

**ALTIN NANOPARTİKÜLLER İLE DEKORE EDİLMİŞ
NANOFİBERLERDE UYARICI FAKTÖRLERİN NÖRİT
UZAMASI ÜZERİNE ETKİSİ**

**EFFECT OF STIMULATING FACTORS ON NEURITE
OUTGROWTH ON GOLD NANOPARTICLES DECORATED
NANOFIBERS**

ÜLKÜ SELCEN DEMİR

PROF. DR. KEZBAN ULUBAYRAM
Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
BİYOMÜHENDİSLİK Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2015

ÜLKÜ SELCEN DEMİR'in hazırladığı "**Altın Nanopartiküller İle Dekore Edilmiş Nanofiberlerde Uyarıcı Faktörlerin Nörit Uzaması Üzerine Etkisi**" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI**' nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nesrin HASIRCI
Başkan



Prof. Dr. Kezban ULUBAYRAM
Danışman



Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Üye



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

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Sevgili annem, babam ve ablama

ETİK

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

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

beyan ederim.

03/07/2015

ÜLKÜ SELCEN DEMİR

ÖZET

ALTIN NANOPARTİKÜLLER İLE DEKORE EDİLMİŞ NANOFİBERLERLERDE UYARICI FAKTÖRLERİN NÖRİT UZAMASI ÜZERİNE ETKİSİ

Ülkü Selcen DEMİR

Yüksek Lisans, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Kezban ULUBAYRAM

Temmuz 2015, 74 sayfa

Nöronal hücrelerin aksonal uzaması sinir doku mühendisliğinin en önemli konusudur. Bu anlamda yönlendirilmiş nanofiberler, hücrelere kılavuzluk etmeleri sayesinde, nörit gelişiminin yönlendirilmesinde önemli rol üstlenirler. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, nörit uzamasını uyarıcı çeşitli faktörlerin etkisi üzerine odaklanılmıştır.

Bu çalışmanın ana hedefi yönlendirilmiş poliüretan nanofiberlerin altın nanopartiküller ile modifiye edilmesi ve bu yapılar üzerinde kültür edilen hücrelerde (PC12 ve B35) nörit uzamasına nanotopografyanın, biyolojik (Sinir Büyüme Faktörü, NGF) ve elektriksel uyarımların sinerjik etkisinin incelenmesidir. Bu amaç doğrultusunda ortalama 519 nm çapında, düzgün ve homojen morfolojiye sahip yönlendirilmiş poliüretan nanofiberler üretilmiştir. Daha sonra “çekirdek-büyütme” yöntemi ile ortalama çapı yaklaşık 50 nm olan altın nanopartiküller sentezlenmiş ve elektrostatik etkileşimlerle nanofiber yüzeylere dekore edilmiştir. İskelelerinin üretimini takiben, PC12 hücreleri sadece NGF veya NGF ile elektriksel uyarımın beraber uygulandığı koşullarda iskeleler üzerinde kültüre edilmiştir. Elektriksel uyarım için kare formunda, 100 mV büyüklüğe ve 10 ms dalga genişliğine sahip gerilim günde 1 saat olmak üzere 4 gün boyunca uygulanmıştır.

Altın nanopartiküller ile modifiye edilmiş düzenli nanofiberlerin hücrelerin tutunmasını artırdığı ve nörit uzamasının fiber yönünde olduğu bulunmuştur. İmmünohistokimya sonuçları NGF stimülasyonunun aksonal uzamaları yaklaşık 190 µm’ye kadar artırdığını

göstermiştir. En iyi aksonal uzamanın, NGF ve elektriksel uyarımların beraber uygulandığı koşullarda elde edildiği ve bu uzamanın yaklaşık 268 μm olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, altın nanopartikül kaplı yönlendirilmiş fiber yüzeylerin sağladığı avantajla birlikte NGF ve elektrik stimülasyonunun sinerjik etkisi nörit geliştirmiştir.

Anahtar Kelimeler: sinir doku mühendisliği, poliüretan fiber, yönlendirilmiş, altın nanopartikül, NGF, elektriksel stimülasyon

ABSTRACT

EFFECT OF STIMULATING FACTORS ON NEURITE OUTGROWTH ON GOLD NANOPARTICLES DECORATED NANOFIBERS

Ülkü Selcen DEMİR

Master of Science, Department of Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. Kezban ULUBAYRAM

July 2015, 74 pages

Axonal elongation of neuronal cells is the most important subject considered in nerve tissue engineering. In this regard, cell guiding aligned nanofibers play an important role in directing of neurite outgrowth. In recent years, studies have been focused on different stimulating factors to promote neurite outgrowth.

The main objective of this study is to fabricate aligned polyurethane nanofibers decorated with gold nanoparticles and investigate the synergistic effect of nanotopography, biological (Nerve Growth Factor, NGF) and electrical stimulation on neurite outgrowth of cultured cells (PC12 and B35). For this purpose, aligned polyurethane nanofibers with average diameter of 519 nm were fabricated with smooth and uniform morphology. Then gold nanoparticles with the average diameter of ~50 nm were synthesized by “seeding-growth” method and decorated on nanofibers by electrostatic interactions. Following scaffold production, PC12 cells were cultured scaffolds on which either NGF alone or combined with electrical stimulation were exposed. For electrical stimulation, square waveform with voltage of 100 mV and wave width of 10 ms was applied to cells for 1h per day for 4 days. It was found that the decorated scaffolds with gold nanoparticles increased cells adhesion and neurites orientation along the direction of nanofibers. Results of immunocytochemical tests demonstrated that NGF increased axonal elongation up to 190 μm . The best results were achieved with combined NGF and electrical stimulation, so that axonal elongation was increased to 268 μm .

As a conclusion, NGF and electrical stimulation together with taking the advantage of gold nanoparticle decorated aligned nanofibers enhanced neurite outgrowth.

Keywords: nerve tissue engineering, polyurethane fiber, aligned, gold nanoparticles, NGF, electrical stimulation

TEŞEKKÜR

Lisans eğitimim sırasında tanıdığım, staj danışmanım olan ve mezun olduktan sonra hiçbir alternatif düşünmeden hevesle, danışmanlığında başlamış olduğum yüksek lisans eğitimim boyunca bana tecrübeleri ile yol gösteren, bu süreç boyunca bilimsel anlamda katkılarının yanında manevi desteği ve güler yüzü ile her an bana destek olan saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Kezban ULUBAYRAM'a,

Tez çalışmam boyunca özverili yardımları, önerileri ve rehberliği ile tezime katkı sağlayan, bıkmadan problemlerime çözüm arayan, çalışma arkadaşım ve değerli dostum Semih ÇALAMAK'a, çalışmamın başından itibaren deneysel katkılarını ve dostluğunu benden esirgemeyen Reza SHAHBAZI'ye, çalışma arkadaşı olduğumuz ilk günden itibaren çok kıymetli yardımları sayesinde tez çalışmalarımın bitmesinde unutulmayacak destekleri ve dostluğu için Şükrü ÖZTÜRK'e, çalışmalarım esnasında kıymetli yardımlarının yanında, ailemden biri gibi sevgisini ve anlayışını benden eksik etmeyen kıymetli dostum Merve GÜLTEKİNOĞLU'na, önerileri ve güler yüzü ile her zaman pozitif hissetmemi sağlayan Gülce TAŞKOR'a, immünohistokimyasal analizlerim için kıymetli vaktini ve yardımlarını benden esirgemeyen saygıdeğer hocam Doç. Dr. Dilara ZEYBEK'e, değerli katkıları ve rehberliğinden dolayı saygıdeğer hocam Doç. Dr. Eda Ayşe AKSOY'a, destekleri için saygıdeğer hocam Prof. Dr. Nezire SAYGILI'ya, dostluklarıyla hayatıma anlam katan, tez dönemimi hayatımın diğer anlarında olduğu gibi güzel anılarla şenlendiren Esmâ TOLAN, Damla HÜCCETOĞULLARI ve Sibel ÖZTÜRK'e, yüksek lisansımın bana kazandırdığı çok değerli dostum olan Hacer AKSEL'e, çalışmalarım esnasında sıkıntılarımı sıkılmadan dinleyen, desteğini, güler yüzü ve anlayışını asla benden eksik etmeyen sevgili Gizem SONUGÜR'e,

Hayata gerçekten çok şanslı başladığımı sonuna kadar hissettiren, beni hayatımın hiçbir anında yalnız bırakmayan, gösterdikleri sonsuz sevgi için, hayattaki en kıymetli varlıklarım olan annem, babam ve ablama,

Teşekkürü borç bilirim...

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Merkezi Sinir Sistemi	5
2.2. Periferik Sinir Sistemi.....	6
2.3. Sinir Hücrelerinin Elektriksel Özellikleri	6
2.4. Doku Mühendisliği.....	7
2.5. Sinir Doku Mühendisliği.....	8
2.5.1. Periferik Sinir Sistemi Doku Mühendisliği	8
2.5.2. Merkezi Sinir Sistemi Doku Mühendisliği.....	12
2.5.3. Elektriksel Stimülasyon Metodları ve Etkileri	13
2.6. İletken Doku İskeleleri.....	13
2.6.1. İletken Polimerler.....	13
2.6.1.1. İletken Polimerlerin İletkenlik Mekanizması.....	15
2.6.1.2. İletken Polimerlerin Yüzey Modifikasyonu.....	15
2.6.1.3. İletken Polimerlerin Elektriksel Özellik Modifikasyonu.....	16
2.6.1.4. İletken Polimerlerin Sinir Doku Mühendisliğinde Uygulamaları	16
2.6.2. Altın Nanopartiküller	18
2.7. Fibroin.....	19
2.8. Poliüretan	20
2.9. Polietilenimin ve Poli-L-Lizin	21
2.10. Doku İskelesi Üretim Yöntemlerinden Elektroğirme Tekniği	22
3. MATERYAL VE YÖNTEM	24
3.1. Materyal	24
3.2. Yöntem.....	25
3.2.1. Altın Nanopartiküllerin Sentezi ve Karakterizasyonu	25
3.2.1.1. Turkevich Metodu ile Çekirdek Oluşturma	25
3.2.1.2. Perrault Metodu ile Altın Nanopartikül Eldesi	25
3.2.2. Doku İskelelerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu.....	26
3.2.2.1. İpek Fibroin Nanofiberlerin Üretimi	26
3.2.2.2. Yönlendirilmiş Poliüretan Nanofiberlerin Üretimi.....	27

3.2.2.3. Altın Nanopartiküllerin Nanofiber Yüzeylerine İmmobilizasyonu.....	27
3.2.2.4. Nanofiberlerin Karakterizasyonu	28
3.2.3. Hücre Kültürü Deneyleri	29
3.2.4. Sinir Büyüme Faktörü ve Elektriksel Uyarımın Aksonal Uzamaya Etkisi	30
3.2.4.1. Sinir Büyüme Faktörü (NGF) Konsantrasyonunun Etkisi.....	30
3.2.4.2. Doku İskelelerinde NGF Uyarımının Etkisi	30
3.2.4.3. Doku İskelelerinde NGF ve Elektriksel Uyarımın Sinerjik Etkisi	30
3.2.5. Hücre Farklılaşmasının Karakterizasyonu	31
3.2.5.1. Hücre Davranışlarının SEM ile İncelenmesi.....	31
3.2.5.2. Hücrelerde Aksonal Uzamanın İmmüno Floresan İncelenmesi.....	32
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	33
4.1. Altın Nanopartiküllerin Sentezi	33
4.2. Elektroeğirilmiş Doku İskeleleri	35
4.2.1. Doku İskelelerinin Özellikleri	43
4.3. Doku İskelesi -Hücre Etkileşimleri	46
4.4. Sinir Büyüme Faktörü (NGF) ve Elektriksel Uyarımın Aksonal Uzamaya Etkisi ...	54
4.4.1. NGF Konsantrasyonunun Aksonal Gelişime Etkisi	54
4.4.2. Doku İskelelerinde NGF'nin Aksonal Gelişime Etkisi.....	58
4.4.3. Doku İskelelerinde NGF ve Elektriksel Uyarımın Aksonal Gelişime Etkisi	64
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	66
KAYNAKLAR.....	68

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. FDA onaylı sinir kondüitleri.....	10
Çizelge 2.2. Yaygın kullanılan iletken polimerler ve iletkenlikleri	14
Çizelge 3.1. Fibroin nanofiberlerin oluşumunda kullanılan elektroğirme parametreleri...27	27
Çizelge3.2.Poliüretan nanofiberlerin oluşumunda kullanılan elektroğirme parametreleri.27	27
Çizelge 4.1. Altın nanopartiküllerin özellikleri.....	33
Çizelge 4.2. Farklı NGF konsantrasyonlarında B35 hücrelerinin nörit uzunlukları	54
Çizelge 4.3. Farklı NGF konsantrasyonlarında PC12 hücrelerinin nörit uzunlukları	55
Çizelge 4.4. Doku iskelelerinde NGF uyarımı sonrası B35 hücrelerinin nörit uzunlukları.58	58

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2. 1. Merkezi sinir sistemindeki hücreler ve birbirleriyle iletişimlerinin gösterimi5	5
Şekil 2. 2. Sinir hücresinin elektriksel stimülasyon sırasındaki aşamaları.7	7
Şekil 2. 3. Sinir kılavuz kanalıyla rejenerasyon modeli.....10	10
Şekil 2. 4. Sinir kılavuzunun şematik gösterimi.....10	10
Şekil 2. 5. Sinir boşluğunda kondüit boyunca rejenerasyon komponentleri.....11	11
Şekil 2. 6. Ürethan grubu20	20
Şekil 2.7. Elektroegirme prosesinin şematik gösterimi.....23	23
Şekil 3.1. Altın nanopartiküllerin yüzeylere immobilizasyonunun şematik gösterimi.28	28
Şekil 3.2. Biyoreaktör sisteminin şematik gösterimi31	31
Şekil 3.3. Biyoreaktör sistemine ait görüntüler31	31
Şekil 4.1. Turkevich metodu ile üretilen AuNP'lerin boyut dağılımı grafiği.....33	33
Şekil 4.2. Perrault metodunda ile üretilen AuNP'lerin boyut dağılımı grafiği34	34
Şekil 4.3. Çekirdek altın nanopartiküllerin TEM görüntüleri34	34
Şekil 4.4. Çekirdek-büyütme metoduyla elde edilen AuNPs'lerin TEM görüntüleri35	35
Şekil 4.5. Altın nanopartiküllerin ESEM görüntüleri35	35
Şekil 4.6. İpek fibroin nanofiberlerin SEM görüntüleri.....37	37
Şekil 4.7. AuNPs/Fibroin nanofiberlerin SEM görüntüleri.....38	38
Şekil 4.8. Yönlendirilmiş PU nanofiberlerin SEM görüntüleri.....39	39
Şekil 4.9. PEI aracılığı ile AuNPs immobilize edilmiş PU fiberlerin SEM görüntüleri....41	41
Şekil 4.10. PLL ve PEI'nin kimyasal yapıları.42	42
Şekil 4.11. PLL aracılığı ile AuNPs immobilize edilmiş PU fiberlerin SEM görüntüleri...43	43
Şekil 4.12. Poliüretan nanofiberlerin ATR-FTIR Spektrumu44	44
Şekil4.13.Poliüretan nanofiber örneklerinin yüzey temas açısı değerleri ve görüntüleri...44	44
Şekil 4.14. PU ve AuNPs nanofiberlerin hücre canlılığına etkisi45	45
Şekil 4.15. PC12 ve B35 hücrelerinin 4.gün ışık mikroskobu görüntüleri47	47
Şekil 4.16. İpek fibroin nanofiberler üzerinde PC12 hücrelerinin SEM görüntüleri.....49	49
Şekil 4.17. AuNPs/fibroin nanofiberler üzerinde PC12'lerin SEM görüntüleri50	50
Şekil 4.18. PU nanofiberler üzerinde PC12 hücrelerinin SEM görüntüleri.....51	51
Şekil 4.19. AuNPs/PU nanofiberler üzerinde PC12 hücrelerinin SEM görüntüleri.....52	52
Şekil 4.20. Poliüretan nanofiberler üzerinde PC12 hücrelerinin mikroskop görüntüleri53	53
Şekil 4.21. Poliüretan nanofiberler üzerinde B35 hücrelerinin mikroskop görüntüleri.....53	53
Şekil 4.22. NGF ile uyarılan PC12 hücrelerinin immüno Floresan görüntüleri56	56

Şekil 4.23. NGF ile uyarılan B35 hücrelerinin immünofloresan görüntüleri	57
Şekil 4.24. PU doku iskelelerinde B35 hücrelerinin immunofloresan görüntüleri	59
Şekil 4.25. AuNPs/PU doku iskelelerinde B35 hücrelerinin immünofloresan görüntüleri...	60
Şekil 4.26. PU ve AuNPs/PU doku iskelelerinde PC12'lerin görüntüleri	62
Şekil 4.27. AuNPs/PU doku iskelelerinde NGF ile uyarılan PC12'lerin görüntüleri	63
Şekil 4.28. AuNPs/PU doku iskelelerinde elektrik ile uyarılan PC12'lerin görüntüleri	65

SİMGELER VE KISALTMALAR

AP	Anilin pentameri
ATP	Adenozin trifosfat
ATR	Zayıflatılmış toplam yansıma
ATTC	Amerikan tipi kültür koleksiyonu
AuNP	Altın nanopartikül
B35	Nöroblastoma hücre hattı
BDNF	Beyin türevli nörotrofik faktör
BF ₄	Tetra floro borat
BS	Benzen sülfonat
BSA	Sığır serum albümini
DBSA	Dodesilbensensülfonik asit
DMEM	Dulbecco'nun minimum esansiyel ortamı
DMSO	Dimetilsülfoksit
ECM	Ekstraselüler matriks
ESEM	Çevresel taramalı elektron mikroskobu
FBS	Fetal sığır serumu
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FeCl ₃	Demir(III) klorür
FTIR	Fourier transform kızılötesi spektroskopisi
HMDS	Hekzametildisilazan
Hz	Hertz
H9c2	Kardiyak miyoblast
L929	Fare fibroblast hücre hattı
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromit
Na ⁺ /K ⁺	Sodyum/Potasyum
NGF	Sinir büyüme faktörü
NOGO-A	Nörit uzama inhibitörü
NT-3	Nörotrofin-3
PA	Poliasetilen
PANI	Polianilin
PBS	Fosfat tamponu
PC12	Sıçan feokromositoma hücre hattı

PCL	Poli-ε-kaprolakton
PCLF	Polikaprolakton Fumarat
PDI	Polidispersite İndeksi
PEDOT	Poli(3,4-Etilendioksitiyofen)
PEI	Polietilenimin
PEO	Polietilen oksit
PGA	Poliglikolik asit
PGA-c	Poliglikolik asit-kollajen
PITN	Poliizotiyonaftalin
PLA	Polilaktik asit
PLCL	Poli(laktid-ko-kaprolakton)
PLGA	Poli-laktik-ko-glikolik asit
PLL	Poli-L-lizin
PLLA	Poli-L-laktik asit
PPP	Poliparafenilin
PPS	Poliparafenilin sülfid
PPv	Poliparavinilen
PPy	Polipirol
PSS	Poli(Strensülfonat)
PT	Politiyofen
PTFE	Politetrafloroetilen
pTS	Para-toluensülfonat
PU	Poliüretan
PVA	Polivinil alkol
RGD	Arjinin-glisin-aspartik asit
SEM	Taramalı elektron mikroskopu
SIBS	Poli(stiren-β-izobütillen-β-stiren)
SIRT2	Sirtuin-2
SIS	Porsin intestinal submukozası
TEM	Geçirimli elektron mikroskopu

1. GİRİŞ

Sinir sistemi, merkezi sinir sistemi ve merkezi sinir sistemine bağılı otonom, kranial ve spinal sinirlerden oluşan periferik sinir sistemi olmak üzere iki kısımdır. Hücre gövdesi, dendrit ve aksonlar olarak adlandırılan çıkıntılardan meydana gelen nöronlar, sinir sisteminin fonksiyonel birimini oluştururlar. Dendritler, periferden ya da diğer nöronlardan sinyalleri hücre gövdesine ulaştıran kısımlar olup; hücre gövdesine gelen uyarımların aktarılmasında görevli kısımlar ise aksonlardır. Elektriksel uyarımların iletimi, sinyallerin farklı nöronların aksonlarından aksonlarına, dendritlerinden dendritlerine veya aksonlarından hücre gövdelerine sinaps olarak adlandırılan kavşak bölgelerinden geçişi ile mümkündür.

Sinir yollarının iskemik nedenlerle veya mekanik, termal, kimyasal faktörlerce hasarı, sinir uyarım mekanizmasında aksamaya yol açarak sinir gövdeleri ve hedef sinirler arasında iletişimin kesilmesine ve sinir sistemi fonksiyonlarının bozulmasına yol açar [1]. Sinir yollarındaki bu iletişimsel bozukluk, sinir sisteminin hasar sonrası rejenerasyon kabiliyetinin oldukça kısıtlı olmasına bağılı olarak, hastaların duyu veya motor fonksiyonu kaybı yaşamalarına sebep olur.

Aksonal fonksiyon bozukluğu sonucu oluşan filamentöz agregatların varlığı ile ilişkili olan Alzheimer ve Parkinson gibi nöronal dejenerasyon hastalıklarına yönelik klasik tedavi yaklaşımları, hastaların durumunun aynı kalması veya hastalığın hızlı ilerlemesinin önlenmesi üzerinedir. Bu amaçla bilim insanları farmakolojik yaklaşımların yanında sinir gelişiminin sağlanmasına yardımcı olan yönlenme ve farklılaşmayı teşvik edici hücresele tedavilere odaklanmışlardır. Diğer taraftan beyine alınan travmalar veya spinal kord yaralanmaları sonucunda hasar bölgesinden salınan sinyal molekülleri yayılarak rejenerasyonu engelleyici gliyal skar doku oluşumuna sebep olur. Hasarın etkilerinin azaltılmasına yönelik konvansiyonel uygulamalar, inflamasyonu azaltarak hücre kaybını engelleyen nöroprotektif tedavilerdir. Son yıllarda, aksonal rejenerasyonu teşvik edici ve aksonunun hedef bölgeye yeniden innervasyonunu sağlayan, nöronal sistemin bütünlüğünü destekleyici doku mühendisliği çalışmaları dikkat çekicidir.

Periferik sinir sistemi hasarlarının en şiddetlisi olan sinir fiberinin tamamen transeksiyonu sonrası hasar bölgesinde artan proteaz aktivitesi, distal uçta bozunmaya neden olur. Hasarlı sinirin ranvier düğümlerinin miyelinsiz kısmından yeniden aksonal tomurcuklanma başlar. Periferik sinir sisteminde sinir rejenerasyonu aksonal tomurcuklanma ile tetiklenebilirken;

merkezi sinir sisteminin kendiliğinden rejenerasyonu mümkün değildir. Periferik sinir yaralanmalarında, sinir transeksiyon hasarının boyutu küçük olduğunda cerrahi olarak doğrudan uç uca ekleme ile yaygınlıkla yeniden bağlantının kurulması sağlanabilmektedir. Defekt boyutu 1 cm'den büyük olduğunda, aksonal rejenerasyon hızının gecikmesi sebebiyle sinir kılavuz kanallarının kullanılması gerekmektedir. Hasar bölgesinin köprülenmesinde, altın standart olarak bilinen otolog sinir greftleri kullanılmaktadır. Ancak otolog greft kullanımının donör greftlerin kısıtlılığı, donör bölgede potansiyel fonksiyon kaybı ve çoklu cerrahi uygulamaya ihtiyaç duyulması gibi dezavantajları vardır. Otolog sinir greftlerinin yerine allogreftlerin ve zenogreftlerin kullanımları ise immünolojik yanıt oluşturmaları ve hastalık transferi ihtimalleri nedeniyle engel oluşturmaktadır.

Geleneksel sinir greftlerinin dezavantajlarının aşılması ve nöronal onarımı teşvik etmek için doku mühendisliği ürünü doku iskeleleri yaklaşımı öne çıkmaktadır. Doku iskeleleri sinir yönlendirilmesinde aksonal kılavuz görevi görmesi için hasar bölgesine yerleştirilir [2]. Böylece sinir, proksimal segmentte aksonun ucundan tomurcuklanarak yeni akson filizleri oluşturur. Sinir hattı boyunca sinyal iletimi, yerleştirilen tünel sayesinde gerçekleştirilir. Doku iskelelerinin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin kontrol edilebilirliği, biyouyumlu olmaları, immun yanıt oluşturmamaları nedeniyle önemi gittikçe artmaktadır. Aynı zamanda morfolojilerinin kontrol edilebilir olması ve sinir rejenerasyonu için uygun topografyada üretilmeleri bu alanda geleneksel greftlere göre avantaj sağlamaktadır.

Sinir doku mühendisliği uygulamalarında kullanılan doku iskeleleri farklı üretim teknikleri ile birçok formda hazırlanmaktadır. Poli-L-laktik asit (PLLA), poli-ε-kaprolakton (PCL), poliglikolik asit (PGA), ipek fibroin ve poliüretan, sinir doku rejenerasyonu için sinir kılavuzları olarak sıklıkla kullanılan polimerlerdendir [3]. Sinir kılavuzlarının topografyası, hücre davranışları, tutunmaları ve aksonal rejenerasyonu etkilemektedir. Elektroçirilmiş fiberler ekstraselüler matriks mimarisini mimik etmesi ve özellikle yönlendirilmiş nanofiber yapıların aksonal yönlendirmeyi ve uzamayı teşvik etmesi nedeniyle son yıllarda potansiyel doku iskeleleri olarak bilinmektedir.

Diğer taraftan elektriksel stimülasyonun hücreler üzerinde aksonal uzamayı artırıcı etkisinin ortaya çıkması nedeniyle iletken malzemeler doku iskelesi malzemesi olarak dikkat çekmektedir [4]. Sinirsel rejenerasyonun sağlanmasında araştırmacıların odağı haline gelen iletken biyomalzemelerin sinir hücrelerinin arasındaki elektriksel iletişimde etkisi, uygulamanın başarı şansını artırmada heyecan verici bir potansiyele sahiptir. Ancak doku iskelelerinde yüzeylerin iletkenliğinin artırılması için kullanılan iletken polimerler,

biyobozunur olmamaları, fiber üretimindeki zorluklar gibi nedenlerle diğer polimerler ile kompozit halinde kullanılabilir. Bazı durumlarda kompozit malzemelerin iletkenliğinin tehlikeye girmesi gibi dezavantajları da bulunmaktadır [5-7]. Diğer taraftan nano ölçekli altın yapılar elektriksel nitelikleri sebebiyle hücreler arasındaki elektriksel iletişimin geliştirilmesinde kullanılmaktadır [8]. Altın nanopartiküllerin iletken özelliklerinin, doğal doku mikroçevresinin fibröz yapısını taklit ederek hücrelerin organizasyonunu indükleyen nanofiber morfolojisi ile birleştirilmesi bu tez çalışmasının çıkış noktasını oluşturmuştur.

Bu tez çalışmasının amacı altın nanopartikül kaplı yönlendirilmiş poliüretan nanofiberlerin doku iskelesi olarak hazırlanması ve nanotopografyanın hücre tutunması ve aksonal gelişime etkisinin biyolojik ve elektriksel uyarımlar eşliğinde araştırılmasıdır. Bu amaçla elektroçirime yöntemi ile ipek fibroin ve poliüretan kullanılarak nanofiber doku iskeleleri hazırlanmış ve nanofiberlerin altın nanopartiküllerle dekore edilmesi için fiber yüzeyi polietilenimin (PEI) ve poli-L-lizin (PLL) katyonik polimerlerle kaplanmıştır. Daha sonra elektrostatik olarak negatif yüklü sitratla kaplı altın nanopartiküller fiberlerle etkileştirilmiştir. Tez kapsamında, hücre farklılaşmasını uyarıcı faktörler olan sinir büyüme faktörü (NGF) ve elektriksel uyarımın etkileri ile altın nanopartikül dekore edilmiş ve yönlendirilmiş nanofiber yüzeylerde hücre davranışları ve biyolojik ve elektriksel uyarımların aksonal gelişmeye etkisi incelenmiştir. Bu kapsamda yapılan çalışmalar aşağıda özetle sunulmuştur.

- (i) altın nanopartiküllerin eldesi ve karakterizasyonu,
- (ii) ipek fibroin ve poliüretan nanofiber doku iskelelerinin elektroçirime tekniği üretimi,
- (iii) altın nanopartiküllerin PEI ve PLL aracılığıyla nanofiberlere immobilizasyonu,
- (iv) altın nanopartikül immobilize edilmiş fiberlerin karakterizasyonu,
- (v) hücre-fiber etkileşimlerinin incelenmesi,
- (vi) çeşitli NGF konsantrasyonun farklı hücre hatlarında etkisi,
- (vii) yönlendirilmiş PU nanofiberlerde NGF'nin aksonal gelişime etkisi
- (viii) yönlendirilmiş PU nanofiberlerde NGF'nin ve elektriksel stimülasyonun aksonal gelişime sinerjik etkisi araştırılmıştır.

Literatürde, partiküllerin polimer yüzeyine tabaka-tabaka (layer-by-layer) kaplanması ile yapılan çalışmalar mevcuttur. Benzer şekilde pozitif yüklü PEI ile altın nanopartiküller cam yüzeyler üzerine kaplanmış ve sinir rejenerasyonu modelleri üzerine çalışılmıştır. Ancak altın nanopartiküllerin yönlendirilmiş nanofiberler üzerine immobilizasyonu ve sinir rejenerasyonu üzerine etkileri henüz denenmemiştir.

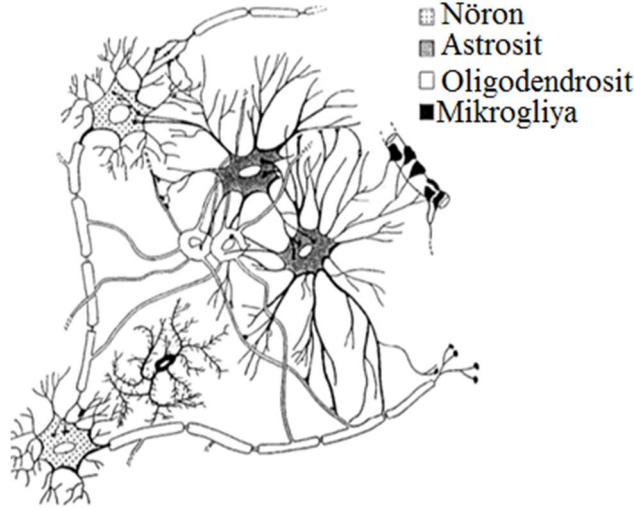
Katyonik PLL aracılığıyla altın nanopartiküllerin yüzeylere kaplanması ise yalnızca tümör belirteçlerinin belirlenmesi için sensör yapılarının eldesinde kullanılırken; henüz sinir doku mühendisliği çalışmalarında altın nanopartiküllerin nanofiberlere immobilizasyonunda kullanılmamıştır. Literatürde yapılan araştırmalara göre, poliüretanın altın nanopartiküller ile dekore edildiği çalışmaların sınırlı sayıda olduğu ve sinir doku mühendisliğinde altın nanopartikül immobilize poliüretan fiberlerin henüz bir uygulamasının bulunmadığı görülmüştür. Kim ve arkadaşları, altın nanopartikül içeren esnek poliüretan filmler hazırlamış ve gerilim uygulanan poliüretan yapılarda mekanik stres altında içindeki partiküllerin dinamik olarak kendiliğinden organize olması sonucu oldukça iyi iletkenlik gösterdiğini açıklamışlardır. [9] Ancak buna benzer bir malzemenin sinir rejenerasyonuna potansiyel etkisi henüz değerlendirilmemiştir.

Sonuç olarak altın nanopartiküller ile dekore edilmiş ve yönlendirilmiş poliüretan nanofiberlerin NGF ve elektrik uyarımlarla birlikte sinir rejenerasyonuna sinerjik etkisi ve kondüit malzemesi olarak kullanım potansiyelleri ilk defa bu tez kapsamında çalışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Merkezi Sinir Sistemi

Nöronlar, dendritleriyle elektriksel darbeler şeklinde diğer hücrelerden aldıkları bilgileri hücre gövdesi ve aksonları yardımıyla taşır. Yaklaşık 1µm çapındaki aksonların uzunlukları makro boyutlara ulaşabilmektedir. İnsan vücundaki en uzun aksonlardan olan siyatik sinir fibrilleri yaklaşık 1 metre uzunluğundadır. Tüm beyin ve omurilikten oluşan merkezi sinir sistemi, sinir uzantılarını içeren beyaz cevher ve sinir hücrelerinin gövdelerini içeren gri cevher tabakaları halindedir. Omurilikte gri cevher içte, beyaz cevher dışta iken; beyinde tam tersi bir durum görülmektedir.



Şekil 2.1. Merkezi sinir sistemindeki hücreler ve birbirleriyle olan iletişimlerinin gösterimi [10].

Merkezi sinir sisteminde, nöronlar ile bu hücrelere fizyolojik destek sağlayarak nöronal hasarların tamirinde etkili, mikroglia ve makroglia (astrozit ve oligodendrositler) olarak adlandırılan gliyal hücreler bulunmaktadır. Gliyalar, nöronlar gibi diğer hücrelerden elektriksel sinyal kodları alırlar; ancak bu hücreler arasında düzenleyici yanıtların hazırlanmasında zamanlama farkı vardır. Nöronlar, Ca^{+2} sinyallerini saniyede metreler oranında yayabilirken; gliyalar aksiyon potansiyellerini saniyede mikrometre oranında yaymaktadırlar [11, 12].

Gliyal hücreler, gliyal ağı oluşturacak şekilde birbirleriyle etkileşim halindedirler. Nöronlarla, oligodendrositlerle ve diğer astrozitlerle bağlantılı olup, bu hücrelerin arasında sinyalleme yol izi olma potansiyeline sahip astrozitler, aynı zamanda astroitik ayakları

yardımıyla kılcal damarların etrafındaki endotelilerle yoğun temaslar kurarak kan-beyin bariyerini oluştururlar [10]. Periferik sinir sistemindeki schwann hücreleri ile aynı görevi üstlenen oligodendrositler ise; aksonların sinirsel uyarıları daha hızlı iletmesini sağlayan miyelin kılıfının yapımında ve sürdürülmesinde görevli hücrelerdir [12, 13]. Miyelin kılıfla bağlantılı olmayan uydu oligodendrositler nöronların etrafındaki mikro çevrenin düzenlenmesinde etkilidir [10]. Diğer gliyal hücre tipi olan, immun yanıtların intraserebral dengesinden ve immun mediyatörlerin üretiminden sorumlu mikrogliya hücreleri, fagositik fonksiyonlarıyla makrofajlar gibi görev yapabilmelerinin dışında antijen sunan hücreler görev görme yeteneğine de sahiptirler [14].

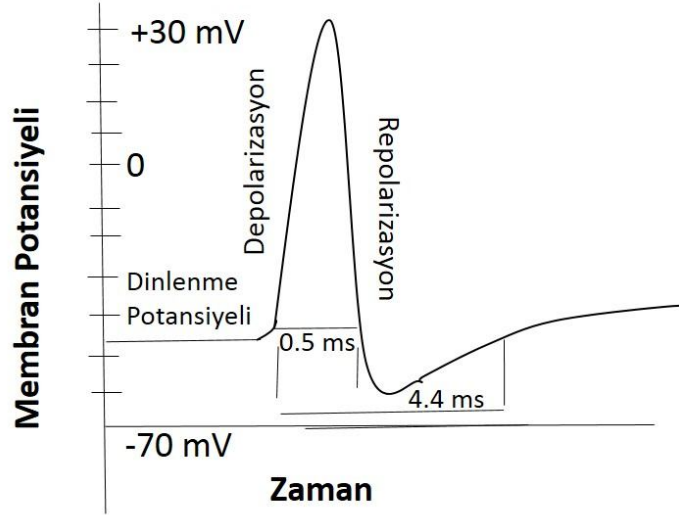
2.2. Periferik Sinir Sistemi

Periferik sinir sistemi, duyu bilgilerini periferden merkeze taşıyan duyuusal sinir sistemi ve motor liflerle merkezden perifere yanıt taşıyan motor sinir sisteminden oluşur. Periferik sinir sisteminin gliyal hücreleri, gangliyonlardaki uydu hücreler ve sinir impulslarının hızlı yayılımını sağlayan miyelin kılıf yapımında görevli schwann hücreleridir. Schwann hücrelerinin dış yüzeyinde nörilemma olarak adlandırılan bazal membran tabakası vardır [15].

Merkezi sinir sisteminde sinir hücreleri ve uzantılarının arası nöroglia dokusu tarafından doldurulmaktadır. Periferik sinir sisteminde ise sinir hücrelerinin ve bunların uzantılarından oluşan sinir fibrillerinin arasını bağ dokusu doldurur. Sinir fibrillerinin bağ doku kılıfları ile çevrili şekilleri periferik sinirleri oluşturur. Periferik sinir sistemini oluşturan sinirler horizontal kesitte içten dışa doğru incelendiğinde sinir liflerinin endonöryum ile çevrili olduğu; bunların demet oluşturarak fasikül meydana getirdiği; fasiküllerin perinöryum ile örtülü olduğu ve bir araya gelen fasiküllerin ise dıştan epinöryum ile sarıldığı görülür.

2.3. Sinir Hücrelerinin Elektriksel Özellikleri

Nöronların dinlenme halindeki transmembran potansiyellerindeki ~ 1 ms geçici değişimler aksiyon potansiyeli olarak adlandırılır.



Şekil 2.2. Sinir hücresinin elektriksel stimülasyon sırasındaki aşamaları

Nöron membranından elektrik akımı geçtiğinde, aksiyon potansiyeli oluşur. Dinlenme potansiyeli, eşik değeri gibi sayısal değerler, nöron çeşidine göre farklılık göstermektedir [16]. Bu nöronların dendritleri hücre dışı sinaptik uyarımı algılayarak, Na^+ kanallarının açılmasını sağlar [17]. Kanallardaki açılma, membranın iç potansiyelini yaklaşık -70 mV'den -55 mV dolayına getirecek düzeydeyse, aksiyon eşiğine gelerek daha fazla Na^+ kanallarının açılmasına neden olur. Aksiyon potansiyelinin oluşumuna yol açan Na^+ akışının, iç potansiyeli 30 mV'a getirdiği duruma depolarizasyon adı verilir. Depolarizasyonun ardından Na^+ kanallarının kapanmasını takiben K^+ kanalları açılır. K^+ kanalları daha yavaş açıldığından membran yeniden polarize olmaya başlar. Hiperpolarizasyon gerçekleştiğinde, nöron daha fazla uyarı kabul edemez veya yeni bir uyarım için eşik yükseltir. Böylelikle, hiperpolarizasyon, zıt yönde aksiyon potansiyelinin tetiklenmesini önleyerek tek yönlü sinyal iletimini sağlamış olur. Hiperpolarizasyondan sonra Na^+/K^+ pompası membran potansiyelini dinlenme durumuna geri getirir [6].

2.4. Doku Mühendisliği

Her yıl çeşitli hastalıklar nedeniyle milyonlarca insan organ transplantasyonuna ihtiyaç duymaktadır. Transplantasyon ihtiyacı oldukça fazla olmasına rağmen, çoğu hasta donör beklerken hayatını kaybetmektedir. Bu ihtiyaç, doku mühendisliği kavramını doğurmuştur. Doku mühendisliği, fonksiyonunu yitirmiş veya zarar görmüş doku/organların yerine kullanılmak üzere, biyoloji ve mühendislik prensipleriyle laboratuvar ortamında doku/organ

üretimini amaçlayan multidisipliner bir alandır [18]. Doku mühendisliği; (i) hasarlı dokuların tamiri için uygun fonksiyonel greftlerin üretilmesi ve implantasyonu, (ii) hücre davranışının ve gelişimsel proseslerinin kontrol edilebilir üç boyutlu yapılarla çalışılması, (iii) mühendislik ürünü dokuların fizyolojisinin veya hastalıkların çalışılması, (iv) ilaçların test edilmesinde model olarak kullanılması gibi imkanlar sağlamaktadır [19].

Doku mühendisliğindeki yaygın yaklaşım hücre davranışlarında önemli role sahip doğal ekstraselüler matriks mimarisinin mimik edilmesidir [20]. Doku mühendisliği çalışmalarında yalnızca hücreler ya da doku iskeleleri, hücreler ve doku iskeleleri, hücreler ve sinyal molekülleriyle kombine doku iskeleleri kullanılmaktadır. İzole edilen hücrelerin hasarlı bölgeye replasman amacıyla kullanıldığında rejenerasyonu arttırdığına yönelik çalışmalar mevcuttur. Yalnızca doku iskelesi kullanıldığında endojen hücreler iskele üzerine göç ederek istenilen dokuyu oluşturarak hasar tamirini sağlayabilmektedir. Bunlardan farklı olarak, iskeleler üzerinde istenilen dokunun oluşumuyla ilişkili hücrelerin inkübe edildikten sonra implantasyonu da dokuların oluşturulabilmesi mümkündür. Sinyal molekülleri ise hücrelerin iskele üzerine tutunmasını kolaylaştıran, hücre yönlenmesinde etkili olan büyüme ve tutunma faktörleri gibi moleküllerden oluşmaktadır. Çeşitli sinyal moleküllerinin doku rejenerasyonu çalışmalarında kullanıldığı başarılı örnekler mevcuttur.

2.5. Sinir Doku Mühendisliği

Sinir dokusunun yaralanma sonrası kendisini onarabilme yeteneği oldukça kısıtlıdır. Periferik sinir sisteminde proksimal segment rejenerasyon olabilir. Fakat periferik sinir sistemindeki nöronların aksine, merkezi sinir sistemindekiler normal koşullar altında rejenerasyon olamazlar [21]. Aksonal gelişmeyi kolaylaştıracak doku iskelelerinin kullanıldığı uygulamalar, sinir sistemi hasarlarının onarımına yönelik sinir doku mühendisliği yaklaşımlarının temelini oluşturmaktadır.

2.5.1. Periferik Sinir Sistemi Doku Mühendisliği

Periferik sinir sistemi yaralanmalarında defektli kısım 1 cm'den uzun olduğunda sinirlerin ayrı uçları dikilemeyeceği uzaklıkta olduğundan uç uca karşılaştırılmazlar. Kişide motor sinir kaybı varsa hastanın bacağından yan tarafından alınan sinir, defektli yere sinir tüneli (sinir grefti) işleviyle yerleştirilebilir. Böylece proksimal sinir segmentinde aksonun ucundan tomurcuklanarak yeni akson filizleri oluşturan sinir o tünel yardımıyla sinyal iletir. Aksonal büyüme hızının 0.5-1 mm/gün olduğu tahmin edilmektedir [22]. Rejenerasyon olan her fibrilin ucunda schwann hücrelerinin bazal laminaları boyunca ilerleyen filopodiyalar bulunur. Transekte sinirin distal ucundaki miyelin artıkları fagosit edilir ve distal sinir

segmenti denerasyona uğrar. Distal ve proksimal uçlar arasındaki ilişki schwann hücrelerinin oluşturduğu bazal lamina bantları olan Bungner bantlarıyla sağlanır ve bantlar aksonları hedefine ulaştırır. Sinir fibrillerinin civar dokular yerine arasında mesafe bulunan sinire ilerlemesi distal uçtan salgılanan indükleyici ajanlara bağlıdır. Schwann hücreleri nörotrofik faktörler ve ekstraselüler matriks elemanları salarlar.

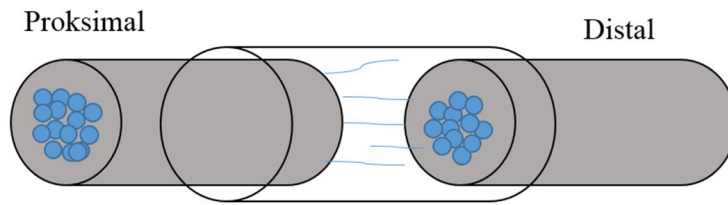
Otolog sinir grefti yerine biyolojik kondüit olarak otolog dondurulmuş kas, ven greftleri gibi dokular da kullanılmaktadır. Sinir greftleri kayıp kısım yerine geçen canlı bir doku değil, proksimal sinirlerin içinden geçeceği bir yenilenme ortamıdır. Sinir hasarının büyük olduğu durumlarda otolog sinir grefti yetersiz kalmaktadır. Ayrıca otogreftlerde sinirin kalınlığı da önemli olduğundan kullanılacak greft istenilen niteliklere sahip değilse altın standart olmasına rağmen başarılı değildir. Kadavradan alınan allogreftler ya da hayvanlardan elde edilen zenogreftler ise immun yanıt oluşturma riski taşımaktadırlar. Allojen hücre içeren standart allogreftlerde sinir iyileşmesi tamamlanıncaya kadar immun baskılayıcı kullanılmaktadır. Sonrasında ise yabancı schwann hücreleri yıkıma uğramaktadır. Deselülerize sinir allogreftlerinde ise immun baskılayıcı kullanımına gerek duyulmamasına rağmen schwann hücrelerinin yokluğunda kondüitin başarı şansı düşmektedir.

Piyasada satılan ticari sinir kanalları (kondüitler, Çizelge 2.1) maksimum 1.5-2.5 cm boyutlarındaki defektlerde kullanılmaktadır [23]. Daha büyük defektlerde kullanılmak üzere doku mühendisliği ürünü olan sinir kanallarına ihtiyaç vardır. Sinir doku mühendisliği bu alandaki ihtiyacı karşılamada oldukça kritiktir. Piyasada yapay kondüit materyali olarak biyobozunur olmayan silikon, politetrafloroetilen (PTFE) ve biyobozunur olan poliglikolik asit (PGA), polilaktid-ko-kaprolakton (PLCL), poliglikolik asit-kollajen (PGA-c), tip I kollojen kullanılmaktadır.

Kondüitler yerleştirildikten sonra sinir uçlarından salgılanan faktörlerce zengin sıvı kanalları doldurur. 1 hafta sonra sinir uçları uzunlamasına düzenlenmiş fibrin matriks ile birbirine bağlanır. İkinci haftada ise fibroblastlar, makrofajlar ve schwann hücreleri fibrin matrikse göç eder. Proksimal uçtan gelen aksonlar yaklaşık dördüncü haftada distal köke ulaşarak miyelinize olur. Distal kökten ilerleyen aksonlar sinirin hedef dokusuna ulaşır ve reinnervasyon sağlanır.

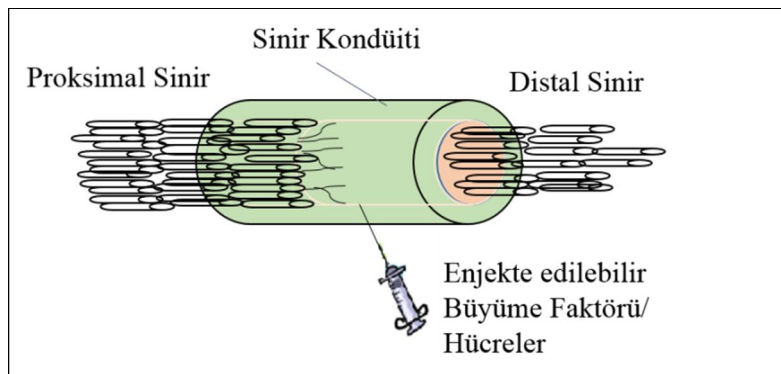
Çizelge 2. 1. FDA onaylı sinir kondüitleri

Ürün İsmi	Malzeme	Bozunma	Çap	Uzunluk
Neurotube®	Poliglikolik Asit (PGA)	3 Ay	2.3-8 mm	2-4 cm
NeuraGen®	Tip I kollajen	36-48 Ay	1.5-7 mm	2-3 cm
NeuraFlex™	Tip I kollajen	4-8 Ay	2-6 mm	2.5 cm
NeuraMatrix™	Tip I kollajen	4-8 Ay	2-6 mm	2.5 cm
AxoGuard™ Nerve Connector	Porsin Intestinal Submukozası (SIS)	3 Ay	1.5-7 mm	1 cm
Neuralac®	Polikaprolakton	16 Ay	1.5-10 mm	3 cm
SaluTunnel™	Polivinil Alkol (PVA)	-	2-10 mm	6.35 cm



Şekil 2.3. Sinir kılavuz kanalıyla rejenerasyon modeli

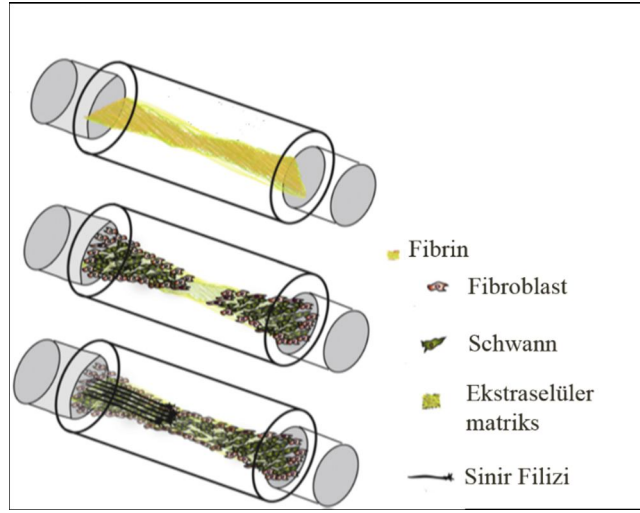
Kullanılacak sinir greftinin implantasyonundan sonra ilk beş günlük sürede çevre dokudan difüzyonla beslenmeye izin verecek geçirgenlikte olması; sonrasında ise kan yoluyla ilişki kuracak vaskülerizasyonunu sağlamış olması gerekmektedir. Vaskülerizasyon sağlanamazsa fibrözis ortaya çıkmakta; akson için tünel kapanmaktadır. Farklı fabrikasyon teknikleri, kondüitlerin geçirgenliğini etkiler. Sinir kondüitlerinin geçirgenliği materyalin kristalinitesiyle yakından ilişkilidir. Bozunma oranı ve geçirgenlik kristalinite oranının artışıyla azalış gösterir. Geçirgenlik değeri materyalin hidrofilik niteliğine de bağlıdır [24].



Şekil 2.4. Sinir kılavuzunun şematik gösterimi

Periferik sinir sisteminde miyelin kılıf sentezleyen schwann hücreleri, hücre adezyon molekülleri ve nörotrofin salgılama yeteneğindedirler. Periferik sinir rejenerasyonunda donör bölge morbiditesi yaratan otolog schwann hücrelerinin kullanımı yerine farklı hücre hatlarına farklılaşabilen yetişkin kök hücrelerin kullanımı alternatif bir stratejidir [25].

Schwann hücrelerini saran bazal lamina, aksonların tutunup beslendiği tabakadır. Bazal laminadaki laminin ve fibronektin aksonların uzamasında ve rejenerasyonunda rol oynadığı için periferik sinir kondütlerine yönelik çalışmalarda bu materyaller sıklıkla kullanılır. Schwann hücrelerinin yüzeyindeki integrin nöronal reseptörü sinir hücrelerinin adezyonunu sağladığı için doku iskelesi oluşturmaya yönelik araştırmalarda integrin de tercih edilmektedir.



Şekil 2. 5. Sinir boşluğunda kondüt boyunca rejenerasyon komponentleri [24].

Genel olarak başarılı bir kondüt

- (i) uygun çap/uzunluk ve esneklikte olmalı,
- (ii) rejenere aksona kılavuzluk edecek topografyada olmalı,
- (iii) rejenere aksonun erken dönemde difüzyon ile beslenebilmesine olanak sağlamalı,
- (iv) kolay anjiogenezise izin verecek uyaranları taşımalı,
- (v) rejenere olacak segmentin sinir rejenerasyonu tamamlanıncaya kadar sağlam kalmalı; rejenerasyon tamamlandığında ise bozunmalı,

- (vi) nörotrofik faktörlerin rejenerasyon ortamında kalmasını sağlamalı,
- (vii) yapısındaki malzeme bozunma öncesi ve sonrasında biyouyumlu olmalıdır.

2.5.2. Merkezi Sinir Sistemi Doku Mühendisliği

Merkezi sinir sistemindeki nöronlar mitozla gitmezler ve endojen nöral kök hücreler tipik yaralanma sonrası nöron kayıplarını yerini alma kabiliyetine sahip değildirler. Cerrahi müdahaleden 1 hafta sonra oluşan gliyal-yara formu aksonal rejenerasyon olasılığını elimine edici inhibitör etkisi yapmaktadır [26]. Bazı araştırma grupları kondroitinaz ABC ile spinal kord yaralanmaları sonrası oluşan bu gliyal yara dokusunun bozunması gibi çeşitli uygulamalarla yaralı çevrenin endojen rejenerasyon için teşvik edilmesi amacıyla yeniden modellenmesi üzerine yoğunlaşmıştır. Buna alternatif bir strateji ise hasarlı dokunun fonsiyonel bağlantılarının yeniden kurulması ve iyileştirilmesi için yeniden oluşturulmasıdır. Hasarlı dokunun yeniden oluşturulmasında endojen kök hücrelerin farmakolojik uyarımı ve ekzojen kök hücre nakli olmak üzere iki yaklaşım vardır. Sinir rejenerasyonu için hücre transplantasyonu ile hasar bölgesindeki hücrelerin yerini alma, hasarlı hücrelerin onarımı (remiyelinizasyon) ya da lokal çevrenin daha iletken olacak şekilde değiştirilmesi hedeflenir [9]. Ekzojen kök hücre transplantasyonu ilgi toplasa da, nöral prekürsörlerin direkt enjeksiyonu kısıtlı başarıya ulaşmaktadır. Transplante hücrelerin graft olma ve hayatta kalma oranının oldukça düşük olduğu belirtilmektedir [26]. Hücre büyümesinin teşvik edilmesi için nörotrofik faktörler; hücre yapısının bozunmasının durdurulması ya da yavaşlatılması için nöroprotektif ajanlar ve yaralı çevredeki inhibitör çevrenin etkisinin bloke edilmesi için nötralize edici moleküller; beyine gönderilmeleri sırasında kan-beyin bariyeri nedeniyle difüzyon engeliyle karşılaşılır. Spinal kord yaralanmalarında metilprednizolon, anti-NOGO-A, kondroitinaz ABC; Alzheimer hastalığında β -sekretaz inhibitörleri, Parkinson hastalığında sirtuin-2 (SIRT2) inhibitörleri nöroprotektif ve nötralize edici ajanlara örnek olarak verilirken; beyin-türevli nörotrofik faktör (BDNF), nörotrofi-3 (NT-3) ve sinir büyüme faktörü (NGF) nörotrofik faktörlere örnektir [27]. Bu terapötik ajanların yaralı bölgede kontrollü salımları katı implante edilebilir veya enjekte edilebilir doku iskeleleri yardımıyla mümkündür [26, 27]. Katı implante edilebilir yapılar genellikle spinal kord yaralanmalarında kullanılırlar. Spinal kord tamamen koptuğunda sinir kılavuz kanalları periferal sinir onarımında klinik olarak kullanılan sisteme analog uygulanabilir. Kordun kısmi transeksiyonunda defektin doldurulmasında hidrojeller enjekte edilebilir sistemlerdir [27]. Beyin yaralanmalarının şekli ve boyutu uniform olmadığından beyin doku mühendisliğinde enjekte edilebilir ve yaralı bölgenin şeklini

alabilir doku iskelelerinin üretilmesi daha uygundur [26]. Sinir doku mühendisliği uygulamalarında, defektli bölgenin şeklini alan hidrojeller hücre göçüne izin veren açık poröz ağ yapısıyla oldukça dikkat çekicidir. Hidrojeller, hücre agregasyonunu azaltma kabiliyetinde olup; hücre yaşamının devamlılığı ve hücrelerin integrasyonu için hücrelere matriks yapısı sağlarlar [27].

2.5.3. Elektriksel Stimülasyon Metodları ve Etkileri

Hücrelerin elektriksel uyarımı, basit ve uyarlanabilir bir methoddur. Yapılan bazı çalışmalar, DC elektrik alan uygulamanın DC elektik akımından daha etkili olduğunu ve elektrik alan uygulamanın, hücrelerin aktivitelerinin modülasyonunda önemli rol oynadığını ifade etmektedir. Elektrik alana maruz bırakmanın (<100 mV/mm) hücre migrasyonu ve hücre büyümesinde uyarıcı etki yaptığı bilinmektedir [6].

Elektriksel uyarımın nöronlar üzerinde etki ettiği düşünülen muhtemel mekanizmalar: (i) hücre membranının büyümesini sağlayan adezyon reseptörleri veya aktin gibi sitoplazmik materyallerin yeniden dağılımı, (ii) hücre membranı potansiyeli değişimine bağlı olarak membran ve ekstraselüler matriks proteinlerinin konformasyonel değişimi, (iii) protein sentezinin artışının tetiklenmesidir [28].

Elektrik alanla fiber uçlarının etrafındaki iyonik akımdaki değişimin büyüme tetiklemesinin, elektriksel stimülasyonun sinir hücrelerini etkilediği muhtemel mekanizmalardan biri olduğu Freeman ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ifade edilmiştir. Kimura ve arkadaşları (1998), sıçan PC12 hücrelerinde sinir büyüme faktörü (NGF) gen ekspresyonunun elektriksel olarak aktive edildiği varsayımında bulunurken; Kotwal ve arkadaşları (2001), fibronektin adsorpsiyonunun elektrik uyarımıyla artması ile nörit uzamasının sağlandığını açıklamışlardır [6].

2.6. İletken Doku İskeleleri

2.6.1. İletken Polimerler

İletken polimerler kendi örgüsü içerisindeki elektronlar ile elektriksel iletkenliği sağlayan polimerlerdir. Bu polimerlerin elektronik iletkenlik gösterebilmesi için polimer örgüsünde elektronların zincir boyunca taşınmasını sağlayan uygun yerlerin bulunması gerekir. Bu koşulu ancak ana zincirinde konjüge çift bağlarını bulanan polimerler sağlayabilir. Ancak bu konjügasyon yüksek düzeyde iletkenlik için tek başına yeterli değildir ve iletkenlik “dop” işlemi ile artırılır. Dop işlemi ile polimer yapısında iletkenliği sağlayacak olan elektronlar alınarak veya elektronlar verilerek polimer örgüsünde artı yüklü boşluklar veya elektron fazlalıkları oluşturulur. Özet olarak dop işleminde nötral polimer zinciri okside veya redükte

olarak pozitif veya negatif yüklenir. Bu işlemde nötral bir sistem içerisinde “dopant” molekülden polimer zincire yük transferi sağlanır [6, 7].

Doğrusal ana zincirli poliasetilen, polipirol (PPy), polianilin ve bunların kopolimerleri önemli iletken polimerlerdir. Poliasetilenin tersine polifenilen aromatikliğinin bir sonucu olarak termal kararlıdır. Polipirol, politiyofen (PT), polianilin (PANI), poli(3,4-etilendioksitiyofen) (PEDOT) iyi kondüktivite, stabilite ve kolay sentezlenebilirlik gösteren aromatik iletken polimer sınıfıdır. Poliasetilen gibi konjuge alifatikler, atmosferdeki oksidatif bozunmaları ve yan ürünlerinin sitotoksik doğası nedeniyle biyomedikal uygulamaların dışında bırakılmıştır. PEDOT ve PPy çevresel ve elektrokimyasal stabilitelerinden dolayı yaygın olarak çalışılan iletken polimerlerdir [7].

Kolay sentezlenebilir, biyoyumlu ve iyi iletken olmalarına bağlı olarak bazı iletken polimerler biyolojik ve medikal uygulamalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Polipirol (PPy), politiyofen (PT), polianilin (PANI), poli(3,4-etilendioksitiyofen) (PEDOT) gibi iletken polimerlerin farklı formları farklı uygulamalarda kullanılmaktadır. Bu polimerler, elektrikle ilişkili biyolojik davranışların çalışılmasında bilim insanlarının dikkatini çekmiştir [7]. Doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere sinir doku rejenerasyonunda potansiyelleri yüksektir [29].

Çizelge 2. 2.Yaygın kullanılan iletken polimerler ve iletkenlikleri [7]

İletken Polimer	Maksimum İletkenlik (S/cm)
Poliasetilen (PA)	200-1000
Poliparafenilin (PPP)	500
Poliparafenilin sülfid (PPS)	3-300
Poliparavinilen (PPv)	1-1000
Polipirol (PPy)	40-200
Politiyofen (PT)	10-100
Poliizotiyonaftalin (PITN)	1-50
Polianilin (PANI)	5

İletken polimerler rejeneratif amaçlarla nöral sistemlerde iletişimi kolaylaştırmak için etkili materyallerdir. Nöronlar elektriksel sinyal iletimi gerçekleştiği için, sinir bilimciler, iletken polimerlerin elektrot olarak kullanıldığı, nöronların elektriksel olarak uyarıldığı sistemlere odaklanmışlardır [7]. Yapılan araştırmalar neticesinde, iletken polimerlerin elektrik

uyarımıyla sinir hücrelerinin farklılaştırılmasını artırdığı ve büyüme faktörlerinin (sinir büyüme faktörü (NGF), nörotrofin-3 (NT3), beyin türevli nörotrofik faktör (BDNF)) salımı için uygun oldukları görülmüştür [30].

İletken polimerlerin biyobozunma yeteneğinin olmaması *in vivo* uygulamalarını kısıtlamaktadır. Kronik enflamasyona yol açabileceği gibi cerrahi yöntemle uzaklaştırılmaları gerekir [6]. Ayrıca iletken polimerlerle ilişkili esas zorluk işlenmeleridir [7]. Bu polimerlerin kısıtlı çözünürlüğü direkt fiber oluşumlarını engellemektedir [30]. Bu problemlerin aşılması için çoğu araştırmacı elektrik iletken polimerleri diğer eğrilebilir polimerlerle (jelatin, poli(L-laktid-ko-kaprolakton) gibi) harmanlayarak elektroegirme yapmıştır; ancak bu durum nanokompozit fiberlerin iletkenliğini tehlikeye atmaktadır. İletken polimerlerin spesifik özelliklerinden daha iyi yararlanmak için nanokompozit yüzeyine ince polimer kaplaması yapılmaktadır [6, 7, 30].

Literatüre göre modifiye edilmemiş iletken polimerler üzerinde zayıf hücre tutunması ve hücre büyümesi olduğu; bunun yanında bu polimerlerin zayıf biyobozunurluklarının olduğu ifade edilmektedir. Bu nedenle doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere tasarlanan iletken polimerlerin çözünürlüklerinin, biyoyumluluklarının ve biyobozunurluklarının ayarlanması oldukça önemlidir [31].

2.6.1.1. İletken Polimerlerin İletkenlik Mekanizması

Yüksek derecede π bağı çakışması içeren konjuge ana zincire sahip olan nötral polimer zinciri “dop” işlemi esnasında negatif veya pozitif yüklenmek için okside veya redükte olabilir [7]. Dop nötral bir polimerin yükseltgenmesi (p-doplama) ya da indirgenmesi (n-doplama) ve sırasıyla karşı anyon ya da katyon (dopant) sağlanması işlemidir. Bu işlemde, yüklü iletken polimer omurgasıyla karşı iyonun yakın ilişkisi nedeniyle sıfır net yüklü iletken polimer sistemi elde edilir. Tek tekrar biriminde elektronların komşu tekrar birimindeki çekirdeğe çekimi zincirler boyunca ve zincirler arasında yük hareketliliğini sağlar ve bu durum “elektron sıçraması” olarak adlandırılır. Yük taşıyıcılarının konjuge iletken polimer ana zinciri boyunca sıralı hareketi iletkenliği sağlar [32].

2.6.1.2. İletken Polimerlerin Yüzey Modifikasyonu

Mekanik özelliklerin ve farklılıkların istenilen özelliklere getirilmesi, biyobozunmanın ayarlanması, hücre yanıtının ve biyoaktivitenin sağlanması iletken polimerlerin modifikasyonunda göz önüne alınması gereken özelliklerdir [7]. İletken polimerlerin, biyolojik dopantlar ile dope edilmeleri, hücre proliferasyon-adezyonunun artırılması amacıyla biyoaktif moleküllerle modifikasyonları, yüzey topografyasının geliştirilmesi için

desenlenmeleri gibi modifikasyonlar yapılmaktadır. Ancak, biyolojik moleküllerle dop edilmesinin, düşük yükleme, polimerin iletkenliğinin azalması, salımın hızlı olması, yüzey pürüzlülüğünün negatif etkilenmesi gibi dezavantajları vardır [6]. Literatürde yapılan çalışmalarda polipirolün dermatan sülfatla katkılanmasıyla keratinosit canlılığının, heparin ile katkılındığında endotelial hücre proliferasyonunun arttığı; laminin-türevli peptidlerle katkılındığında ise nöron ve astrosit adezyonunun kontrolüne katkı sağladığı bildirilmiştir [32].

2.6.1.3. İletken Polimerlerde Elektriksel Özelliklerin İyileştirilmesi

İletken polimerlerin yeterli düzeyde iletkenlik özellik göstermemesinden dolayı farklı dopant maddeler kullanılmaktadır [6, 7, 32]. Dop edilmiş iletken polimerin özellikleri, dopant maddenin tipine ve moleküler büyüklüğüne bağlıdır. Dopant seçimine, konsantrasyonuna ve doping seviyesine bağlı olarak dop edilen iletken polimerlerin yüzey enerjilerinin, polaritelerinin ve termal stabilitelerinin değiştiği bilinmektedir [6]. Polimerlerin katkılanması için sıklıkla para-toluensülfonat (pTS), poli(strensülfonat) (PSS), sodyum benzensülfonat (BS) içeren dopantlar kullanılır [32].

PANI için HCl, pTS, dodesilbensülfonik asit (DBSA) gibi aromatik asitler, sülfonik asit türevi laurik asit kullanılan dopantlardandır [6, 7]. Organik çözücüde çözülebilir polipirol (PPy) sentezi için ise naftalin sülfonik asit sodyum tuzu, dodesilbenzen sülfonik asit sodyum tuzu, bütill naftalin sülfonik asit sodyum tuzu ve di-2-etilhekzil sülfosüksinik asit sodyum tuzu gibi fonksiyonel dopantların kullanımı mümkündür [6]. Bunların dışında PPy, heparin, dekstran sülfat, hiyalüronik asit, kitosan, kollajen, büyüme faktörleri, ATP gibi farklı biyoaktif moleküllerle de dop edilebilir [6, 33].

Uygulamaya bağlı olarak dopant materyalin seçimine karar verilir. Örneğin, tetraetil tosilat dopant olarak kalın ve iyi mekanik özelliklerde polipirol eldesi için kullanılır. Poli(strensülfonat) ise çöktürüldüğünde kararlılığı ve biyoyumluluğu nedeniyle polipirol ile kombine edilerek kullanılan bir dopanttır [32].

2.6.1.4. İletken Polimerlerin Sinir Doku Mühendisliğinde Uygulamaları

Polipirol nöral büyüme ve rejenerasyonun *in vivo* ve *in vitro* uyarılması için kullanılan biyoyumlu iletken bir polimerdir [34]. Polimer ana zincirindeki konjugasyon derecesi fazla olduğundan sert, çözünmez ve işlenebilirliği zayıftır. Bu nedenle yapısal materyal olarak tek başına kullanmak yerine optimize edilerek mekanik olarak yönlendirilebilir ve işlenebilir bir forma dönüştürülür [6]. Polipirol, biyomedikal uygulamalarda genellikle negatif yüklü proteinler, makromoleküller gibi anyonik türlerin, yapılarına elektrokimyasal olarak

eklenmesiyle üretilir [35]. Elektroğirilmiş düzenli polipirol (PPy)/poli(stiren- β -izobütülen- β -stiren) (SIBS) fiber platformlar üzerinde akson uzamasının yönlendirilmesine yönelik yapılan bir çalışmada, PC12 nöronal hücrelerinin düzenli fiberlere paralel olarak, yüksek derecede yönlendirilmiş aksonal uzamalarının olduğu gösterilmiştir. Çalışmada döner silindir toplayıcı kullanan modifiye elektroğirme metodu kullanılmıştır [30]. Quigley ve arkadaşları (2009) ise yaptıkları çalışmada sinir rejenerasyonunun yönlendirilmesi amacıyla iletken polipirol tabakayla kaplı tek yönlü biyobozunur liflerden oluşan bir platform geliştirmişlerdir. *p*-toluensülfonat yüklü iletken polipirol polimer ve yönlendirilmiş biyobozunur fiberlerden (PLA:PLGA,75:25) oluşan platform üzerine yerleştirilen dorsal kök gangliyonu eksplantları, fiberlerle aksonal hizalanma göstermişlerdir. İletken polimer tabakası üzerinden elektrik uyarımıyla akson uzantılarında artış ve schwann hücre göçü gözlenmiştir [34].

Lee ve arkadaşları (2009), rastgele ve düzenli elektroğirilmiş PLGA nanofiberler üzerinde polipirol kaplı iletken örgü (mesh) yapılar üretmişlerdir. PPy-PLGA elektrospun yapının kaplı olmayan PLGA kontrol örgülerle kıyaslandığında sıçan feokromositoma (PC12) hücrelerinin ve sıçan embriyonik hipokampal nöronlarının büyüme ve farklılaşmasını desteklediğini görmüşlerdir. PPy-PLGA doku iskelelerinin 10 mV/cm potansiyelle uyarıldığı elektriksel stimülasyon çalışmalarında kontrol gruba göre, PC12 hücrelerinde %40-50 daha uzun nörit uzaması, %40-90 daha fazla nörit formasyonu olduğu görülmüştür. Düzenli PPy-PLGA fiberler üzerinde uyarılan hücrelerde rastgele fiberlerdekine göre daha uzun ve daha fazla sayıda nörit olduğu belirlenmiştir [36].

Moroder ve arkadaşları yaptıkları bir başka çalışmada ise (2011), polikaprolakton fumarat-polipirol (PCLF-PPy) nanokompozit doku iskelelerinin fizyolojik koşullar altında iletken sinir kondüitler olarak uygulanmasına yönelik bir çalışma yapmışlardır. Hazırlanan doku iskeleleri üzerinde kültüre edilen PC12 hücreleri 10 μ A sabit akımla ya da 20 Hz frekansta akımla (1 saat/gün) uyarılmışlardır. 48 saat sonunda elektrik varlığında aksonlu hücrelerin yüzdesinde, hücre başına nörit sayısında, nörit uzunluğunda artış olduğunu tespit etmişlerdir [7].

Çeşitli yapısal formları olan PANI, en iyi karakterize edilen iletken polimerlerden biri olup yüksek çevresel stabilitededir ve yükleme/boşaltma prosesiyle kolay yük transportu sağlar. PANI, *in vitro* ve *in vivo* uygulamalar için biyoyumlu bir polimerdir. PANI ve türevlerinin H9c2 kardiyak miyoblastların ve PC12 nöronal hücre hattının (sıçan adrenal medullasından

türevlenen nöronal feokromositoma) üzerinde tutunup gelişerek farklılaşabileceği biyoyumlu substratlar olarak fonksiyon gördüğü bildirilmiştir [31, 37].

2.6.2. Altın Nanopartiküller

Metal nanopartiküller eşsiz elektronik, manyetik, optik, termal ve katalitik nitelikleri nedeniyle oldukça dikkat çekicidirler [38]. Son yıllarda, metal nanopartiküller küçük boyutları, hücrenel alımları, biyofonksiyonel aktif gruplarla fonksiyonlandırılmaları sebepleriyle biyomedikal alanda sıklıkla kullanılmaktadır [39]. Polimer-metal nanopartikül kompozitlerinin sensör, filtre, doku mühendisliği gibi çeşitli alanlarda uygulanma potansiyelleri vardır. Metal nanoparçacıkların polimer yapısına katılmasıyla polimerlerin özelliklerinin istenilen yönde geliştirmesi mümkündür. Örneğin; iletken metal nanopartiküller polimer yüzeylerine kaplanarak iletken yüzeyler yaratılmaktadır. Altın nanopartiküller bu amaçla sıklıkla kullanılan nanopartiküllerdir [38, 40, 41].

Altın nanopartiküller agrege olma eğilimindedirler. Altın nanopartiküllerin kararlılığı için polimer-metal nanopartikül kompozit formasyonu en kolay ve uygun yöntemdir. Son zamanlarda elektroçirme teknolojisi, polimer/inorganik nanopartikül kompozit fiberlerinin üretiminde kullanılmaktadır. Polimer fiberlerine dağıtılmış metal nanopartiküllerin hazırlanması, metal/polimer nanokompozitlerinin polimer fiberlerin ve metal nanopartiküllerinin belirgin özelliklerini kombine edebilmesi nedeniyle oldukça çarpıcıdır. Fakat altın nanopartikül/polimer kompozitleriyle ilgili çalışmalar oldukça sınırlı sayıdadır [38].

Metal nanopartikül/polimer kompozit fiberlerin yüksek yüzey alanı/hacim oranına sahip olmaları nedeniyle konvansiyonel fiberlerden daha iyi fiziksel ve kimyasal özellikler sergiledikleri düşünülmektedir. Bugüne kadar altın, gümüş, paladyum gibi bazı metal nanopartiküller elektroçirme ile fiber yapısına eklenmiştir [42]. Nanopartikül/polimer kompozitleri, partiküllerin polimer üzerine tabaka-tabaka (layer-by-layer) kaplanmasıyla veya nanopartiküllerin polimerler çözeltisi içerisinde disperse edilmesiyle elde edilebilirler [9]. Nanopartikül içeren polimerik nanofiberlerin elektroçirilmesinde ise genel olarak iki yaklaşım vardır [43]. Çoğunlukla iletken nanopartiküller kimyasal ve/veya termal yollarla sentezlendikten sonra nanopartiküllerin dağıtıldığı polimer solüsyonu elektroçirilerek, nanopartiküllerin yapıya immobilizasyonu sağlanabilir [30, 43]. İlk olarak Kim ve arkadaşları tiol-kaplı altın nanoparçacıkları polietilen oksit (PEO) nanofiberlerine bu yöntemle entegre etmişlerdir [44]. Diğer yaygın bir yöntem ise metalik öncül olan Au(III) komplekslerinin polimer ile çözülerek polimer yüzeyine absorpsiyonunu takiben

elektroerilmesi ve metal iyonlarının nanopartikül formunda eldesi için kimyasal indirgeyiciler kullanılmasıdır [30]. Bu yöntemlerden farklı olarak Deniz ve arkadaşları (2011), ilk defa lazer ablyasyon ve elektroerime yöntemini birlikte kullanılarak polimer/metal nanopartikül kompozitleri hazırlamışlardır. Yöntemde, altın blok içeren polimer solüsyonuna direkt olarak lazer ablyasyon uygulayarak altın nanoparçacıklar direkt elde edildikten sonra nanopartikülleri içeren çözeltiye elektroerime uygulanmıştır [43].

2.7. Fibroin

İpek, doğal kaynaklı olması ve eşsiz mekanik özellik göstermesi nedenleriyle yüzyıllardır tekstil alanında kullanılmaktadır. Son dönemlerde ise ipek fibroin, fiber, film, partikül, hidrojel ve sünger gibi çeşitli formda kolay üretilmesi, biyobozunur olması, yüksek mukavemet göstermesi gibi özellikleri nedeniyle doku mühendisliği alanında yaygın olarak kullanılmaktadır.

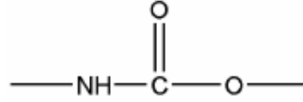
Fibröz bir protein olan ipek iki alt protein yapısındadır. Bunlardan birincisi glikoprotein yapısındaki serisin, ikincisi ise fibroindir. Molekül ağırlığı 10-300 kDa olan serisin ipeğin ağırlıkça % 25-30'unu oluşturur. Serisin proteini fazla sayıda hidroksil grupları içerir bu nedenle hidrofiliktir. İpek fibroini ise ham koza yapısındaki fibroin fiber yapılarından, glikoprotein yapısındaki serisinin uzaklaştırılmasıyla elde edilir. Bu protein oldukça iyi mekanik dayanım gösterir ve serisine kıyasla oldukça hidrofobiktir. Fibroinin yüzeyini kaplayan serisin proteini uzaklaştırıldıktan sonra, fiberler sulu çözelti halinde proses edilir. Elde edilen fibroin amorf yapıdadır, metanol-etanol gibi alkollerle muamele edilirse kristal yapıya dönüşür [45].

İpek fibroin fiberlerin hücre tutunmasını ve gelişmesini desteklediği birçok araştırmacı tarafından ortaya konmuştur. İpeğin iletken yüzeylerin sentezlenmesinde polimer olarak kullanımına yönelik az sayıda çalışma vardır. İpeğin elektriksel özelliklerinin değiştirilmesine yönelik yapılan bir çalışmada, çok duvarlı karbon nanotüp içeren ipek elektroerilmiş matrislerin geliştirilmesi üzerine yapılmıştır. Karbon nanotüplerin matrislere adsorpsiyonu, matrislerin nanotüp banyosuna 60 saniye daldırıldıktan sonra deiyonize suyla durulanıp vakum altında kurutulması ile gerçekleştirilmiştir. Agregasyonlarının önlenmesi için triton x-100 kullanılan nanotüplerin, yüzeylere yüksek oranda adsorbe olarak ipeğin iletkenliğini artırdığı görülmüştür [46]. Cucchi ve arkadaşlarının biyo-bazlı iletken kompozitlerin oluşturulmasına yönelik çalışmalarında, iletken yüzey kaplı ipek fiberlerin, muamele edilmemiş ipek fiberlerden daha yüksek termal kararlılıkta olduğu açıklanmıştır [47]. Bu tez çalışmasında, ipek fibroinin doku iskelesi materyali olarak avantajları göz önüne

alındığında altın nanopartiküllerle immobilize edilmesi konusunda öncelikle bu polimer tercih edilmiştir.

2.8. Poliüretan

Poliüretanlar, ilk kez 1937 yılında Alman bilim adamı Otto Bayer tarafından sentezlenen ve temel olarak yapılarında üretan grubu içeren (Şekil 2.6) önemli bir sentetik polimer grubudur. 1940'ların sonunda özellikle elastomerik yapılarda ve sünger formlarında kullanılan poliüretanlar, halen polimer endüstrisinde çok geniş bir kullanıma sahiptir.



Şekil 2. 6. Üretan grubu

Biyomedikal alanda ise poliüretanlar ilk kez 1967 yılında Boretos ve Pierce tarafından 'Biomer™' ticari isim ile kullanıma sunulmuştur. Moleküler kompozisyonlarına bağlı olarak farklı fiziksel ve mekanik özellikler ile üretilebilen poliüretanlar, biyomedikal alanda yara örtüleri, ameliyat iplikleri, hemodiyaliz cihazları (membranları ve bağlantıları), göğüs protezleri, kataterler, kan torbaları, yapay damarlar, kalp kapakçıkları ve yapay kalp vb. gibi birçok medikal cihazın yapısında yaygın olarak kullanılırlar. Biyomedikal düzeye uygun olan ticari poliüretanlar; Biomer™, Pellethane™, Estane™, Vialon™, Tecoflex™, Corethane™, Bionate™, Chronoflex™ vb. olarak sıralanabilir.

Bu tez çalışmasında kullanılan Corethane™ alifatik polikarbonat bazlı termoplastik poliüretandır. Corethane™ kolay işlenebilirliği sayesinde istenilen fiziksel formlarda kolaylıkla hazırlanabilir ve mükemmel oksidasyon kararlılığı, mekanik dayanımı sebebi ile uzun vadeli biyomedikal kullanımlarda tercih edilir. Poliüretan, kolay işlenebilirliği, esnekliği ve mekanik dayanımı gibi özellikleri nedeniyle bu tez çalışmasında tercih edilmiştir.

Literatürde poliüretanların sinir kondüit materyali olarak kullanımına yönelik çalışmalar incelendiğinde poliüretan bazlı malzemelerin sinir rejenerasyonunu destekleyici özellikte olduğu görülmüştür. Hausner ve arkadaşları (2007) sıçanlarda yaptıkları *in vivo* sinir hasar modeli çalışmasında, biyobozunur poliüretan kondüitlerin sıçanlarda 3 ay sürede histolojik, fonksiyonel ve elektrofizyolojik gelişme sağladığı görülmüştür [48]. Yin ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise biyobozunur poliüretanın tavşanlarda 12 mm boyutunda sinir açıklığının iyileştirilmesi incelenmiş ve implantasyondan 4 hafta sonra aksonların yeniden

miyelin yapısı oluşturarak rejenere olduğu bildirilmiştir [49]. Elektroeğirilmiş fibröz poliüretan doku iskelelerinin üzerinde embriyonik kök hücrelerinin kültürü sonucunda hücrelerin nöronal farklılaştıkları görülmüştür [50]. Sonuç olarak bu ve benzeri çalışmalar, poliüretan doku iskelelerinin nöronal farklılaşma için uygunluğunu göstererek, sinir doku onarımı için iyi bir potansiyel olduğunu kanıtlamıştır.

2.9. Polietilenimin ve Poli-L-Lizin

Altın nanopartiküllerin yüzeyler üzerine elektrostatik olarak immobilize edilmesi amacıyla polietilenimin (PEI) ve poli-L-lizin (PLL) polikasyonik polimerleri kullanılmaktadır. PEI düz zincirli veya dallanmış yapıdadır. PEI çözeltisinin pH'sı 7.4'e ayarlandığında yan zincirlerdeki amin gruplarının yoğun olarak protonlandığı bilinmektedir. PEI, polikasyonik özelliği nedeniyle altın nanopartiküllerin yüzey kaplamalarında sıklıkla kullanılmaktadır. PEI'nin amin grupları ile sitrat yüklü altın nanopartiküller arasında elektrostatik etkileşim vardır [36].

Park ve arkadaşları (2009), elektrostatik adsorpsiyonla altın nanopartikül kaplı cam yüzeyler üzerine çalışmışlardır. Bu çalışmada PEI (pH 7.4) ile muamele edilerek pozitif yükle yüklenen cam yüzeylere altın nanopartiküllerin immobilizasyonunun ardından PC12 hücrelerine elektrik uygulayarak (250 mV/günde 1 saat) hücrelerinin nörit uzunluklarının arttığını bildirmişlerdir [51]. Cam yüzeylerin PEI aracılığıyla altın nanopartiküllerle kaplanmasının ardından insan mezenkimal kök hücrelerine elektriksel stimülasyon uygulayarak gen transfeksiyonu ile uyaran Park ve arkadaşları (2012), araştırmanın sonucunda bu hücrelerin nöronal farklılaştırılmasını başarmışlardır. Bu çalışmalardan farklı olarak, bu tez çalışmasında PEI aracılığıyla altın nanopartiküllerin yönlendirilmiş nanofiberler üzerine immobilizasyonu denenmiştir.

Altın nanopartiküllerin yüzeyler üzerine immobilizasyonunda kullanılan bir diğer polimer ise PLL'dir. PLL pozitif yüklü hidrofilik amino grupları içeren katyonik polimerdir. PLL'nin aynı zamanda hücre adezyonunu arttırıcı tutunma faktörü olarak kullanımı bilinmektedir. Higashi ve arkadaşları, anyonik PLGA kaplı altın nanopartiküllerin PLL ve PAA (polialilamin) katyonik polipeptidlerini kullanmışlardır. Yan zincirler olarak aynı $-NH_2$ gruplarına sahip olmalarına rağmen, iki polikasyonik polimer ile farklı sonuçlar elde etmişlerdir. Yüzeylerin karakterizasyonu sonucu altın nanopartikül kaplamanın kalınlığı ve homojenitesinin kullanılan polikasyonun cinsinden etkilendiği sonucuna varılmıştır. Araştırmacılar, PLL polikasyon aracılığıyla altın nanopartiküllerin agregasyonuna sebep olmadan homojen biçimde yüzeyler üzerine ince tabaka halinde kaplayabilmışlerdir [52].

Bu ve benzeri çalışmalarda yüzeylere katyonik PLL aracılığıyla altın nanopartiküllerin immobilize edilmesi tümör belirteçlerinin belirlenmesi amacıyla sensör uygulamalarında kullanılmıştır. Bu tez çalışmasında ise PLL ile altın nanopartiküllerin fiberler üzerine immobilizasyonu amaçlanmış, sinir doku mühendisliği alanında doku iskelesi olarak kullanım potansiyeli araştırılmıştır.

2.10. Doku İskelesi Üretim Yöntemlerinden Elektroğirme Tekniği

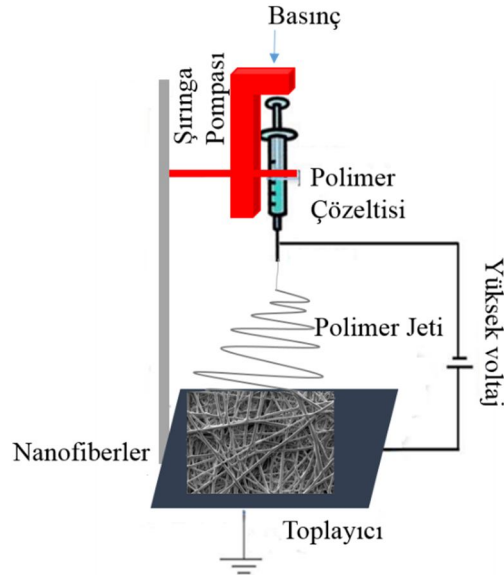
Doku iskeleleri, hücreler için fiziksel destek sağlayan ve aynı zamanda hücre gelişmesi, farklılaşması ve fonksiyonları açısından önemli görevlere sahip yapay bir hücre dışı matrikstir [53]. Hücrelerle ekstraselüler matriks etkileşiminin onarıcı ve yenileyici olmasının yanında progenitör hücrelerinin farklılaşmasının düzenlenmesinde de oldukça önemli bir rolü vardır. Bu nedenle ekstraselüler matriksin fonksiyonunu taklit eden doğal veya sentetik materyallerle üretilen doku iskelelerinin geliştirilmesi travmatik omurilik yaralanması tedavisindeki potansiyellerinden dolayı oldukça ilgi çekicidir [54, 55].

Fonksiyonel bir doku üretiminde hücrelerin canlılığı ve fonksiyonelliği için uygun bir mikro çevrenin ve besinlerin taşınmasına izin veren, yeterli mekanik özelliklere sahip, çok hücreli proseslerin koordinasyonunu kolaylaştıran makro çevrenin sağlanmasıyla mümkündür [5]. Doku iskelelerinin makro ve mikro yapısal nitelikleri için kritik olan unsurlar; yüzey alanı ve yüzey kimyası, mekanik özellikleri, bozunma hızı, por çapı ve gözenekliliğidir. Gözeneklilik, nutrientlerin ve gazların difüzyonunu, metabolik artıkların ve yan ürünlerin hücrelerden uzaklaştırılmasını etkilemektedir. Gözenek çapının hücre büyüklüğünün en az 2-3 katı fazla olması istenir. Yüzey alanı ise hücrelerin tutunmasında, göç etmesinde ve hücreler arası sinyal gönderiminde etkilidir. Kültürde veya *in vivo*'da karşılaşacağı yüklerle dayanabilecek ve gözenekliliğini devam ettirecek yapıda hazırlanan doku iskelesinin bozunması ise yeni dokunun gelişimine göre ayarlanmalıdır [54].

Doku iskelesi üretiminde kullanılan elektroğirme tekniği, proses esnekliği ve geniş çeşitlilikte malzeme kullanılması açısından fiber üretiminde başarılı bir yöntemdir. Elektroğirme, polimer çözeltilerinden elektriksel kuvvetlerin etkisiyle çapları iki nanometreden mikrometre düzeylerine kadar değişen polimer fiberlerinin üretilebildiği yöntemdir. Bu yöntemle hücrelerin büyümesi, çoğalması ve farklılaşması için yeterli por aralığına sahip, yüksek yüzey/hacim oranıyla nanofibröz doku iskelelerinin üretimi mümkündür [53, 55-56].

Elektroegirme sistemi yüksek voltaj kaynagi, siringa pompasi ve topraklanmis toplama plakasından (metal plaka) oluşur. Elektroegirme prosesi, iki zit yuكلu elektrot arasında yoğun elektrik alan oluşturulmasıyla kontrol edilir. Elektrotlardan birisi polimer solusyonuna yerleştirilirken; diğeri toplayıcıdır. Polimer solusyonu polimer damlası oluşturacak şekilde pompalanır. Damlacığa elektriksel potansiyel uygulandığında yuzyey gerilimi ve viskoelastik kuvvetler damlacığın şeklini korumaya çalışırken, elektriksel alan kuvveti damlacığı “Taylor konisi” haline getirmeye zorlar. Sınır gerilim değeri aşıldığında Taylor konisinin ucundan bir polimer jeti fişkırır. Polimer fiberler toplayıcıda toplanır.

Bu tez çalışmasında, doku iskelesi olarak doğal hucre dışı matriksi taklit etmesi nedeniyle elektroegirme tekniğiyle uşretilen nanofiberler tercih edilmiştir.



şekil 2. 7. Elektroegirme prosesinin şematik gosterimi

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Tetrakloroaurik (III) asit trihidrat ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) – Sigma Aldrich (Almanya)
Sodyum sitrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) - Sigma Aldrich (Almanya)
Hidrokinon- Sigma Aldrich (Almanya)
Bombyx mori kozası (Bursa Koza Birlik, Türkiye)
Sodyum bikarbonat (NaHCO_3) – Sigma Aldrich (Almanya)
Etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) - Sigma Aldrich (Almanya)
Metanol (CH_3OH) - Merck & Co (Almanya)
Kalsiyum klorür (CaCl_2) - Sigma Aldrich (Almanya)
Formik asit – Merck & Co (Almanya)
Poliüretan – Carothane (Velox, GmbH)
Tetrahidrofuran – Riedel-de-Haen (Almanya)
Dimetilformamid – Fluka (Almanya)
Polietilenimin (PEI, $M_n \sim 1800$) –Sigma Aldrich (Almanya)
Poli-L-lizin (PLL) – Sigma Aldrich (Almanya)
Glutaraldehit çözeltisi (GA) - Sigma Aldrich (Almanya)
Diyaliz membranı (14 kDa) - Sigma Aldrich (Almanya)
Kollajen (Tip IV) – Sigma Aldrich (Almanya)
RPMI 1640 – Gibco (Life Technologies) (A.B.D.)
Dulbecco's MEM - BIOCHROM (Almanya)
Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS)- BIOCHROM (Almanya)
Tripsin-EDTA - BIOCHROM (Almanya)
L-glutamin - BIOCHROM (Almanya)
Fetal sığır serumu – BIOCHROM (Almanya)
At serumu – Biological Industries (İsrail)
Penisilin-streptomisin - BIOCHROM (Almanya)
3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2-5-difeniltetrazolyum bromit (MTT)-Sigma Aldrich (A.B.D)
Hidroklorik asit (HCl) –Merck & Co (Almanya)
İzopropanol – Sigma Aldrich (Almanya)
Tripan mavisi – Sigma Aldrich (Almanya)
Dimetil sülfoksit (DMSO) – Origen Biomedical (İsviçre)
NGF-2.5S –Sigma Aldrich (Almanya)

Alexa fluor 488 phalloidin antikoru – Life Technologies (A.B.D.)

Gold anti-fade mountant (kapatma ortamı)- Life Technologies (A.B.D.)

4',6-Diamidino-2-fenilfol (DAPI) – Sigma Aldrich (Almanya)

Sığır serum albümini (Bovine serum albumin, BSA) – Sigma Aldrich (Almanya)

Hekzametildisilazan-Sigma Aldrich (Almanya)

Triton x-100 – Sigma Aldrich (Almanya)

Amonyum klorür (NH₄Cl) – BIOMATİK (A.B.D.)

L929 fibroblast hücresi – Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Şap Enstitüsü Müdürlüğü (Türkiye)

PC12 feokromasitoma hücresi (CRL-1721TM) - ATTC (A.B.D.)

B35 nöroblastoma hücresi - (CRL-2754TM) - ATTC (A.B.D.)

3.2. Yöntem

3.2.1. Altın Nanopartiküllerin Sentezi ve Karakterizasyonu

Yaklaşık 50 nm boyuta sahip altın nanopartiküller çekirdek-büyütme (seeding-growth) yöntemi kullanarak 2 aşamada sentezlenmiştir. İlk aşamada yaklaşık 20 nm boyutunda çekirdek altın nanopartiküller elde edilerek ikinci aşamada ise bu çekirdeğin büyütülmesi ile yaklaşık 50 nm boyutunda altın nanopartiküllerin hazırlanmıştır.

3.2.1.1. Turkevich Metodu ile Çekirdek Oluşturma

Altın nanopartiküllerin eldesinde, tetrakloroaurik (III) asit trihidratın (HAuCl₄.3H₂O), sodyum sitrat (Na₃C₆H₅O₇.2H₂O) ile indirgenmesi esasına dayanan Turkevich ve arkadaşları tarafından ortaya konulmuş metot temel alınmıştır. Bu yöntemde indirgen maddenin etkisiyle Au⁺³ iyonları yüksüz altın atomları haline gelmektedir. Sitrat iyonları taneciklerin kararlı halde olmasını sağlayarak birbirlerine yapışmasını engellediği için sodyum sitrat miktarının değiştirilmesiyle nanopartikül boyutu değişmektedir. Bu amaçla, 50 mL ve 0,25 mM HAuCl₄.3H₂O çözeltisi yaklaşık 100°C'ye ısıtılarak kaynama sıcaklığına getirilmiştir. Daha sonra %1 (w/v) sodyum sitrat çözeltisinden 1,25 mL ilave edilerek yüksek hızda 10 dakika karıştırılmıştır. Sodyum sitratın eklenmesinin ardından renk değişimi gözlenmiş ve yaklaşık 10 dakikalık sürenin sonunda reaksiyon sonlandırılarak çekirdek altın nanopartiküller elde edilmiştir.

3.2.1.2. Perrault Metodu ile Altın Nanopartikül Eldesi

Turkevich metodu ile elde edilen altın çekirdek çözeltisinden 2 mL alınarak 0,25 mM'lık HAuCl₄.3H₂O çözeltisi içinde oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Daha sonra bu çözeltiye 800 µL 15 mM'lık sodyum sitrat (Na₃C₆H₅O₇.2H₂O) ve 800 µL 0,25 mM hidrokinon çözeltileri

aynı anda eklenerek 10 dakika 800 rpm'de karıştırılmıştır. Daha sonra oluşan altın nanopartiküller (AuNPs) 12000 rpm hızda çöktürülerek, deiyonize su içerisine alınmıştır.

Altın nanopartiküllerin boyut dağılımı ve zeta potansiyel analiz cihazı (Zetasizer Nano ZS, Malvern) ile ölçülmüştür. Altın nanopartiküllerin morfolojisi Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM), Geçirimli Elektron Mikroskopu (TEM) ve Çevresel Taramalı Elektron Mikroskopu (ESEM) ile izlenmiştir.

3.2.2. Doku İskelelerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Tez kapsamında kullanılan elektroğirme sistemi el yapımı bir sistem olup, bir adet yüksek voltaj kaynağı (Gamma High Voltage Research, Model ES40P-20W), bir adet şırınga pompası (NE-1000 Family of Programmable Syringe Pumps, Model NE-3000) ve toplayıcıdan oluşmaktadır. Doku iskelesi olarak ipek fibroin ve poliüretan polimerleri kullanılarak elektroğirme tekniği ile nanofiberler elde edilmiştir.

3.2.2.1. İpek Fibroin Nanofiberlerin Üretimi

Bu çalışmada Bursa Koza Birlik'ten alınan *Bombyx mori* ipeğinden elde edilen fibroin proteini kullanılmıştır. Bu amaçla ipek böceğinden (*Bombyx mori*) elde edilen kozalar parçalara ayrıldıktan sonra %0,5 (w/v) NaHCO₃ çözeltisi içerisinde 1 saat kaynatılmıştır. Serisin proteininin uzaklaştırılması için 3 kez distile su ile durulanmış ve oda sıcaklığında 24 saat liyofilizatörde kurutulmuştur. Kurutulmuş ipek fibroin, 1:2:8 mol oranında hazırlanmış olan CaCl₂/Etanol/H₂O çözeltisi içerisinde 70°C'de 1 saat boyunca çözdürülerek ipek fibroin çözeltisi elde edilmiştir. Diyaliz tüplerine (14 kDa MWCO) aktarılan ipek fibroin çözeltisi 3 gün boyunca deiyonize suya karşı diyaliz edilmiş ve diyaliz süresince aralıklı olarak deiyonize suyu değiştirilmiştir. Elde edilen sulu çözeltinin dondurarak kurutulmasıyla saf ipek fibroin eldesi sağlanmıştır. Elektroğirme prosesinden hemen önce, liyofilize ipek fibroin oda sıcaklığında formik asit içerisinde çözülerek, %20 (w/v) konsantrasyonunda fibroin elektroğirme çözeltisi elde edilmiştir. Daha sonra fibroin çözeltisi (%20 w/v) şırınga içerisine alınarak şırınga pompasına yerleştirilmiştir. 0,42 mL/h akış hızı ile 10-17 kV arasında farklı voltajlar uygulanmıştır. Yüksek voltaj kaynağı ve zıt yüklü elektrotlar yardımıyla elektriksel kuvvetlerin etkisi altında nanofiberler 13 cm mesafedeki alüminyum toplayıcı üzerinde elde edilmiştir. Fibroin fiberlerin eldesinde kullanılan elektroğirme parametreleri Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Fibroin nanofiberlerin oluşumunda kullanılan elektroğirme parametreleri

Elektroğirme Parametresi	Parametre Değerleri
Fibroin çözeltisi konsantrasyonu (w/v)	%20
Şırınga iğnesi iç çapı (ID) (mm)	0,41
Şırınga iğnesi dış çapı (OD) (mm)	0,72
Şırınga iğnesi ucuyla toplayıcı arası uzaklık (cm)	13
Enjeksiyon hızı (mL/h)	0,42
Eğirme Voltajı (kV)	17-20

3.2.2.2. Yönlendirilmiş Poliüretan Nanofiberlerin Üretimi

İşlenebilirliği kolay bir polimer olan poliüretanın yönlendirilmiş nanofiberlerinin eldesi üzerine çalışılmıştır. Bu amaçla poliüretan tetrahidrofurandimetilformamid (60:40 v/v) içerisinde çözdürülerek, %8 (w/v) konsantrasyonda elektroğirme çözeltisi hazırlanmıştır. Toplayıcı sistemi olarak aralarında 1,8 cm mesafe bulunan iki adet paralel bakır kullanılmıştır. Çizelge 3.2'deki elektroğirme parametreleri kullanılarak yönlendirilmiş poliüretan (PU) nanofiberler elde edilmiştir.

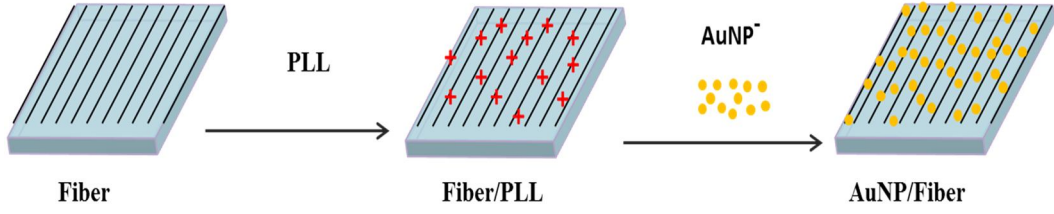
Çizelge 3.4. Poliüretan nanofiberlerin oluşumunda kullanılan elektroğirme parametreleri

Yönlendirilmiş Nanofiberlerin Elektroğirme Parametresi	Parametre Değerleri
Polimer çözeltisi konsantrasyonu (w/v)	%8
Şırınga iğnesi iç çapı (ID) (mm)	0,41
Şırınga iğnesi dış çapı (OD) (mm)	0,72
Şırınga iğnesi ucuyla toplayıcı arası uzaklık (cm)	17
Polimerin enjeksiyon hızı (mL/h)	0,48
Eğirme Voltajı (kV)	17
Paralel Levhalar Arası Uzaklık (cm)	1,8

3.2.2.3. Altın Nanopartiküllerin Nanofiber Yüzeylerine İmmobilizasyonu

Altın nanopartiküllerin fiber yüzeyine immobilizasyonundan önce fiberler katyonik polimer olan polietilenimin (PEI) veya poli-L-lizin (PLL) çözeltileri ile kaplanmıştır. Bu amaçla distile su içerisinde %0,1 (w/v) PEI çözeltisi hazırlanmıştır. Polimer çözeltisinin pH'sı 7,4'e ayarlanarak yan zincirlerdeki amin gruplarının yoğun olarak protonlanması sağlanmıştır. Daha sonra fiberler bu çözeltide 48 saat boyunca orbital çalkalayıcıda hafif hızda karıştırılmak suretiyle bekletilmiştir. Sürenin ardından fiberler altın nanopartikül çözeltisine (0,05 mg/mL) daldırılarak 24 saat boyunca etkileştirilmiştir. Fibroin nanofiberlerin PLL içerisinde çözünmesinin engellenmesi için glutaraldehit buharında 3 saat muamele ederek çapraz bağlanmıştır. Benzer şekilde fiber yapılar 0,05 mg/mL konsantrasyonda hazırlanan PLL çözeltisi içerisinde 48 saat boyunca orbital çalkalayıcıda hafif hızda karıştırılmış ve

fiberler daha sonra 24 saat boyunca altın nanopartikül çözeltisinde (0,05 mg/mL) bekletilmişlerdir.



Şekil 3.1. Altın nanopartiküllerin yüzeylere immobilizasyonunun şematik gösterimi

3.2.2.4. Nanofiberlerin Karakterizasyonu

Doku iskelelerinin morfolojileri taramalı elektron mikroskobu (SEM, Nova NanoSEM) ile incelenmiş ve fiberlerin ortalama çapları Image J programı kullanılarak ölçülmüş ve ortalaması alınmıştır.

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrofotometre (Thermo Scientific Nicolet™ iS™10 FT-IR) cihazının ATR ataçmanı kullanılarak (FTIR-ATR) poliüretan fiber yapılarından oluşan doku iskelesi yüzeylerin kimyasal karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Poliüretan fiber doku iskelesi yapıların yüzey ıslanabilirlikleri; yüzey temas açısı ölçüm cihazı (Attension Theta, Biolin Scientific) kullanılarak değerlendirilmiştir. Yüzeylerin temas açıları ölçümleri goniometre yardımı ile yüzeye damlatılan 4 µL suyun yüzey ile gerçekleştirdiği temas açısının ölçümü ile belirlenmiştir.

Nanofiberlerin hücre canlılığı üzerine etkisi, ISO 10993-5:2009(E) standardına göre indirekt sitotoksosite testi (MTT) ile değerlendirilmiştir. Bu amaçla hazırlanan nanofiberlerin sterilizasyonları 1 saat boyunca UV sterilizasyonu ile sağlanmıştır. Poliüretan ve altın nanopartikül immobilize poliüretan (AuNPs/PU) nanofiber iskeleler (1,8 x 1,8 cm²) 6 cm²/mL besi ortamı (%89 DMEM, %10 FBS, %1 L-glutamin ve %0,1 penisilin-streptomisin (v/v)) içerisinde 72 saat boyunca inkübatörde bekletilmiştir. Diğer taraftan L929 hücreleri 96 kuyucuklu doku kültür kabına (10⁴ hücre/kuyucuk) ekilerek 24 saat süresince inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra hücrelerin besi ortamı uzaklaştırılmış ve 72 saat inkübasyona bırakılan nanofiberlerin besi ortamı 96 kuyucuklu doku kültür kabına ekili hücreler üzerine aktarılmış ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra kuyucuklardaki besi ortamları uzaklaştırılarak, her bir kuyucuğa 50 µL MTT çözeltisi (1 mg/mL) eklenmiş ve 100 µL besi ortamı ilave edilmiş, 2,5 saat 37°C'de inkübe edilmiştir.

Daha sonra kuyucuklardaki besi ortamları uzaklaştırılmış ve 100 µL, 0,1 N HCl/izopropanol çözeltisi kuyucuklara eklenerek yarım saat karanlıkta bekletilmiş ve absorbans değerleri ölçülmüştür. Absorbans değerlerinden hücre canlılığı değerlerine geçilmiştir. Nanofiber ihtiva etmeyen kuyucuklardaki (negatif kontrol grubu) hücrelerin canlılığı %100 kabul edilip, diğer kuyucuklardaki yüzde (%) hücre canlılığı hesaplanmıştır. Deneyler 5 tekrarlı yapılmıştır.

3.2.3. Hücre Kültürü Deneyleri

Tez çalışmasında nöron benzeri farklılaştırma ve nöronal uzantıların izlenmesi için model hücre kaynağı olarak sıçan feokromasitoma (PC12) (CRL-1721TM, ATTC[®]) ve B35 nöroblastoma hücreleri (CRL-2754TM, ATTC[®]) ile çalışılmıştır. B35 hücrelerinin yüzeylere kolaylıkla tutunabilme özelliğine karşın; PC12 hücrelerinin polistiren yüzeylere kendiliğinden tutunarak çoğalma özelliği olmamasından dolayı, polistiren doku kültür kapları kollajen kaplanmıştır. Bu amaçla, kollajen tip IV, 0,1 M asetik asetik içerisinde çözülerek %0,01 w/v konsantrasyonda hazırlanmıştır. Daha sonra kollajen çözeltisi 75'lik flaska aktarılarak 1 gece boyunca 37°C' de inkübatörde bekletilmiştir. Sürenin sonunda kollajen çözeltisi uzaklaştırılarak Ca⁺² ve Mg⁺² içeren PBS ile yıkama yapılmıştır. Ardından 2 saat süresince UV altında flaskın sterilizasyonu gerçekleştirilmiş ve kollajen kaplı yüzeyler, hücrelerle temas ettirilmeden önce flask besi ortamı ile şartlandırılmıştır. Daha sonra sıvı azot kabından çıkarılan PC12 hücreleri ve B35 hücre hattını içeren dondurma ampulleri 37°C su banyosuna daldırılmış ve içeriğin buzlu kısmının ¾'ü çözülünceye kadar su banyosunda bekletilmiştir. PC12 hücreleri için, önceden 37°C' ye ısıtılmış RPMI 1640 besi ortamı (%10 inaktif at serumu ve %5 fetal sıgır serumu (FBS), %1 L-glutamin, %0,1 Penisilin-Streptomisin (v/v)) dondurma ampulüne damla damla ilave edilmiş ve ampul içeriği bir santrifüj tüpüne aktarılarak DMSO'nun uzaklaştırılması için +25°C'de 1300 rpm hızda 8 dakika santrifüj edilmiştir. B35 hücreleri için ise DMEM (4,5 g/L glikoz) besi ortamı, %10 FBS ve %0,1 Penisilin-Streptomisin (v/v) kullanılmış ve hücreler 1000 rpm değerinde 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifügasyonla çöktürülen hücrelerin süpernatantları uzaklaştırıldıktan sonra hücre pelleti homojenize edilmiştir. Serumlu besi ortamının ilave edilmesiyle elde edilen hücre süspansiyonu 75 cm² kültür kabına alınarak 37°C' de %5 CO₂'li inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır ve her iki günde bir besi ortamları değiştirilmiştir. Farklı olarak PC12 hücreleri kollajen kaplı kültür kaplarında kültür edilmiştir. Doku kültür kaplarında çoğaltılan hücreler, ters ışık mikroskopunda incelenerek,

hücrelerin %70 oranında yüzeyi kapladığı görüldüğü zaman hücreler pasajlanmıştır. Farklı pasajlardaki hücreler sıvı azot ortamında ileriki deneylerde kullanılmak üzere saklanmıştır.

3.2.4. Sinir Büyüme Faktörü ve Elektriksel Uyarımın Aksonal Uzunlamaya Etkisi

3.2.4.1. Sinir Büyüme Faktörü (NGF) Konsantrasyonunun Etkisi

NGF'nin aksonal uzunlamaya etkisi için iki farklı konsantrasyon (50 ng/mL ve 100 ng/mL) seçilmiştir. PC12 hücreleri (P/3), 3×10^5 hücre/cm² ve B35 hücreleri (P/23) ise 1×10^4 hücre/cm² yoğunluğunda 6 kuyucuklu doku kültür kaplarına ekilmiştir. Hücrelerin 24 saatlik inkübasyondan sonra farklı konsantrasyonlardaki NGF çözeltisi kültür ortamına eklenerek, PC12 hücrelerinin 6 gün boyunca; B35 hücrelerinin ise 4 gün boyunca kültürü sağlanmıştır. Kontrol grubuna ise NGF eklenmemiştir.

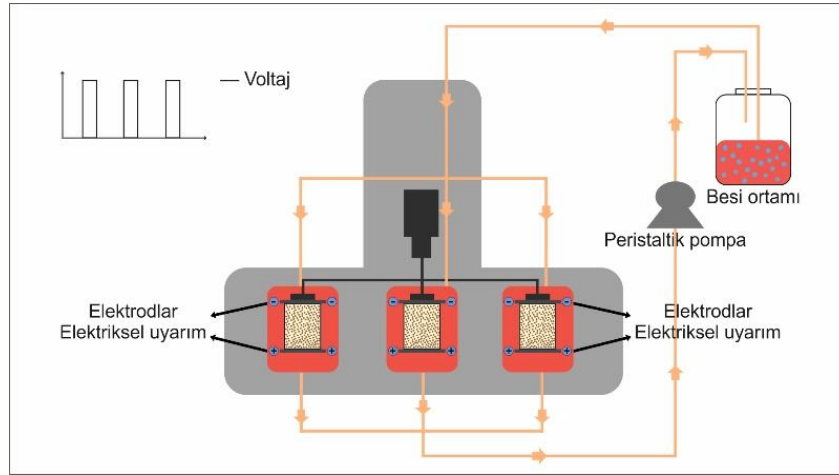
3.2.4.2. Doku İskelelerinde NGF Uyarımının Etkisi

PU nanofiberler ve altın nanopartiküller ile modifiye edilmiş PU nanofiberler (AuNPs/PU) UV ile sterilize edildikten sonra pasaj sayısı 3 olan PC12 hücreleri, 3×10^5 hücre/cm² yoğunluğunda doku iskeleleri üzerine ekilmiştir. B35 hücreleri (P/23) ise 1×10^4 hücre/cm² yoğunluğunda ekilmiştir. NGF konsantrasyonu PC12 hücreleri için 50 ng/mL ve B35 hücreleri için 100 ng/mL olarak kültür ortamına uygulanmıştır. NGF uygulanmayan örnekler ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

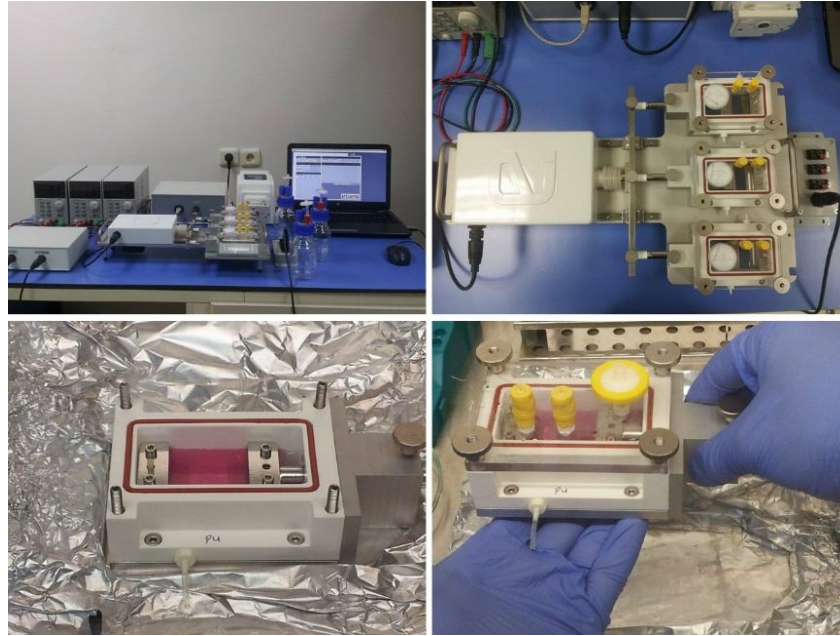
3.2.4.3. Doku İskelelerinde NGF ve Elektriksel Uyarımın Sinerjik Etkisi

Kültür ortamına elektriksel uyarım için Şekil 3.2 ve 3.3'de verilen bilgisayar kontrollü bir biyoreaktör sistemi kullanılmıştır. Bu sistem, kültür boyunca elektriksel pulsun frekans ve genliği elektronik olarak bir yazılım tarafından kontrol edilen, kare dalga formunda bir uyarım sağlamaktadır.

UV steril altın nanopartiküller ile modifiye edilmiş AuNPs/PU nanofiberler reaktörün içine yerleştirilmiştir (Şekil 3.3). Farklılaştırılmadan önce nöritsiz olan ve farklılaştırıcı etkisiyle B35'lere kıyasla daha uzun nöritlere sahip olma yeteneğinde olan PC12 hücreleri kullanılmıştır. PC12 hücreleri (P/3), 3×10^5 hücre/cm² yoğunluğunda doku iskeleleri üzerine ekilerek 1 gün boyunca kültür edilmiştir. 24 Saatlik başlangıç periyodundan sonra hücrelere uyarıcı faktörler uygulanmıştır. NGF (50 ng/mL) ile birlikte inkübasyon süresince günde 1 saat süreyle 100 mV, 100 Hz frekansta ve kare dalga formunda gerilim uygulanmıştır. Hücrelerin inkübasyonun 4. gününde örnekler biyoreaktör ortamından çıkarılarak, farklılaşmaları incelenmiştir. Farklılaştırıcı stimülasyonların uygulandığı hücreler düşük serumlu (%2 Fetal Sığır Serum) besi ortamı içerisinde inkübe edilmiştir.



Şekil 3. 2. Biyoreaktör sisteminin şematik gösterimi



Şekil 3. 3. Biyoreaktör sistemine ait görüntüler

3.2.5. Hücre Farklılaşmasının Karakterizasyonu

3.2.5.1. Hücre Davranışlarının SEM ile İncelenmesi

Hücrelerin morfoloji ve boyutları SEM görüntülemeyle incelenmiştir. SEM protokolü uygulanacak örnekler, 30 saniye Ca^{+2} Mg^{+2} içermeyen PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra örnekler %2,5 (w/v) glutaraldehit çözeltisi içerisinde 30 dakika bekletilerek fikse edilmiştir. Fiksasyondan sonra örnekler 3 defa PBS ile yıkandıktan sonra artan derecelerdeki alkol serilerinde (%25 etanol, %50 etanol, %70 etanol, %75 etanol, %90 etanol, %95 etanol) 10'ar dakika bekletilmişlerdir. Daha sonra heksametildisilazan (HMDS) çözeltisinde 10 dakika

bekletilmelerinin ardından, örnekler kurumaları için oda sıcaklığında 30 dakika tutulmuştur. Kuruma tamamlandıktan sonra örnekler +4°C'de saklanmış ve taramalı elektron mikroskopunda incelenmiştir.

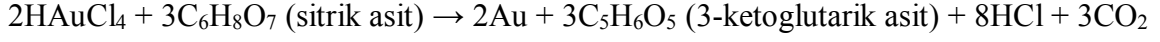
3.2.5.2. Hücrelerde Aksonal Uzamanın İmmünofloresan İncelenmesi

Hücrelerin besi ortamı pipet yardımıyla uzaklaştırıldıktan sonra Ca^{+2} , Mg^{+2} içeren PBS ile 2 kez yıkama yapılmıştır. Örnekler %0,7'lik glutaraldehit çözeltisi 10 dakika boyunca çalkalayıcıda tutularak fikse edilmiştir. Sürenin sonunda glutaraldehit çözeltisi uzaklaştırılmış ve Ca^{+2} Mg^{+2} içeren PBS ile 2 defa yıkanmıştır. Glutaraldehyitten gelen aldehitlerin uzaklaştırılması amacıyla örnekler 50 mM NH_4Cl ile 7 dakika boyunca çalkalayıcıda tutularak muamele edilmiştir. Geçirgenlik basamağı olarak %0,2'lik PBS triton x-100 eklenerek 5 dakika çalkalayıcıda inkübe edilmiş ve bu işlem tekrarlanmıştır. Daha sonra Ca^{+2} , Mg^{+2} içermeyen PBS ile 1-2 dakika yıkama yapılmıştır. Antikor çözeltisi için 6,6 μM konsantrasyonda 1:50 seyreltme oranında Alexa Fluor 488 phalloidin aktin filament boyama antikor ve 1:500 seyreltmede 10 μM konsantrasyonda DAPI antikor %1'lik BSA'lı PBS çözeltisi içerisinde hazırlanmıştır. Karanlık ve nemli odacık içerisine alınan örnekler üzerine hazırlanan antikor çözeltisi eklenerek 40 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Sürenin sonunda örnekler Ca^{+2} Mg^{+2} içermeyen PBS ile 10 dakika bekletilerek yıkanmış ve 3 defa bu işlem tekrarlanmıştır. Lamlar üzerine kapatma ortamı konulduktan sonra hücre ekili lameller lamaların üzerine yerleştirilmiştir. Karanlık odacığa alınan hücreli yüzeyler oda sıcaklığında 1 gece bekletilmelerini takiben +4 °C'ye alınmış ve floresan mikroskop ile incelenmiştir. Hücrelerde nörit uzunlukları aksonların uç kısmından, hücre gövdesi-nörit (akson) başlangıcı arasındaki bağlantı noktasına kadar çizgisel uzaklık ile ImageJ programı kullanılarak ölçülmüştür.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Altın Nanopartiküllerin Sentezi

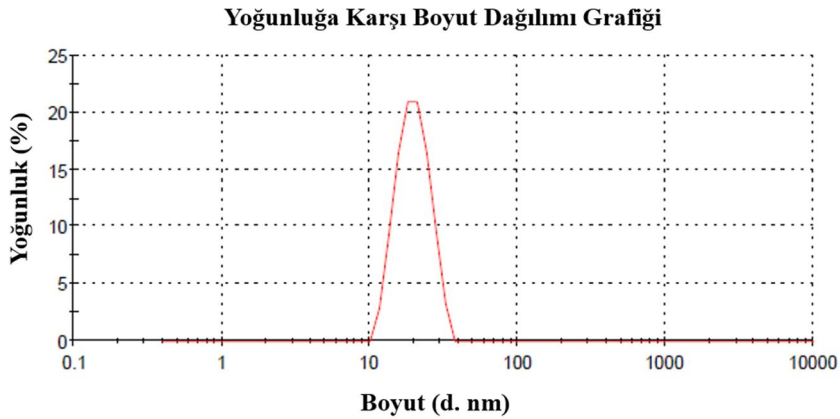
Turkevich metodunda aurik klorürün trisodyum sitrat indirgenmesi ile yaklaşık 20 nm çapında çekirdek altın nanopartiküller üretilmiştir.



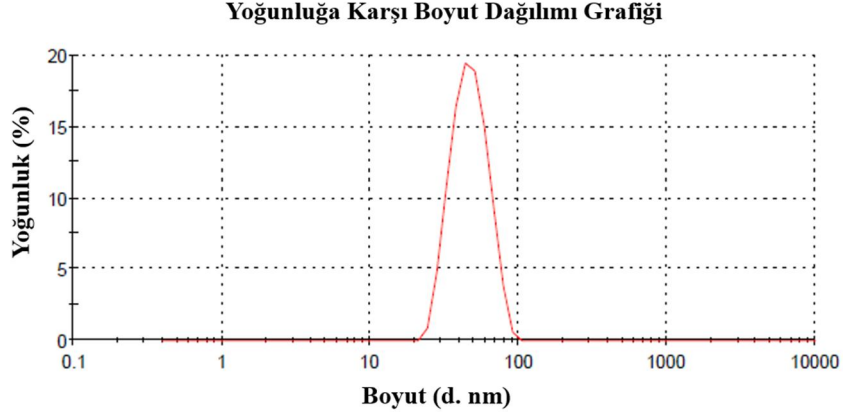
Turkevich metodu kullanılarak elde edilen çekirdek altın nanopartiküllerin ortalama çapı 20 nm, polidispersite indeksi (PDI) 0,046, zeta potansiyeli -14,6 mV olarak bulunmuştur (Çizelge 4.1). Perrault metodu (çekirdek-büyütme) kullanarak büyütülen altın nanopartiküllerin (AuNPs) polidispersite indeksi (PDI) 0,070, zeta potansiyeli -30,3 mV ve ortalama partikül büyüklüğü 50 nm olarak bulunmuştur. Her iki yöntemle sentezlenmiş nanopartiküllerin dar boyut dağılımında (Şekil 4.1 ve 4.2) yani düşük polidispersitede olması uniform olarak elde edildiklerini göstermektedir. Ancak ortalama 50 nm çapa sahip AuNPs'lerin süspansiyonda daha kararlı oldukları gözlenmiş olup partiküllerin zeta potansiyel değeri de (-30,3 mV) bunu doğrulamaktadır.

Çizelge 4.1. Altın nanopartiküllerin özellikleri

	Partikül çapı (nm)	PDI	Zeta Potansiyel (mV)
Turkevich Metodu	20	0,046	-14,6
Perrault Metodu	50	0,070	-30,3

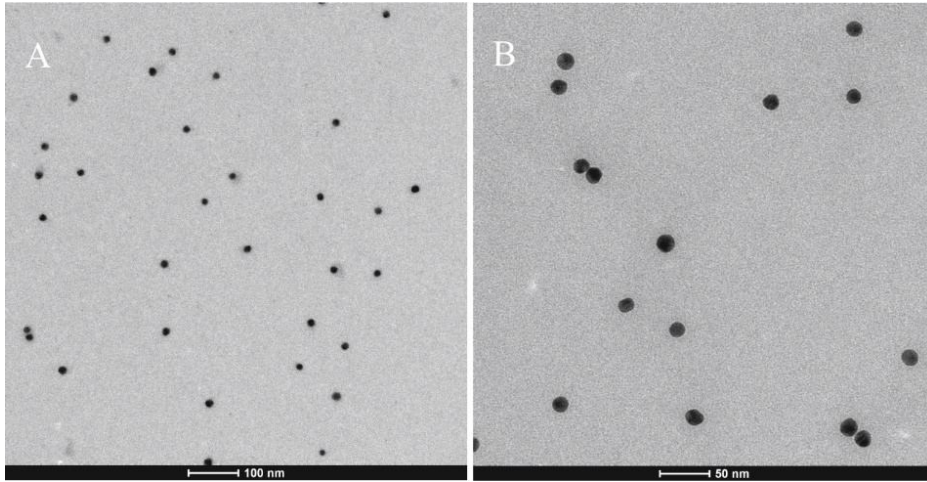


Şekil 4.1. Turkevich metodu ile üretilen çekirdek altın nanopartiküllerin (20 nm) boyut dağılımı grafiği

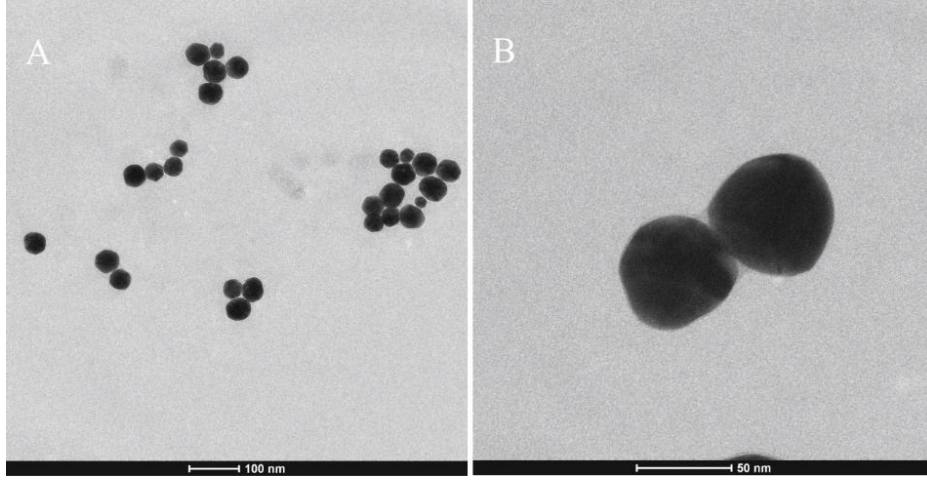


Şekil 4.2. Perrault metodunda ile üretilen altın nanopartiküllerin (50 nm) boyut dağılımı grafiği

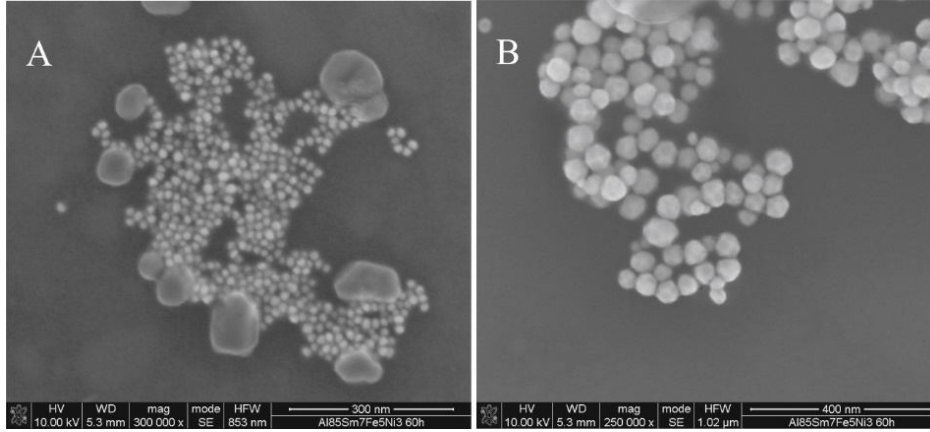
TEM görüntülerinde altın nanopartiküllerin çoğunlukla küresel morfolojide olduğu görülmüştür. Turkevich metoduyla sentezlenen altın nanopartiküllerin TEM görüntüleri Şekil 4.3'de, Perrault metoduyla üretilen AuNPs'lerin TEM görüntüleri ise Şekil 4.4'de verilmiştir. Şekil 4.5'te ise ortalama 20 nm ve 50 nm çapındaki altın nanopartiküllerin çevresel SEM görüntüleri verilmiştir.



Şekil 4. 3. Çekirdek altın nanopartiküllerin TEM görüntüleri, (A) 100 nm skala, (B) 50 skala



Şekil 4. 4. Çekirdek-büyütme metoduyla üretilen AuNPs'lerin TEM görüntüleri (A) uzak görüntü, (B) yakın görüntü



Şekil 4. 5. Altın nanopartiküllerin ESEM görüntüleri, (A) 20 nm ve (B) 50 nm AuNPs

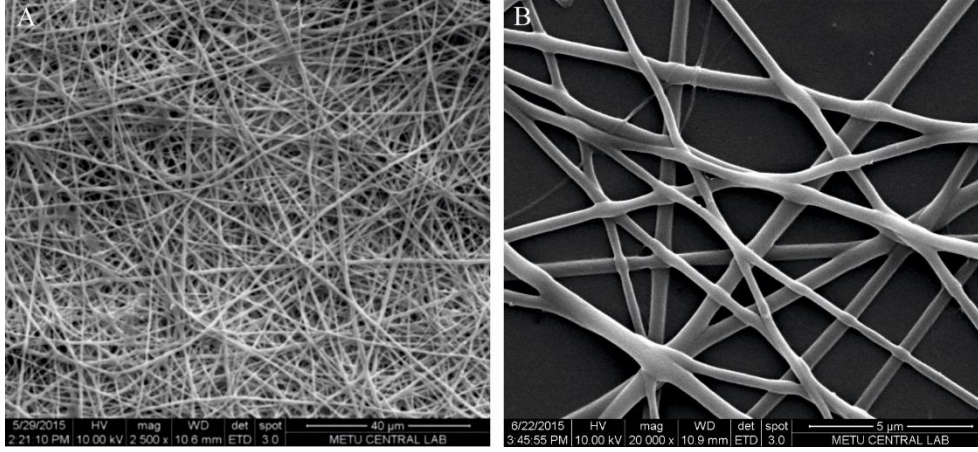
4.2. Elektroeğirilmiş Doku İskeleleri

Bombyx mori tırtıllarının kozalarından elde edilen protein bazlı ipek fibroin biyopolimeri, eşsiz mekanik özellikleri, biyouyumluluğu, yavaş proteolitik biyobozunma profili ve işlenebilirliği ile doku mühendisliği uygulamalarının geliştirilmesinde doku iskelesi materyali olarak oldukça dikkat çekicidir [47, 57-59]. Cerrahi ve doku mühendisliği uygulamaları için FDA tarafından onaylanmış olan ipek fibroin, yapısında hücre adezyonu, migrasyonu ve proliferasyonunu teşvik eden RGD sekanslarından oluşan peptidler içerir [57, 59, 60]. Ayrıca literatürde ipek fibroin sinir kondütlerinin periferik sinir rejenerasyonu için gerekli spesifik hızda bozunabildiği bildirilmiştir [25]. Bu tez çalışmasının ilk aşamasında bu avantajları göz önüne alınarak ipek fibroin tercih edilmiştir.

Nanofiberlerin eldesinde ipek fibroin konsantrasyonunun fiber oluşumunda kritik olduğu bilinmektedir. Zhang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, %39 (w/v) gibi yüksek konsantrasyonlarda çözelti kullanımının, fiberlerin toplayıcıya ulaşmasından önce çözücünün yavaş buharlaşmasına bağlı olarak düzensiz ve kıvrık biçimde olmasına neden olabileceğinden bahsetmişlerdir [46].

Fiber formasyonunu etkileyen proses değişkenleri; kullanılan elektrik potansiyeli büyüklüğü, polimer çözeltisinin akış hızı, kapiller ucu ile toplayıcı arasındaki uzaklıktır. Artan elektriksel potansiyelin etkisi, çözeltinin yüzey geriliminin aşılmasında etkili olup, yüksek değerlerde fiber jetinde damlacıklar oluşturarak, fiber uzantıları boyunca, ipek makromolekülleri arasındaki etkileşimi azaltan boncuk oluşumuna sebep olabilir. Ayrıca artan elektrik potansiyeli çözücünün buharlaşması için gereken zamanı kısaltarak daha fazla oranda kıvrık biçimde fiber yapılarının oluşumuyla da sonuçlanabilir. Genel olarak artan voltaj değerleri fiber çapında artışla sonuçlanmaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda, kapiller ucu ile toplayıcı arasındaki uzaklık arttığında ise fiber çapında azalış görüldüğü belirtilmiştir. Polimer çözeltisinin akış hızı, spineretin ucundaki çözeltinin hacmini doğrudan etkileyerek sürekli fiber jeti oluşumu açısından önem arz eden Taylor konisinin şeklini etkiler. Ortamın sıcaklık ve nemlilik değerleri de elektroğirmeyi etkileyen çevresel etkenlerdir.

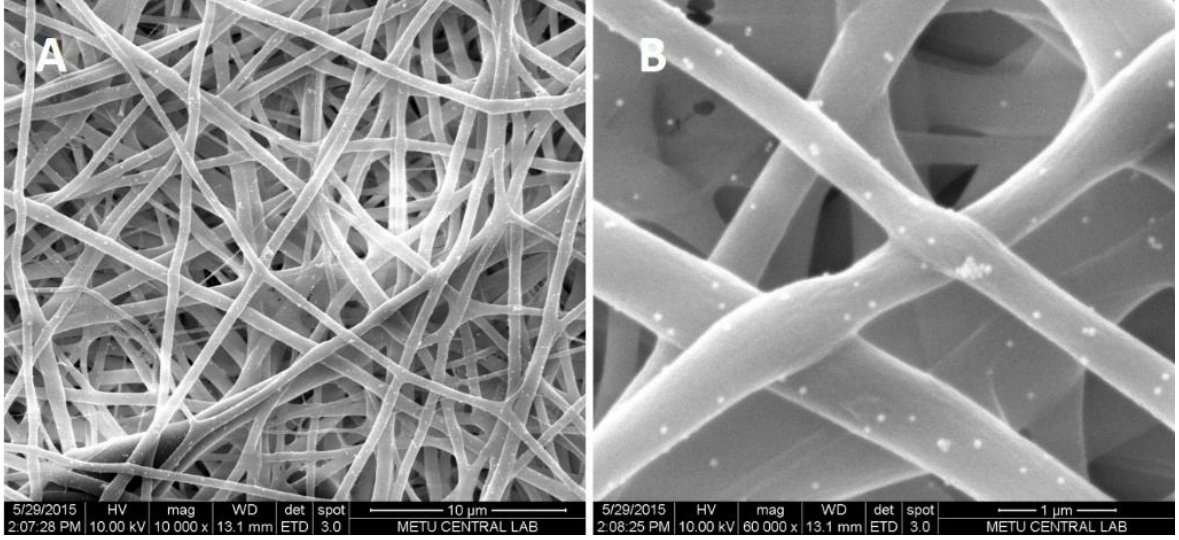
Bu çalışmada, ipek fibroin nanofiberlerin eldesi, elektroğirme tekniği ile ipek fibroin (%20 w/v) çözeltisi kullanılarak 0,42 mL/h akış hızında, 13 cm toplayıcı mesafesinde ve 17-20 kV arasında voltajlar uygulanarak sağlanmış ve fibroinin kararlı hale geçirilmesi için glutaraldehit buharında muamele ederek çapraz bağlanmış. Şekil 4.6'da elde edilen ipek fibroin nanofibröz yüzeylere ait SEM görüntüleri verilmiştir. Yapılan gözlemler sonucunda, çözelti konsantrasyonunun eğrilebilirliği, fiber çapında ve yapının homojenitesinde etkili olduğu görülmüştür. İpek fibroin nanofiber eldesi için %20 (w/v) çözelti konsantrasyonunun uygun olduğu ve kullanılan diğer elektroğirme parametreleri ile birlikte düzgün, uniform, boncuksuz fiber üretimi sağlanmıştır. Bu konsantrasyonda ortalama 607 ± 71 nm çapa sahip fiberler elde edilmiştir. Farklı çözücü kullanımının fiber çaplarını değiştirdiği literatürde bildirilmiştir [46].



Şekil 4. 6. İpek fibroin nanofiberlerin SEM görüntüleri (A) 2500x, (B) 20000x

Yönlendirilmiş nanofiberlerin, döner toplayıcılar, metal çerçeveler, desenli elektrotlar, akan su banyoları ve manyetik alan destekli elektrotlar yardımıyla eldesi mümkündür. Yönlendirilmiş fiber doku iskeleleri, istenilen anizotropide hücrelerin gelişimine kılavuzluk etmeleri açısından oldukça önemlidir. Bu amaçla yönlendirilmiş nanofiberlerin üretimi için toplayıcı sistem olarak iki adet paralel bakır plaka elektroerme sistemine uyarlanmıştır.

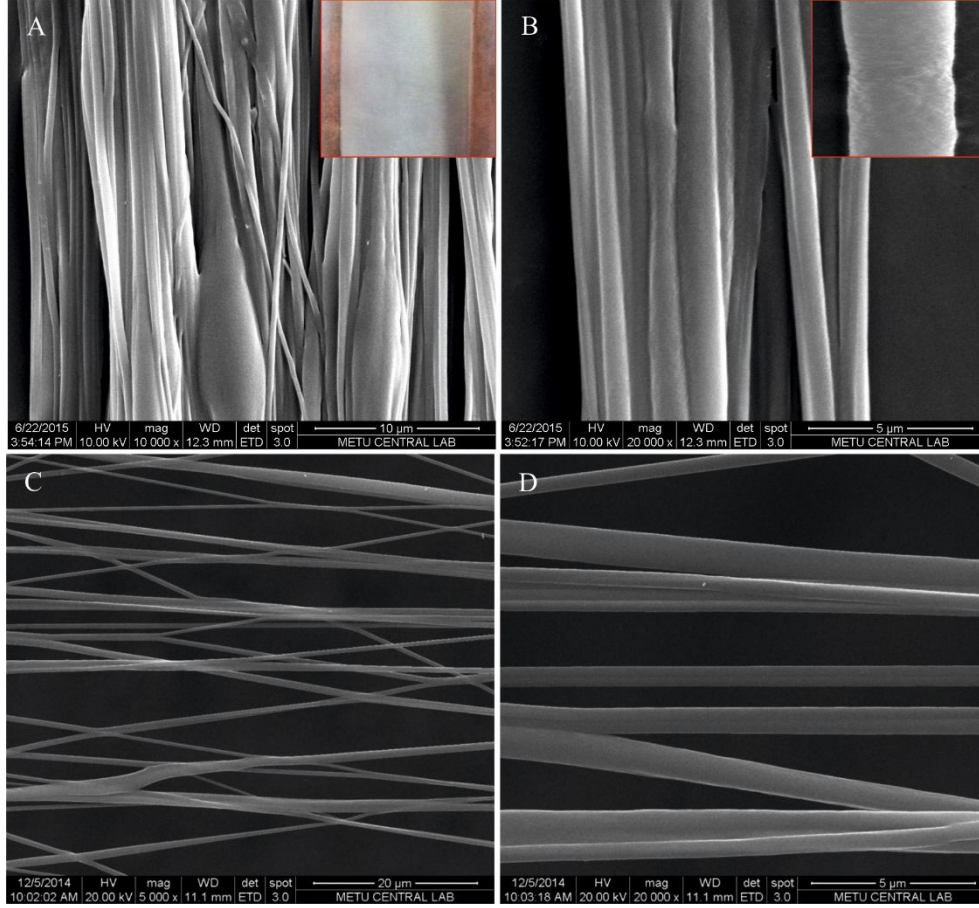
Altın nanopartiküller, doku iskeleleri yapılarına matris iletkenliğinin ve hücreler arası elektriksel sinyal iletiminin artırılması amacıyla eklenmektedir. Son çalışmalarda doku iskelesi yapılarına altın nanopartiküller gibi inorganik yapıların katılmasının materyalin adeziv ve mekanik özelliklerinin etkilenmesi ile hücre yönlendirilmesi için anahtar rol oynayacağı önerilmiştir [8]. Bu çalışmada yüzey topografisinin hücre yönlendirilmesini teşviki için yönlendirilmiş fiberlere basit bir yaklaşımla altın nanopartiküllerin immobilizasyonu ile altın nanopartiküllü fibröz doku iskelelerinin eldesi çalışılmıştır. Ancak işlenebilirliği zor doğal bir polimer olan ipek fibroin ile yönlendirilmiş nanofiberlerin eldesi sağlanamamıştır. Şekil 4.7’de altın nanopartiküllerin elektrostatik etkileşim aracılığıyla dekore edildiği ipek fibroin yüzeylerin SEM görüntüsü verilmiştir. Elektroerme ve karakterizasyon çalışmalarının sonucunda rastgele yönelimli fibroin nanofiberler elde edildiği görülmüştür. Literatürde, ipek nanofiberlerin elektroerme tekniği ile düşük kristalinite ve mekanik değerlerde üretilebilmelerinden dolayı toplayıcı üzerinde genellikle düzensiz dizilimli yüzeyler halinde elde edildiği bildirilmiştir [61]. Sonuç olarak, yönlendirilmiş fiberlerin aksonal gelişimine katkıları bilindiğinden eğinebilirliği iyi bilinen sentetik bir polimer olan poliüretan ile yönlendirilmiş nanofiberlerin eldesi çalışmalarına devam edilmiştir.



Şekil 4. 7. AuNPs/Fibroin nanofiberlerin SEM görüntüleri (A) AuNPs/Fibroin nanofiberler (10000x) ve (B) AuNPs/Fibroin nanofiberler (60000x)

Elektroegirme duzeneğinde yüksek yüzey yüküne sahip polimer jetinin karmaşık olarak bükülmesi düz bir toplayıcı üzerinde nanofiberlerin rastgele düzende toplanmasına sebep olur. Toplayıcı olarak paralel levhalar arasındaki boşluğun kullanıldığı elektroegirme duzeneğinde yönlendirilmiş nanofiberler üretilebilmektedir. Bu yöntemde elektriksel olarak iletken olan substratların arasındaki iletken olmayan kısma fiberler dizilmektedir. Elektroegirilmiş fiberlerdeki yük, toplanan fiberler arasındaki birbirini itme etkisi oluşturarak, fiberlerin hizalanmış şekilde toplanmasını sağlamaktadır. Paralel levhalar yardımıyla yönlendirilmiş fiberler, kolaylıkla diğer katı substratlar üzerine transfer edilebilmektedir. Bu çalışmada, %8 (w/v) poliüretan çözeltisi tetrahidrofurana/dimetilformamid (60:40 v/v) içerisinde hazırlanarak elektroegirilmiştir.

Toplayıcı olarak 1,8 cm aralıkla yerleştirilmiş iki adet paralel levha, şırınga iğnesi ucuyla toplayıcı arası uzaklık 17 cm, enjeksiyon hızı 0,48 mL/h ve egirme voltajının 17 kV olduğu elektroegirme koşullarında yönlendirilmiş poliüretan nanofiberler elde edilmiştir. Fiber morfolojisi ve çapları SEM görüntüleri ile analiz edilmiştir. Şekil 4.8’de izleneceği gibi boncuksuz, homojen düzgün yapılı, yönlendirilmiş ve ortalama 519 ± 56 nm çapa sahip olan poliüretan nanofiberler başarıyla elde edilmiştir. Tezin bundan sonraki aşamalarında poliüretan fiberlerin kullanılmasına karar verilmiştir. Tezin ileriki araştırmalarında bu derişimdeki yönlendirilmiş nanofiberler “PU” olarak anılacaktır.



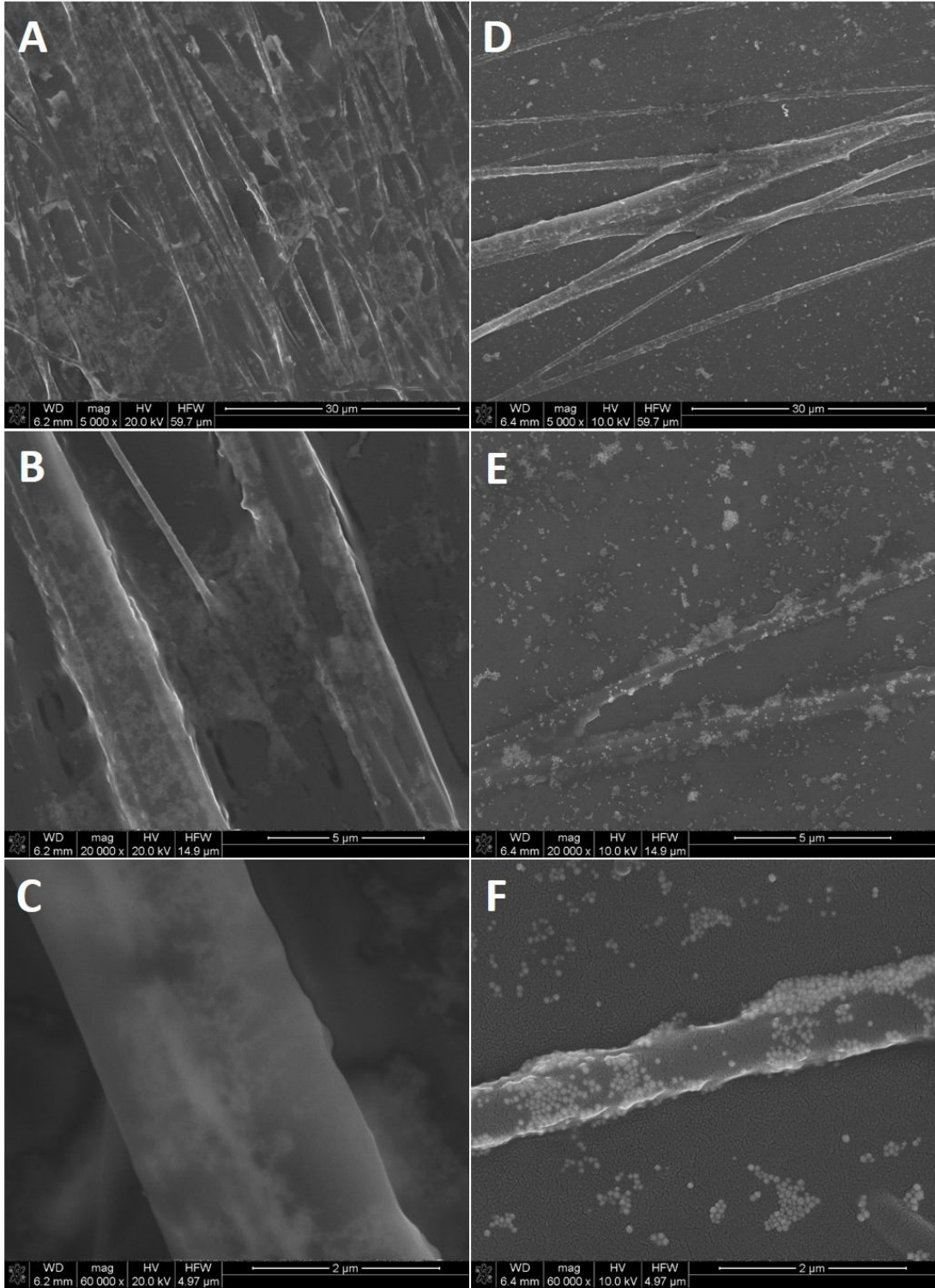
Şekil 4. 8. Yönlendirilmiş PU nanofiberlerin SEM görüntüleri; (A) 10000x objektif büyütmesi, (B) 20000x objektif büyütmesi, (C) 5000x objektif büyütmesi ve (D) 20000x objektif büyütmesi

Nanopartiküllerle yüzeylerin kaplanmasında yaşanan en büyük problemlerinden birisi nanopartiküllerin agregasyonudur. Altın nanopartiküllerin agregasyonu, nanopartiküllerin boyutlarına bağlı fiziksel ve kimyasal niteliklerini kaybetmelerine neden olmaktadır [52]. Altın nanopartiküllerin koloidal çözeltilerinden katı polimerik fiber yüzeyler üzerine agregasyon olmadan dekore edilmesi için PEI ve PLL olmak üzere iki farklı katyonik polimer kullanılmıştır.

Bu amaçla yönlendirilmiş PU nanofiberler 48 saat boyunca katyonik PEI çözeltisinin içerisinde bekletilerek, Turkevich ve çekirdek-büyütme metodlarıyla elde edilen 20 nm ve 50 nm boyutlarındaki negatif yüklü altın nanopartiküller, PEI kaplı ile nanofiberler ile 24 saat süresince etkileştirilmiştir. Şekil 4.9'da PEI (pH 7.4) aracılığı ile etkileştirilmiş altın nanopartiküllerle kaplı yönlendirilmiş PU nanofiberlerin SEM görüntüleri verilmiştir.

Altın nanopartiküllerle kaplı fiberler incelendiğinde, 20 nm boyutundaki nanopartiküllerin fiber yüzeylerine homojen olarak kaplanmadığı, çözeltide kararlı olmadığı için çökerek fiziksel şekil ve boyutlarını kaybettiği görülmüştür. Bu durumun aksine, 50 nm boyutundaki partiküllerin özelliklerini koruduğu ve fiber yüzeylerine homojen olarak kaplandığı gözlenmiştir. Literatürdeki çalışmalarda, çekirdeklenme ve büyüme proseslerinin farklı zamanlarda gerçekleştirilmesi stratejisine dayalı olan “çekirdek-büyütme” tekniği ile Au⁺³ iyonlarının sitratla indirgenmesine kıyasla daha kararlı ve iyi morfolojik özelliklere sahip altın nanopartiküllerin elde edildiği ifade edilmiştir [62]. Bu nedenle fiberlerin 50 nm boyutundaki altın nanopartiküller ile dekore edilmesine karar verilmiştir.

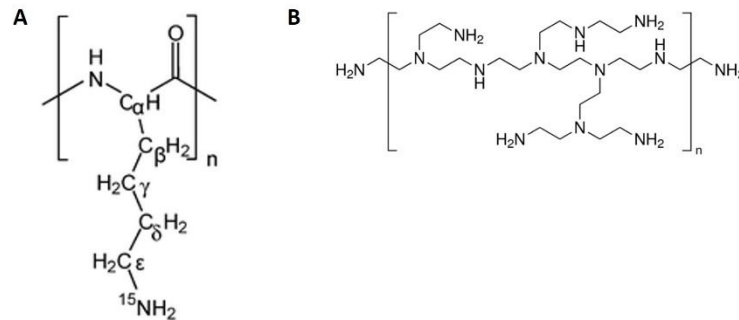
Altın nanopartiküllerin yüzeye immobilizasyon işleminde PEI'ye alternatif olarak katyonik bir polimer olan PLL ile çalışmalar tekrarlanmıştır.



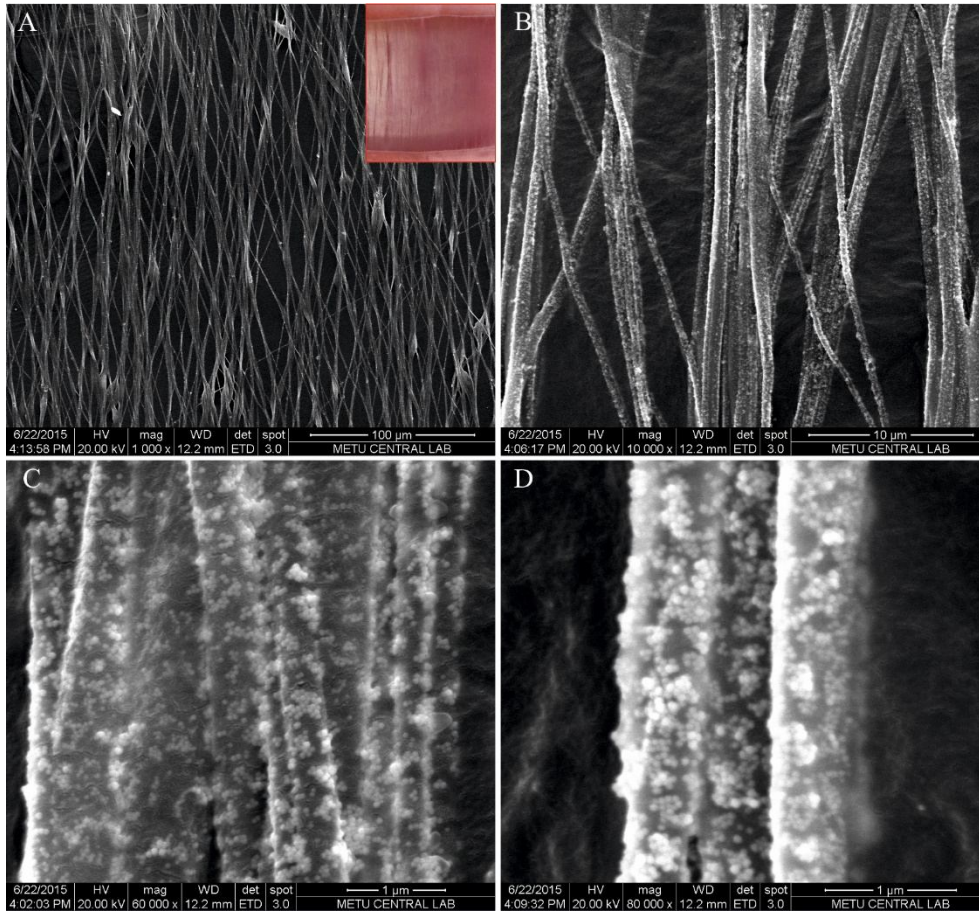
Şekil 4. 9. PEI aracılığı ile AuNPs immobilize edilmiş PU fiberlerin SEM görüntüleri; (A) 20 nm altın nanopartikül 5000x, (B) 20 nm altın nanopartikül, 20000x, (C) 20 nm altın nanopartikül, 60000x, (D) 50 nm AuNPs, 5000x, (E) 50 nm AuNPs, 20000x, (F) 50 nm AuNPs, 60000x

Katyonik PLL, altın nanopartiküllerin yüzeylere immobilize edilmesinde bağlayıcı görevi görebilen bir polimerdir. Çok sayıda amin (-NH₂) grubu içeren PLL zincirlerinde altın nanopartiküllerle kendiliğinden etkileşme yeteneğinde olduğundan bağlayıcı ajan olarak kullanılmaktadır. Negatif yüklü altın nanopartiküller PLL üzerindeki pozitif yüklü yüzeylerle elektrostatik olarak etkileşmektedir [52, 63, 64]. Yüzeylerin, katyonik PLL aracılığıyla altın nanopartiküllerle kaplanması sensör çalışmalarında kullanılmış olup, henüz nanofiberlere uygulanmamıştır.

Bu amaçla, PLL (0,05 mg/mL) çözeltisi içerisinde 48 saat boyunca pozitif yüzey yükü ile kaplanan nanofiberler, daha sonra 50 nm boyutundaki altın nanopartiküllerle 24 saat etkileştirilmiş ve AuNPs dekore nanofiberler elde edilmiştir. Şekil 4.11’de görüldüğü gibi PLL ile altın nanopartiküller homojen olarak PU fiberler üzerine dizilimi gerçekleştirilmiştir. PLL polimeri aracılığıyla yapılan çalışmalarda PEI ile yapılan çalışmalara kıyasla fiber yüzeylerinde homojen ve yoğun nanopartikül dizilimi sağlanmıştır. Her iki polimerin yapılarında -NH₂ gruplarına sahip olmalarına rağmen altın nanopartikül immobilizasyonunda farklılık göstermesinin stereokimyasal farklılıklarından ve hidrofilik özellikteki PLL’nin oldukça serbest amino gruba sahip olmasından dolayı PEI’ye kıyasla altın nanopartiküllerle daha kolay etkileşmiş olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. PEI ve PLL’nin kimyasal yapıları Şekil 4.10’da verilmiştir. Literatürde altın nanopartikül kaplamanın kalınlığı ve homojenitesinin kullanılan polikasyonun cinsine bağlı olduğu bildirilmiştir [52].



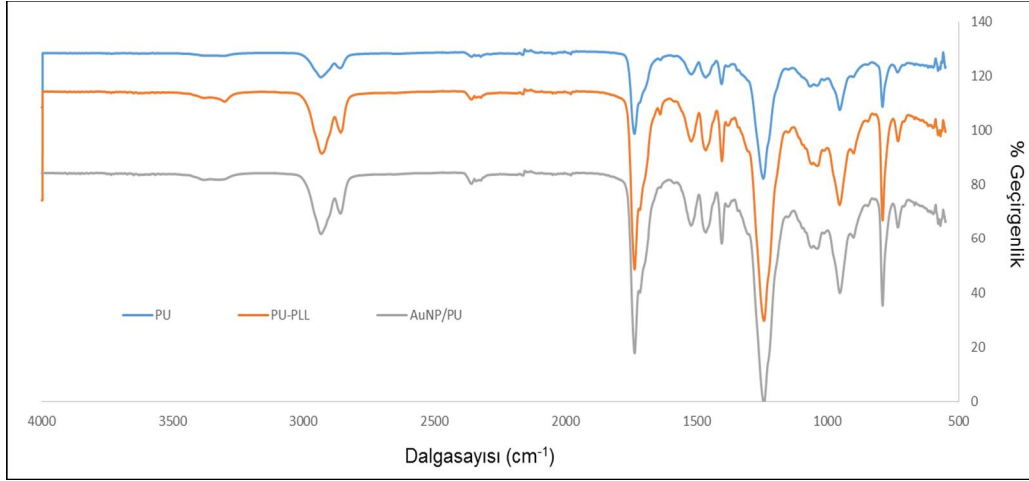
Şekil 4. 10. PLL ve PEI’nin kimyasal yapıları; (A) PLL ve (B) PEI.



Şekil 4. 11. PLL aracılığı ile AuNPs immobilize edilmiş PU fiberlerin SEM görüntüleri; (A) 1000x objektif büyütmesi, (B) 10000x objektif büyütme (AuNPs, 50 nm)

4.2.1. Doku İskelelerinin Özellikleri

Poliüretan nanofiberlerin karakterizasyonu için ATR-FTIR, kontakt açısı ölçümü ve indirekt sitotoksisite testi ile gerçekleştirilmiştir. PU-PLL ve AuNPs/PU yapılarının Şekil 4.12’de görülen ATR-FTIR analizi sonucunda poliüretanın FTIR sonucuna paralel pikler gözlenmiştir. N-H geniş gerilme titreşimi $2935-2858\text{ cm}^{-1}$ bölgesinde; CH_2 gerilimi ile ilişkili orta şiddette pikler $1455-1400\text{ cm}^{-1}$ bölgelerinde; aromatik CH titreşimlerinin frekansları 787 cm^{-1} ’de görülen poliüretanın karakteristik bantlarıdır. Poliüretan polimerin FTIR spektrumunda karbamat (R-O-C(=O)-NHR) içerisindeki C=O bağının güçlü gerilmesiyle ilişkili olarak 1732 cm^{-1} bölgesinde güçlü absorpsiyon piki görülür. Alkil eterin karakteristik bantları C-O-C 1250 cm^{-1} bölgesinde gözlenmiştir. Ayrıca PU-PLL spektrumunda PU’dan farklı olarak $3100-3200\text{ cm}^{-1}$ bölgelerinde poli-L-lizin’in dar $-\text{NH}_2$ primer amit titreşimleri gözlenmiştir.



Şekil 4.12. Poliüretan nanofiberlerin ATR-FTIR Spektrumu

Nanofiber yüzeylerin temas açısı ölçüm değerleri ve görüntüleri Şekil 4.13'te verilmiştir. PU fiberlerin temas açısı $155,9^\circ \pm 8,6$ derece olarak hesaplanmıştır. Kullanılan Carothane[®] alifatik termoplastik poliüretanın temas açısı ölçümleri literatürde 125° olarak belirtilmiştir. Yapının fiber formunda olması ve yüzey pürüzlülüğünün artmasına bağlı olarak yüzey temas açısının arttığı Sirivisoot ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada da belirtilmiştir [65].

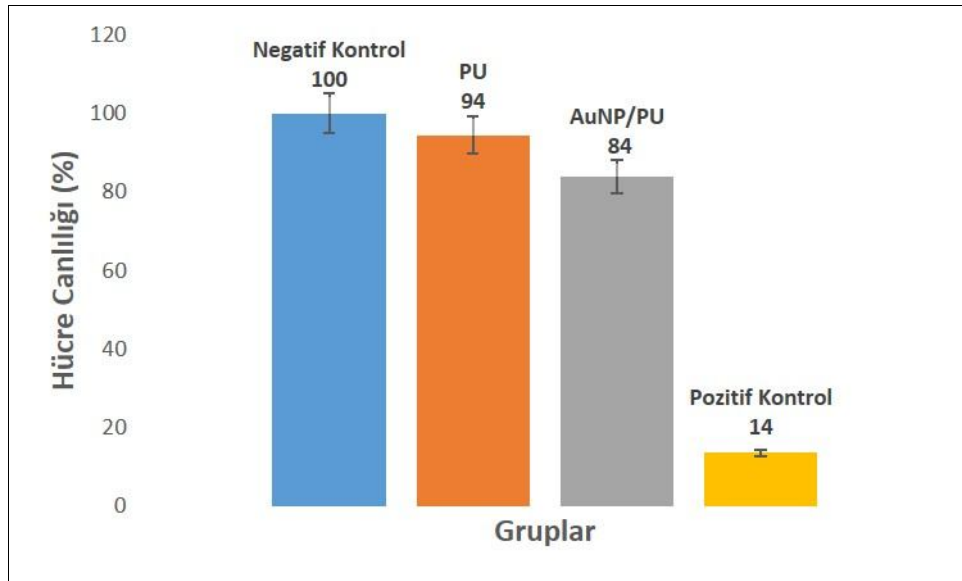
Örnek Grupları	PU	PU-PLL	AuNP/PU
Temas Açısı Değerleri	$155,9 \pm 8,6$	$116,3 \pm 1,5$	$107,0 \pm 1,4$
Temas Açısı Görüntüleri			

Şekil 4.13. Poliüretan nanofiber örneklerinin yüzey temas açısı değerleri ve görüntüleri

PLL kaplı fiber doku iskelelerinin temas açısı değeri ise (PU-PLL); $116,3^\circ \pm 1,5$ olarak bulunmuştur. Polikatyonik bir polimer olan PLL yapısında hidrofilik amino gruplarına sahip olmasında dolayı temas açısı değeri düşmüştür. FTIR sonuçlarında da $3100-3300 \text{ cm}^{-1}$ bölgesinde varlığı gösterilen amino grupları sayesinde fiber yapılarının yüzey hidrofobitesinde azalma meydana gelmiştir. PLL kaplamadan sonra fiber yüzeylerine elektrostatik olarak altın nanopartiküllerin immobilizasyonu üretilen AuNPs/PU fiber yüzeyleri için temas açısı değeri ise; $107,0^\circ \pm 1,4$ olarak bulunmuştur. Negatif yüklü altın nanopartiküllerin AuNPs/PU fiber yüzeylerinin temas açısını düşürdüğü görülmüştür. Sonuç

olarak PU, PU-PLL ve AuNPs/PU fiber doku iskelesi yapılar, yüzey ıslanabilirlik değerleri açısından karşılaştırıldığında, veriler poliüretanın hidrofobik karakterinde azalma meydana geldiğini, ancak tüm örnek gruplarının hidrofobik yapıda olduğunu göstermiştir.

PU ve AuNPs/PU nanofiberlerin sitotoksikite testi ISO 10993-5:2009(E) standardına göre indirekt MTT yapılarak değerlendirilmiş, sonuçları hücre canlılığı (%) grafiği halinde Şekil 4.14'te sunulmuştur. Yapılan MTT sitotoksikite testi sonucunda nanofiber yapılarıyla inkübe edilmiş besi ortamıyla muamele edilmemiş hücreler negatif kontrol grubunu ve %10 DMSO ile muamele edilmiş hücreler ise pozitif kontrol grubunu oluşturmuştur. Negatif kontrol grubundaki hücrelerin canlılığı %100 kabul edilmiştir. PU nanofiberlerle inkübe edilmiş besi ortamıyla muamele edilenlerin %94 olarak hesaplanan hücre canlılığı bu grubun oldukça biyoyumlu olduğunu ifade etmektedir. Diğer taraftan, AuNPs/PU nanofiberlerle muamele edilenlerin %84 olarak bulunan canlılık oranı, negatif kontrol grubuna kıyasla %16 oranında daha düşük olmasına rağmen biyoyumluluk sınırlarında olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, nanofiberlerle inkübe edilen besi ortamıyla muamele edilenlerin hücre canlılığı oranlarına bakıldığında canlılık oranlarının oldukça iyi olduğu, nanofiberlerin hücrelere herhangi bir sitotoksik etki göstermediği ve biyoyumlu oldukları sonucuna varılmıştır.



Şekil 4. 14. PU ve AuNPs nanofiberlerin hücre canlılığına etkisi

4.3. Doku İskelesi -Hücre Etkileşimleri

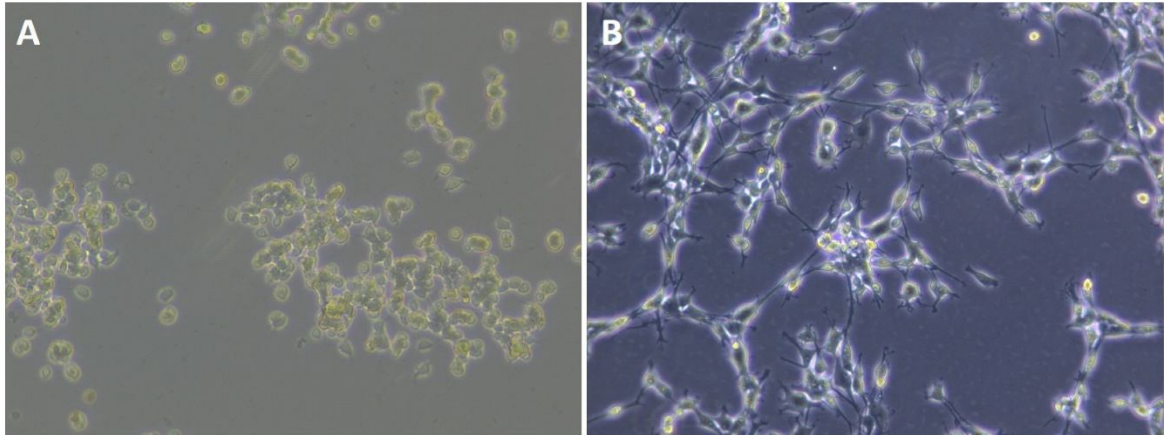
Hücre-biyomalzeme etkileşimi farklı faktörlerin kombine etkilerinden oluşur. Bu etkileşimin ilk unsuru ise, hücrenin yüzeylere tutunması ve yayılmasıdır. Yüzeyin kimyasal kompozisyonu, yüzey kimyasının bir yansıması olan yüzey ıslanabilirliği değeri ve yüzeyin pürüzlülüğü hücrelerin yanıtında etkili en önemli parametrelerdir. Pek çok çalışmada yüzeyin hidrofilik özelliğinin artmasının hücre tutunması ve yayılmasını artırdığı söylene de bazı çalışmalarda hücrelerin hidrofobik veya ara temas açılarındaki yüzeylere çok fazla oranda tutunduğu ve çoğaldığından bahsedilmektedir [66].

Hücre gelişimine kılavuzluk eden doku iskelelerinin tasarımı, bu malzemelerin sınır kılavuzu olan kondüit materyali olarak kullanımları açısından oldukça önemlidir. Sınır doku mühendisliğinde doku iskeleleri, hücreleri mekanik desteklenmesinin yanında, yüzey topografisi açısından uygun yönde organizasyonları için oldukça kritiktir. Yüzey topografisi, yüzeyin adeziv özelliklerinden bağımsız olarak hücrelerin yüzeylerle fiziksel etkileşimi için gerekli ipuçlarını sağlar. Nanofiber doku iskelelerinin sağladığı yüksek yüzey alanı-hacim oranı hücre adezyonu ve proliferasyonu için gerekli koşulların oluşmasında etkilidir [67].

Kimyasal ve mekanik özelliklerin yanında yüzey enerjisi gibi fiziksel özellikler hücre farklılaşması gibi fonksiyonları etkilemektedir. Bu tez çalışmasında doğal bir polimer olan ipek fibroin ve hidrofobik ve rahatlıkla işlenebilme özelliğinde alifatik polikarbonat bazlı termoplastik poliüretan nanofiber eldesi amacıyla kullanılmıştır.

Sınır rejenerasyonu proksimal uçtan distal uca tek yönde gerçekleştiğinden, rejeneren olan aksonların istenilen yönde hareketi için yönlendirilmiş nanofiber doku iskelelerinin kullanımı önem arz etmektedir. Yönlendirmenin hücre gelişimine daha iyi kılavuzluk ettiği ve nörit uzamasının yönlendirmiş fiberler üzerinde daha fazla olduğu literatürdeki çalışmalarda bahsedilmiştir [67]. Paralel levhalar aracılığıyla elektroçirilen ipek fibroinin nanofiber yönlenmesinin başari lamamasına karşılık, işlenebilirliği daha kolay olan poliüretan ile yönlendirilmiş nanofiberler elde edilmiştir. Poliüretanın yönlendirilmiş nanofiberler halinde işlenmelerinin ardından, yüzeylere PLL kaplama ve altın immobilizasyonu yapılarak yüzeylerin hidrofilisiteleri artırılmıştır. Ayrıca hücre tutunmasında etkili olan pürüzlülük değeri polimerin nanofiberler halinde işlenmesi ve altın nanopartiküllerle desenlenmesi ile arttırılmıştır. Literatürdeki çalışmalardan, yüzey pürüzlülüğünü artıran uygulamaların hücrelerin daha iyi tutunmalarını sağladığı bilinmektedir [66]. Bu durum, yüzey topografisinin hücreler için eşsiz bir biyokimyasal mikroçevre oluşturmasına dayandırılmaktadır.

Bu tez çalışmasında fiberler üzerindeki hücre davranışlarının incelenmesi ve farklılaştırılması çalışmaları için PC12 ve B35 hücre hatları kullanılmıştır. Şekil 4.15'te kollajen kaplı polistiren yüzeylere tutunan PC12 hücrelerinin ve polistiren yüzeylere kolaylıkla tutunan B35 hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüleri verilmiştir. PC12 hücre hattı, sıçan adrenal bezinin medulla kısmındaki nöroendokrin tümör hücreleri olan feokromasitomadan türevli hücrelerdir. Agregatlar şeklinde büyüme eğiliminde olan PC12 hücrelerinin yüzeylere tutunması oldukça zordur [51]. Bu hücreler, kollajen ve PLL kaplı yüzeylere tutunma özelliğindedirler [68]. PC12 hücrelerinin uyarıcı faktörler altında çoğalmayı durdurup farklılaşma yoluna gittikleri bilinmektedir. Farklılaşan hücreler ise düzleşerek, uzunlamasına yayılarak nöron-benzeri dallanmalar göstermekte ve bu etkiyle nörit yapıları uzamaktadır [69]. Hiçbir farklılaştırıcı uyarım altında kalmadıklarında, yuvarlak şekilli olan ve herhangi bir sitoplazmik uzantıya sahip olmayan PC12 hücrelerinin bu yanıtları, nöronal farklılaşma için model hücre hattı olarak kullanılmalarını sağlamaktadır [70]. Sıçan sinir sistemi orijinli tümör hücre hattı olan B35 nöroblastoma hücreleri ise sinir metabolizması, sinir doku fizyolojisi, aksonal büyüme, farklılaşma ve sinir hastalıkları patolojisi çalışmalarında model olarak kullanılan bir hücre tipidir [71, 72].



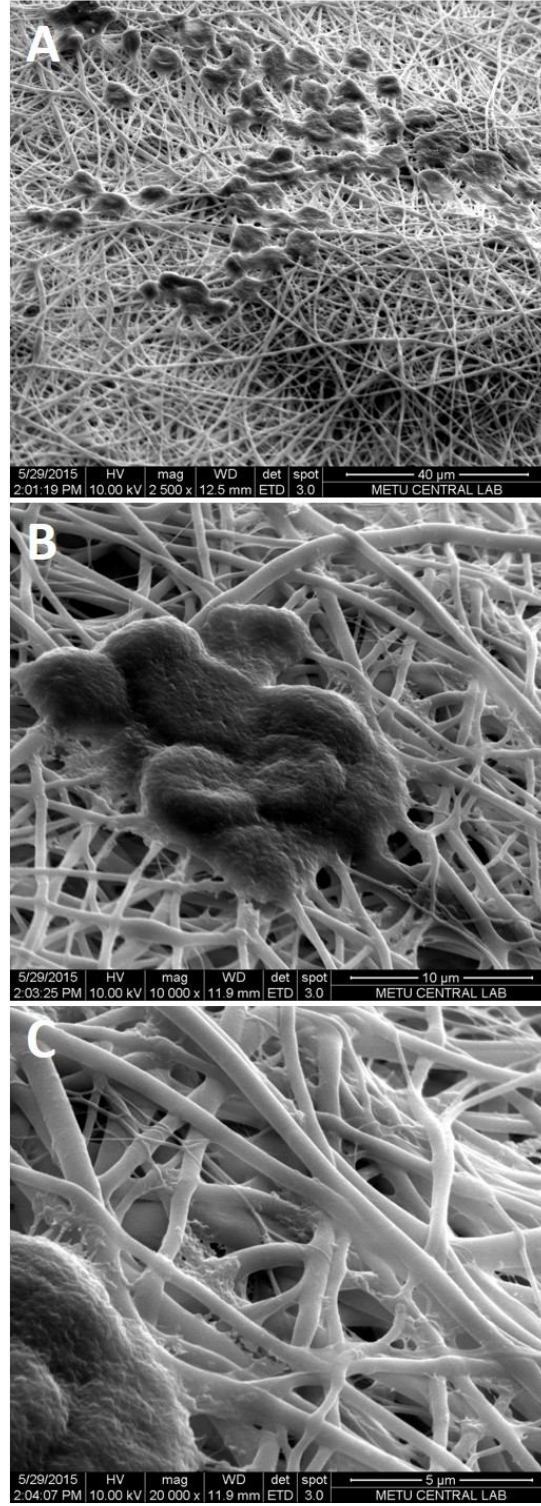
Şekil 4. 15. PC12 ve B35 hücrelerinin 4.gün ışık mikroskobu görüntüleri, 10x objektif büyütmesi (A) PC12 hücreleri ve (B) B35 hücreleri.

Bu tez çalışmasının ilk aşamalarında tercih edilen ipek fibroin, biyouyumluluğu ve kontrol edilebilir bozunma hızı ile dikkat çeken bir biyomalzemedir. Ancak doğal ipek fibroinin işlenme zorluğu yönlenmiş nanofiber eldesini kısıtladığından bu tez çalışmasında yönlendirme denemeleri başarılı olmamıştır. İpek fibroin, AuNPs/Fibroin, yönlendirilmiş AuNPs/PU ve PU nanofiberler ile hücre etkileşimlerinin değerlendirilmesi için PC12

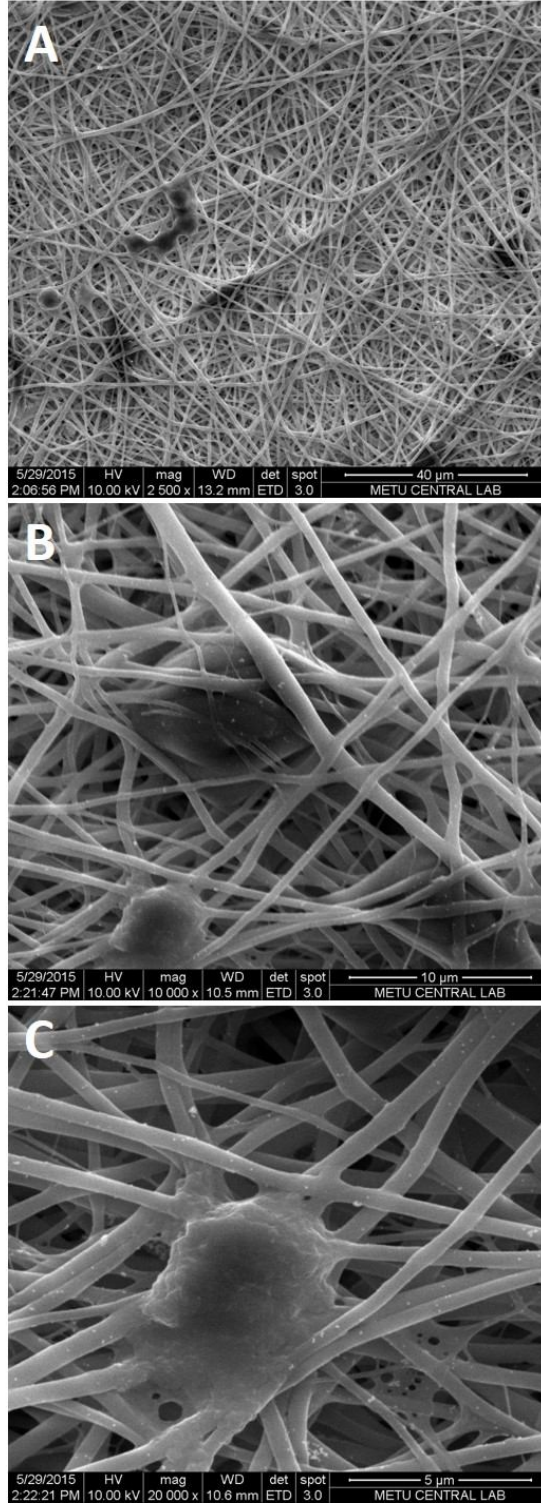
hücreleri ile çalışılmıştır. Nanofiber yüzeylerin hücre adezyonuna etkisi SEM ile araştırılmıştır.

İpek fibroin ve PU nanofiberler üzerine ekili PC12 hücrelerinin nanofiberlere tutunduğu ancak yönlendirilmiş AuNPs/PU ve PU nanofiberler üzerinde daha fazla hücre uzantılarının olduğu ve bu uzantıların fiberler doğrultusunda yönlendiği görülmüştür. Şekil 4.16 fibroin nanofiberler üzerindeki hücreleri gösterirken; Şekil 4.17 PLL kaplandıktan sonra AuNPs immobilize edilen fibroin yüzeylerde, Şekil 4.18 yönlendirilmiş PU nanofiberlerin üzerinde, Şekil 4.19 ise PLL aracılığıyla AuNPs immobilize edilen yönlendirilmiş AuNPs/PU nanofiberlerde hücreleri göstermektedir. Görüntülerde fiberlerle hücreler arasında ağ şeklinde hücre uzantılarının olduğu gözlenmiştir.

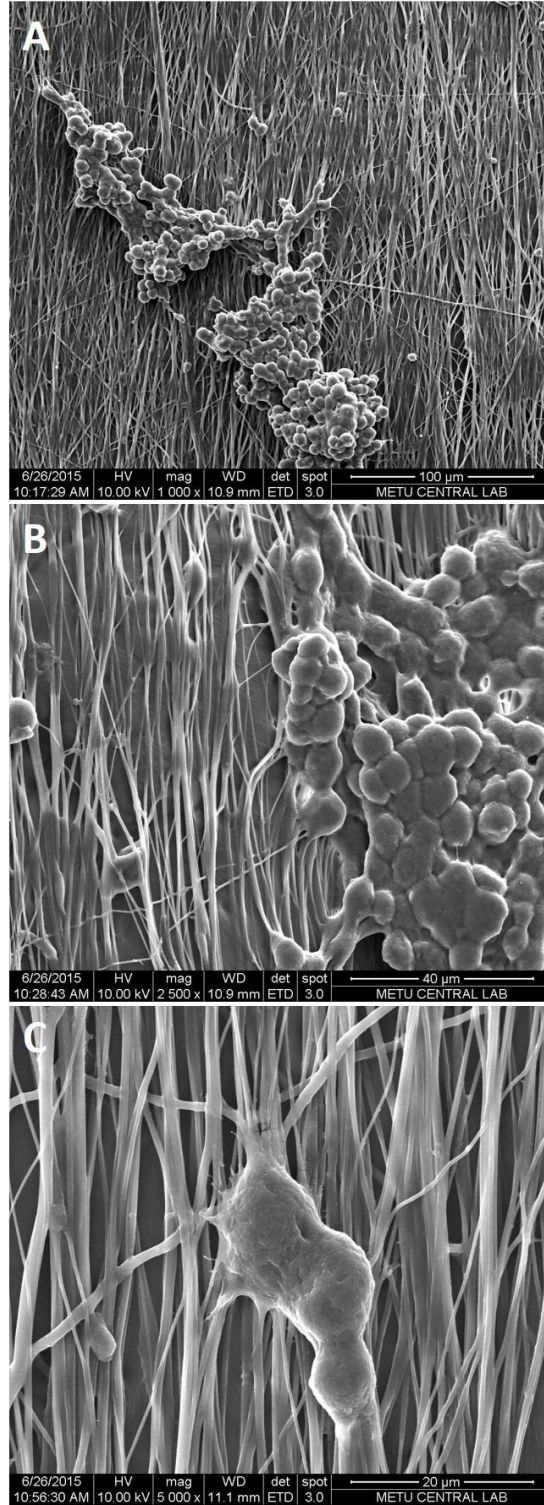
Yönlendirilmiş PU nanofiber yüzeylerindeki hücre uzantılarının ipek fibroin nanofiberlerinden daha iyi olması hücrelerin fiberler doğrultusunda tutunmaya çalışarak daha fazla aksonal uzantı geliştirmiş olabilecekleri düşünülmüştür (Şekil 4.16 ve Şekil 4.18). Bu nedenle bundan sonraki çalışmalarda sadece yönlendirilmiş PU nanofiberlerin kullanılmasına karar verilmiştir. Şekil 4.18 ve 4.19'da ise, adezyon kabiliyetleri zayıf olan PC12 hücrelerinin, altın nanopartiküllerle nanoboyutta desenlenme sonrasında pürüzlülüğün arttığı yüzeylerde daha homojen dağılarak tutunduğu görülmüştür. Altın nanopartikül içermeyen PU yüzeylerde ise hücrelerin agregasyona daha eğilimli olduğu ve kümeler halinde tutundukları görülmüştür.



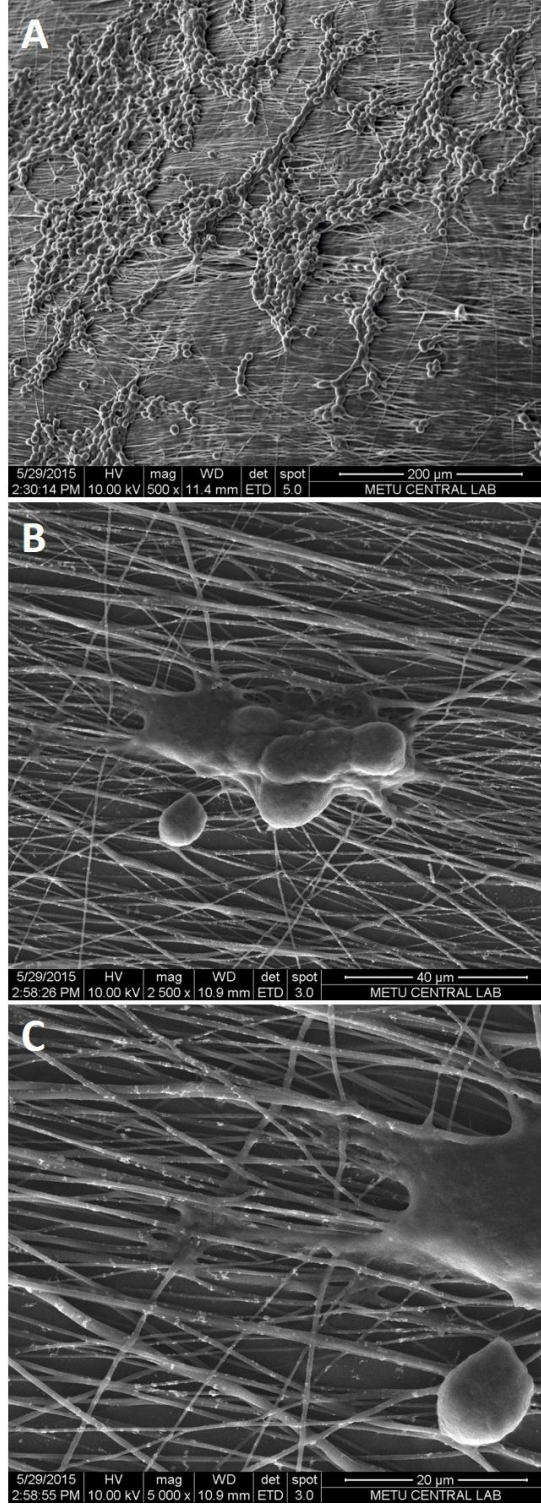
Şekil 4. 16. İpek fibroin nanofiberler üzerinde PC12 hücrelerinin SEM görüntüleri; (A) 2500x objektif büyütmesi, (B) 10000x objektif büyütmesi, (C) 20000x objektif büyütmesi



Şekil 4. 17. AuNPs/fibroin nanofiberler üzerinde PC12'lerin SEM görüntüleri; (A) 2500x, (B) 10000x, (C) 20000x objektif büyütmesi

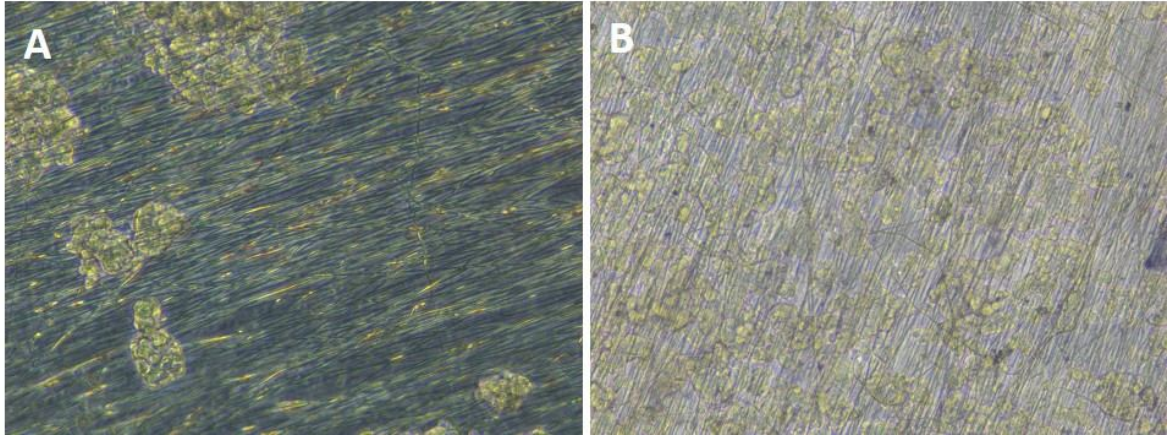


Şekil 4. 18. PU nanofiberler üzerinde PC12 hücrelerinin SEM görüntüleri; (A) 1000x objektif büyütmesi, (B) 2500x objektif büyütmesi, (C) 5000x objektif büyütmesi

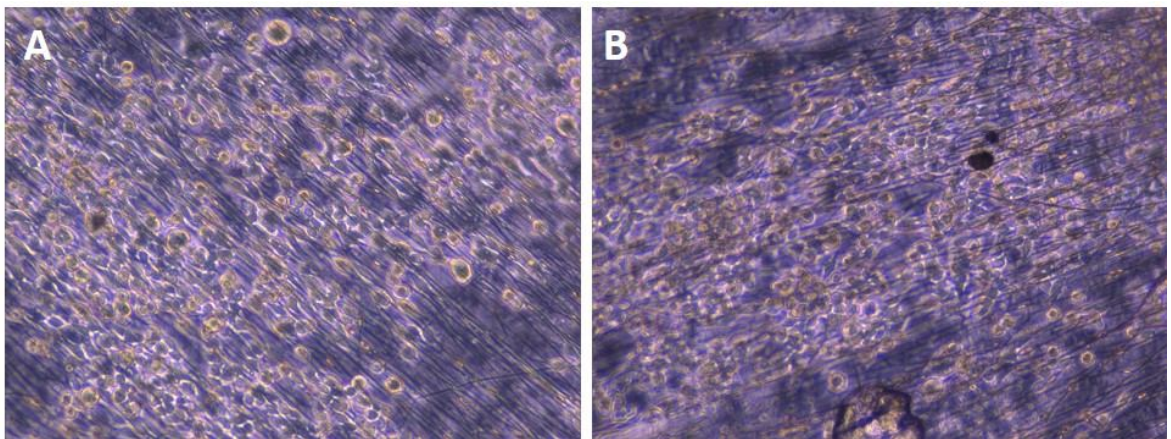


Şekil 4.19. AuNPs/PU nanofiberler üzerinde PC12 hücrelerinin SEM görüntüleri; (A) 2500x objektif büyütmesi, (B) 10000x objektif büyütmesi, (C) 20000x objektif büyütmesi

Altın nanopartikül immobilize edilen ve edilmeyen yönlendirilmiş poliüretan fiberler üzerindeki iki farklı hücre hattının tutunma davranışları ışık mikroskobu görüntüleri alınarak değerlendirilmiştir. Şekil 4.20’de PU ve AuNPs/PU nanofiberler üzerindeki PC12 hücrelerinin; Şekil 4.21’de ise B35 hücrelerinin görüntüleri verilmiştir. Görüldüğü gibi PC12 hücrelerinin, altın nanopartikül immobilize yüzeylerdeki artmış pürüzlülüğe bağlı olarak, altınsızlara kıyasla daha homojen dağıldıkları görülmüştür. Altınsız PU fiberlerde hücreler, daha agreste kümeler halinde tutunmuşlardır. Bu görünüm SEM görüntülerini destekler nitelikte bulunmuştur. B35 hücrelerinin iki farklı yüzeyler üzerinde tutunmaları açısından ışık mikroskobu görüntülerinde belirgin bir fark görülemediği. Bunun nedeninin B35 hücrelerinin PC12 hücrelerine göre adhezyon kabiliyetinin daha iyi olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 4. 20. Poliüretan nanofiberler üzerinde PC12 hücrelerinin mikroskop görüntüleri, 4.gün, 10x objektif büyütmesi; (A) PU ve (B)AuNPs/PU nanofiberler üzerindeki hücreler



Şekil 4.21. Poliüretan nanofiberler üzerinde B35 hücrelerinin mikroskop görüntüleri, 4.gün, 10x objektif büyütmesi; (A) PU üzerinde B35 hücreleri, (B) AuNPs/PU üzerinde B35 hücreleri

4.4. Sinir Büyüme Faktörü (NGF) ve Elektriksel Uyarımın Aksonal Uzamaya Etkisi

4.4.1. NGF Konsantrasyonunun Aksonal Gelişime Etkisi

Doku iskeleleri üzerinde uygulanacak NGF uyarımı için kullanılacak uygun NGF konsantrasyonu hücre kültüründe yapılan denemelerle belirlenmiştir. Bu amaçla, 50 ng/mL ve 100 ng/mL konsantrasyonlardaki NGF'nin PC12 ve B35 hücrelerinin nörit uzamasına etkisi incelenmiştir. PC12 hücrelerinin 6 gün boyunca; B35 hücrelerinin ise 4 gün boyunca uyarıcı faktör altında kültürü sağlanmıştır.

Nörit uzunlukları aktin filamentlerin antikor boyalamaları ile görselleştirilmiştir. Aktin eksprese eden hücrelerin Alexafluor488 Phalloidin antikoruna ile aktin boyaması yapılmıştır. Aktin içeren yapılara entegre olan bu ajan, fikse edilmiş PC12 ve B35 hücrelerinde aktin dinamiğinin görselleştirilmesini sağlamıştır [73].

NGF uyarımının etkisinin değerlendirilmesi için, nöritlerin uzunlukları uç kısımlarından hücre gövdesine kadar olan mesafenin ölçülmesiyle bulunmuştur. Ölçümlerin sonunda, en uzun nörit uzunluğu ortalamasına sahip olan konsantrasyon grupları, doku iskelesi üzerinde hücrelere uygulanmak üzere NGF konsantrasyonu olarak seçilmiştir.

NGF stimülasyonu sonrası yüzeylerde B35 hücrelerinin nörit uzunlukları 100 ng/mL konsantrasyonda ortalama $40,4 \pm 6,3 \mu\text{m}$; 50 ng/mL değerinde $22 \pm 6,4 \mu\text{m}$; ve kontrol grubunda $21,5 \pm 3,7 \mu\text{m}$ olarak ölçülmüştür. Bu ölçümlerin sonucunda B35'ler için en optimize konsantrasyonun 100 ng/mL olduğuna karar verilerek, bu konsantrasyon değeri doku iskelesi üzerindeki hücrelerin ortamına uygulanmak üzere taşınmıştır (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Farklı NGF konsantrasyonlarında B35 hücrelerinin nörit uzunlukları

NGF Konsantrasyonu	Nörit Uzunluğu (μm)
Kontrol grubu*	$21,5 \pm 3,7$
50 ng/mL	$22,0 \pm 6,4$
100 ng/mL	$40,4 \pm 6,3$

*NGF uygulanmayan grup

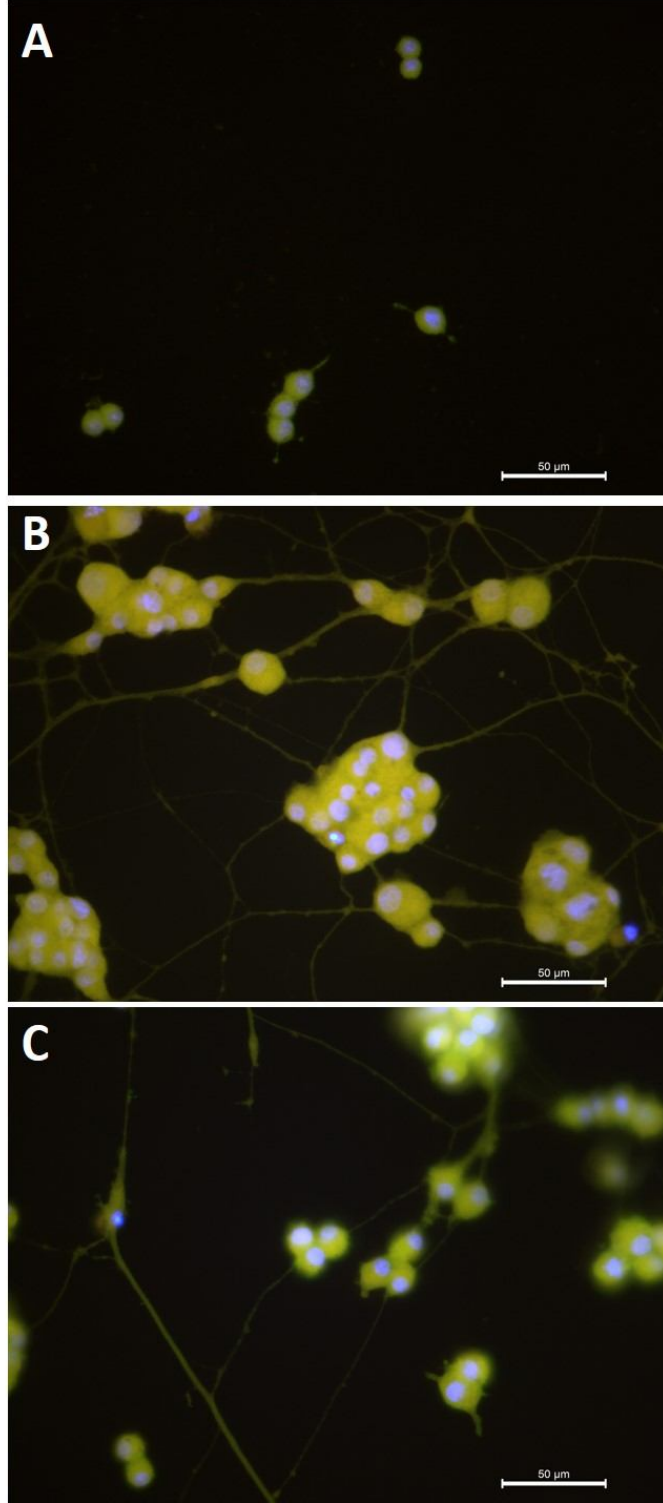
NGF ile uyarılan PC12 hücrelerinin nörit uzunlukları ise 100 ng/mL konsantrasyonda ortalama $137 \pm 7 \mu\text{m}$; 50 ng/mL değerinde $239 \pm 32 \mu\text{m}$ ve kontrol grubunda $17 \pm 1 \mu\text{m}$ olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.3). Buna göre, PC12 hücreleri için en yüksek nörit uzamasını sağlayan konsantrasyon olarak belirlenen 50 ng/mL, doku iskelesi üzerindeki hücrelere uygulanmak üzere seçilmiştir.

Çizelge 4.3. Farklı NGF konsantrasyonlarında PC12 hücrelerinin nörit uzunlukları

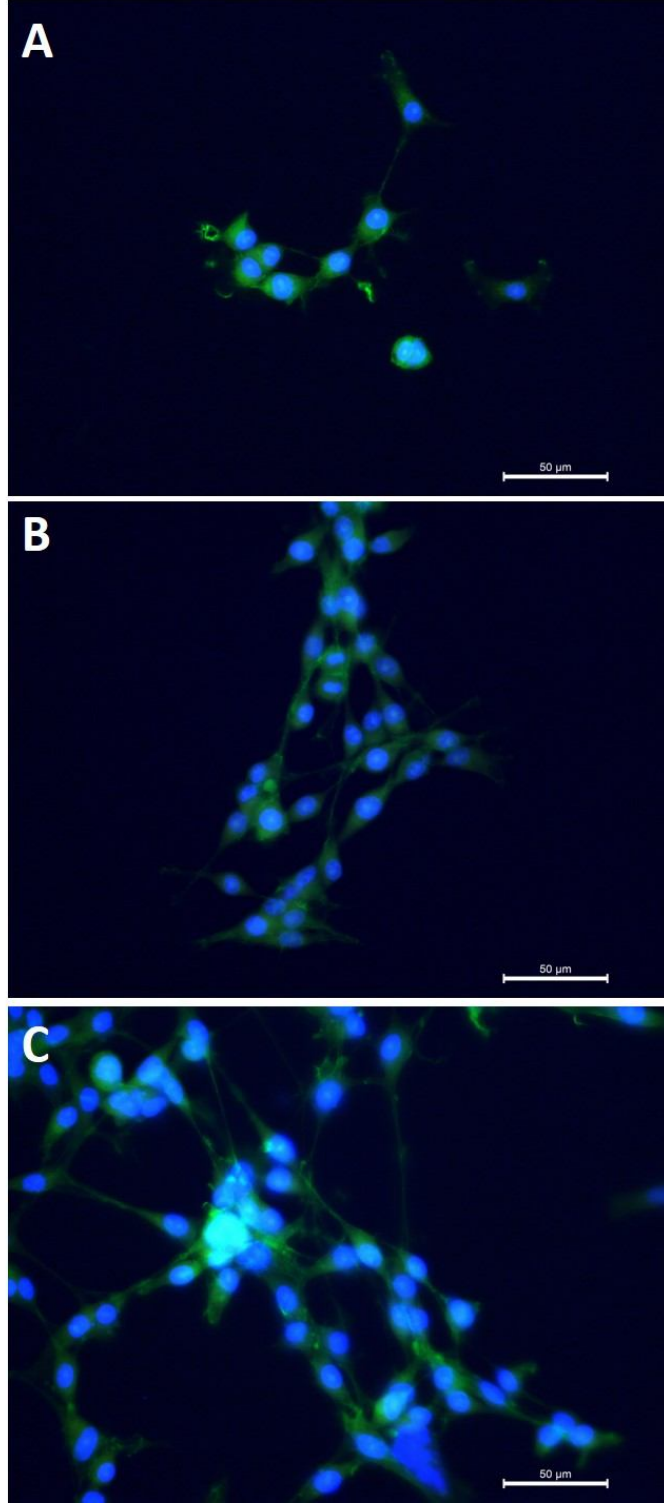
NGF Konsantrasyonu	Nörit Uzunluğu (μm)
Kontrol grubu*	17 \pm 1,0
50 ng/mL	239 \pm 32
100 ng/mL	137 \pm 7,0

*NGF uygulanmayan grup

Şekil 4.22’de iki farklı konsantrasyonda NGF ile farklılaşması uyarılan yüzeyler üzerindeki PC12 hücrelerinin 6 günlük inkübasyonları sonrası alınan immünofloresan görüntüleri verilmiştir. En fazla sitoplazmik uzantı oluşumunun ve aksonal uzamanın 50 ng/mL konsantrasyonda olduğu görülmüştür. Aynı konsantrasyonlarda NGF ile uyarılan yüzeyler üzerindeki B35 hücrelerinin, 4 günlük inkübasyonları sonrası alınan immünofloresan görüntüleri Şekil 4.23’te verilmiştir. B35’lerde en iyi nörit gelişimi 100 ng/mL konsantrasyonda gerçekleşmiştir. Bu çalışmalar sonucunda nörit uzamasının NGF konsantrasyonuna bağlı olduğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.22. NGF ile uyarılan PC12 hücrelerinin immüno Floresan görüntüleri, 6.gün, 40x objektif büyütmesi; (A) Kontrol (B) 50 ng/mL (C) 100 ng/mL



Şekil 4.23. NGF ile uyarılan B35 hücrelerinin immüno Floresan görüntüleri, 4.gün, 40x objektif büyütmesi; (A) Kontrol (B) 50 ng/mL (C) 100 ng/mL

4.4.2. Doku İskelelerinde NGF'nin Aksonal Gelişime Etkisi

Doku iskelelerinde NGF'nin aksonal gelişime etkisinin araştırılması için PU ve AuNPs/PU fiberlerde kültür edilen PC12 hücrelerine 50 ng/mL NGF ve B35 hücrelerine 100 ng/mL NGF uygulanmıştır. NGF'nin uygulanmadığı örnekler negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

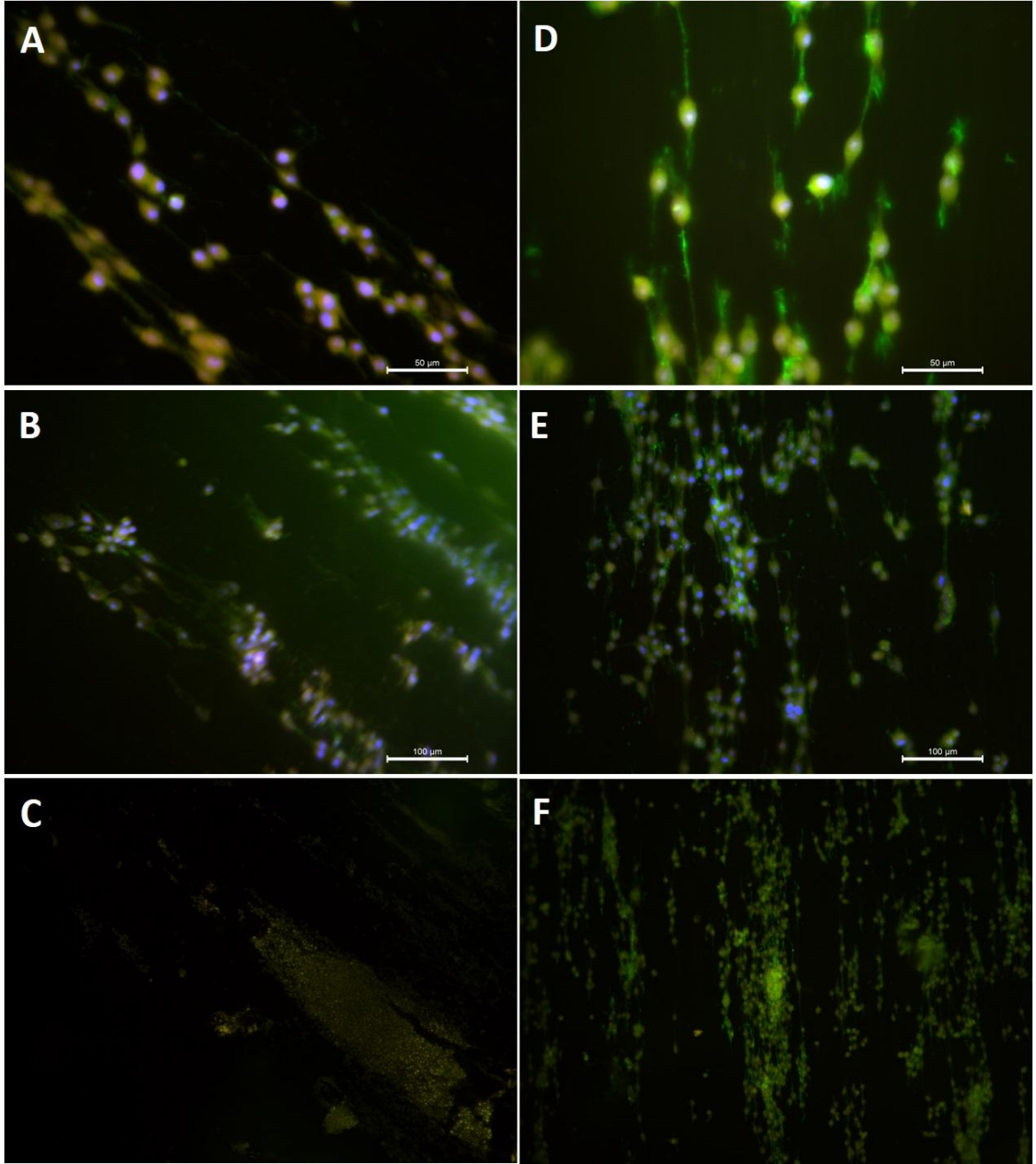
PU nanofiberler üzerinde B35 hücrelerinin ortalama aksonal uzantı boyları kontrol grubu için $35 \pm 2,6$ μm ve NGF uygulananlar için $56 \pm 14,4$ μm bulunmuştur. AuNPs/PU üzerindeki hücrelerin kontrol grubundaki nörit uzunluğu değerleri $37 \pm 4,1$ μm iken; NGF uygulaması sonucu $56 \pm 10,1$ μm değerine yükseldiği görülmüştür (Çizelge 4.4). Bu sonuçlar doğrultusunda doku iskelelerinde kültür edilen hücrelerin daha yüksek nörit uzunluklarına sahip olduğu görülmüştür. Diğer bir deyişle, NGF'nin aksonal uyarıma etkisi doku iskelelerinde daha yüksek bulunmuştur. Bu durumun, hücrelerin yönlendirilmiş fiberler üzerinde tutunarak uzama eğiliminden kaynaklandığı yorumuna varılmıştır.

Çizelge 4.4. Doku iskelelerinde NGF uyarımı sonrası B35 hücrelerinin nörit uzunlukları

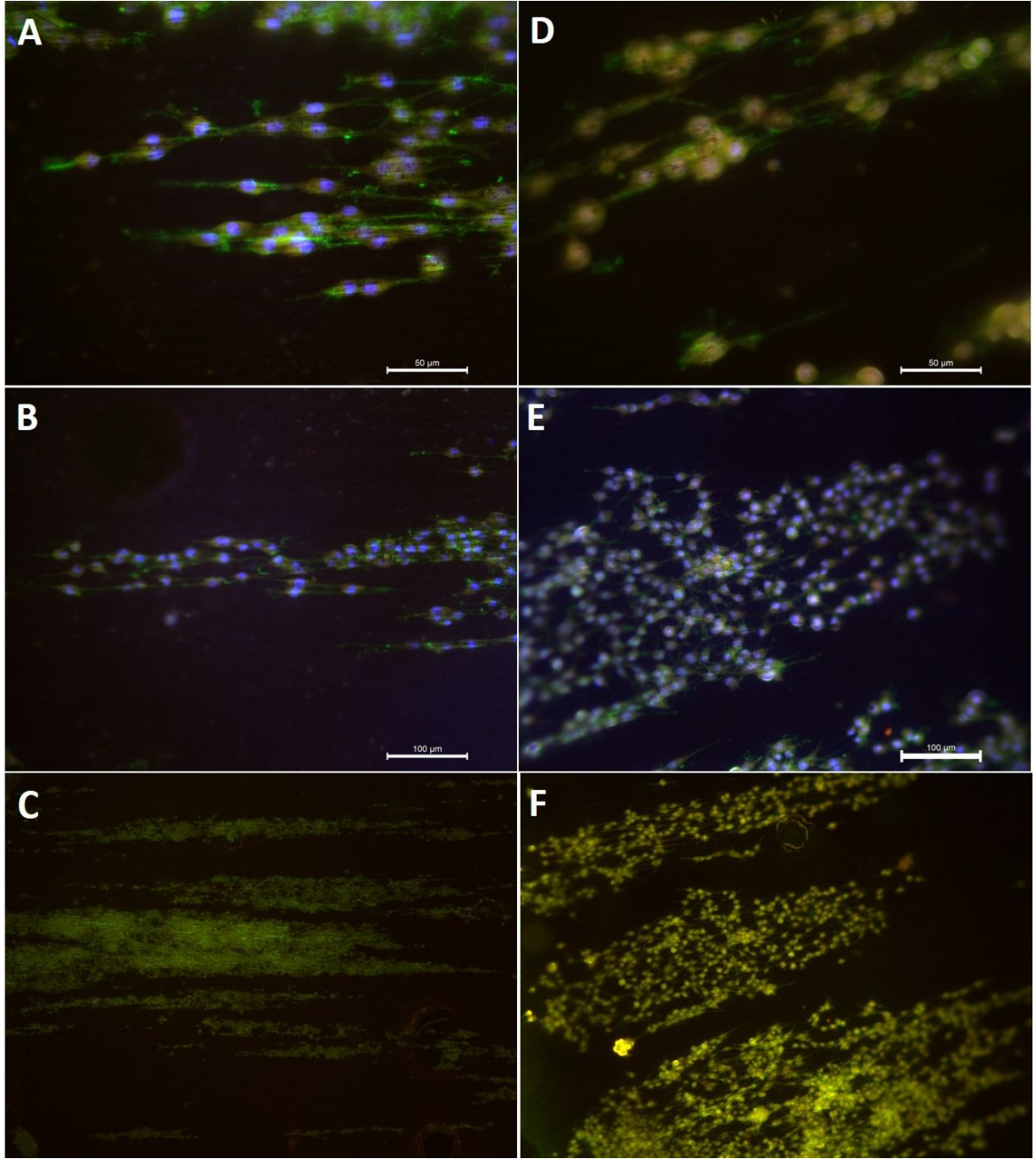
NGF Konsantrasyonu	Doku İskelesi Kullanılmayanların Nörit Uzunluğu (μm)	Doku İskelesi Kullanılanların Nörit Uzunluğu (μm)	
		PU	AuNPs/PU
Kontrol grubu*	$21,5 \pm 3,7$	$35 \pm 2,6$	$37 \pm 4,1$
50 ng/mL	$22,0 \pm 6,4$	-	-
100 ng/mL	$40,4 \pm 6,3$	$56 \pm 14,4$	$56 \pm 10,1$

*NGF uygulanmayan grup

Şekil 4.24'te PU doku iskeleleri üzerinde farklı NGF konsantrasyonlarında B35 hücrelerinin 4. gün immüno Floresan görüntüleri verilmiştir. Morfolojik inceleme sonrası, hücrelerin fiberler doğrultusunda yönlendirilerek uzadığı görülmüştür. Mikroskopik görüntülerde, B35 hücrelerinin NGF stimülasyonu ile nörit uzunluklarının arttığı sonucuna ulaşılmıştır. Yalnızca NGF uygulaması yapıldığında, beklendiği üzere PU ve AuNPs/PU fiberler üzerindeki hücrelerin nörit uzunlukları açısından belirgin bir fark bulunmamıştır. Daha önce de ifade edildiği gibi, B35'lerin yüzeylere tutunması açısından bu iki grup arasında farklılık olmadığı görülmüştür. AuNPs/PU doku iskeleleri üzerinde kontrol ve NGF test grubunda B35 hücrelerinin 4. gün immüno Floresan görüntüleri Şekil 4.25'te verilmiştir. Altın nanopartikül immobilize fiberler üzerinde NGF uyarımı sonucu hücre davranışları Şekil 4.24'teki hücrelerle benzer bulunmuştur.



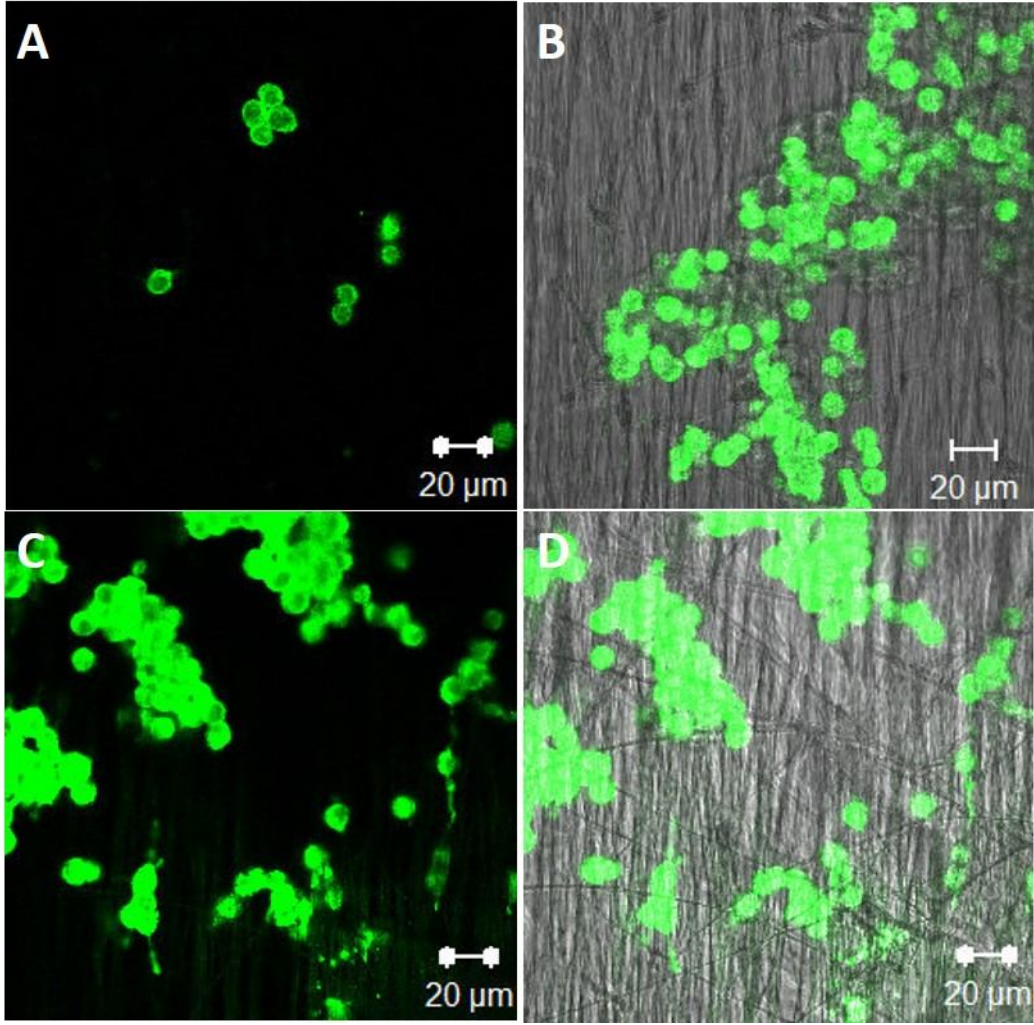
Şekil 4.24. PU doku iskelelerinde B35 hücrelerinin immuno Floresan görüntüleri, 4.gün;
(A) Kontrol grubu 40x, (B) Kontrol grubu, 20x (C) Kontrol grubu, 10x,
(D) 100 ng/mL NGF, 40x, (E) 100 ng/mL NGF, 20x, (F) 100 ng/mL NGF, 10x



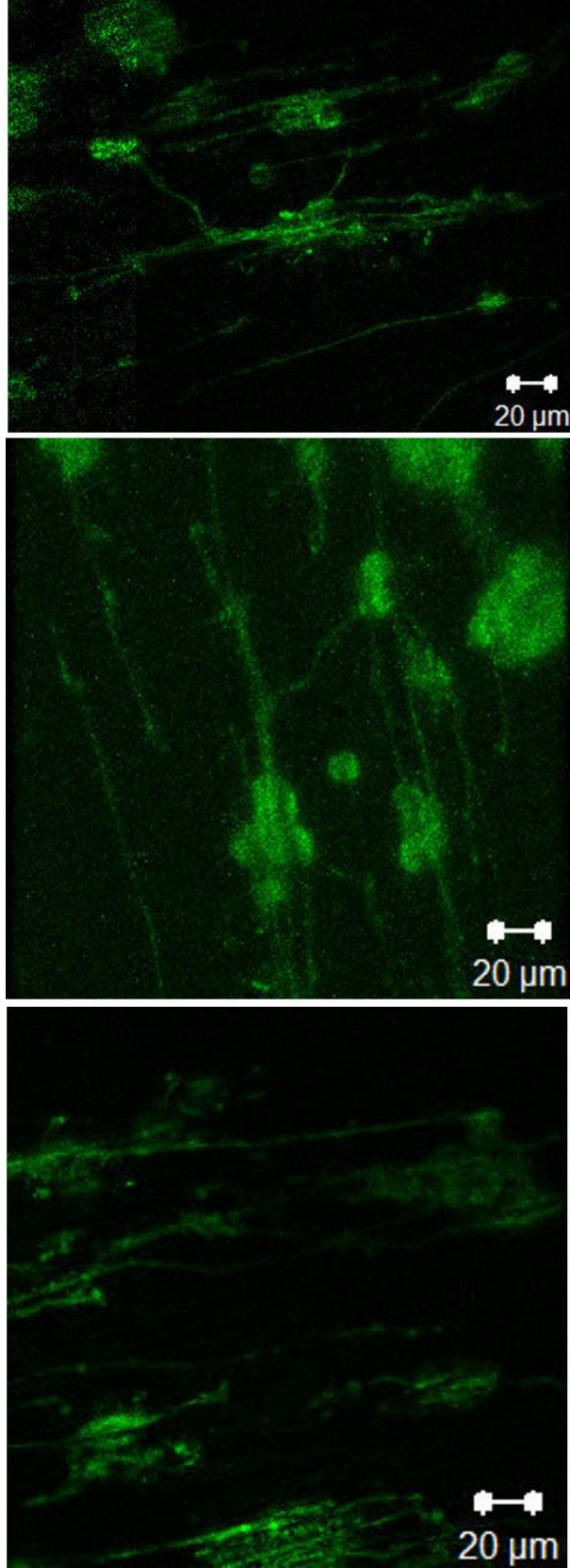
Şekil 4.25. AuNPs/PU doku iskelelerinde B35 hücrelerinin immüno floresan görüntüleri, 4.gün; (A) Kontrol grubu, 40x, (B) Kontrol grubu, 20x (C) Kontrol grubu, 4x, (D) 100 ng/mL NGF, 40x, (E) 100 ng/mL NGF, 20x, (F) 100 ng/mL NGF, 10x

Şekil 4.26'da PU ve AuNPs/PU nanofiber yüzeyler üzerinde herhangi bir NGF uyarımına maruz bırakılmayan PC12 hücrelerinin aktin boyama sonrası konfokal görüntüleri verilmiştir. Kontrol grubu olan bu hücrelerin nöritsiz morfolojileri gözlenmiştir. AuNPs/fiberler üzerinde yüzey pürüzlülüğüne bağlı olarak hücrelerin daha homojen tutunurken, PU fiberlerde agregasyona daha fazla eğilimli oldukları görülmüştür.

Şekil 4.27'de ise AuNPs nanofiberler üzerindeki PC12 hücrelerinin 50 ng/mL NGF uyarımı sonrasında hücrelerin nörit uzattıkları görülmektedir. Bu hücrelerin aksonları fiberler doğrultusunda yönlenmiştir.



Şekil 4.26. PU ve AuNPs/PU doku iskelelerinde PC12'lerin konfokal mikroskop görüntüleri, 4.gün, 40x; (A) ve (B) PU üzerindeki hücreler, (C) ve (D) AuNPs/PU üzerindeki hücreler



Şekil 4.27. AuNPs/PU doku iskelelerinde NGF ile uyarılan PC12'lerin konfokal mikroskop görüntüleri, 4.gün, 40x

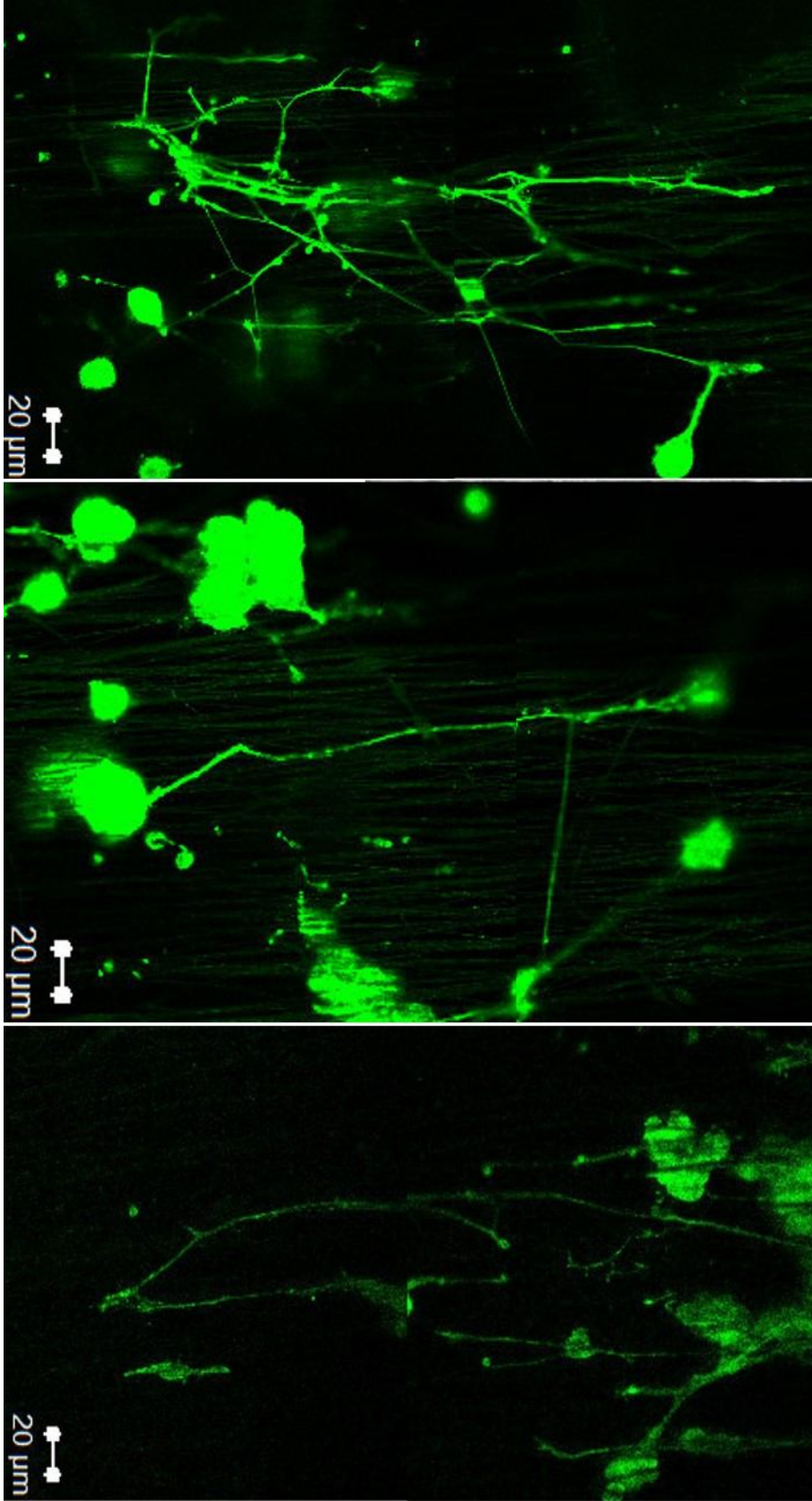
4.4.3. Doku İskelelerinde NGF ve Elektriksel Uyarımın Aksonal Gelişime Etkisi

Altın nanopartiküllerin yeterli konsantrasyonda nanofiberlere kaplanamamış olması sebebiyle, nanofiberlerde iletkenlik sağlanamamıştır. Ancak PU fiberlere kıyasla, yüzey pürüzlülüğü ve hidrofilitiyi artırarak, hücre tutunması ve dağılımında olumlu etki göstermesi sebebiyle AuNPs/PU fiberlerin kondüit malzemesi olma potansiyelinin daha yüksek olduğu yargısına varılmıştır. Bu sebeple yalnızca, AuNPs/PU fiberler üzerindeki hücrelere elektrik uygulanmasına karar verilmiştir.

Pek çok *in vitro* ve *in vivo* çalışmada elektriksel stimülasyonun nörit uzaması ve hasarlı sinir uçlarının rejenerasyonunda önemli olduğu ifade edilmiştir. Daha önceden yapılan çalışmalarda, 100 mV elektriksel uyarımın PC12 hücrelerinin farklılaşmasında etkili olduğu bildirilmiştir [28, 74]. Literatürde sabit akımla elektriksel stimülasyon yerine alternatif akım uygulandığında hücre canlılığının daha iyi olduğuna dair çalışmalar mevcuttur [51]. Bu nedenle tez çalışmasında, sabit akım yerine 100 Hz frekansta kare dalga formunda elektriksel uyarım uygulanmıştır.

Farklılaştırmadan önce nörit uzatmaları göstermeyen ve uyarıcı etki sonrası B35'lere kıyasla daha uzun aksonal gelişim göstermeleri sebebiyle, morfolojik gözlemlerin yapılmasının daha kolay olduğu PC12 hücreleri ile çalışılmıştır. Elektriksel uyarımın NGF uyarımına katkısının değerlendirilmesi için, AuNPs/PU nanofiberler üzerindeki hücrelere 50 ng/mL NGF ile eş zamanlı olarak 100 mV ve 100 Hz frekansta potansiyel uygulanmıştır. 4 günlük inkübasyon süresinin bitiminde, hücrelerin farklılaşmaları morfolojik olarak incelenmiştir.

Şekil 4.28'da AuNPs/PU nanofiber yüzeyler üzerinde NGF uyarımı ile eş zamanlı olarak elektrik uyarımına maruz bırakılan PC12 hücrelerine ait görüntüler verilmiştir. Şekil 4.27'deki yalnızca NGF ile uyarılan hücrelere kıyasla elektriksel stimülasyonun uygulandığı hücrelerde, fiberler üzerinde daha uzun nörit uzamalarının olduğu görülmüştür. Elektriksel uyarımın uygulandığı hücrelerde aksonal uzunluk değeri ortalama 268 µm iken, yalnızca NGF uygulanan AuNPs/PU üzerindeki hücrelerde 190 µm olarak bulunmuştur. Bu nörit uzunluğunun artışının elektriksel uyarımın etkisi ile olduğu ve elektriksel uyarımın NGF'nin etkisini artırdığı sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.28. AuNPs/PU doku iskelelerinde elektrik ile uyarılan PC12'lerin konfokal mikroskop görüntüleri, 4.gün, 40x

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada altın nanopartiküllerle dekore edilmiş PU nanofiberlerin NGF ve elektrik uyarımlarının sinerjik etkisi ile hücrelerde aksonal gelişime katkısı incelenmiştir. Nanotopografya, fiber yönlenmesi, biyolojik ve elektriksel uyarımların etkileri karşılaştırılmış ve aşağıdaki sonuçlara varılmıştır:

- Turkevich metoduyla 20 nm ve çekirdek büyütme yöntemiyle 50 nm boyutundaki altın nanopartiküller başarıyla sentezlenmiştir. Her iki yöntemle sentezlenmiş nanopartiküller uniform ve küresel simetriye sahiptir.
- Çekirdek büyütme yöntemiyle elde edilen altın nanopartiküllerin daha büyük zeta potansiyele sahip olduğu, bu nedenle daha kararlı yapıda olduğu görülmüştür.
- Elektroegirme yöntemi ile yönlendirilmiş, homojen, düzgün yüzeylere sahip, biyoyumlu poliüretan nanofiberler üretilmiştir.
- Nanofiber yüzeylere 50 nm çapındaki altın nanopartiküller homojen olarak kaplanmıştır. 20 nm boyutundaki nanopartiküller ise kararsızlığı nedeniyle homojen olarak kaplanmamıştır.
- Altın nanopartiküllerin nanofiberlere immobilizasyonunda PLL'in PEI'ye göre daha etkili olduğu sonucuna varılmıştır.
- Yönlenmiş nanofiberler üzerinde, hücreler fiberler doğrultusunda tutunma eğiliminde oldukları ve aksonal uzama gösterdikleri izlenmiştir.
- PU yüzeylere altın nanopartikül kaplamanın fiber yüzeylerinde pürüzlülüğü artırması ve temas açısını düşürmesi nedeniyle hücre tutunmasını teşvik ettiği görülmüştür.
- Nanotopografyanın aksonal yönlenmeyi etkilediği ve aksonlara sağlanan fiziksel rehberliğin sinir onarımı için kritik bir parametre olduğu sonucuna varılmıştır.
- NGF uyarımının aksonal gelişimi artırdığı ve bu etkinin konsantrasyona bağımlı olduğu bulunmuştur. Optimal NGF konsantrasyonu B35 hücreleri için 100 ng/mL iken PC12 hücreleri için 50 ng/mL olarak bulunmuştur. Bu konsantrasyonlarda nörit uzaması en yüksek seviyeye ulaşmıştır.
- NGF uyarımının aksonal uzamaya etkisinin yönlendirilmiş fiberlerde daha fazla olduğu bulunmuştur.
- Elektriksel uyarım (100 mV, 100 Hz), PC12 kültür edilmiş AuNPs/PU fiberlerde NGF uyarımının etkisini arttırarak, hücrelerin daha uzun aksonlara sahip olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak nanotopografyanın ve biyolojik ve elektrik uyarımlarının kombine etkilerinin aksonal gelişimi önemli derecede etkilediği görülmüş ve AuNPs/PU fiberlerin hücre yönlenmesini ve farklılaşmasını destekleyici olduğu ve sinir kondüit malzemesi olarak kullanım potansiyellerinin olduğu sonucuna varılmıştır. Ancak nanopartiküllerin yeterince yüksek konsantrasyonda ve sıklıkta yüzeylere homojen dizilimi sağlanamaması nedeniyle fiberlerde iletkenlik sağlanamamıştır. İleriye dönük çalışmalarda, nanofiberlere altın nanopartiküllerin daha sıklıkla kaplanarak fiber yüzeylerinin iletkenliklerinin sağlanması üzerine çalışılması planlanmaktadır. Diğer taraftan hücre farklılaşmasında yeterince fazla sayıda örnek üzerinde çalışılmamış olması nedeniyle nörit uzunluğu verilerinin istatistiksel olarak yeterli olmadığı düşünülmektedir. Bu tez kapsamında elde edilen bulguların önemli olduğu görülmüştür, ancak sağlıklı sonuçlar için daha detaylı çalışmaların yapılması gerekmektedir. Bu amaçla, stimülasyonla indüklenen PC12 farklılaşmasında immunositokimyasal ve morfolojik gözlemlerin yanında NF-200 nöron markırının, nestinin ve β -tubulinin gen ekspresyonunun incelenmesinin ve biyoreaktör ortamında farklı gerilimlerde elektrik uyarımlarının denenmesinin konuya netlik kazandırılmasının önemli olduğu sonucuna varılmış ve bu yönde çalışılması planlanmıştır.

KAYNAKLAR

- [1] N. Zhang, H. H. Yan, and X. J. Wen, Tissue-engineering approaches for axonal guidance, *Brain Research Reviews*, 49, 48-64, **2005**.
- [2] B. L. Guo, Y. Sun, A. Finne-Wistrand, K. Mustafa, and A. C. Albertsson, Electroactive porous tubular scaffolds with degradability and non-cytotoxicity for neural tissue regeneration, *Acta Biomaterialia*, 8, 144-153, **2012**.
- [3] M. P. Prabhakaran, J. Venugopal, C. K. Chan, and S. Ramakrishna, Surface modified electrospun nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering, *Nanotechnology*, 19, 455102, **2008**.
- [4] Q. Yu, S. Xu, K. Zhang, and Y. Shan, Multi-porous electroactive poly(L-lactic acid)/polypyrrole composite micro/nano fibrous scaffolds promote neurite outgrowth in PC12 cells, *Neural Regen Res*, 8, 31-8, **2013**.
- [5] V. L. Tsang and S. N. Bhatia, Three-dimensional tissue fabrication, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56, 1635-1647, **2004**.
- [6] L. Ghasemi-Mobarakeh, M. P. Prabhakaran, M. Morshed, M. H. Nasr-Esfahani, H. Baharvand, S. Kiani, *et al.*, Application of conductive polymers, scaffolds and electrical stimulation for nerve tissue engineering, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 5, E17-E35, **2011**.
- [7] M. Mozafari, D. Vashae, L. Tayebi, and M. Mehraien, *Electroconductive Nanocomposite Scaffolds: A New Strategy Into Tissue Engineering and Regenerative Medicine*: INTECH Open Access Publisher, 369-392, **2012**.
- [8] M. Shevach, B. M. Maoz, R. Feiner, A. Shapira, and T. Dvir, Nanoengineering gold particle composite fibers for cardiac tissue engineering, *Journal of Materials Chemistry B*, 1, 5210-5217, **2013**.
- [9] Y. Kim, J. Zhu, B. Yeom, M. Di Prima, X. L. Su, J. G. Kim, *et al.*, Stretchable nanoparticle conductors with self-organized conductive pathways, *Nature*, 500, 59-U77, **2013**.
- [10] N. Baumann and D. Pham-Dinh, Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system, *Physiological Reviews*, 81, 871-927, **2001**.
- [11] P. Bezzi and A. Volterra, A neuron-glia signalling network in the active brain, *Current Opinion in Neurobiology*, 11, 387-394, **2001**.
- [12] P. G. Haydon, Glia: Listening and talking to the synapse, *Nature Reviews Neuroscience*, 2, 185-193, **2001**.
- [13] C. L. Delaney, J. W. Russell, H. L. Cheng, and E. L. Feldman, Insulin-like growth factor-I and over-expression of Bcl-xL prevent glucose-mediated apoptosis in

- Schwann cells, *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 60, 147-160, **2001**.
- [14] F. Aloisi, Immune function of microglia, *Glia*, 36, 165-179, **2001**.
- [15] C. E. Schmidt and J. B. Leach, Neural tissue engineering: Strategies for repair and regeneration, *Annual Review of Biomedical Engineering*, 5, 293-347, **2003**.
- [16] B. P. Bean, The action potential in mammalian central neurons, *Nature Reviews Neuroscience*, 8, 451-465, **2007**.
- [17] G. Stuart, J. Schiller, and B. Sakmann, Action potential initiation and propagation in rat neocortical pyramidal neurons, *Journal of Physiology-London*, 505, 617-632, **1997**.
- [18] R. Langer and J. P. Vacanti, Tissue Engineering, *Science*, 260, 920-926, **1993**.
- [19] J. A. Burdick and G. Vunjak-Novakovic, Engineered Microenvironments for Controlled Stem Cell Differentiation, *Tissue Engineering Part A*, 15, 205-219, **2009**.
- [20] H. Q. Cao, T. Liu, and S. Y. Chew, The application of nanofibrous scaffolds in neural tissue engineering, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61, 1055-1064, **2009**.
- [21] Y. C. Huang and Y. Y. Huang, Biomaterials and strategies for nerve regeneration, *Artificial Organs*, 30, 514-522, **2006**.
- [22] J. T. Seil and T. J. Webster, Electrically active nanomaterials as improved neural tissue regeneration scaffolds, *Wiley Interdisciplinary Reviews-Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2, 635-647, **2010**.
- [23] S. Kehoe, X. F. Zhang, and D. Boyd, FDA approved guidance conduits and wraps for peripheral nerve injury: A review of materials and efficacy, *Injury-International Journal of the Care of the Injured*, 43, 553-572, **2012**.
- [24] M. B. Steed, V. Mukhatyar, C. Valmikinathan, and R. V. Bellamkonda, Advances in bioengineered conduits for peripheral nerve regeneration, *Atlas Oral Maxillofac Surg Clin North Am*, 19, 119-30, **2011**.
- [25] Y. C. Lin and K. G. Marra, Injectable systems and implantable conduits for peripheral nerve repair, *Biomedical Materials*, 7, 024102, **2012**.
- [26] N. B. Skop, F. Calderon, C. H. Cho, C. D. Gandhi, and S. W. Levison, Improvements in biomaterial matrices for neural precursor cell transplantation, *Mol Cell Ther*, 2, 19, **2014**.
- [27] M. M. Pakulska, B. G. Ballios, and M. S. Shoichet, Injectable hydrogels for central nervous system therapy, *Biomedical Materials*, 7, 024101, **2012**.
- [28] C. E. Schmidt, V. R. Shastri, J. P. Vacanti, and R. Langer, Stimulation of neurite outgrowth using an electrically conducting polymer, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 8948-8953, **1997**.

- [29] D. Mawad, E. Stewart, D. L. Officer, T. Romeo, P. Wagner, K. Wagner, *et al.*, A Single Component Conducting Polymer Hydrogel as a Scaffold for Tissue Engineering, *Advanced Functional Materials*, 22, 2692-2699, **2012**.
- [30] X. A. Liu, J. Chen, K. J. Gilmore, M. J. Higgins, Y. Liu, and G. G. Wallace, Guidance of neurite outgrowth on aligned electrospun polypyrrole/poly(styrene-beta-isobutylene-beta-styrene) fiber platforms, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 94A, 1004-1011, **2010**.
- [31] A. D. Bendrea, L. Cianga, and I. Cianga, Review paper: Progress in the Field of Conducting Polymers for Tissue Engineering Applications, *Journal of Biomaterials Applications*, 26, 3-84, **2011**.
- [32] R. Ravichandran, S. Sundarrajan, J. R. Venugopal, S. Mukherjee, and S. Ramakrishna, Applications of conducting polymers and their issues in biomedical engineering, *Journal of the Royal Society Interface*, 7, S559-S579, **2010**.
- [33] H. K. Song, B. Toste, K. Ahmann, D. Hoffman-Kim, and G. T. R. Palmore, Micropatterns of positive guidance cues anchored to polypyrrole doped with polyglutamic acid: A new platform for characterizing neurite extension in complex environments, *Biomaterials*, 27, 473-484, **2006**.
- [34] A. F. Quigley, J. M. Razal, B. C. Thompson, S. E. Moulton, M. Kita, E. L. Kennedy, *et al.*, A Conducting-Polymer Platform with Biodegradable Fibers for Stimulation and Guidance of Axonal Growth, *Advanced Materials*, 21, 1-5, **2009**.
- [35] D. D. Ateh, H. A. Navsaria, and P. Vadgama, Polypyrrole-based conducting polymers and interactions with biological tissues, *Journal of the Royal Society Interface*, 3, 741-752, **2006**.
- [36] J. Y. Lee, C. A. Bashur, A. S. Goldstein, and C. E. Schmidt, Polypyrrole-coated electrospun PLGA nanofibers for neural tissue applications, *Biomaterials*, 30, 4325-4335, **2009**.
- [37] T. Zhou, B. N. Xu, H. P. Que, Q. X. Lin, S. H. Lv, and S. J. Liu, Neurons derived from PC12 cells have the potential to develop synapses with primary neurons from rat cortex, *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 66, 105-112, **2006**.
- [38] J. K. Kim and H. Ahn, Fabrication and characterization of polystyrene/gold nanoparticle composite nanofibers, *Macromolecular Research*, 16, 163-168, **2008**.
- [39] J. Pinkernelle, P. Calatayud, G. F. Goya, H. Fansa, and G. Keilhoff, Magnetic nanoparticles in primary neural cell cultures are mainly taken up by microglia, *Bmc Neuroscience*, 13, 32, **2012**.
- [40] J. Shan and H. Tenhu, Recent advances in polymer protected gold nanoparticles: synthesis, properties and applications, *Chemical Communications*, 4580-4598, **2007**.

- [41] J. Bai, Y. Li, J. Du, S. Wang, J. Zheng, Q. Yang, *et al.*, One-pot synthesis of polyacrylamide-gold nanocomposite, *Materials Chemistry and Physics*, 106, 412-415, **2007**.
- [42] H. S. Du, Q. B. Yang, J. Bai, S. G. Wang, and Y. X. Li, Synthesis of poly (N-Anylpyrrolidone) nanofibers containing gold nanoparticles via electrospinning technique, *Chemical Research in Chinese Universities*, 23, 538-540, **2007**.
- [43] A. E. Deniz, H. A. Vural, B. Ortac, and T. Uyar, Gold nanoparticle/polymer nanofibrous composites by laser ablation and electrospinning, *Materials Letters*, 65, 2941-2943, **2011**.
- [44] G. M. Kim, A. Wutzler, H. J. Radusch, G. H. Michler, P. Simon, R. A. Sperling, *et al.*, "One-dimensional arrangement of gold nanoparticles by electrospinning," *Chemistry of Materials*, 17, 4949-4957, **2005**.
- [45] S. Calamak, C. Erdogdu, M. Ozalp, and K. Ulubayram, Silk fibroin based antibacterial bionanotextiles as wound dressing materials, *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 43, 11-20, **2014**.
- [46] X. H. Zhang, M. R. Reagan, and D. L. Kaplan, Electrospun silk biomaterial scaffolds for regenerative medicine, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61, 988-1006, **2009**.
- [47] I. Cucchi, A. Boschi, C. Arosio, F. Bertini, G. Freddi, and M. Catellani, Bio-based conductive composites: Preparation and properties of polypyrrole (PPy)-coated silk fabrics, *Synthetic Metals*, 159, 246-253, **2009**.
- [48] T. Hausner, R. Schmidhammer, S. Zandieh, R. Hopf, A. Schultz, S. Gogolewski, *et al.*, Nerve regeneration using tubular scaffolds from biodegradable polyurethane, *Acta Neurochir Suppl*, 100, 69-72, **2007**.
- [49] D. Z. Yin, X. H. Wang, Y. N. Yan, and R. J. Zhang, Preliminary studies on peripheral nerve regeneration using a new polyurethane conduit, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 22, 143-159, **2007**.
- [50] B. Carlberg, M. Z. Axell, U. Nannmark, J. Liu, and H. G. Kuhn, Electrospun polyurethane scaffolds for proliferation and neuronal differentiation of human embryonic stem cells, *Biomedical Materials*, 4, 045004, **2009**.
- [51] J. S. Park, K. Park, H. T. Moon, D. G. Woo, H. N. Yang, and K. H. Park, Electrical Pulsed Stimulation of Surfaces Homogeneously Coated with Gold Nanoparticles to Induce Neurite Outgrowth of PC12 Cells, *Langmuir*, 25, 451-457, **2009**.
- [52] N. Higashi, T. Takagi, and T. Koga, Layer-by-layer fabrication of well-packed gold nanoparticle assemblies guided by a beta-sheet peptide network, *Polymer Journal*, 42, 95-99, **2010**.
- [53] M. P. Prabhakaran, J. R. Venugopal, and S. Ramakrishna, Mesenchymal stem cell differentiation to neuronal cells on electrospun nanofibrous substrates for nerve tissue engineering, *Biomaterials*, 30, 4996-5003, **2009**.

- [54] K. F. Leong, C. M. Cheah, and C. K. Chua, Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs, *Biomaterials*, 24, 2363-2378, **2003**.
- [55] J. M. Hackett, T. T. Dang, E. C. Tsai, and X. D. Cao, Electrospun Biocomposite Polycaprolactone/Collagen Tubes as Scaffolds for Neural Stem Cell Differentiation, *Materials*, 3, 3714-3728, **2010**.
- [56] Ulubayram K, Calamak S, Shahbazi R, Eroglu İ. Nanofibers Based Antibacterial Drug Design, Delivery and Applications, *Current Pharmaceutical Design*, 21, 1930-1943, **2015**.
- [57] F. A. Sheikh, H. W. Ju, B. M. Moon, H. J. Park, J. H. Kim, O. J. Lee, *et al.*, A novel approach to fabricate silk nanofibers containing hydroxyapatite nanoparticles using a three-way stopcock connector, *Nanoscale Research Letters*, 8, 303, **2013**.
- [58] A. R. Murphy, P. S. John, and D. L. Kaplan, Modification of silk fibroin using diazonium coupling chemistry and the effects on hMSC proliferation and differentiation, *Biomaterials*, 29, 4260-4260, **2008**.
- [59] K. Karthikeyan, S. Sekar, M. P. Devi, S. Inbasekaran, C. H. Lakshminarasiah, and T. P. Sastry, Fabrication of novel biofibers by coating silk fibroin with chitosan impregnated with silver nanoparticles, *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, 22, 2721-2726, **2011**.
- [60] A. R. Padol, K. Jayakumar, N. B. Shridhar, H. D. Narayana Swamy, M. Narayana Swamy, and K. Mohan, Safety evaluation of silk protein film (a novel wound healing agent) in terms of acute dermal toxicity, acute dermal irritation and skin sensitization," *Toxicol Int*, 18, 17-21, **2011**.
- [61] N. N. Jiang, X. Y. Huang, Z. B. Li, L. J. Song, H. S. Wang, Y. M. Xu, *et al.*, Silk fibroin tissue engineering scaffolds with aligned electrospun fibers in multiple layers, *Rsc Advances*, 4, 47570-47575, **2014**.
- [62] N. G. Bastus, J. Comenge, and V. Puntes, Kinetically Controlled Seeded Growth Synthesis of Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles of up to 200 nm: Size Focusing versus Ostwald Ripening, *Langmuir*, 27, 11098-11105, **2011**.
- [63] L. Y. Shen, L. Rapenne, P. Chaudouet, J. Ji, and C. Picart, In situ synthesis of gold nanoparticles in exponentially-growing layer-by-layer films, *Journal of Colloid and Interface Science*, 388, 56-66, **2012**.
- [64] X. B. Feng, N. Gan, J. Zhou, T. H. Li, Y. T. Cao, F. T. Hu, *et al.*, A novel dual-template molecularly imprinted electrochemiluminescence immunosensor array using Ru(bpy)₃(2+)-Silica@Poly-L-lysine-Au composite nanoparticles as labels for near-simultaneous detection of tumor markers, *Electrochimica Acta*, 139, 127-136, **2014**.

- [65] S. Sirivisoot and B. S. Harrison, Skeletal myotube formation enhanced by electrospun polyurethane carbon nanotube scaffolds, *International Journal of Nanomedicine*, 6, 2483-2497, **2011**.
- [66] D. P. Dowling, I. S. Miller, M. Ardhaoui, and W. M. Gallagher, Effect of Surface Wettability and Topography on the Adhesion of Osteosarcoma Cells on Plasma-modified Polystyrene, *Journal of Biomaterials Applications*, 26, 327-347, **2011**.
- [67] L. M. Y. Yu, N. D. Leipzig, and M. S. Shoichet, Promoting neuron adhesion and growth, *Materials Today*, 11, 36-43, **2008**.
- [68] D. C. Turner, L. A. Flier, and S. Carbonetto, Identification of a Cell-Surface Protein Involved in Pc12 Cell-Substratum Adhesion and Neurite Outgrowth on Laminin and Collagen, *Journal of Neuroscience*, 9, 3287-3296, **1989**.
- [69] L. A. Greene and A. S. Tischler, Establishment of a Noradrenergic Clonal Line of Rat Adrenal Pheochromocytoma Cells Which Respond to Nerve Growth-Factor, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73, 2424-2428, **1976**.
- [70] T. M. Dinis, G. Vidal, R. R. Jose, P. Vigneron, D. Bresson, V. Fitzpatrick, *et al.*, Complementary Effects of Two Growth Factors in Multifunctionalized Silk Nanofibers for Nerve Reconstruction, *Plos One*, 9, **2014**.
- [71] T. M. Patz, A. Doraiswamy, R. J. Narayan, W. He, Y. Zhong, R. Bellamkonda, *et al.*, Three-dimensional direct writing of B35 neuronal cells, *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials*, 78B, 124-130, **2006**.
- [72] D. R. Croslan, M. C. Schoell, G. D. Ford, J. V. Pulliam, A. Gates, C. M. Clement, *et al.*, Neuroprotective effects of neuregulin-1 on B35 neuronal cells following ischemia, *Brain Research*, 1210, 39-47, **2008**.
- [73] M. Fischer, S. Kaech, D. Knutti, and A. Matus, Rapid actin-based plasticity in dendritic spines, *Neuron*, 20, 847-854, **1998**.
- [74] L. H. Huang, X. L. Zhuang, J. Hu, L. Lang, P. B. Zhang, Y. S. Wang, *et al.*, Synthesis of biodegradable and electroactive multiblock polylactide and aniline pentamer copolymer for tissue engineering applications, *Biomacromolecules*, 9, 850-858, **2008**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Ülkü Selcen Demir
Doğum Yeri : Aydın
Medeni Hali : Bekar
E-posta : selcen.demir@hacettepe.edu.tr
Adresi : Hacettepe Üniversitesi Biyomühendislik Anabilim Dalı

Eğitim ve Akademik Durumu

Lise : Aydın Adnan Menderes Anadolu Lisesi (2004-2008)
Lisans : Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü (2008-2012)
Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Anabilim Dalı (2012-2015)

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce : IELTS 6,5/9,0, YDS 85/100

İş Deneyimi

-

Deneyim Alanları

Doku Mühendisliği, biyomalzemeler

Tezden Üretilmiş Proje ve Bütçesi

BAB Projesi, Proje No. 1064, İletken Doku İskelelerinde Nöron-Benzeri Hücre Davranışlarının İncelenmesi, Proje Bütçesi: 18.900,00 TL

Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

-