.
- [14] N. Zhang, H. Yan, X. Wen, Tissue-engineering approaches for axonal guidance, *Brain Res Brain Res Rev*, 49 (2005) 48-64.
- [15] G. Verreck, I. Chun, Y. Li, R. Kataria, Q. Zhang, J. Rosenblatt, A. Decorte, K. Heymans, J. Adriaensen, M. Bruining, M. Van Remoortere, H. Borghys, T. Meert, J. Peeters, M.E. Brewster, Preparation and physicochemical characterization of biodegradable nerve guides containing the nerve growth agent sabeluzole, *Biomaterials*, 26 (2005) 1307-1315.
- [16] Y. Haile, K. Haastert, K. Cesnulevicius, K. Stummeyer, M. Timmer, S. Berski, G. Drager, R. Gerardy-Schahn, C. Grothe, Culturing of glial and neuronal cells on polysialic acid, *Biomaterials*, 28 (2007) 1163-1173.

- [17] B.T. B, Gao, S., Wang, S., & Ramakrishna, S., Development of fibrous biodegradable polymer conduits for guided nerve regeneration, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 16 (2005) 367-375.
- [18] T.-R.V. Bergethon P.R., Franzblau C., Modified hydroxyethylmethacrylate hydrogels as a modelling tool for the study of cell-substratum interactions, *Journal of Cell Science*, 92 (1989) 111-121.
- [19] T.B. Bini, Gao, S., Xu, X., Wang, S., Ramakrishna, S., & Leong, K. W. , Peripheral nerve regeneration by microbraided poly(L-lactide-co-glycolide) biodegradable polymer fibers *Journal of Biomedical Materials Research* 68A (2003) 286–295.
- [20] G.R.D. Evans, Brandt, K., Widmer, M. S., Lu, L., Meszlenyi, R. K., Gupta, P. K., Patrick, C. W., In vivo evaluation of poly(l-lactic acid) porous conduits for peripheral nerve regeneration, *Biomaterials*, 20 (1999) 1109-1115.
- [21] J. Lee, M.J. Cuddihy, N.A. Kotov, Three-dimensional cell culture matrices: state of the art, *Tissue Eng Part B Rev*, 14 (2008) 61-86.
- [22] M. Cheng, J. Deng, F. Yang, Y. Gong, N. Zhao, X. Zhang, Study on physical properties and nerve cell affinity of composite films from chitosan and gelatin solutions, *Biomaterials*, 24 (2003) 2871-2880.
- [23] A.S. Rowlands, S.A. Lim, D. Martin, J.J. Cooper-White, Polyurethane/poly(lactic-co-glycolic) acid composite scaffolds fabricated by thermally induced phase separation, *Biomaterials*, 28 (2007) 2109-2121.
- [24] M. Cheng, W. Cao, Y. Gao, Y. Gong, N. Zhao, X. Zhang, Studies on nerve cell affinity of biodegradable modified chitosan films, *J Biomater Sci Polym Ed*, 14 (2003) 1155-1167.
- [25] X. Wang, W. Hu, Y. Cao, J. Yao, J. Wu, X. Gu, Dog sciatic nerve regeneration across a 30-mm defect bridged by a chitosan/PGA artificial nerve graft, *Brain*, 128 (2005) 1897-1910.
- [26] H. Jiao, J. Yao, Y. Yang, X. Chen, W. Lin, Y. Li, X. Gu, X. Wang, Chitosan/polyglycolic acid nerve grafts for axon regeneration from prolonged axotomized neurons to chronically denervated segments, *Biomaterials*, 30 (2009) 5004-5018.
- [27] S. Amado, M.J. Simoes, P.A. Armada da Silva, A.L. Luis, Y. Shirosaki, M.A. Lopes, J.D. Santos, F. Fregnan, G. Gambarotta, S. Raimondo, M. Fornaro, A.P. Veloso, A.S. Varejao, A.C. Mauricio, S. Geuna, Use of hybrid chitosan membranes and N1E-115 cells for promoting nerve regeneration in an axonotmesis rat model, *Biomaterials*, 29 (2008) 4409-4419.
- [28] S.H. Oh, J.H. Kim, K.S. Song, B.H. Jeon, J.H. Yoon, T.B. Seo, U. Namgung, I.W. Lee, J.H. Lee, Peripheral nerve regeneration within an asymmetrically porous PLGA/Pluronic F127 nerve guide conduit, *Biomaterials*, 29 (2008) 1601-1609.
- [29] Z. Zhang, M. Rouabhia, Z. Wang, C. Roberge, G. Shi, P. Roche, J. Li, L.H. Dao, Electrically conductive biodegradable polymer composite for nerve regeneration: electricity-stimulated neurite outgrowth and axon regeneration, *Artif Organs*, 31 (2007) 13-22.

- [30] K.E. Crompton, J.D. Goud, R.V. Bellamkonda, T.R. Gengenbach, D.I. Finkelstein, M.K. Horne, J.S. Forsythe, Polylysine-functionalised thermoresponsive chitosan hydrogel for neural tissue engineering, *Biomaterials*, 28 (2007) 441-449.
- [31] E. Schnell, K. Klinkhammer, S. Balzer, G. Brook, D. Klee, P. Dalton, J. Mey, Guidance of glial cell migration and axonal growth on electrospun nanofibers of poly-epsilon-caprolactone and a collagen/poly-epsilon-caprolactone blend, *Biomaterials*, 28 (2007) 3012-3025.
- [32] C.J. Bettinger, B. Orrick, A. Misra, R. Langer, J.T. Borenstein, Microfabrication of poly (glycerol-sebacate) for contact guidance applications, *Biomaterials*, 27 (2006) 2558-2565.
- [33] C. Sundback, Manufacture of porous polymer nerve conduits by a novel low-pressure injection molding process, *Biomaterials*, 24 (2003) 891-830.
- [34] L. Flynn, Fiber templating of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) for neural tissue engineering, *Biomaterials*, 24 (2003) 4265-4272.
- [35] X.J. Loh, A. Abdul Karim, C. Owh, Poly(glycerol sebacate) biomaterial: synthesis and biomedical applications, *J Mater Chem B*, 3 (2015) 7641-7652.
- [36] R. Rai, M. Tallawi, A. Grigore, A.R. Boccaccini, Synthesis, properties and biomedical applications of poly(glycerol sebacate) (PGS): A review, *Progress in Polymer Science*, 37 (2012) 1051-1078.
- [37] C.A. Sundback, J.Y. Shyu, Y. Wang, W.C. Faquin, R.S. Langer, J.P. Vacanti, T.A. Hadlock, Biocompatibility analysis of poly(glycerol sebacate) as a nerve guide material, *Biomaterials*, 26 (2005) 5454-5464.
- [38] S. Pina, V.P. Ribeiro, C.F. Marques, F.R. Maia, T.H. Silva, R.L. Reis, J.M. Oliveira, *Scaffolding Strategies for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Applications*, Materials (Basel), 12 (2019).
- [39] D. Hoffman-Kim, J.A. Mitchel, R.V. Bellamkonda, Topography, cell response, and nerve regeneration, *Annu Rev Biomed Eng*, 12 (2010) 203-231.
- [40] Y. Li, G. Huang, X. Zhang, L. Wang, Y. Du, T.J. Lu, F. Xu, Engineering cell alignment in vitro, *Biotechnol Adv*, 32 (2014) 347-365.
- [41] M.J. Moore, J.A. Friedman, E.B. Lewellyn, S.M. Mantila, A.J. Krych, S. Ameenuddin, A.M. Knight, L. Lu, B.L. Currier, R.J. Spinner, R.W. Marsh, A.J. Windebank, M.J. Yaszemski, Multiple-channel scaffolds to promote spinal cord axon regeneration, *Biomaterials*, 27 (2006) 419-429.
- [42] D. Shahriari, G. Loke, I. Tafel, S. Park, P.H. Chiang, Y. Fink, P. Anikeeva, Scalable Fabrication of Porous Microchannel Nerve Guidance Scaffolds with Complex Geometries, *Adv Mater*, 31 (2019) e1902021.
- [43] S. Koo, S.M. Santoni, B.Z. Gao, C.P. Grigoropoulos, Z. Ma, Laser-assisted biofabrication in tissue engineering and regenerative medicine, *Journal of Materials Research*, 32 (2016) 128-142.
- [44] W.Y. Yeong, H. Yu, K.P. Lim, K.L. Ng, Y.C. Boey, V.S. Subbu, L.P. Tan, Multiscale topological guidance for cell alignment via direct laser writing on biodegradable polymer, *Tissue Eng Part C Methods*, 16 (2010) 1011-1021.

- [45] M. Li, Y. Guo, Y. Wei, A.G. MacDiarmid, P.I. Lelkes, Electrospinning polyaniline-contained gelatin nanofibers for tissue engineering applications, *Biomaterials*, 27 (2006) 2705-2715.
- [46] J. Xie, M.R. Macewan, S.M. Willerth, X. Li, D.W. Moran, S.E. Sakiyama-Elbert, Y. Xia, Conductive Core-Sheath Nanofibers and Their Potential Application in Neural Tissue Engineering, *Adv Funct Mater*, 19 (2009) 2312-2318.
- [47] J. Zeng, Z. Huang, G. Yin, J. Qin, X. Chen, J. Gu, Fabrication of conductive NGF-conjugated polypyrrole-poly(L-lactic acid) fibers and their effect on neurite outgrowth, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 110 (2013) 450-457.
- [48] J. Ribeiro, T. Pereira, A.R. Caseiro, P. Armada-da-Silva, I. Pires, J. Prada, I. Amorim, S. Amado, M. Franca, C. Goncalves, M.A. Lopes, J.D. Santos, D.M. Silva, S. Geuna, A.L. Luis, A.C. Mauricio, Evaluation of biodegradable electric conductive tube-guides and mesenchymal stem cells, *World J Stem Cells*, 7 (2015) 956-975.
- [49] M. Kabiri, M. Soleimani, I. Shabani, K. Futrega, N. Ghaemi, H.H. Ahvaz, E. Elahi, M.R. Doran, Neural differentiation of mouse embryonic stem cells on conductive nanofiber scaffolds, *Biotechnol Lett*, 34 (2012) 1357-1365.
- [50] B.L. Behan, D.G. DeWitt, D.R. Bogdanowicz, A.N. Koppes, S.S. Bale, D.M. Thompson, Single-walled carbon nanotubes alter Schwann cell behavior differentially within 2D and 3D environments, *J Biomed Mater Res A*, 96 (2011) 46-57.
- [51] S.H. Bhang, S.I. Jeong, T.J. Lee, I. Jun, Y.B. Lee, B.S. Kim, H. Shin, Electroactive electrospun polyaniline/poly[(L-lactide)-co-(epsilon-caprolactone)] fibers for control of neural cell function, *Macromol Biosci*, 12 (2012) 402-411.
- [52] B. Guo, Y. Sun, A. Finne-Wistrand, K. Mustafa, A.C. Albertsson, Electroactive porous tubular scaffolds with degradability and non-cytotoxicity for neural tissue regeneration, *Acta Biomater*, 8 (2012) 144-153.
- [53] X. Zhou, B. Liu, Y. Chen, L. Guo, G. Wei, Carbon nanofiber-based three-dimensional nanomaterials for energy and environmental applications, *Materials Advances*, 1 (2020) 2163-2181.
- [54] X. Zhou, Y. Wang, C. Gong, B. Liu, G. Wei, Production, structural design, functional control, and broad applications of carbon nanofiber-based nanomaterials: A comprehensive review, *Chemical Engineering Journal*, 402 (2020).
- [55] H. Samadian, H. Mobasheri, M. Azami, R. Faridi-Majidi, Osteoconductive and electroactive carbon nanofibers/hydroxyapatite nanocomposite tailored for bone tissue engineering: in vitro and in vivo studies, *Sci Rep*, 10 (2020) 14853.
- [56] Z. Zhao, J. Gou, A. Khan, Processing and Structure of Carbon Nanofiber Paper, *Journal of Nanomaterials*, 2009 (2009) 1-7.
- [57] J. Gopinathan, A.F. Quigley, A. Bhattacharyya, R. Padhye, R.M. Kapsa, R. Nayak, R.A. Shanks, S. Houshyar, Preparation, characterisation, and in vitro evaluation of electrically conducting poly(epsilon-caprolactone)-based nanocomposite scaffolds using PC12 cells, *J Biomed Mater Res A*, 104 (2016) 853-865.
- [58] J. Gopinathan, M.M. Pillai, V. Elakkiya, R. Selvakumar, A. Bhattacharyya, Carbon nanofillers incorporated electrically conducting poly epsilon-caprolactone nanocomposite films and their biocompatibility studies using MG-63 cell line, *Polymer Bulletin*, 73 (2015) 1037-1053.

- [59] E. Mirzaei, J. Ai, S. Ebrahimi-Barough, J. Verdi, H. Ghanbari, R. Faridi-Majidi, The Differentiation of Human Endometrial Stem Cells into Neuron-Like Cells on Electrospun PAN-Derived Carbon Nanofibers with Random and Aligned Topographies, *Mol Neurobiol*, 53 (2016) 4798-4808.
- [60] M.M. Pillai, G.S. Kumar, S. Houshyar, R. Padhye, A. Bhattacharyya, Effect of nanocomposite coating and biomolecule functionalization on silk fibroin based conducting 3D braided scaffolds for peripheral nerve tissue engineering, *Nanomedicine*, 24 (2020) 102131.
- [61] T.M. Hopkins, K.J. Little, J.J. Vennemeyer, J.L. Triozzi, M.K. Turgeon, A.M. Heilman, D. Minter, K. Marra, D.B. Hom, S.K. Pixley, Short and long gap peripheral nerve repair with magnesium metal filaments, *J Biomed Mater Res A*, 105 (2017) 3148-3158.
- [62] Y. Chen, Z. Xu, C. Smith, J. Sankar, Recent advances on the development of magnesium alloys for biodegradable implants, *Acta Biomater*, 10 (2014) 4561-4573.
- [63] S. Agarwal, J. Curtin, B. Duffy, S. Jaiswal, Biodegradable magnesium alloys for orthopaedic applications: A review on corrosion, biocompatibility and surface modifications, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 68 (2016) 948-963.
- [64] S. Takeuchi, K. Nagatani, N. Otani, H. Nawashiro, T. Sugawara, K. Wada, K. Mori, Hydrogen improves neurological function through attenuation of blood-brain barrier disruption in spontaneously hypertensive stroke-prone rats, *BMC Neurosci*, 16 (2015) 22.
- [65] X. Gu, F. Ding, Y. Yang, J. Liu, Construction of tissue engineered nerve grafts and their application in peripheral nerve regeneration, *Prog Neurobiol*, 93 (2011) 204-230.
- [66] E. Kaptanoglu, E. Beskonakli, I. Solaroglu, A. Kilinc, Y. Taskin, Magnesium sulfate treatment in experimental spinal cord injury: emphasis on vascular changes and early clinical results, *Neurosurg Rev*, 26 (2003) 283-287.
- [67] S. Jia, C. Mou, Y. Ma, R. Han, X. Li, Magnesium regulates neural stem cell proliferation in the mouse hippocampus by altering mitochondrial function, *Cell Biol Int*, 40 (2016) 465-471.
- [68] X. Yan, J. Liu, J. Huang, M. Huang, F. He, Z. Ye, W. Xiao, X. Hu, Z. Luo, Electrical stimulation induces calcium-dependent neurite outgrowth and immediate early genes expressions of dorsal root ganglion neurons, *Neurochem Res*, 39 (2014) 129-141.
- [69] J. Fei, X. Wen, X. Lin, Saijilafu, W. Wang, O. Ren, X. Chen, L. Tan, K. Yang, H. Yang, L. Yang, Biocompatibility and neurotoxicity of magnesium alloys potentially used for neural repairs, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 78 (2017) 1155-1163.
- [70] P. Sensharma, G. Madhumathi, R.D. Jayant, A.K. Jaiswal, Biomaterials and cells for neural tissue engineering: Current choices, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 77 (2017) 1302-1315.
- [71] M. Pérez-Garnes, J.A. Barcia, U. Gómez-Pinedo, M. Monleón Pradas, A. Vallés-Lluch, Materials for Central Nervous System Tissue Engineering, *Cells and Biomaterials in Regenerative Medicine* 2014.
- [72] O. Honmou, R. Onodera, M. Sasaki, S.G. Waxman, J.D. Kocsis, Mesenchymal stem cells: therapeutic outlook for stroke, *Trends Mol Med*, 18 (2012) 292-297.
- [73] C. Martinez-Ramos, S. Lainez, F. Sancho, M.A. Garcia Esparza, R. Planells-Cases, J.M. Garcia Verdugo, J.L. Gomez Ribelles, M. Salmeron Sanchez, M. Monleon Pradas,

- J.A. Barcia, J.M. Soria, Differentiation of postnatal neural stem cells into glia and functional neurons on laminin-coated polymeric substrates, *Tissue Eng Part A*, 14 (2008) 1365-1375.
- [74] B. Wiatrak, A. Kubis-Kubiak, A. Piwowar, E. Barg, PC12 Cell Line: Cell Types, Coating of Culture Vessels, Differentiation and Other Culture Conditions, *Cells*, 9 (2020).
- [75] J.D. Foley, E.W. Grunwald, P.F. Nealey, C.J. Murphy, Cooperative modulation of neuritogenesis by PC12 cells by topography and nerve growth factor, *Biomaterials*, 26 (2005) 3639-3644.
- [76] R.A. D'Sa, J. Raj, P.J. Dickinson, F. McCabe, B.J. Meenan, Human Fetal Osteoblast Response on Poly(Methyl Methacrylate)/Polystyrene Demixed Thin Film Blends: Surface Chemistry Vs Topography Effects, *ACS Appl Mater Interfaces*, 8 (2016) 14920-14931.
- [77] R.T. Tran, P. Thevenot, D. Gyawali, J.C. Chiao, L. Tang, J. Yang, Synthesis and characterization of a biodegradable elastomer featuring a dual crosslinking mechanism, *Soft Matter*, 6 (2010) 2449-2461.
- [78] E.M. Jeffries, R.A. Allen, J. Gao, M. Pesce, Y. Wang, Highly elastic and suturable electrospun poly(glycerol sebacate) fibrous scaffolds, *Acta Biomater*, 18 (2015) 30-39.
- [79] M. Uyanıklar, G. Günal, A. Tevlek, P. Hosseinian, H.M. Aydin, Hybrid Cornea: Cell Laden Hydrogel Incorporated Decellularized Matrix, *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 6 (2019) 122-133.
- [80] D. Persaud-Sharma, A. McGoron, Biodegradable Magnesium Alloys: A Review of Material Development and Applications, *J Biomim Biomater Tissue Eng*, 12 (2012) 25-39.
- [81] C. Liu, Z. Ren, Y. Xu, S. Pang, X. Zhao, Y. Zhao, Biodegradable Magnesium Alloys Developed as Bone Repair Materials: A Review, *Scanning*, 2018 (2018) 9216314.
- [82] S. Ali, B. Paul, R. Magnusson, E. Ekström, C. Pallier, B. Jonson, P. Eklund, J. Birch, Optical and mechanical properties of amorphous Mg-Si-O-N thin films deposited by reactive magnetron sputtering, *Surface and Coatings Technology*, 372 (2019) 9-15.
- [83] B. Gantenbein-Ritter, C.M. Sprecher, S. Chan, S. Illien-Junger, S. Grad, Confocal imaging protocols for live/dead staining in three-dimensional carriers, *Methods Mol Biol*, 740 (2011) 127-140.
- [84] J.M. Kempainen, S.J. Hollister, Tailoring the mechanical properties of 3D-designed poly(glycerol sebacate) scaffolds for cartilage applications, *J Biomed Mater Res A*, 94 (2010) 9-18.
- [85] J. Rowley, Sun, Z., Goldman, D. and Mooney, D. , Biomaterials to Spatially Regulate Cell Fate, *Communication*, 14 (2002) 886-889.
- [86] H.M. Aydin, K. Salimi, Z.M.O. Rzayev, E. Pişkin, Microwave-assisted rapid synthesis of poly(glycerol-sebacate) elastomers, *Biomaterials Science*, 1 (2013).
- [87] X. Li, A.T. Hong, N. Naskar, H.J. Chung, Criteria for Quick and Consistent Synthesis of Poly(glycerol sebacate) for Tailored Mechanical Properties, *Biomacromolecules*, 16 (2015) 1525-1533.
- [88] A. Gadomska-Gajadhar, M. Wrzecionek, G. Matyszczyk, P. Piętowski, M. Więclaw, P. Ruśkowski, Optimization of Poly(glycerol sebacate) Synthesis for Biomedical

Purposes with the Design of Experiments, *Organic Process Research & Development*, 22 (2018) 1793-1800.

[89] Q. Liu, M. Tian, T. Ding, R. Shi, L. Zhang, Preparation and characterization of a biodegradable polyester elastomer with thermal processing abilities, *Journal of Applied Polymer Science*, 98 (2005) 2033-2041.

[90] R. Maliger, P.J. Halley, J.J. Cooper-White, Poly(glycerol-sebacate) bioelastomers-kinetics of step-growth reactions using Fourier Transform (FT)-Raman spectroscopy, *Journal of Applied Polymer Science*, 127 (2013) 3980-3986.

[91] D. Kafouris, F. Kossivas, C. Constantinides, N.Q. Nguyen, C. Wesdemiotis, C.S. Patrickios, Biosourced Amphiphilic Degradable Elastomers of Poly(glycerol sebacate): Synthesis and Network and Oligomer Characterization, *Macromolecules*, 46 (2013) 622-630.

[92] Y. Li, W.D. Cook, C. Moorhoff, W.-C. Huang, Q.-Z. Chen, Synthesis, characterization and properties of biocompatible poly(glycerol sebacate) pre-polymer and gel, *Polymer International*, 62 (2013) 534-547.

[93] W. Cai, L. Liu, Shape-memory effect of poly (glycerol–sebacate) elastomer, *Materials Letters*, 62 (2008) 2171-2173.

[94] I.H. Jaafar, M.M. Ammar, S.S. Jedlicka, R.A. Pearson, J.P. Coulter, Spectroscopic evaluation, thermal, and thermomechanical characterization of poly(glycerol-sebacate) with variations in curing temperatures and durations, *Journal of Materials Science*, 45 (2010) 2525-2529.

[95] S. Salehi, M. Fathi, S.H. Javanmard, F. Barneh, M. Moshayedi, Fabrication and characterization of biodegradable polymeric films as a corneal stroma substitute, *Adv Biomed Res*, 4 (2015) 9.

[96] C. Schick, Differential scanning calorimetry (DSC) of semicrystalline polymers, *Anal Bioanal Chem*, 395 (2009) 1589-1611.

[97] J. He, W. Liu, Y.X. Huang, Simultaneous Determination of Glass Transition Temperatures of Several Polymers, *PLoS One*, 11 (2016) e0151454.

[98] Q. Liu, M. Tian, T. Ding, R. Shi, Y. Feng, L. Zhang, D. Chen, W. Tian, Preparation and characterization of a thermoplastic poly(glycerol sebacate) elastomer by two-step method, *Journal of Applied Polymer Science*, 103 (2007) 1412-1419.

[99] K.A. Ersoy A., *Polimerik Yalıtkanlarda Yüzey Özelliklerinin Temas Açısı ile İncelenmesi*, ELECOBursa, Turkey, 2008.

[100] Y. Jia, W. Wang, X. Zhou, W. Nie, L. Chen, C. He, Synthesis and characterization of poly(glycerol sebacate)-based elastomeric copolyesters for tissue engineering applications, *Polymer Chemistry*, 7 (2016) 2553-2564.

[101] Á. Conejero-García, H.R. Gimeno, Y.M. Sáez, G. Vilariño-Feltrer, I. Ortuño-Lizarán, A. Vallés-Lluch, Correlating synthesis parameters with physicochemical properties of poly(glycerol sebacate), *European Polymer Journal*, 87 (2017) 406-419.

[102] S.J. Lee, G. Khang, Y.M. Lee, H.B. Lee, The effect of surface wettability on induction and growth of neurites from the PC-12 cell on a polymer surface, *Journal of Colloid and Interface Science*, 259 (2003) 228-235.

[103] A. Saudi, M. Rafienia, A. Zargar Kharazi, H. Salehi, A. Zarrabi, M. Karevan, Design and fabrication of poly (glycerol sebacate)-based fibers for neural tissue

engineering: Synthesis, electrospinning, and characterization, *Polymers for Advanced Technologies*, 30 (2019) 1427-1440.

[104] A.R. Webb, Yang, J., Ameer, G. A, Biodegradable polyester elastomers in tissue engineering, *Expert Opinion on Biological Therapy*, 4 (2004) 801–812.

[105] J. Yang, A.R. Webb, G.A. Ameer, Novel Citric Acid-Based Biodegradable Elastomers for Tissue Engineering, *Advanced Materials*, 16 (2004) 511-516.

[106] L. Xue, H.P. Greisler, Biomaterials in the development and future of vascular grafts, *J Vasc Surg*, 37 (2003) 472-480.

[107] D. Singh, A.J. Harding, E. Albadawi, F.M. Boissonade, J.W. Haycock, F. Claeysens, Additive manufactured biodegradable poly(glycerol sebacate methacrylate) nerve guidance conduits, *Acta Biomater*, 78 (2018) 48-63.

[108] Q.Z. Chen, A. Bismarck, U. Hansen, S. Junaid, M.Q. Tran, S.E. Harding, N.N. Ali, A.R. Boccaccini, Characterisation of a soft elastomer poly(glycerol sebacate) designed to match the mechanical properties of myocardial tissue, *Biomaterials*, 29 (2008) 47-57.

[109] M.J. Kim, M.Y. Hwang, J. Kim, D.J. Chung, Biodegradable and elastomeric poly(glycerol sebacate) as a coating material for nitinol bare stent, *Biomed Res Int*, 2014 (2014) 956952.

[110] S. Bennour, F. Louzri, Study of Swelling Properties and Thermal Behavior of Poly(N,N-Dimethylacrylamide-co-Maleic Acid) Based Hydrogels, *Advances in Chemistry*, 2014 (2014) 1-10.

[111] I. Pomerantseva, N. Krebs, A. Hart, C.M. Neville, A.Y. Huang, C.A. Sundback, Degradation behavior of poly(glycerol sebacate), *J Biomed Mater Res A*, 91 (2009) 1038-1047.

[112] P. Kumar, A. Nagarajan, P.D. Uchil, Analysis of Cell Viability by the MTT Assay, *Cold Spring Harb Protoc*, 2018 (2018).

[113] Q.Z. Chen, H. Ishii, G.A. Thouas, A.R. Lyon, J.S. Wright, J.J. Blaker, W. Chrzanowski, A.R. Boccaccini, N.N. Ali, J.C. Knowles, S.E. Harding, An elastomeric patch derived from poly(glycerol sebacate) for delivery of embryonic stem cells to the heart, *Biomaterials*, 31 (2010) 3885-3893.

[114] C.W. Yeh, L.W. Wang, H.C. Wu, Y.K. Hsieh, J. Wang, M.H. Chen, T.W. Wang, Development of biomimetic micro-patterned device incorporated with neurotrophic gradient and supportive Schwann cells for the applications in neural tissue engineering, *Biofabrication*, 9 (2017) 015024.

[115] M. Pardo-Figueroa, N.R.W. Martin, D.J. Player, P. Roach, S.D.R. Christie, A.J. Capel, M.P. Lewis, Controlled Arrangement of Neuronal Cells on Surfaces Functionalized with Micropatterned Polymer Brushes, *ACS Omega*, 3 (2018) 12383-12391.

[116] M.J. Mahoney, R.R. Chen, J. Tan, W.M. Saltzman, The influence of microchannels on neurite growth and architecture, *Biomaterials*, 26 (2005) 771-778.

[117] R.P. Kevin D. Ausman, Oleg Lourie, and Rodney S. Ruoff, Organic Solvent Dispersions of Single-Walled Carbon Nanotubes: Toward Solutions of Pristine Nanotubes, *The Journal of Physical Chemistry B*, 104 (2000).

- [118] J.Y. Hwang, U.S. Shin, W.C. Jang, J.K. Hyun, I.B. Wall, H.W. Kim, Biofunctionalized carbon nanotubes in neural regeneration: a mini-review, *Nanoscale*, 5 (2013) 487-497.
- [119] N. Toyoda, T. Yamamoto, Dispersion of carbon nanofibers modified with polymer colloids to enhance mechanical properties of PVA nanocomposite film, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 556 (2018) 248-252.
- [120] O.V. Kharissova, B.I. Kharisov, E.G. de Casas Ortiz, Dispersion of carbon nanotubes in water and non-aqueous solvents, *RSC Advances*, 3 (2013).
- [121] E. Artukovic, Kaempgen, M., Hecht, D. S., Roth, S., & Grüner, G., Transparent and Flexible Carbon Nanotube Transistors, *Nano Letters*, 5 (2005) 757–760.
- [122] K. Yamamoto, Akita, S., & Nakayama, Y., Orientation and purification of carbon nanotubes using ac electrophoresis, *Journal of Physics D: Applied Physics*, 31 (1998) L34–L36.
- [123] Y.Y. Huang, E.M. Terentjev, Dispersion of Carbon Nanotubes: Mixing, Sonication, Stabilization, and Composite Properties, *Polymers*, 4 (2012) 275-295.
- [124] K. Yang, Z. Yi, Q. Jing, R. Yue, W. Jiang, D. Lin, Sonication-assisted dispersion of carbon nanotubes in aqueous solutions of the anionic surfactant SDBS: The role of sonication energy, *Chinese Science Bulletin*, 58 (2013) 2082-2090.
- [125] L. Vaisman, H.D. Wagner, G. Marom, The role of surfactants in dispersion of carbon nanotubes, *Adv Colloid Interface Sci*, 128-130 (2006) 37-46.
- [126] C.W. Nam, S.J. Kang, Y.K. Kang, M.K. Kwak, Cell growth inhibition and apoptosis by SDS-solubilized single-walled carbon nanotubes in normal rat kidney epithelial cells, *Arch Pharm Res*, 34 (2011) 661-669.
- [127] K. Yue, G. Trujillo-de Santiago, M.M. Alvarez, A. Tamayol, N. Annabi, A. Khademhosseini, Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels, *Biomaterials*, 73 (2015) 254-271.
- [128] J.W. Nichol, S.T. Koshy, H. Bae, C.M. Hwang, S. Yamanlar, A. Khademhosseini, Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels, *Biomaterials*, 31 (2010) 5536-5544.
- [129] S.R. Shin, Bae, H., Cha, J. M., Mun, J. Y., Chen, Y.-C., Tekin, H., Khademhosseini, A., Carbon Nanotube Reinforced Hybrid Microgels as Scaffold Materials for Cell Encapsulation, *ACS Nano*, 6 (2011) 362–372.
- [130] A. Schneller, Mueller, W. M., Roessle, R., & Horn, S. R., Surface Modification of Recycled Carbon Fibers by Use of Plasma Treatment, *Key Engineering Materials*, 742 (2017) 576–582.
- [131] S. Lim, Yoon, S.-H., Mochida, I., & Chi, J., Surface Modification of Carbon Nanofiber with High Degree of Graphitization, *The Journal of Physical Chemistry B*, 108 (2004) 1533–1536.
- [132] O. Morales-Teyssier, S. Sánchez-Valdes, L.F. Ramos-de Valle, Effect of Carbon Nanofiber Functionalization on the Dispersion and Physical and Mechanical Properties of Polystyrene Nanocomposites, *Macromolecular Materials and Engineering*, 291 (2006) 1547-1555.
- [133] V.N. Khabashesku, M.X. Pulikkathara, Chemical modification of carbon nanotubes, *Mendeleev Communications*, 16 (2006) 61-66.

- [134] H. Han, Y. Jeon, Z. Liu, T. Song, Highly Graphitic Carbon Nanofibers Web as a Cathode Material for Lithium Oxygen Batteries, *Applied Sciences*, 8 (2018).
- [135] A. Jorio, Pimenta, M. A., Filho, A. G. S., Saito, R., Dresselhaus, G., Dresselhaus, M. S. , Characterizing carbon nanotube samples with resonance Raman scattering, *New Journal of Physics*, 5 (2003) 139.
- [136] T.M.G. Mohiuddin, A. Lombardo, R.R. Nair, A. Bonetti, G. Savini, R. Jalil, N. Bonini, D.M. Basko, C. Galiotis, N. Marzari, K.S. Novoselov, A.K. Geim, A.C. Ferrari, Uniaxial strain in graphene by Raman spectroscopy: Gpeak splitting, Grüneisen parameters, and sample orientation, *Physical Review B*, 79 (2009).
- [137] A.C. Ferrari, Robertson, J., Interpretation of Raman spectra of disordered and amorphous carbon, *Physical Review B*, 61 (2000) 14095–14107.
- [138] J.M. Muñoz-Ávila, S. Sánchez-Valdes, I. Yáñez-Flores, O.S. Rodríguez-Fernandez, M.G. Neira-Velázquez, E. Hernández-Hernández, S. Flores-Gallardo, F. Avalos-Belmontes, T. Lozano-Ramírez, A. Morales-Cepeda, P.G. Lafleur, Influence of carbon nanofiber functionalization and compatibilizer on the physical properties of carbon nanofiber reinforced polypropylene nanocomposites, *Polymer Composites*, 39 (2018) 3575-3585.
- [139] Z. Said, A. Allagui, M.A. Abdelkareem, H. Alawadhi, K. Elsaid, Acid-functionalized carbon nanofibers for high stability, thermoelectrical and electrochemical properties of nanofluids, *J Colloid Interface Sci*, 520 (2018) 50-57.
- [140] B. Shirkavand Hadavand, K. Mahdavi Javid, M. Gharagozlou, Mechanical properties of multi-walled carbon nanotube/epoxy polysulfide nanocomposite, *Materials & Design*, 50 (2013) 62-67.
- [141] T.D. Nguyen Van, S. Sufian, N. Mansor, N. Yahya, Characterization of Carbon Nanofibers Treated with Thermal Nitrogen as a Catalyst Support Using Point-of-Zero Charge Analysis, *Journal of Nanomaterials*, 2014 (2014) 1-6.
- [142] S.S.J. Aravind, P. Baskar, T.T. Baby, R.K. Sabareesh, S. Das, S. Ramaprabhu, Investigation of Structural Stability, Dispersion, Viscosity, and Conductive Heat Transfer Properties of Functionalized Carbon Nanotube Based Nanofluids, *The Journal of Physical Chemistry C*, 115 (2011) 16737-16744.
- [143] M. Soleimani, M. Ghahraman Afshar, A. Sedghi, Amino-Functionalization of Multiwall Carbon Nanotubes and Its Use for Solid Phase Extraction of Mercury Ions from Fish Sample, *ISRN Nanotechnology*, 2013 (2013) 1-8.
- [144] U. Legrand, N.Y. Mendoza Gonzalez, P. Pascone, J.L. Meunier, D. Berk, Synthesis and in-situ oxygen functionalization of deposited graphene nanoflakes for nanofluid generation, *Carbon*, 102 (2016) 216-223.
- [145] K.L. Klein, A.V. Melechko, T.E. McKnight, S.T. Retterer, P.D. Rack, J.D. Fowlkes, D.C. Joy, M.L. Simpson, Surface characterization and functionalization of carbon nanofibers, *Journal of Applied Physics*, 103 (2008).
- [146] M.A. Atieh, O.Y. Bakather, B. Tawabini, B. Al-Tawbini, A.A. Bukhari, F.A. Abuilaiwi, M.B. Fettouhi, Effect of carboxylic functional group functionalized on carbon nanotubes surface on the removal of lead from water, *Bioinorg Chem Appl*, 2010 (2010) 603978.

- [147] D.D. La, J.M. Patwari, L.A. Jones, F. Antolasic, S.V. Bhosale, Fabrication of a GNP/Fe-Mg Binary Oxide Composite for Effective Removal of Arsenic from Aqueous Solution, *ACS Omega*, 2 (2017) 218-226.
- [148] S. Ge, G. Wang, Y. Shen, Q. Zhang, D. Jia, H. Wang, Q. Dong, T. Yin, Cytotoxic effects of MgO nanoparticles on human umbilical vein endothelial cells in vitro, *IET Nanobiotechnol*, 5 (2011) 36.
- [149] S. Feliu Jr, M.C. Merino, R. Arrabal, A.E. Coy, E. Matykina, XPS study of the effect of aluminium on the atmospheric corrosion of the AZ31 magnesium alloy, *Surface and Interface Analysis*, 41 (2009) 143-150.
- [150] L. Wang, T. Shinohara, B.-P. Zhang, XPS study of the surface chemistry on AZ31 and AZ91 magnesium alloys in dilute NaCl solution, *Applied Surface Science*, 256 (2010) 5807-5812.
- [151] S. Hiromoto, M. Inoue, T. Taguchi, M. Yamane, N. Ohtsu, In vitro and in vivo biocompatibility and corrosion behaviour of a bioabsorbable magnesium alloy coated with octacalcium phosphate and hydroxyapatite, *Acta Biomater*, 11 (2015) 520-530.
- [152] N.I. Zainal Abidin, B. Rolfe, H. Owen, J. Malisano, D. Martin, J. Hofstetter, P.J. Uggowitzer, A. Atrens, The in vivo and in vitro corrosion of high-purity magnesium and magnesium alloys WZ21 and AZ91, *Corrosion Science*, 75 (2013) 354-366.
- [153] I. Johnson, H. Liu, A study on factors affecting the degradation of magnesium and a magnesium-yttrium alloy for biomedical applications, *PLoS One*, 8 (2013) e65603.
- [154] W.D. Mueller, M. Lucia Nascimento, M.F. Lorenzo de Mele, Critical discussion of the results from different corrosion studies of Mg and Mg alloys for biomaterial applications, *Acta Biomater*, 6 (2010) 1749-1755.
- [155] A. Atrens, M. Liu, N.I. Zainal Abidin, Corrosion mechanism applicable to biodegradable magnesium implants, *Materials Science and Engineering: B*, 176 (2011) 1609-1636.
- [156] M.P. Staiger, A.M. Pietak, J. Huadmai, G. Dias, Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: a review, *Biomaterials*, 27 (2006) 1728-1734.
- [157] K. Chen, J. Dai, X. Zhang, Improvement of corrosion resistance of magnesium alloys for biomedical applications, *Corrosion Reviews*, 33 (2015) 101-117.
- [158] H.M. Mousa, H.P. Chan, C.S. Kim, Surface Modification of Magnesium and its Alloys Using Anodization for Orthopedic Implant Application, *Magnesium Alloys 2017*.
- [159] O. Kylian, A. Shelemin, P. Solar, P. Pleskunov, D. Nikitin, A. Kuzminova, R. Stefanikova, P. Kus, M. Cieslar, J. Hanus, A. Choukourov, H. Biederman, Magnetron Sputtering of Polymeric Targets: From Thin Films to Heterogeneous Metal/Plasma Polymer Nanoparticles, *Materials (Basel)*, 12 (2019).
- [160] P. Kelly, & Arnell, R. . , Magnetron sputtering: a review of recent developments and applications, *Vacuum*, 56 (2000) 159-172.
- [161] G. Song, Control of biodegradation of biocompatible magnesium alloys, *Corrosion Science*, 49 (2007) 1696-1701.
- [162] T. Yan, L. Tan, D. Xiong, X. Liu, B. Zhang, K. Yang, Fluoride treatment and in vitro corrosion behavior of an AZ31B magnesium alloy, *Materials Science and Engineering: C*, 30 (2010) 740-748.

- [163] C. Blawert, W. Dietzel, E. Ghali, G. Song, Anodizing Treatments for Magnesium Alloys and Their Effect on Corrosion Resistance in Various Environments, *Advanced Engineering Materials*, 8 (2006) 511-533.
- [164] J. Yang, F. Cui, I.S. Lee, Surface modifications of magnesium alloys for biomedical applications, *Ann Biomed Eng*, 39 (2011) 1857-1871.
- [165] A. Baptista, F. Silva, J. Porteiro, J. Míguez, G. Pinto, Sputtering Physical Vapour Deposition (PVD) Coatings: A Critical Review on Process Improvement and Market Trend Demands, *Coatings*, 8 (2018).
- [166] J.N. Demopoulos, Corrosion Resistance of Silane Coatings on Aluminum and Magnesium Alloys., *Materials Science*, (2017).
- [167] M.S. Killian, S. Seiler, V. Wagener, R. Hahn, C. Ebensperger, B. Meyer, P. Schmuki, Interface chemistry and molecular bonding of functional ethoxysilane-based self-assembled monolayers on magnesium surfaces, *ACS Appl Mater Interfaces*, 7 (2015) 9006-9014.
- [168] J. Song, W.J. Van Ooij, Bonding and corrosion protection mechanisms of γ -APS and BTSE silane films on aluminum substrates, *Journal of Adhesion Science and Technology*, 17 (2003) 2191-2221.
- [169] M. Echeverry-Rendon, V. Duque, D. Quintero, S.M. Robledo, M.C. Harmsen, F. Echeverria, Improved corrosion resistance of commercially pure magnesium after its modification by plasma electrolytic oxidation with organic additives, *J Biomater Appl*, 33 (2018) 725-740.
- [170] T.S.N. Sankara Narayanan, I.S. Park, M.H. Lee, Strategies to improve the corrosion resistance of microarc oxidation (MAO) coated magnesium alloys for degradable implants: Prospects and challenges, *Progress in Materials Science*, 60 (2014) 1-71.
- [171] A. Gokhan Demir, V. Furlan, N. Lecis, B. Previtali, Laser surface structuring of AZ31 Mg alloy for controlled wettability, *Biointerphases*, 9 (2014) 029009.
- [172] B.J. O'Brien, W.M. Carroll, A.J. Conneely, G.M. O'Connor, Combined anodizing and picosecond laser treatment to control the corrosion rate of biodegradable magnesium alloy AZ31, *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part L: Journal of Materials: Design and Applications*, 228 (2013) 278-287.
- [173] G.H. Borschel, K.F. Kia, W.M. Kuzon, R.G. Dennis, Mechanical properties of acellular peripheral nerve, *Journal of Surgical Research*, 114 (2003) 133-139.
- [174] M.-S. Ju, C.-C.K. Lin, C.-T. Chang, Researches on biomechanical properties and models of peripheral nerves - a review, *Journal of Biomechanical Science and Engineering*, 12 (2017) 16-00678-00616-00678.
- [175] M.K. Kwan, E.J. Wall, J. Massie, S.R. Garfin, Strain, stress and stretch of peripheral nerve. Rabbit experiments in vitro and in vivo, *Acta Orthop Scand*, 63 (1992) 267-272.
- [176] J. Kerns, H. Piponov, C. Helder, F. Amirouche, G. Solitro, M. Gonzalez, Mechanical Properties of the Human Tibial and Peroneal Nerves Following Stretch With Histological Correlations, *Anat Rec (Hoboken)*, 302 (2019) 2030-2039.
- [177] S. Vijayavenkataraman, S. Kannan, T. Cao, J.Y.H. Fuh, G. Sriram, W.F. Lu, 3D-Printed PCL/PPy Conductive Scaffolds as Three-Dimensional Porous Nerve Guide Conduits (NGCs) for Peripheral Nerve Injury Repair, *Front Bioeng Biotechnol*, 7 (2019) 266.

- [178] L. Guadagno, Raimondo, M., Vittoria, V., Vertuccio, L., Lafdi, K., De Vivo, B., Tucci, V., The role of carbon nanofiber defects on the electrical and mechanical properties of CNF-based resins, *Nanotechnology*, 24 (2013).
- [179] L.-H. Sun, Z. Ounaies, X.-L. Gao, C.A. Whalen, Z.-G. Yang, Preparation, Characterization, and Modeling of Carbon Nanofiber/Epoxy Nanocomposites, *Journal of Nanomaterials*, 2011 (2011) 1-8.
- [180] S. Behkami, J. Frounchi, F. Ghaderi Pakdel, T. Stieglitz, Simulation of effects of the electrode structure and material in the density measuring system of the peripheral nerve based on micro-electrical impedance tomography, *Biomed Tech (Berl)*, 63 (2018) 151-161.
- [181] A. Orłowska, P.T. Perera, M. Al Kobaisi, A. Dias, H.K.D. Nguyen, S. Ghanaati, V. Baulin, R.J. Crawford, E.P. Ivanova, The Effect of Coatings and Nerve Growth Factor on Attachment and Differentiation of Pheochromocytoma Cells, *Materials (Basel)*, 11 (2017).
- [182] N.D. Chaurasiya, S. Shukla, B.L. Tekwani, A Combined In Vitro Assay for Evaluation of Neurotrophic Activity and Cytotoxicity, *SLAS Discov*, 22 (2017) 667-675.
- [183] N. Nazeri, R. Karimi, H. Ghanbari, The effect of surface modification of poly-lactide-co-glycolide/carbon nanotube nanofibrous scaffolds by laminin protein on nerve tissue engineering, *J Biomed Mater Res A*, 109 (2021) 159-169.
- [184] G.Y. Wiederschain, *The Molecular Probes handbook. A guide to fluorescent probes and labeling technologies*, *Biochemistry (Moscow)*, 76 (2011) 1276-1276.
- [185] A.B. Lyons, Divided we stand: Tracking cell proliferation with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, *Immunology and Cell Biology*, 77 (1990) 509–515.
- [186] W. Zhou, H.C. Kang, M. O'Grady, K.M. Chambers, B. Dubbels, P. Melquist, K.R. Gee, CellTrace™ Far Red & CellTracker™ Deep Red—long term live cell tracking for flow cytometry and fluorescence microscopy, *Journal of Biological Methods*, 3 (2016).
- [187] K. Toda, Small, J. A., Goda, S., & Quarles, R. H. , Biochemical and Cellular Properties of Three Immortalized Schwann Cell Lines Expressing Different Levels of the Myelin-Associated Glycoprotein, *Journal of Neurochemistry*, 63 (2002) 1646–1657.
- [188] N. Sasagasaki, Toda, K., Hollis, M., & Quarles, R. H., Myelin Gene Expression in Immortalized Schwann Cells: Relationship to Cell Density and Proliferation, *Journal of Neurochemistry*, 66 (2002) 1432–1439.
- [189] J.R. Chan, Cosgaya, J. M., Wu, Y. J., & Shooter, E. M., Neurotrophins are key mediators of the myelination program in the peripheral nervous system, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98 (2001) 14661–14668.
- [190] B. Sun, T. Wu, J. Wang, D. Li, J. Wang, Q. Gao, M.A. Bhutto, H. El-Hamshary, S.S. Al-Deyab, X. Mo, Polypyrrole-coated poly(l-lactic acid-co-epsilon-caprolactone)/silk fibroin nanofibrous membranes promoting neural cell proliferation and differentiation with electrical stimulation, *J Mater Chem B*, 4 (2016) 6670-6679.
- [191] J. Wang, L. Tian, B. Luo, S. Ramakrishna, D. Kai, X.J. Loh, I.H. Yang, G.R. Deen, X. Mo, Engineering PCL/lignin nanofibers as an antioxidant scaffold for the growth of neuron and Schwann cell, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 169 (2018) 356-365.

[192] H. Xia, X. Sun, D. Liu, Y. Zhou, D. Zhong, Oriented growth of rat Schwann cells on aligned electrospun poly(methyl methacrylate) nanofibers, *J Neurol Sci*, 369 (2016) 88-95.