

**HASARLI OMURİLİK ONARIMI İÇİN HÜCRE DESTEKLİ
ENJEKTE EDİLEBİLİR İPEK FİBROİN
MİKROTAŞIYICILARIN GELİŞTİRİLMESİ**

**DEVELOPMENT OF CELL SUPPORTED INJECTABLE
SILK FIBROIN MICROCARRIERS FOR REPAIR OF
DAMAGED SPINAL CORD**

BEGÜM SARGON

PROF. DR. MENEMŞE GÜMÜŞDERELİOĞLU

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Ana Bilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2023

ÖZET

HASARLI OMURİLİK ONARIMI İÇİN HÜCRE DESTEKLİ ENJEKTE EDİLEBİLİR İPEK FİBROİN MİKROTAŞIYICILARIN GELİŞTİRİLMESİ

Begüm SARGON

Yüksek Lisans, Biyomühendislik Ana Bilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Eylül 2023, 132 sayfa

Sunulan tez çalışması, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından FHD-2022-20005 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir.

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün verilerine göre omurilik yaralanmaları her yıl 250.000 ile 500.000 insanı etkilemektedir. Mevcut klinik uygulamalarda omurilik hasarlarını tamamen onarabilen bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır. Hücre temelli rejenerasyon yaklaşımlarının önünde, hücrelerin hasarlı omuriliğe transplantasyonundan sonra düşük canlılık oranları ile karşılaşılması gibi engeller bulunmaktadır. Tez kapsamında, omurilik hasarlarının tedavisine yönelik enjekte edilebilir mikrotasıyıcı-destekli hücre dağıtım sisteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Doğal bir protein olan ipek fibroin (SF) temelli biyobozunur yapıdaki mikrotaşyıcılar, emülsiyon haline getirilmiş faz ayrımı yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır. Yüzde %1,5-6,5 ağırlık/hacim oranlarındaki 7 farklı ipek fibroin konsantrasyonuna sahip mikrotaşyıcılar üretilmiştir.

SF konsantrasyonu artıkça mikrotaşyıcıların çapı $160,8 \pm 34,9$ μm 'den $385,5 \pm 112,9$ μm 'ye artmıştır. Mikrotaşyıcıların topografik özelliklerinin ipek konsantrasyonu, donma sıcaklığı ve karıştırma hızı ile değiştirilebildiği gösterilmiştir. Mikrotaşyıcı sistemlerinde partikül çapı enjekte edilebilirlik ile doğrudan ilişkilidir. Hücrelerin çoğalabileceği uygun yüzey topografisi de göz önünde bulundurulduğunda 7 grup arasından %2,5 SF konsantrasyonuna sahip mikrotaşyıcı grubu (2,5 SF) ön plana çıkmıştır.

Üretilen mikrotaşyıcıların stabilizasyonu metanol ve etanol olmak üzere iki farklı alkol çözeltisinde test edilmiştir. Geliştirilen mikrotaşyıcılar fiziksel ve kimyasal özellikleri temelinde ayrıntılı bir şekilde karakterize edilmiştir. Yedi günlük *in-vitro* statik ve dinamik hücre kültürü çalışmaları kapsamında; L929 fibroblastları, MC3T3-E1 pre-osteoblastları ve S42-Schwann hücrelerinin SF mikrotaşyıcıların pürüzlü yüzeylerinde iyi bir şekilde çoğaldığı gösterilmiştir. Mikrotaşyıcılar, Schwann hücrelerine mekanik destek sağlayarak hücrelerin enjekte edildikten sonra da canlılıklarının artarak devam etmesini sağlamıştır.

Bu araştırma, üç boyutlu SF mikrotaşyıcı yüzeylerinde çoğalan Schwann hücrelerinin çoğalmasını inceleyen ilk çalışmadır. Hücre yüklü enjekte edilebilir ve biyobozunur yapıdaki küresel SF mikrotaşyıcılar ile invaziv olmayan bir tedavi seçeneği sunmak, çalışmadaki fikrin özgünlüğünü desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler: İpek Fibroin; Enjekte Edilebilir Mikrotaşyıcılar; Schwann Hücreleri; Omurilik Yaralanmaları; Doku Mühendisliği; Sinir Rejenerasyonu.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF CELL SUPPORTED INJECTABLE SILK FIBROIN MICROCARRIERS FOR REPAIR OF DAMAGED SPINAL CORD

Begüm SARGON

Master of Science, Department of Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

September 2023, 132 pages

This thesis study has been financially supported by Hacettepe University Research Fund (FHD-2022-20005).

According to the data of the World Health Organization (WHO), spinal cord injuries affect between 250,000 and 500,000 people every year. In current clinical practice, there is no treatment method that can completely repair spinal cord injuries. There are barriers to cell-based regeneration approaches, such as low viability rates after transplantation of cells into the damaged spinal cord. The aim of this study is to develop an injectable microcarrier-assisted cell delivery system for the therapy of spinal cord injuries. Biodegradable microcarriers based on silk fibroin (SF), a natural protein, were prepared using the emulsified phase separation method.

Microcarriers with 7 different silk fibroin concentrations at 1.5-6.5% weight/volume ratios were produced. As the silk fibroin concentration increased, the diameter of the microcarriers increased from $160.8 \pm 34.9 \mu\text{m}$ to $385.5 \pm 112.9 \mu\text{m}$. It has been shown that the topographic properties of microcarriers can be changed by silk concentration, freezing temperature, and mixing speed. Particle diameter is directly related to injectability in microcarrier systems. Considering the suitable surface topography on which cells can proliferate, the microcarrier group (2.5 SF) with 2.5% silk fibroin concentration came to the fore among the 7 groups.

The stabilization of the produced microcarriers was tested in two different alcohol solutions, methanol and ethanol. The developed microcarriers were characterized on the basis of their physical and chemical properties. At the end of study, *in-vitro* static and dynamic cell culture studies in 7 days were performed. Microcarriers provided mechanical support to L929 fibroblasts, MC3T3-E1 pre-osteoblasts and Schwann cells, ensuring that the viability of the cells increased even after they were injected.

This research describes the first report of three dimensional microcarrier surfaces to examine Schwann cell proliferation. Cell-loaded injectability and biodegradability of spherical SF microcarriers provide a non-invasive treatment option. Thus supports the originality of the idea in the study.

Keywords: Silk fibroin; Injectable microcarriers; Schwann cells; Spinal cord injuries; Tissue engineering; Nerve repair.

TEŞEKKÜR

*Hayallerini kurduğum bilimsel yolculuğumu bilgi ve deneyimleriyle aydınlatan, öğrencisi olduğum için gurur duyduğum, örnek aldığım, içimde tutamadığım heyecanımı benimle paylaşan, tez çalışmalarımı büyük bir özenle yönlendiren, hayatımda her zaman çok büyük bir yeri olacak olan çok değerli hocam **Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU**'na kendimi geliştirmeme fırsat tanıdığı, sağladığı imkanları, bana inandığı, güvendiği ve desteği için saygı, sevgi ve en içten teşekkürlerimi sunarım.*

*Yüksek lisans tez çalışmasının yürütülmesinde FHD-2022-20005 numaralı Hızlı Destek Projesi ile maddi destek sağlayan **Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi**'ne ve bana 2210-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında maddi destek sağlayan **TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı**'na teşekkür ederim.*

*Hayallerimi ve yapmak istediklerimi anlattığımda "Neden olmasın? Yüksek lisans bilim insanı olma yolunda attığımız bir adımdır. Önemli olan senin ne istediğin, bu süreci nasıl yöneteceğin" diyerek beni cesaretlendiren, yüksek lisans eğitim sürecime beni yönlendiren sayın hocam **Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR**'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.*

*Tez çalışmam kapsamında SEM analizlerimi titizlikle gerçekleştiren **HÜNİTEK** personeline teşekkür ederim.*

*Üzerimde emeği büyük olan, hücre kültürü deneyimlerimin tohumlarını ekip yeşerten, hayata karşı güçlü duruşuyla her zaman örnek alacağım, birlikte çalışarak kendimi şanslı hissettiğim ve çok özlediğim canım hocam **Dr. Özge Ekin AKDERE**'ye, ne zaman bir sorun ile karşılaşsam sakinliği ile durumu hemen çözen, bilgi ve deneyimlerini benimle her zaman paylaşan hocam **Dr. Anıl Sera ÇAKMAK**'a, tez çalışmamda olmuyor dediğim çözeltimi olduran, bilimsel merakından çok şey öğrendiğim, kendisini gördükçe mutlu olduğum, insanlığı ve çalışma azmini her zaman örnek alacağım hocam **Dr. Damla ÇETİN ALTINDAL**'a, enerjisiyle bana neşe katan, renkli kişiliğiyle çalışmalarına özendiğim, ne zaman ihtiyacım olsa sürprizleriyle beni mutlu eden, her zaman güç veren biricik hocam **Dr. Gözde KOŞARSOY AĞÇELİ**'ye en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım.*

Hayatımın son üç senesinin büyük bir çoğunluğunu kaplayan canlarım; omzumdaki elini hiç çekmeyen, ne zaman umutsuzluğa kapılsam tüm çözüm yollarını hiç sıkılmadan anlatan, laboratuvara ilk geldiğim andan beri kendisinden çok şey öğrendiğim, her şeyden konuşmaktan büyük zevk aldığım canım tatlışım **Elvan KONUK TOKAK**'a, ağabeyim olsa ancak bu kadar sevebilirim dediğim, beni kardeşi gibi görüp uğraşan, Yeşil Vadi'deki yürüyüşlerimizde eşsiz sohbetiyle hayata bakışımı güzelleştiren **Aykut TOKAK**'a, yapabileceklerimin farkında olmamı sağlayan, vazgeçmeyerek mücadele etmeyi öğreten, tezimin son çalışmalarındaki kurtarıcım, en güzel gülüşlerimin ortakçısı **Tuğçe GÜLTAN**'a, ne zaman yardıma ihtiyacım olsa hemen koşan, desteğini hiç esirgemeyen, güne başlamadan önceki sohbetlerimizden büyük keyif aldığım **Onat AKBULUT**'a hayatımda oldukları için ve hiç çıkmamalarını umarak teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımın başında benimle denemekten vazgeçmeyen, başaracağıma inandıran, minik küreciklerimizi ürettiğimizde aynı heyecanı ve zorlukları paylaştığım **Sena KOÇ**'a, yanımda olduğunu tüm samimiyetiyle hissettiren, kalbi güzel **Tülay Selin ERKUT**'a, kahve kokularıyla bana nefes aldırان **Demet ÇAKIR**'a ve tüm **Hücre ve Doku Mühendisliği Grubu**'ndaki değerli arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Kendimi açıklamadan bile beni her zaman anlayan, sonsuz güvendiğim, içtenliği ile yanımda olan kızçem **Andaç ABAT**'a, yan yana yaptığımız deneylerden çok zevk aldığım, zor zamanlarımla varlığı ile güzelleştiren, beni her zaman motive eden canım arkadaşım **Meryem UYAR**'a, içimdeki çiçekleri yeşerten meslektaşım **Zeynep ÖZDEL**'e teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımda olduğu için çok şanslı hissettiğim, beni her zaman mutlu etmeye çalışan, güldüren, sakinleştiren, geleceğe umutla bakmamı sağlayan 'sevgili' **Ozan TARI**'ya sevgimi ve teşekkürlerimi sunarım.

Beni bu günlere getiren, yanımda olmalarıyla motive olduğum, daha ilkokul birinci sınıftayken "Bilim insanı olacağım!" diyerek yürüdüğüm bu yolun ilk emekçileri olan sevgili ailem; babam **Burak SARGON**'a, annem **Ebru SARGON**'a ve kardeşim **Bora SARGON**'a gösterdikleri sabır ve anlayış için sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xviii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xix
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Omurilik.....	4
2.2. Omurilik Yaralanmaları.....	4
2.2.1. Omurilik Yaralanmalarında Schwann Hücreli Rejenerasyon.....	7
2.3. Üç Boyutlu Hücre Kültürü.....	9
2.3.1. Mikrotaşyıcı Teknolojisi.....	10
2.3.1.1. Mikrotaşyıcı Üretim Yöntemleri.....	15
2.4. Doğal Polimerlerden Üretilen Mikrotaşyıcılar.....	17
2.4.1. İpek Fibroinin Yapısı ve Fiziksel Özellikleri.....	18
2.4.2. İpek Fibroin Mikrotaşyıcılar.....	19
2.5. Enjekte Edilebilir Mikrotaşyıcılar.....	22
2.6. Mikrotaşyıcı-destekli Biyoreaktörler.....	24
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	26
3.1. Kullanılan Malzemeler.....	26
3.2. İpek Fibroin Mikrotaşyıcıların Üretimi.....	29

3.2.1. İpek Fibroin Çözeltilisinin Hazırlanması.....	29
3.2.2. İpek Fibroin Mikrotaşıyıcıların Üretimi.....	29
3.2.2.1. İpek Fibroin Mikrotaşıyıcıların Stabilizasyonu.....	30
3.3. İpek Fibroin Mikrotaşıyıcıların Karakterizasyonu.....	31
3.3.1. Mikrotaşıyıcıların Görüntülenmesi ve Çap Ölçümü.....	31
3.3.2. Mikrotaşıyıcıların Yoğunluk Ölçümü.....	31
3.3.3. Mikrotaşıyıcıların Kimyasal Karakterizasyonu.....	31
3.3.4. Mikrotaşıyıcıların Termal Karakterizasyonu.....	31
3.3.5. Su Alım Kapasitesinin Belirlenmesi.....	32
3.3.6. <i>In-Vitro</i> Biyobozunurluk Testi.....	32
3.4. <i>In-vitro</i> Hücre Kültürü Çalışmaları.....	32
3.4.1. Schwann Hücrelerinin Karakterizasyonu.....	32
3.4.1.1. Hücre Canlılığı ve Proliferasyonunun Belirlenmesi.....	34
3.4.1.2. Schwann Hücrelerinin Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	35
3.4.2. Mikrotaşıyıcı-destekli Statik Hücre Kültürü Çalışmaları.....	35
3.4.2.1. L929 Hücre Kültürü Çalışmaları.....	36
3.4.2.2. MC3T3-E1 Hücre Kültürü Çalışmaları.....	40
3.4.2.3. S42-Schwann Kültürü Çalışmaları.....	40
3.4.3. Mikrotaşıyıcı-destekli Dinamik Hücre Kültürü Çalışmaları.....	41
3.4.4. Gen Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi.....	42
3.5. İstatistiksel Analiz.....	44
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	45
4.1. İpek Fibroin Mikrotaşıyıcıların Üretimi.....	45
4.2. İpek Fibroin Mikrotaşıyıcıların Karakterizasyonu.....	48
4.2.1. Mikrotaşıyıcıların Görüntülenmesi ve Çap Değerleri.....	48
4.2.2. Mikrotaşıyıcıların Yoğunluk Değerleri.....	51

4.2.3. Mikrotaşıyıcıların Kimyasal Yapısı.....	52
4.2.4. Mikrotaşıyıcıların Termal Özellikleri.....	53
4.2.5. Su Alım Kapasitesi.....	55
4.2.6. <i>In-Vitro</i> Biyobozunurluk Sonuçları.....	57
4.3. <i>In-vitro</i> Hücre Kültürü Çalışmaları.....	59
4.3.1. Schwann Hücrelerinin Karakterizasyonu.....	59
4.3.1.1. Hücre Büyüme Eğrisi.....	59
4.3.1.2. Canlılık Analizi.....	59
4.3.1.3. Schwann Hücrelerinin Morfolojik Özellikleri.....	61
4.3.2. Mikrotaşıyıcı-destekli Statik Hücre Kültürü.....	66
4.3.2.1. L929 Hücre Kültürü.....	66
4.3.2.2. MC3T3-E1 Hücre Kültürü.....	73
4.3.2.3. S42 Hücre Kültürü.....	83
4.3.3. Mikrotaşıyıcı-destekli Dinamik Hücre Kültürü.....	95
4.3.4. Gen Ekspresyon Seviyeleri.....	111
5. YORUM.....	113
6. KAYNAKLAR.....	115
EKLER.....	125
EK 1 – Schwann hücrelerinin $\ln(\text{hücre sayısı/mL}) / \text{zaman (sa)}$ grafiği.....	125
EK 2 - TCPS yüzeylerinde çoğalan hücrelerin MTT grafiği, hücre sayıları, kalibrasyon grafikleri.....	126
EK 3 - Mikrotaşıyıcı/hücre kalibrasyon grafikleri.....	128
EK 4 – Tez Çalışması Orjinallik Raporu.....	130
ÖZGEÇMİŞ.....	131

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Omurilik hasarlarına yönelik biyomalzeme destekli hücre tedavilerinin uygulama yöntemleri ([4]'ten değiştirilerek).....	5
Şekil 2.2. Pluripotent ve multipotent kök hücre tedavi yaklaşımları. Rakamlar tedaviler için gerekli hücre sayısını ifade etmektedir. GVHH: Graft versus host hastalığı ([1]'den değiştirilerek).....	7
Şekil 2.3. A) Schwann hücresi sitoplazmasının katlanarak miyelin kılıfı oluşturması B) Miyelin kılıfın açılmış hali [12]'den değiştirilerek.....	8
Şekil 2.4. Nöron anatomisinin şematik çizimi (BioRender.com ile çizilmiştir).....	8
Şekil 2.5. Hücre kültürü yöntemlerinin gelişimi ([16]'dan değiştirilerek).....	10
Şekil 2.6. Çeşitli hücre kültür sistemlerinden elde edilen hücre sayılarının karşılaştırması ([18]'den değiştirilerek).....	11
Şekil 2.7. Cytodex-1 mikrot taşıyıcıların (Pharmacia Fine Chemicals, Sweden) ters ışık mikroskopundaki (Olympus IX73, A.B.D.) görüntüleri.....	14
Şekil 2.8. Cytodex-3 mikrot taşıyıcıların (Pharmacia Fine Chemicals, Sweden) ters ışık mikroskopundaki görüntüleri.....	14
Şekil 2.9. <i>Bombyx mori</i> tarafından üretilen ipeğin yapısı ([32]'den değiştirilerek).....	18
Şekil 2.10. Hasarlı doku onarımında kullanılan uygulamalarında kullanılan enjekte edilebilir hücre dağıtım sistemlerinin şematik gösterimi ([1]'den değiştirilerek).....	23
Şekil 2.11. Karıştırmalı kap biyoreaktör kullanılarak hazırlanan hücre yüklü enjekte edilebilir mikrot taşıyıcıların uygulamasının şematik gösterimi ([62]'den değiştirilerek).....	25
Şekil 3.1. Emülsiyon haline getirilmiş faz ayrımı ile dondurarak kurutulan gözenekli mikrot taşıyıcıların üretim şeması (Biorender.com ile çizilmiştir).....	30
Şekil 3.2. Farklı miktarlardaki SF mikrot taşıyıcıların 24 kuyucuklu kültür kaplarında kapladığı alan.....	36

Şekil 3.3. SF mikrotarıyıcıların hücre kültürü çalışmaları öncesindeki görüntüsü. Mikrotarıyıcılar 24 kuyucuklu kültür kabının her gözüne 1 mg/mL konsantrasyonda dağıtılmıştır.....	37
Şekil 3.4. (A) Spinal iğnenin (18 G) genel görüntüsü (B) Bir mL içerisinde çekilen 1 mg 2,5 SF (C) Enjeksiyon sonrası şırınga ucu.....	38
Şekil 3.5. Dinamik hücre kültürü çalışması zaman çizelgesi.....	41
Şekil 3.6. Karıştırmalı kap biyoreaktörün etüv içerisindeki görüntüsü.....	42
Şekil 4.1. Farklı karıştırma hızlarında oluşan ve parçalanmış 2,5 SF mikrotarıyıcılar.....	46
Şekil 4.2. Donma sıcaklığı ve stabilizasyon ajanları ile değişen mikrotarıyıcı yüzeylerinin SEM görüntüleri.....	47
Şekil 4.3. Ters ışık mikroskopunda 2,5 SF mikrotarıyıcıların PBS içerisindeki görüntüleri.....	48
Şekil 4.4. Farklı SF konsantrasyonlarına bağlı olarak ölçülen çap değerleri (Karıştırma hızı:850 rpm; donma sıcaklığı:-80°C koşullarında üretilmiştir).....	49
Şekil 4.5. %1,5-6,5 (w/v) oranlarındaki 7 farklı SF konsantrasyonuna sahip mikrotarıyıcıların farklı büyütmelerindeki SEM görüntüleri.....	50
Şekil 4.6. Artan SF konsantrasyonlarındaki mikrotarıyıcıların (A) Pürüz/gözenek boyutları (B) Yoğunluk değerleri.....	51
Şekil 4.7. Metanol ve etanol ile stabilize edilmiş SF mikrotarıyıcıların stabilize edilmemiş mikrotarıyıcılar (kontrol) ile karşılaştırmalı ATR-FTIR spektrumları.....	52
Şekil 4.8. Artan SF konsantrasyonlarında üretilen mikrotarıyıcıların kuru haldeki ve PBS içerisinde 2 saat sonundaki görüntüleri.....	55
Şekil 4.9. Artan ipek konsantrasyonlarında mikrotarıyıcıların su alım yüzdeleri.....	56
Şekil 4.10. 2,5 SF mikrotarıyıcıların <i>in-vitro</i> biyobozunurluk grafiği.....	57
Şekil 4.11. Kolajenaz ortamında 2,5 SF mikrotarıyıcının ışık mikroskopundaki 5. hafta görüntüsü.....	58
Şekil 4.12. SF mikrotarıyıcı bozunurluğunun 5. haftadaki SEM görüntüleri.....	58

Şekil 4.13. Schwann hücrelerinin hücre büyüme eğrisi (Başlangıç hücre yoğunluğu: 2×10^4 hücre/mL'dir).....	59
Şekil 4.14. Schwann hücrelerinin 14 günlük kültürasyonu süresince elde edilen absorbans değerleri (Başlangıç hücre yoğunluğu: 2×10^4 hücre/mL'dir).....	60
Şekil 4.15. Schwann hücrelerinin kültürün 1., 3. ve 5. günlerine ait ışık mikroskobu görüntüleri.....	61
Şekil 4.16. Schwann hücrelerinin kültürün 7., 10. ve 14. günlerine ait ışık mikroskobu görüntüleri.....	62
Şekil 4.17. Schwann hücrelerinin Alexa Fluor® 488 Phalloidin (hücre iskeleti)/DAPI (çekirdek) boyamasına ait 1. gün görüntüleri (Hücre iskeleti yeşil; hücre çekirdeği mavi ile boyanmıştır).....	63
Şekil 4.18. Schwann hücrelerinin Alexa Fluor® 488 Phalloidin (hücre iskeleti)/DAPI (çekirdek) boyamasına ait 7. gün görüntüleri (Hücre iskeleti yeşil; hücre çekirdeği mavi ile boyanmıştır).....	64
Şekil 4.19. Schwann hücrelerinin kristal viyole boyaması 1. gün görüntüleri....	65
Şekil 4.20. Schwann hücrelerinin kristal viyole boyaması 5. gün görüntüleri....	65
Şekil 4.21. Schwann hücrelerinin kristal viyole boyaması 7. gün görüntüleri....	66
Şekil 4.22. 2,5 SF mikrotarıyıcılar üzerinde çoğalan L929 fibroblastların 1., 3. ve 7. günde mikroskop görüntüleri.....	67
Şekil 4.23. (A) İpek mikrotarıyıcılar/L929 fibroblastların 7 günlük kültürasyonu boyunca elde edilen absorbans değerleri (B) İpek mikrotarıyıcılar yüzeylerinden tripsinizasyon ile kaldırılan toplam L929 hücre sayısı (İstatistiksel anlamlı farklılıklar $n=3$, $*p<0,05$, $****p<0,0001$ mikrotarıyıcı yüzeylerinde çoğalan hücrelerin 1. gün canlılık değeri kontrol olarak kabul edildiğinde, $■■■■p<0,0001$ 3. gün kontrol olarak kabul edildiğinde ve $▲▲p<0,01$, $▲▲▲▲p<0,0001$ 7. gün kontrol olarak kabul edildiğindeki durum) (Başlangıç hücre yoğunluğu: 2×10^4 hücre/mL'dir).....	68

Şekil 4.24.	2,5 SF mikrotasıyıcı yüzeylerindeki L929 fibroblastların 3. ve 7. gün canlı/ölü hücre boyama görüntüleri (Canlı hücreler yeşile, ölü hücreler kırmızıya boyanmıştır).....	70
Şekil 4.25.	2,5 SF yüzeylerinde çoğalan L929 fibroblastların 3. ve 7. gün Alexa Fluor® Phalloidin/DAPI boyama görüntüleri (Hücre iskeleti yeşil; hücre çekirdeği mavi ile boyanmıştır).....	71
Şekil 4.26.	2,5 SF mikrotasıyıcı yüzeylerinde yayılmaya başlayan L929 fibroblastların 3. gün SEM görüntüleri.....	72
Şekil 4.27.	2,5 SF mikrotasıyıcı yüzeylerinde çoğalan L929 fibroblastların 7. gün SEM görüntüleri.....	73
Şekil 4.28.	İpek mikrotasıyıcılar/L929 fibroblastların enjeksiyon sonrası 6. saat ve 1. gün SEM görüntüleri.....	74
Şekil 4.29.	2,5 SF mikrotasıyıcılar üzerine tutunan ve çoğalan MC3T3-E1 pre-osteoblastların 1., 3. ve 7. gündeki mikroskop görüntüleri.....	75
Şekil 4.30.	(A) İpek mikrotasıyıcılar/MC3T3-E1 pre-osteoblastların 7 günlük kültürasyonu boyunca elde edilen absorbans değerleri (B) İpek mikrotasıyıcılar yüzeylerinden tripsinizasyon ile kaldırılan toplam L929 hücre sayısı (İstatistiksel anlamlı farklılıklar n=3, * $p<0,05$, ** $p<0,01$ mikrotasıyıcı yüzeylerinde çoğalan hücrelerin 1. gün canlılık değeri kontrol olarak kabul edildiğinde, ■ $p<0,05$, ■■ $p<0,01$ 3. gün kontrol olarak kabul edildiğinde ve ▲▲ $p<0,01$ 7. gün kontrol olarak kabul edildiğindeki durum) (Başlangıç hücre yoğunluğu: 2×10^4 hücre/mL'dir).....	76
Şekil 4.31.	2,5 SF mikrotasıyıcı yüzeylerindeki MC3T3-E1 pre-osteoblastların 3. ve 7. gün canlı/ölü hücre boyama görüntüleri (Canlı hücreler yeşile, ölü hücreler kırmızıya boyanmıştır).....	78
Şekil 4.32.	2,5 SF yüzeylerinde. çoğalan MC3T3-E1 pre-osteoblastların 3. ve 7. gün Alexa Fluor® Phalloidin/DAPI boyama görüntüleri (Hücre iskeleti yeşil; hücre çekirdeği mavi ile boyanmıştır).....	79
Şekil 4.33.	2,5 SF mikrotasıyıcı yüzeylerine yayılmaya başlayan MC3T3-E1 pre-osteoblastların 3. gün SEM görüntüleri.....	80

Şekil 4.34. 2,5 SF mikrotarıyıcı yüzeylerine yayılan MC3T3-E1 pre-osteoblastların 7. gün SEM görüntüleri.....	81
Şekil 4.35. İpek mikrotarıyıcılar/MC3T3-E1 pre-osteoblastların enjeksiyon sonrası 6. saat ve 1. gün SEM görüntüleri.....	81
Şekil 4.36. Artan SF konsantrasyonundaki mikrotarıyıcılar/MC3T3-E1 pre-osteoblastların 7. gün SEM görüntüleri.....	82
Şekil 4.37. İpek mikrotarıyıcılar üzerine 2×10^4 /mL ve 4×10^4 /mL hücrenin ekim anı ve 1. gündeki mikroskop görüntüleri.....	83
Şekil 4.38. Mikrotarıyıcılar �zerine ekilen 2×10^4 hücre/mL yoğunluğundaki hücrenin 3., 5. ve 7. gündeki mikroskop görüntüleri.....	83
Şekil 4.39. Mikrotarıyıcılar �zerine ekilen 4×10^4 hücre/mL yoğunluğundaki hücrenin 3., 5. ve 7. gündeki mikroskop görüntüleri.....	84
Şekil 4.40. 2,5 SF mikrotarıyıcılar �zerine Schwann hücrelerinin ekim anı ve 1. gündeki mikroskop görüntüleri.....	85
Şekil 4.41. 2,5 SF mikrotarıyıcılar üzerinde çoğalan Schwann hücrelerinin 3., 5. ve 7. gündeki mikroskop görüntüleri.....	85
Şekil 4.42. İpek mikrotarıyıcılar/Schwann hücrelerinin kültürasyonu ile elde edilen absorbands değerleri (İstatistiksel anlamlı farklılıklar $n=3$, $*p<0,05$, $**p<0,01$ mikrotarıyıcı yüzeylerinde çoğalan hücrelerin 1. gün canlılık değeri kontrol olarak kabul edildiğinde, $■■■p<0,001$, $■■p<0,01$ 3. gün kontrol olarak kabul edildiğinde ve $▲▲p<0,01$ 7. gün kontrol olarak kabul edildiğindeki durum) (Başlangıç hücre yoğunluğu: 2×10^4 hücre/mL'dir).....	86
Şekil 4.43. Mikrotarıyıcı ve TCPS yüzeylerinde çoğalan Schwann hücrelerinin enjekte edildikten sonra 6. saat ve 1. gündeki ışık mikroskobu görüntüleri.....	87
Şekil 4.44. Tripsin ile muamele edilerek kaldırılan Schwann hücrelerinin 3. ve 7. günlerdeki 10X ve 20X büyütmede mikroskop görüntüleri.....	88

- Şekil 4.45.** İpek mikrotarıyıcılar ve TCPS yüzeylerinden tripsinizasyon ile kaldırılan (A) Toplam Schwann hücre sayısı (B) Canlı hücre sayısı (C) Canlı hücre yüzdesi (İstatistiksel anlamlı farklılıklar $n=3$, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,0001$ mikrotarıyıcı yüzeylerinde çoğalan hücrelerin 1. günde ki hücre sayısı kontrol olarak kabul edildiğinde, ■■ $p<0,01$, ■■■■ $p<0,0001$ 3. gün kontrol olarak kabul edildiğinde ve ● $p<0,05$, ●● $p<0,01$, ●●● $p<0,001$ aynı günde farklı grupların karşılaştırıldığı durum). (Başlangıç hücre yoğunluğu: 2×10^4 hücre/mL'dir).....89
- Şekil 4.46.** İpek mikrotarıyıcılar ve TCPS yüzeylerinin kolajenaz ortamındaki görüntüleri.....90
- Şekil 4.47.** İpek mikrotarıyıcılar ve TCPS yüzeylerinden kolajenaz ile kaldırılan (A) Toplam Schwann hücre sayısı (B) Canlı hücre sayısı (C) Canlı hücre yüzdesi.....91
- Şekil 4.48.** 2,5 SF mikrotarıyıcı yüzeylerinde çoğalan Schwann hücrelerinin 3. ve 7. günde ki canlı/ölü hücre boyama görüntüleri (Canlı hücreler yeşile, ölü hücreler kırmızıya boyanmıştır).....92
- Şekil 4.49.** 2,5 SF mikrotarıyıcı yüzeylerinde çoğalan Schwann hücrelerinin 7. günde ki canlı/ölü hücre boyama görüntüsü (4X) (Canlı hücreler yeşile, ölü hücreler kırmızıya boyanmıştır).....92
- Şekil 4.50.** 2,5 SF mikrotarıyıcı yüzeylerinde çoğalan Schwann hücrelerinin SEM görüntüleri.....93
- Şekil 4.51.** İpek mikrotarıyıcılar ile üç farklı hücre hattının kültürasyonu boyunca elde edilen absorbans değerleri (İstatistiksel anlamlı farklılıklar $n=3$, ● $p<0,05$, ●● $p<0,01$, ●●● $p<0,001$, ●●●● $p<0,0001$ aynı günde farklı grupların karşılaştırıldığı durum) (Başlangıç hücre yoğunluğu: 2×10^4 hücre/mL'dir).....94
- Şekil 4.52.** Dinamik hücre kültürü sonucu parçalanmış 2,5 SF mikrotarıyıcıların 7. günde ki mikroskop görüntüleri.....96
- Şekil 4.53.** Karıştırma hızının 15 rpm olduğuunda 2,5 SF mikrotarıyıcıların 7. günde ki mikroskop görüntüleri.....96
- Şekil 4.54.** 2,5 SF mikrotarıyıcılar üzerinde çoğalan Schwann hücrelerinin statik kültürdeki 1., 3. ve 7. gün mikroskop görüntüleri.....97

- Şekil 4.55.** 2,5 SF mikrotarıyıcılar üzerinde çoğalan Schwann hücrelerinin dinamik kültürdeki 7. gün mikroskop görüntüleri.....98
- Şekil 4.56.** İpek mikrotarıyıcılar/Schwann hücrelerinin statik ve dinamik koşullardaki kültürasyonu boyunca elde edilen absorbans değerleri (İstatistiksel anlamlı farklılıklar $n=3$, $*p<0,05$, $***p<0,001$, $****p<0,0001$ mikrotarıyıcı yüzeylerinde çoğalan hücrelerin 1. gün canlılık değeri kontrol olarak kabul edildiğinde, $\blacktriangle p<0,05$, $\blacktriangle\blacktriangle p<0,01$, $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle p<0,0001$ mikrotarıyıcı yüzeylerinde çoğalan hücrelerin 7. gün canlılık değeri kontrol olarak kabul edildiğinde ve $\bullet p<0,05$ aynı günde farklı grupların karşılaştırıldığı durum) (Başlangıç hücre yoğunluğu: 1×10^5 hücre/mL'dir).....100
- Şekil 4.57.** İpek mikrotarıyıcılar/Schwann hücrelerinin statik ve dinamik koşullardaki kültürasyonu boyunca elde edilen hücre canlılığı (İstatistiksel anlamlı farklılıklar $n=3$, $*p<0,05$, $***p<0,001$, $****p<0,0001$ mikrotarıyıcı yüzeylerinde çoğalan hücrelerin 1. gün canlılık değeri kontrol olarak kabul edildiğinde, $\blacktriangle p<0,05$, $\blacktriangle\blacktriangle p<0,01$, $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle p<0,0001$ mikrotarıyıcı yüzeylerinde çoğalan hücrelerin 7. gün canlılık değeri kontrol olarak kabul edildiğinde ve $\bullet p<0,05$ aynı günde farklı grupların karşılaştırıldığı durum).....101
- Şekil 4.58.** Tripsin ile muamele edilerek mikrotarıyıcı yüzeylerinden kaldırılan Schwann hücrelerinin statik-dinamik kültürdeki 3. ve 7. gün mikroskop görüntüleri (10X).....102
- Şekil 4.59.** İpek mikrotarıyıcı yüzeylerinden tripsinizasyon ile kaldırılan canlı hücre sayısı. (İstatistiksel anlamlı farklılıklar $n=3$, $**p<0,01$, $***p<0,001$, $****p<0,0001$ mikrotarıyıcı yüzeylerinde çoğalan hücrelerin 1. gündeki hücre sayısı kontrol olarak kabul edildiğinde, $\blacksquare p<0,05$, $\blacksquare\blacksquare p<0,01$ 3. gün kontrol olarak kabul edildiğinde ve $\bullet\bullet\bullet p<0,001$ aynı günde farklı grupların karşılaştırıldığı durum). (Başlangıç hücre yoğunluğu: 1×10^5 hücre/mL'dir).....103
- Şekil 4.60.** Schwann hücrelerinin statik kültürdeki 3. gününde canlı/ölü hücre boyama görüntüsü (Canlı hücreler yeşile, ölü hücreler kırmızıya boyanmıştır).....104

- Şekil 4.61.** Statik ve dinamik kültürün 7. gününde 2,5 SF mikrotarışıcı yüzeylerinde çoğalan Schwann hücrelerinin canlı/ölü hücre boyama görüntüleri (Canlı hücreler yeşile, ölü hücreler kırmızıya boyanmıştır).....105
- Şekil 4.62.** Schwann hücrelerinin statik ve dinamik kültürlerindeki 7. gününde Alexa Fluor® Phalloidin/DAPI boyama görüntüleri (Hücre iskeleti yeşil; hücre çekirdeği mavi ile boyanmıştır).....106
- Şekil 4.63.** Statik kültürdeki ipek mikrotarışıcılar üzerinde tutunan Schwann hücrelerinin 3. gün SEM görüntüleri.....107
- Şekil 4.64.** Statik kültürdeki ipek mikrotarışıcılar üzerinde yayılan Schwann hücrelerinin 7. gün SEM görüntüleri.....108
- Şekil 4.65.** Dinamik kültürdeki ipek mikrotarışıcılar üzerinde yayılan Schwann hücrelerinin 7. gün SEM görüntüleri.....109
- Şekil 4.66.** Statik ve dinamik kültürlerdeki ipek mikrotarışıcılar-Schwann hücrelerinin enjeksiyon sonrası 6. saat SEM görüntüleri.....110
- Şekil 4.67.** Statik ve dinamik kültürlerdeki ipek mikrotarışıcılar-Schwann hücrelerinin enjeksiyon sonrası 1. gün SEM görüntüleri.....111
- Şekil 4.68.** İpek mikrotarışıcı yüzeylerindeki Schwann hücresi belirteçlerinin (*MPZ*, *GaIC*, *LN* ve *FN*) 3. ve 7. gündeki RT-PCR analizi (İstatistiksel anlamlı farklılıklar $n=3$, aynı grup farklı günlerde $*p<0,05$, $***p<0,001$, $****p<0,0001$ ve aynı günde farklı grupların karşılaştırıldığı durum $●●p<0,01$, $●●●●p<0,0001$).....112

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Ticari olarak temin edilebilen mikrotarışıyıcılar ve fizikokimyasal özellikleri ([20]'den değıştirilerek).....	12
Çizelge 2.2. Ticari olarak temin edilebilen gözenekli mikrotarışıyıcılar ve fizikokimyasal özellikleri ([20]'den değıştirilerek).....	13
Çizelge 2.3. Gözenekli mikrotarışıyıcıların üretimi için kullanılan yöntemler ([22]'den değıştirilerek).....	16
Çizelge 2.4. İpek fibroin kullanılarak üretilen mikrotarışıyıcılar.....	20
Çizelge 2.4. Devamı.....	21
Çizelge 3.1. Tez çalışmasında kullanılan malzemeler.....	27
Çizelge 3.1. Devamı.....	28
Çizelge 3.2. Schwann hücrelerinin karakterizasyonunda yapılan analizler.....	33
Çizelge 3.3. Karakterizasyonda kullanılan hücre kültür kapları ve çeşitli özellikleri.....	33
Çizelge 3.4. RT-PCR analizinde kullanılan primerler.....	43
Çizelge 4.1. İpek fibroin mikrotarışıyıcıların üretim koşulları.....	45
Çizelge 4.2. SF mikrotarışıyıcıların ATR-FTIR spektrum verileri.....	53
Çizelge 4.3. Termal özelliklere ilişkin DSC ve TGA analiz değerleri.....	54
Çizelge 4.4. Artan ipek konsantrasyonlarında mikrotarışıyıcıların PBS içerisindeki zamana bağlı şişme değerleri.....	56
Çizelge 4.5. İpek fibroin mikrotarışıyıcılar ile kültüre edilen üç farklı hücre hattına ait zamana bağlı hücre sayıları.....	95
Çizelge 4.6. Statik ve dinamik kültür koşulunda elde edilen Schwann hücre sayısı.....	103

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

α	Alfa
β	Beta
μ	Mikro
LiBr	Lityum bromür
NaN ₃	Sodyum azid
Na ₂ CO ₃	Sodyum karbonat
Sr ⁺²	Stronsiyum iyonu

Kısaltmalar

BSA	Sığır serum albümin
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM-HG	Yüksek glikozlu Dulbecco'nun modifiye ettiği Eagle ortamı
D-PBS	Dulbecco'nun fosfat tampon çözeltisi
DSC	Diferansiyel taramalı kalorimetre
ECM	Hücre dışı matriks
EthD-1	Etidyum homodimer-1
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
GA	Glutaraldehit
GMP	İyi üretim uygulamaları
FBS	Fetal sığır serumu
FT-IR	Fourier dönüşüm kızılötesi spektrofotometre
HMDS	Hekzametildisilazan
Kalsein AM	Kalsein asetoksimetil
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2]-difeniltetrazolyum bromür

PBS	Fosfat tampon çözeltisi
PCL	Poli(ϵ -kaprolakton)
PHEMA	Poli hidroksietil metakrilat
PLA	Poli(laktik asit)
PLGA	Poli(laktik-ko-glikolik asit)
P/S	Penisilin/Streptomisin
PS	Polistiren
RGD	Arginin-glisin-aspartik asit
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
TCPS	Hücre kültür kabı
TGA	Termal gravimetrik analiz
UPW	Ultra saf su
α -MEM	Minimum esansiyel Eagle ortamı-Alfa modifikasyonu
2B	İki boyutlu
3B	Üç boyutlu
v/v	Hacim/hacim oranı
w/v	Kütle/hacim oranı

1. GİRİŞ

Hasar görmüş dokunun onarımına yardımcı olmak için uygun fenotipte yeterli hücre sayısını sağlayabilmek büyük ölçekli kültür üretim teknolojisi ile mümkün olabilmektedir. Mikrotaşıyıcılar, yüksek miktarlarda hücre ve mikro doku üretmek için kullanılan polimerik malzemelerdir. Özellikle gözenekli mikrotaşıyıcılar, birbirine bağlı gözenek yapıları sayesinde hücrelerin tutunma, çoğalma ve göç davranışlarını, besin alışverişini ve metabolik atıkların uzaklaştırılmasını etkin kılmak üzere birim hacimde yüksek bir yüzey alanı sağlayabilmektedir [1].

Hücre temelli tedavilerdeki en zorlu sınırlayıcı etmenlerden biri, transplantasyon sonrasında hücre proliferasyonunun yeterli olmamasıdır. Terapötik hücre popülasyonunun büyük çoğunluğu intravenöz veya direkt enjeksiyondan sonraki günlerde canlılığını yitirmektedir. Biyolojik sınırlar, hücreleri istenen bölgeden dağıtarak doku lokalizasyonunun zayıf olmasına neden olmakta ve enjeksiyon sırasında hedef dokuda mekanik hasar ve çevresel stres meydana getirmektedir. Enjekte edilebilir mikrotaşıyıcılar ise hücrelere mekanik destek sağlayarak hedef dokuda canlılıklarını sürdürmelerine olanak sağlar [2].

Mikrotaşıyıcı içeren kültür sistemleri, hasar görmüş dokunun onarımına yardımcı olmak için uygun fenotipte çok sayıda hücre sağlayabilmektedir. Bunun yanı sıra, orijinal doku fenotipinin korunmasını da desteklemektedir. Mikrotaşıyıcı kültürlerin klinik uygulamalarda etkinliği gösterilmiş olup, kıkırdak ve kemik doku mühendisliği uygulamalarında sıklıkla çalışılmaktadır [3]. Sinir rejenerasyonu ise çeşitli sinyal yollarının ve sitokinlerin sinerjik düzenlenmesini gerektiren karmaşık bir süreçtir.

Omurilik yaralanmaları ciddi bir şekilde motor, duyu ve otonom işlev bozukluğuna yol açmaktadır. Potansiyel tedavi yaklaşımlarında hasarlı omurilik hücrelerini değiştirmek, aksonları yenileyerek hasarlı sinir devrelerini yeniden kurmak ve dokularda büyümeye elverişli bir ortam yaratmak gibi konular araştırılmaktadır [4].

Bu yaklaşımlar; hücre transplantasyonunu, doku desteği için tasarlanmış malzemeleri, epidural omurga stimülasyonunu ve giyilebilir robotik iskeletleri içermektedir. Hücre temelli rejenerasyon halen klinikte araştırılan bir tedavi yaklaşımı olarak tercih edilse de hücrelerin hasarlı omuriliğe transplantasyonundan sonra düşük canlılık oranı görülmektedir [5]. Buradan yola çıkarak, hasarlı omurilik onarımını uyarmak için hücre iletim aracı olarak enjekte edilebilir mikrotasıyıcıların umut vadeden bir doku mühendisliği yaklaşımı olduğu ileri sürülebilir.

Sunulan tez çalışmasında, ipek fibroin mikrotasıyıcılar üzerinde Schwann hücrelerinin çoğaltılarak omurilik yaralanmalarına yönelik enjekte edilebilir bir hücre dağıtım sisteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaca yönelik üç hipotez oluşturulmuştur:

- (1) İpek fibroin konsantrasyonu ve karıştırma hızı değiştirilerek enjekte edilebilirliği sağlayan mikrotasıyıcı çapına ulaşılabilir.
- (2) Mikrotasıyıcıların yüzey topografisi, donma sıcaklığı ve ipek fibroin konsantrasyonlarıyla değişebilir. Bu özellik, hücrelerin tutunması ve çoğalmasında etkilidir.
- (3) Hücreler, enjeksiyon sonrasında da mikrotasıyıcı yüzeylerinde canlılıklarını sürdürmeye devam edebilir.

Hipotezleri test etmek için ilk olarak doğal bir protein olan ipek fibroin temelli, biyobozunur yapıda, gözenekli/pürüzlü mikrotasıyıcılar üretilmiştir. Mikrotasıyıcıların enjekte edilebilirliğine uygun çap ve hücre çoğalmasında uygun yüzeyin sağlanabilmesi için üretim koşulları belirlenmiştir. Geliştirilen mikrotasıyıcılar fiziksel ve kimyasal özellikler temelinde ayrıntılı bir şekilde karakterize edilmiştir. Elde edilen sonuçlar literatür ile karşılaştırılarak yorumlanmıştır. Son aşamada ise *in-vitro* hücre kültürü çalışmalarında L929, MC3T3-E1 ve Schwann hücrelerinin mikrotasıyıcılara tutunma ve çoğalma

potansiyelleri değerlendirilmiştir. Hücresel mikrotarıyıcıların enjekte edildikten sonra da hücre canlılığını sürdürülebilirliği test edilmiştir.

Schwann hücrelerinin yeni bir enjekte edilebilir hücre dağıtım sistemi ile birleştirildiğinde, hasarlı omurilik onarımı üzerinde etkili olabileceği öngörülmektedir. Omurilik yaralanmalarına yönelik Schwann hücreleriyle çeşitli biyomalzeme çalışması bulunmasına rağmen, Schwann hücrelerinin ipek mikrotarıyıcı yüzeyinde çoğaltılması ve bu yapıların hasarlı omurilik dokusuna enjekte edilmesiyle ilgili bir çalışmaya literatürde rastlanılmamıştır.

Sunulan tez çalışması kapsamında üretilen ipek fibroin mikrotarıyıcılar, enjekte edilebilir çap, küresel morfoloji ve pürüzlü yüzey özellikleri ile literatürdeki mikrotarıyıcılardan ayrılmaktadır. Fibroblast ve pre-osteoblast hücre hatları ve iğsi morfolojideki Schwann hücre hattı ile mikrotarıyıcı biyouyumluluğunun test edilmesi çalışmanın bir diğer özgün yönünü oluşturmaktadır. Sunulan araştırma Schwann hücreleri ile statik ve dinamik hücre kültürünün yürütüldüğü ve ipek fibroin mikrotarıyıcı-Schwann hücre uyumluluğunun incelendiği literatürdeki ilk çalışmadır.

2. GENEL BİLGİLER

Bu bölümde ilgili tez çalışmasına ait genel bilgiler özetlenerek sunulmuştur. İlk kısımda, omurilik ve omurilik yaralanmaları hakkında bilgi verilmiş, ardından omurilik yaralanmalarında Schwann hücreli rejenerasyon açıklanmıştır. Üçüncü kısımda çalışmanın temelini oluşturan üç boyutlu hücre kültüründen bahsedilerek, bu sistemlerden biri olan mikrotaşyıcı teknolojisi ve mikrotaşyıcı üretim yöntemleri anlatılmıştır. Dördüncü kısımda ise doğal polimerlerden üretilen mikrotaşyıcılara yer verilmiştir. Tez çalışmasında kullanılan ipek fibroinin yapısı ve fiziksel özellikleri anlatılmış ve literatürde yer alan ipek fibroin mikrotaşyıcılar detaylarıyla açıklanmıştır. Beşinci kısım, enjekte edilebilir mikrotaşyıcıları içermektedir. Son olarak da mikrotaşyıcı-destekli biyoreaktörler hakkında bilgi verilmiştir.

2.1. Omurilik

Sinir sistemi; santral ve periferik sinir sistemi olmak üzere iki anatomik yapıdan oluşmaktadır. Santral sinir sistemi beyin, omurilik ve bunlarla bağlantılı sinirlerden meydana gelmektedir. Periferik sinir sistemi ise beyinden çıkan ve beyne gelen (kraniyal) sinirler ile omurilikten çıkan ve omuriliğe gelen (spinal) sinirlerden, ayrıca bunlarla ilişkili gangliyonlardan oluşmaktadır [6].

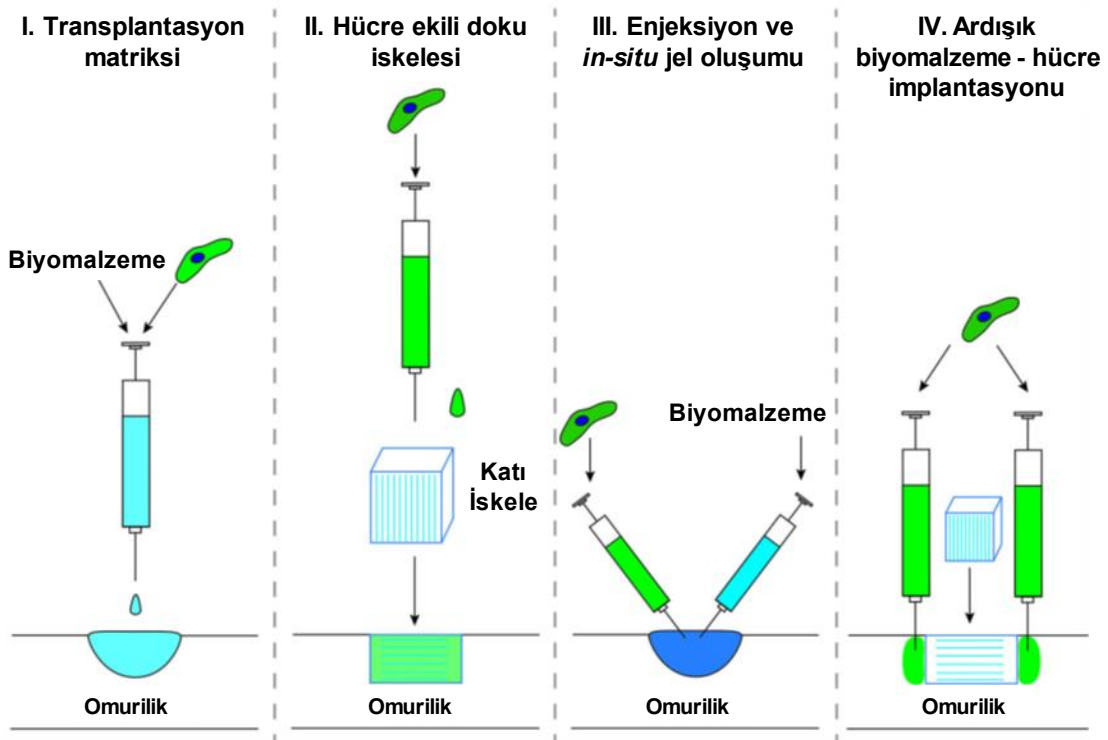
Omurilik, embriyolojik süreç içerisinde nöral tüpün öncüllüğünde kanal şeklinde gelişmektedir. Omurilikten çıkan 31 çift spinal sinir, vücut organları ve uzuvlar ile ilişki kurmaktadır. Periferik sinir sistemi kan-beyin bariyeri ile korunmadığından toksinler ve mekaniksel hasarlara maruz kalabilmektedir. Periferik sinir yaralanmaları, yaşam kalitesini düşüren ve oldukça sık görülen klinik bir durum olup, tüm dünyada travmatik yaralanmalar kapsamında hareket kabiliyetini kısıtlayan nedenlerin başında gelmektedir [7].

2.2. Omurilik Yaralanmaları

Omurilik yaralanmaları sonucunda sıvı dolu boşlukların oluşumu ve aksonal rejenerasyon için tamamen engelleyici bir ortam yaratan glial skar dokusu ortaya

çıkılmaktadır. Bu nedenle, hücrelerin hasarlı omuriliğe transplantasyonunda, kistik boşlukları doldurarak aksonun yeniden büyümesini desteklemek asıl amaç olarak düşünülmektedir [6,8]. Bu amaçla, biyomalzeme destekli hücre transplantasyonu çalışmaları, omurilik yaralanmaları, felç ve nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için uygun bir aday olarak değerlendirilmektedir. Omurilik yaralanmalarına yönelik transplante edilebilen hücre kaynağı olarak kemik iliği mezenkimal kök hücreleri, diş kök hücreleri, nöral kök ve progenitör hücreleri, Schwann hücreleri, oligodendrosit öncü hücreleri, embriyonik kök hücreler ve indüklenmiş pluripotent kök hücreler araştırılmaktadır [5,6].

Hücre transplantasyonu ve biyomalzeme implantasyonunun kombinasyonu, omurilik yaralanmaları tedavisi için kayıp nöral dokunun değiştirilmesini ve fonksiyonel iyileşmeyi sağlamak için aksonal rejenerasyonun desteğini ele alan umut verici bir doku mühendisliği stratejisi karşımıza çıkmaktadır (Şekil 2.1) [4].

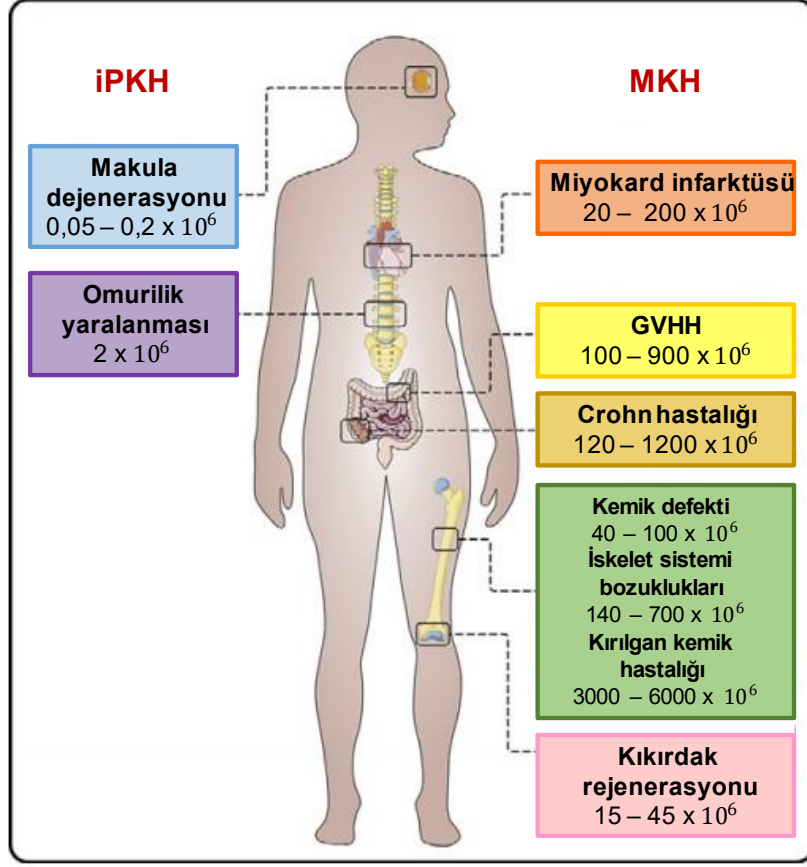


Şekil 2.1. Omurilik hasarlarına yönelik biyomalzeme destekli hücre tedavilerinin uygulama yöntemleri ([4]'ten değiştirilerek).

Farklı kökenlerden mezenkimal kök hücreler; nöral hücre soylarına farklılaşma, nörotrofik faktörleri salgılama, hücre apoptozunu azaltma ve inflamasyonu modüle etme yeteneklerinden dolayı hasarlı omuriliğe enjekte edildiğinde yararlı bir etkiye sahiptir (Şekil 2.2). Örneğin, Kandalam ve ark. apikal papilladan elde edilen dış kök hücreleri ve beyin kaynaklı nörotrofik faktörü (BDNF) salan 30 µm çapındaki mikrotaşıyıcıların kombine uygulamasının omurilik yaralanmasındaki tedavi potansiyelini vurgulamışlardır. Ayrıca, hücre tedavilerinin enjekte edilebilir bir hücre dağıtım sistemi ile birleştirildiğinde hasarlı omurilik üzerindeki yararlı etkisi ilk kez bu çalışmada gösterilmiştir [9].

Bir başka çalışmada, Álvarez ve ark. tarafından ağır omurilik yaralanmalarına yönelik yeni bir enjekte edilebilir tedavi geliştirilmiştir. Omuriliğe enjekte edilen nanofiber ağ içerisindeki biyoaktif ajanların hareket ettirilmesiyle felçli fareler üzerinde başarı sağlanmıştır. Felçli fareler enjeksiyonu takiben yürüme yeteneğini geri kazanmış ve tedavi seçeneği az olan hastalarda kullanılmak üzere FDA tarafından, geliştirilen bu yeni tedavi yönteminin onay almasına yönelik süreç başlatılmıştır [10].

Mezenkimal kök hücrelerin yanında sıklıkla tercih edilen bir diğer hücre türü olan Schwann hücreleri; GMP koşullarında kültürlenebilmesi, otolog hücrelerin damar içine transplante edilebilmesi, kronik immünosüpresyon ihtiyacını hafifletmesi ve aynı zamanda erişilebilir bir hücre tipi olması sebebiyle literatürde yer almaktadır [8,9].



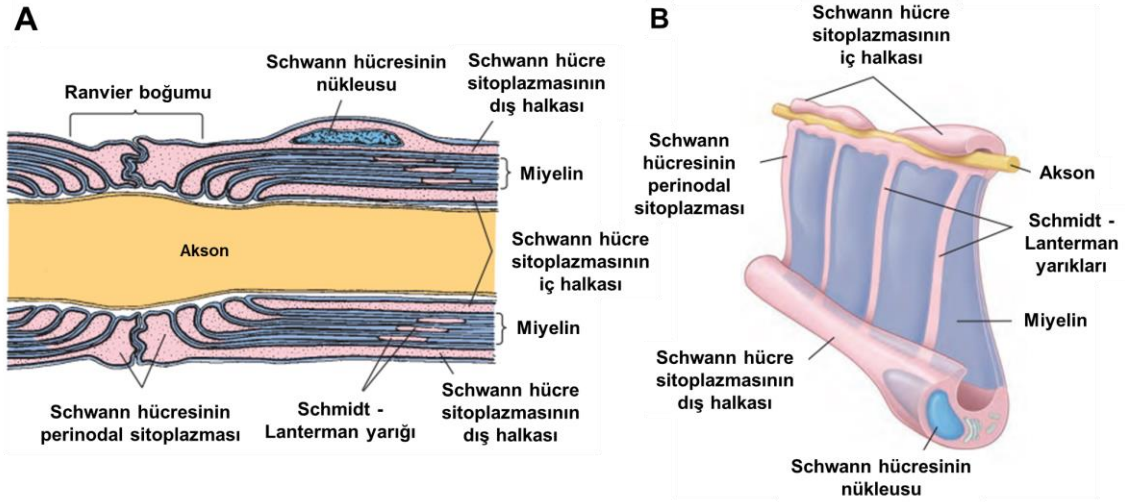
Şekil 2.2. Pluripotent ve multipotent kök hücre tedavi yaklaşımları.

Rakamlar tedaviler için gerekli hücre sayısını ifade etmektedir.

GVHH: Graft versus host hastalığı ([1]'den değiştirilerek).

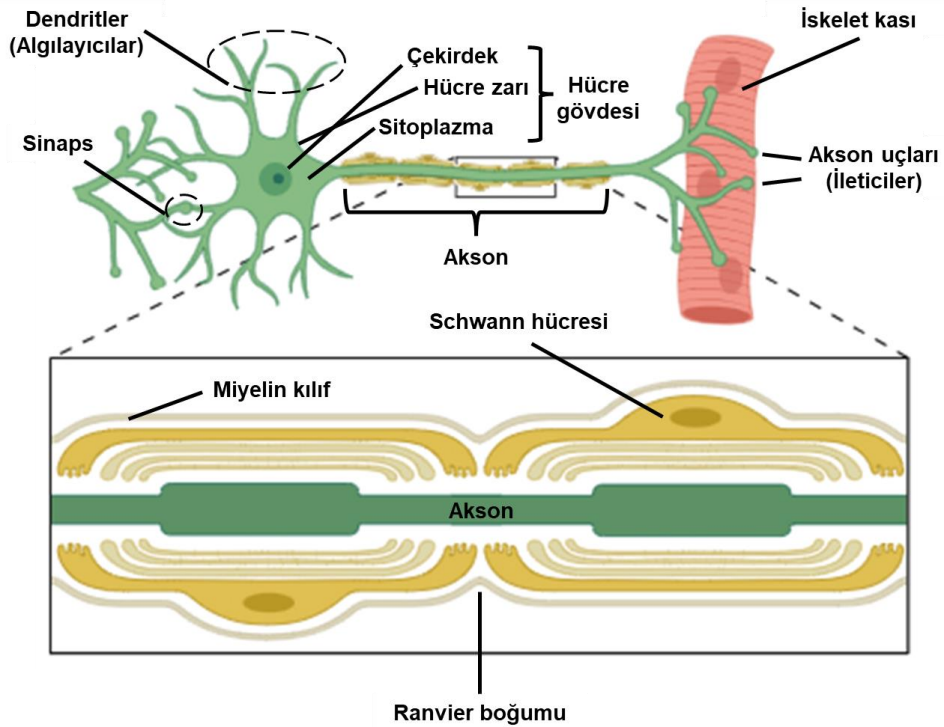
2.2.1. Omurilik Yaralanmalarında Schwann Hücreli Rejenerasyon

Nöronlar sinir sisteminin işlevsel birimleridir. Tipik bir nöron; *hücre gövdesi*, *dendrit* ve *akson* adı verilen uzantılardan oluşmaktadır. Nörondan çıkan sinyaller (*impuls*) aksonlar boyunca taşınmakta ve aksonlar diğer nöronların gövdesi veya dendritleriyle bağlantılar kurarak, taşıdıkları sinyalleri elektriksel ya da kimyasal olarak aktarmaktadır. Bu bağlantı bölgelerine *sinaps* adı verilmektedir. Birçok nöronun aksonu, *miyelin kılıf* adı verilen, çok tabakalı bir protein-lipid kompleksiyle sarmalanmıştır (Şekil 2.3). Miyelin kılıfın varlığı, impuls üretim hızını artırmaktadır [11].



Şekil 2.3. A) Schwann hücresi sitoplazmasının katlanarak miyelin kılıfı oluşturması B) Miyelin kılıfın açılmış hali [12]'den değiştirilerek.

Periferel sinir sisteminde, sinir rejenerasyonu *Schwann hücresi* aracılıdır. Her bir Schwann hücresi, akson üzerinde tek miyelin kılıfı oluşturmaktadır. Bir aksonun miyelinizasyonu için çok sayıda Schwann hücresine ihtiyaç vardır (Şekil 2.4) [12].



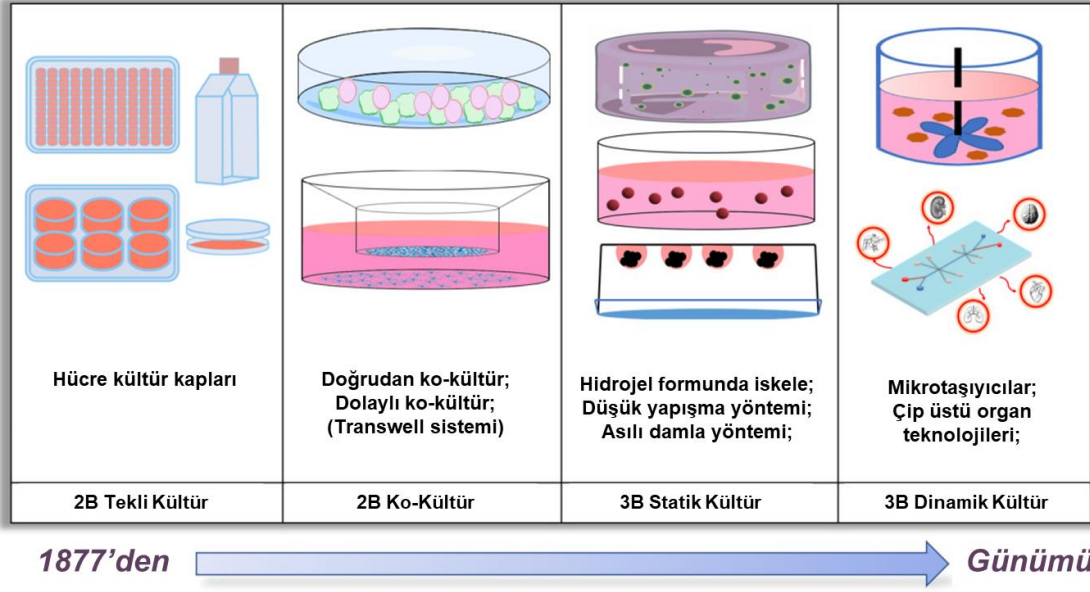
Şekil 2.4. Nöron anatomisinin şematik çizimi (BioRender.com ile çizilmiştir).

Schwann hücreleri; korunmuş nöral dokuyu desteklemesi, lezyon boşluklarını köprüleyebilmesi, motor ve duyuşal aksonların lezyon içinde büyümesini teşvik etmesi ve periferik sinir sistemi aksonlarında remiyelinizasyonu sağlayabilmesi açısından önemlidir [9].

Schwann hücreleri, yalnızca periferik sinir sisteminde akson rejenerasyonunu ve miyelinizasyonu sağlamakla kalmayan, aynı zamanda omuriliğe nakledildiğinde benzer bir işlevi gerçekleştiren nöroglial hücrelerdir [13]. Omurilik hasarının tedavisi için kültürlenmiş Schwann hücreleriyle, 1990'ların başından beri deney hayvanlarında sistematik olarak ilerleme kaydedilse de insanlar üzerindeki etkili tedavilerin geliştirilmesindeki zorluklar halen devam etmektedir. Aksonal rejenerasyon yaklaşımının önündeki engeller, Schwann hücrelerinin hasarlı omuriliğe transplantasyonundan sonra düşük canlılık oranlarıyla ilişkilendirilmektedir [14].

2.3. Üç Boyutlu Hücre Kültürü

İki boyutlu (2B) hücre kültüründeki en büyük problem; dokulara mekanik özellikler kazandıran ve hücreler arasındaki iletişimi kolaylaştırarak yapıyı destekleyen hücre dışı matriksin (ECM)'nin bulunmamasıdır. İki boyutlu hücre kültürü koşullarında hücreler, biyokimyasal sinyallere yanıt olarak göç edemediklerinden normal hücre büyümesinden farklı bir gelişim gösterirler. Bu nedenle 2B hücre kültürü sistemi, *in-vivo* ortamın üç boyutlu (3B) hücre-doku organizasyonunun karmaşıklığına ulaşamaz. Tüm bunlardan yola çıkarak hücre biyolojisi temelinde ve mühendislik yaklaşımları ile günümüzde 3B hücre kültürü sistemleri geliştirilmiştir (Şekil 2.5). Üç boyutlu hücre kültüründe hücreler, hücre dışı matriksi taklit eden bir substrat üzerinde büyütülür [15,16].



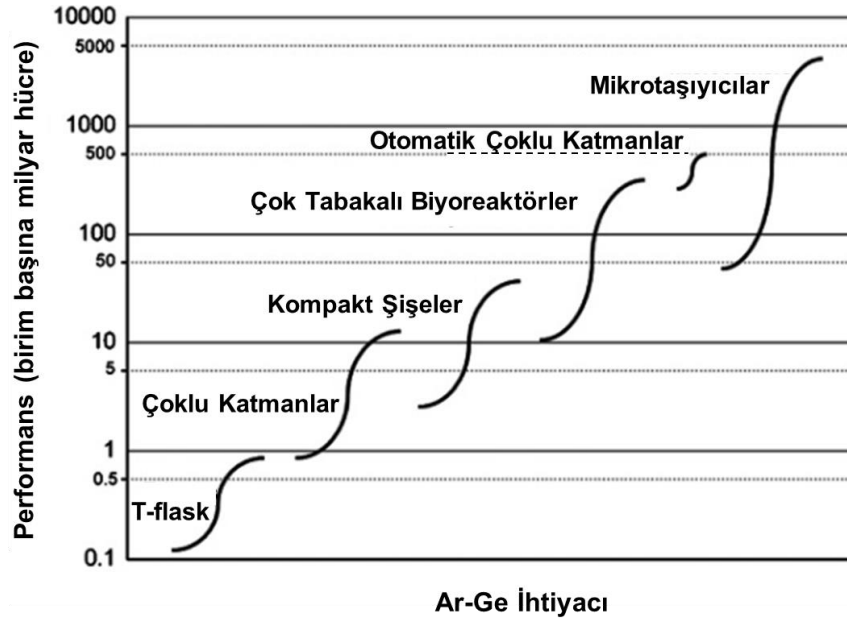
Şekil 2.5. Hücre kültürü yöntemlerinin gelişimi ([16]'dan değiştirilerek).

Doku mühendisliği çalışmalarının başarısı, biyomalzeme ile hücre arasındaki etkileşime bağlıdır. Hücre davranışını yönlendiren biyomühendislik ürünü olan 3B hücre kültürü sistemlerinden biri olan mikrotaşıyıcı kültürü, geleneksel 2B kültürlerin aksine *in-vivo* ortamın mikroçevresini daha iyi taklit etmekte ve doku fizyolojisi için daha uygun koşullar sağlayabilmektedir [17].

2.3.1. Mikrotaşıyıcı Teknolojisi

Mikrotaşıyıcılar; 100-400 μm çap aralığında, hücre tutunmasını ve büyümesini destekleyen mikroküreler olarak tanımlanmaktadır. Mikrotaşıyıcı kültüründe yüzeye-bağımlı hücreler kültür ortamında asılı mikroküreler üzerinde çoğalır ve doğrudan onarım gerektiren bölgeye iletilebilir. Mikrotaşıyıcılı kültür sisteminde pasaja gerek kalmadan kültür süresi artırılır, maliyet azaltılır, hücre koşullarının (hücre morfolojisi, canlılık, yoğunluk, farklılaşma) doğrudan mikroskopik gözlemine olanak sağlanır ve daha az insan müdahalesi ile kontaminasyon riski en aza indirilir [1]. Bu sistemin en önemli avantajlarından biri, diğer hücre kültürü sistemlerine kıyasla birim hacimde daha fazla bir yüzey alanı sağlamasıdır. Hücre kültürü sistemleri karşılaştırıldığında (Şekil 2.6); 80 adet 75 cm^2 lik flaskın yüzey alanının 2 gram gözeneksiz mikrotaşıyıcının (2.930 cm^2/g) yüzey alanına eşit olduğu görülmektedir.

Sonuç olarak mikrotarıyııcılar, homojen bir süspansiyon kültür sisteminde birim hacim başına düşen yüzey alanını artırabilme özelliğine sahiptir [18].



Şekil 2.6. Çeşitli hücre kültür sistemlerinden elde edilen hücre sayılarının karşılaştırması ([18]'den değiştirilerek).

Van Wezel tarafından 1967 yılında tanımlanan mikrotarıyııcı kültürü, tavşan embriyonik deri ve insan embriyonik akciğer hücrelerinin başarıyla çoğaldığı pozitif yüklü DEAE-Sephadex mikroküreleri ile viral aşılarda ve biyolojik hücre ürünlerini üretmek için kullanılmıştır [19]. Günümüzde ise dekstran, cam, polistiren, selüloz ve kolajen malzemeli mikrotarıyııcılar gözenekli ticari olarak temin edilebilmektedir. Çizelge 2.1'de gözeneksiz, Çizelge 2.2'de gözenekli ticari mikrotarıyııcılar listelenmiştir.

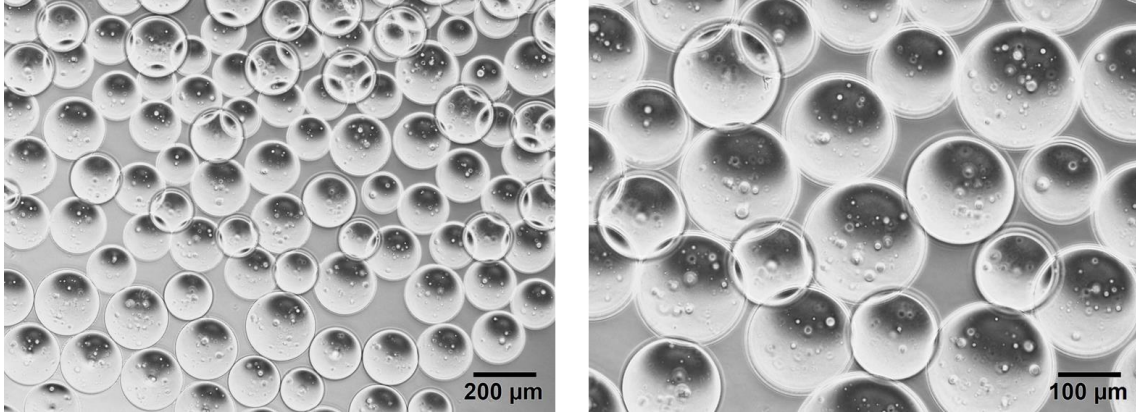
Çizelge 2.1. Ticari olarak temin edilebilen mikrotarıyıcılar ve fizikokimyasal özellikleri ([20]'den değiştirilerek).

İsim	Üretici Firma	Malzeme	Boyut (µm)	Yoğunluk (g/mL)	Şekil	Yüzey Alanı (cm ² /g)	Yük
Cytodex-1	Amersham Biosciences, İsveç	Çapraz bağlı dekstran/ DEAE (Tersiyer amin)	190	1,03	Küresel	4.400	Pozitif
Cytodex-2	Amersham Biosciences, İsveç	N,N,N trimetil-2 ile Dekstran matriksi hidroksiaminopropil	135-200	1,04	Küresel	3.300	-
Cytodex-3	GE Healthcare, ABD	Dekstran	175	1,04	Küresel	2.700	Yüksüz
Kolajen Boncukları	Solohill, ABD	Polistiren	125-212	1,02	Küresel	480	Yüksüz
Hillex II	Thermo Scientific, ABD	Polistiren	75-150	1,12	Küresel	515	Pozitif
Corning	Sigma/SoloHill, ABD	Çapraz bağlı polistiren (Tip I kolajen kaplı)	125-212	1,03	Küresel	360	Yüksüz
G2767	Sigma, ABD	Cam	150-210	1,03	Küresel	-	-
ProNectin® F	SoloHill, ABD	Polistiren/Rekombinant fibronektin	169	1,02	Küresel	480	Yüksüz
DE 52-54	Whatman™, UK	Selüloz/DEAE (Tersiyer amin)	130	0,9-1,2	Silindirik	6.800	Pozitif

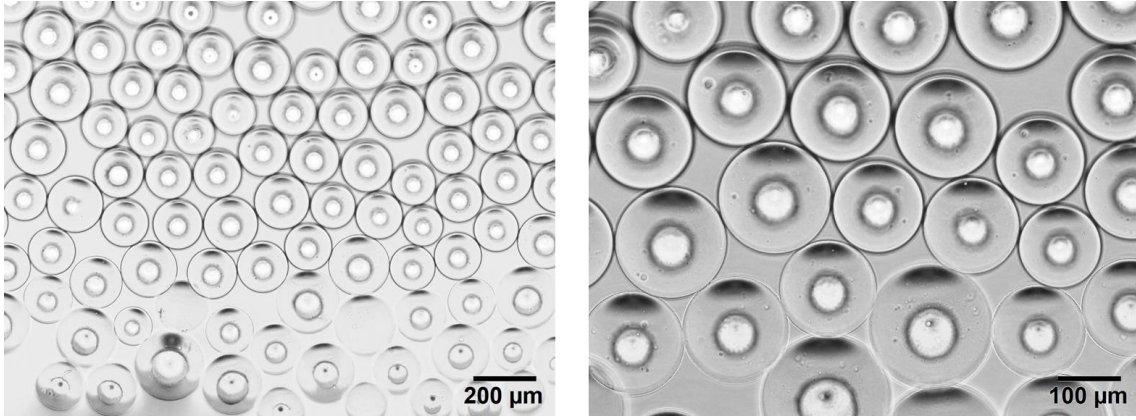
Çizelge 2.2. Ticari olarak temin edilebilen gözenekli mikrotarıyıcılar ve fizikokimyasal özellikleri ([20]'den değiştirilerek).

İsim	Üretici Firma	Malzeme	Boyut (µm)	Gözenek Boyutu (µm)	Yoğunluk (g/mL)	Şekil	Yüzey Alanı (cm ² /g)	Yük
Cytopore 1,2	GE HealthCare, ABD	Çapraz bağlı selüloz/ DEAE(Tersiyer amin)	240	30	1,03	Küresel	11.000	+
CultiSpher-G	Thermo Scientific, ABD	Tip I domuz jelatin	130-380	10-20	1,04	Küresel	40.000	Yüksüz
CultiSpher-S	Thermo Scientific, ABD	Jelatin	130-380	10-20	1,04	Küresel	7.500	Yüksüz
Cultispher-GL	Percell Biolytica, İsveç	Jelatin	255	50-70	1,04	Küresel	-	-
Cytoline 1, 2	Amersham Biosciences, İsveç	Polietilen ve Silika	400-2.500	10-400	1,32	Lens	>1.000	-

Çeşitli hücrelerin tutunmasını ve çoğalmasını kolaylaştıran bir dekstran matriksinden oluşan Cytodex mikrotarıyıcılar (Şekil 2.7 ve 2.8) en sık tercih edilen mikrotarıyıcılar olarak kabul edilmektedir [20].



Şekil 2.7. Cytodex-1 mikrotarıyıcıların (Pharmacia Fine Chemicals, Sweden) ters ışık mikroskopundaki (Olympus IX73, A.B.D.) görüntüleri.



Şekil 2.8. Cytodex-3 mikrotarıyıcıların (Pharmacia Fine Chemicals, Sweden) ters ışık mikroskopundaki görüntüleri.

Doctor ve ark. tarafından kemik iliğinden türetilmiş insan yetişkin mezenkimal kök hücrelerinin (hAMSC), karıştırmalı kapta yürütülen kültürde kolajen kaplı Cytodex-3 makro gözenekli mikrotarıyıcılar üzerine kolayca bağlandığı, çoğaldığı ve farklılaştığı gösterilmiştir [21].

2.3.1.1. Mikrotasıyıcı Üretim Yöntemleri

Mikrotasıyıcıların temel işlevi, hücre tutunması, çoğalması ve fonksiyonel olarak farklılaşması için bir alan sağlamak ve vücuttaki doku rejenerasyonu için hücreleri iletmektir. Bu nedenle mikrotasıyıcıların iyi derece biyouyumluluk göstermesi gerekir. Biyouyumlu malzemelere yüklü hücrelerin hayatta kalma oranı artırılmakta ve mikrotasıyıcı implantasyonu ile indüklenen konakçı tepkisini hafifletmede fayda sağlanmaktadır. Biyouyumluluğu etkileyen faktörler arasında biyobozunma, toksisite, boyut, yük, hidrofobik-hidrofilik denge, pürüzlü/pürüzsüz ve gözenekli yüzey yer almaktadır [22].

Nanodan mikro ölçeğe değişen pürüzlü yüzeyler ve hücreler arasındaki etkileşimlerin araştırılması önemlidir. Hücrelerin çevredeki topografyayı algılayabildiği ve uygun bir yanıt üretebildiği 1964 yılında bulunmuştur. Günümüzde geliştirilen birçok polimerik malzemede, mikro ölçekli topografyalarının oluşturulması hedeflenmektedir. Yapılan araştırmalarda hücrelerin biyomalzeme yüzeylerine tutunma, büyüme ve farklılaşma davranışlarına odaklanılmıştır [23,24].

Hücrelerin mikrotasıyıcı yüzeyine tutunma kolaylığı; malzemenin kimyasal bileşimi, topografyası, yük yoğunluğu, morfolojisi, boyut, fonksiyonel grup ve yüzey kaplama özelliklerine bağlıdır [1,25]. Çizelge 2.3'te gözenekli mikrotasıyıcıların hazırlanmasına yönelik üretim yöntemlerine yer verilmiştir.

Çizelge 2.3. Gözenekli mikrotasıyıcıların üretimi için kullanılan yöntemler ([22]'den değiştirilerek).

Yöntem	Avantaj	Dezavantaj	Gerekli Ekipman	Mikrotasıyıcı Boyutu
Emülsiyon Oluşturma/Çözücü Buharlaştırma	Kolayca büyütülebilir, basit ve kullanışlı, düşük maliyetli	Düşük viskoziteli çözeltiler ile sınırlı	Manyetik veya mekanik karıştırıcı	Geniş boyut aralığı
Emülsiyon Haline Getirilmiş Faz Ayrımı ile Dondurarak Kurutma	Kolayca büyütülebilir, basit ve kullanışlı, düşük maliyetli	Düşük viskoziteli çözeltiler ile sınırlı	Manyetik veya mekanik karıştırıcı	Geniş boyut aralığı
Ekstrüzyon-Katılaştırma	Basit ve kullanışlı, düşük maliyetli	Düşük viskoziteli çözeltiler ile sınırlı, üretim miktarı çok az	Şırınga	Büyük mikrotasıyıcı boyutunda dar aralık
Mikroakışkanlar	Tek boyutlu mikrotasıyıcıları üretmek	Üretim miktarı çok az, pahalı cihaz kullanımı	Örnek pompası, sıvı tespit ve kontrol sistemi, mikroakışkan çip sistemi	Dar boyut aralığı
Püskürterek Kurutma	Kolayca büyütülebilir	Sınırlı polimer grubuna uygulanabilir, pahalı cihaz kullanımı	Sprey kurutucu	Geniş boyut aralığı
Elektrostatik Püskürtme	Küçük ve düzgün morfolojide mikrotasıyıcıları üretmek	Üretim miktarı çok az, pahalı cihaz kullanımı	Şırınga pompası, yüksek voltajlı elektrik alanı, topraklama ve mikrotasıyıcı toplama cihazı	Küçük mikrotasıyıcı boyutunda dar aralık

2.4. Doğal Polimerlerden Üretilen Mikrotaşıyıcılar

Mikrotasıyıcılar; biyoseramik malzemeler, doğal polimerler, sentetik polimerler ve organik/inorganik kompozitler olmak üzere dört farklı malzeme grubundan üretilebilmektedir. Kırılganlık ve zayıf moleküler arası kuvvetler nedeniyle doğrudan inorganik malzemelerden gözenekli mikrotasıyıcılar hazırlamak oldukça zordur. Mikrotasıyıcılara istenen fiziksel ve kimyasal özellikleri kazandırabilmek için uygun biyomalzemenin seçilmesi önemlidir [22].

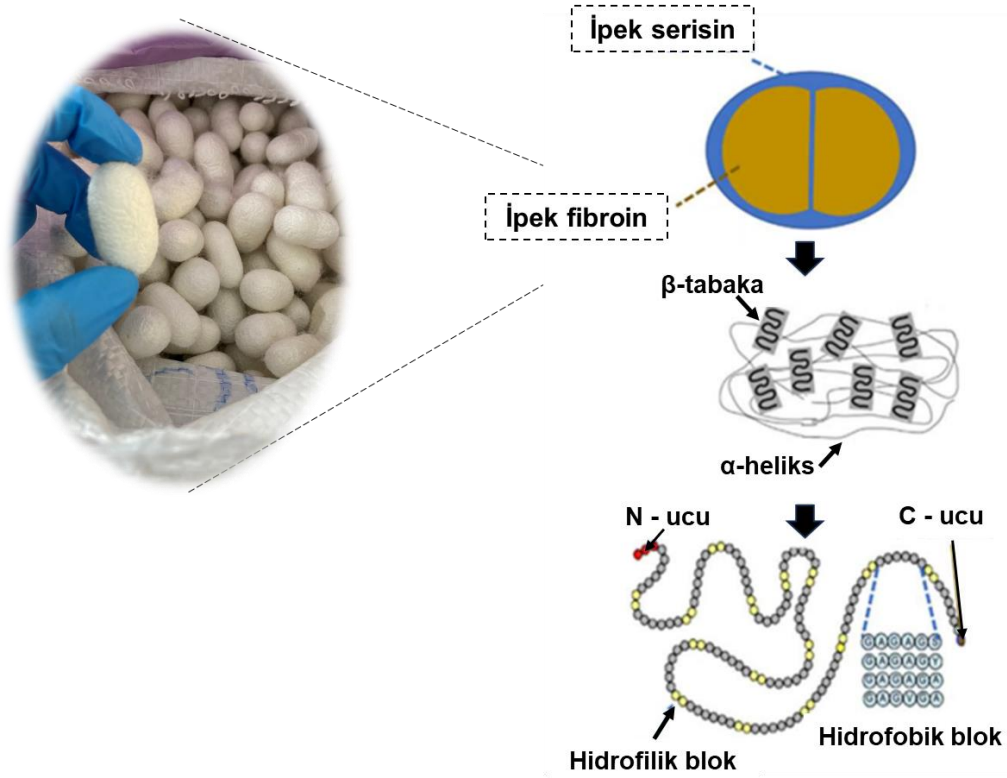
Günümüzde jelatin, kitosan gibi doğal, poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), polilaktik asit (PLA), poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) ve poli (hidroksietilmetakrilat) (PHEMA) gibi sentetik polimerlerden mikrotasıyıcılar üretilmektedir [20,26]. Doğal polimerlerin biyouyumluluk ve biyobozunurluk özellikleri sentetik malzemelere göre daha üstün olduğundan araştırmalarda bu polimerler tercih edilmektedir. Öyle ki tamamen doğal kökenli mikrotasıyıcılardaki gelişmelerle, doku mühendisliği alanında parlak bir gelecek olduğu düşünülmektedir [17].

Sun ve ark. tarafından emülsiyon faz ayırma yöntemiyle makrogözenekli kitosan mikrotasıyıcılar hazırlanmıştır. Mikrotasıyıcıların hücre tutunma kapasitesini geliştirmek için polilisin ile kaplama yapılmıştır. Yağ kaynaklı mezenkimal kök hücre yüklü mikrotasıyıcılar sıçan siyatik sinir kusurlarını onarmak için sinir kanalına enjekte edilmiştir. Bu çalışma ile periferik sinir onarımı kapsamında ilk kez mikrotasıyıcı tabanlı kök hücre transplantasyonu gösterilmiş ve yağ dokudan izole edilmiş mezenkimal kök hücre yüklü mikrotasıyıcıların periferik sinir onarımında iyi bir potansiyele sahip olduğu belirtilmiştir [27].

Literatürdeki çalışmalarda kitosan mikrotasıyıcıları için zayıf mekanik özellik ($54,0 \pm 9,5$ kPa) bildirilmiştir [28,29]. Mikrotasıyıcıların deformasyonu, çökmesi ve saflaştırılmasındaki zorluklar önemli dezavantajlardır. Bu nedenle tez çalışması kapsamında ipek fibroin (SF) kullanılmıştır ve aşağıdaki bölümde SF hakkında daha detaylı bilgi verilmiştir.

2.4.1. İpek Fibroinin Yapısı ve Fiziksel Özellikleri

Bombycidae familyasından en bol bulunan *Bombyx mori* ve Saturniidae familyasından *Antheraea mylitta* tarafından üretilen ipekler, benzersiz bir doğal polimer sınıfı olarak dikkat çekmektedir. Yapısal olarak $1,3 \text{ g/cm}^3$ yoğunluğa, 4,8 GPa değerinde yüksek mekanik dayanımına sahip olan ipek, doğada bulunan en kuvvetli fiber olarak kabul edilmektedir [30]. İpek polimeri filament yapıdaki çekirdek proteini olan fibroin ve bu yapıyı saran yapışkan serisin olmak üzere iki proteinden oluşmaktadır (Şekil 2.9). İpek fibroin, 1993 yılında FDA tarafından biyouyumlu bir malzeme olarak tanımlanmış ve pek çok çalışmada “model biyomalzeme” olarak kullanımı kabul edilmiştir [31].



Şekil 2.9. *Bombyx mori* tarafından üretilen ipeğin yapısı ([32]'den değiştirilerek).

İpek fibroin farklı malzeme şekillerinde (küresel partikül, film, membran, 3B doku iskelesi, vb.) üretilmiştir. Ancak ipek fibroin malzemelere hücre tutunması zayıf olabilmektedir.

Hücreler ve ipek temelli biyomalzemelerin birbirleriyle olan etkileşimini artırmak için fibroin; jelatin, kitosan ve hüyalüronik asit gibi diğer doğal polimerlerle harmanlanarak araştırılmaktadır [33]. Ek olarak RGD tripeptidinden yararlanılmaktadır [34].

2.4.2. İpek Fibroin Mikrotasıyıcılar

İpek fibroin mikrotasıyıcı ile raporlanan az sayıda çalışma bulunmaktadır. İpeğin hücre tutunma ve proliferasyon özelliklerini iyileştirmek için aljinat, jelatin, kalsiyum fosfat ve pullulan ile karıştırılan kompozit mikrotasıyıcılar mevcuttur [32].

Literatürde yer alan diğer çalışmalarda ise mikrotasıyıcı olarak adlandırılan örneklerin küresel bir taşıyıcı yapısında olmadığı görülmektedir [35-37]. Diğer bir çalışmada ise 3B iskele yapısına RGD tripeptidi içeren jelatin eklenmiştir. Ancak jelatinin etkisi serum proteinlerinin adsorpsiyonu ile maskelenmiştir [38]. Buradaki mikrotasıyıcı olarak tanımlanan yapılar, Van Wezel'in "mikrotasıyıcı-destekli hücre kültürü" tanımındaki mikrotasıyıcılarla boyut ve şekil açısından benzerlik içermemektedir.

Küresel geometriye sahip, ortalama çapı yaklaşık 400 µm olan SF (%1,5 w/v) kaplı aljinat mikrotasıyıcılar raporlanmıştır [39]. Ayrıca SF mikrotasıyıcının pürüzlü yüzeylerine mezenkimal kök hücrelerin tutunduğu ancak yayılmadığı görülmektedir [40]. Bir başka çalışmada SF ve jelatin çeşitli oranlarda karıştırılarak, simetrik akış odaklama cihazı kullanılarak üretilmiştir. Mezenkimal kök hücrelerin mikrotasıyıcı üzerinde osteojenik farklılaşması, ticari mikrotasıyıcılara benzer olduğu belirtilmiştir. Ancak üretilen mikrotasıyıcıların boyutları önemli ölçüde büyüktür (~300-400 µm) ve gözenek boyutları (~2 µm) hücre göçü için yetersizdir [33]. Chen ve ark. ise sodyum aljinat/SF mikrotasıyıcılardan stronsiyum (Sr^{+2}) salımının sıçan kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin proliferasyonunu artırdığını göstermiştir [41].

Çizelge 2.4'te ipek fibroin kullanılarak literatürde yer alan mikrotasıyıcılara yer verilmiştir.

Çizelge 2.4. İpek fibroin kullanılarak üretilen mikrotasıyıcılar.

Polimer Matris	Şekil	Metot	Boyut	Gözenek Oluşturma İşlemi	Gözenek Boyutu	Stabilizasyon	Salım Profili	<i>in-vitro</i> Hücre Kültürü	Yazar-Yıl
Sodyum aljinat (SA) / İpek fibroin (SF) mikrotasıyıcı	Küresel	Yağda (petrol eteri) su (SA, SF 2:1) emülsiyonu ile birleştirilmiş faz ayrımı	254,3 ± 50,0 µm	Buz kristali (-20°C) ve liyofilizasyon	42,0 ± 5,3 µm	Mutlak etanol (%99,5 v/v)	Stronsiyum (Sr ⁺²)	Sıçan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre	Chen ve ark. – 2022 [41]
%2,5 (w/v) ipek fibroin mikrotasıyıcı	Küresel	Yağda (petrol eteri) su (SF) emülsiyonu ile birleştirilmiş faz ayrımı	-	Buz kristali (-20°C) ve liyofilizasyon	20 ± 5 µm	Mutlak etanol (%99,5 v/v)	Stronsiyum (Sr ⁺²)	Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre	Fang ve ark. – 2021 [42]
%5 (w/v) ipek fibroin / Jelatin mikrotasıyıcı	Küre benzeri	Dış faz oleik asit/metanol/Span 80 (73:25:2) - İç faz SF/G solüsyonlarının akış odaklama cihazından geçirilmesi	342 ± 33 µm	Buz üzerinde bekletmek ve liyofilizasyon	2 µm	Metanol	-	Sıçan mezenkimal kök hücre	Luetchford ve ark. – 2020 [33]
%3 (w/v) ipek fibroin mikroküre	Küresel-Elipsoit	Yüksek voltajlı elektrostatik jeneratör ve mikro enjeksiyon pompası	95-260 µm	Sıvı azotta dondurma ve liyofilizasyon	1,5-7,0 µm	Gliserol	Temel fibroblast büyüme faktörü	L929 fibroblastları	Qu ve ark. – 2018 [43]

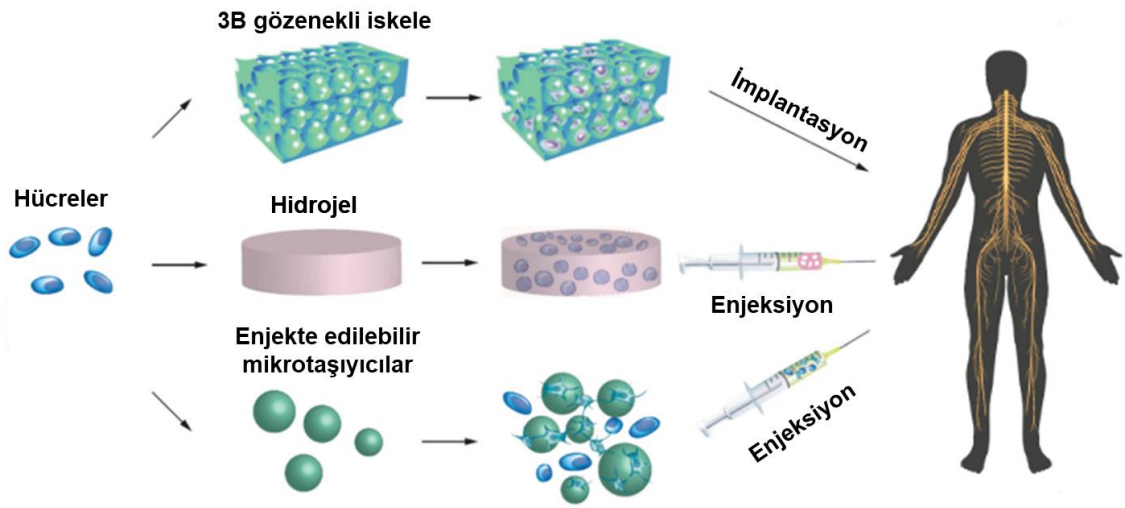
Çizelge 2.4. Devamı.

%1 (w/v) sodyum aljinat/ %2 (w/v) İpek fibroin mikrotasıyıcı	Küresel şekil, pürüzsüz yüzey	Aljinat mikrotasıyıcıların SF çözeltisinde karıştırılması	462,97 ± 160,25 µm	-	-	Etanol (%96 v/v)	-	Adipoz ve kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücre	Orfei ve ark. – 2018 [40]
Fibroin kaplı aljinat mikrotasıyıcılar	Küresel şekil, pürüzsüz yüzey	Aljinat mikrotasıyıcıların SF çözeltisinde karıştırılması	464,34 ± 62,190 µm	-	-	Etanol (%96 v/v)	-	İnsan yağından izole edilen kök hücreler (hASC'ler)	Perteghella ve ark. – 2017 [39]
%5 (w/v) ipek fibroin mikroküre	Küresel şekil, buruşuk yüzey	İkili (toluen ve etanol) damlacık çözünmesi	-	-	-	Etanol (%98 v/v)	-	-	Jativa ve Zhang – 2017 [44]
%1 (w/v) ipek fibroin mikroküre	Küresel şekil, pürüzsüz yüzey	Yağda (etil asetat), su (SF) emülsiyonu çözücü difüzyon	158 ± 56 µm - 167 ± 96 µm (ilaçlı)	-	-	Su buharı	Mavi dekstran	-	Srisa-Ard ve Baimark – 2013 [45]

2.5. Enjekte Edilebilir Mikrotasıyıcılar

Mikrotasıyıcıların kimyasal bileşimi, canlı hücrelerin yüzeyden geri kazanımını belirlemede anahtar rol oynar. Tripsin ve kolajenaz gibi proteolitik enzimlerin muamelesinden sonra hücrelerin mikrotasıyıcılardan ayrılması zor olmakta ve hücre membran proteinleri, dolayısıyla birikmiş ECM bozulmaktadır. Bu durum azalan hücre canlılığıyla ilişkilendirildiğinden hücre transplantasyonundaki verim de düşmektedir. Kısacası, mikrotasıyıcı-destekli kültür sisteminin başlıca sorunlarından biri, fiziksel veya fizyolojik harabiyet vermeden hücrelerin mikrotasıyıcı yüzeylerinden ayrılmasındaki zorluktur [25,46]. Bu sorunun çözümü için bir yandan sıcaklık duyarlı polimerlerin kullanımı gündeme gelirken, diğer yandan biyobozunur polimerler ile mikrotasıyıcılar hazırlanmıştır. Okano ve ark. sıcaklığa duyarlı poli (N-izopropilakrilamid) (PNIPAAm) kullanılarak kültür kaplarından düşük sıcaklıkta hücre toplanılmasını önermiştir [47]. Daha sonra sıcaklığa duyarlı PNIPAAm bazlı mikrotasıyıcılarda hücre tutunma verimliliği ve termal olarak indüklenen yüzeyden kopma etkileri gösterilmiştir [46,48]. Lam ve ark. ise farklılaşma potansiyellerini koruyarak mezenkimal stromal hücrelerin verimini destekleyebilen biyouyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilir PCL mikrotasıyıcılar geliştirmişlerdir [49].

Enjekte edilebilir mikrotasıyıcı uygulamalarında hücrelerin yüzeyden kaldırılmasına gerek yoktur. Doku mühendisliği uygulamalarında kullanılan doku iskeleleri gibi, mikrotasıyıcılar da doku rejenerasyonu için hücreleri ve büyüme faktörlerini taşımak üzere tasarlanmıştır (Şekil 2.10) [17]. Hücre tedavilerinde enjekte edilebilir hidrojel sistemleri de kullanılmaktadır. Vücut dışında sıvı halde bulunan polimerler vücut içerisinde jel haline geçerek hücrelerin iletimini sağlamaktadırlar. Ancak mikrotasıyıcılar ile karşılaştırıldığında hidrojel temelli enjekte edilebilir sistemler yüzeye-bağımlı hücrelerin tutunmasında yetersiz kalmaktadır [1,50].



Şekil 2.10. Hasarlı doku onarımında kullanılan uygulamalarında kullanılan enjekte edilebilir hücre dağıtım sistemlerinin şematik gösterimi ([1]'den değiştirilerek).

Enjekte edilebilir hücre taşıyıcısı kavramı, 2003 yılında Burg ve Boland tarafından tanıtılmıştır [51]. Aynı yılda Malda ve ark. makro gözenekli Cultispher jelatin bazlı mikrotasıyıcılar üzerinde çoğaltılmış insan nazal kondrositlerinin fenotipindeki değişiklikleri araştırmıştır. Başlangıçta; 10 hücre/mikrotasıyıcı varken 12 günlük kültür sonrasında; 400-500 hücre/mikrotasıyıcı elde etmişlerdir. Ardından farelerin deri altına enjekte edilen hücrelerin kondrojenik potansiyeli değerlendirilmiştir. Mikrotasıyıcı yüzeyinde çoğaltılmış hücrelerin T-flask ile karşılaştırıldığında daha yüksek derecede farklılaştığı ve istatistiksel olarak önemli ölçüde artan miktarda proteoglikan ürettiği gösterilmiştir [52].

Enjekte edilebilir mikrotasıyıcıların sağladığı avantajlar sayesinde bu alana yönelik araştırmalar son yıllarda hızla artmıştır. Örneğin, tavşan osteokondral defekt modeline transplante edilen insan mezenkimal stromal hücre yüklü PCL mikrotasıyıcıların, hücre çoğalması ve kondrosit farklılaşmasındaki etkinliği araştırılmıştır. Kondrojenik farklılaşmayı destekleyen hücre yüklü mikrotasıyıcı yapılarının *in-vivo*'da kırıldak iyileşmesini en iyi sağlayan grup olduğu gösterilmiştir [53].

2.6. Mikrotarıyıcı-destekli Biyoreaktörler

Fizyolojik ortamı taklit edebilme özelliğine sahip biyoreaktörler, her bir spesifik doku için gerekli olan belirli biyolojik, kimyasal ve fiziksel sinyalleri tanımlamak için kontrollü çalışmalar yapılmasını sağlar. Doku gelişimindeki mikroçevrenin otomatik bir sistem tarafından kontrol edilebilmesi, tekrarlanabilir sonuçlar elde etmek için ideal kültür koşullarının standardizasyonunun sağlanması önemlidir. Hücre üretiminin birçok küçük kültür ünitesi yerine, yüksek üretim kapasitesindeki tek bir biyoreaktörde gerçekleştirilmesiyle kültür ortamının ekonomik bir şekilde kullanılması sağlanmış olur. Ayrıca otomatik izleme ve kontrol sistemine sahip mikrotarıyıcı-destekli biyoreaktörlerde daha az insan müdahalesiyle kontaminasyon riski en aza inmektedir [54,55].

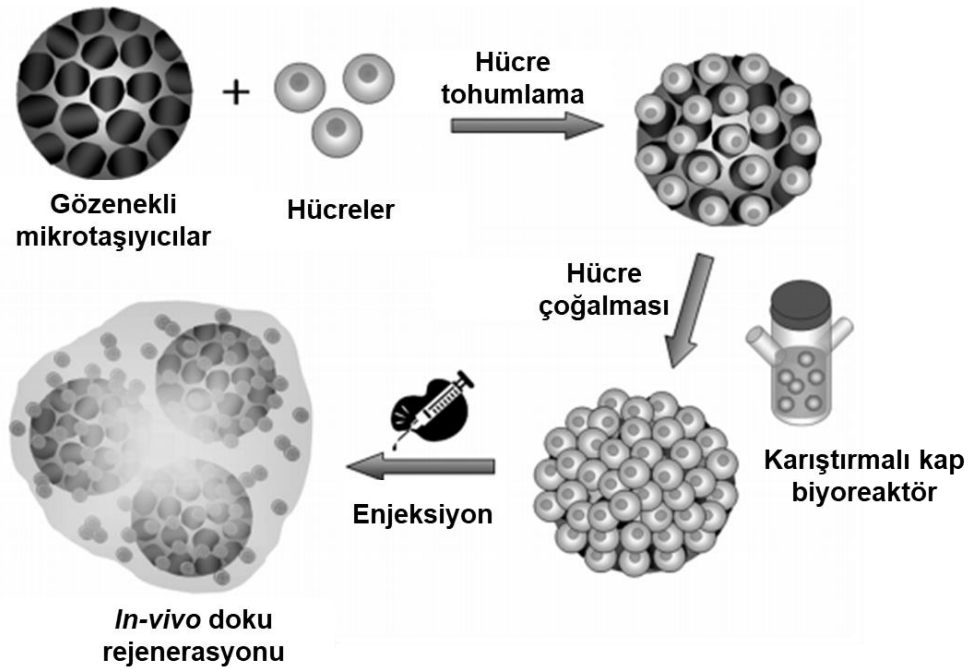
İdeal ve istenen özelliklerde bir biyoreaktör tasarımında biyoreaktör tasarımında dikkat edilmesi gereken çeşitli parametreler bulunmaktadır. Öncelikle kullanılacak olan malzemeler biyouyumlu olmalı, sterilize edilebilmeli ve kolaylıklar monte edilebilmelidir. Hücrelerin otomatik koşullarda kontrolünün sağlanabilmesi için de sıcaklık, basınç, pH, O₂ ve CO₂ ölçüm sensörlerinin yüksek verimle çalışması gerekir. Tekrarlanabilir sonuçlar elde edebilmek için çevresel parametrelerin kontrol edilebilirliği son derece önemlidir [56,57]. Doku mühendisliği uygulamalarında; karıştırmalı kap, döner şişe, döner duvarlı, perfüzyon, dolgulu-yatak, çekme gerinim, içi boş fiber membran biyoreaktörleri gibi farklı amaçlara yönelik çeşitli biyoreaktör sistemleri kullanılmaktadır [58].

Önceki yıllarda mikrotarıyıcılarla durgun ortamda (Petri kabı) ve karıştırmalı kap biyoreaktörlerde karşılaştırmalı çalışmalar yürütülmüştür [59]. Günümüzde karıştırmalı kap biyoreaktörler, mikrotarıyıcı-destekli kültür sistemindeki önemini korumaktadır.

Yüzeye-bağımlı hücreler, biyoreaktör ortamında süspansiyon haldeki mikrotarıyıcılar üzerinde çoğaltılarak hasarlı dokuya enjekte edilebilmektedir (Şekil 2.11). Meghezi ve ark. mikrotarıyıcılara ekilen hücrelerin benzer ECM ürettiğini gözlemlemiştir. Bu gözlemlerde, döner duvarlı biyoreaktörlerdeki

mikrotaşıyıcılar kıkırdak ve kemik biyolojisini incelemek için *in-vitro* model olarak kullanılmıştır [60].

Diğer bir çalışmada, Voigt ve ark. insan keratinosit hücrelerini mikrotaşıyıcılar üzerine ekmiş ve karıştırmalı kap biyoreaktöründeki mikrogreftleri farelerin sırtındaki yaralara nakletmişlerdir. On dört gün sonunda, kontrol grubuna kıyasla çok katmanlı, keratinize ve yeniden yapılandırılmış bir epitel doku oluşumunun sağlandığını göstermişlerdir [61].



Şekil 2.11. Karıştırmalı kap biyoreaktör kullanılarak hazırlanan hücre yüklü enjekte edilebilir mikrotaşıyıcıların uygulamasının şematik gösterimi ([62]'den değiştirilerek).

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Bu bölümde tez çalışması kapsamında kullanılan malzemeler ve deneysel çalışmaların yöntemleri hakkında bilgi verilmiştir. Tez çalışması üç ana bölümden oluşmaktadır. İlk kısımda, SF mikrot taşıyıcıların emülsiyon haline getirilmiş faz ayrımı yöntemiyle üretimi anlatılmıştır. Mikrot taşıyıcı yüzey özelliklerinin değiştirildiği, enjekte edilebilir çapın sağlanabildiği üretim parametreleri detaylı bir biçimde açıklanmıştır.

İkinci bölüm; SF mikrot taşıyıcıların karakterizasyon çalışmalarını temsil etmektedir.

Üçüncü bölümde; L929 fibroblast, MC3T3-E1 pre-osteoblast ve S42 işsi Schwann hücrelerin SF mikrot taşıyıcılara tutunma ve çoğalma kabiliyetlerinin incelendiği statik hücre kültürü çalışmalarına yer verilmiştir. Ayrıca Schwann hücreleri yapılan statik ve dinamik hücre kültürü çalışmaları anlatılmıştır.

3.1. Kullanılan Malzemeler

Deneysel çalışmalarda kullanılan tüm malzemeler Çizelge 3.1'de detayları ile sunulmuştur.

Çizelge 3.1. Tez çalışmasında kullanılan malzemeler.

Malzemeler	Katalog Numarası	Firma	Ülke
SF Üretimi			
<i>Bombyx mori</i> kozaları	-	Koza Birlik A.Ş.	Türkiye
Sodyum karbonat (Na_2CO_3)	13418	Sigma-Aldrich	Almanya
LiBr	746479	Sigma-Aldrich	Almanya
Yılan derisi diyaliz membranı (3,5 K MWCO)	68035	Thermo Fisher	A.B.D.
SF Mikrotaşyıcı Üretimi			
Petrol eteri	TK.150370.01000	Tekkim Lab.	Türkiye
Span-80	S6760	Sigma-Aldrich	Almanya
Metanol (%99,9 v/v)	1.06009.2511	Iso-Lab	Türkiye
Mutlak etanol (%99,5 v/v)	9200262500	Iso-Lab	Türkiye
Biyobozunurluk			
Kolajenaz I (370 birim/mg)	CI-22	Biochrom AG	Almanya
Sodyum azid (NaN_3)	S-2002	Sigma-Aldrich	Almanya
Hücre Kültürü			
DMEM-HG	E0500-170	Cegrogen	Almanya
α -MEM	310-010-CL	Wisent	Kanada
FBS	A0500-3210	Cegrogen	Almanya
L-glutamin	K0100-670	Cegrogen	Almanya
P/S	P0100-790	Cegrogen	Almanya
Trypsin/EDTA	TRY-3B	Capricorn Scientific	Almanya
D-PBS	PBS-1A	Capricorn Scientific	Almanya
BSA	BSA-1S	Capricorn Scientific	Almanya
MTT	298-93-1	Merck	Almanya

Çizelge 3.1. Devamı.

DMSO	A3672	Applichem	Almanya
Tripan mavisi	T8154	Sigma-Aldrich	Almanya
GA (%25 v/v)	G-6257	Sigma-Aldrich	Almanya
HMDS	999-97-3	Sigma-Aldrich	Almanya
70 µm hücre süzgeci (BD Falcon™)	352350	Biosciences	A.B.D.
Triton X-100	215682500	Acros Organics	Almanya
Alexa Fluor® 488 Phalloidin Konjuge F-Aktin Antikoru	CST 8878S	Cell Signaling	A.B.D.
DAPI	D-1306	Invitrogen	A.B.D.
Kalsein AM	56496	Sigma-Aldrich	Almanya
EthD-1	46043	Sigma-Aldrich	A.B.D.
18 G Spinal iğne	-	T-Lab	Türkiye
PCR Reaksiyonu			
RNA izolasyon kiti	74006	Qiagen	Almanya
cDNA reverse transkripsiyon kiti	4368814	Thermo Fisher	A.B.D.
EvaGreen®	08-24-00001	Solis Biodyne	Estonya
RNase İnhibitörü	N8080119	Thermo Fisher	A.B.D.
Trizol	79306	Qiagen	Almanya
Kloroform	1.02445	Merck	Almanya
Primerler	-	Oligomer Biyoteknoloji	Türkiye

3.2. İpek Fibroin Mikrotarıyıcıların Üretimi

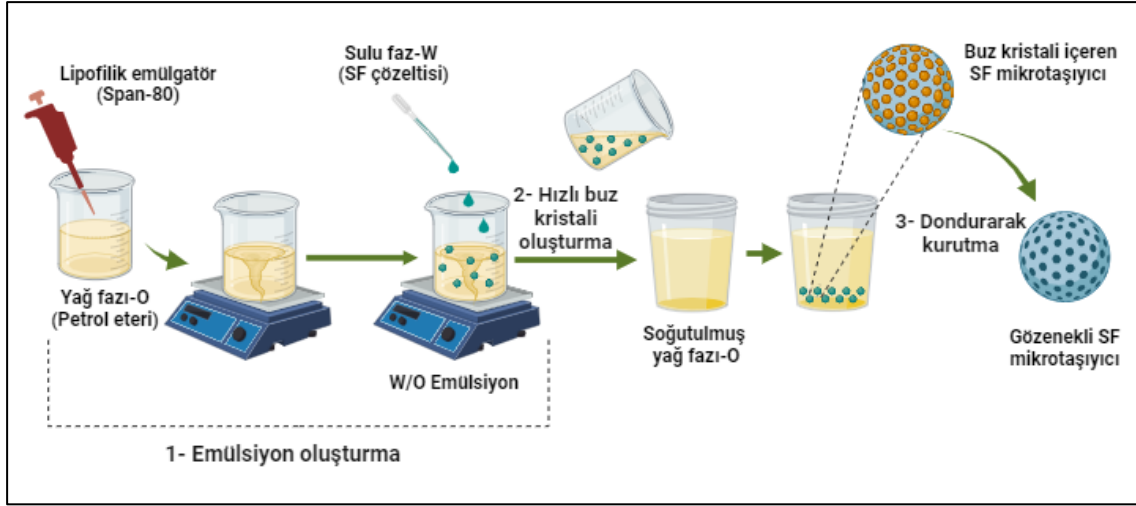
3.2.1. İpek Fibroin Çözeltisinin Hazırlanması

Tarif edilen protokol kullanılarak *Bombyx mori* kozalarından SF çözeltisi elde edilmiştir. Bu protokole göre; kozalar ipek böceğinden uzaklaştırılarak, 5 g'lık küçük parçalar halinde kesilmiştir. Koza parçaları 0,02 M Na₂CO₃ çözeltisinde 30 dk süreyle birbirinden ayrılarak kaynatılmıştır. Böylece ipek kozalarında safsızlığa neden olan, yapışkan, suda çözünür serisin proteini uzaklaştırılmıştır. Üç kez ultra saf su (UPW) ile yıkanan fibroin ekstratı 1 gece çeker ocağın içerisinde kurutulmuştur. Kuruyan öz tartılmış ve ağırlığının 4 katı kadar 9,3 M LiBr çözeltisi içerisinde 60°C'de 4 sa süreyle çözdürülmüştür. Daha sonra, çözünmüş SF/LiBr viskoz çözeltisi UPW içerisinde 48 sa diyaliz edilmiştir. Diyaliz sonucunda SF çözeltisinden LiBr uzaklaştırılmıştır. Çözeltinin konsantrasyonu, gravimetrik olarak hesaplanarak 4°C'de saklamaya hazır hale getirilmiştir [63].

3.2.2. İpek Fibroin Mikrotarıyıcıların Üretimi

İpek fibroin mikrotarıyıcıları, literatürde belirtilen prosedürdeki emülsiyon haline getirilmiş faz ayrımı ile dondurarak kurutma yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır [42]. Tez çalışması kapsamında karıştırma hızı, karıştırma süresi ve donma sıcaklığı ile ilgili farklı koşullar denenmiştir. İlk olarak, 0,175 mL Span-80 (lipofilik emülgatör), 10 mL petrol eteri (yağ fazı-O) içerisinde manyetik karıştırma ile 20 dk'da tamamen çözdürülmüştür. Ağırlıkça %1,5-6,5 (w/v) oranlarındaki 7 farklı SF çözeltisinden 2,5 mL (sulu faz-W), oda sıcaklığındaki Span-80/petrol eteri karışımı içerisine, yüksek karıştırma hızı varlığında (850 rpm) damlatılmıştır. Ardından oluşan emülsiyon (W/O), önceden soğutulmuş -20/-80°C sıcaklıklardaki petrol eteri içerisine hızlıca ilave edilmiş ve 1 gece bekletilmiştir.

Böylece buz kristali içeren SF mikrotarıyıcılar elde edilmiştir. Son aşamada ise mikrotarıyıcılar -20 ve -80°C'deki petrol eterinden süzülerek uzaklaştırılmış ve örnekler liyofilizatörde (Christ, Germany) 1 gece kurutulmuştur. Buz kristalinin mikrotarıyıcı yüzeyinden uzaklaştırılmasıyla gözenekli mikrotarıyıcılar üretilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Emülsiyon haline getirilmiş faz ayrımı ile dondurarak kurutulan gözenekli mikrotaşyıcıların üretim şeması (Biorender.com ile çizilmiştir).

3.2.2.1. İpek Fibroin Mikrotaşyıcıların Stabilizasyonu

İpek fibroin, genellikle sulu bir çözelti içerisinde çözülmemektedir. Ancak bu sorun, suda çözünmezlik ve mekanik stabilite sağlayan β -tabaka içeriğini ayarlayarak kontrol edilebilmektedir [64]. SF'in α -sarmaldan β -tabaka yapılarına konfigürasyon değişikliklerini indükleyebilen organik çözücüler arasında en yaygın kullanılanı alkollerdir [65]. Buradan yola çıkılarak üretilen SF mikrotaşyıcıların stabilizasyonu; metanol ve etanol olmak üzere iki farklı alkol çözeltisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Metanol modifikasyonu için; mikrotaşyıcılar %90 (v/v) metanol çözeltisinde 1 sa boyunca $+4^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilip, 1X PBS (pH:7,4) ile 3 kez yıkanmıştır [66]. Etanol modifikasyonunda ise; metanol protokolüne benzer şekilde mikrotaşyıcılar, %99,5 (v/v) etanol çözeltisinde 1 sa boyunca $+4^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilmiştir. Bir saatin sonunda etanol çekilerek örnekler deiyonize su ile 3 kez yıkanmıştır [42].

3.3. İpek Fibroin Mikrotaşıyıcıların Karakterizasyonu

3.3.1. Mikrotaşıyıcıların Görüntülenmesi ve Çap Ölçümü

SF mikrotasıyıcıların morfolojik özellikleri ters ışık mikroskobu (Olympus IX73, A.B.D.) ve taramalı elektron mikroskobu (SEM, GAIA3, Tescan, Czech Republic) ile belirlenmiştir. Elde edilen görüntüler Image J (NIH, A.B.D.) programına aktarılmış ve mikrotasıyıcıların çapları 3 farklı görüntüden (4X) 200 mikrotasıyıcı ölçülerek hesaplanmıştır.

3.3.2. Mikrotasıyıcıların Yoğunluk Ölçümü

Mikrotasıyıcıların yoğunlukları, Arşimet prensibine göre ölçülmüştür. Eppendorf tüplerin içerisinde 1 mL su eklenmiş ve tüpteki seviye işaretlenmiştir. Ardından sular boşaltılmış, tüpler kurutulmuştur. Yedi farklı ipek fibroin konsantrasyonundaki mikrotasıyıcılar, 22-35 mg olacak şekilde tüplere eklenmiştir. İşaretlenen su seviyesine kadar tekrar saf su ilave edilmiş ve mikrotasıyıcıların çökmeye bağlı olarak taşan su seviyesi ölçülmüştür. Her bir mikrotasıyıcı grubunun başlangıç ağırlığı ölçülen su miktarına bölünmüştür [67].

3.3.3. Mikrotasıyıcıların Kimyasal Karakterizasyonu

Mikrotasıyıcıların kimyasal yapısı, FTIR cihazında (Thermo Scientific Nicolet iS10, A.B.D.) ATR tekniği kullanılarak 400-4000 cm^{-1} dalga boyu arasında incelenmiştir.

3.3.4. Mikrotasıyıcıların Termal Karakterizasyonu

Mikrotasıyıcılara ait ısıl karakteristik özellikler, diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) analizi (Perkin Elmer Inc., A.B.D.) ile oda sıcaklığından 400°C'ye kadar 10°C/dk bir ısıtma hızında gerçekleştirilmiştir.

Termal kütle kaybı, N_2 atmosferi altında oda sıcaklığından 400°C'ye kadar termal gravimetrik analiz (TGA, EXSTAR 6000, SII Nanotechnology Inc., Japan) ile tayin edilmiştir.

3.3.5. Su Alım Kapasitesinin Belirlenmesi

SF mikrotarıyıcıların şişme davranışı, çapındaki değişime göre belirlenmiştir. Tek bir mikrotarıyıcıya PBS'in damlatıldığı ilk andan itibaren 15, 30, 45, 60 dk ve 2, 4, 6 sa aralıklarında ters ışık mikroskobunda görüntü alınarak değerlendirilmiştir. Mikrotarıyıcıların değişen çapları Image J yazılımında ölçülmüştür. Mikrotarıyıcıların şişme yüzdesi Eşitlik 3.1'e göre hesaplanmıştır [68].

$$\text{Şişme Yüzdesi} = \frac{D_t - D_0}{D_0} \times 100 \quad (3.1)$$

Eşitlikte, D_0 : Mikrotarıyıcının kuru haldeki çapı, D_t : Şişmenin t anındaki çapını belirtmektedir.

3.3.6. *In-Vitro* Biyobozunurluk Testi

SF tabakalarının biyobozunurluk davranışının incelenmesi için kolajenaz I kullanılmıştır. Kolajenaz enzimi (1,0 U/mL) %0,1 (w/v) NaN_3 içeren 0,05 M sodyum fosfat tamponunda (pH:7,0) çözdürülmüştür [69]. SF mikrotarıyıcılar, hazırlanan enzimatik çözelti içerisinde 5 hafta boyunca 37°C sıcaklıktaki çalkalamalı inkübatörde tutulmuştur. Enzimatik ortamları her hafta yenilenmiştir. Mikrotarıyıcılar, başlangıç anı ve 1., 3., ve 5. haftalarda görüntülenmiş ve çap değişimi Image J yazılımında ölçülmüştür. Mikrotarıyıcıların bozunma oranı Eşitlik 3.2'e göre hesaplanmıştır [68].

$$\text{Bozunma Yüzdesi} = \frac{D_t - D_0}{D_0} \times 100 \quad (3.2)$$

Eşitlikte, D_0 : Mikrotarıyıcının başlangıçtaki çapı, D_t : t zamandaki bozunan mikrotarıyıcının çapını belirtmektedir.

3.4. *In-Vitro* Hücre Kültürü Çalışmaları

3.4.1. Schwann Hücrelerinin Karakterizasyonu

Hacettepe Üniversitesi Biyomalzeme ve Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edilen Schwann hücre hattının karakterizasyonunda yapılan analizler Çizelge 3.2.'de gösterilmiştir.

Schwann hücreleri %10 (v/v) FBS, %2 (v/v) L-glutamin ve %1 P/S (100 birim/mL-100µL/mL) içeren DMEM-HG ortamında 37°C'de %95 nem ve %5 CO₂ içeren inkübatörde (Heraeus Instruments, Almanya) kültüre edilmiştir [70]. Schwann hücrelerinin karakterizasyon çalışmaları, 14 gün boyunca kesikli kültürde sürdürülmüştür.

Çizelge 3.2. Schwann hücrelerinin karakterizasyonunda yapılan analizler.

Analiz	Analiz günleri	Analizin yürütüldüğü hücre kültür kabı	Çalışılan tekrar sayısı
Hücre Sayımı	1, 2, 3, 5, 7, 10, 14	48 kuyucuklu hücre kültür kabı	3 (Her gözden iki kere sayım)
MTT	1, 2, 3, 5, 7, 10, 14	48 kuyucuklu hücre kültür kabı	3 (Her gözden iki kere okuma)
Kristal Viyole	1, 5, 7	6 kuyucuklu hücre kültür kabı	2
Alexa Fluor® 488 Phalloidin/DAPI	1, 7	48 kuyucuklu hücre kültür kabı	2

Çizelge 3.3. Karakterizasyonda kullanılan hücre kültür kapları ve çeşitli özellikleri

Hücre kültür kabı	Kuyucuk yüzey alanı (cm ²)	Göze eklenen ortam miktarı (mL)
6 kuyucuklu	9,6	3,0
48 kuyucuklu	0,75	0,5

Hücre ekimi 2×10^4 hücre/cm² yoğunlukta gerçekleştirilmiştir. Çizelge 3.3'te karakterizasyonda kullanılan hücre kültür kapları verilmiştir. Pasaj 5'te dondurulan hücreler uygun besi ortamı ile 25'cm²'lik hücre kültür flaskına açılmış

(pasaj 6), hücreler kültür kabının %90'ını kapladığında (confluence) pasaj 7'de ekim yapılmıştır.

3.4.1.1. Hücre Canlılığı ve Proliferasyonunun Belirlenmesi

Hücre Büyüme Eğrisi

Hücre büyüme eğrisi ve ikilenme süresinin belirlenmesi amacıyla hücrelerin sayımı, hemositometrik yöntem ile gerçekleştirilmiştir. Kültürün 1., 2., 3., 5., 7., 10. ve 14. günlerinde, hücrelerin ekili olduğu gözlere 0,3 mL %0,25 tripsin/ 0,53 mM EDTA çözeltisi eklenip 5 dk boyunca 37°C'deki CO₂ etüvünde inkübe edilmiştir. Tripsin ile kaldırılan Schwann hücreleri, 0,7 mL büyüme ortamıyla toplanmıştır. Toplam hacmin 1 mL olduğu süspanse hücreler, 1/1 oranında seyreltilerek (100 µL hücre/100 µL boya) PBS içerisinde çözülmüş %0,4 tripan mavisini (w/v) ile boyanmıştır. Hücre/boya karışımından 10 µL'si lamel ve Neubauer lamının arasına alınmıştır. Neubauer lamı, ters ışık mikroskopunda 10X objektifine yerleştirilerek 3 paralel kuyucuktan 2'şer kere sayım yapılmıştır. Parlak ve boyanmayan canlı hücreler, sekiz farklı 1 mm'lik kareden sayılmıştır.

Canlılık Analizi

Schwann hücrelerinin mitokondriyal aktiviteleri, kültürün 1., 2., 3., 5., 7., 10. ve 14. günlerinde 3-[4,5-dimetiltiazol-2]-difeniltetrazolyum bromür (MTT) analizi ile kantitatif olarak belirlenmiştir. Öncelikle hücreler üzerindeki ortam uzaklaştırılıp her bir göze 300 µL serumsuz besi ortamı (DMEM-HG) ve 30 µL MTT çözeltisi (2,5 mg/mL PBS) eklenerek 37°C'deki CO₂ etüvünde 3 sa boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda hücreler üzerindeki ortam uzaklaştırılmış ve her bir göze 400 µL DMSO eklenerek formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır. Kristallerin çözünmesiyle ortaya çıkan mor renkli çözülden 200 µL alınarak 96 kuyucuklu kültür kaplarına aktarılmış ve 690 nm referans olmak üzere, 570 nm'de mikropilaka okuyucu (Asys UVM 340, Avusturya) ile spektrofotometrik olarak çözümlerin optik yoğunlukları belirlenmiştir.

3.4.1.2. Schwann Hücrelerin Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

Schwann hücrelerinin Alexa Fluor® 488 Phalloidin/DAPI ve kristal viyole boyaması ile morfolojik karakterizasyonu tamamlanmıştır.

Floresan Görüntüleme

Hücrelerin morfolojik karakterizasyonu; kültürün 1. ve 7. günlerinde Alexa Fluor® 488 Phalloidin/DAPI boyamaları ile gerçekleştirilmiştir. Hücre iskeleti Alexa Fluor® 488 Phalloidin ile yeşil, hücre çekirdeği ise DAPI ile mavi boyanmıştır. Kültürün belirlenen günlerinde hücreler üzerindeki ortam uzaklaştırılmış ve 3 kez PBS ile yıkanmıştır. Ardından 4°C'deki %2,5 (w/v) glutaraldehit ile 20 dk boyunca oda sıcaklığında, karanlık koşullarda hücrelerin fiksasyonu gerçekleştirilmiştir. Fiksasyon sonrasında hücreler PBS ile 3 kez yıkanmıştır. Hücrelerin membran geçirgenliğini artırmak için %0,1 (v/v) Triton-X-100 içeren PBS çözeltisi kültür kaplarına eklenmiştir. On dk sonunda %0,1 (v/v) Triton-X-100 çözeltisi uzaklaştırılarak, hücreler %1 (w/v) BSA içeren PBS ile 3 kez 5'er dk yıkanmıştır. Daha sonra her bir göze Alexa Fluor® 488 Phalloidin/DAPI karışımı (1:100Alexa/1:1000DAPI) eklenerek karanlıkta 30 dk boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında hücreler BSA'lı PBS ile 3 kez daha yıkanmış ve floresan mikroskobu (Olympus IX73) ile görüntüleme yapılmıştır.

Kristal Viyole Boyama

Kristal viyole ile boyamaları yapılacak olan Schwann hücrelerinin kültür ortamı uzaklaştırılmış ve hücreler 3 kez PBS ile yıkanmıştır. Fiksasyon işlemi için hücreler 4°C'de 20 dk boyunca %20 (v/v) metanol/PBS çözeltisinde bekletilmiştir. Ardından hücreler üzerine 500 µL %0,1 (w/v) kristal viyole çözeltisi eklenerek 30 dk inkübe edilmiştir. Boyanan yüzey su ile yıkanmış ve hücreler ters ışık mikroskobunda incelenmiştir.

3.4.2. Mikrotasıyıcı-destekli Statik Hücre Kültürü Çalışmaları

Hazırlanan mikrotasıyıcıların hücre biyoyumluluk testleri L929 fibroblast ve MC3T3-E1 pre-osteoblastları ile test edilmiştir.

Statik hücre kültürü çalışmaları, laminar akış kabininde (Bioair, İtalya) L929 fibroblast (pasaj 15), MC3T3-E1 pre-osteoblast (pasaj 10) ve S42-Schwann (pasaj 7) hücre hatları ile gerçekleştirilmiştir. Aşağıda detayları ile açıklanan analizler, 3 hücre hattı için de aynı şekilde gerçekleştirilmiştir.

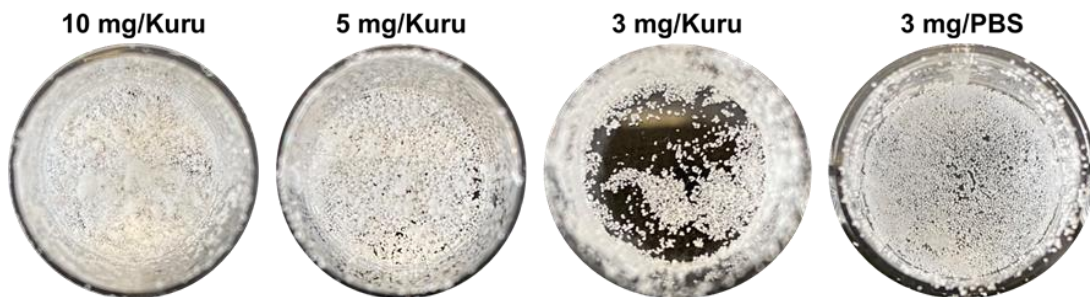
Mikrotaşıyıcıların kimyasal ve termal özelliklerinin sonuçları doğrultusunda uygun sterilizasyon yöntemine karar verilmiştir. Stabilize edilmiş mikrotaşıyıcılar, %75 (v/v) etanol içinde 1 sa çalkalanarak sterilize edilmiş ve steril D-PBS ile üç kez yıkanmıştır. Daha sonra steril tüpler 45 dk UV ışığı altında tutulmuştur.

3.4.2.1. L929 Hücre Kültürü Çalışmaları

L929 fibroblastları %10 (v/v) FBS, %2 (v/v) L-glutamin ve %1 (v/v) P/S içeren DMEM-HG kültür ortamında çoğaltılmıştır.

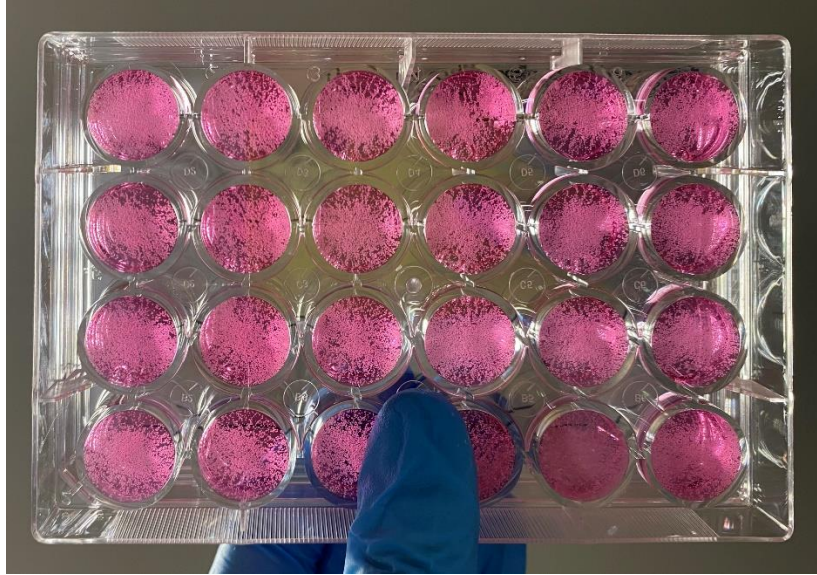
Hücre Ekimi

Hücre kültürü çalışmalarının gerçekleşeceği 24 kuyucuklu kültür kabının 1 kuyucuğu $1,9 \text{ cm}^2$ 'dir. Bir kuyucuk alanın tamamen mikrotaşıyıcı ile kaplanabilmesi için gerekli olan miktar, mg olarak belirlenmiştir. Sırasıyla 10, 5 ve 3 mg mikrotaşıyıcı tartılarak kuyucuklara yerleştirilmiştir. SF mikrotaşıyıcıların elektrostatik özelliğinden dolayı kuru haldeyken kuyucuk çevresine dağıldığı görülmektedir. Sulu ortamda kapladıkları alanın belirlenebilmesi için 3 mg mikrotaşıyıcı üzerine 1 mL PBS eklenmiştir. Bu miktarın kuyucuk yüzeyini kaplamak için fazla olduğu görülmüştür (Şekil 3.2). Bu nedenle kuyucuk başına ideal mikrotaşıyıcı miktarının 1 mg/mL olmasına karar verilmiştir.



Şekil 3.2. Farklı miktarlardaki SF mikrotaşıyıcıların 24 kuyucuklu kültür kaplarında kapladığı alan.

Hücre ekimi öncesi mikrotarıyıcılar, serum içeren DMEM-HG şartlandırma ortamında 1 gece bekletilmiştir. Böylece serum içerisinde bulunan proteinlerin mikrotarıyıcı yüzeylerine adsorplanması sağlanmıştır. Ertesi gün şartlandırma ortamı, taze büyüme ortamı ile değiştirilmiştir ve SF mikrotarıyıcıları, 50 mL'lik steril bir tüp içerisinde süspansiyon edilmiştir. Süspansiyon halindeki mikrotarıyıcılar, 1 mg/mL olacak şekilde 24 kuyucuklu non-treated kültür kaplarına paylaştırılmıştır (Şekil 3.3). Kuyucuk başına 2×10^4 hücre/mL ekilmiştir. Hücrelerin mikrotarıyıcı yüzeylerine yapışmasını kolaylaştırmak için kültür kabı aralıklarla çalkalanmıştır. Hücre-mikrotarıyıcı süspansiyonları, yedi gün boyunca kültüre edilmiştir. Etkileşimleri ters ışık mikroskopunda günlük olarak incelenmiştir. Kontrol grubu olarak 48 kuyucuklu hücre kültür kabı (TCPS) kullanılmış ve kuyucuk başına 8×10^3 hücre/mL ekilmiştir.



Şekil 3.3. SF mikrotarıyıcıların hücre kültürü çalışmaları öncesindeki görüntüsü. Mikrotarıyıcılar 24 kuyucuklu kültür kabının her gözüne 1 mg/mL konsantrasyonda dağıtılmıştır.

MTT Analizi

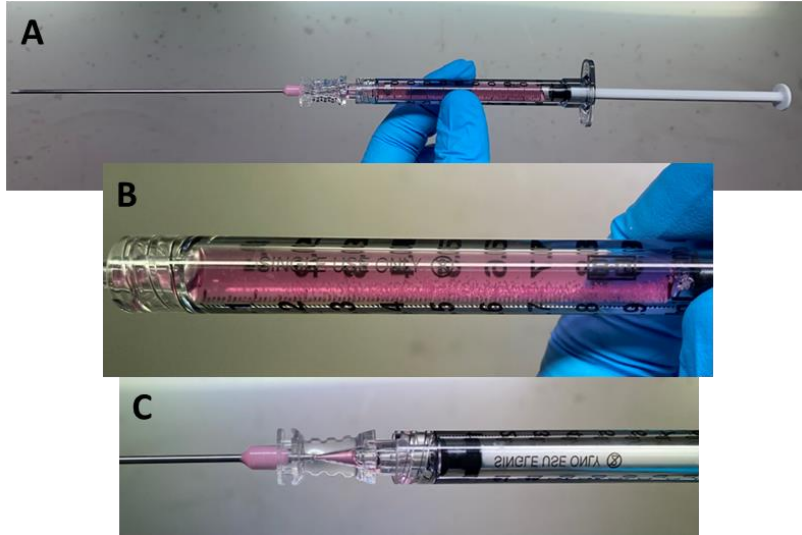
Mikrotarıyıcı yüzeyine tutunan hücrelerin kantitatif analizi MTT ile kültürün 1., 3. ve 7. günlerinde belirlenmiştir. Öncelikle mikrotarıyıcılar yeni bir kültür kabı yüzeyine aktarılmış ve üzerindeki ortam uzaklaştırılmıştır.

Daha sonra her bir kuyucuğa 600 µL serumsuz besi ortamı (DMEM-HG) ve 60 µL MTT çözeltisi (2,5 mg/mL PBS) eklenerek 37°C'deki CO₂ etüvünde 3 sa boyunca inkübe edilmiştir. Analizin diğer detayları Bölüm 3.5.1.1'de açıklanmıştır.

Enjekte Edilebilirlik

Mikrotaşıyıcıların enjekte edilebilir boyutta olması, 18 G spinal iğne kullanılarak test edilmiştir (Şekil 3.4). Mikrotaşıyıcılar, kültürün 7. gününde 1 mL hücre büyüme ortamıyla birlikte şırınga içerisine çekilmiş ve yeni bir kuyucuğa enjekte edilmiştir. Hücre canlılığının devam ettiğini test etmek için enjeksiyon sonrası 6. sa (ES-6. Saat), 1. günde (ES-1. Gün) MTT analizi ve SEM fiksasyonu gerçekleştirilmiştir [71].

TCPS yüzeyinde çoğalan hücreler de kültürün 7. gününde tripsinizasyon işlemi ile yüzeyden kaldırılmış, büyüme ortamı varlığında şırınga içerisine çekilmiş ve yeni bir kuyucuğa enjekte edilmiştir. ES-6. Saat ve ES-1. Gün'de MTT analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz öncesinde mikrotaşıyıcılı örnekler ve kontrol grubu ters ışık mikroskopunda incelenmiştir.



Şekil 3.4. (A) Spinal iğnenin (18 G) genel görüntüsü (B) Bir mL içerisinde çekilen 1 mg 2,5 SF (C) Enjeksiyon sonrası şırınga ucu.

Mikrotaşıyıcı Yüzeylerinden Hücrelerin Kaldırılması

Hücreler mikrotaşıyıcı yüzeylerinden tripsinizasyon işlemi ile kaldırılıp sayılmıştır. Kültürün 1., 3. ve 7. günlerinde, hücrelerin ekili olduğu mikrotaşıyıcılı kuyucuklar, hücre matris bağlarının zayıflatılması için Ca^{+2} ve Mg^{+2} içermeyen D-PBS ile yıkanmıştır. Ardından 0,3 mL %0,25 tripsin/0,53 mM EDTA çözeltisi eklenip 5 dk boyunca $37^{\circ}C$ 'deki CO_2 etüvünde inkübe edilmiştir. Örnekler, 0,7 mL büyüme ortamı eklenerek Eppendorf tüplerine toplanmış ve 1000 rpm, $+4^{\circ}C$ 'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Mikrotaşıyıcı yüzeylerinden hücrelerin tamamen ayrılmasını sağlamak için pipetleme ile mekanik etki uygulanmıştır. Toplam hacmin 1 mL olduğu süspanse hücreler, 1/1 oranında seyreltilerek (100 μ L hücre/100 μ L boya) PBS içerisinde çözülmüş %0,4 tripan mavisi (w/v) ile boyanmıştır. Hücre/boya karışımının 10 μ L'si lamel ve Neubauer lamının arasına alınmıştır. Neubauer lamı, ters ışık mikroskobunun 10X objektifine yerleştirilerek 3 paralel kuyucuktan 2'şer kere sayım yapılmıştır. Parlak ve boyanmayan canlı hücreler ile boyanan ölü hücreler sekiz farklı 1 mm'lik kareden sayılmıştır.

Canlı/Ölü Hücrelerin Görüntülenmesi

SF mikrotaşıyıcılar üzerindeki hücre canlılıkları Calcein AM ve Etidyum Homodimer-1 (EthD-1) boyaları kullanılarak kültürün 3. ve 7. günlerinde belirlenmiştir. Örnekler Ca^{+2} ve Mg^{+2} içeren DPBS (DPBS+) ile iki kez yıkanmış ve hazırlanan boya çözeltileri (1 μ M Calcein AM ve 1 μ M EthD-1) ile DPBS+ içerisinde 30 dk boyunca karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında DPBS+ ile iki kez daha yıkama yapılmıştır. Ardından örnekler, floresan mikroskobunda incelenmiştir.

Alexa Fluor® 488 Phalloidin/DAPI Boyama

Mikrotaşıyıcı yüzeylerindeki hücre iskeleti Alexa Fluor® 488 Phalloidin ile yeşil, hücre çekirdeği ise DAPI ile mavi boyanmıştır. Analizin detayları Bölüm 3.5.1.2'de açıklanmıştır.

SEM Analizi

Schwann hücrelerinin mikrotasıyıcı yüzeyine tutunması ve yayılması kültürün 3. ve 7. günlerinde SEM analizi ile belirlenmiştir. İlk olarak örneklerin üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırılmış ve oda sıcaklığındaki PBS ile üç kez yıkanmıştır. Mikrotasıyıcılar, +4°C'deki %2,5'luk (v/v) glutaraldehit çözeltisi ile 20 dk boyunca karanlıkta fikse edilmiş, ardından etanol serilerinden (%30-100) geçirilerek dehidrasyon işlemi sağlanmıştır. Son olarak, mikrotasıyıcılar HMDS ile 5 dk muamele edilmiştir. Mikrotasıyıcılar stampalara yerleştirebilmek için 70 µm hücre süzgecinden (BD Falcon™) geçirilerek çeker ocakta kurutulmuştur. Analizden önce, hücreli SF mikrotasıyıcılar altın-paladyum ile kaplanmıştır.

3.4.2.2. MC3T3-E1 Hücre Kültürü Çalışmaları

MC3T3-E1 pre-osteoblastları ile yapılan çalışmalarda %10 (v/v) FBS, %2 (v/v) L-glutamin, %1 (v/v) P/S ile desteklenmiş α-MEM ortamı kullanılmıştır. Hücre ekim yoğunluğu ve tüm analizler, Bölüm 3.5.2.1'de açıklandığı gibidir.

Ek olarak, bu hücre hattı ile 7 farklı SF mikrotasıyıcı grubu kültüre edilmiştir. SF konsantrasyonunun artmasıyla biyoyumluluk test edilmiştir. Artan SF konsantrasyonuna sahip mikrotasıyıcılar ve MC3T3-E1 hücrelerinin etkileşimi SEM analizi ile incelenmiştir.

3.4.2.3. S42-Schwann Hücre Kültürü Çalışmaları

Schwann hücreleri ile yapılan çalışmalarda %10 (v/v) FBS, %2 (v/v) L-glutamin ve %1 (v/v) P/S içeren DMEM-HG kültür ortamı kullanılmıştır.

Mikrotasıyıcı-Schwann hücreleri ile yapılan çalışmalarda kuyucuk başına 2×10^4 ve 4×10^4 hücre ekilmiştir. Analizler, karar verilen ekim yoğunluğu ile sürdürülmüştür. Yapılan analizler Bölüm 3.4.2.1'de açıklandığı gibidir.

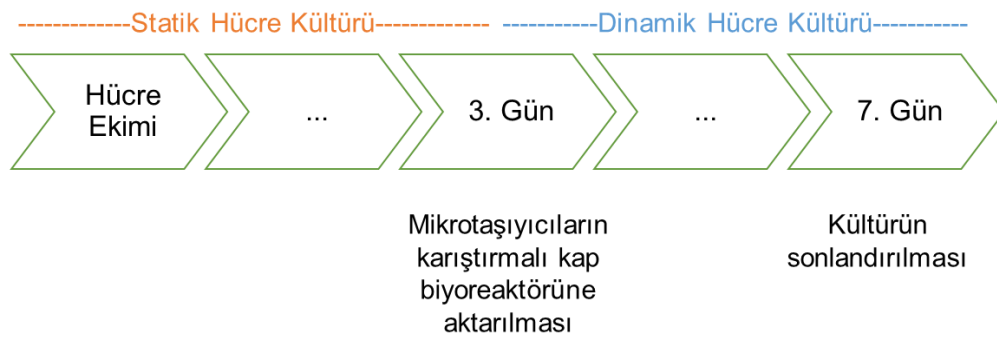
Schwann Hücreli Mikrotarıyıcılarda Kolajenaz Etkisinin İncelenmesi

Mikrotarıyıcı yüzeylerinden hücrelerin geri kazanılmasında rol oynayan bir başka enzim kolajenazdır [72]. Çalışmada kolajenaz enziminin mikrotarıyıcı yüzeylerindeki hücrelere etkisi test edilmiştir. Kültürün 7. gününde, örnekler üzerinden hücre büyüme ortamı uzaklaştırılmış ve kolajenaz ortamı (1,0 U/mL) eklenmiştir. Örnekler 15, 30 ve 60 dk boyunca 37°C'deki inkübatörde bekletilmiştir. Enzimin uygulama süresini artırmanın, hücre canlılığında nasıl bir etki göstereceği test edilmiştir. İlgili süre sonlarında örnekler ışık mikroskopunda incelenmiştir. Mikrotarıyıcılardan ve TCPS yüzeylerinden kalkan hücrelerin sayımı yapılmıştır.

3.4.3. Mikrotarıyıcı-destekli Dinamik Hücre Kültürü Çalışmaları

In-vitro hücre kültürü çalışmalarının üçüncü aşamasında, dinamik kültür koşulları karıştırmalı kap biyoreaktör içerisinde gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.6). Çalışma öncesinde, karıştırmalı kap biyoreaktörün tüm parçaları otoklavlanarak steril edilmiştir.

Statik hücre kültürü çalışmaları sonucunda belirlenen koşullarda, 2×10^4 hücre 1 mg mikrotarıyıcıya ekilmiş, ardından kültürün 3. gününde karıştırmalı kap biyoreaktöre taşınmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Dinamik hücre kültürü çalışması zaman çizelgesi.

Biyoreaktör çalışma koşulları literatürdeki benzer çalışmalar dikkate alınarak belirlenmiştir [40,73]. Mikrotaşıyıcılar 30 rpm hızında karıştırılarak süspansiyon halinde kültüre edilmiştir.



Şekil 3.6. Karıştırılmalı kap biyoreaktörün etüv içerisindeki görüntüsü.

3.4.4. Gen Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi

Aksonların miyelin kılıfını oluşturan Schwann hücreleri, birçok miyelin gen ekspresyonunu regüle etmektedir. *In-vitro* statik kültürde SF mikrotaşıyıcılar üzerinde çoğalan Schwann hücrelerinin gen ekspresyon seviyeleri kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile tespit edilmiştir. Schwann hücreleri tarafından salgılanan ve bazal laminanın önemli bir bileşeni olan Laminin (LN), periferik sinir sistemi nöronlarının pro-rejeneratif durumunu uyaran ECM'nin bir diğer önemli bileşeni olan Fibronektin (FN), Schwann hücre zarını aksonun zarı etrafında saran Miyelin Protein Sıfır (P₀, MPZ) glikoproteini ve miyelin kılıfın birincil lipidi olan galaktoserebrosid'in (GalC) aksonal rejenerasyonu teşvik etme seviyeleri incelenmiştir [74]. Bağlı gen ifadesi için housekeeping gen olarak β -aktin kullanılmıştır. Hedef gen, β -Aktin ifadesine göre normalize edilmiş ve $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır.

Örnekler ilgili kültür günlerinde 2 kez D-PBS ile yıkanmış ve analiz gününe kadar -80°C'de saklanmıştır. Analiz öncesi mikrotarıyıcılara 200 µL Trizol eklenmiş ve örnekler parçalanmıştır. Qiagen'in RNeasy Mini Kit protokolüne uygun olarak kültürün 3. ve 7. günlerinde RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

RNA izolasyonunu takiben Yüksek Kapasiteli cDNA Ters Transkripsiyon Kit (Applied Biosystem) ile cDNA sentezi yapılmıştır. cDNA sentezi için termal döngüleyicideki sıcaklık profilleri 25 °C'de 10 dk, 40 °C'de 120 dk, 85 °C'de 5 dk'dır. Örnekler PCR analizine kadar -20°C'de tutulmuştur. Gerçek zamanlı PCR analizi, 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (Solis Biodyne, Estonya) kit protokolüne göre bir Light Cycler Nano (Roche, İsviçre) analiz sisteminde gerçekleştirilmiştir. Her 20 µL reaksiyon karışımı, EvaGreen, QuantiTect RT Mix, RNase içermeyen su, ileri ve geri spesifik primerler ve hücrelerden izole edilmiş RNA'ları içermektedir. PCR'nin ilk aktivasyon adımı, ortamdaki primerlerin hedef DNA bileşeni ile 95°C'de 12 dk, proliferasyon adımı 95 °C'de 15 sn, ayrışma adımı 60°C'de 20 sn ve uzatma adımı 72°C'de 20 sn süreyle gerçekleştirilmiştir. Analizde kullanılan primerler Çizelge 3.4'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. RT-PCR analizinde kullanılan primerler.

GEN	FORWARD 5'-3'	REVERSE 5'-3'
LN	GCCAGAGTAGGGTTTCCGAG	ATGAGCCCCAGAGTGGGTAT
FN	CTGGTTACCCTTCCACACCC	GGTGACGAAGGGGGTCTTTT
MPZ	TGTCAAAAACCCACCGGACA	TCAAATCCCGCTAACCTGCC
GalC	TCCCTGCTCCAGGATGATAC	CTTGTGAGGACGAAGTCAA
β-aktin	AGCAAGCAGGAGTACGATGAG	AAAGGGTGTAACGCAGCTC

3.5. İstatistiksel Analiz

Deneysel çalışmalar kapsamında elde edilen veriler, GraphPad Prism v9.3.0 (GraphPad Software, A.B.D.) programı kullanılarak istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Her deney grubu için 3 paralel örnek ile çalışılmış ve ortalama \pm standart sapma değerleri ile sunulmuştur. Gruplar arasındaki farklılıkların tespit edilebilmesi için iki yönlü varyans analizi (ANOVA) yöntemi kullanılmış ve p değerinin 0,05'ten küçük olduğu durumlar anlamlı kabul edilmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Sunulan tez çalışmasında elde edilen sonuçlar üç temel başlıkta özetlenmiştir. İlk olarak İpek fibroin mikrotasıyıcıların üretimine ait bulgular paylaşılmış, ardından ardından karakterizasyon sonuçları çalışmaları sunulmuştur. Son olarak ise *in-vitro* hücre kültürü çalışmalarının sonuçları verilmiştir. Tüm sonuçlar literatür bilgisi ışığında yorumlanarak sunulmuştur.

4.1. İpek Fibroin Mikrotasıyıcıların Üretimi

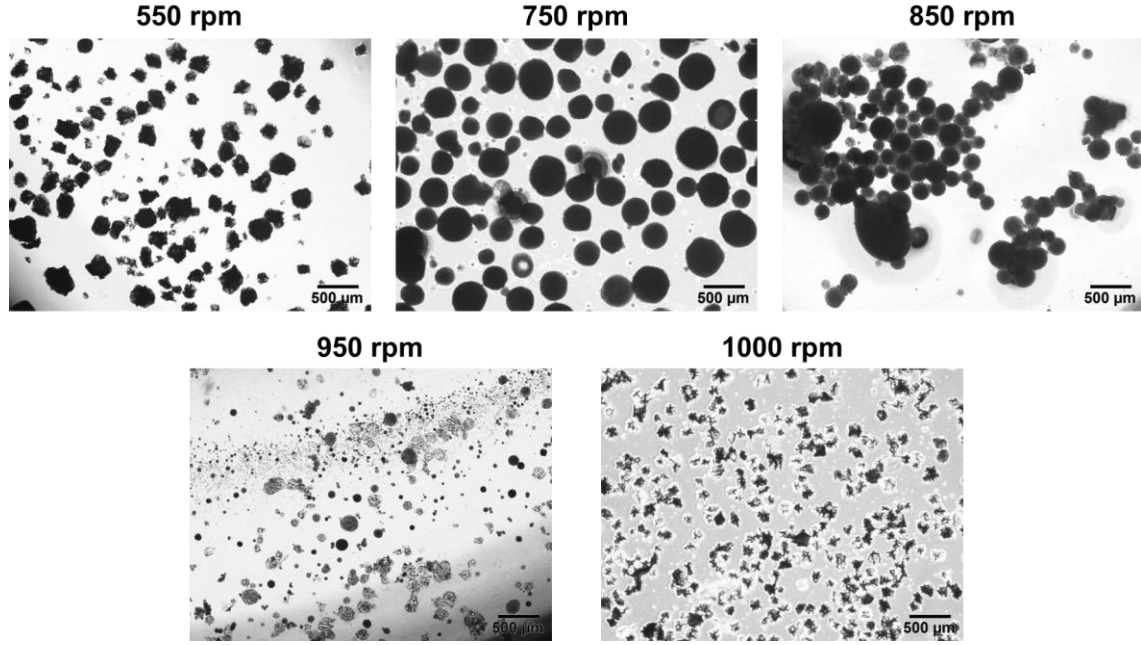
Doğal polimer bazlı kürelerin çapı; polimerin türü ve konsantrasyonundan, emülsiyon oluşum hızından, su ve yağ fazın hacminden, yüzey aktif maddenin türü ve konsantrasyonundan etkilenmektedir [75]. Buradan yola çıkarak, SF mikrotasıyıcılarda enjekte edilebilir çapın sağlanabilmesi, hücreler ile iyi derecede biyouyumluluk gösteren yüzeyin oluşturabilmesi için farklı üretim parametreleri test edilmiştir. Yedi farklı SF konsantrasyonunda gruplar oluşturulmuştur. Çizelge 4.1'de çalışılan üretim koşulları ve üretilen mikrotasıyıcı grupları gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. İpek fibroin mikrotasıyıcıların üretim koşulları.

Mikrotasıyıcı	İpek fibroin konsantrasyonu (%)	Karıştırma hızı (rpm)	Karıştırma süresi (dk)	Donma sıcaklığı (°C)
1,5 SF	1,5	850	3	-80
2,0 SF	2,0	850	3	-80
2,5 SF	2,5	550;750;850; 950;1000	3;20	-20;-80
3,5 SF	3,5	850	3	-80
4,5 SF	4,5	850	3	-80
5,5 SF	5,5	850	3	-80
6,5 SF	6,5	850	3	-80

İlk olarak yağ/su fazı karıştırma hızı için denemeler oluşturulmuştur. Span 80/petrol eteri içerisine %2,5 (w/v) SF çözeltisi damlatılırken karıştırma hızının çok yüksek olmasıyla mikrotasıyıcılar parçalanmış, düşük karıştırma hızında ise çapın yüksek olduğu görülmüştür. En uygun karıştırma hızının 850 rpm olduğuna karar verilmiştir (Şekil 4.1).

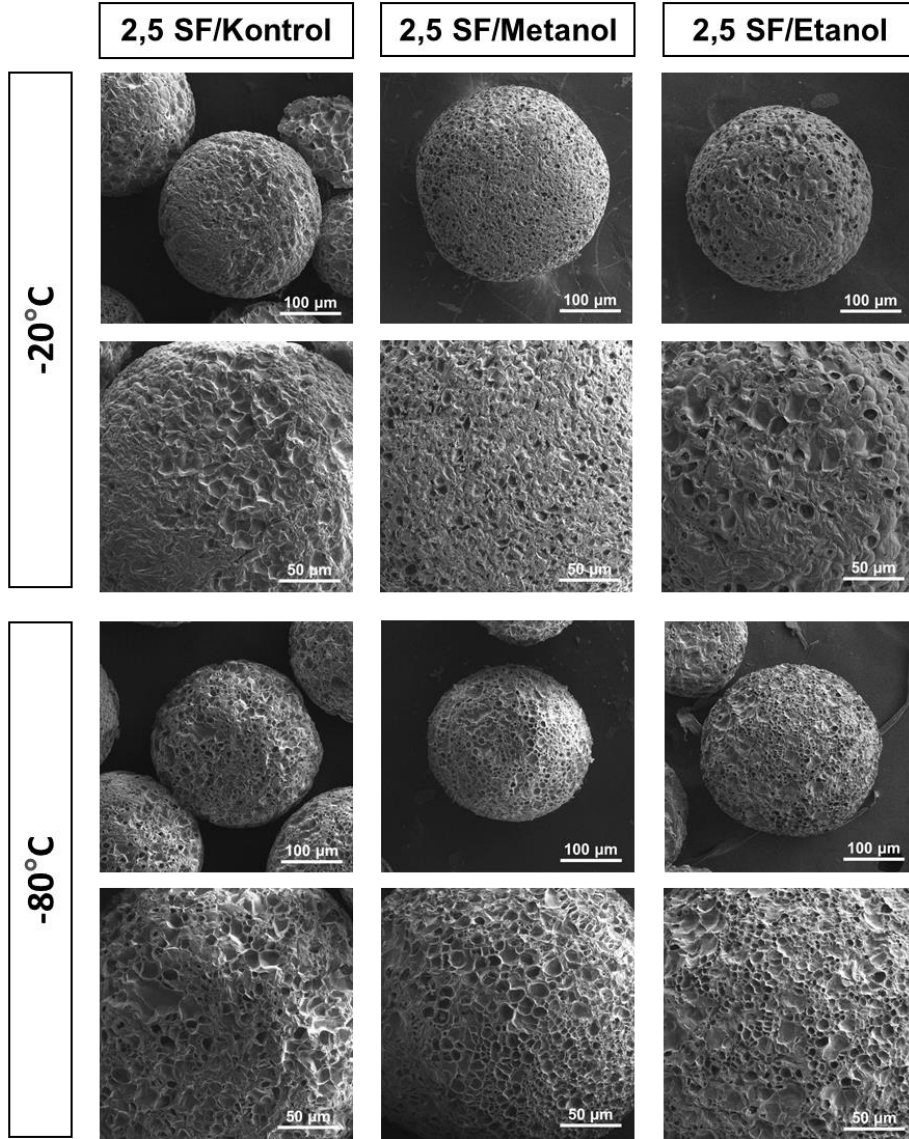
Emülsiyon oluştuktan sonra karıştırma 20 dk kadar devam ettirildiğinde, emülsiyon yapısının kaybedildiği görülmüştür. Bu nedenle su fazının eklenme süresi 3 dk ile sınırlandırılmıştır.



Şekil 4.1. Farklı karıştırma hızlarında oluşan ve parçalanan 2,5 SF mikrot taşıyıcılar.

Buz kristalinin oluşum hızı, gözenek boyutunu belirlemede anahtar faktördür [22]. Bu nedenle emülsiyon oluşturulunca hızlıca yağ fazının içerisine eklenmiştir. Gözenek boyutunu etkileyen bir başka parametre donma sıcaklığıdır. Guangyuan ve ark. yaptığı çalışmada, donma sıcaklığı -10°C 'den -270°C 'ye değiştirildiğinde kitosan mikrot taşıyıcıların gözenek boyutu $60\ \mu\text{m}$ 'den $5\ \mu\text{m}$ 'ye düştüğü gösterilmiştir [76]. Tez çalışması kapsamında ise -20°C ve -80°C olmak üzere iki farklı donma sıcaklığı denenmiştir. Emülsiyonun -20°C 'de bekletilmesi, hedeflenen yüzey topografisini sağlamamıştır (Şekil 4.2). Bu nedenle çalışmalar -80°C 'de buz kristali oluşturulan mikrot taşıyıcılar ile devam ettirilmiştir.

Üretilen SF mikrotarıyıcıların PBS damlatıldığı anda büzüştüğü görülmüştür. Bu sorunu çözebilmek için SF proteininin çözünmeyen antiparalel β -tabaka içeriğine odaklanılmıştır. β -tabakalarının ipek yapısına suda çözünmezlik ve mekanik stabilizasyon kazandırdığı bilinmektedir [66,77]. SF mikrotarıyıcılardaki α -sarmaldan β -tabaka yapılarına konfigürasyon değışiklikleri etanol ve metanol ile indüklenmiştir. Stabilizasyon ajanlarının mikrotarıyıcı yüzeylerine etkisi Şekil 4.2'de gösterilmektedir.



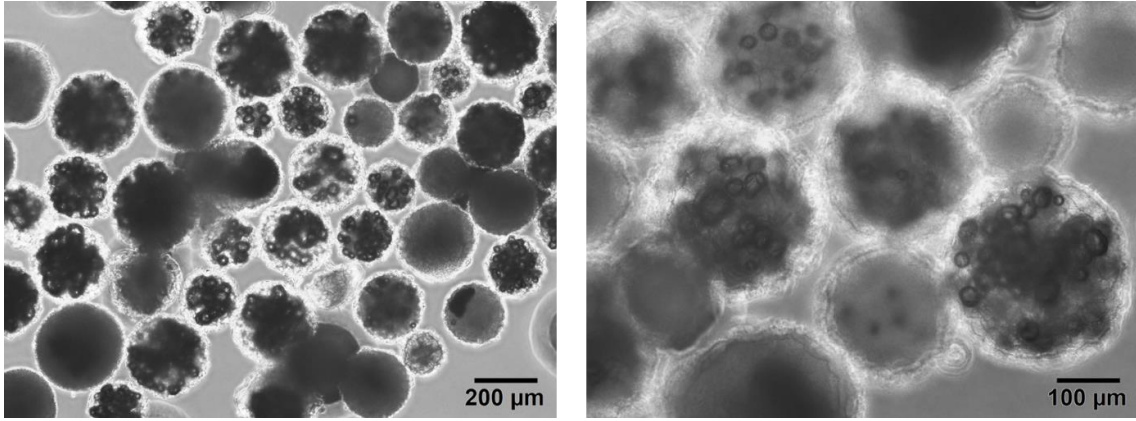
Şekil 4.2. Donma sıcaklığı ve stabilizasyon ajanları ile değışen mikrotarıyıcı yüzeylerinin SEM görüntüleri.

Mikrotaşıyıcıların çap dağılımı, gözeneklilik ve yüzey pürüzlülüğü gibi özelliklerin polimer bileşimi, karıştırma hızı ve donma sıcaklığı ile değiştirilebileceği gösterilmiştir. SEM görüntülerine ek olarak uygun stabilizasyon ajanının seçilebilmesi için karakterizasyon testleri yapılmıştır.

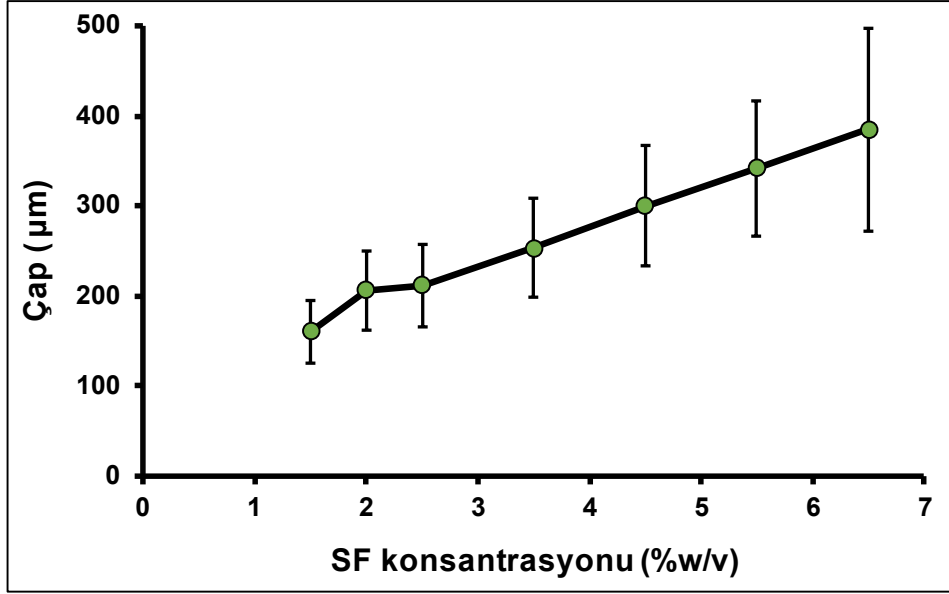
4.2. İpek Fibroin Mikrotaşıyıcıların Karakterizasyonu

4.2.1. Mikrotaşıyıcıların Görüntülenmesi ve Çap Değerleri

Şekil 4.3'tekine benzer şekilde elde edilen ışık mikroskobu görüntüleri ImageJ programına aktarılmış, mikrotaşıyıcıların çap dağılımı 3 farklı görüntüden (4X) 200 mikrotaşıyıcının çapı ölçülerek ortalama değerleri hesaplanmıştır. Yedi farklı grubun çapı Şekil 4.4'de gösterilmiştir.



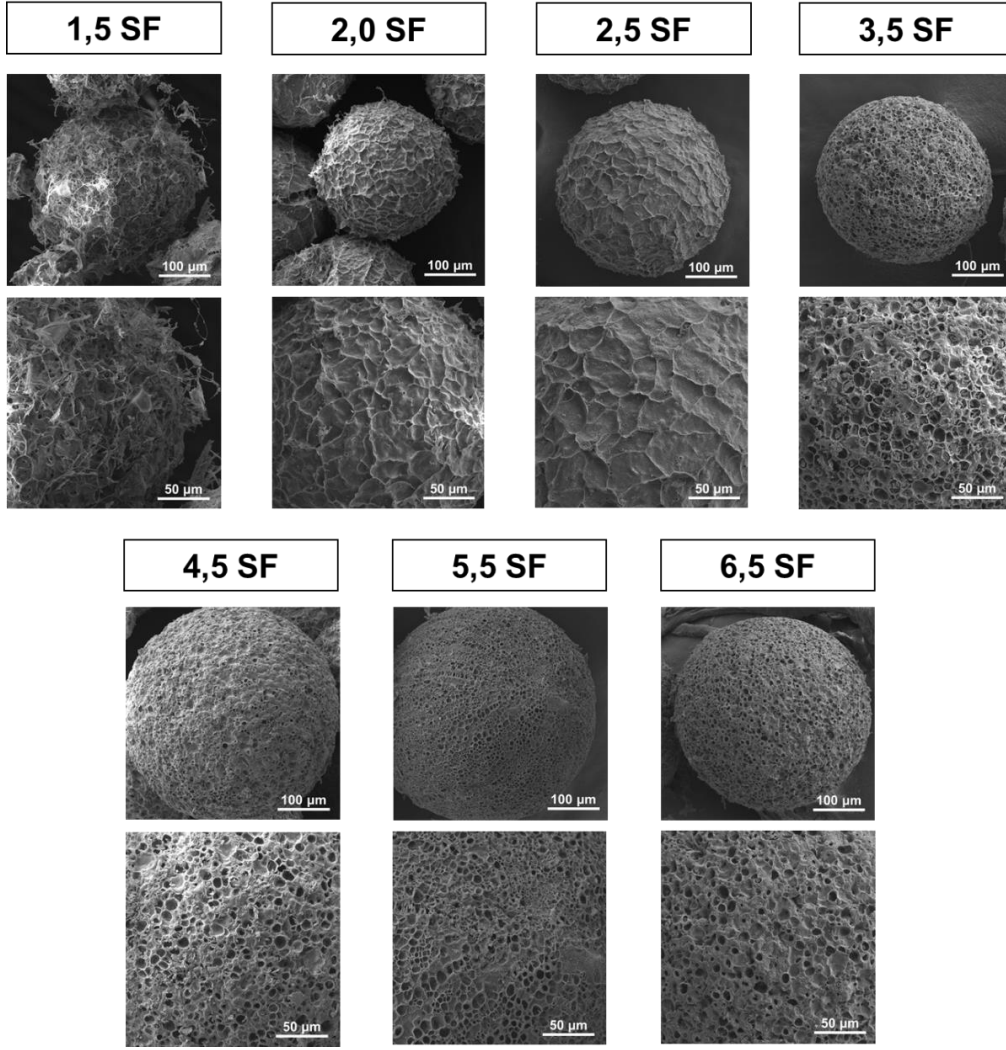
Şekil 4.3. Ters ışık mikroskobunda 2,5 SF mikrotaşıyıcıların PBS içerisindeki görüntüleri.



Şekil 4.4. Farklı SF konsantrasyonlarına bağlı olarak ölçülen çap değerleri (Karıştırma hızı:850 rpm; donma sıcaklığı:-80°C koşullarında üretilmiştir).

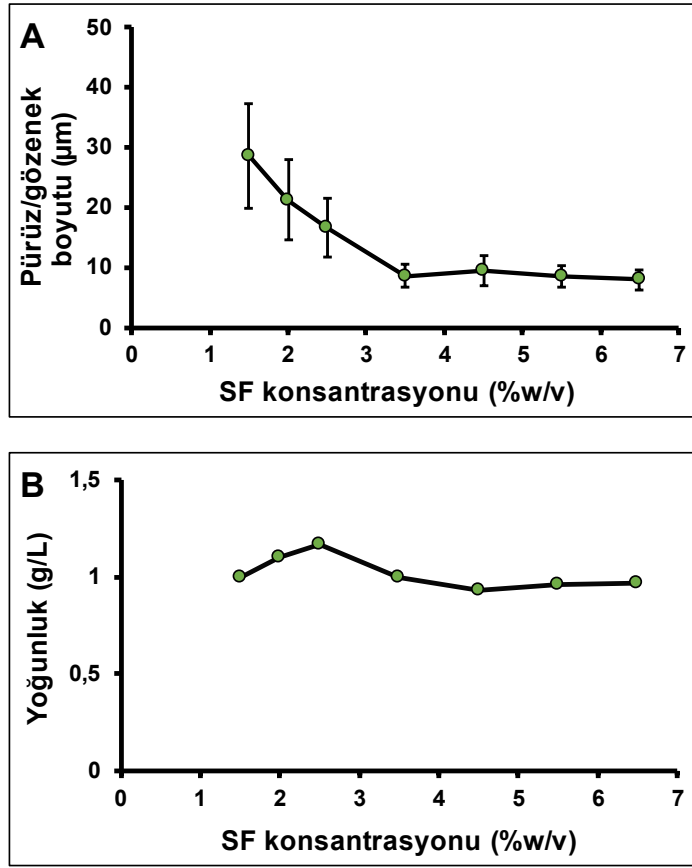
SF konsantrasyonu %1,5'dan %6,5'a yükseldiğinde; mikrotaşyıcıların çapları $160,8 \pm 34,8 \mu\text{m}$ 'den $385,5 \pm 112,7 \mu\text{m}$ 'ye artmıştır. Üretilen mikrotaşyıcılardan 2,5 SF grubu $211,9 \pm 45,8 \mu\text{m}$ çap değerine sahip olup hedeflenen enjekte edilebilir başarı ölçütünü sağlamıştır.

Mikrotaşyıcıların üç boyutlu küresel yapıları, geniş bir yüzey alanı sağlamaktadır. Artan yüzey alanı, hücrel tutunmayı ve büyümeyi desteklemektedir [78]. SF mikrotaşyıcıların yüzey topografisinin polimer konsantrasyonu ve donma sıcaklığı ile değiştirildiği gösterilmiştir. Şekil 4.5'te mikrotaşyıcıların değişen yüzey morfolojisini gösteren SEM görüntülerine yer verilmiştir.



Şekil 4.5. %1,5-6,5 (w/v) oranlarındaki 7 farklı SF konsantrasyonuna sahip mikrotaşyıcıların farklı büyütmelerindeki SEM görüntüleri.

Şekil 4.5'teki SEM görüntüleri incelendiğinde artan SF konsantrasyonu ile mikrotaşyıcı yüzey topografisinin değiştiği görülmektedir. Yüzeydeki pürüz/gözenek boyutları Image J programında ölçülmüştür. SF konsantrasyonunun artmasıyla boyutlar $29,0 \mu\text{m} \pm 8,8$ 'den $0,8 \mu\text{m} \pm 1,6$ 'ya düşmüştür (Şekil 4.6-A). 2,5 SF grubunda pürüz/gözenek boyutu $17,0 \pm 4,9$ olarak ölçülmüştür. Enjekte edilebilirliğin sağlandığı çap ve uygun yüzey topoğrafyası nedeniyle 7 grup arasından 2,5 SF grubu ön plana çıkmış ve tez çalışmasındaki tüm çalışmalar bu grup ile sürdürülmüştür.



Şekil 4.6. Artan SF konsantrasyonlarındaki mikrotasıyıcıların (A) Pürüz/gözenek boyutları (B) Yoğunluk değerleri.

Bu sonuçlar literatür ile karşılaştırıldığında, benzer sonuçların elde edildiği görülmüştür. Örneğin bir çalışmada, donma sıcaklığı sabit tutulurken (-78°C) kitosan konsantrasyonunun artması küçük gözenek çapları ile ilişkilendirilmiştir [79]. Çizelge 4.2'deki SF mikrotasıyıcıların gözenek çapları karşılaştırıldığında ise donma sıcaklığına göre farklılıklar rapor edilmiştir. Mikrotasıyıcı üretiminde referans alınan çalışmadaki gözenek çapı $20\pm 5\ \mu\text{m}$ olarak ölçülmüştür [42]. Tez çalışması kapsamında üretilen SF mikrotasıyıcıların gözenek çapı bu değere yakındır.

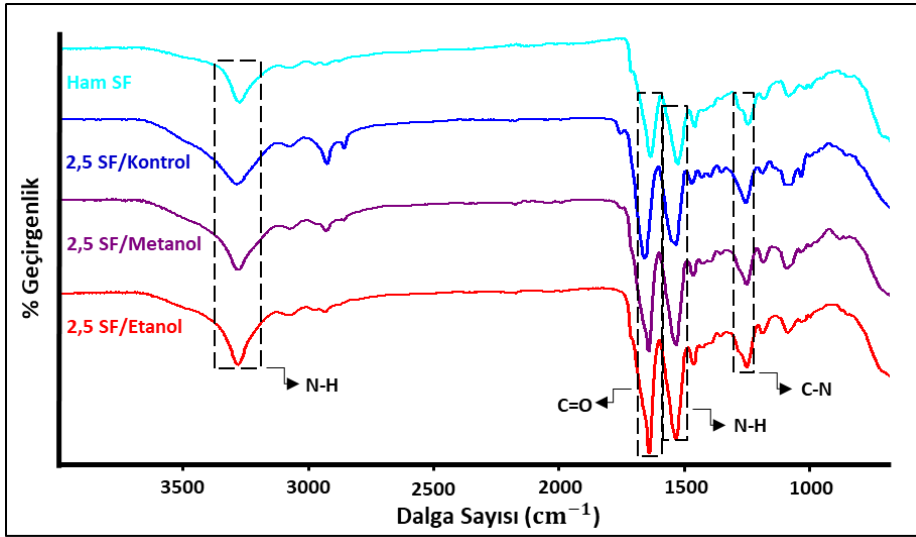
4.2.2. Mikrotasıyıcıların Yoğunluk Değerleri

Mikrotasıyıcıların yoğunluğu kültür ortamınıninkinden biraz daha yüksek olmalıdır. Bu koşulu sağlayan mikrotasıyıcılar, biyoreaktör içerisinde kesme kuvvetini azaltan hafif karıştırma ile süspansiyon halinde kalabilirler [67].

Sunulan tez çalışmasında üretilen SF mikrotarıyıcıların (%1,5-6,5 SF) yoğunlukları, 0,93–1,17 mg/μL arasındadır (Şekil 4.6-B). Yoğunluğun mikrotarıyıcı gruplarında artmaması, gözenek boyutu ile ilişkilendirilebilir. SF konsantrasyonu artıkça küçülen gözeneklere daha az su molekülü absorblanmış, bu da yoğunluğun azalması ile sonuçlanmıştır. Seçilen 2,5 SF mikrotarıyıcı grubu 1,17 g/mL yoğunluk değerindedir. Yüksek yüzey pürüzlülüğü nedeniyle bu mikrotarıyıcılara daha fazla su molekölünün absorbe olduğu söylenebilir.

4.2.3. Mikrotarıyıcıların Kimyasal Yapısı

ATR-FTIR analizi proteinlerin ikincil yapısını karakterize etmek için en yaygın kullanılan tekniktir. Metanol ve etanol ile stabilize edilmiş SF mikrotarıyıcıların kimyasal özellikleri ATR-FTIR analizi ile belirlenmiştir ve ilgili spektrumlar Şekil 4.7'de gösterilmiştir.



Şekil 4.7. Metanol ve etanol ile stabilize edilmiş SF mikrotarıyıcıların stabilize edilmemiş mikrotarıyıcılar (kontrol) ile karşılaştırmalı ATR-FTIR spektrumları.

Çizelge 4.2. SF mikrotaşyıcıların ATR-FTIR spektrum verileri.

Gruplar	N-H Gerilimi (cm ⁻¹)	C=O Gerilimi (cm ⁻¹) (Amid I)	N-H Bükülmesi (cm ⁻¹) (Amid II)	C-N Gerilimi (cm ⁻¹) (Amid III)
Ham İpek	3077	1618	1509	1227
2,5 SF/Kontrol	3266	1644	1517	1235
2,5 SF/Metanol	3282	1625	1516	1232
2,5 SF/Etanol	3082	1623	1516	1231

Uygun stabilizasyon yöntemine, α -sarmal ve β -tabakaya ait karakteristik pikler değerlendirilerek karar verilmiştir. Çizelge 4.2'deki 2,5 SF/Metanol grubuna ait piklerin 1625 cm⁻¹ (Amid I), 1516 cm⁻¹ (Amid II), 1232 cm⁻¹ (Amid III) dalga sayısında olduğu görülmektedir. FTIR spektrumunda ipeğin metanol stabilizasyonunu sağlayan β -tabaka içeriğine ait pikler, literatürdeki değerler ile uyuşmaktadır [80]. SF, organik çözücülerde ve suda çözünmeyen yüksek miktarda β -tabaka içeren bir forma getirilmiştir.

SF'teki β -tabaka oluşumu, su molekülleri ile SF arasında yeni oluşan hidrojen bağları tarafından indüklenir [81]. Hidrojen bağlarının bu yeniden düzenlenmesi, su molekülleri ile organik çözücü arasındaki etkileşim tarafından düzenlenir. Etanol, su molekülleriyle metanole göre daha düşük afinite göstermektedir. Dolayısıyla etanol ile stabilizasyon daha az β -tabaka oluşumu ile sonuçlanmaktadır [82]. Bu literatür bilgisi hem FTIR spektrum değerleri hem de metanol ile stabilize edilen mikrotaşyıcıların PBS içerisinde daha kolay çökmesiyle doğrulanmıştır. Metanol ile stabil hale getirilen 2,5 SF mikrotaşyıcılar ile çalışmalar sürdürülmüştür.

4.2.4. Mikrotaşyıcıların Termal Özellikleri

SF mikrotaşyıcılara ait ısısal özellikler ve uygulanan stabilizasyon işleminin termal özelliklerde oluşturduğu değişim DSC ve TGA analizleri ile belirlenmiştir. Analizler sonucunda belirlenen ısısal değerler Çizelge 4.3'te yer almaktadır.

Çizelge 4.3. Termal özelliklere ilişkin DSC ve TGA analiz değerleri.

Gruplar	Termal Geçiş Sıcaklıkları	T_g (°C)	T_M (°C)	Bozunma I (°C)		Bozunma II (°C)	
				% Kütle Kaybı	% Kütle Kaybı	% Kütle Kaybı	% Kütle Kaybı
Ham İpek		91	316	60 / 9		314 / 55	
2,5 SF Kontrol		104	283	53 / 2		282 / 58	
2,5 SF Metanol		75	281	72 / 2		294 / 42	
6,5 SF Kontrol		85	284	55 / 4		283 / 54	
6,5 SF Metanol		89	281	64 / 3		297 / 47	

SF, amid I ve amid II yapısına bağlı olarak iki farklı bozunma sıcaklığına sahiptir [80]. Bu iki endotermik bozunma zirvesinin ilki amorf yapıların bozunduğu, ikincisi ise malzemede mevcut olan kristal yapıyı temsil etmektedir. Ekzotermik tepe noktası yalnızca stabilize edilmemiş gruplarda görülmektedir. TGA analizinde 6,5 SF kontrol grubunda 206°C'de bir egzotermik pik görülmüştür. Metanol ile muamele edilmiş gruplarda β -tabakasındaki artıştan dolayı egzotermik pik bulunmamaktadır [83].

TGA analiz sonuçları değerlendirildiğinde, β -tabakasındaki değişikliklerin termal stabiliteyi sağladığını göstermiştir. 2,5 SF/Metanol grubunda kontrol grubuna göre, daha yüksek sıcaklıkta (294°C) daha az bir kütle kaybı olmuştur. SF'in α -sarmal ağırlıklı (amid I) yapısı 250°C'ye kadar termal kararlılığını korumaktadır [84]. β -tabaka'ya ait yapıların (amid II) ise yaklaşık 260°C'de bozunduğu bildirilmiştir [85].

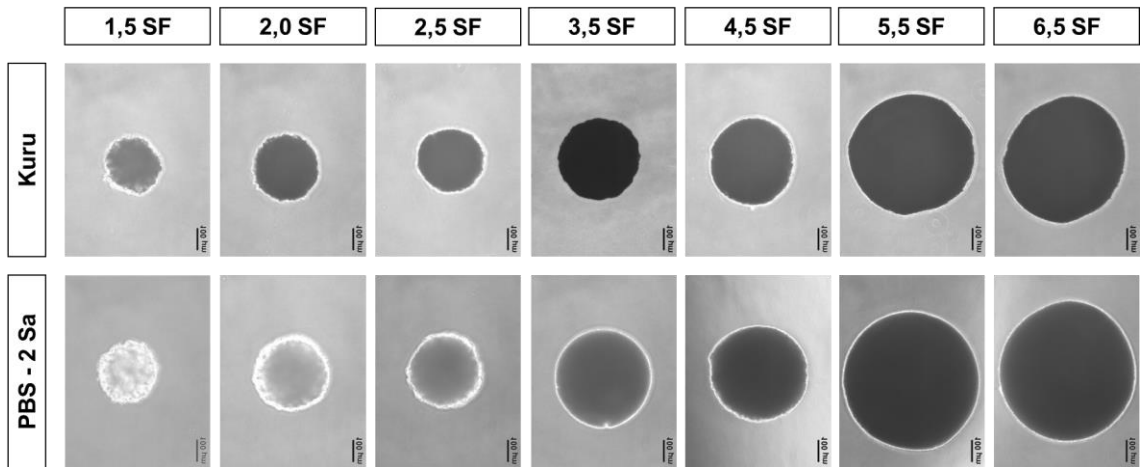
DSC analiz verilerinden metanol ile muamelemenin mikrotaşyıcıların camsı geçiş sıcaklığını değiştirmiştir. Metanol ile stabilize edilen 2,5 SF grubu; camsı geçiş sıcaklığı (T_g) 75°C olarak endotermik bir pik, yapının tamamen eridiği sıcaklık (T_m) 281°C olarak egzotermik pik göstermiştir.

T_g sonuçları literatürde belirtilen değerlerden düşüktür. Bunun nedeni olarak ipek kozalarının kalitesi öne sürülebilir. Ayrıca SF yapısında bağlı su içerdiğinde, 80°C gibi erken bir T_g sıcaklığı göstermektedir [86]. 2,5 SF kontrol grubunda ise T_g sıcaklığının 104°C'de gösterilmesi, düzensiz yapı ile ilişkilendirilebilir.

4.2.5. Su Alım Kapasitesi

Mikrotaşıyıcıların su alım kapasitesi belirlenirken çaptaki değişim dikkate alınmıştır. Şekil 4.8'deki gibi tek bir mikrotaşıyıcının çapı ölçülerek denge şişme oranları Eşitlik 4.1 ile hesaplanmıştır. İlgili değerler Çizelge 4.4'de gösterilmiştir. Eşitlikteki D_t : Şişmenin t anındaki çap değeri, D_0 : Mikrotaşıyıcının kuru haldeki çap değerini belirtmektedir [59].

$$\text{Denge şişme oranı} = \frac{D_t}{D_0} \quad \text{Eşitlik 4.1.}$$

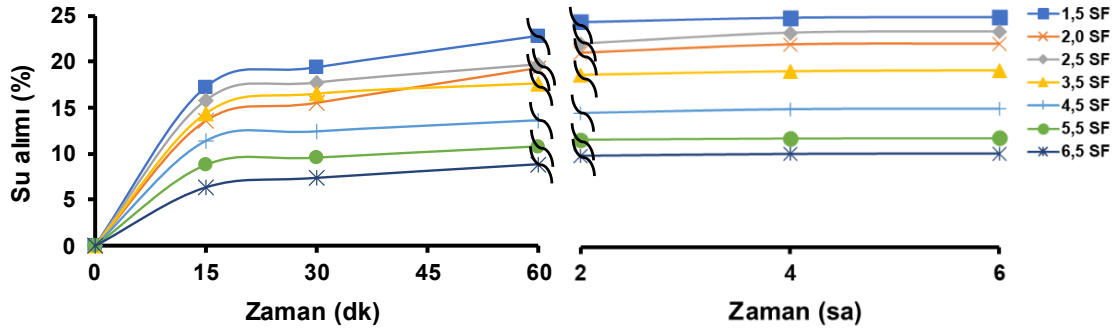


Şekil 4.8. Artan SF konsantrasyonlarında üretilen mikrotaşıyıcıların kuru haldeki ve PBS içerisinde 2 saat sonundaki görüntüleri.

Çizelge 4.4. Artan ipek konsantrasyonlarında mikrotaşıyıcıların PBS içerisindeki zamana bağlı şişme değerleri.

SF konsantrasyonları (%)	Zaman (dk)			Zaman (sa)		
	15	30	60	2	4	6
1,5	1,18 ± 0,04	1,20 ± 0,05	1,23 ± 0,03	1,25 ± 0,03	1,25 ± 0,04	1,25 ± 0,04
2,0	1,14 ± 0,02	1,16 ± 0,02	1,19 ± 0,02	1,21 ± 0,02	1,22 ± 0,03	1,22 ± 0,03
2,5	1,16 ± 0,03	1,18 ± 0,03	1,20 ± 0,02	1,22 ± 0,03	1,23 ± 0,02	1,23 ± 0,02
3,5	1,14 ± 0,00	1,17 ± 0,01	1,18 ± 0,01	1,18 ± 0,01	1,19 ± 0,01	1,19 ± 0,01
4,5	1,12 ± 0,02	1,13 ± 0,02	1,14 ± 0,02	1,15 ± 0,02	1,15 ± 0,02	1,15 ± 0,02
5,5	1,09 ± 0,02	1,10 ± 0,02	1,11 ± 0,03	1,12 ± 0,03	1,12 ± 0,03	1,12 ± 0,03
6,5	1,06 ± 0,01	1,07 ± 0,00	1,09 ± 0,01	1,10 ± 0,01	1,10 ± 0,01	1,10 ± 0,01

Çizelge 4.4'teki artan çap oranları su alımına bağlı olarak gerçekleştiğinden bu değerlerden mikrotaşıyıcıların su alım yüzdeleri hesaplanmış ve zamanla değişimleri Şekil 4.9'da gösterilmiştir.



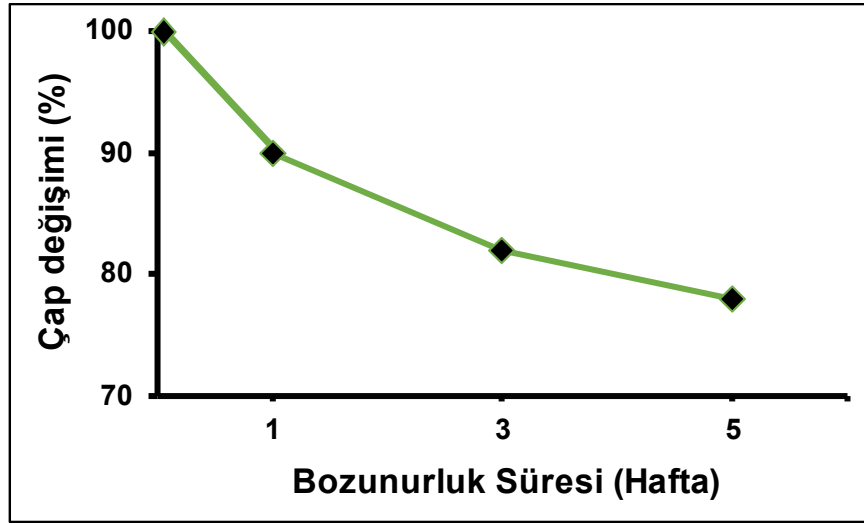
Şekil 4.9. Artan ipek konsantrasyonlarında mikrotaşıyıcıların su alım yüzdeleri.

Hücre ve materyal arasındaki etkileşimi etkileyen önemli parametrelerden biri, yüzeyin hidrofilik-hidrofobik dengesidir. Bu denge, mikrotaşıyıcıların yüzeyindeki adsorbe edilen proteinlerin konformasyonunu değiştirir ve mikrotaşıyıcılara hücre tutunmasını etkiler. Örneğin, güçlü bir hidrofilik yüzey, protein adsorpsiyonuna elverişli değildir. Benzer şekilde, güçlü bir hidrofobik yüzey, adezyon protein zincirinin doğal yapısını bozabilir. Sonuç olarak, orta dereceli hidrofilik yüzey, hücre tutunması ve büyümesi için uygundur [22].

Şekil 4.9'daki eğriler incelendiğinde mikrotaşyıcıların su alım kapasitesinin yaklaşık 1-2 saatte dengeye ulaştığı görülmektedir. Diğer yandan SF konsantrasyonunun artmasıyla su alım yüzdesi azalmıştır. Seçilen 2,5 SF grubunun ise %23 oranında su tuttuğu hesaplanmıştır.

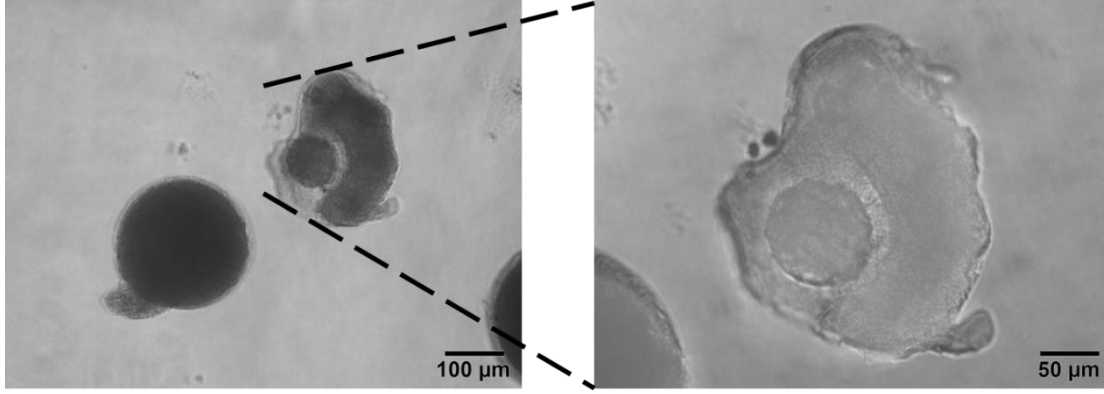
4.2.6. *İn-Vitro* Biyobozunurluk Sonuçları

SF mikrotaşyıcıların enzimatik ortamdaki bozunması, 5 hafta boyunca ışık mikroskopunda incelenmiştir. Bu süreçte çaptaki değişim yüzde olarak hesaplanmış, ilgili değerler Şekil 4.10'da gösterilmiştir.



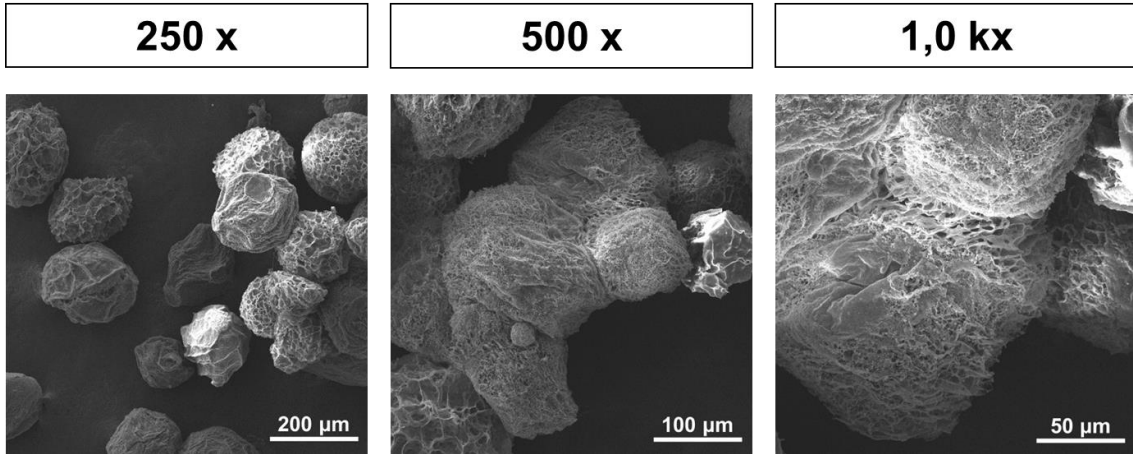
Şekil 4.10. 2,5 SF mikrotaşyıcıların *in-vitro* biyobozunurluk grafiği.

SF protein yapıda olup ve enzimatik bozunmaya uğrar ve vücut tarafından kolayca emilebilen aminoasitlere parçalanmaktadır. Kolajenaz, ipeğin β -tabaka kısımlarını etkilemektedir [69]. İpeğin bozunma hızı β -tabaka içeriği ayarlanarak kontrol edilebilmektedir. Artan β -tabaka konsantrasyonları malzeme ile doğrudan ilişkili olup, malzemelerin daha yavaş bozunmasına neden olmaktadır [87]. Şekil 4.11'de görüldüğü üzere, 5 haftanın sonunda 2,5 SF/M grubunun %22 oranında bozunmuştur.



Şekil 4.11. Kolajenaz ortamında 2,5 SF mikrotaşyıcının ışık mikroskobundaki 5. hafta görüntüsü.

Ayrıca enzimatik bozunma ortamındaki SF mikrotaşyıcılar SEM görüntüleri ile değerlendirilmiştir. İlgili bozunurluk görüntüleri Şekil 4.12’de gösterilmiştir.



Şekil 4.12. SF mikrotaşyıcı bozunurluğunun 5. haftadaki SEM görüntüleri.

SF mikrotaşyıcıların, 1U kolajenaz ortamında ve 5 haftanın sonunda çaplarının küçüldüğü ve yüzeylerinin deforme olduğu görülmektedir. Geliştirilen enjekte edilebilir mikrotaşyıcıların, uzun süreli rejenerasyonu destekleyebilecek uygun biyobozunurluk süresine sahip olduğu ileri sürülebilir.

4.3. *In-vitro* Hücre Kültürü Çalışmaları

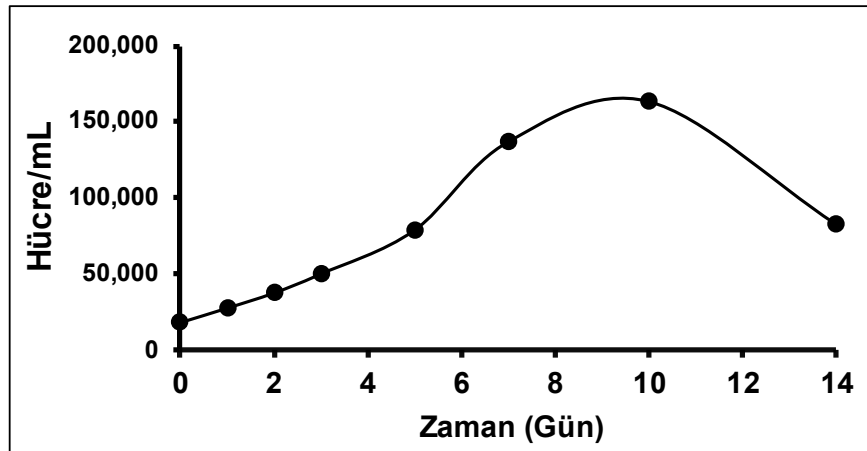
4.3.1. Schwann Hücrelerinin Karakterizasyonu

4.3.1.1. Hücre Büyüme Eğrisi

Hemositometrik sayım değerlerinden 1 mL'ye düşen hücre sayısı Eşitlik 4.2 ile hesaplanmıştır. Bu veriler kullanılarak çizilen hücre üreme eğrisinde, hücrelerin 3. günde üstel üreme fazına (logaritmik faz) geçtiği görülmektedir (Şekil 4.13).

$$\text{Hücre/mL} = \frac{\text{Sayım}}{8} \times 10^4 \times \text{Dilüsyon oranı} \times \text{Süspansiyon hacmi} \quad \text{Eşitlik 4.2.}$$

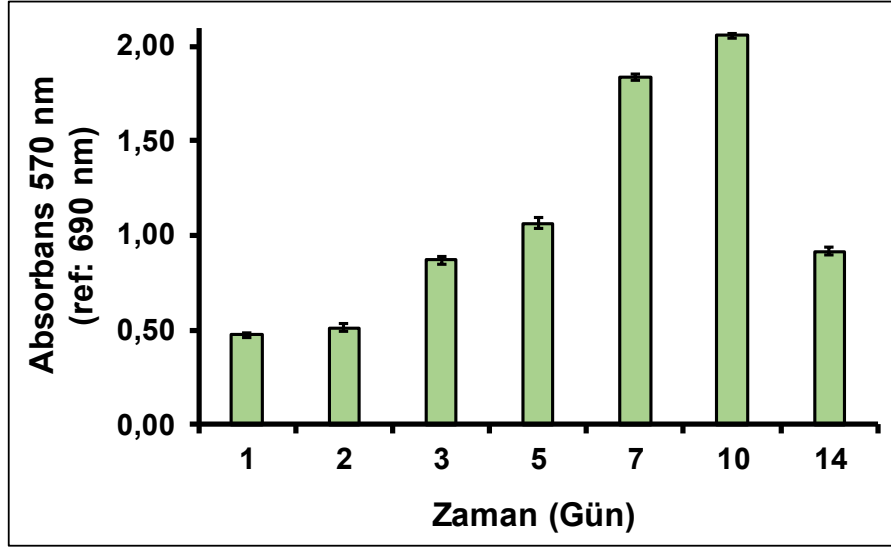
Şekil 4.13'teki grafikte doğrusallığa en yakın olan zaman aralığı olarak 24., 48. ve 72. saatler seçilmiştir. Bu saatlerdeki hücre sayısının doğal logaritması alınarak (ln) zamana karşı grafiği çizilmiş ve grafiğin eğiminden çoğalma hızının (özgül üreme hızı, μ) 0,0125 sa⁻¹ olduğu tespit edilmiştir (Ek-1). Hücre ikilenme süresi, $\ln 2/\mu$ formülü ile 55 saat olarak belirlenmiştir ($R^2=0,99$) [88].



Şekil 4.13. Schwann hücrelerinin hücre büyüme eğrisi (Başlangıç hücre yoğunluğu: 2×10^4 hücre/mL'dir).

4.3.1.2. Canlılık Analizi

MTT analizi; hücre canlılığı, proliferasyonu ve sitotoksitenin bir göstergesi olarak hücre metabolik aktiviteyi ölçmek için yapılır. Şekil 4.14'de Schwann hücrelerine ait 14 günlük MTT sonuçları verilmiştir.

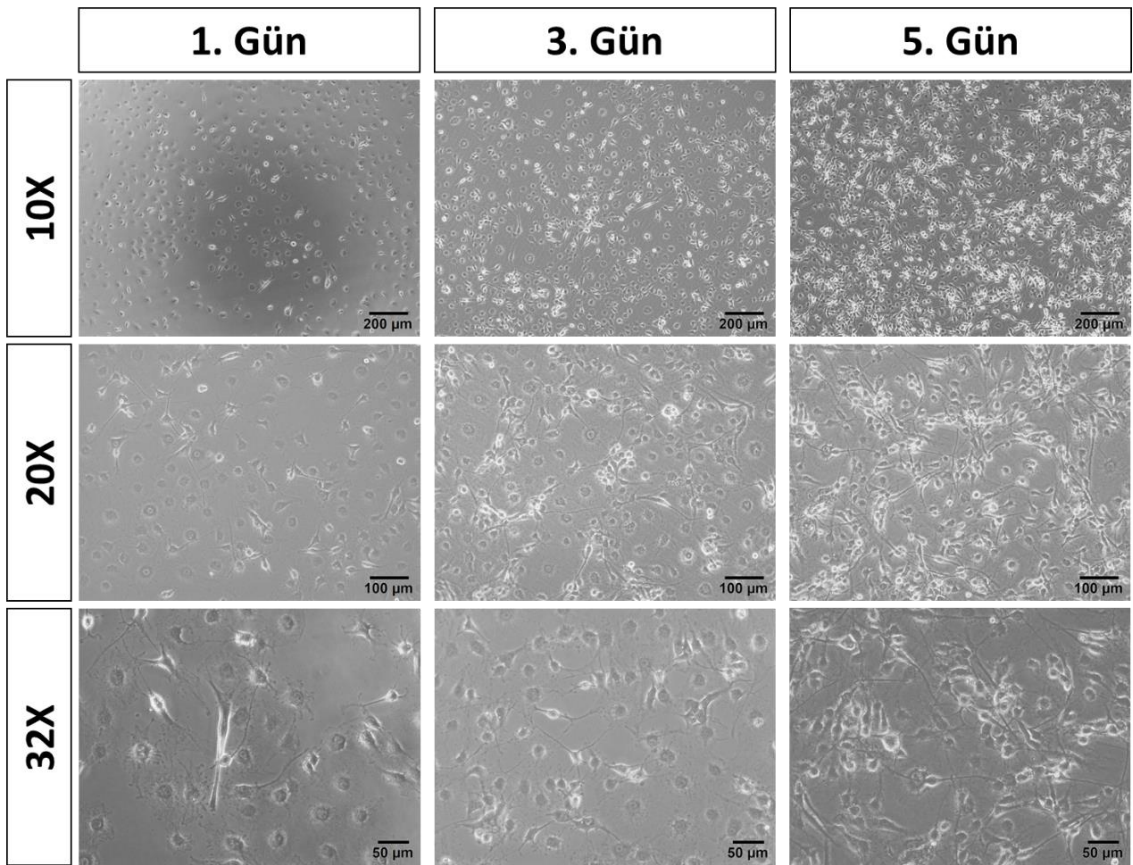


Şekil 4.14. Schwann hücrelerinin 14 günlük kültürasyonu süresince elde edilen absorbans değerleri (Başlangıç hücre yoğunluğu: 2×10^4 hücre/mL'dir).

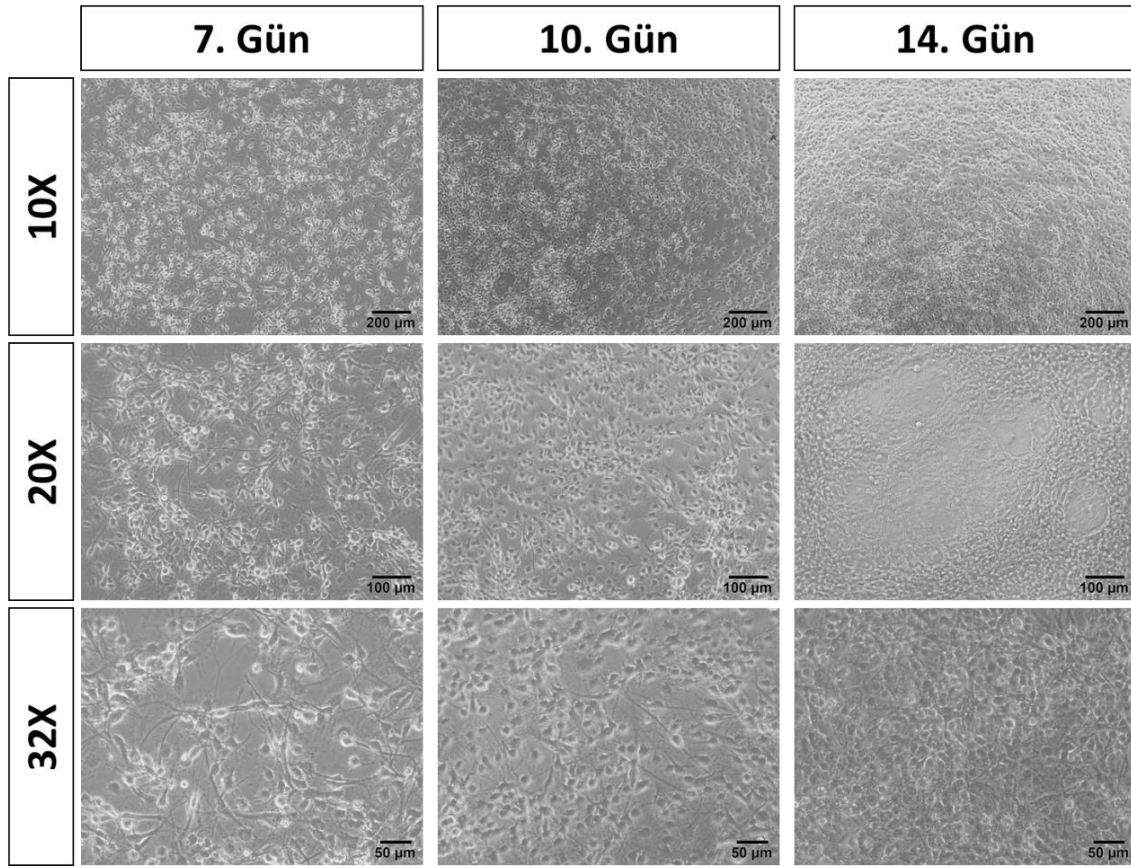
Şekil 4.14'deki grafikten anlaşıldığı üzere 10 günlük kültürasyon boyunca yükselen absorbans değerleri elde edilmiştir. Schwann hücreleri üstel üreme fazında, en yüksek metabolik aktiviteyi göstermiştir. Kültürün 14. günündeki azalan değer, kültür süresince ortam değişiminin yapılmaması sonucunda (kesikli kültür) hücrelerin ölüm fazına geçtiklerini göstermiştir. Kültürün 1., 3. ve 7. günlerindeki hücre sayısı ve ölçülen absorbans değerleri karşılaştırılmış ve doğrusal bir yönelim göstermiştir. İlgili kalibrasyon grafiği Ek-2'de sunulmuştur.

4.3.1.3. Schwann Hücrelerinin Morfolojik Özellikleri

Schwann hücrelerinin tutunduktan sonra sitoplazmalarını geniş bir alana yaydığı gözlemlenmiştir. Işık mikroskopunda hücrelerin oldukça uzun filopod yapılarına sahip olup, bu yapılar yardımıyla birbirleri ile temas kurdukları görülmüştür. Kültürün ilerleyen günlerinde hücrelerin yayılan sitoplazmalarını çekerek, filopod yapılarını iki uç noktada uzatma eğiliminde oldukları da gözlemlenmiştir (Şekil 4.15 ve 4.16).



Şekil 4.15. Schwann hücrelerinin kültürün 1., 3. ve 5. günlerine ait ışık mikroskobu görüntüleri.

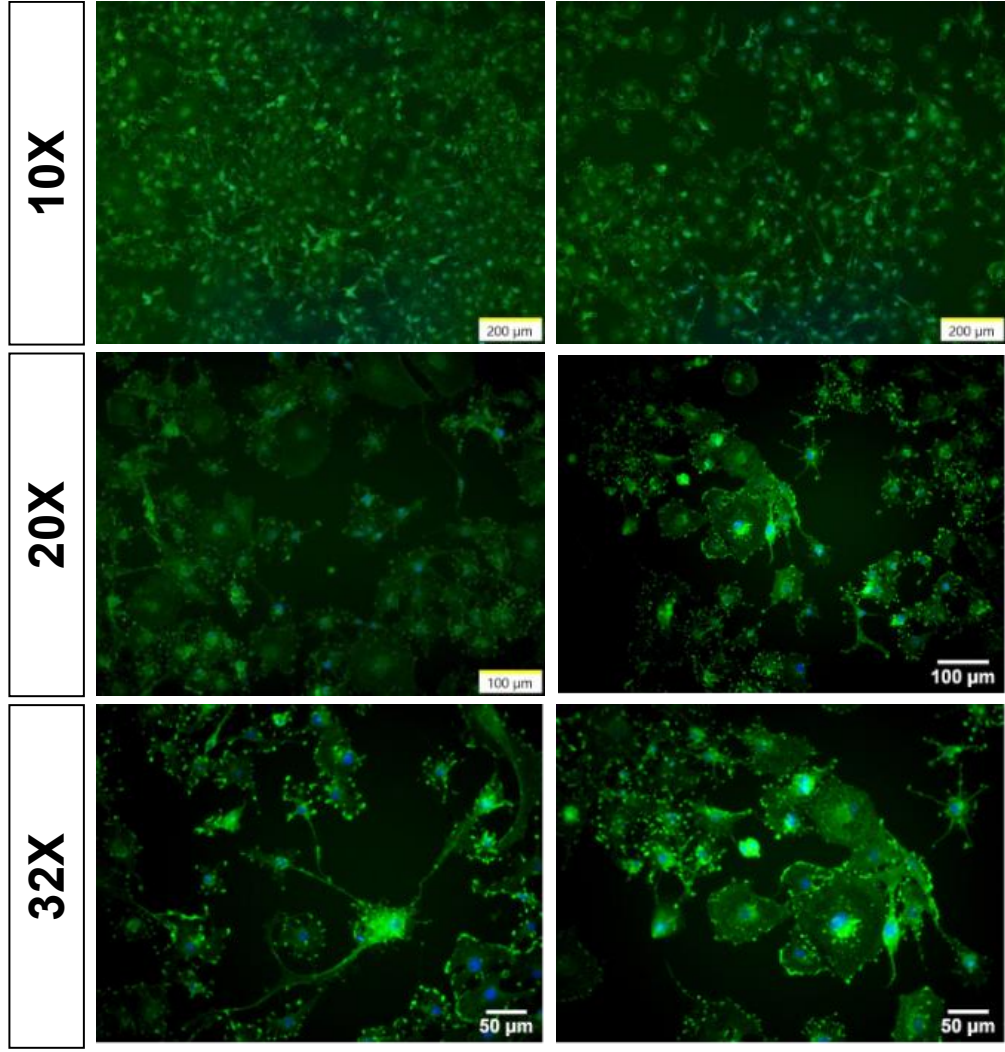


Şekil 4.16. Schwann hücrelerinin kültürün 7., 10. ve 14. günlerine ait ışık mikroskobu görüntüleri.

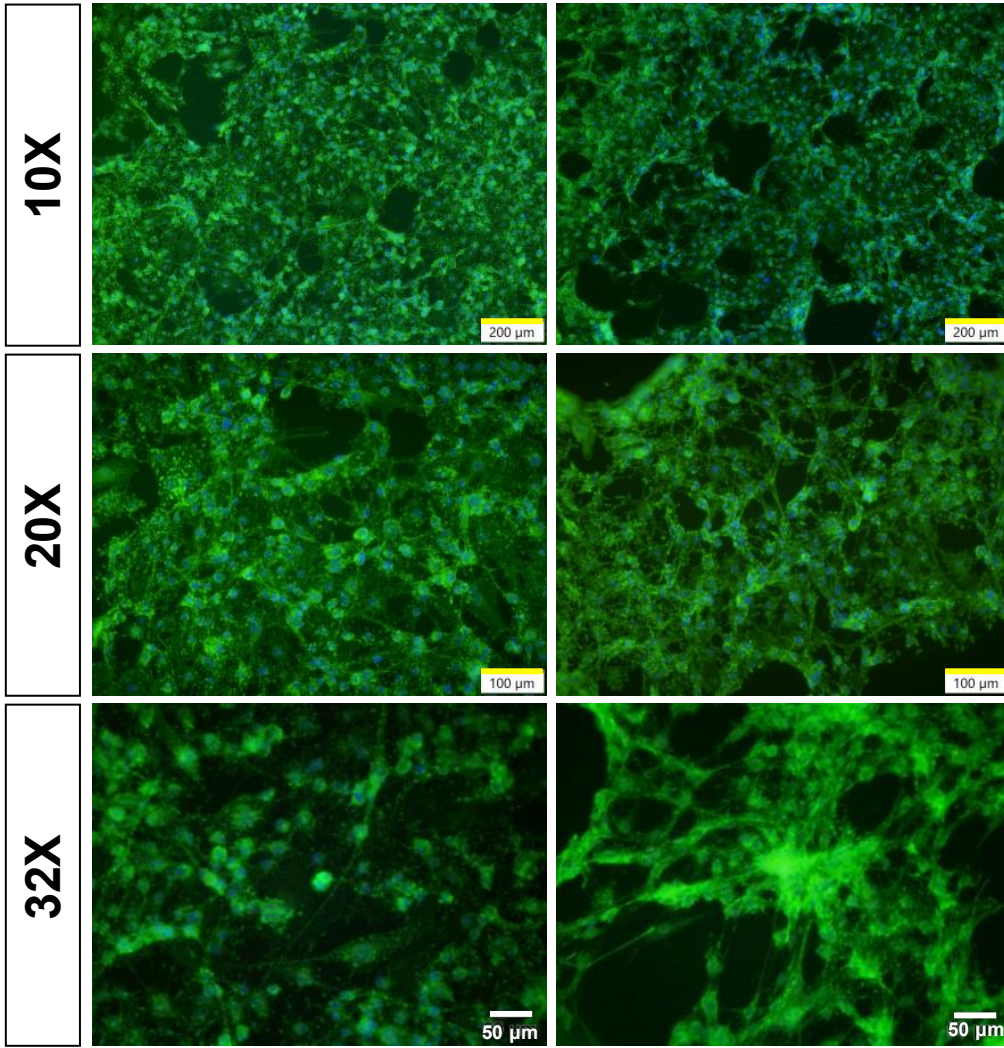
Floresan Görüntüleme

Işık mikroskobu ile incelenen Schwann hücrelerinin, Alexa Fluor® 488 Phalloidin/DAPI ve kristal viyole boyama ile morfolojik karakterizasyonu tamamlanmıştır. Şekil 4.17'de kültürün 1. günündeki, Şekil 4.18'de ise kültürün 7. günündeki floresan boyama görüntüleri verilmiştir.

Schwann hücrelerinin 1. ve 7. günündeki morfolojik görüntülerinin literatüre uygun şekilde olduğu, ilerleyen kültür sürecinde iğsi hücre morfolojisi gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca 7. güne ait floresan mikroskop görüntüleri dikkatle incelendiğinde, hücrelerin birbirleri üzerinde katman oluşturarak yayılmaya devam ettiği gözlemlenmiştir.



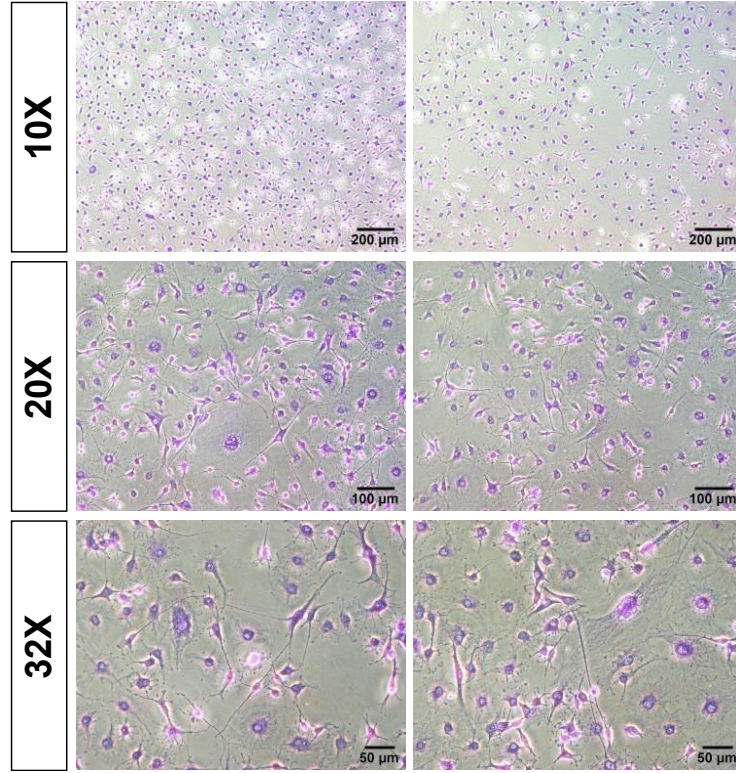
Şekil 4.17. Schwann hücrelerinin Alexa Fluor® 488 Phalloidin (hücre iskeleti)/DAPI (çekirdek) boyamasına ait 1. gün görüntüleri (Hücre iskeleti yeşil; hücre çekirdeği mavi ile boyanmıştır).



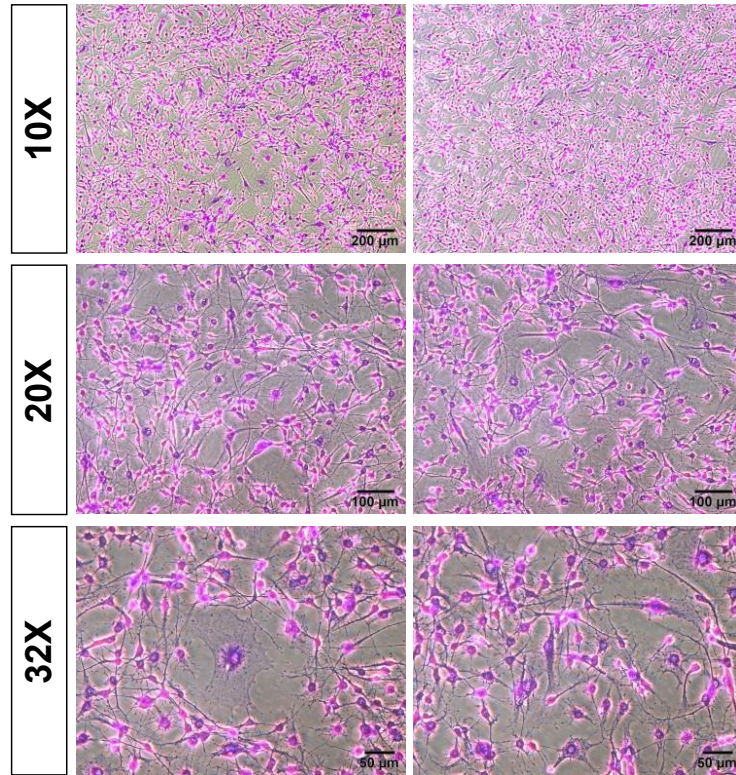
Şekil 4.18. Schwann hücrelerinin Alexa Fluor® 488 Phalloidin (hücre iskeleti)/DAPI (çekirdek) boyamasına ait 7. gün görüntüleri (Hücre iskeleti yeşil; hücre çekirdeği mavi ile boyanmıştır).

Kristal Viyole Boyama

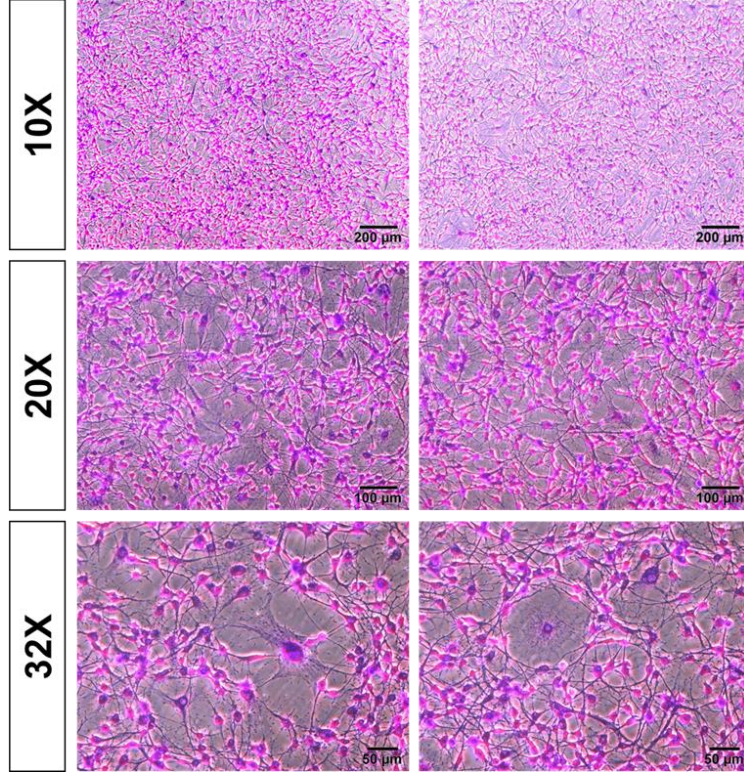
Kristal viyole boyaması ile hücrelerin canlılığı hakkında değerlendirme yapılması sağlanmıştır. Şekil 4.19-4.21'de Schwann hücrelerinin kristal viyole görüntüleri bulunmaktadır.



Şekil 4.19. Schwann hücrelerinin kristal viyole boyaması 1. gün görüntüleri.



Şekil 4.20. Schwann hücrelerinin kristal viyole boyaması 5. gün görüntüleri.



Şekil 4.21. Schwann hücrelerinin kristal viyole boyaması 7. gün görüntüleri.

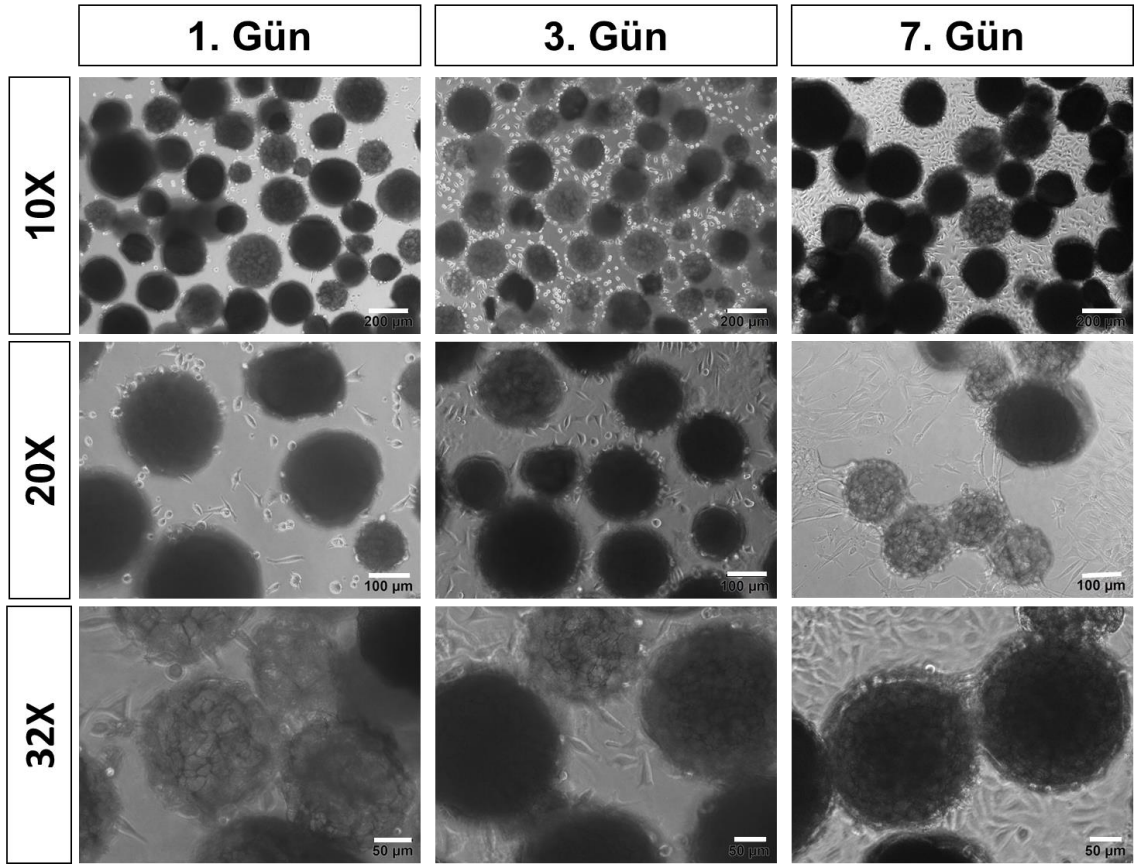
Floresan boyama görüntüleri ve kristal viyole boyamaları birbirini destekler nitelikte olup, hücrelerin içi morfolojide olduğu tespit edilmiştir.

4.3.2. Mikrotarıyıcı-destekli Statik Hücre Kültürü

4.3.2.1. L929 Hücre Kültürü

Hücre Ekimi

İpek mikrotarıyıcı-hücre etkileşimleri 7 gün boyunca ters ışık mikroskobu ile incelenmiştir (Şekil 4.22). L929 fare fibroblastları ekim anından itibaren mikrotarıyıcı yüzeylerine yöneldiği gözlemlenmiştir. Kültür kuyucuğu non-treated olmasına rağmen kuyucuk üzerinde de hücrelerin çoğalmaları devam etmiştir. Yedinci güne gelindiğinde, kuyucuk yüzeyinde çoğalan hücrelerin mikrotarıyıcı yüzeyindeki hücreler ile etkileşime girdiği görülmektedir.

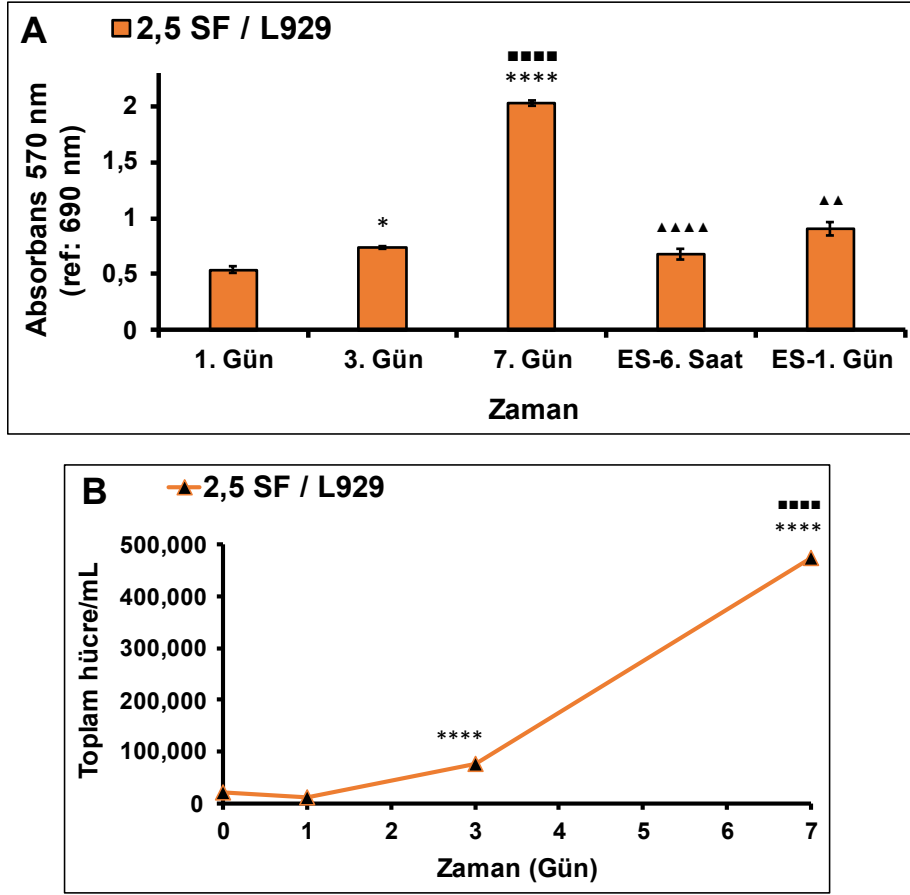


Şekil 4.22. 2,5 SF mikrot taşıyıcılar üzerinde çoğalan L929 fibroblastların 1., 3. ve 7. günde mikroskop görüntüleri.

MTT Analizi

İpek fibroin mikrot taşıyıcılar ile kültüre edilen L929 fibroblastlarının canlılığı MTT analizi ile tespit edilmiştir (Şekil 4.23-A). 2,5 SF yüzeylerine etkili bir şekilde tutunan fibroblastlardan 1. günde $0,54 \pm 0,03$, çoğaldıkları 3. günde $0,74 \pm 0,01$ ($*p < 0,05$) ve 7. günde $2,03 \pm 0,02$ ($***p < 0,0001$, $■■■■p < 0,0001$) absorbans değeri ölçülmüştür.

TCPS yüzeylerinden elde edilen absorbans değerleri Ek-2'de sunulmuştur. Bu değerler, daha önce grubumuzdan Karakeçili tarafından gerçekleştirilen L929 fibroblastlarının karakterizasyon çalışması ile karşılaştırılmıştır [88]. Tez çalışması kapsamında elde edilen değerler birbiriyle uyumaktadır.



Şekil 4.23. (A) İpek mikrot taşıyıcılar/L929 fibroblastların 7 günlük kültürasyonu boyunca elde edilen absorbans değerleri (B) İpek mikrot taşıyıcılar yüzeylerinden tripsinizasyon ile kaldırılan toplam L929 hücre sayısı (İstatistiksel anlamlı farklılıklar $n=3$, $*p<0,05$, $****p<0,0001$ mikrot taşıyıcı yüzeylerinde çoğalan hücrelerin 1. gün canlılık değeri kontrol olarak kabul edildiğinde, $****p<0,0001$ 3. gün kontrol olarak kabul edildiğinde ve $\blacktriangle\blacktriangle p<0,01$, $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle p<0,0001$ 7. gün kontrol olarak kabul edildiğindeki durum) (Başlangıç hücre yoğunluğu: 2×10^4 hücre/mL'dir).

Enjekte Edilebilirlik

Mikrot taşıyıcı yüzeylerinde çoğalan L929 fibroblastların enjeksiyon sonrasında da canlılıklarını koruduğu MTT analizi ile doğrulanmıştır (Şekil 4.23-A). L929 fibroblastları mikrot taşıyıcı yüzeylerinde enjekte edildikten 6 saat sonra absorbans değerleri anlamlı seviyede düşmüştü ($0,68 \pm 0,05$, $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle p<0,0001$) ancak ertesi gün artmıştır ($0,91 \pm 0,06$, $\blacktriangle\blacktriangle p<0,01$).

Yedinci gün ve enjeksiyon sonrası 1. gün absorbans değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmasına rağmen ($\Delta\Delta p < 0,01$) mikrotaşyıcı yüzeylerindeki hücre canlılığı yüksek değerdedir. Bu sonuç ile enjeksiyonun hücre canlılığını kısmen azalttığı ve mikrotaşyıcı yüzeylerinde L929 fibroblastların çoğalmaya devam ettiği anlaşılmıştır.

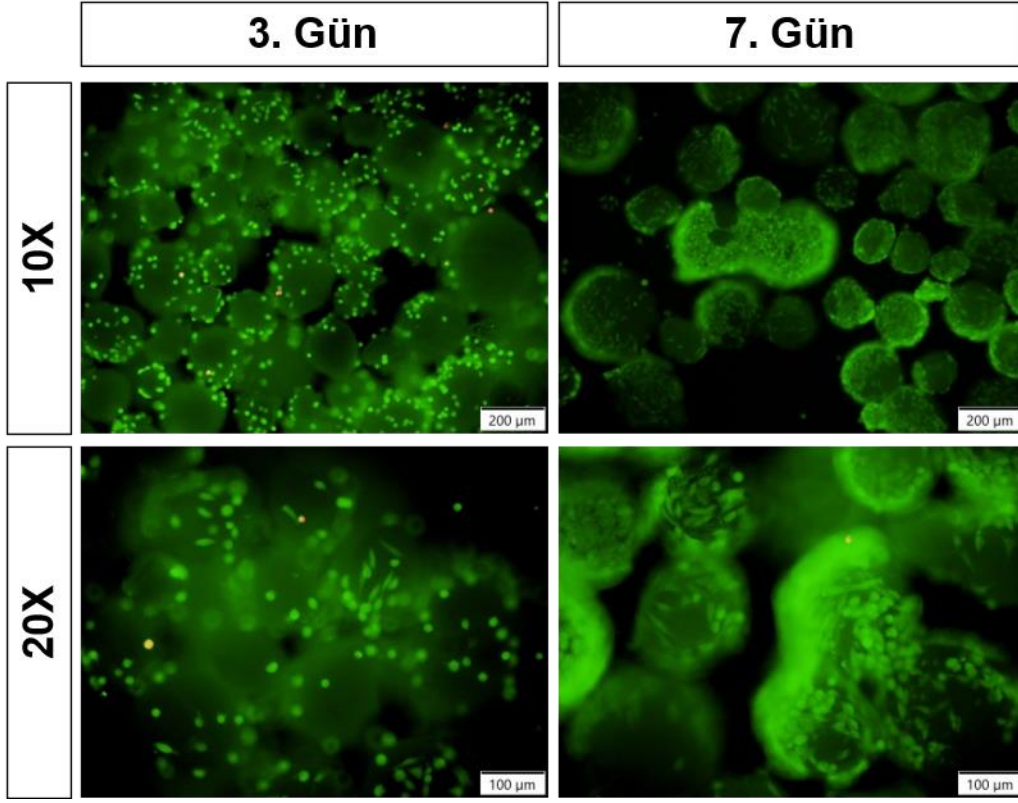
Hücre Sayımı

2,5 SF yüzeylerine 2×10^4 hücre/mL ekilmesi göz önünde bulundurulduğunda, bu hücrelerin yaklaşık yarısı tutunmuş ve 1. günde toplam $1,1 \times 10^4 \pm 0,5$ hücre/mL sayılmıştır. Üçüncü günde ise toplam $7,5 \times 10^4 \pm 0,0$ hücre/mL ($****p < 0,0001$) ve 7. gün toplam $47,5 \times 10^4 \pm 1,5$ hücre/mL ($****p < 0,0001$, $■■■■p < 0,0001$) sayılmıştır (Şekil 4.23-B). L929 fibroblastların ikilenme süresi 32 saattir [88]. Bu ikilenme süresine göre elde edilen hücre sayıları da uyuşmaktadır. Tripsinizasyon işlemi hücre canlılığında anlamlı bir azalma meydana getirmemiştir.

Kültürün 1., 3. ve 7. günlerindeki 2,5 SF yüzeylerinden elde edilen hücre sayısı, ölçülen absorbans değerleri karşılaştırılmış ve doğrusal bir yönelim göstermiştir ($R^2=1$). İlgili kalibrasyon grafiği Ek-3'te sunulmuştur.

Canlı/Ölü Hücrelerin Görüntülenmesi

İpek mikrotaşyıcı yüzeylerinde çoğalan L929 fibroblastları kültürün 3. ve 7. gününde canlı/ölü hücre boyaması ile incelenmiştir (Şekil 4.24). Boyama bileşenlerinden EthD-1, canlı hücre membranından geçemez. Ancak ölü hücre membranından geçerek DNA'ya bağlanır ve ölü hücrelerin kırmızı floresan ile görüntülenmesini sağlar. Calcein AM ise hücre membranından geçebilen floresan olmayan bir bileşiktir. Sitozoldeki esterozlar tarafından asetometoksi 85 grubu parçalanmasıyla yeşil floresan ışımaya yapan kalseine dönüşür. Böylece ipek fibroin mikrotaşyıcı yüzeylerindeki canlı hücreler Calcein AM boyası ile yeşile, ölü hücreler EthD-1 boyası ile kırmızıya boyanmıştır.

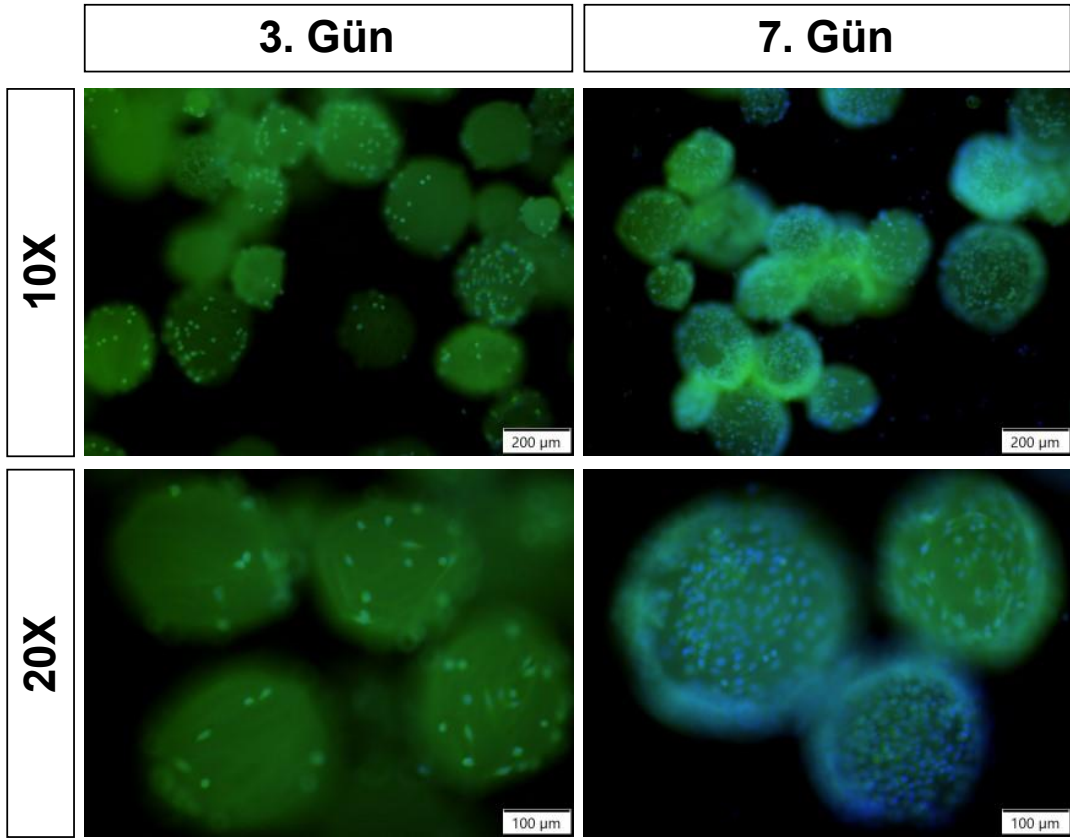


Şekil 4.24. 2,5 SF mikrotayııcı yüzeylerindeki L929 fibroblastların 3. ve 7. gün canlı/ölü hücre boyama görüntüleri (Canlı hücreler yeşile, ölü hücreler kırmızıya boyanmıştır).

Şekil 4.24'te çok az ölü hücreye (Eth-1, kırmızı) rastlanmış, hücre canlılığının (Calcein-AM, yeşil) oldukça yüksek olduğu görülmüştür.

Hücre İskeleti/Çekirdek Boyaması

İpek mikrotayııcı yüzeylerinde yayılan ve çoğalan L929 hücre iskeleti Alexa Fluor® 488 Phalloidin ile yeşile, hücre çekirdeği ise DAPI ile mavi boyanmıştır. Şekil 4.25'te kültürün 3. ve 7. gününde yapılan floresan boyama görüntüleri verilmiştir.

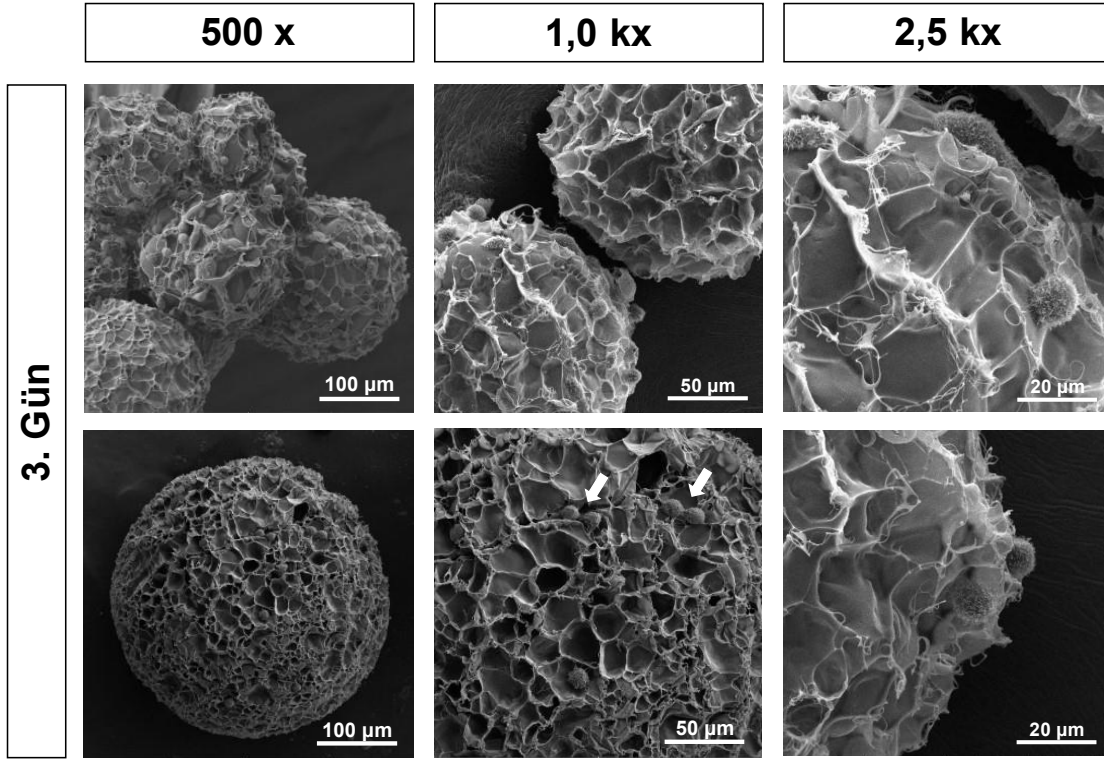


Şekil 4.25. 2,5 SF yüzeylerinde çoğalan L929 fibroblastların 3. ve 7. gün Alexa Fluor® Phalloidin/DAPI boyama görüntüleri (Hücre iskeleti yeşil; hücre çekirdeği mavi ile boyanmıştır).

Canlı/ölü hücre ve hücre iskeleti/çekirdek boyaması ile yapılan morfolojik incelemede, özellikle 7. günde yoğun bir şekilde çoğalan L929 fibroblastları dikkat çekmektedir.

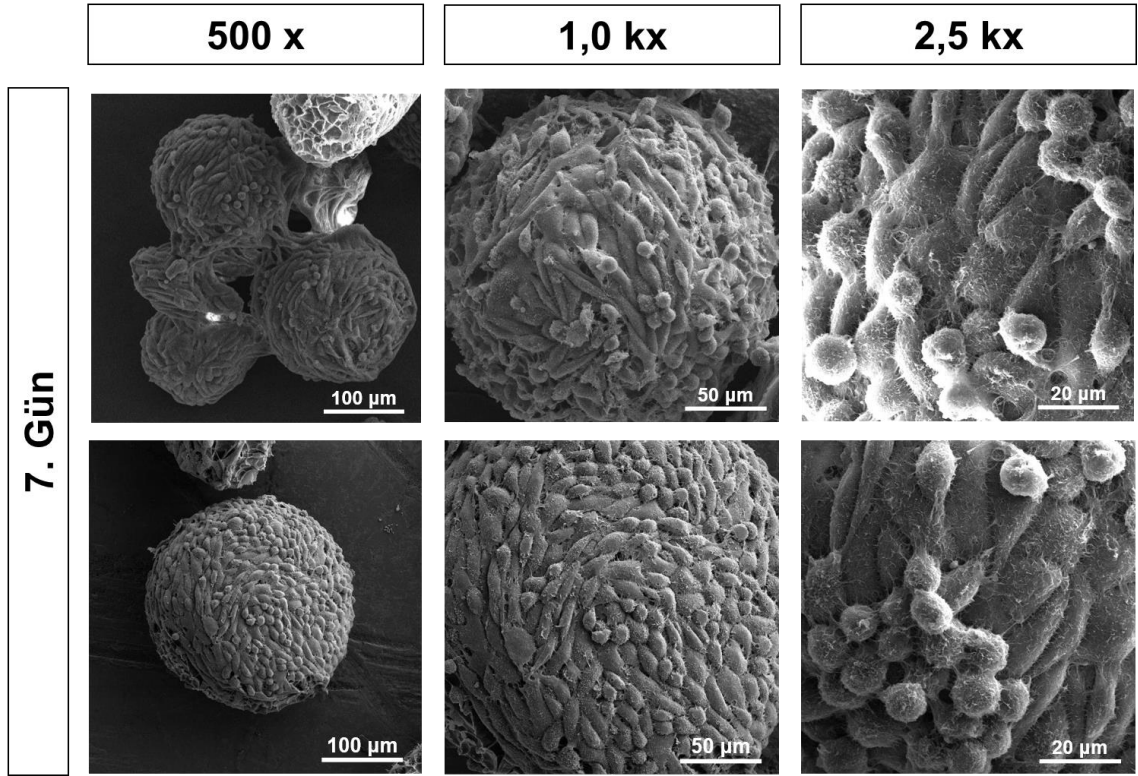
SEM Analizi

İpek mikrotarıyıcı ve L929 fibroblastların etkileşimi SEM ile incelenmiş ve görüntüleri Şekil 4.26-4.27'de verilmiştir.



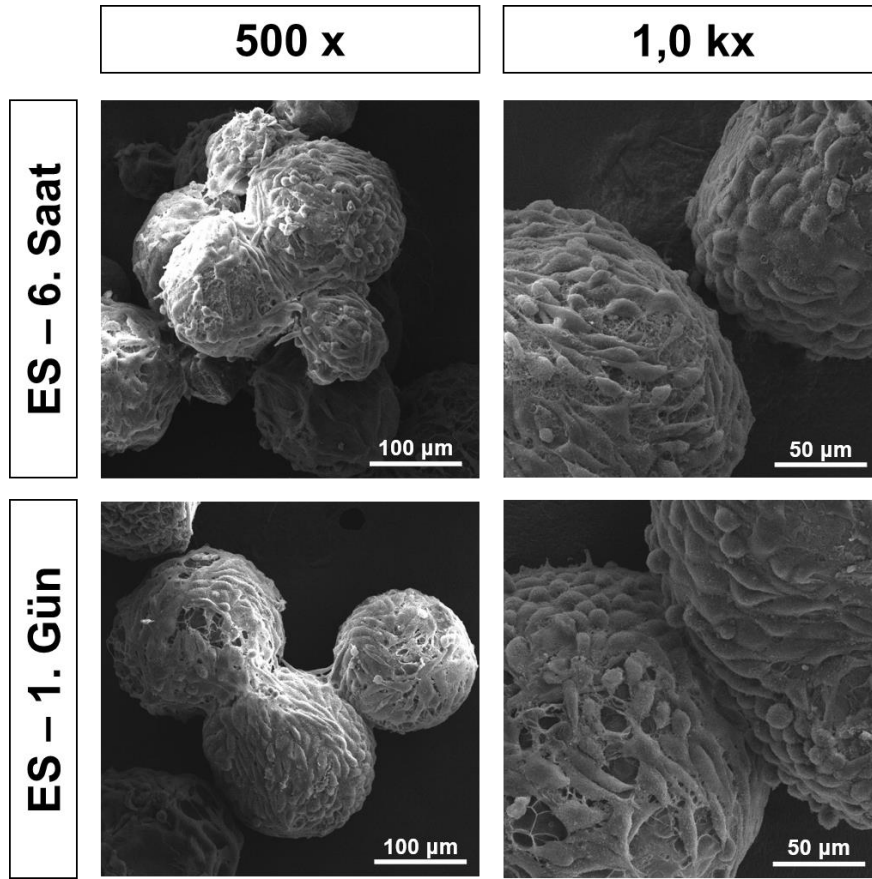
Şekil 4.26. 2,5 SF mikrotarıyıcı yüzeylerinde yayılmaya başlayan L929 fibroblastların 3. gün SEM görüntüleri.

Üçüncü gün SEM görüntüleri incelendiğinde, mikrotarıyıcı yüzeyine tutunan ve yayılan L929 fibroblastları görülmektedir. Hücreler, ipek mikrotarıyıcının gözeneklerine tutunup çoğalabilmektedir. Şekil 4.26'da bölünen fibroblastlar beyaz ok ile gösterilmiştir. Hücrelerin yerleşebileceği uygun gözenek boyutu, tutunma davranışını olumlu etkilemiştir.



Şekil 4.27. 2,5 SF mikrotasıyıcı yüzeylerinde çoğalan L929 fibroblastların 7. gün SEM görüntüleri.

Yedinci günde ise 2,5 SF yüzeylerini çoğalarak tamamen kaplayan L929 fibroblastları görülmektedir. Hücre yığınları mikrotasıyıcıların da birbirine yapışmasına sebep olmuştur. Oluşturulan güçlü etkileşim kantitatif ve morfolojik olarak doğrulanmıştır. Ayrıca jelatin bazlı mikrotasıyıcı yüzeylerinin de L929 fibroblastları ile kaplandığı bildirilmiştir [72]. Burada hücrelerin mikrotasıyıcı yüzeyini tek tabaka olacak şekilde kapladığı görülmektedir. Ancak sunulan tez çalışmasında 2,5 SF yüzeylerindeki hücreler, tabakalar oluşturmuştur. Böyle bir hücre/mikrotasıyıcı etkileşimini içeren başka bir çalışmaya literatürde rastlanılmamıştır.



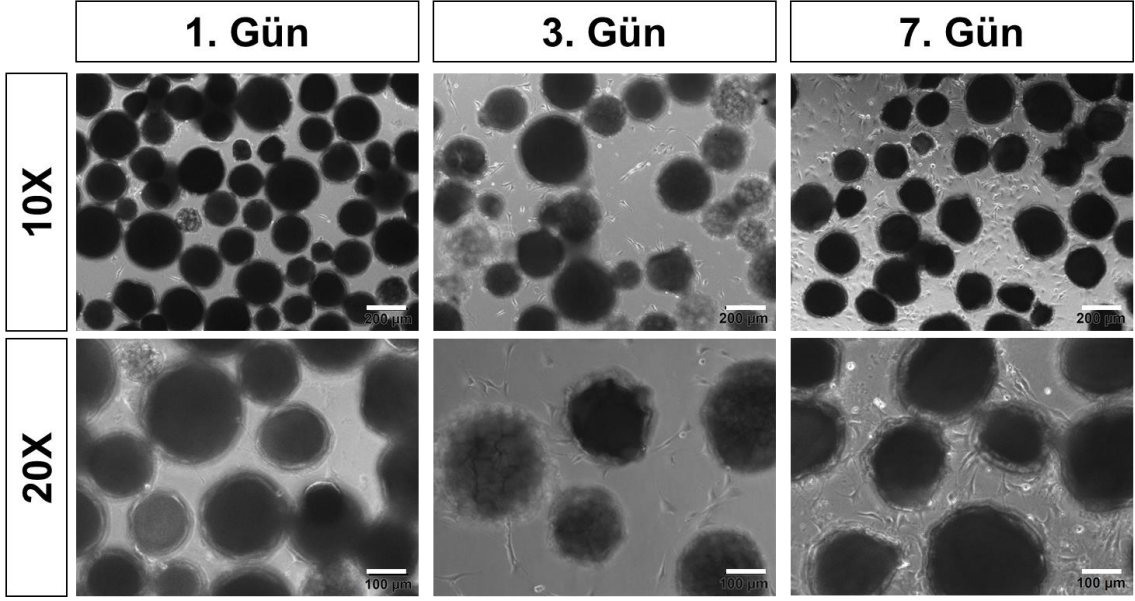
Şekil 4.28. İpek mikrot taşıyıcılar/L929 fibroblastların enjeksiyon sonrası 6. saat ve 1. gün SEM görüntüleri.

Enjeksiyonun ipek mikrot taşıyıcı ve L929 fibroblastlarına bir zarar vermediği görülmektedir (Şekil 4.28). Altıncı saat ve birinci gün SEM görüntüleri incelendiğinde, mikrot taşıyıcı yüzeylerinde hücrelerin korunduğu ve canlılığın devam ettiği anlaşılmaktadır.

4.3.2.2. MC3T3-E1 Hücre Kültürü

Hücre Ekimi

Bölüm 3.5.2.1’de açıklandığı gibi ipek mikrot taşıyıcılara MC3T3-E1 pre-osteoblastları ekilmiştir. Mikrot taşıyıcı/hücre etkileşimleri 7 gün boyunca ters ışık mikroskobu ile incelenmiştir (Şekil 4.29).

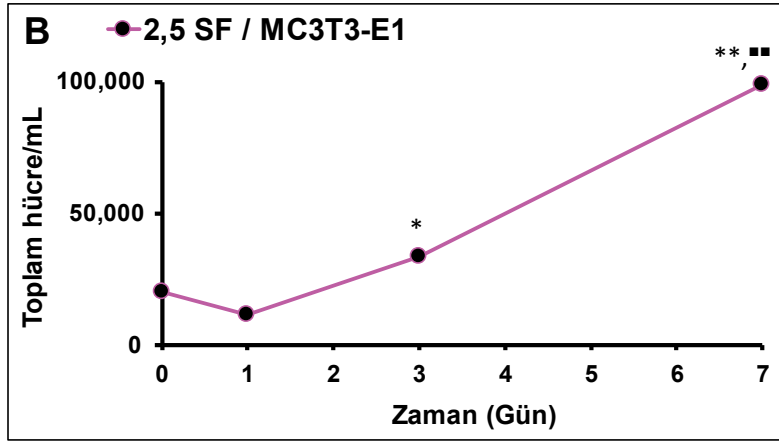
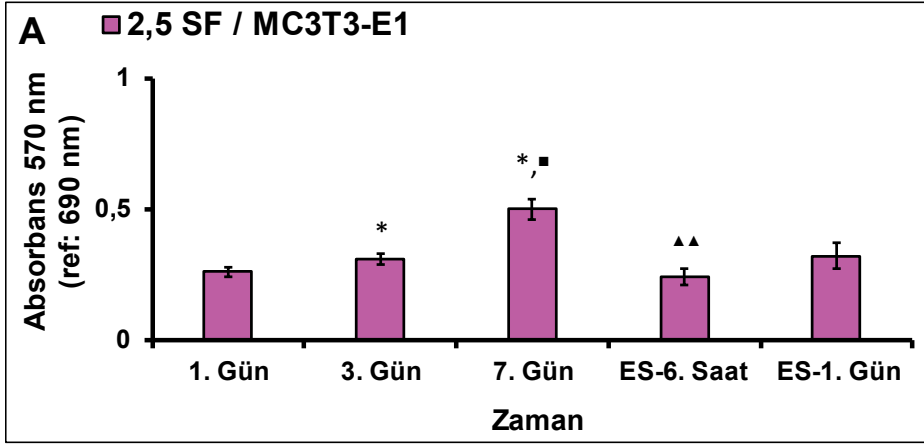


Şekil 4.29. 2,5 SF mikrot taşıyıcılar üzerine tutunan ve çoğalan MC3T3-E1 pre-osteoblastların 1., 3. ve 7. gündeki mikroskop görüntüleri.

MTT Analizi

İpek fibroin mikrot taşıyıcılar ile kültüre edilen MC3T3-E1 pre-osteoblastlarının canlılığı MTT analizi ile tespit edilmiştir (Şekil 4.30-A). Osteoblastlar; mikrot taşıyıcı yüzeyine tutunduğu 1. günde $0,26 \pm 0,02$, çoğaldıkları 3. günde $0,31 \pm 0,02$ ($*p < 0,05$) ve 7. günde $0,5 \pm 0,04$ ($*p < 0,05$, $\blacksquare p < 0,05$) absorbands değerinde ölçülmüştür. Özellikle 7. gündeki absorbands değeri L929 fibroblastlarına göre daha düşüktür ($\bullet\bullet\bullet p < 0,0001$).

TCPS yüzeylerinden elde edilen absorbands değerleri Ek-2'de sunulmuştur. Bu değerler, daha önce grubumuzdan Aday tarafından gerçekleştirilen MC3T3-E1 karakterizasyon çalışması ile karşılaştırılmıştır [89]. Tez çalışması kapsamında elde edilen değerler birbiriyle uyumaktadır.



Şekil 4.30. (A) İpek mikrotarıyıcılar/MC3T3-E1 pre-osteoblastların 7 günlük kültürasyonu boyunca elde edilen absorbans değerleri (B) İpek mikrotarıyıcılar yüzeylerinden tripsinizasyon ile kaldırılan toplam L929 hücre sayısı (İstatistiksel anlamlı farklılıklar $n=3$, $*p<0,05$, $**p<0,01$ mikrotarıyıcı yüzeylerinde çoğalan hücrelerin 1. gün canlılık değeri kontrol olarak kabul edildiğinde, ■ $p<0,05$, ■■ $p<0,01$ 3. gün kontrol olarak kabul edildiğinde ve ▲▲ $p<0,01$ 7. gün kontrol olarak kabul edildiğindeki durum) (Başlangıç hücre yoğunluğu: 2×10^4 hücre/mL'dir).

Enjekte Edilebilirlik

Mikrotarıyıcı yüzeylerinde çoğalan MC3T3-E1 pre-osteoblastların enjeksiyon sonrasında da canlılıklarını koruduğu MTT analizi ile doğrulanmıştır (Şekil 4.30-A). Osteoblastların mikrotarıyıcı yüzeylerinde enjekte edildikten 6 saat sonra absorbans değerleri anlamlı seviyede düşmüş ($0,24 \pm 0,03$, ▲▲ $p<0,01$) ve ertesi gün artmıştır ($0,32 \pm 0,05$).

Yedinci gün ve enjeksiyon sonrası 1. gün absorbans değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

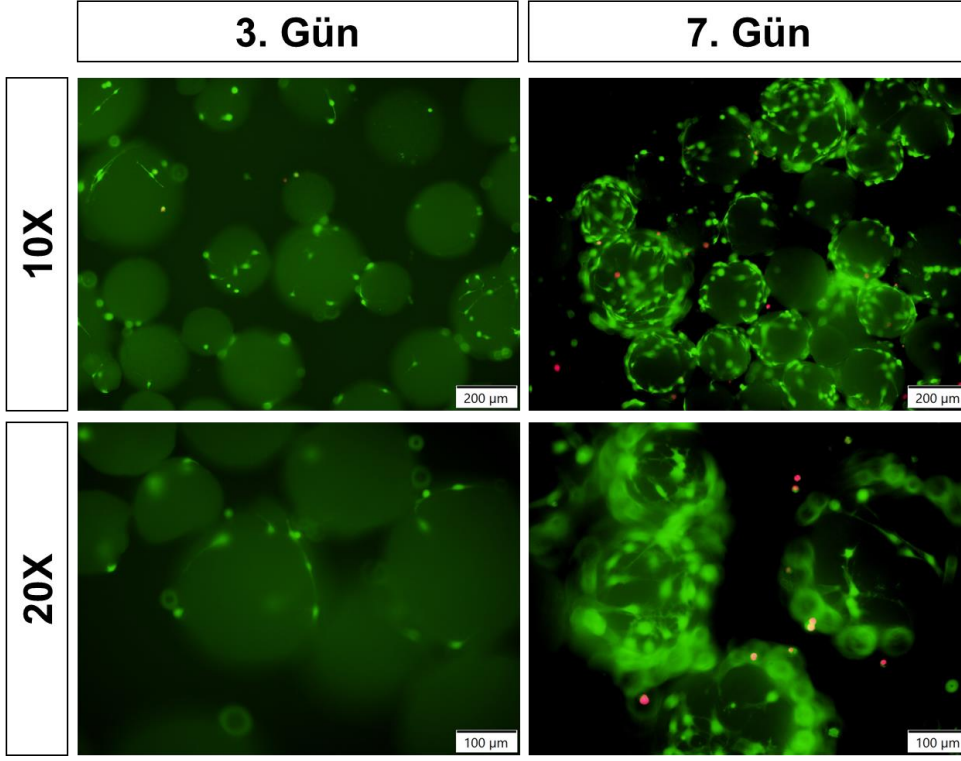
Hücre Sayımı

2,5 SF yüzeylerine 2×10^4 hücre/mL ekilmesi göz önünde bulundurulduğunda, bu hücrelerin de yaklaşık yarısı tutunmuş ve 1. günde toplam $1,2 \times 10^4 \pm 1,2$ hücre/mL sayılmıştır. Üçüncü günde ise toplam $3,4 \times 10^4 \pm 1,5$ hücre/mL ($*p < 0,05$) ve 7. gün toplam $9,9 \times 10^4 \pm 1,2$ hücre/mL ($**p < 0,01$, $\blacksquare p < 0,01$) sayılmıştır (Şekil 4.30-B). MC3T3-E1 osteoblastlarının ikilenme süresi 36 saattir [86]. Bu ikilenme süresine göre elde edilen hücre sayıları daha düşüktür. Tripsinizasyon işlemi hücre canlılığında anlamlı bir azalma meydana getirmemiştir.

Kültürün 1., 3. ve 7. günlerindeki 2,5 SF yüzeylerinden elde edilen hücre sayısı, ölçülen absorbans değerleri karşılaştırılmış ve doğrusal bir yönelim göstermiştir ($R^2=0,99$). İlgili kalibrasyon grafiği Ek-3'te sunulmuştur.

Canlı/Ölü Hücrelerin Görüntülenmesi

İpek mikrotayıcı yüzeylerinde çoğalan MC3T3-E1 pre-osteoblastları kültürün 3. ve 7. gününde canlı/ölü hücre boyaması ile incelenmiştir. Şekil 4.31'de çok az ölü hücreye (Eth-1, kırmızı) rastlanmış, hücre canlılığının (Calcein-AM, yeşil) oldukça yüksek olduğu görülmüştür.

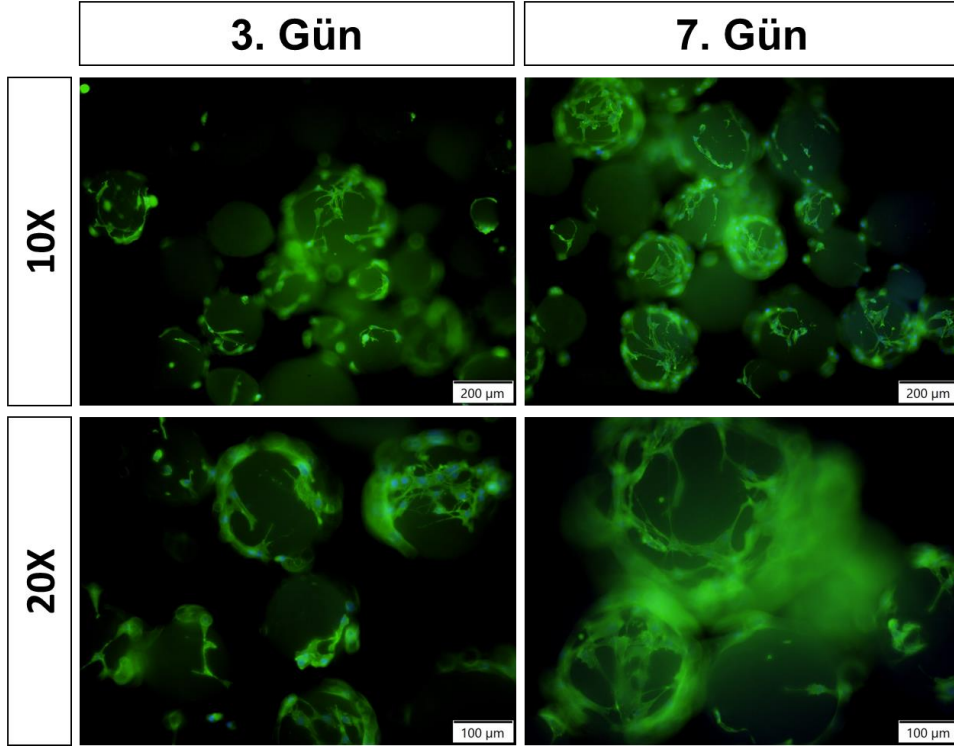


Şekil 4.31. 2,5 SF mikrotayııcı yüzeylerindeki MC3T3-E1 pre-osteoblastların 3. ve 7. gün canlı/ölü hücre boyama görüntüleri (Canlı hücreler yeşile, ölü hücreler kırmızıya boyanmıştır).

Canlı/ölü hücre boyama görüntüsünde 3. günden 7. güne artan canlı hücre miktarı net bir şekilde ayırt edilmektedir.

Hücre İskeleti/Çekirdek Boyaması

İpek mikrotayııcı yüzeylerinde yayılan ve çoğalan MC3T3-E1 hücre iskeleti Alexa Fluor® 488 Phalloidin ile yeşile, hücre çekirdeği ise DAPI ile mavi boyanmıştır. Şekil 4.32'de kültürün 3. ve 7. gününde yapılan floresan boyama görüntüleri verilmiştir.

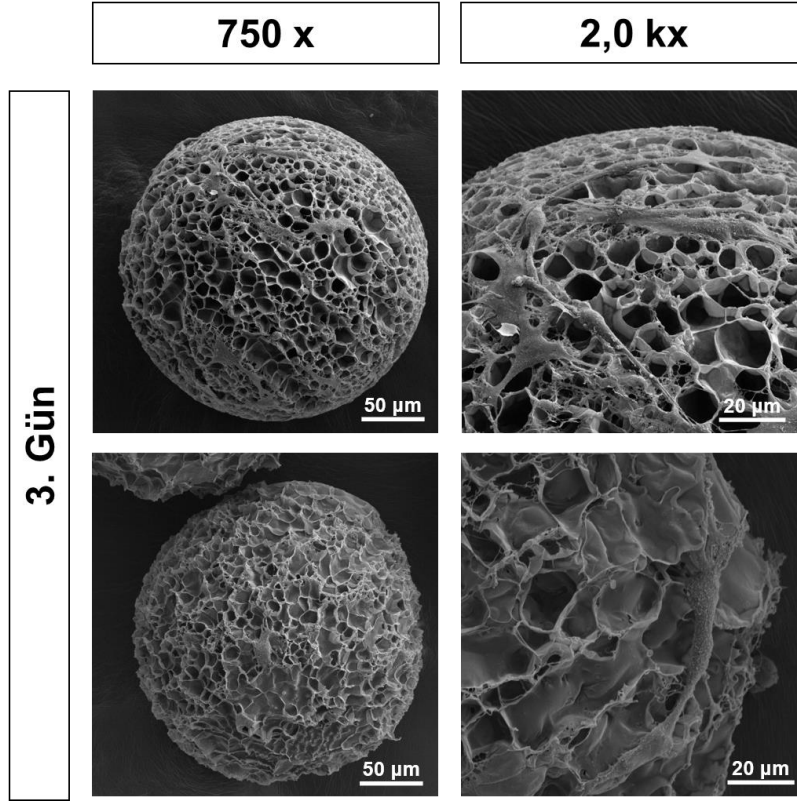


Şekil 4.32. 2,5 SF yüzeylerinde çoğalan MC3T3-E1 pre-osteoblastların 3. ve 7. gün Alexa Fluor® Phalloidin/DAPI boyama görüntüleri (Hücre iskeleti yeşil; hücre çekirdeği mavi ile boyanmıştır).

SEM Analizi

İpek mikrotarıyıcı ve MC3T3-E1 pre-osteoblastlarının etkileşimi SEM ile incelenmiş ve görüntüler Şekil 4.33-4.34'te verilmiştir.

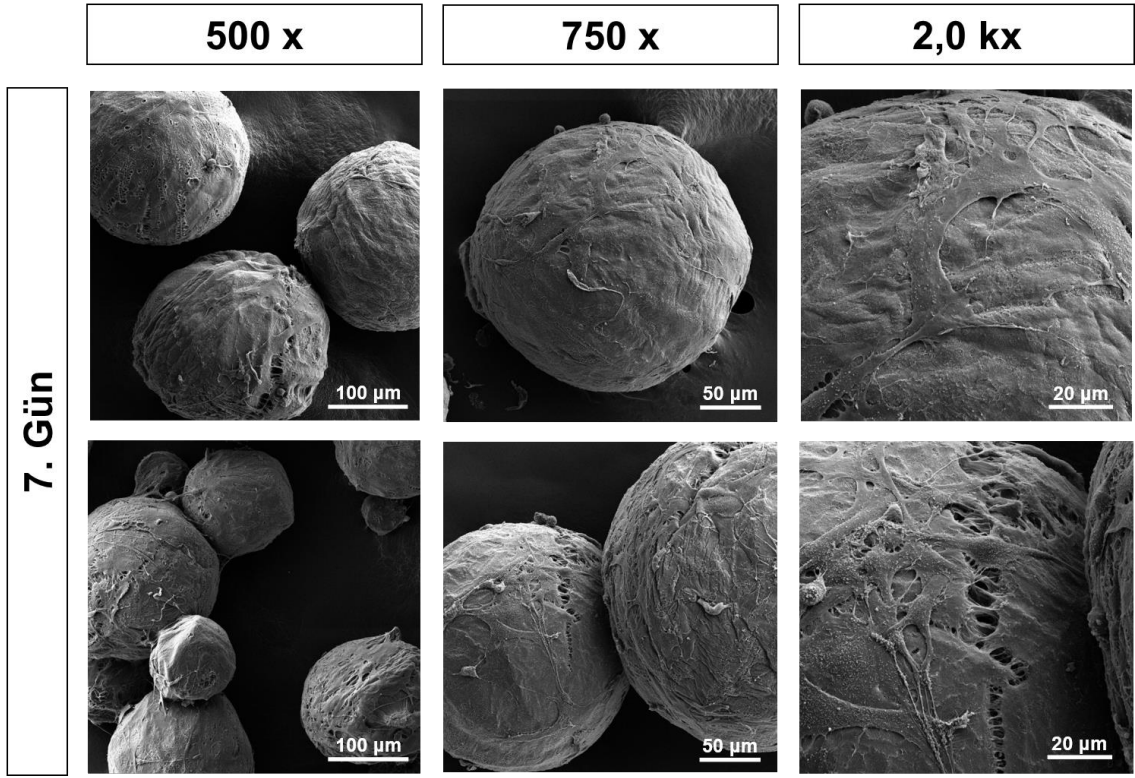
Literatürdeki bir çalışmada, MC3T3-E1 pre-osteoblastlarının PCL ve PLA'dan üretilmiş gözenekli mikrotarıyıcılar yüzeyinde MC3T3-E1 osteoblastlarının kültüre edilmesini ilk kez gerçekleştirmiştir. Döner şişe biyoreaktöründe gerçekleştirilen kültürün 14. gününde, hücreler yüzeyi tamamen kaplamıştır. Mikrotarıyıcı gözenekleri kalın hücre tabakası nedeniyle görülmemiştir [90]. Sunulan tez çalışmasında temsil edilen SF mikrotarıyıcılar, 7 günlük statik kültür kapsamında bu başarı ölçütünü sağlamıştır.



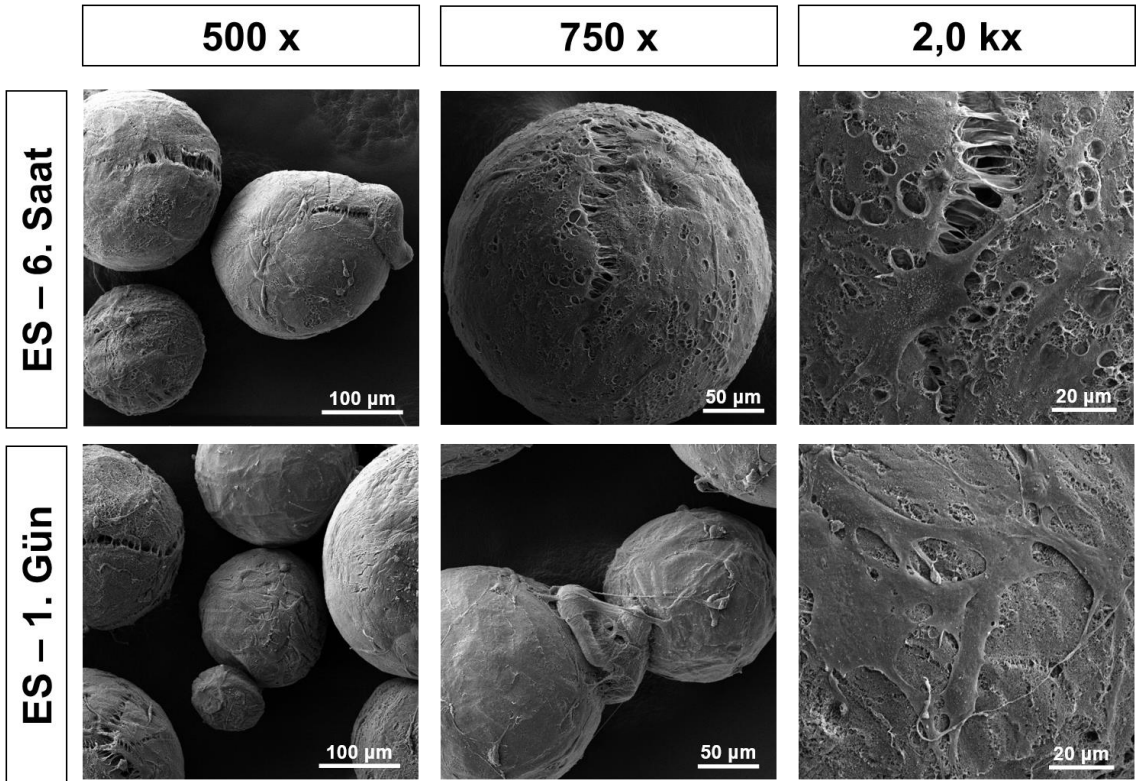
Şekil 4.33. 2,5 SF mikrot taşıyıcı yüzeylerine yayılmaya başlayan MC3T3-E1 pre-osteoblastların 3. gün SEM görüntüleri.

İpek mikrot taşıyıcı yüzeylerindeki L929-fibroblast ve MC3T3-E1-osteoblastların Şekil 4.33'deki üçüncü güne ait SEM görüntüleri karşılaştırıldığında; mikrot taşıyıcı yüzeyine osteoblastların daha hızlı yayıldığı görülmektedir. Hücre uzantıları mikrot taşıyıcı yüzeyinden ayırt edilmektedir. Şekil 4.34'daki yedinci günde ise 2,5 SF yüzeylerini tamamen kaplayan MC3T3-E1 osteoblastları görülmektedir. Bu hücre hattının ürettiği ECM daha geniş yayımlı olup, L929 fibroblastlarından farklılık göstermektedir. Hücre sayımı ile ilişkilendirilebilir. MC3T3-E1 osteoblastları mikrot taşıyıcı yüzeylerinde tutunacak yeterli alan bulamadığı için çoğalma kabiliyeti sınırlanmış olabilir.

Ayrıca enjeksiyonun ipek mikrot taşıyıcı/MC3T3-E1 yapılarına bir zarar vermediği görülmektedir (Şekil 4.35). Altıncı saat ve birinci gün SEM görüntüleri incelendiğinde, mikrot taşıyıcı yüzeylerinde hücrelerin korunduğu ve canlılığın devam ettiği görülmektedir.

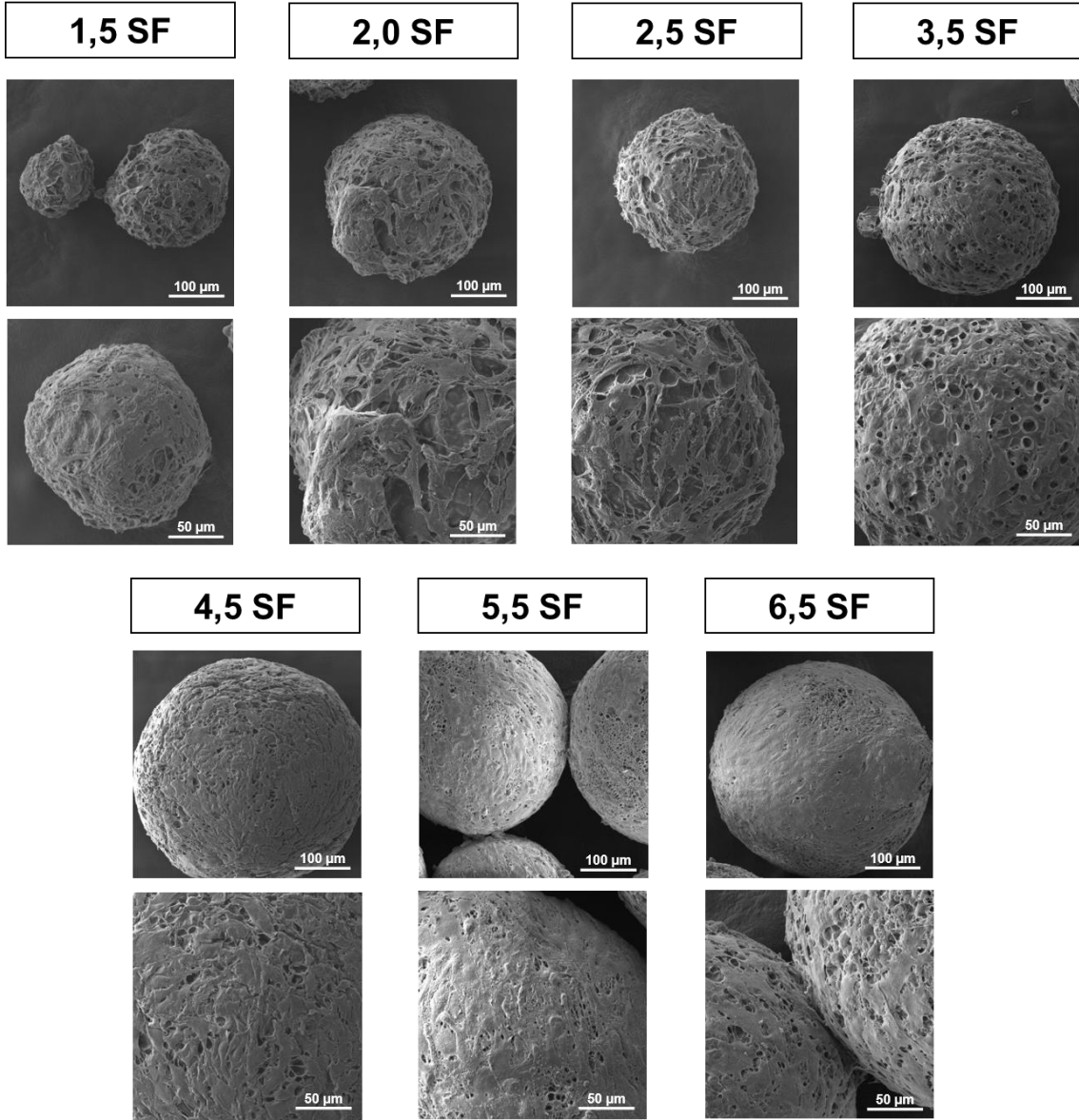


Şekil 4.34. 2,5 SF mikrot taşıyıcı yüzeylerine yayılan MC3T3-E1 pre-osteoblastların 7. gün SEM görüntüleri.



Şekil 4.35. İpek mikrot taşıyıcılar/MC3T3-E1 pre-osteoblastların enjeksiyon sonrası 6. saat ve 1. gün SEM görüntüleri.

MC3T3-E1 pre-osteoblastları ile yedi farklı SF mikrotarıyıcı grubu kültüre edilmiştir. SF konsantrasyonunun artmasıyla hücrelerin çoğalma potansiyelleri kültürün 7. gününde SEM analizi ile belirlenmiştir. şekil 4.36 incelendiğinde artan SF konsantrasyonu hücreler için zararlı olmamiş, hücreler mikrotarıyıcı yüzeylerini kaplamaya devam etmiştir. Buradan da SF'in artan konsantrasyonlarda bile biyouyumluluk gösterdiği anlaşılmaktadır.

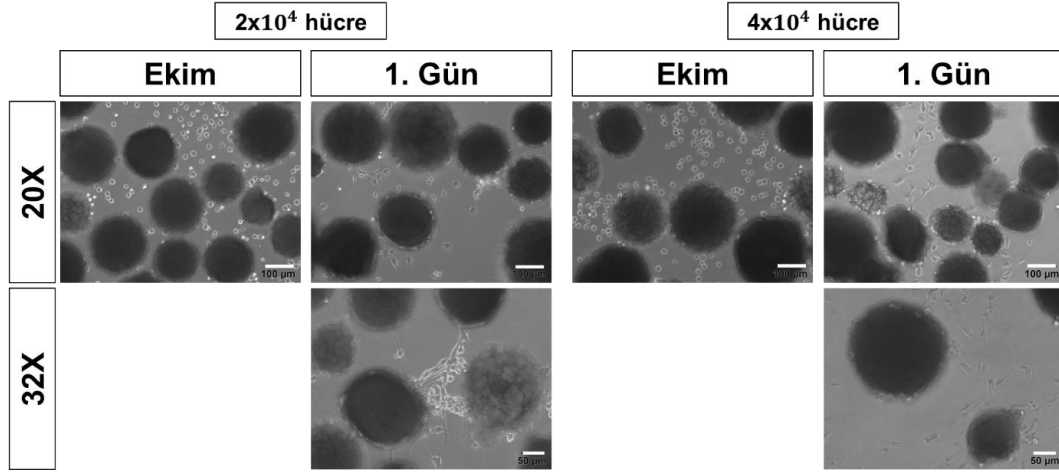


şekil 4.36. Artan SF konsantrasyonundaki mikrotarıyıcılar/MC3T3-E1 pre-osteoblastların 7. gün SEM görüntüleri.

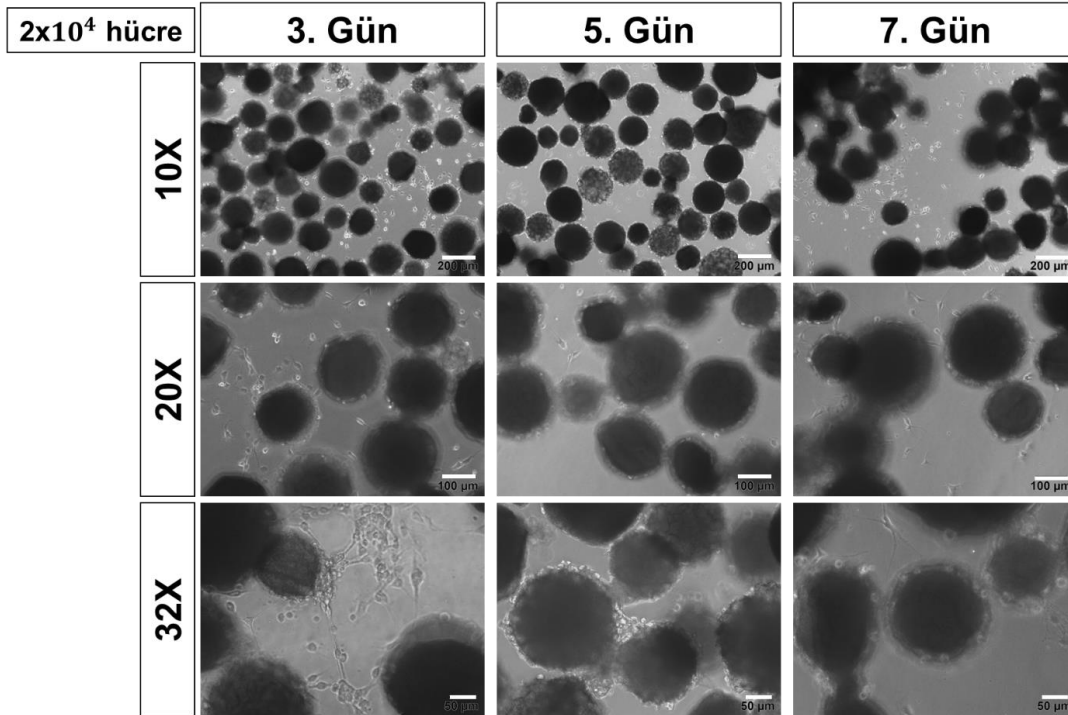
4.3.2.3. S42-Schwann Hücre Kültürü

Hücre Ekim Yoğunluğu Ön Deneme Sonuçları

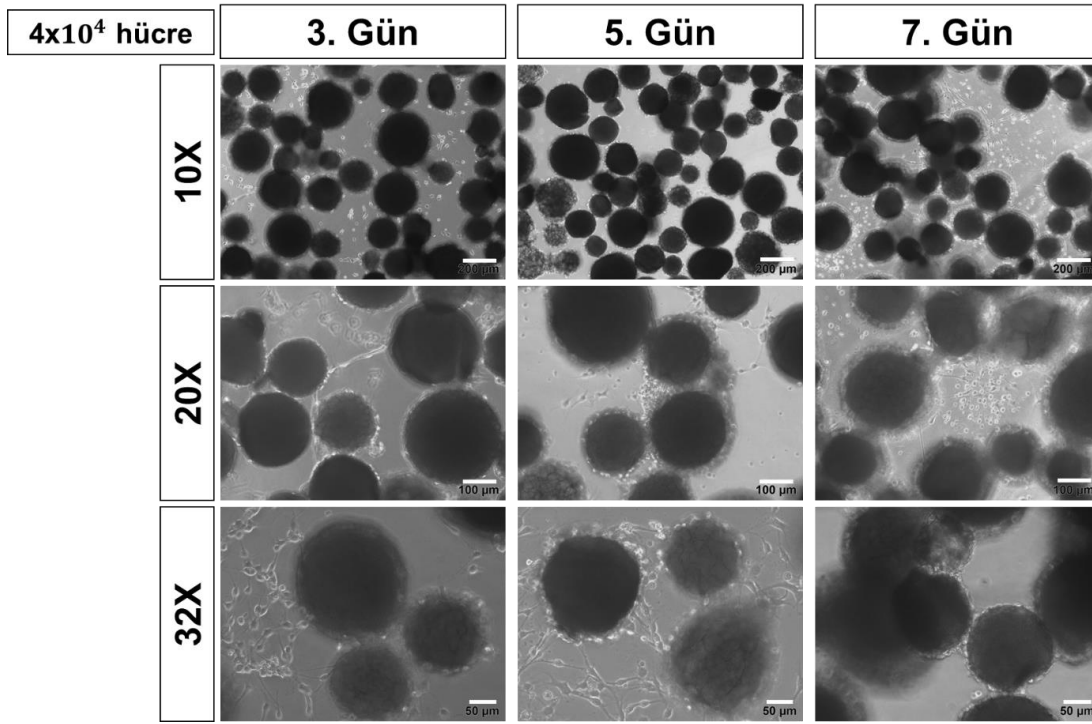
Hücre ekim yoğunluğunun belirlenebilmesi için 1 mg ipek mikrotarıyıcı üzerine iki farklı yoğunlukta hücre ekimi yapılmıştır. Mikrotarıyıcı/hücre etkileşimleri 7 gün boyunca ters ışık mikroskobu ile incelenmiştir (Şekil 4.37-4.39).



Şekil 4.37. İpek mikrotarıyıcılar üzerine 2x10⁴/mL ve 4x10⁴/mL hücrenin ekim anı ve 1. gündeki mikroskop görüntüleri.



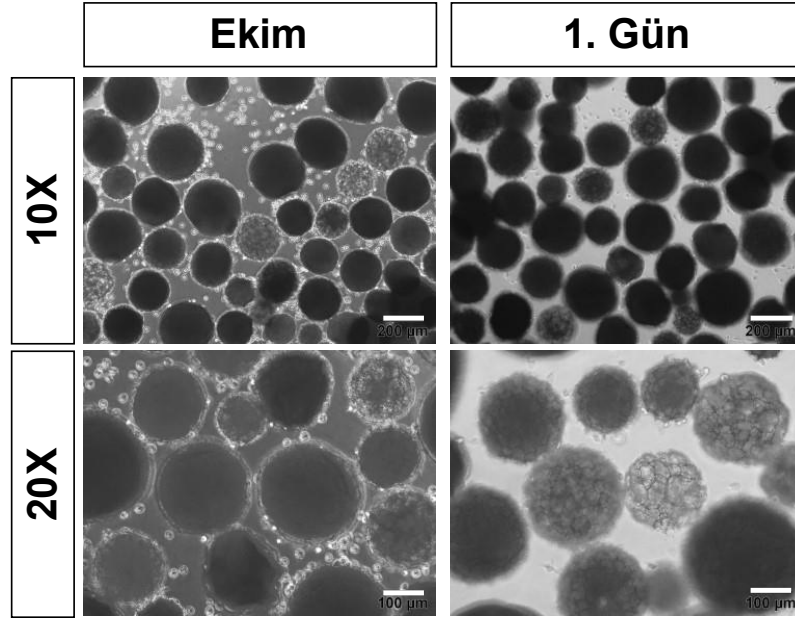
Şekil 4.38. Mikrotarıyıcılar üzerine ekilen 2x10⁴ hücre/mL yoğunluğundaki hücrenin 3., 5. ve 7. gündeki mikroskop görüntüleri.



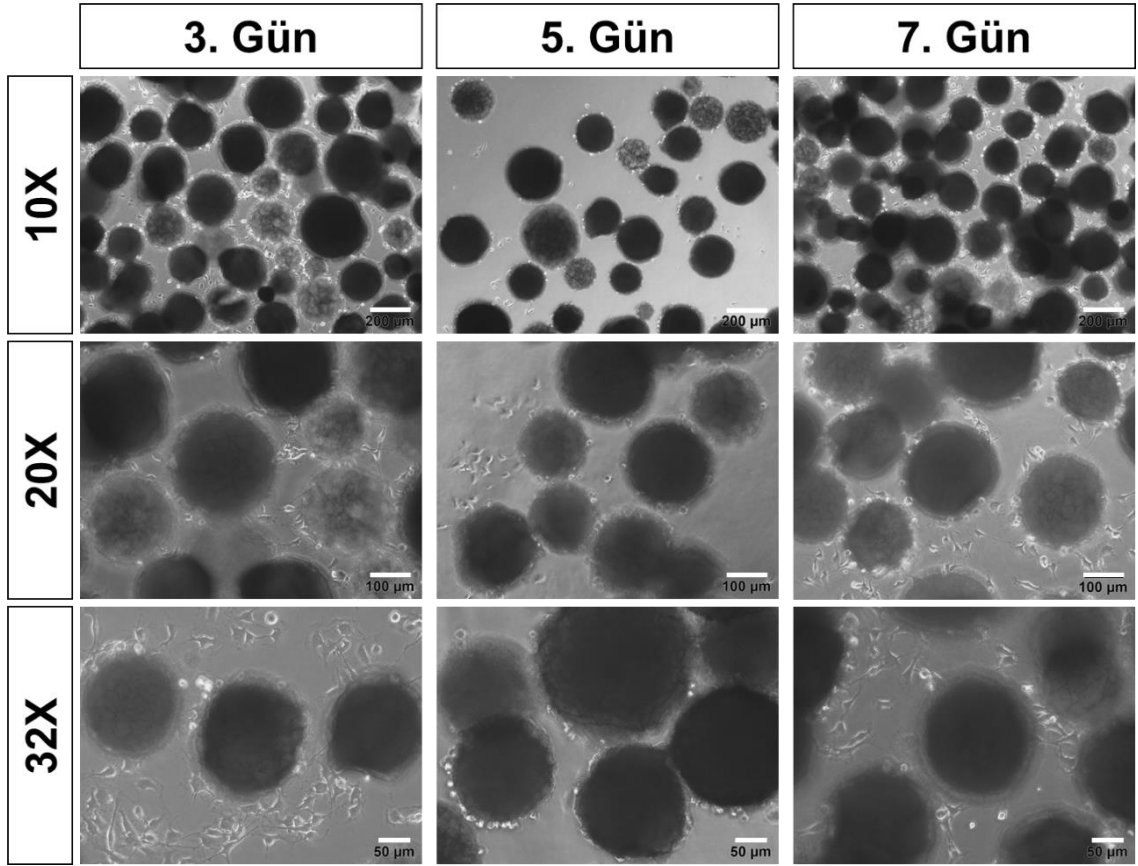
Şekil 4.39. Mikrot taşıyıcılar üzerine ekilen 4x10⁴ hücre/mL yoğunluğundaki hücrenin 3., 5. ve 7. gündeki mikroskop görüntüleri.

İpek Mikrot taşıyıcılara Hücre Ekimi

Ön deneme sonuçları doğrultusunda ekim yoğunluğuna 2x10⁴ hücre/mg SF mikrot taşıyıcı olacak şekilde karar verilmiş ve çalışmalar bu ekim yoğunluğunda sürdürülmüştür. Schwann hücrelerinin 2,5 SF mikrot taşıyıcılara ekilmesinden itibaren mikrot taşıyıcılarla etkileşimleri Şekil 4.40 ve 4.41’de gösterilmiştir.



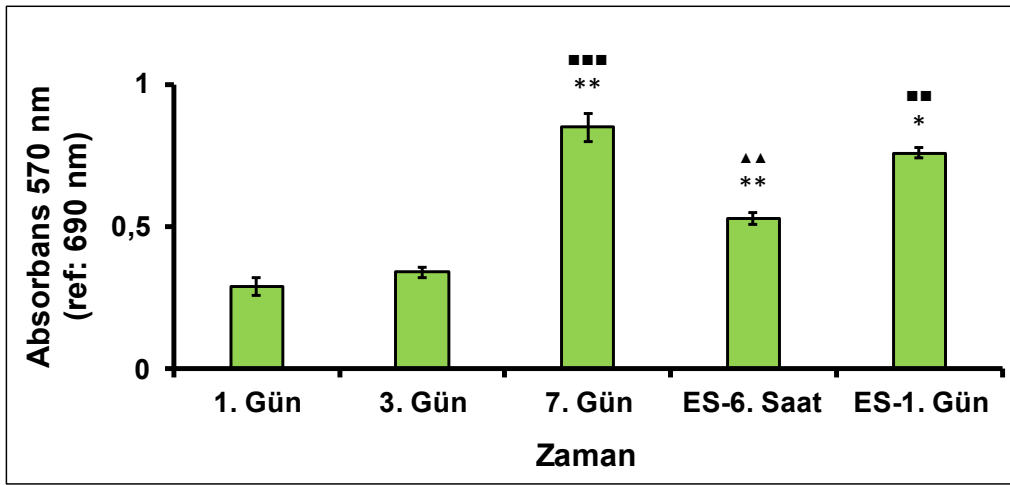
Şekil 4.40. 2,5 SF mikrotarıyıcılar  zerine Schwann hücrelerinin ekim anı ve 1. gündeki mikroskop görüntüleri.



Şekil 4.41. 2,5 SF mikrotarıyıcılar üzerinde çoğalan Schwann hücrelerinin 3., 5. ve 7. gündeki mikroskop görüntüleri.

MTT Analizi

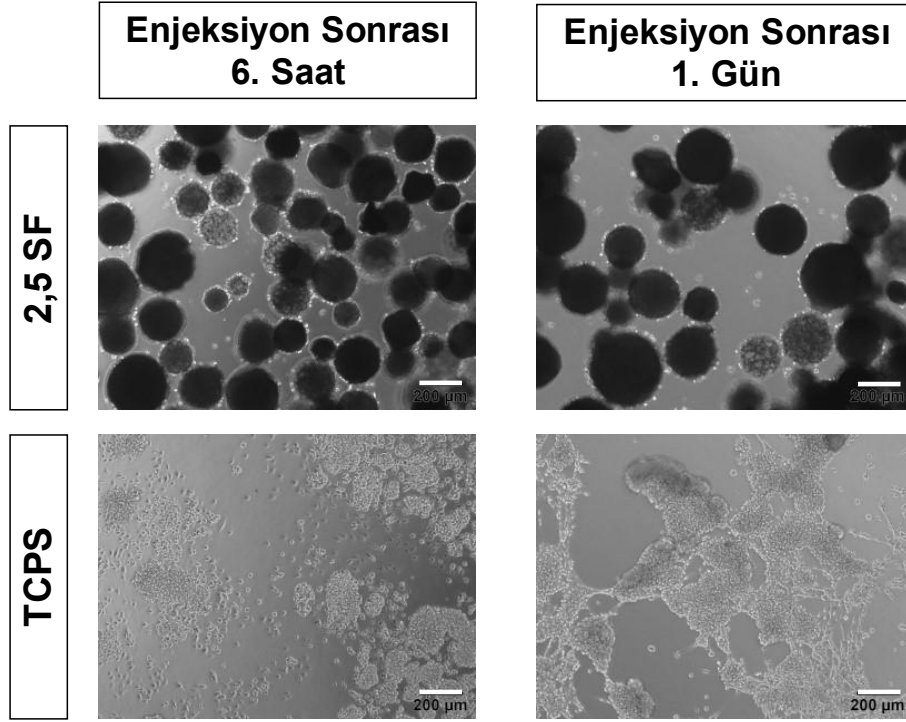
İpek fibroin mikrotarıyıcılar ile kültüre edilen Schwann hücrelerinin canlılığı MTT analizi ile tespit edilmiştir (Şekil 4.42). Schwann hücreleri, ipek mikrotarıyıcılar yüzeyinde etkili bir şekilde çoğalarak 7. günde yüksek bir absorbans değeri ($0,85\pm0,02$) göstermiştir (** $p<0,01$, ■■■ $p<0,001$). Hücrelerin birbirleri ile etkileşim kurmak için filopod yapılarını oldukça uzatması, metabolik aktivitelerinde artışa neden olmuştur.



Şekil 4.42. İpek mikrotarıyıcılar/Schwann hücrelerinin kültürasyonu ile elde edilen absorbans değerleri (İstatistiksel anlamlı farklılıklar $n=3$, * $p<0,05$, ** $p<0,01$ mikrotarıyıcı yüzeylerinde çoğalan hücrelerin 1. gün canlılık değeri kontrol olarak kabul edildiğinde, ■■■ $p<0,001$, ■■ $p<0,01$ 3. gün kontrol olarak kabul edildiğinde ve ▲▲ $p<0,01$ 7. gün kontrol olarak kabul edildiğindeki durum) (Başlangıç hücre yoğunluğu: 2×10^4 hücre/mL'dir).

Enjekte Edilebilirlik

İpek fibroin mikrotarıyıcılar, 18 G spinal iğneden bir tıkanıklık olmaksızın, rahatlıkla enjekte edilebilmiştir (Şekil 3.4-C). Mikrotarıyıcı yüzeylerinde çoğalan Schwann hücrelerinin enjeksiyon sonrasında da canlılıklarını koruduğu, ters ışık mikroskobu ile gözlenmiştir. TCPS yüzeylerinden kaldırılıp, enjekte edilen hücreler ise sağlıklı bir morfolojide görülmektedir (Şekil 4.43).

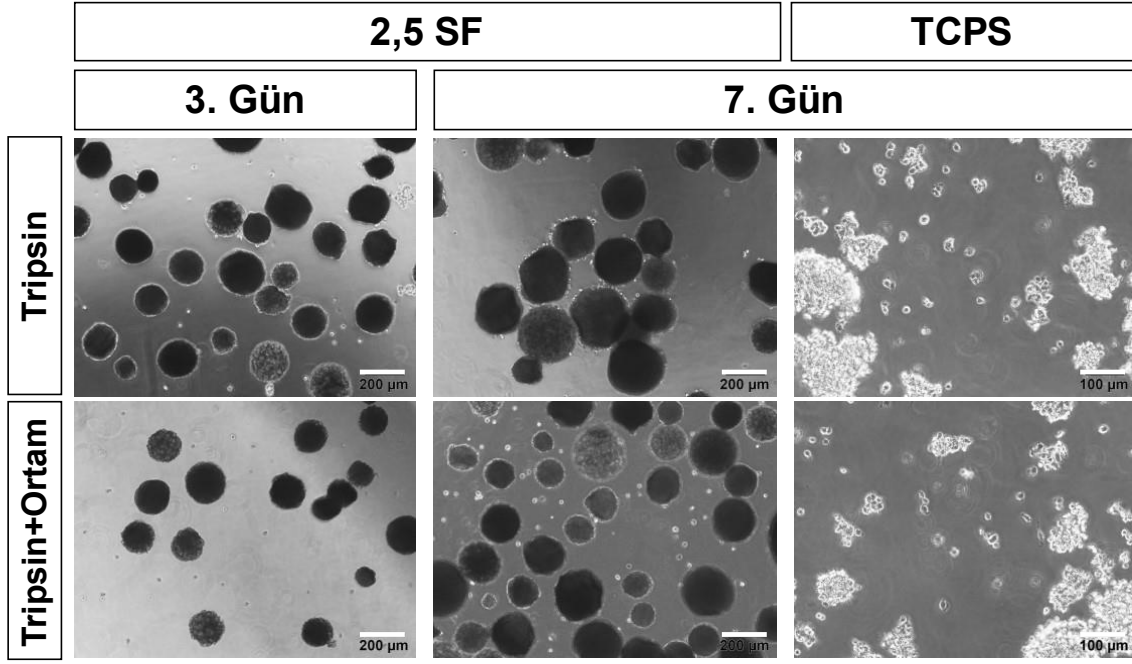


Şekil 4.43. Mikrotaşyıcı ve TCPS yüzeylerinde çoğalan Schwann hücrelerinin enjekte edildikten sonra 6. saat ve 1. gündeki ışık mikroskobu görüntüleri.

Schwann hücreleri mikrotaşyıcı yüzeylerinde enjekte edildikten 6 saat sonra absorbans değerleri anlamlı seviyede düşmüş ($0,53 \pm 0,03$, $\blacktriangle\blacktriangle p < 0,01$) ancak ertesi gün artmıştır ($0,76 \pm 0,04$). Yedinci gün ve enjeksiyon sonrası 1. gün absorbans değerleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bu sonuç ile enjeksiyonun hücre canlılığını kısmen azalttığı ve mikrotaşyıcı yüzeylerinde Schwann hücrelerinin çoğalmaya devam ettiği anlaşılmıştır. Mikrotaşyıcılar, Schwann hücrelerine mekanik destek sağlayarak, hücrelerin enjekte edildikten sonra canlılığını sürdürmesine olanak sağlamıştır.

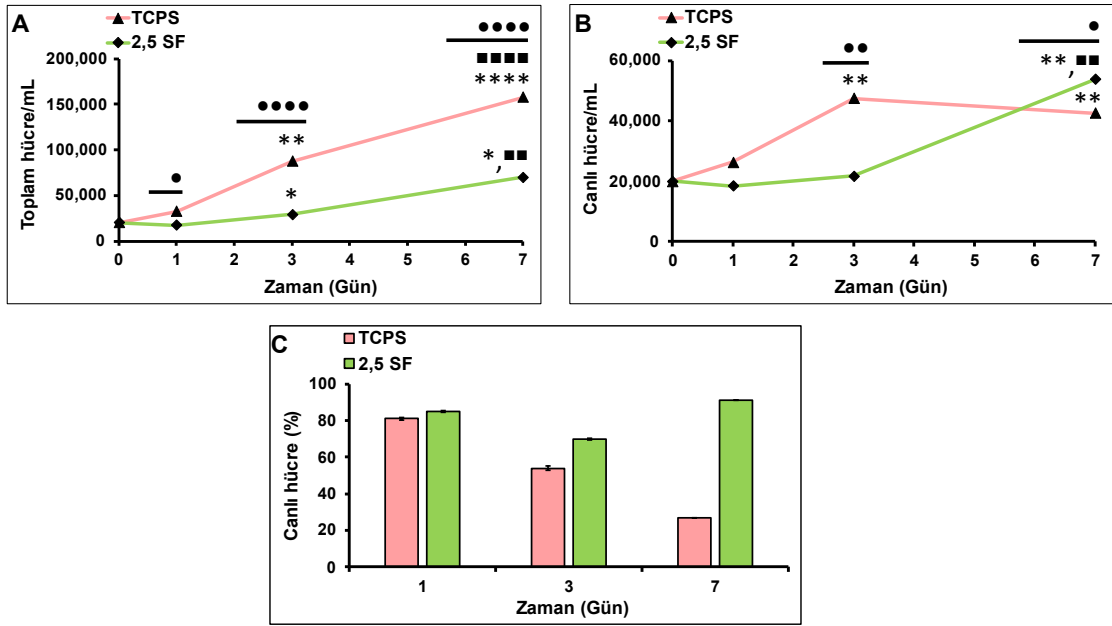
Hücre Sayımı

Şekil 4.44'te tripsin varlığında mikrotaşyıcı çevresinde Schwann hücreleri görülmektedir. Mikrotaşyıcı yüzeylerinden hücreleri ayırmak kolay olmamıştır. Tripsin üzerine büyüme ortamı eklenip, pipetaj yapıldığında ise hücrelerin büyük bir kısmı mikrotaşyıcı yüzeylerinden ayrılmıştır. Kontrol grubunda çoğalan Schwann hücrelerinin ise gruplar halinde yüzeyden kalktığı görülmüştür.



Şekil 4.44. Tripsin ile muamele edilerek kaldırılan Schwann hücrelerinin 3. ve 7. günlerdeki 10X ve 20X büyütmede mikroskop görüntüleri.

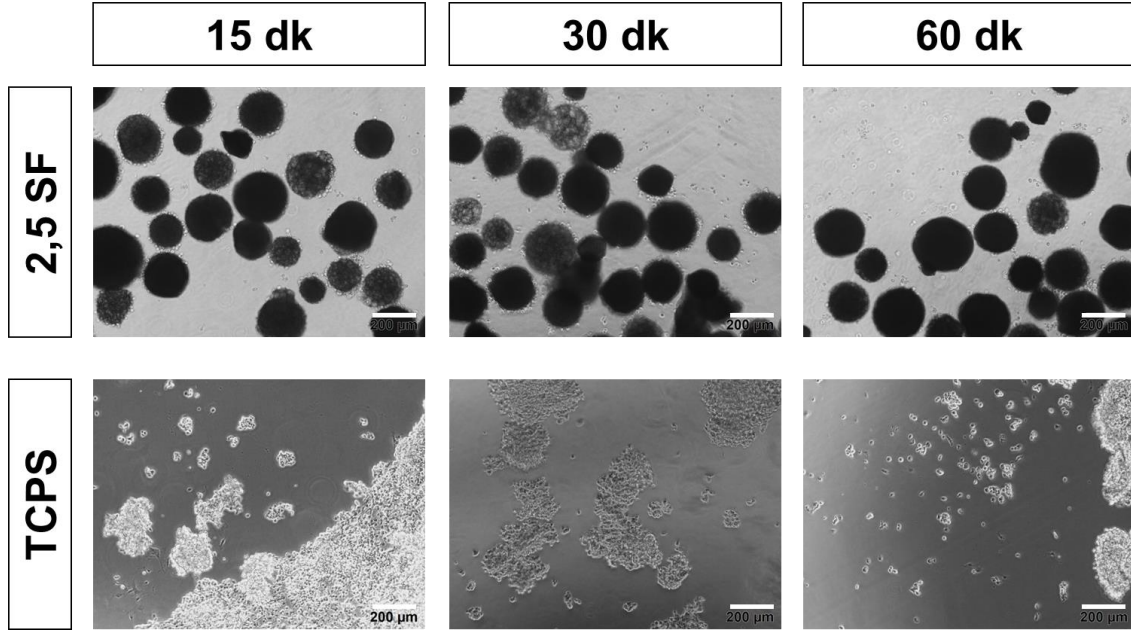
İpek mikrotayıyıcı yüzeylerinden 1. gün toplam $2,2 \times 10^4 \pm 1,2$ hücre/mL, 3. gün toplam $3,1 \times 10^4 \pm 0,9$ hücre/mL ($*p < 0,05$) ve 7. günden toplam $5,9 \times 10^4 \pm 0,5$ hücre/mL ($*p < 0,05$, $\blacksquare p < 0,01$) sayılmıştır. TCPS yüzeylerinden ise 1. gün toplam $3,3 \times 10^4 \pm 0,0$ hücre/mL, 3. gün toplam $8,8 \times 10^4 \pm 1,0$ hücre/mL ($**p < 0,01$) ve 7. günde toplam $1,6 \times 10^5 \pm 9,0$ hücre/mL ($****p < 0,0001$, $\blacksquare\blacksquare\blacksquare p < 0,0001$) olarak sayılmıştır (Şekil 4.45-A). TCPS yüzeylerinde daha çok sayıda hücre çoğalmasına rağmen, tripsin uygulamasıyla hücre canlılığının azaldığı görülmüştür (Şekil 4.45-B). Canlı hücre sayısı, toplam hücre sayısına oranlanarak yüzde canlılık değerleri hesaplanmıştır (Şekil 4.45-C). Yedinci günde mikrotayıyıcı yüzeylerinden $5,4 \times 10^4 \pm 0,5$ canlı hücre/mL sayılmış ve %91 oranında canlılık elde edilmiştir ($**p < 0,01$, $\blacksquare p < 0,01$). Ancak TCPS yüzeylerinden 7. günde $4,3 \times 10^4 \pm 0,0$ canlı hücre/mL sayılmış ve %27 oranında canlılık elde edilmiştir ($**p < 0,01$). Buradaki sonuçlar ışığında; TCPS yüzeylerine kıyasla, mikrotayıyıcı yüzeylerinde hücreleri çoğaltmanın daha yüksek bir hücre canlılığını sağladığı vurgulanmaktadır ($\bullet p < 0,05$).



Şekil 4.45. İpek mikrot taşıyıcılar ve TCPS yüzeylerinden tripsinizasyon ile kaldırılan (A) Toplam Schwann hücre sayısı (B) Canlı hücre sayısı (C) Canlı hücre yüzdesi (İstatistiksel anlamlı farklılıklar $n=3$, $*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,0001$ mikrot taşıyıcı yüzeylerinde çoğalan hücrelerin 1. günündeki hücre sayısı kontrol olarak kabul edildiğinde, $\blacksquare p<0,01$, $\blacksquare\blacksquare\blacksquare p<0,0001$ 3. gün kontrol olarak kabul edildiğinde ve $\bullet p<0,05$, $\bullet\bullet p<0,01$, $\bullet\bullet\bullet p<0,001$ aynı günde farklı grupların karşılaştırıldığı durum). (Başlangıç hücre yoğunluğu: 2×10^4 hücre/mL'dir).

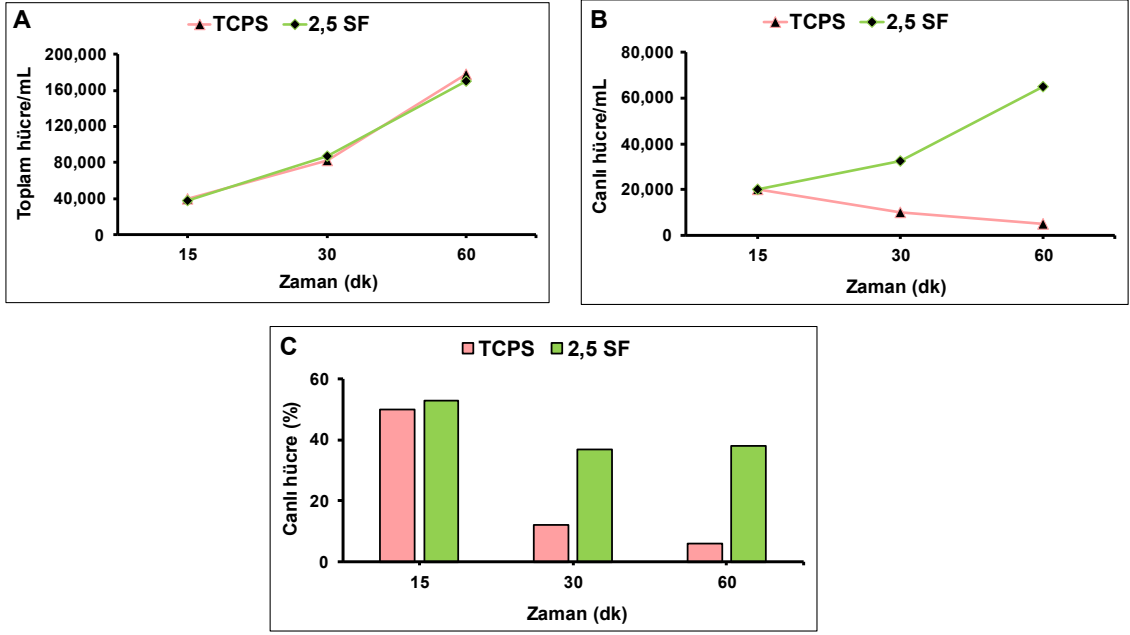
Schwann Hücreli Mikrot taşıyıcılarda Kolajenaz Etkisinin Değerlendirilmesi

Kültürasyonun 7. günündeki örnekler 1,0 U/mL kolajenaz ortamında 15, 30 ve 60 dk bekletilmiş ve ters ışık mikroskopunda incelenmiştir (Şekil 4.46).



Şekil 4.46. İpek mikrot taşıyıcılar ve TCPS yüzeylerinin kolajenaz ortamındaki görüntüleri.

İpek mikrot taşıyıcılı kuyucuklara kolajenaz ilavesinden itibaren 15., 30. ve 60. dakikalarda sırasıyla toplam $3,8 \times 10^4$ hücre/mL, $8,8 \times 10^4$ hücre/mL ve $1,7 \times 10^5$ hücre/mL sayılmıştır. TCPS yüzeylerinden ise aynı süre sırasıyla toplam hücre sayısı $4,0 \times 10^4$ hücre/mL, $8,3 \times 10^4$ hücre/mL, $1,8 \times 10^5$ hücre/mL olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.47-A). Enzim süresinin artırılmasıyla yüzeyden kaldırılan hücre sayısında artış olmuştur. Özellikle mikrot taşıyıcılı örnekleri 60 dk boyunca kolajenaza maruz bırakmak, hücrelerin yüzeyden daha çok kalkmasını sağlamıştır. Yüzde canlılık değerleri hesaplandığında, $6,5 \times 10^4$ canlı hücre/mL sayılmış ve %38 oranında canlılık elde edilmiştir. Ancak TCPS yüzeyleri 60 dk boyunca kolajenaz ortamında bekletildiğinde 5×10^3 canlı hücre/mL sayılmış ve %6 oranında canlılık elde edilmiştir (Şekil 4.47-B,C). Buradaki sonuçlara göre, mikrot taşıyıcılı yüzeylerden hücre kaldırırken enzim muamele süresinin uzatılması sayım verimini artırmış, ancak yüzde canlılığını azaltmıştır. Mikrot taşıyıcılı yüzeylerden kaldırılan hücrelerin canlılığı TCPS'e göre daha yüksektir.

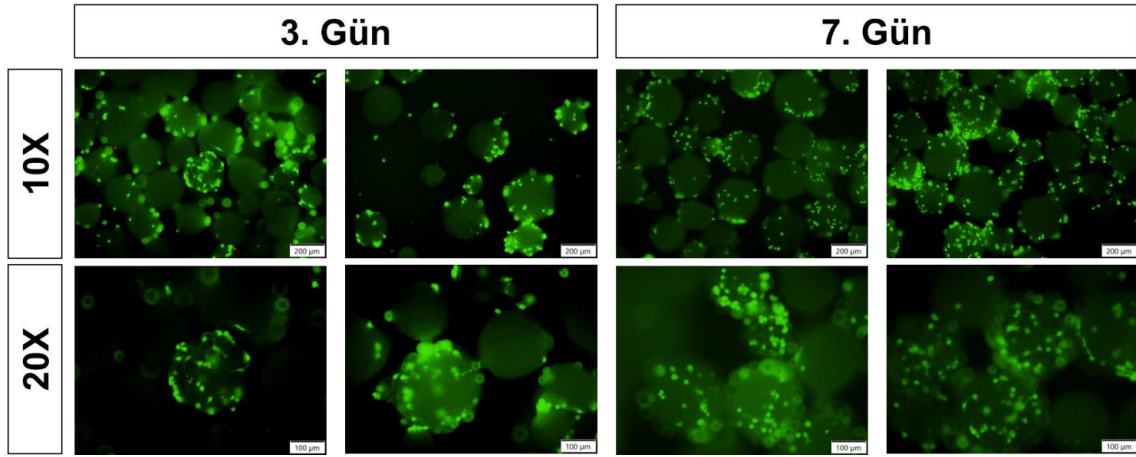


Şekil 4.47. İpek mikrotarıyıcılar ve TCPS yüzeylerinden kolajenaz ile kaldırılan (A) Toplam Schwann hücre sayısı (B) Canlı hücre sayısı (C) Canlı hücre yüzdesi.

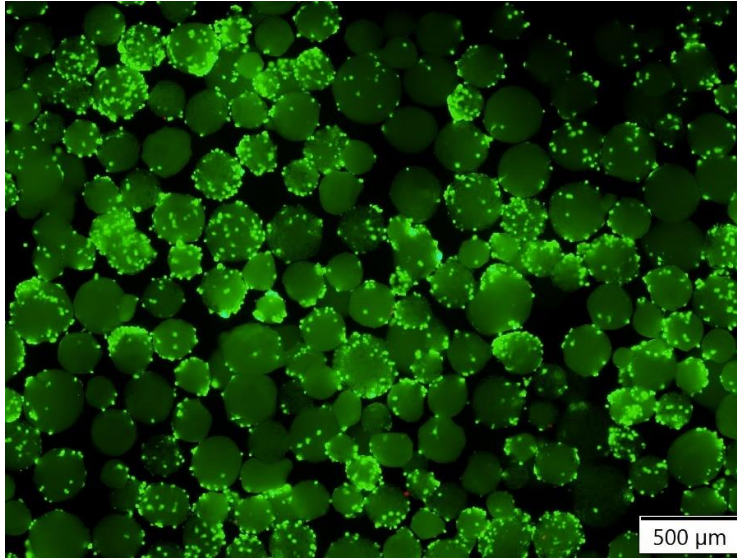
Tripsin ve kolajenaz etkisi karşılaştırıldığında ise, 7. günde mikrotarıyıcı yüzeylerinden $5,9 \times 10^4$ hücre/mL 5 dk içerisinde kaldırılırken, kolajenaz varlığında $3,8 \times 10^4$ hücre/mL 15 dk içerisinde kaldırılmıştır. Hücreli mikrotarıyıcılar, kolajenaz içerisinde 60 dk bekletildiğinde TCPS yüzeylerinde çoğalan hücre sayısı kadar elde edilmiştir. Toplam hücre sayısı göz önünde bulundurulduğunda, kolajenaz ile muamele süresinin artırılması daha etkili sonuç vermiştir.

Canlı/Ölü Hücrelerin Görüntülenmesi

İpek mikrotarıyıcı yüzeylerinde çoğalan Schwann hücreleri, kültürün 3. ve 7. gününde canlı/ölü hücre boyaması ile incelenmiştir (Şekil 4.48 ve 4.49). SF mikrotarıyıcı yüzeylerindeki canlı hücreler Calcein AM boyası ile yeşile, ölü hücreler EthD-1 boyası ile kırmızıya boyanmıştır.



Şekil 4.48. 2,5 SF mikrotaşyıcı yüzeylerinde çoğalan Schwann hücrelerinin 3. ve 7. gündeki canlı/ölü hücre boyama görüntüleri (Canlı hücreler yeşile, ölü hücreler kırmızıya boyanmıştır).



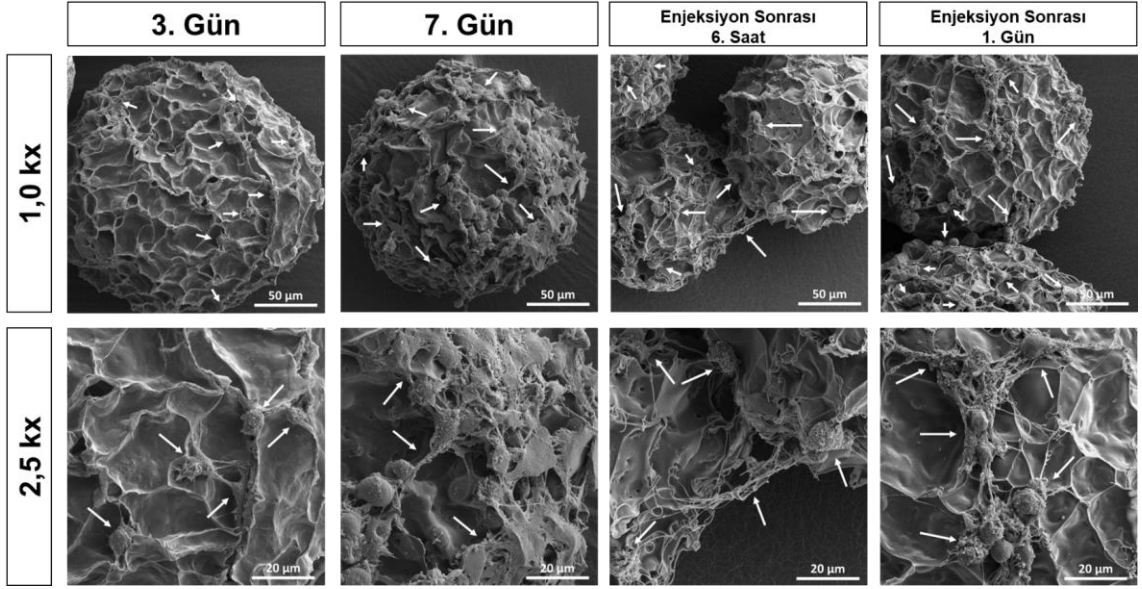
Şekil 4.49. 2,5 SF mikrotaşyıcı yüzeylerinde çoğalan Schwann hücrelerinin 7. gündeki canlı/ölü hücre boyama görüntüsü (4X) (Canlı hücreler yeşile, ölü hücreler kırmızıya boyanmıştır).

Şekil 4.48 ve 4.49'da yok denecek kadar az ölü hücreye (Eth-1, kırmızı) rastlanmıştır, hücre canlılığının (Calcein-AM, yeşil) yüksek olduğu görülmüştür.

SEM Analizi

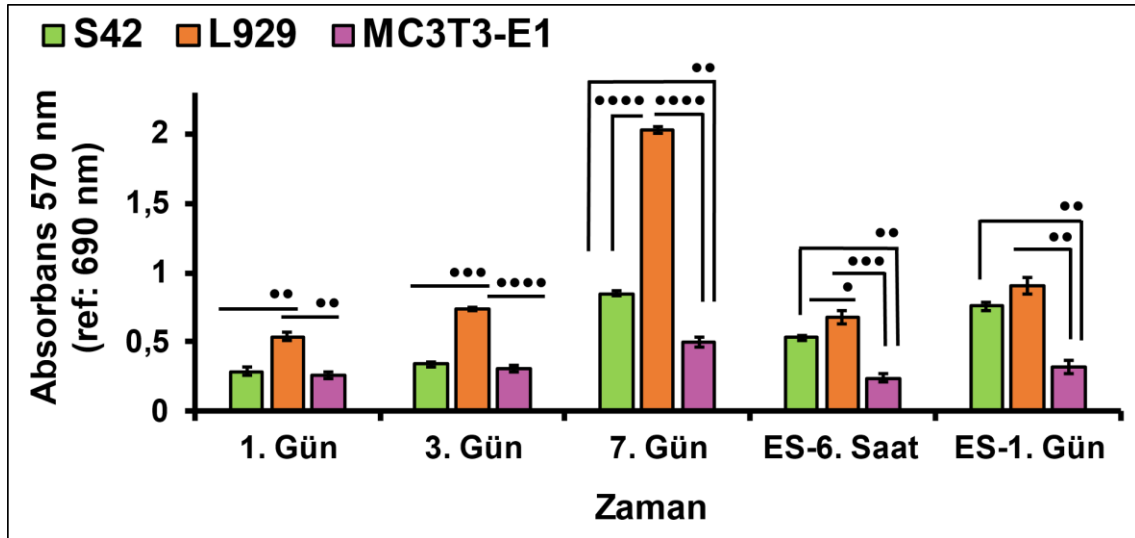
İpek mikrotaşyıcı-Schwann hücrelerinin etkileşimi SEM ile incelenmiş ve görüntüler Şekil 4.50'de verilmiştir.

SEM görüntüleri incelendiğinde; 3. günde mikrotarıyıcı yüzeyine tutunan Schwann hücreleri, 7. günde ise mikrotarıyıcı yüzeyine yayılan Schwann hücreleri görülmektedir. Enjekte edilme ile mikrotarıyıcı yüzeylerindeki hücrelere mekanik bir zarar gelmemiş, hücre yayılımı devam etmiştir. Hücrelerin ve mikrotarıyıcıların birbirleri ile bağlantı kurmaya devam ettiği görülmektedir.



Şekil 4.50. 2,5 SF mikrotarıyıcı yüzeylerinde çoğalan Schwann hücrelerinin SEM görüntüleri.

İpek mikrotarıyıcılar ile üç farklı hücre hattının kültürasyonu boyunca elde edilen absorbans değerleri Şekil 4.51’de verilmiştir. Statik hücre kültürü çalışmaları, üç hücre hattı için 2×10^4 hücre/mg 2,5 SF koşulunda gerçekleştirilmiştir. Aynı koşullardan ölçülen absorbans değerleri ve elde edilen hücre sayıları birbirleriyle karşılaştırmalı olarak açıklanmıştır.



Şekil 4.51. İpek mikrotarıyıcılar ile üç farklı hücre hattının kültürasyonu boyunca elde edilen absorbans değerleri (İstatistiksel anlamlı farklılıklar $n=3$, $\bullet p<0,05$, $\bullet\bullet p<0,01$, $\bullet\bullet\bullet p<0,001$, $\bullet\bullet\bullet\bullet p<0,0001$ aynı günde farklı grupların karşılaştırıldığı durum). (Başlangıç hücre yoğunluğu: 2×10^4 hücre/mL'dir).

L929 fibroblastlarından 7. günde diğer hücre hatlarından daha yüksek absorbans değeri ve hücre sayısı elde edilmiştir ($\bullet\bullet\bullet\bullet p<0,0001$). Ancak enjekte edildiğinde hücre canlılığındaki azalma daha fazla olmuştur. Bu durum L929 hücreleri için aynı miktardaki mikrotarıyıcının kullanılmasının yeterli olmamasından kaynaklı olduğu söylenebilir. Çünkü önceki görüntülerde görüldüğü gibi L929 hücreleri mikrotarıyıcı yüzeyinde tek tabaka değil tabakalar halinde çoğalmışlardır. Enjeksiyon sırasında üst katmanlardaki hücrelerin zarar görmesine bağlı olarak hücre canlılığında azalma olmuştur. Üç farklı hücre hattı ile gerçekleştirilen çalışmalardan elde edilen hücre sayıları Çizelge 4.5'te verilmiştir. Başlangıç hücre sayıları ile 1. gün arasında sadece L929 fibroblastları için anlamlı farklılık bulunmuştur ($*p<0,05$).

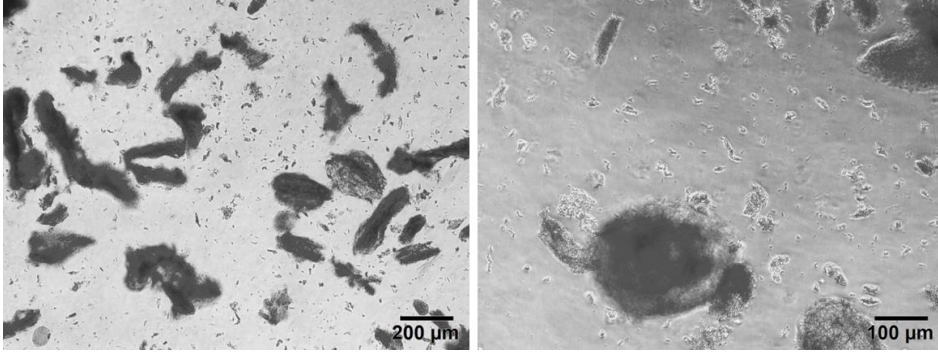
Çizelge 4.5. İpek fibroin mikrotarıyıcılar ile kültüre edilen üç farklı hücre hattına ait zamana bağlı hücre sayıları.

Hücre	Gün	Başlangıç (hücre/mL)	1 (hücre/mL)	3 (hücre/mL)	7 (hücre/mL)
L929		2×10^4	$1,1 \times 10^4 \pm 0,5$	$7,5 \times 10^4 \pm 0,0$	$47,5 \times 10^4 \pm 1,5$
MC3T3-E1		2×10^4	$1,2 \times 10^4 \pm 1,2$	$3,4 \times 10^4 \pm 1,5$	$9,9 \times 10^4 \pm 1,3$
S42		2×10^4	$1,8 \times 10^4 \pm 1,2$	$2,9 \times 10^4 \pm 0,9$	$7,0 \times 10^4 \pm 0,5$

Çizelge 4.5.'teki değerler incelendiğinde 1. günden 7. güne tüm kültürlerde hücre sayılarının artığı, ancak bu artışın özellikle L929 hücre hattında çok daha belirgin olduğu görölmüştür (MC3T3-E1 ve S42 hücreleri ile farkı; $***p < 0,0001$). Birinci gün hücre sayılarında gruplar arasında anlamlı fark bulunamamıştır. L929 hücreleri daha düşük ikilenme süresi sebebiyle mikrotarıyıcı yüzeylerinde 3. günde daha fazla sayıda çoğalmıştır (MC3T3-E1 hücreleri ile farkı; $**p < 0,01$, S42 hücreleri ile farkı; $***p < 0,0001$). Birbirlerine yakın sayıda çoğalan MC3T3-E1 ve Schwann hücreleri arasında sadece 7. günde anlamlı bir fark bulunmuştur ($**p < 0,01$).

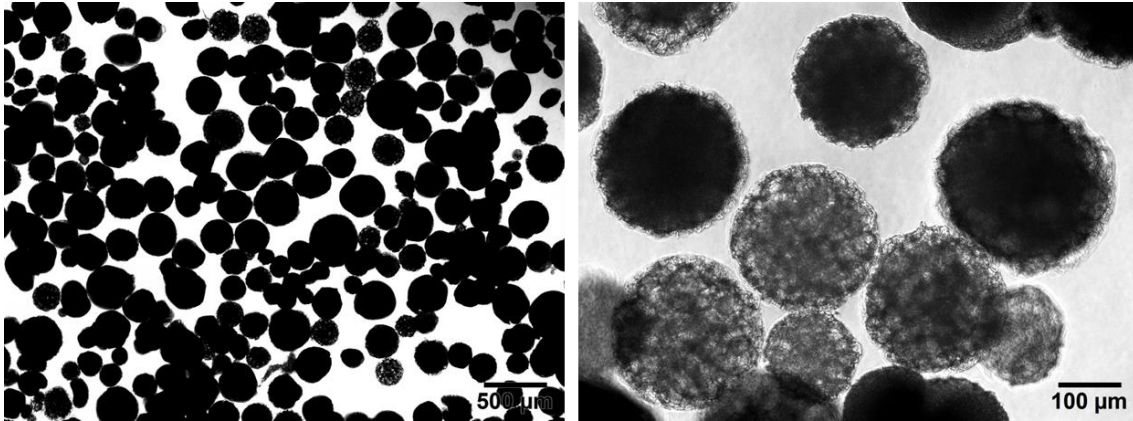
4.3.3. Mikrotarıyıcı-destekli Dinamik Hücre Kültürü

İpek fibroin mikrotarıyıcılara ekilen Schwann hücreleri, kültürasyonun 3. gününde karıştırmalı kap biyoreaktörüne aktarılmıştır. Mikrotarıyıcılar, karıştırmalı kap biyoreaktör içerisinde homojen bir şekilde, 30 rpm hızında karıştırılmıştır. Kültürasyonun 7. gününe gelindiğinde ters ışık mikroskopunda mikrotarıyıcıların parçalandığı görölmüştür (Şekil 4.52).



Şekil 4.52. Dinamik hücre kültürü sonucu parçalanmış 2,5 SF mikrot taşıyıcıların 7. gündeki mikroskop görüntüleri.

Mikrot taşıyıcı yüzeyine etki eden kayma kuvvetleri nedeniyle, malzemenin parçalandığı düşünülmüştür. Buradan yola çıkarak, hücresiz mikrot taşıyıcılar ile bir deneme oluşturulmuş ve karıştırmalı kap biyoreaktörün karıştırma hızı 15 rpm'e düşürülerek çalıştırılmıştır. Mikrot taşıyıcıların bu hızda homojen karışmadığı, ancak parçalanmadığı görülmüştür (Şekil 4.53).

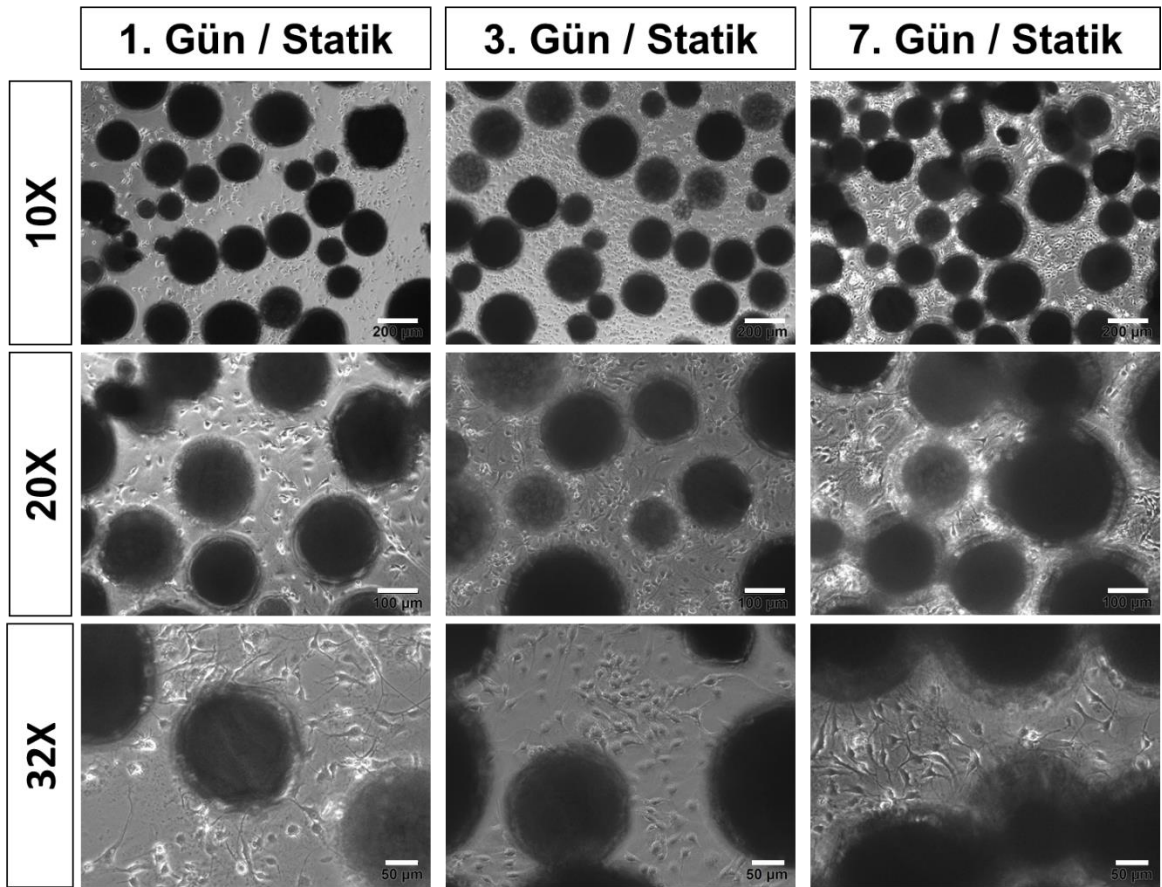


Şekil 4.53. Karıştırma hızının 15 rpm olduğunda 2,5 SF mikrot taşıyıcıların 7. gündeki mikroskop görüntüleri.

Buradan elde edilen sonuçlar ile dinamik kültür koşulları yeniden planlanmıştır. Bir mg 2,5 SF/ 1×10^5 hücre yoğunluğunda 24 kuyucuklu non-treated kültür kaplarına ekilmiştir. Kültürün üçüncü gününde, mikrot taşıyıcı-hücre yapılarının büyüme ortamı değiştirilmiş ve karıştırmalı kap biyoreaktör içerisine aktarılmıştır. Son hacim 100 mL'ye tamamlanmış ve 15 rpm karıştırma hızı uygulanmıştır. Bu koşullar içerisinde dinamik hücre kültürü, dört gün devam ettirilmiştir.

Statik hücre kültürü için de aynı yoğunlukta ($1 \text{ mg } 2,5 \text{ SF}/1 \times 10^5$) hücre ekilmiş ve üçüncü günde yeni bir kültür kabına aktarılmıştır. Kültür süresi toplam 7 günde sonlandırılmıştır. Statik ve dinamik hücre kültürü çalışmalarından elde edilen sonuçlar birbirleriyle karşılaştırılmıştır.

Mikrotaşıyıcı-hücre etkileşimleri ters ışık mikroskobu ile incelenmiştir (Şekil 4.54 ve 4.55). Hücrelerin kısa sürede mikrotaşıyıcılara tutunup, çoğaldıkları görülmüştür. Bu değerlendirmeler kantitatif olarak da doğrulanmıştır.

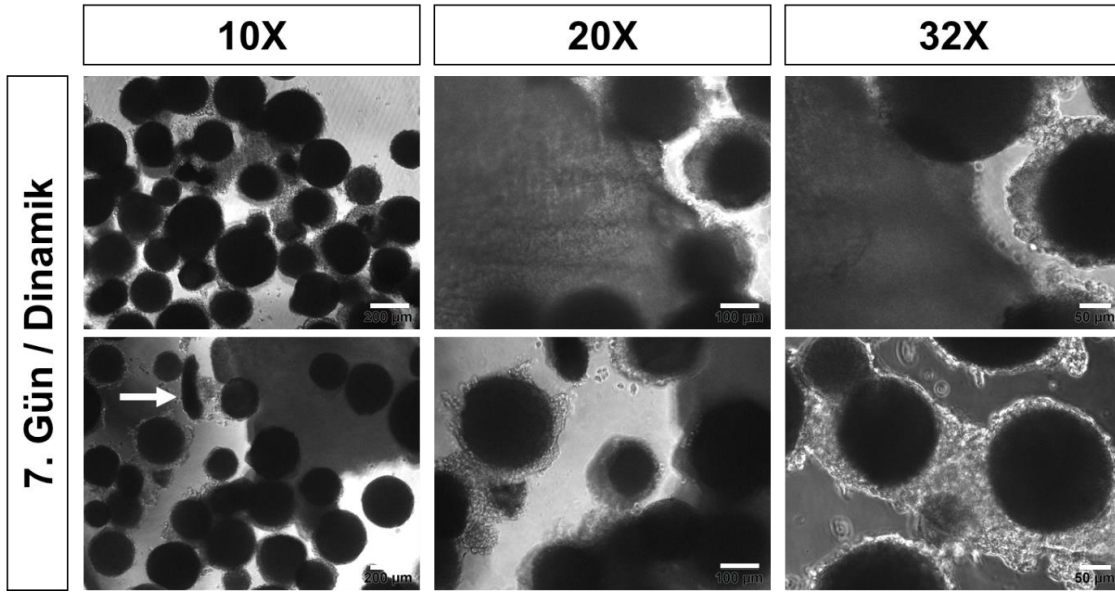


Şekil 4.54. 2,5 SF mikrotaşıyıcılar üzerinde çoğalan Schwann hücrelerinin statik kültürdeki 1., 3. ve 7. gün mikroskop görüntüleri.

Karıştırmalı kap biyoreaktörün tabanına mikrotaşıyıcılar birikerek, yığın oluşturdukları gözlenmiştir. Birbirine yapışan mikrotaşıyıcılar, 7. gün analizleri için toplanırken kısmen birbirinden ayrılmıştır.

Mikroskopta incelendiğinde, ipek mikrotarıyıcıların parçalanmadığı, küresel morfolojilerini koruduğu, sadece birkaç mikrotarıyıcının yassı bir şekilde olduğu görülmüştür. Bu yassı mikrotarıyıcıların çevresinde de hücrelerin tutunmaya devam ettiği gözlenmiştir (Şekil 4.55, 10X görüntüsünde beyaz ok ile gösterilmiştir).

Dinamik hücre kültür koşulları kapsamında, hücrelerin yoğun bir şekilde çoğalıp mikrotarıyıcıları tabakalar halinde kapladıkları dikkat çekmektedir.



Şekil 4.55. 2,5 SF mikrotarıyıcılar üzerinde çoğalan Schwann hücrelerinin dinamik kültürdeki 7. gün mikroskop görüntüleri.

MTT Analizi

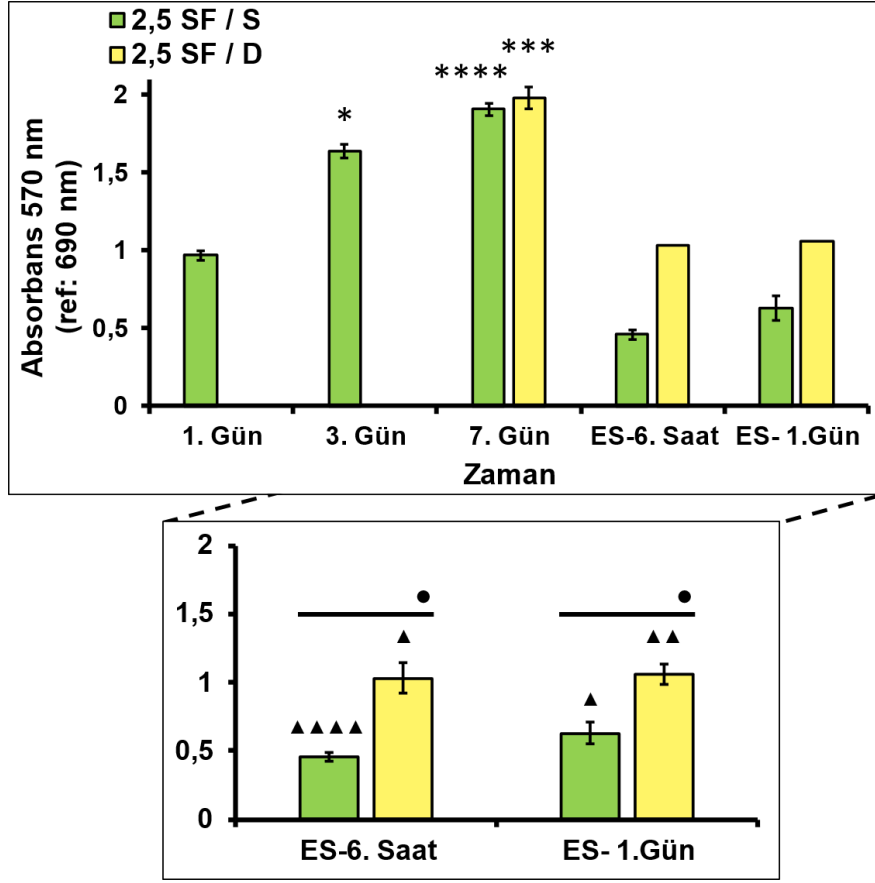
İpek fibroin mikrotarıyıcılar ile kültüre edilen Schwann hücrelerinin statik ve dinamik kültür koşullarındaki canlılığı, MTT analizi ile tespit edilmiştir (Şekil 4.56). Mikrotarıyıcılar analiz günlerinde, ilk saatlerden itibaren mor renk ile boyanmıştır. Statik hücre kültüründe çözdürülen mor renkli çözelti, 1. günde $0,97 \pm 0,03$, 3. günde $1,64 \pm 0,04$ ve 7. günde $1,91 \pm 0,04$ absorbans değerinde ölçülmüştür.

Birinci gün kontrol olarak kabul edildiğinde, 3. ve 7. gündeki hücre canlılığı anlamlı bir şekilde artmıştır (Sırasıyla $*p<0,05$, $****p<0,0001$). Böylece mikrotaşyıcı yüzeylerine ekilen hücre yoğunluğunun artırılmasıyla, kültür süresinin azaltılabileceği ön görülmektedir.

Statik kültürde çoğalan hücreli mikrotaşyıcılar 18 G spinal iğneden tıkanıklık olmaksızın enjekte edilmiş ve enjeksiyon sonrası 6. sa, $0,46\pm 0,03$ absorbans değeri ölçülmüştür. Enjeksiyon uygulamasıyla 7. güne göre hücre canlılığında anlamlı bir düşüş olmuştur ($\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle p<0,0001$). Enjeksiyon sonrası 1. günde ise canlılık $0,63\pm 0,08$ absorbans değerinde artmıştır ($\blacktriangle p<0,05$).

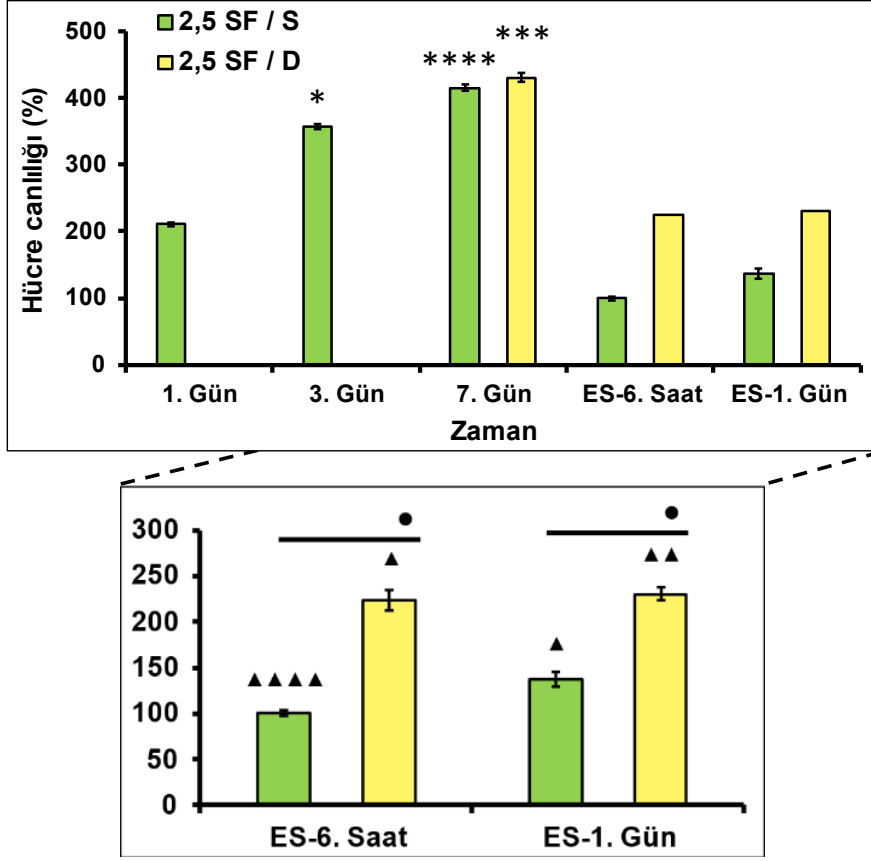
Dinamik hücre kültürünün 7. gününde $1,98 \pm 0,1$ absorbans değeri ölçülmüştür ($***p<0,001$). Statik ve dinamik hücre kültürünün 7. gün absorbans değerleri arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Bunun nedeni 690 nm referans olmak üzere 570 nm'de dalga boyundaki mikropilaka okuyucunun kalibrasyon ayarınının 1,99 absorbans değerinde olmasıdır [91]. Ayrıca MTT çözeltisinin indirgenmesi hücrenin metabolizmasına bağlıdır ve hücre sayısı ile ilişkilidir. Ancak hücreler sabit faza ulaşırsa, ölçülen absorbans ile hücre sayısı doğrusal değildir [92]. Bu nedenle dinamik hücre kültüründe çoğalan hücreler, sabit faza ulaşarak maksimum absorbans değerini temsil etmektedir.

Birbirine hücreler aracılığıyla bağlanan mikrotaşyıcılar, yığın oluşturmalarına rağmen enjekte edilebilmiştir. Mikrotaşyıcı çapın küçük olması ($211,9\pm 45,8 \mu\text{m}$) tıkanıklık sorunun önüne geçmiştir. Enjeksiyon sonrası 6. sa $1,03 \pm 0,11$ ($\blacktriangle p<0,05$) ve 1. gün $1,06 \pm 0,07$ ($\blacktriangle\blacktriangle p<0,01$) absorbans değerleri ölçülmüştür. Her iki kültür koşulunda, enjeksiyon sonrasında hücre canlılıkları yedinci güne göre anlamlı olarak düşmüştür. İki kültür koşulu değerlendirildiğinde; dinamik kültürdeki mikrotaşyıcılarda çoğalan hücreler enjekte edildiğinde, daha yüksek hücre canlılığı göstermiştir ($\bullet p<0,05$). Hücreler, birbirine yapışan mikrotaşyıcılar sayesinde mekanik hasardan daha az etkilenmişlerdir. Böylece dinamik kültürün, hücre canlılığını sürdürmek açısından daha avantajlı olduğu görülmektedir.



Şekil 4.56. İpek mikrotayııcılar/Schwann hücrelerinin statik ve dinamik koşullardaki kültürasyonu boyunca elde edilen absorbans değerleri (İstatistiksel anlamlı farklılıklar $n=3$, $*p<0,05$, $***p<0,001$, $****p<0,0001$ mikrotayııcı yüzeylerinde çoğalan hücrelerin 1. gün canlılık değeri kontrol olarak kabul edildiğinde, $\blacktriangle p<0,05$, $\blacktriangle\blacktriangle p<0,01$, $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle p<0,0001$ mikrotayııcı yüzeylerinde çoğalan hücrelerin 7. gün canlılık değeri kontrol olarak kabul edildiğinde ve $\bullet p<0,05$ aynı günde farklı grupların karşılaştırıldığı durum) (Başlangıç hücre yoğunluğu: 1×10^5 hücre/mL'dir).

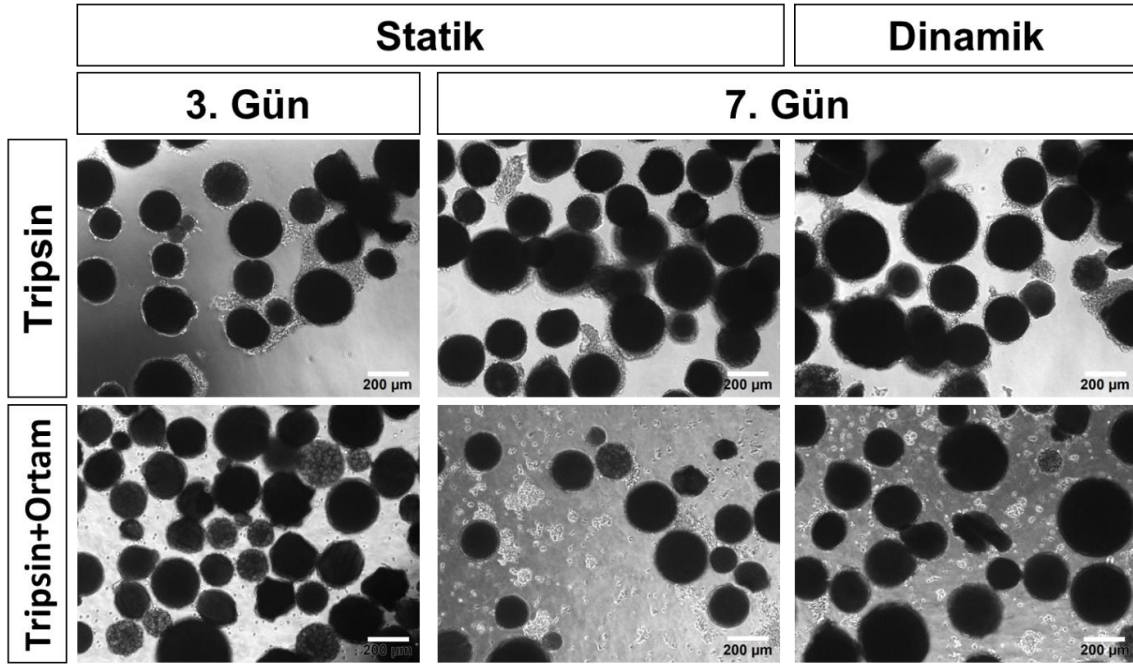
TCPS yüzeylerinde 1. günde çoğalan Schwann hücrelerinin canlılığı %100 kabul edilmiştir. Statik ve dinamik kültürden elde edilen canlılık, TCPS'e göre oranlanarak hücre canlılıkları hesaplanmıştır (Şekil 4.57).



Şekil 4.57. İpek mikrotarıyıcılar/Schwann hücrelerinin statik ve dinamik koşullardaki kültürasyonu boyunca elde edilen hücre canlılığı (İstatistiksel anlamlı farklılıklar $n=3$, $*p<0,05$, $***p<0,001$, $****p<0,0001$ mikrotarıyıcı yüzeylerinde çoğalan hücrelerin 1. gün canlılık değeri kontrol olarak kabul edildiğinde, $\blacktriangle p<0,05$ $\blacktriangle\blacktriangle p<0,01$, $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle p<0,0001$ mikrotarıyıcı yüzeylerinde çoğalan hücrelerin 7. gün canlılık değeri kontrol olarak kabul edildiğinde ve $\bullet p<0,05$ aynı günde farklı grupların karşılaştırıldığı durum).

Hücre Sayımı

Şekil 4.58'de tripsin varlığında mikrotarıyıcı çevresinde Schwann hücreleri görülmektedir. Mikrotarıyıcı yüzeylerinden hücreleri ayırmak kolay olmamıştır. Tripsin üzerine büyüme ortamı eklenip, pipetaj yapıldığında ise hücrelerin bir kısmı mikrotarıyıcı yüzeylerinden ayrılmıştır. Kontrol grubunda çoğalan Schwann hücrelerinin ise gruplar halinde yüzeyden kalktığı görülmüştür.



Şekil 4.58. Tripsin ile muamele edilerek mikrot taşıyıcı yüzeylerinden kaldırılan Schwann hücrelerinin statik-dinamik kültürdeki 3. ve 7. gün mikroskop görüntüleri (10X).

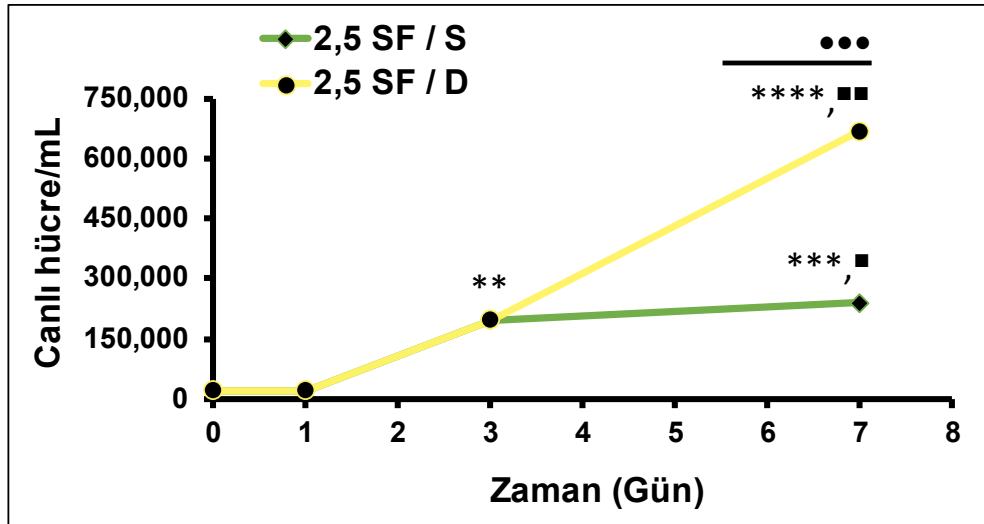
İpek mikrot taşıyıcı yüzeylerinden 1., 3. ve 7. günde sayılan toplam Schwann hücresi sayısı Çizelge 4.6'da gösterilmiştir. Başlangıç hücre yoğunluğu 1×10^5 hücre/mL olması göz önünde bulundurularak, ilk gün mikrot taşıyıcı yüzeylerine tutunan $2,3 \times 10^4 \pm 1,0$ hücre sayılmıştır. Başlangıç hücre yoğunluğu 2×10^4 hücre/mL ekildiğinde de, ilk gün $1,8 \times 10^4 \pm 1,2$ hücre sayılmıştır (Şekil 4.45). Ekilen hücre sayısı artılırsa da ilk günde tutunan hücre sayısı arasında anlamlı bir fark yoktur. Buradan da mikrot taşıyıcıların belirli bir yüzey alanını temsil ettiği görülmektedir. Hücre yoğunluğunun 2×10^4 hücre/mL olması, ipek mikrot taşıyıcılara tutunma başarısını desteklemektedir.

Kültürün üçüncü gününde $2,2 \times 10^5 \pm 0,9$ hücre sayılmıştır ($**p < 0,01$). Buradan mikrot taşıyıcı yüzeylerine tutunan hücrelerin üzerlerine çevredeki hücrelerin de tutunup çoğalmaya devam ettiği kantitatif olarak belirlenmiştir. Statik hücre kültürünün 7. günü de 3. gün sayım sonucuna yakın değerdedir. Başlangıç hücre sayısına göre, 7. günde hücre sayısı 2,5 kat artmıştır ($***p < 0,001$, $\blacksquare p < 0,05$).

Dinamik hücre kültürü sonucunda ise, başlangıç hücre sayısına göre 7. günde 7 kat artmıştır (**** $p<0,0001$, ■■ $p<0,01$). Statik ve dinamik kültür koşulları ile elde edilen hücre sayılarındaki farklılık, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (●●● $p<0,001$) (Şekil 4.59).

Çizelge 4.6. Statik ve dinamik kültür koşulunda elde edilen Schwann hücre sayısı.

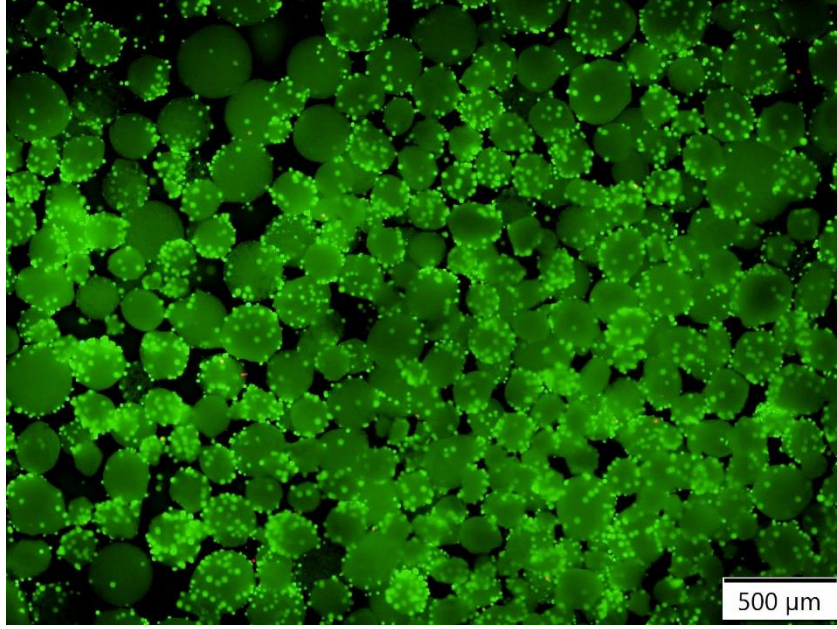
Gün	Başlangıç (hücre/mL)	1 (hücre/mL)	3 (hücre/mL)	7 (hücre/mL)
Mikrotaşıyıcı				
2,5 SF / Statik	1×10^5	$2,3 \times 10^4 \pm 1,0$	$2,2 \times 10^5 \pm 0,9$	$2,6 \times 10^5 \pm 0,5$
2,5 SF / Dinamik				$7,0 \times 10^5 \pm 1,0$



Şekil 4.59. İpek mikrotaşıyıcı yüzeylerinden tripsinizasyon ile kaldırılan canlı hücre sayısı. (İstatistiksel anlamlı farklılıklar $n=3$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$ mikrotaşıyıcı yüzeylerinde çoğalan hücrelerin 1. gündeki hücre sayısı kontrol olarak kabul edildiğinde, ■ $p<0,05$, ■■ $p<0,01$ 3. gün kontrol olarak kabul edildiğinde ve ●●● $p<0,001$ aynı günde farklı grupların karşılaştırıldığı durum). (Başlangıç hücre yoğunluğu: 1×10^5 hücre/mL'dir).

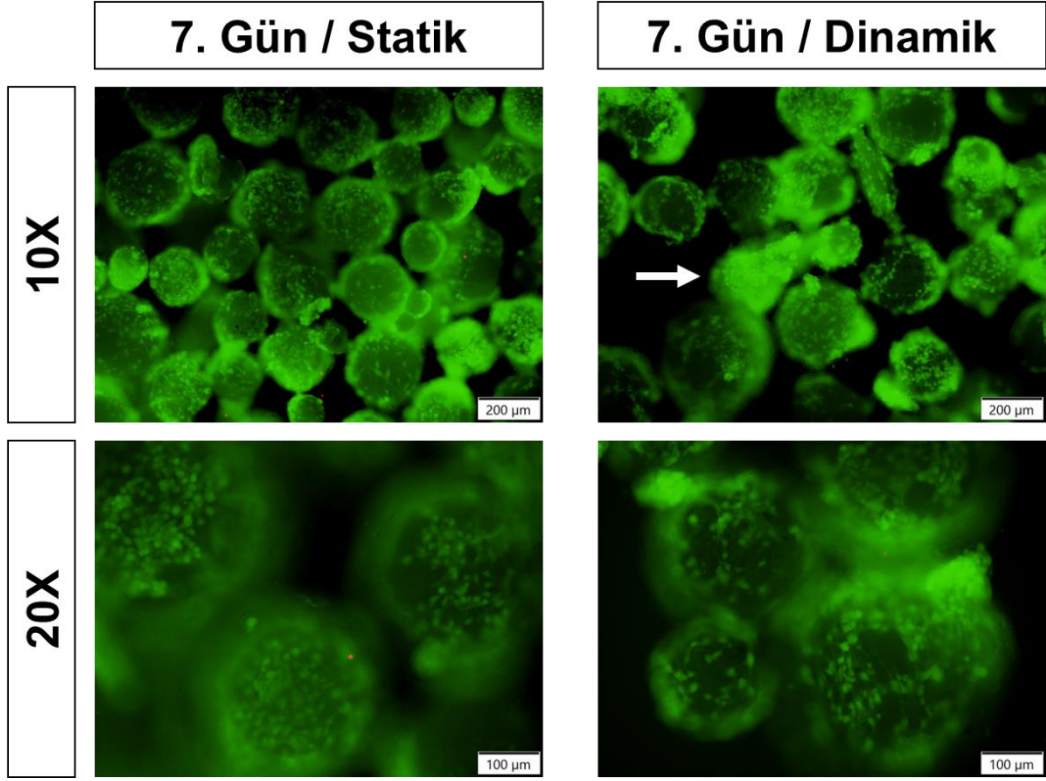
Canlı/Ölü Hücrelerin Görüntülenmesi

Statik ve dinamik kültür koşullarında, ipek fibroin mikrotarıyıcı yüzeylerindeki canlı hücreler Calcein AM boyası ile yeşile, ölü hücreler EthD-1 boyası ile kırmızıya boyanmıştır (Şekil 4.60 ve 4.61).



Şekil 4.60. Schwann hücrelerinin statik kültürdeki 3. gününde canlı/ölü hücre boyama görüntüsü
(Canlı hücreler yeşile, ölü hücreler kırmızıya boyanmıştır).

Şekil 4.60 ve 4.61'de yok denecek kadar az ölü hücreye (Eth-1, kırmızı) rastlanmış, hücre canlılığının (Calcein-AM, yeşil) 3. günde bile oldukça yüksek olduğu görülmüştür. Ayrıca daha küçük çapa sahip mikrotarıyıcılara, hücrelerin sayıca daha fazla tutunup, çoğaldıkları dikkat çekmektedir. Bunun sebebi olarak, daha dar bir alanın hücrelerin birbirleriyle daha çok etkileşime geçebilmesiyle ilişkilendirilebilir.

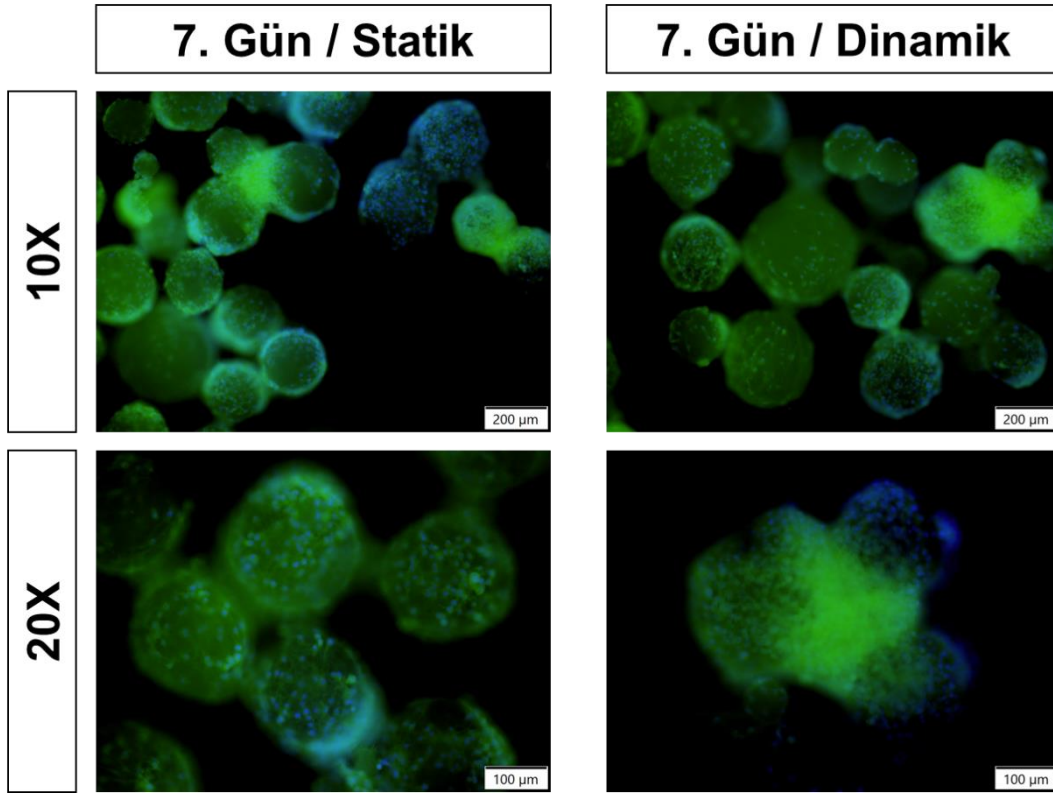


Şekil 4.61. Statik ve dinamik kültürün 7. gününde 2,5 SF mikrot taşıyıcı yüzeylerinde çoğalan Schwann hücrelerinin canlı/ölü hücre boyama görüntüleri (Canlı hücreler yeşile, ölü hücreler kırmızıya boyanmıştır).

Dinamik kültür koşulları sonucunda oluşan mikrot taşıyıcı/hücre, hücre/hücre yapıları floresan mikroskopunda belirgin bir şekilde görülmektedir (Şekil 4.61'de beyaz ok ile gösterilmiştir).

Hücre iskeleti/Çekirdek Boyaması

İpek mikrot taşıyıcı yüzeylerinde çoğalan Schwann hücre iskeleti Alexa Fluor® 488 Phalloidin ile yeşile, hücre çekirdeği ise DAPI ile mavi boyanmıştır. Şekil 4.62'de kültürlerin 7. gününde yapılan floresan boyama görüntüleri verilmiştir.

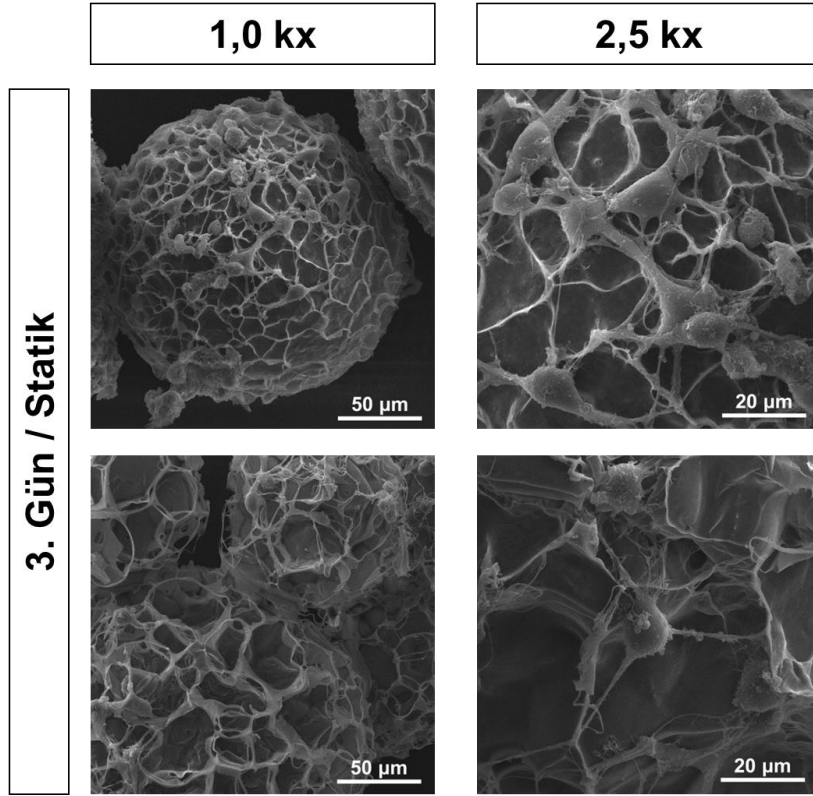


Şekil 4.62. Schwann hücrelerinin statik ve dinamik kültürlerindeki 7. gününde Alexa Fluor® Phalloidin/DAPI boyama görüntüleri (Hücre iskeleti yeşil; hücre çekirdeği mavi ile boyanmıştır).

Alexa Fluor® 488 Phalloidin/DAPI boyaması ile yapılan morfolojik incelemede, Schwann hücrelerinin karakteristik, iğsi morfolojiye sahip oldukları görülmektedir. Dinamik koşullardaki ipek mikrotaşyıcı/hücre yığınları, yoğun ışığa vererek dikkat çekmektedir.

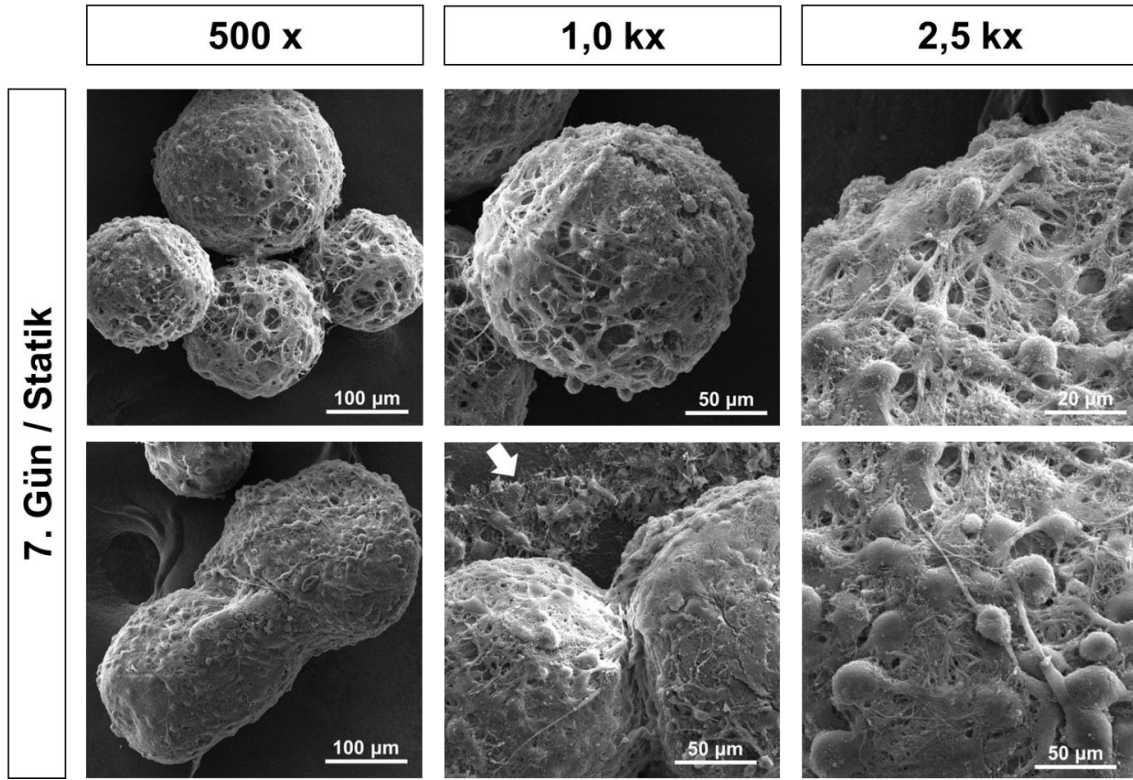
SEM Analizi

Statik ve dinamik kültürlerdeki ipek mikrotarıyıcılar-Schwann hücrelerinin etkileşimi SEM ile incelenmiş ve görüntüler Şekil 4.63-4.64'te verilmiştir.



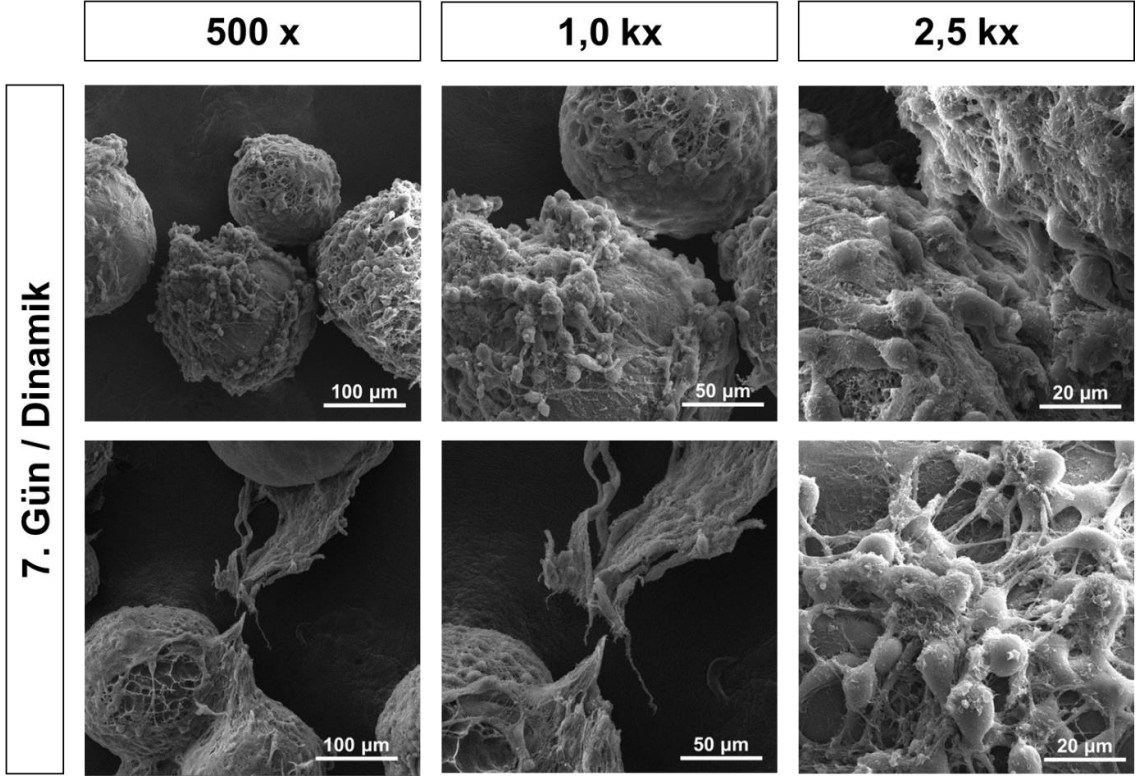
Şekil 4.63. Statik kültürdeki ipek mikrotarıyıcılar üzerinde tutunan Schwann hücrelerinin 3. gün SEM görüntüleri.

Schwann hücreleri, ön kenarlarından (aksiyal lamellipod) ve hücreler boyunca (radyal lamellipod) çıkıntı yapan lamellipod yoluyla diğer hücrelerle etkileşime girer [93]. Şekil 4.63 incelendiğinde, mikrotarıyıcı yüzeyine tutunan Schwann hücrelerinin birbirleri ile etkileşime girmek için uzattığı lamellipodları görülmektedir.



Şekil 4.64. Statik kültürdeki ipek mikrotarıyıcılar üzerinde yayılan Schwann hücrelerinin 7. gün SEM görüntüleri.

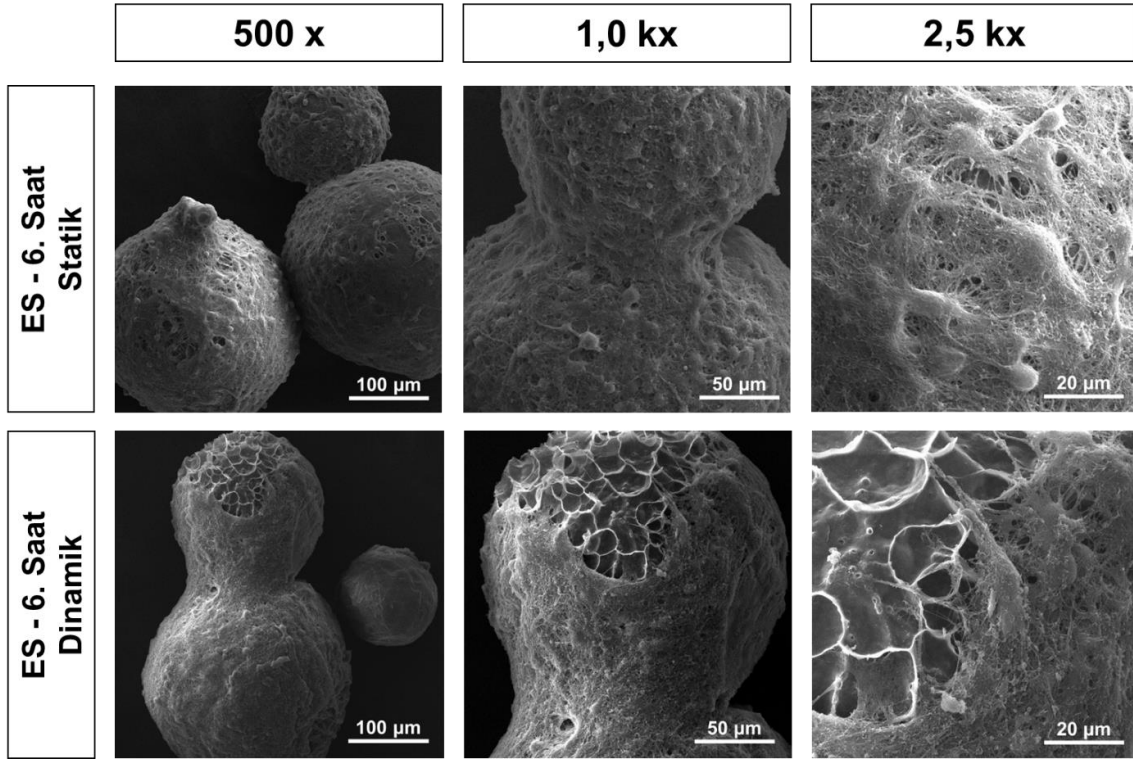
Statik kültürün 7. gününde, mikrotarıyıcı yüzeylerinde oldukça yoğun çoğalan Schwann hücreleri görülmektedir (Şekil 4.64). Hücrelerin tüm mikrotarıyıcı yüzeyini kapladığı ve mikrotarıyıcıları birbirine yapıştırıp üzerinde kat kat hücre tabakalarının oluştuğu dikkat çekmektedir. Katman halinde bir grup hücrenin, karbon bandı üzerine döküldüğü beyaz ok ile gösterilmiştir.



Şekil 4.65. Dinamik kültürdeki ipek mikrot taşıyıcılar üzerinde yayılan Schwann hücrelerinin 7. gün SEM görüntüleri.

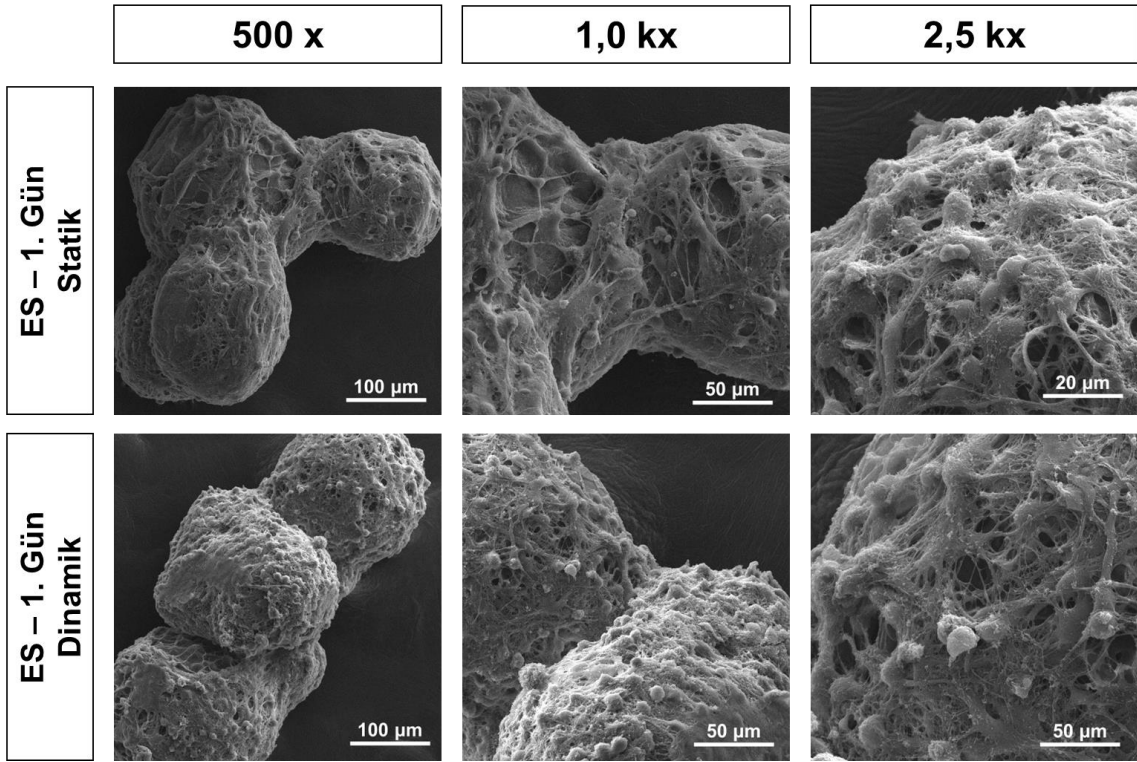
Dinamik hücre kültürü kapsamında, mikrot taşıyıcı yüzeylerinde yığın oluşturan hücreler görülmektedir (Şekil 4.65). Karıştırmalı kap biyoreaktör içerisinde örnek alınırken bir miktar ayırım olmasına rağmen, mikrot taşıyıcılar hücreler aracılığıyla birbirine yapışmayı sürdürmektedir. Mikrot taşıyıcı yüzeylerinden hücrelerin tabaka halinde ayrılması gösterilmiştir.

Shakhbazov ve ark. tarafından bildirilen bir çalışmada, Cytodex mikrot taşıyıcılarına Schwann hücrelerinin tutunmasını kolaylaştırmak için poly-D-lizin/laminin ile kaplanmıştır. Bu çalışma Schwann hücrelerinin, mikrot taşıyıcı bazlı biyoreaktörde çoğalmasını içeren ilk rapordur [94]. Ancak bilindiği üzere, Cytodex mikrot taşıyıcıları biyolojik olarak parçalanmamaktadır. Sinir rejenerasyonundaki uygulamalarda, hücrelerin nakil öncesinde biyolojik olarak parçalanmayan mikrot taşıyıcılardan toplanması gerekecektir. Hücre dağıtımı için alternatif bir seçenek olan tez çalışmasında, biyolojik olarak parçalanabilen 2,5 SF mikrot taşıyıcılarının potansiyeli değerlendirilmiştir.



Şekil 4.66. Statik ve dinamik kültürlerdeki ipek mikrotarıyıcılar/Schwann hücrelerinin enjeksiyon sonrası 6. saat SEM görüntüleri.

Enjeksiyonun ipek mikrotarıyıcı ve Schwann hücrelerine bir zarar vermediği görülmektedir (Şekil 4.66 ve 4.67). Altıncı saat ve birinci gün SEM görüntüleri incelendiğinde, mikrotarıyıcı yüzeylerinde hücrelerin korunduğu ve canlılığın devam ettiği anlaşılmaktadır.



Şekil 4.67. Statik ve dinamik kültürlerdeki ipek mikrotaşıyıcılar/Schwann hücrelerinin enjeksiyon sonrası 1. gün SEM görüntüleri.

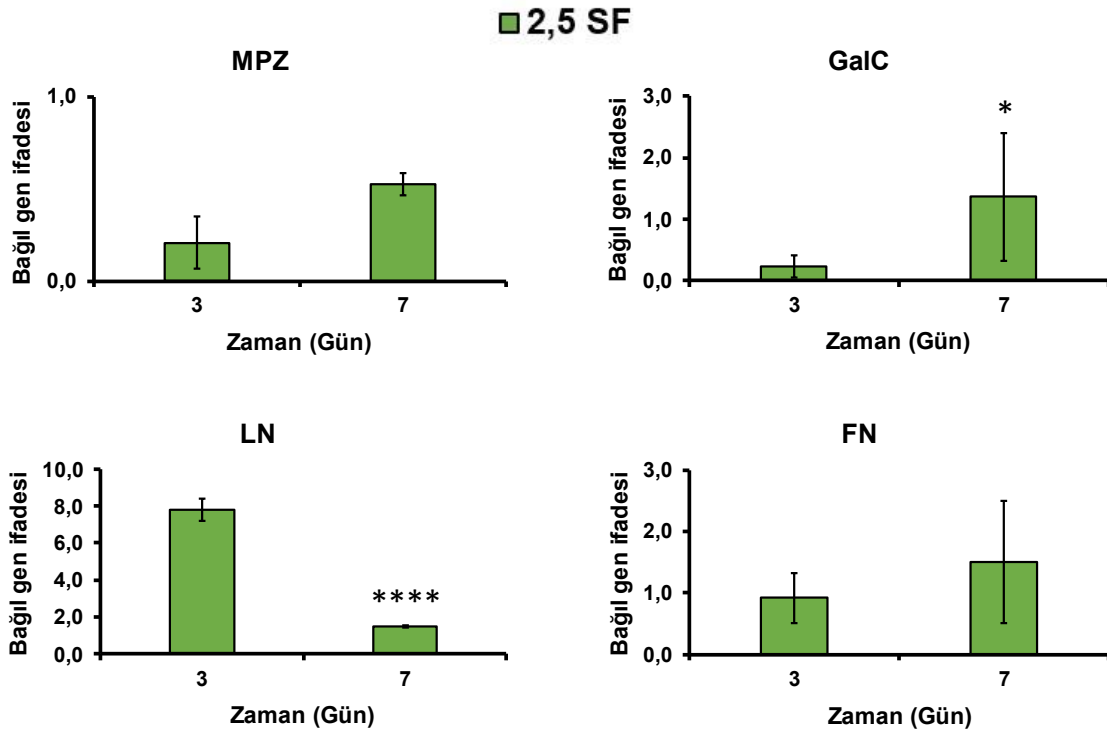
İpek mikrotaşıyıcılar yüzeyinde Schwann hücreleri, iki kültür koşulunda da başarı ile çoğaltılmıştır. İpek mikrotaşıyıcılar, enjeksiyon sonrasında sürdürülen hücre canlılığı ile ilişkilendirilmiştir. Diğer analizler gibi SEM analizi de bu sonucu doğrulamaktadır. Statik ve dinamik hücre kültürleri arasındaki niceliksel fark, MTT ve hücre sayım analizleri ile ortaya konmuştur.

4.3.4. Gen Ekspresyon Seviyeleri

Çalışmalar kapsamında ilk yapılan statik hücre kültüründeki, ipek fibroin mikrotaşıyıcılar üzerinde çoğalan Schwann hücrelerinin (1 mg 2,5 SF/2x10⁴ hücre) gen ekspresyon seviyeleri kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile tespit edilmiştir. Bağlı gen ifadesi için referans gen olarak *β-aktin* kullanılmıştır. Hedef gen, *β-Aktin* ifadesine göre normalize edilmiştir (Şekil 4.68).

İpek mikrotayııcı yüzeylerindeki Schwann hücrelerinin 3. gündeki belirteçleri; *MPZ* ($0,2\pm0,1$), *GalC* ($0,2\pm0,0$), *LN* ($7,8\pm0,4$), *FN* ($0,9\pm0,3$) ifade olmuştur. Yedinci günde ise *GalC* ($1,4\pm0,1$) ekspresyonu artmış ($*p<0,05$), *LN* ($1,5\pm0,1$) ekspresyonu azalmıştır ($****p<0,0001$). *FN* ($1,5\pm1,2$) ve *MPZ* ($0,5\pm0,1$) seviyeleri de artmış, ancak bu artış anlamlı değildir.

İpek fibroin mikrotayııcı yüzeylerindeki Schwann hücrelerinde gen ifadesinin korunduğu sonucuna ulaşılmıştır.



Şekil 4.68. İpek mikrotayııcı yüzeylerindeki Schwann hücresi belirteçlerinin (*MPZ*, *GalC*, *LN* ve *FN*) 3. ve 7. gündeki RT-PCR analizi (İstatistiksel anlamlı farklılıklar $n=3$, aynı grup farklı günlerde $*p<0,05$, $***p<0,001$, $****p<0,0001$ ve aynı günde farklı grupların karşılaştırıldığı durum $\bullet\bullet p<0,01$, $\bullet\bullet\bullet\bullet p<0,0001$).

5. YORUM

Sunulan yüksek lisans tez çalışmasında, ipek fibroin mikrotarıyıcılar üzerinde Schwann hücrelerinin çoğaltılarak omurilik yaralanmalarına yönelik enjekte edilebilir bir sistemin oluşturulması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda;

- ✓ Doğal bir polimer olan ipek fibroin diğer biyomalzemelere göre kolay işlenmesi, ucuz maliyetiyle kaynaklarının bol bulunması, oksijen ve su geçirgenliğiyle iyi derecede biyouyumluluk göstermesi, yüksek mekanik mukavemeti ve kontrol edilebilir biyobozunurluk özelliklerine sahip olmasından dolayı tercih edilmiştir.
- ✓ Emülsiyon haline getirilmiş faz ayrımı ile dondurarak kurutma yöntemi kullanılarak ipek fibroin mikrotarıyıcılar üretilmiştir. Yöntemdeki karıştırma hızı ve polimer konsantrasyonu mikrotarıyıcıların boyutunu etkilerken, donma aşamasının mikrotarıyıcıların gözenek boyutunu etkilediği gösterilmiştir. Tüm parametreler hedeflenen mikrotarıyıcı özelliklerine göre uyarlanmıştır.
- ✓ İpek fibroin temelli farklı biyomalzemelerde hücre tutunma özellikleri zayıf olabilmektedir. Tez çalışması kapsamında, hücre tutunma özelliğini iyileştirmek için yüzey kimyasının işlevselleştirilmesi yerine, yüzey topografyası kullanılmıştır. Bu yöntem potansiyel olarak güvenilir, tekrarlanabilir ve ucuzdur. Doku mühendisliği çalışmalarına yönelik bu tür işlevsel yaklaşımlar, yapı-fonksiyonel ilişkilerin uygun şekilde değerlendirilmesiyle ipeğin üç boyutlu bir malzeme yüzeyinde yeniden tasarlanmasını içermektedir.
- ✓ Yüksek gözeneklilik, biyomalzemelerde düşük mekaniksel dayanım ile ilişkilendirilmektedir. Tez çalışması kapsamında geliştirilen mikrotarıyıcılar uygun yüzey çapı ve topografik özellikleri ile temsil edilmiştir.

- ✓ Mikrotaşıyıcılar ve hücre yapılarının vücuda enjeksiyonu ile implante edilen hücrelerin, hem miktar hem de fonksiyon ihtiyaçlarını karşılayarak doku rejenerasyon yeteneğini geliştirebilmesi için *in-vitro*'da çoğalması gerekmektedir. Sunulan tez çalışmasında; ipek fibroin mikrotasıyıcılarda L929 fibroblast, MC3T3-E1 pre-osteoblast, S42-Schwann hücre hatlarının çoğalması test edilmiştir. Üç boyutlu küresel morfoloji ve karakteristik yüzeye sahip ipek fibroin mikrotasıyıcılara üç hücre hattı da iyi derecede biyouyumluluk göstermiştir. Bu yapıların *in-vitro* ortamda enjekte edilmesiyle hücre canlılığının sürdürüldüğü gösterilmiştir.
- ✓ Üç farklı hücrenin ipek mikrotasıyıcılardaki proliferasyonunu karşılaştırarak benzer sonuçları almak, çalışmanın güvenilirliğini güçlendirmiştir.
- ✓ Üç hücre hattı arasında başlangıç hücre sayısı ile 1. gün hücre sayıları karşılaştırıldığında, Schwann hücrelerinin daha fazla sayıda mikrotasıyıcı yüzeyine tutunduğu görülmüştür. Bu durum Schwann hücrelerinin tutunabileceği bir yüzeye daha çok ihtiyaç duyduğu şeklinde yorumlanabilir.
- ✓ Hasarlı omuriliğe yönelik hücre transplantasyon çalışmaları olmasına rağmen, nakledilen hücrelerin rejenerasyonu teşvik ettiği ve fonksiyonel gelişmelere aracılık ettiği mekanizmalar hakkındaki bilgiler sınırlıdır. Sinir doku mühendisliği alanında daha fazla araştırma yapılmasına ihtiyaç olduğu açıktır. Sunulan tez çalışmasında, ipek fibroin mikrotasıyıcıların ve Schwann hücrelerinin uygun kombinasyonu, omurilik yaralanmalarına yönelik tedavi yaklaşımında fonksiyonel iyileşmeyi sağlamak üzere, aksonal rejenerasyonun desteğini sağlayan bir doku mühendisliği stratejisi olarak değerlendirilmektedir. Bu kapsamda; sağlık alanında kullanılabilecek bir hücresel ürün elde edilmiş, günümüz bilim ve teknolojisine yeni bir yaklaşım kazandırılmıştır.

6. KAYNAKLAR

- [1] H. Tavassoli, S.N. Alhosseini, A. Tay, P.P. Chan, S.K.W. Oh, M.E. Warkiani, Large-scale production of stem cells utilizing microcarriers: a biomaterials engineering perspective from academic research to commercialized products, *Biomaterials*, 181 (2018) 333-346.
- [2] R. Levato, J.A. Planell, M.A. Mateos-Timoneda, E. Engel, Role of ECM/peptide coatings on SDF-1 α triggered mesenchymal stromal cell migration from microcarriers for cell therapy, *Acta biomaterialia*, 18 (2015) 59-67.
- [3] J.-H. Park, R.A. Pérez, G.-Z. Jin, S.-J. Choi, H.-W. Kim, I.B. Wall, Microcarriers designed for cell culture and tissue engineering of bone, *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 19 (2013) 172-190.
- [4] S. Liu, T. Schackel, N. Weidner, R. Puttagunta, Biomaterial-supported cell transplantation treatments for spinal cord injury: challenges and perspectives, *Frontiers in cellular neuroscience*, 11 (2018) 430.
- [5] P. Assinck, G.J. Duncan, B.J. Hilton, J.R. Plemel, W. Tetzlaff, Cell transplantation therapy for spinal cord injury, *Nature neuroscience*, 20 (2017) 637-647.
- [6] S.G. Varadarajan, J.L. Hunyara, N.R. Hamilton, A.L. Kolodkin, A.D. Huberman, Central nervous system regeneration, *Cell*, 185 (2022) 77-94.
- [7] M. Harrow-Mortelliti, V. Reddy, G. Jimsheleishvili, *Physiology, spinal cord*, StatPearls Publishing, (2023).
- [8] M.B. Bunge, P.V. Monje, A. Khan, P.M. Wood, From transplanting Schwann cells in experimental rat spinal cord injury to their transplantation into human injured spinal cord in clinical trials, *Progress in brain research*, 231 (2017) 107-133.
- [9] S. Kandalam, P. De Berdt, B. Ucakar, K. Vanvarenberg, C. Bouzin, V. Gratpain, A. Diogenes, C.N. Montero-Menei, A. Des Rieux, Human dental stem cells of the apical papilla associated to BDNF-loaded pharmacologically active microcarriers (PAMs) enhance locomotor function after spinal cord injury, *International journal of pharmaceutics*, 587 (2020) 119685.

- [10] Z. Álvarez, A. Kolberg-Edelbrock, I. Sasselli, J. Ortega, R. Qiu, Z. Syrgiannis, P. Mirau, F. Chen, S. Chin, S. Weigand, Bioactive scaffolds with enhanced supramolecular motion promote recovery from spinal cord injury, *Science*, 374 (2021) 848-856.
- [11] G.J. Kidd, N. Ohno, B.D. Trapp, *Biology of Schwann cells*, Handbook of clinical neurology, 115 (2013) 55-79.
- [12] W. Pawlina, M.H. Ross, *Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology*, Lippincott Williams & Wilkins, Chapter 12, 2018.
- [13] P. Assinck, J.S. Sparling, S. Dworski, G.J. Duncan, D.L. Wu, J. Liu, B.K. Kwon, J. Biernaskie, F.D. Miller, W. Tetzlaff, Transplantation of skin precursor-derived Schwann cells yields better locomotor outcomes and reduces bladder pathology in rats with chronic spinal cord injury, *Stem Cell Reports*, 15 (2020) 140-155.
- [14] P.V. Monje, L. Deng, X.-M. Xu, Human Schwann cell transplantation for spinal cord injury: prospects and challenges in translational medicine, *Frontiers in cellular neuroscience*, 15 (2021) 690894.
- [15] J.C. Fontoura, C. Viezzer, F.G. Dos Santos, R.A. Ligabue, R. Weinlich, R.D. Puga, D. Antonow, P. Severino, C. Bonorino, Comparison of 2D and 3D cell culture models for cell growth, gene expression and drug resistance, *Materials Science and Engineering: C*, 107 (2020) 110264.
- [16] X. Huang, Z. Huang, W. Gao, W. Gao, R. He, Y. Li, R. Crawford, Y. Zhou, L. Xiao, Y. Xiao, *Current Advances in 3D Dynamic Cell Culture Systems*, Gels, 8 (2022) 829.
- [17] B. Li, X. Wang, Y. Wang, W. Gou, X. Yuan, J. Peng, Q. Guo, S. Lu, Past, present, and future of microcarrier-based tissue engineering, *Journal of orthopaedic translation*, 3 (2015) 51-57.
- [18] A.S. Simaria, S. Hassan, H. Varadaraju, J. Rowley, K. Warren, P. Vanek, S.S. Farid, Allogeneic cell therapy bioprocess economics and optimization: Single-use cell expansion technologies, *Biotechnology and bioengineering*, 111 (2014) 69-83.
- [19] A.v. van Wezel, Growth of cell-strains and primary cells on micro-carriers in homogeneous culture, *Nature*, 216 (1967) 64-65.

- [20] S. Derakhti, S.H. Safiabadi-Tali, G. Amoabediny, M. Sheikhpour, Attachment and detachment strategies in microcarrier-based cell culture technology: A comprehensive review, *Materials Science and Engineering: C*, 103 (2019) 109782.
- [21] J. Doctor, C. Petraglia, A. Loveland, M. Dietz, E. Minich, J. Leung, J. Hollinger, P. Campbell, Evaluating microcarriers for delivering human adult mesenchymal stem cells in bone tissue engineering, *Developmental Biology*, 247 (2002) 505-505.
- [22] Z. Zhou, W. Wu, J. Fang, J. Yin, Polymer-based porous microcarriers as cell delivery systems for applications in bone and cartilage tissue engineering, *International Materials Reviews*, 66 (2021) 77-113.
- [23] H. Chen, W. Song, F. Zhou, Z. Wu, H. Huang, J. Zhang, Q. Lin, B. Yang, The effect of surface microtopography of poly (dimethylsiloxane) on protein adsorption, platelet and cell adhesion, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 71 (2009) 275-281.
- [24] H. Chen, L. Yuan, W. Song, Z. Wu, D. Li, Biocompatible polymer materials: role of protein–surface interactions, *Progress in Polymer Science*, 33 (2008) 1059-1087.
- [25] J. Malda, C.G. Frondoza, Microcarriers in the engineering of cartilage and bone, *Trends in biotechnology*, 24 (2006) 299-304.
- [26] M. Kiremitçi, H. Cukurova, S. Özkar, Spectral characterization and thermal behaviour of crosslinked poly (hydroxyethylmethacrylate) beads prepared by suspension polymerization, *Polymer international*, 30 (1993) 357-361.
- [27] Y. Sun, X. Chi, H. Meng, M. Ma, J. Wang, Z. Feng, Q. Quan, G. Liu, Y. Wang, Y. Xie, Polylysine-decorated macroporous microcarriers laden with adipose-derived stem cells promote nerve regeneration in vivo, *Bioactive Materials*, 6 (2021) 3987-3998.
- [28] Y. Wang, X. Yuan, K. Yu, H. Meng, Y. Zheng, J. Peng, S. Lu, X. Liu, Y. Xie, K. Qiao, Fabrication of nanofibrous microcarriers mimicking extracellular matrix for functional microtissue formation and cartilage regeneration, *Biomaterials*, 171 (2018) 118-132.

[29] M. Ma, G. Liu, H. Meng, Y. Zheng, J. Peng, Y. Xie, Y. Wang, W. He, S. Wei, Injectable biomimetic shellfish macromolecule conductive microcarriers loaded with adipose-derived stem cells for nerve repair in vivo, *Applied Materials Today*, 25 (2021) 101195.

[30] A.S. Çakmak, *Biyofiziksel ve Biyokimyasal Uyarımlarla Desteklenmiş Doku İskeleleri ile Mezenkimal Kök Hücrelerin Osteojenik Farklılaşmasının İncelenmesi*, Fen Bilimleri Enstitüsü, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 2014.

[31] B. Kundu, N.E. Kurland, S. Bano, C. Patra, F.B. Engel, V.K. Yadavalli, S.C. Kundu, Silk proteins for biomedical applications: Bioengineering perspectives, *Progress in polymer science*, 39 (2014) 251-267.

[32] A. Veiga, F. Castro, F. Rocha, A. Oliveira, Silk-based microcarriers: current developments and future perspectives, *IET nanobiotechnology*, 14 (2020) 645-653.

[33] K.A. Luetchford, J.B. Chaudhuri, A. Paul, Silk fibroin/gelatin microcarriers as scaffolds for bone tissue engineering, *Materials Science and Engineering: C*, 106 (2020) 110116.

[34] S.D. Biman B. Mandal, Koel Choudhury and Subhas C. Kundu, Implication of Silk Film RGD Availability and Surface Roughness on Cytoskeletal Organization and Proliferation of Primary Rat Bone Marrow Cells, *Tissue Engineering Part A*, 16 (2010) 2129-2413.

[35] A.Y. Arkhipova, M. Nosenko, N. Malyuchenko, R. Zvartsev, A. Moisenovich, A. Zhdanova, T. Vasil'eva, E. Gorshkova, I. Agapov, M. Drutskaya, Effects of fibroin microcarriers on inflammation and regeneration of deep skin wounds in mice, *Biochemistry (Moscow)*, 81 (2016) 1251-1260.

[36] M. Kotliarova, V. Zhuikov, Y. Chudinova, D. Khaidapova, A. Moisenovich, A. Kon'kov, L. Safonova, M. Bobrova, A. Arkhipova, A. Goncharenko, Induction of osteogenic differentiation of osteoblast-like cells MG-63 during cultivation on fibroin microcarriers, *Moscow University Biological Sciences Bulletin*, 71 (2016) 212-217.

[37] A. Goncharenko, M. Kotlyarova, A. Moisenovich, A. Arkhipova, D. Kulikov, A. Konkov, A. Kulikov, A. Mashkov, I. Agapov, M. Moisenovich, Osteogenic differentiation of mouse bone marrow stromal cells on fibroin microcarriers, *Doklady Biochemistry and Biophysics*, Springer, (2017) 345-348.

- [38] A.Y. Arkhipova, M. Kotlyarova, S. Novichkova, O. Agapova, D. Kulikov, A. Kulikov, M. Drutskaya, I. Agapov, M. Moisenovich, New silk fibroin-based bioresorbable microcarriers, *Bulletin of experimental biology and medicine*, 160 (2016) 491-494.
- [39] S. Perteghella, E. Martella, L. De Girolamo, C. Perucca Orfei, M. Pierini, V. Fumagalli, D.V. Pintacuda, T. Chlapanidas, M. Viganò, S. Faragò, Fabrication of innovative silk/alginate microcarriers for mesenchymal stem cell delivery and tissue regeneration, *International journal of molecular sciences*, 18 (2017) 1829.
- [40] C. Perucca Orfei, G. Talò, M. Viganò, S. Perteghella, G. Lugano, F. Fabro Fontana, E. Ragni, A. Colombini, P. De Luca, M. Moretti, Silk/fibroin microcarriers for mesenchymal stem cell delivery: optimization of cell seeding by the design of experiment, *Pharmaceutics*, 10 (2018) 200.
- [41] P. Chen, Z. Zhou, W. Liu, T. Huang, W. Wu, M. Yi, C. Zhang, X. He, J. Fang, Preparation and properties of sodium alginate/silk fibroin microcarriers, *Journal of Macromolecular Science, Part B*, 61 (2022) 636-648.
- [42] J. Fang, D. Wang, F. Hu, X. Li, X. Zou, J. Xie, Z. Zhou, Strontium mineralized silk fibroin porous microcarriers with enhanced osteogenesis as injectable bone tissue engineering vehicles, *Materials Science and Engineering: C*, 128 (2021) 112354.
- [43] J. Qu, L. Wang, L. Niu, J. Lin, Q. Huang, X. Jiang, M. Li, Porous silk fibroin microspheres sustainably releasing bioactive basic fibroblast growth factor, *Materials*, 11 (2018) 1280.
- [44] F. Jativa, X. Zhang, Transparent silk fibroin microspheres from controlled droplet dissolution in a binary solution, *Langmuir*, 33 (2017) 7780-7787.
- [45] M. Srisa-Ard, Y. Baimark, Controlling conformational transition of silk fibroin microspheres by water vapor for controlled release drug delivery, *Particulate Science and Technology*, 31 (2013) 379-384.
- [46] G. Cetinkaya, A.S. Kahraman, M. Gümüşderelioğlu, S. Arat, M.A. Onur, Derivation, characterization and expansion of fetal chondrocytes on different microcarriers, *Cytotechnology*, 63 (2011) 633-643.

- [47] T. Okano, N. Yamada, M. Okuhara, H. Sakai, Y. Sakurai, Mechanism of cell detachment from temperature-modulated, hydrophilic-hydrophobic polymer surfaces, *Biomaterials*, 16 (1995) 297-303.
- [48] J. Zhang, Z. Cui, R. Field, M.G. Moloney, S. Rimmer, H. Ye, Thermo-responsive microcarriers based on poly (N-isopropylacrylamide), *European Polymer Journal*, 67 (2015) 346-364.
- [49] A.T.-L. Lam, J. Li, J.P.-W. Toh, E.J.-H. Sim, A.K.-L. Chen, J.K.-Y. Chan, M. Choolani, S. Reuveny, W.R. Birch, S.K.-W. Oh, Biodegradable poly- ϵ -caprolactone microcarriers for efficient production of human mesenchymal stromal cells and secreted cytokines in batch and fed-batch bioreactors, *Cytotherapy*, 19 (2017) 419-432.
- [50] Z. Zhang, T.W. Eyster, P.X. Ma, Nanostructured injectable cell microcarriers for tissue regeneration, *Nanomedicine*, 11 (2016) 1611-1628.
- [51] K.J. Burg, T. Boland, Minimally invasive tissue engineering composites and cell printing, *IEEE engineering in medicine and biology magazine*, 22 (2003) 84-91.
- [52] J. Malda, E. Kreijveld, J. Temenoff, C. Van Blitterswijk, J. Riesle, Expansion of human nasal chondrocytes on macroporous microcarriers enhances redifferentiation, *Biomaterials*, 24 (2003) 5153-5161.
- [53] Y.M. Lin, A.T.L. Lam, J. Lee, T.K. Leng, E. Sim, L. Jian, J.P.W. Toh, X. Ren, B.W. Tan, M. Choolani, Human early mesenchymal stromal cells delivered on porous lightweight biodegradable polycaprolactone-based microcarriers result in improved cartilage formation, *Materialia*, 13 (2020) 100851.
- [54] P.S. Couto, M. Rotondi, A. Bersenev, C. Hewitt, A. Nienow, F. Verter, Q. Rafiq, Expansion of human mesenchymal stem/stromal cells (hMSCs) in bioreactors using microcarriers: lessons learnt and what the future holds, *Biotechnology Advances*, 45 (2020) 107636.
- [55] S.-L. Ding, X. Liu, X.-Y. Zhao, K.-T. Wang, W. Xiong, Z.-L. Gao, C.-Y. Sun, M.-X. Jia, C. Li, Q. Gu, Microcarriers in application for cartilage tissue engineering: Recent progress and challenges, *Bioactive Materials*, 17 (2022) 81-108.

- [56] C. Attanasio, P.A. Netti, Bioreactors for cell culture systems and organ bioengineering, *Kidney Transplantation, Bioengineering and Regeneration*, (2017) 889-899.
- [57] A.-C. Tsai, C.A. Pacak, Bioprocessing of human mesenchymal stem cells: From planar culture to microcarrier-based bioreactors, *Bioengineering*, 8 (2021) 96.
- [58] J. Zhao, M. Griffin, J. Cai, S. Li, P.E. Bulter, D.M. Kalaskar, Bioreactors for tissue engineering: An update, *Biochemical Engineering Journal*, 109 (2016) 268-281.
- [59] M. Kiremitçi, Süspansiyon Polimerizasyonu ile Üretilen Akrilik ve Alkil Plazmaları ile Modifiye Edilen Polistiren Bazlı Polimerik Mikrot taşıyıcılar ile Desteklenmiş BHK Hücre Kültürü ve Şap Virüsü Üretiminin Deneysel ve Matematiksel Olarak İncelenmesi, *Fen Bilimleri Enstitüsü, Hacettepe Üniversitesi, Ankara*, 1988.
- [60] S. Meghezi, D.G. Seifu, N. Bono, L. Unsworth, K. Mequanint, D. Mantovani, Engineering 3D cellularized collagen gels for vascular tissue regeneration, *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (2015) e52812.
- [61] M. Voigt, M. Schauer, D. Schaefer, C. Andree, R. Horch, G. Stark, Cultured epidermal keratinocytes on a microspherical transport system are feasible to reconstitute the epidermis in full-thickness wounds, *Tissue engineering*, 5 (1999) 563-572.
- [62] H.J. Chung, I.K. Kim, T.G. Kim, T.G. Park, Highly open porous biodegradable microcarriers: in vitro cultivation of chondrocytes for injectable delivery, *Tissue Engineering Part A*, 14 (2008) 607-615.
- [63] D.N. Rockwood, R.C. Preda, T. Yücel, X. Wang, M.L. Lovett, D.L. Kaplan, Materials fabrication from Bombyx mori silk fibroin, *Nature protocols*, 6 (2011) 1612-1631.
- [64] W. Sun, D.A. Gregory, M.A. Tomeh, X. Zhao, Silk fibroin as a functional biomaterial for tissue engineering, *International Journal of Molecular Sciences*, 22 (2021) 1499.
- [65] X. Hu, K. Shmelev, L. Sun, E.-S. Gil, S.-H. Park, P. Cebe, D.L. Kaplan, Regulation of silk material structure by temperature-controlled water vapor annealing, *Biomacromolecules*, 12 (2011) 1686-1696.

- [66] D. Çetin Altındal, E.N. James, D.L. Kaplan, M. Gümüşderelioğlu, Melatonin-induced osteogenesis with methanol-annealed silk materials, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 34 (2019) 291-305.
- [67] J. Li, A.T.-L. Lam, J.P.W. Toh, S. Reuveny, S.K.-W. Oh, W.R. Birch, Tunable volumetric density and porous structure of spherical poly- ϵ -caprolactone microcarriers, as applied in human mesenchymal stem cell expansion, *Langmuir*, 33 (2017) 3068-3079.
- [68] G. Chen, R. Wei, X. Huang, F. Wang, Z. Chen, Synthesis and assessment of sodium alginate-modified silk fibroin microspheres as potential hepatic arterial embolization agent, *International journal of biological macromolecules*, 155 (2020) 1450-1459.
- [69] M. Li, M. Ogiso, N. Minoura, Enzymatic degradation behavior of porous silk fibroin sheets, *Biomaterials*, 24 (2003) 357-365.
- [70] B. Topuz, Sinir Doku Mühendisliği için İletken Poli (Gliserol-Sebakat) Kompozitlerinin Geliştirilmesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 2021.
- [71] Z. Yuan, X. Yuan, Y. Zhao, Q. Cai, Y. Wang, R. Luo, S. Yu, Y. Wang, J. Han, L. Ge, Injectable GelMA cryogel microspheres for modularized cell delivery and potential vascularized bone regeneration, *Small*, 17 (2021) 2006596.
- [72] K.W. Wissemann, B.S. Jacobson, Pure gelatin microcarriers: synthesis and use in cell attachment and growth of fibroblast and endothelial cells, *In vitro cellular & developmental biology*, 21 (1985) 391-401.
- [73] R. Alfred, J. Radford, J. Fan, K. Boon, R. Krawetz, D. Rancourt, M.S. Kallos, Efficient suspension bioreactor expansion of murine embryonic stem cells on microcarriers in serum-free medium, *Biotechnology progress*, 27 (2011) 811-823.
- [74] B. Nieuwenhuis, B. Haenzi, M.R. Andrews, J. Verhaagen, J.W. Fawcett, Integrins promote axonal regeneration after injury of the nervous system, *Biological Reviews*, 93 (2018) 1339-1362.
- [75] K. Sharma, Z.e. Porat, A. Gedanken, Designing natural polymer-based capsules and spheres for biomedical applications—a review, *Polymers*, 13 (2021) 4307.

- [76] G. Lu, L. Zhu, L. Kong, L. Zhang, Y. Gong, N. Zhao, X. Zhang, Porous chitosan microcarriers for large scale cultivation of cells for tissue engineering: fabrication and evaluation, *Tsinghua Science & Technology*, 11 (2006) 427-432.
- [77] C. Lujerdean, G.-M. Baci, A.-A. Cucu, D.S. Dezmirean, The contribution of silk fibroin in biomedical engineering, *Insects*, 13 (2022) 286.
- [78] H.K. Handral, T.A. Wyrobnik, A.T.-L. Lam, Emerging Trends in Biodegradable Microcarriers for Therapeutic Applications, *Polymers*, 15 (2023) 1487.
- [79] S.V. Madihally, H.W. Matthew, Porous chitosan scaffolds for tissue engineering, *Biomaterials*, 20 (1999) 1133-1142.
- [80] M. Li, S. Lu, Z. Wu, H. Yan, J. Mo, L. Wang, Study on porous silk fibroin materials. I. Fine structure of freeze dried silk fibroin, *Journal of applied polymer science*, 79 (2001) 2185-2191.
- [81] J. Guan, D. Porter, F. Vollrath, Thermally induced changes in dynamic mechanical properties of native silks, *Biomacromolecules*, 14 (2013) 930-937.
- [82] K. Yazawa, A.D. Malay, N. Ifuku, T. Ishii, H. Masunaga, T. Hikima, K. Numata, Combination of amorphous silk fiber spinning and postspinning crystallization for tough regenerated silk fibers, *Biomacromolecules*, 19 (2018) 2227-2237.
- [83] M. Puerta, M.S. Peresin, A. Restrepo-Osorio, Effects of chemical post-treatments on structural and physicochemical properties of silk fibroin films obtained from silk fibrous waste, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8 (2020) 523949.
- [84] Y. Wang, H.-J. Kim, G. Vunjak-Novakovic, D.L. Kaplan, Stem cell-based tissue engineering with silk biomaterials, *Biomaterials*, 27 (2006) 6064-6082.
- [85] Q. Lu, X. Hu, X. Wang, J.A. Kluge, S. Lu, P. Cebe, D.L. Kaplan, Water-insoluble silk films with silk I structure, *Acta biomaterialia*, 6 (2010) 1380-1387.
- [86] M. McGill, G.P. Holland, D.L. Kaplan, Experimental methods for characterizing the secondary structure and thermal properties of silk proteins, *Macromolecular rapid communications*, 40 (2019) 1800390.

[87] M.K. DeBari, C.I. King III, T.A. Altgold, R.D. Abbott, Silk fibroin as a green material, *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 7 (2021) 3530-3544.

[88] A. Karakeçili, Mikrodesenli Biyoaktif Malzemelerin Dizaynı, Karakterizasyonu ve Doku Mühendisliğindeki Uygulamaları, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 2006.

[89] S. Aday, Biyomimetik Apatit Kaplı ve Heparin Fonksiyonalitesine Sahip Kitosan Doku İskelelerinde Kondrosit ve Osteoblast Aktivitelerinin İncelenmesi Biyomühendislik, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 2008.

[90] G.-Z. Jin, J.-H. Park, S.-J. Seo, H.-W. Kim, Dynamic cell culture on porous biopolymer microcarriers in a spinner flask for bone tissue engineering: a feasibility study, *Biotechnology letters*, 36 (2014) 1539-1548.

[91] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of immunological methods*, 65 (1983) 55-63.

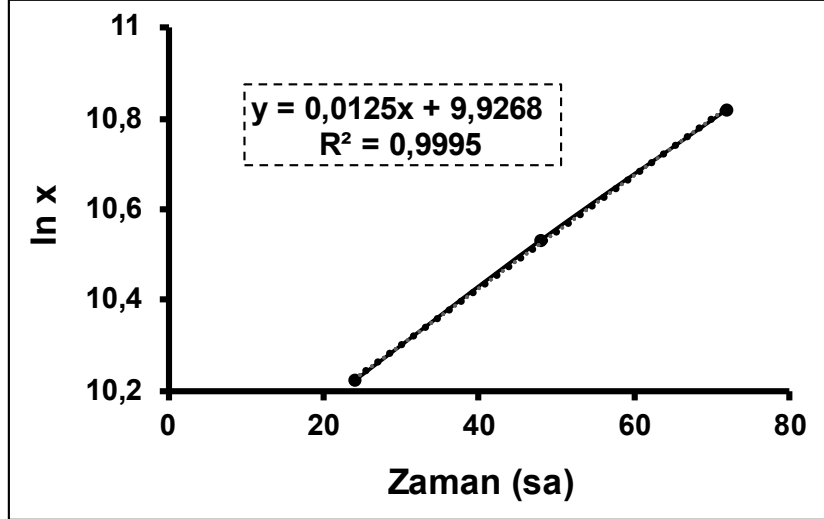
[92] M. Ghasemi, T. Turnbull, S. Sebastian, I. Kempson, The MTT assay: utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis, *International journal of molecular sciences*, 22 (2021) 12827.

[93] J.T. Velasquez, J.A. St John, L. Nazareth, J.A. Ekberg, Schwann cell lamellipodia regulate cell-cell interactions and phagocytosis, *Molecular and Cellular Neuroscience*, 88 (2018) 189-200.

[94] A. Shakhbazau, L. Mirfeizi, T. Walsh, H.M. Wobma, R. Kumar, B. Singh, M.S. Kallos, R. Midha, Inter-microcarrier transfer and phenotypic stability of stem cell-derived Schwann cells in stirred suspension bioreactor culture, *Biotechnology and Bioengineering*, 113 (2016) 393-402.

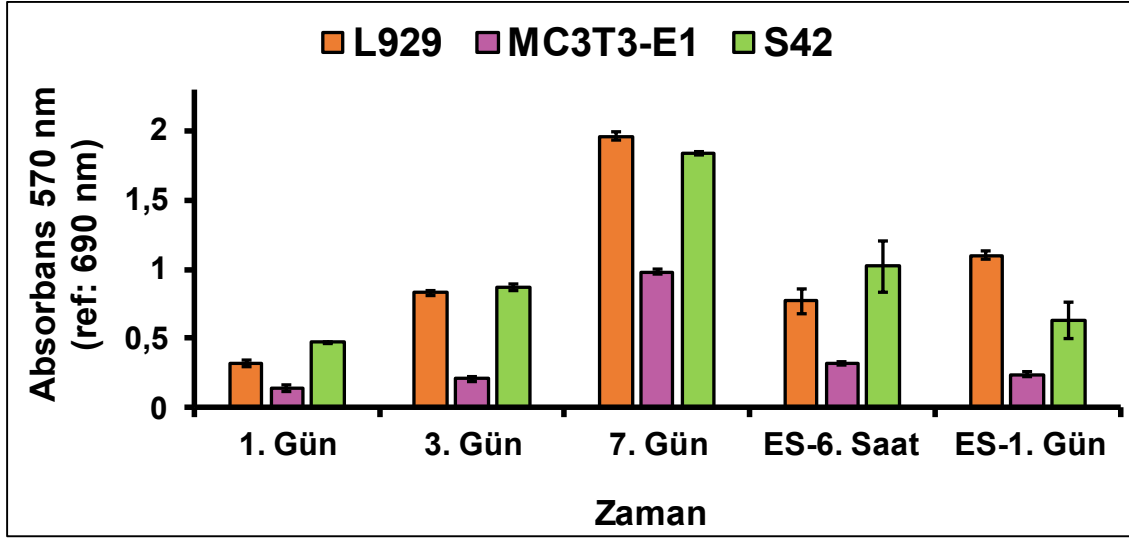
EKLER

EK 1 – Schwann hücrelerinin ln (hücre sayısı/mL) / zaman(sa) grafiği



EK 2 – TCPS yüzeylerinde çoğalan hücrelerin;

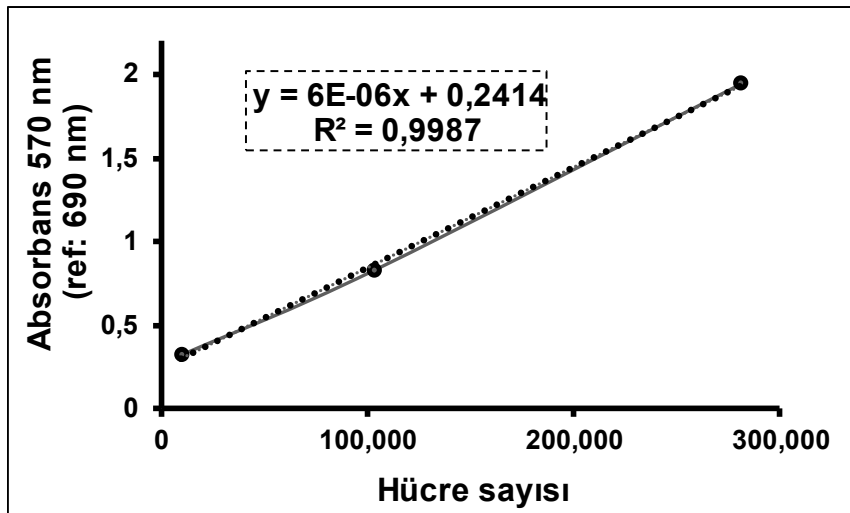
- MTT grafiği



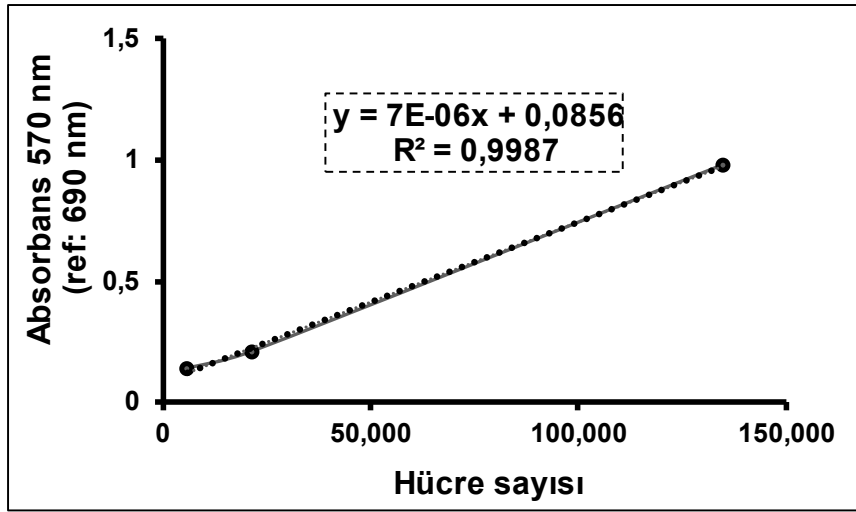
- Tripsinizasyon ile kaldırılan toplam hücre sayısı çizelgesi

Gün	Başlangıç (hücre/mL)	1 (hücre/mL)	3 (hücre/mL)	7 (hücre/mL)
L929	$0,8 \times 10^4$	$0,9 \times 10^4 \pm 0,5$	$10 \times 10^4 \pm 1,5$	$28 \times 10^4 \pm 3,0$
MC3T3-E1	$0,8 \times 10^4$	$0,6 \times 10^4 \pm 0,47$	$2,2 \times 10^4 \pm 1,5$	$14 \times 10^4 \pm 2,9$
S42	2×10^4	$3,6 \times 10^4 \pm 0,0$	$6,9 \times 10^4 \pm 1,0$	$18 \times 10^4 \pm 9,0$

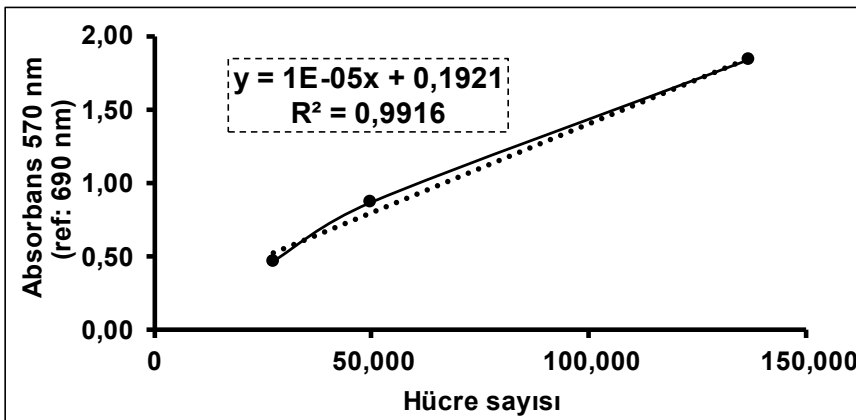
- L929 fibroblastları MTT ve hücre sayısı kalibrasyon grafiği



- MC3T3-E1 osteoblastları MTT ve hücre sayısı kalibrasyon grafiği

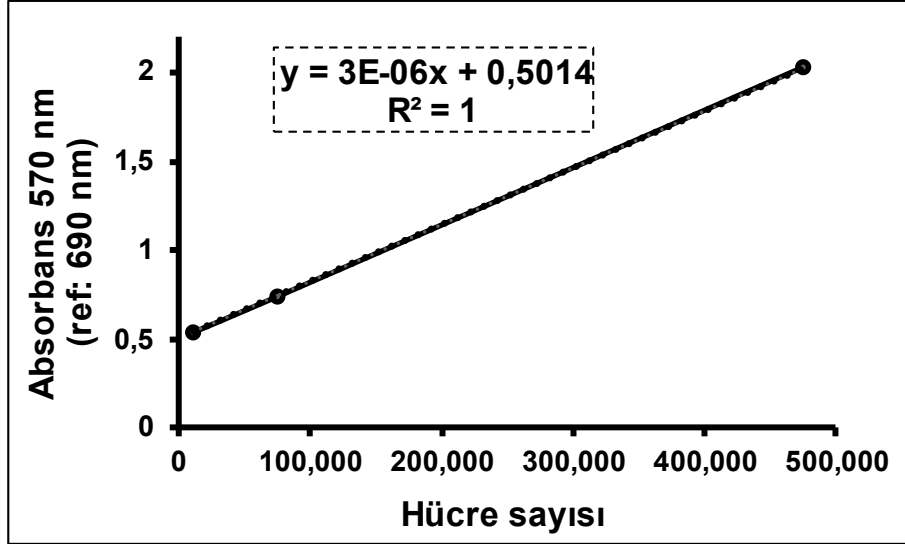


- Schwann hücreleri MTT ve hücre sayısı kalibrasyon grafiği

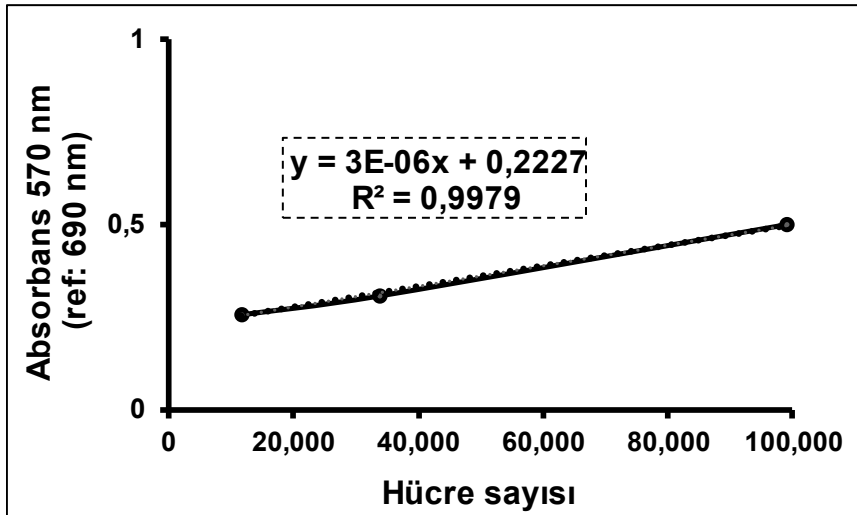


EK 3 – Mikrotayııcı/hücre kalibrasyon grafikleri

- İpek mikrotayııcı/L929 fibroblastları MTT ve hücre sayısı kalibrasyon grafiği



- İpek mikrotayııcı/MC3T3-E1 osteoblastları MTT ve hücre sayısı kalibrasyon grafiği



- İpek mikrotarıyıcı/Schwann hücreleri MTT ve hücre sayısı kalibrasyon grafiği

