

**POLİ(3-HİDROKSİBUTİRAT) (P3HB) - POLİ-β-ALANİN
(PBA) FİBRÖZ DOKU İSKELELERİNİN İSKELET KASI
REJENERASYONUNDAKİ ETKİNLİĞİNİN
İNCELENMESİ**

**INVESTIGATION OF POLY(3-HYDROXYBUTYRATE)
(P3HB) - POLY-β-ALANINE (PBA) FIBROUS TISSUE
SCAFFOLDS IN THE EFFECTIVENESS OF SKELETAL
MUSCLE REGENERATION**

ELVAN KONUK TOKAK

PROF. DR. MENEMŞE GÜMÜŞDERELİOĞLU

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

Sevgili Eşim ve Dostum Aykut'a

ÖZET

POLİ(3-HİDROKSİBUTİRAT) (P3HB) - POLİ- β -ALANİN (PBA) FİBRÖZ DOKU İSKELELERİNİN İSKELET KASI REJENERASYONUNDAKİ ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ

Elvan KONUK TOKAK

Doktora, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Nisan 2024, 240 sayfa

Tez çalışması, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından FBA-2017-14509 ve FDK-2020-18612 numaralı projeler kapsamında ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu tarafından 122M374 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir.

İskelet kası dokusundaki hasarların onarılması amacıyla iskelet kası doku mühendisliği yaklaşımları kullanılarak *in vitro* fonksiyonel bir iskelet kasının elde edilmesi tez çalışmasının amacını oluşturmaktadır. Bu amaçla, çalışmada doğal kas dokusunu taklit edebilen ve piezoelektrik özellikler sergileyen poli- β -alanin (PBA) katkılı poli(3-hidroksibutirat) (P3HB) fibröz matriksler kullanılmıştır. Matrikslerin miyojenik farklılaşmadaki etkinliği C2C12 fare miyoblast hücre hattı ile statik kültür koşullarında ve mekanik, elektrik ve elektromekanik uyarımlı hibrit biyoreaktör ile dinamik kültür koşullarında test edilmiştir.

Tez çalışmasının ilk kısmında, rastgele ve hizalı fiber morfolojisine sahip P3HB/PBA nanofiber matriksler elektroçirime yöntemi ile üretilmiştir. Matrikslerin kimyasal, termal, morfolojik, mekanik, kristalografik ve piezoelektrik özellikleri karakterize edilmiştir. Rastgele ve hizalı P3HB bazlı matrikslerin d_{33} piezoelektrik sabiti literatürdeki çalışmalardan farklı olarak artış göstermiş ve sırasıyla 5 pC/N ve 5,3 pC/N olarak tespit edilmiştir. Statik kültür çalışmalarında, hizalı matriksler üzerindeki hücrelerin düzenli

miyotübüler yapılar oluşturduğu ve yoğun mikrovilli barındırdığı tespit edilmiştir. Canlılık analizleri, morfolojik analizler, gen ifadesi ve gen belirteçleri analizleri ile hizalı matrikslerin miyojenik olarak uyumlu olduğu ve miyojenik farklılaşmayı iyi bir şekilde desteklediği belirlenmiştir.

İkinci kısımda, hücre kültürü çalışmalarından önce mekanik ve elektriksel uyarımların malzemenin mekanik ve morfolojik özelliklerinde yarattığı değişimler incelenmiştir. Ardından mekanik, elektrik ve elektromekanik uyarımlı hibrit biyoreaktör ile dinamik kültür çalışmaları yürütülmüştür. Canlılık analizleri, morfolojik analizler, mekanik testler, gen ifadesi ve gen belirteci analizleri gerçekleştirilmiştir. Yüzde 5 gerinim, 0,5 Hz frekans ve 20 dk çekme/2 sa dinlenme süresi parametreleri ile mekanik uyarımlı M-D1 grubu ve 2 ms atım periyodu, 0,4 V voltaj, 20 dk atım /2 sa dinlenme süresi parametreleri ile elektrik uyarımlı E-D2 grubu miyojenik farklılaşma ve maturasyon açısından en başarılı sonuçları vermiştir. Uyarımların sinerjik olarak uygulandıklarında miyojenik farklılaşma ve maturasyon üzerine etkilerinin araştırılması amacıyla M-D1 ve E-D2 uyarım parametreleri birleştirilerek elektromekanik uyarımlı biyoreaktör çalışmaları (EM-D) gerçekleştirilmiştir. EM-D grubunda çekme dayanımı %105 artış göstermiştir. Miyojenik maturasyon gen ifadeleri analiz edildiğinde EM-D grubunda, miyozin ağır zincir (MHC) ifadesinin M-D1 grubuna göre ≈ 23 kat, E-D2 grubuna göre ≈ 13 kat; nörofilament (NF-H) ifadesinin M-D1 grubuna göre ≈ 95 kat, E-D2 grubuna göre ≈ 11 kat; asetilkolin reseptörü- α (AChR- α) ifadesinin M-D1 grubuna göre ≈ 13 kat, E-D2 grubuna göre $\approx 1,5$ kat artış gösterdiği tespit edilerek miyojenik maturasyonun yüksek oranda desteklendiği belirlenmiştir.

Tez çalışması ile hizalı P3HB/PBA nanofiber matrikslerin morfolojik, mekanik ve piezoelektrik özellikleri ile miyojenik farklılaşmayı başarı ile desteklediği tespit edilmiştir. Ayrıca, bu matriksler kontrollü ön çalışmalarla belirlenen elektromekanik uyarımlar ile simultane olarak desteklendiğinde *in vitro* fonksiyonel bir iskelet kası dokusu elde edilebildiği gösterilmiştir. Elde edilen doku mühendisliği ürününün gelecekte klinikte kullanılabilmesi için, matriksler satelit hücreler ile etkileştirilmeli ve *in vivo* hayvan çalışmaları gerçekleştirilmelidir.

Anahtar Kelimeler: P3HB, PBA, iskelet kası, miyojenik farklılaşma, biyoreaktör ve elektromekanik uyarım.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF POLY(3-HYDROXYBUTYRATE) (P3HB) - POLY- β -ALANINE (PBA) FIBROUS TISSUE SCAFFOLDS IN THE EFFECTIVENESS OF SKELETAL MUSCLE REGENERATION

Elvan KONUK TOKAK

Doctor of Philosophy, Nanotechnology and Nanomedicine Division

Supervisor: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

April 2024, 240 pages

This thesis study has been financially supported by Hacettepe University Research Fund (Project No: FBA-2017-14509 and Project No: FDK-2020-18612) and Scientific and Technological Research Council Of Turkey (Project No: 122M374).

The aim of the thesis is to obtain an *in vitro* functional skeletal muscle using tissue engineering approaches for repairing damage in skeletal muscle tissue. To accomplish this aim, the research utilizes fibrous matrices of poly- β -alanine (PBA) doped poly(3-hydroxybutyrate) (P3HB) which can mimic natural muscle tissue and exhibit piezoelectric characteristics. The effectiveness of the matrices in myogenic differentiation was assessed in static culture conditions with the C2C12 mouse myoblast cell line and dynamic culture conditions using a hybrid bioreactor that provides mechanical, electrical, and electromechanical stimulations.

In the first part of the thesis, random and aligned P3HB/PBA nanofiber matrices were produced using the electrospinning method. The matrices were characterized for their chemical, thermal, morphological, mechanical, crystallographic, and piezoelectric properties. In contrast to the literature, both random and aligned P3HB-based matrices exhibited an increase in the d_{33} piezoelectric constant, measured as 5 pC/N and 5.3 pC/N, respectively. In static culture studies, cells on aligned matrices formed regular myotubular structures and showed dense microvilli. Viability analyses, morphological examinations,

myogenic gene expression and marker analyses determined that aligned matrices were myogenically compatible and well supported myogenic differentiation.

In the second part, the effect of mechanical and electrical stimulations on the mechanical and morphological properties of the matrices was investigated before cell culture studies. Subsequently, dynamic culture studies were conducted using a hybrid bioreactor providing mechanical, electrical, and electromechanical stimulations. Notably, mechanical stimulation with 5% strain, 0.5 Hz frequency, and a 20 min stretching/2 h resting (M-D1 group) and electrical stimulation with a 2 ms pulsing period, 0.4 V voltage, and a 20 min pulsing/2 h resting (E-D2 group) yielded the most successful results in terms of myogenic differentiation and maturation. Electromechanical stimulation studies (EM-D) were carried out by combining M-D1 and E-D2 stimulation parameters to investigate the synergistic effects on myogenic differentiation and maturation. The EM-D group showed a 105% increase in tensile strength. The gene expressions related to myogenic maturation were analyzed in the EM-D group and it was determined that the expression of the myosin heavy chain (MHC) was ≈ 23 times higher compared to the M-D1 group and ≈ 13 times higher compared to the E-D2 group. Similarly, the expression of neurofilament (NF-H) showed a ≈ 95 -fold increase compared to the M-D1 group and ≈ 11 times higher compared to the E-D2 group. The expression of acetylcholine receptor- α (AChR- α) was found to increase ≈ 13 times compared to the M-D1 group and ≈ 1.5 times compared to the E-D2 group. These findings indicate that myogenic maturation is highly supported in the EM-D group.

The thesis demonstrates that aligned P3HB/PBA nanofiber matrices successfully support myogenic differentiation through their morphological, mechanical, and piezoelectric properties. Additionally, it has been shown that when these matrices are simultaneously supported with controlled electromechanical stimulations, an *in vitro* functional skeletal muscle tissue can be obtained. For the future clinical use of this engineered tissue product, the matrices should be interacted with satellite cells, and *in vivo* animal studies should be conducted.

Keywords: P3HB, PBA, skeletal muscle, myogenic differentiation, bioreactor, and electromechanical stimulation.

TEŞEKKÜR

Lisans hayatımdan bu yana yaklaşık 15 yıldır, elini üzerimden eksik etmeyen, beni dinleyen, benimle konuşan, fikirlerini paylaşan, tökezlediğimde bana inanan ve güvenen, büyük bir şeyin parçası olmamı sağlayan, çalışmalarına motivasyonla devam etmemeye yardımcı olan, çalışma disiplinine hayran olduğum ve örnek aldığım, yol göstericim ve öğretmenim, değerli hocam **Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu**'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tez çalışmasının yürütülmesinde FBA-2017-14509 numaralı Kapsamlı Araştırma Projesi ve FDK-2020-18612 numaralı Doktora Tez Projesi ile maddi destek sağlayan **Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi**'ne ve 122M374 numaralı 1002 Projesi ile maddi destek sağlayan **TÜBİTAK**'a teşekkürlerimi sunarım.

Doktora çalışmalarım boyunca değerli görüş ve önerilerini sunan tez izleme komitesi hocalarım **Prof. Dr. Mehmet Ali Onur** ve **Prof. Dr. Nuray Yıldız**'a teşekkürlerimi sunarım.

Sonsuz sevgisi, empati yeteneği ve her daim psikolojik desteği ile sürekli yanımda olan canım hocam, ablam ve dostum **Dr. Öğr. Üyesi Damla Çetin Altındal**'a; hayatımın büyük bir bölümünde benimle olan ve iyi ki tanışışım iyi ki varsın dediğim kardeşim, dostum ve izomerim **Tuğçe Gültan**'a; bir diğer izomerim, kendi söküğünü dikemeyen ama benimkini hep diken, fikir ve önerilerini almaktan mutluluk duyduğum, geyik partnerim sevgili **Dr. Öğr. Üyesi Burcu Sarıkaya**'ya; tüm yüksek lisans ve doktora sürecim boyunca çalışmalarımda fikrini ve desteğini aldığım, bana hem ablalık hem arkadaşlık yapan canım **Dr. Özge Ekin Akdere**'ye; Pollyanna'dan da naif küçük kız kardeşim ve sonsuz desteği ile hep yanımda olan ponçik **Begüm Sargon**'a; hayatımda tanıdığım en değişik ama dünyanın en yardımsever ve espri anlayışı yüksek insanı, her zaman yardıma koşan **S. Onat Akbulut**'a sonsuz sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

Hücre kültürü çalışmalarımda verdiği sonsuz desteği, öğrettiği tüm bilgileri ve sohbetlerimizi asla unutamayacağım **Öğr. Görevlisi Dr. Anıl Sera Çakmak**'a; bilgi ve deneyimlerinden sürekli yararlandığım ve sohbet etmekten mutlu olduğum **Doç. Dr. Murat Şimşek**, **Dr. Öğr. Üyesi Soner Çakmak** ve **Dr. Öğr. Üyesi Işıl Gerçek Beşkardeş**'e içtenlikle teşekkür ederim.

Her süreçte karşılıksız yardıma koşan ve desteklerini her zaman hissettiğim canım arkadaşlarım, **Arş. Gör. Tülay Selin Erkut**, **Arş. Gör. Sena Koç** ve **Arş. Gör. Demet Çakır**'a sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım. **Hücre ve Doku Mühendisliği Araştırma Grubu**'ndaki diğer tüm değerli arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Doktora sürecim boyunca yaşadığım fiziksel rahatsızlıklarda sağlığıma kavuşmamı ve devam etmemi sağlayan değerli hocam **Prof. Dr. Egemen Turhan**'a teşekkürlerimi sunarım.

Varlığı ile hayatımı değiştiren, sevgisini ve ilgisini sürekli hissettiren, düştüğümde kaldıran, hastalıkta ve sağlıkta her anımda ve her daim benimle olan, benimle ağlayan, benimle gülen, bana sürekli inanan ve tüm tez sürecimde bana sürekli yardımcı olan canım eşim ve dostum **Aykut Tokak**'a sonsuz minnetlerimi sunarım, iyi ki varsın.

Keşke bugünleri görseydi dediğim ama bir şekilde beni izlediğine inandığım canım babam **Cüneyt Konuk**'a, bana bir insanın hayatında en önemli becerilerden biri olan okuma alışkanlığını kazandırdığı ve tüm hayatı boyunca bana verdiği destek için sonsuz teşekkür ederim. Hayatımda bu aşamaya gelmemi ve şu an olduğum insanı olmamı sağlayan, tüm bu süreçte bana sabır ile yaklaşan annem **Meral Konuk**'a ve kocaman ama hep küçük kardeşim olarak kalacak **Cem Noyan Konuk**'a minnetlerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xxiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. İskelet Kası Fizyolojisi ve Histolojisi	5
2.2. İskelet Kasında Kasılma Aktivitesi	8
2.3. İskelet Kasının Görevleri	12
2.4. İskelet Kası Yenilenmesi (Miyogenez) ve Farklılaşma	12
2.5. İskelet Kası Dokusunda Gen Regülasyonu	13
2.6. İskelet Kası Kaybı ve Hasarlarında Mevcut Tedavi Yöntemleri	16
2.7. İskelet Kası Doku Mühendisliği.....	17
2.7.1. İskelet Kası Doku Mühendisliği Tasarım Parametreleri	20
2.7.1.1. Morfolojik özellikler	20
2.7.1.2. Mekanik özellikler.....	21
2.7.1.3. Biyokimyasal özellikler.....	21
2.7.1.4. Mekanik ve elektriksel uyarılar	22
2.7.2. İskelet Kası Doku Mühendisliğinde Kullanılan Biyomalzemeler.....	23
2.7.3. İskelet Kası Biyoreaktör Sistemleri.....	27
2.8. Poli(3-Hidroksibutirat) (P3HB) ve Poli-β-Alanin (PBA) Polimerleri	32

2.8.1. P3HB Polimeri.....	32
2.8.1.1. Piezoelektrisite.....	34
2.8.1.2. P3HB'nin piezoelektrik özellikleri	36
2.8.2. PBA Polimeri.....	36
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	37
3.1. Kullanılan Malzemeler	37
KISIM I.....	39
3.2. Polimer Çözeltilerinin Hazırlanması	39
3.3. Elektrooğırme Parametrelerinin Belirlenmesi	39
3.4. Matrikslerin Karakterizasyonu	40
3.4.1. Kimyasal Karakterizasyon.....	40
3.4.1.1. FTIR analizi	40
3.4.1.2. EDX analizi.....	41
3.4.1.3. Elementel analiz.....	41
3.4.2. Termal Karakterizasyon.....	41
3.4.2.1. DSC analizi	41
3.4.2.2. TGA	41
3.4.3. Morfolojik Karakterizasyon.....	41
3.4.3.1. SEM analizi.....	42
3.4.3.2. AFM analizi	42
3.4.4. Kristalografik Karakterizasyon.....	42
3.4.5. Piezoelektrik Özelliklerin Belirlenmesi.....	42
3.4.6. Mekanik Özelliklerin Belirlenmesi.....	43
3.4.7. Hidrolitik ve Enzimatik Bozunma Davranışı.....	43
3.4.8. Su Temas Açılırları	43
3.5. Hücre Kültür Çalışmaları.....	43

3.5.1. C2C12 Hücre Hattının Karakterizasyonu	44
3.5.1.1. Hücre büyüme eğrisi	45
3.5.1.2. Canlılık analizi	45
3.5.1.3. Floresan görüntüleme	45
3.5.1.4. Histolojik boyama	46
3.5.2. Hücre Kültür Kaplarında Miyojenik Farklılaşma Çalışmaları	46
3.5.2.1. Canlılık analizi	46
3.5.2.2. Morfolojik analizler.....	47
3.5.2.3. Histolojik analizler	47
3.5.3. P3HB/PBA Matrikslerde Miyojenik Farklılaşma Çalışmaları.....	47
3.5.3.1. Canlılık analizleri	47
3.5.3.2. Morfolojik analizler.....	48
3.5.3.3. Gen ekspresyonu analizleri	48
3.5.3.4. İmmünohistokimyasal analizler	49
KISIM II.....	51
3.6. Mekanik, Elektrik ve Elektromekanik Uyarımlı (Hibrit) Biyoreaktör.....	51
3.7. Biyoreaktörde Hücre Kültürü Öncesi Çalışmalar	53
3.7.1. Mekanik ve Elektrik Uyarımlı Biyoreaktör Çalışma Koşullarının Belirlenmesi.....	54
3.7.2. Uyarımın Mekanik Özelliklere Etkisi	55
3.7.3. Uyarımın Morfolojik Özelliklere Etkisi.....	55
3.8. Biyoreaktör Koşullarında Hücre Kültürü Çalışmaları	55
3.8.1. Mekanik Uyarımlı Biyoreaktör Çalışmaları.....	57
3.8.2. Elektrik Uyarımlı Biyoreaktör Çalışmaları	58
3.8.3. Elektromekanik Uyarımlı Biyoreaktör Çalışmaları	58
3.9. Biyoreaktör Çalışmalarına Ait Hücre Kültürü Analizleri	58
3.9.1. Hücre Canlılığının Belirlenmesi.....	59

3.9.2. Hücre Morfolojisi	59
3.9.3. Mekanik Özelliklerin Belirlenmesi.....	59
3.9.4. Miyojenik Gen İfadeleri.....	59
3.9.5. Miyojenik Belirteçler.....	60
3.10. İstatistiksel Analiz.....	60
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	61
KISIM I.....	61
4.1. Elektroğirme Koşulları.....	63
4.2. Matrikslerin Karakterizasyonu	70
4.2.1. Kimyasal Yapı Karakterizasyonu	70
4.2.1.1. FTIR.....	70
4.2.1.2. EDX	71
4.2.1.3. Elementel analiz.....	72
4.2.2. Termal Karakterizasyon.....	72
4.2.2.1. DSC.....	72
4.2.2.2. TGA	74
4.2.3. Morfolojik Karakterizasyon.....	75
4.2.3.1. SEM	75
4.2.3.2. AFM.....	77
4.2.4. Kristalografik Karakterizasyon.....	78
4.2.5. Piezoelektrik Özelliklerin Belirlenmesi.....	80
4.2.6. Mekanik Özelliklerin Belirlenmesi.....	81
4.2.7. Hidrolitik ve Enzimatik Bozunma Davranışı.....	84
4.2.8. Su Temas Açılırları	86
4.3. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	87
4.3.1. C2C12 Hücre Hattının Karakterizasyonu.....	87

4.5.1.4. Mekanik testler	133
4.5.1.5. Miyojenik gen ifadelerinin belirlenmesi.....	136
4.5.1.6. Miyojenik belirteçlerin belirlenmesi.....	139
4.5.2. Elektrik Uyarımlı Biyoreaktör Çalışmaları.....	142
4.5.2.1. Hücre canlılığının belirlenmesi.....	143
4.5.2.2. SEM analizi.....	144
4.5.2.3. Hücre iskeleti/çekirdeği boyama	146
4.5.2.4. Mekanik özelliklerin tayin edilmesi	147
4.5.2.5. Miyojenik gen ifadelerinin belirlenmesi.....	151
4.5.2.6. Miyojenik belirteçlerin belirlenmesi.....	154
4.5.3. Elektromekanik Uyarımlı Biyoreaktör Çalışmaları.....	156
4.5.3.1. Hücre canlılığının belirlenmesi.....	157
4.5.3.2. SEM analizi.....	159
4.5.3.3. Hücre iskeleti/çekirdeği boyama	161
4.5.3.4. Mekanik özelliklerin tayin edilmesi	163
4.5.3.5. Miyojenik gen ifadelerinin belirlenmesi.....	165
4.5.3.6. Miyojenik belirteçlerin belirlenmesi.....	169
5. genel sonuçlar	171
6. KAYNAKLAR	178
EKLER.....	194
EK 1 – Tezden Türetilmiş Yayınlar.....	194
EK 2 – Tezden Üretilmiş Projeler.....	195
EK 3 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu.....	196
ÖZGEÇMİŞ	197

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. İskelet kasının hiyerarşik yapısı, [18]'den değiştirilerek.....	6
Şekil 2.2. İskelet kasının elektron mikroskobu (a-c) ve şematik görüntüleri (b) [22]'den değiştirilerek.....	7
Şekil 2.3. Sarkomerin moleküler yapısı (a), uyarılmış ve dinlenme konumundaki sarkomer (b), sarkomer elektron mikroskop görüntüsü (c), çizgili kas organizasyonu (d) [22]'den değiştirilerek.....	8
Şekil 2.4. Nöromusküler bağlantı noktası şematik ve elektron mikroskobu görüntüleri (a-b) ve fotomikrografi (c) [22]'den değiştirilerek.....	9
Şekil 2.5 İskelet kasında aksiyon potansiyeli.....	10
Şekil 2.6. İskelet kası dokusunda motor birim, [28]'den değiştirilerek.....	11
Şekil 2.7. Miyoblastlardan miyotüplere farklılaşma ve süreçlerdeki gen ifadeleri, [18]'den değiştirilerek.....	15
Şekil 2.8. İskelet kası doku mühendisliği yaklaşımları, [1]'den değiştirilerek...	18
Şekil 2.9. <i>İn vitro</i> iskelet kası doku mühendisliğinde ideal yaklaşım; hasarlı bölgeye uygun fiziksel, kimyasal, morfolojik ve mekanik özellikteki doku iskelesinin implantasyonu (a), hasarlı bölgede doku iskelesinin implantasyonu ile meydana gelen parakrin faktörlerin salımı, konakçı hücre göçü ve immün sistem cevabından korunma (b), miyoblast farklılaşması ile miyotüplerin oluşumu ve doku iskelesinin bozularak yerini fonksiyonel iskelet kası dokusuna bırakması (c), fonksiyonel iskelet kası oluşumuna bağlı olarak gerçekleşen vaskülerizasyon ve innervasyon (d), hasarlı bölgede fonksiyonel iskelet kası oluşumu (e), [1]'den değiştirilerek.....	20
Şekil 2.10. P3HB polimerinin moleküler yapısı.....	33
Şekil 2.11. Yönlendirilmiş polimerler için D_{∞} ve C_{∞} simetrilerinde piezoelektrik matris ve stres yönüne bağlı oluşan polarizasyonlar; d_{14} ve d_{15} kesme piezoelektrisite, d_{31} ve d_{33} uzunlamasına piezoelektrisite (a), [130]'dan	35

<i>değiştirilerek</i> , uzunlamasına (b) ve transvers (c) kesme piezoelektrik etki modellemeleri, [132]'den değiştirilerek.....	36
Şekil 2.12. PBA polimerinin moleküler yapısı.....	
Şekil 3.1. Mekanik, elektriksel ve elektromekanik uyarım biyoreaktörüne ait şematik görseller (a-b); elektrik uyarımlı biyoreaktör görüntüsü (c); sistem ara yüzü (d); biyoreaktör haznesine yerleştirilmiş fiber matriks (Kırmızı oklar matriks hatlarını göstermektedir.) (e-üst); tam kurulumu yapılmış reaktör haznesi (Lacivert çerçeve matriks hatlarını göstermektedir.) (e-alt); tam kurulumu yapılmış reaktör (f).....	52
Şekil 3.2. Biyoreaktör çalışmalarında hücre ekimi.....	57
Şekil 3.3. Biyoreaktörde hücre kültürü için çalışma planlaması.....	57
Şekil 4.1. Tez çalışmasının ilk kısmına ait akış şeması.	63
Şekil 4.2. Sabit iğne ucu-toplayıcı uzaklığında (22,5 cm), değişen akış hızları (0,5 – 1,0 mL/sa aralığında) ve voltajlarda (15 – 25 kV aralığında) elde edilen rastgele P3HB/PBA fiberlerin farklı büyütmelerdeki SEM fotoğrafları.....	64
Şekil 4.3. 1 mL/sa sabit akış hızında, farklı toplayıcı dönüş hızı, uzaklık ve voltajlarda elde edilen hizalı P3HB/PBA fiberlerin optik mikroskop (10 X) ve SEM fotoğrafları (500 X) (sarı ölçek barları: 200 µm).....	67
Şekil 4.4. 1 mL/sa akış hızı, 2000 rpm toplayıcı dönüş hızı ve 18 cm toplayıcı-iğne ucu uzaklığı sabitken farklı voltajlarda elde edilen hizalı P3HB/PBA fiberlerin çap değerleri.....	68
Şekil 4.5. 1 mL/sa akış hızı ve 2000 rpm toplayıcı dönüş hızı sabit olmak üzere, farklı uzaklık ve voltajlarda elde edilen hizalı fiberlerin SEM fotoğrafları.....	69
Şekil 4.6. P3HB ve P3HB/PBA fiber matrikslere ait FTIR spektrumları.	70
Şekil 4.7. P3HB/PBA fiber matrikslere ait EDX spektrumu.	71
Şekil 4.8. P3HB (a) ve P3HB/PBA (b) fiber matrikslere ait DSC termogramları.	73
Şekil 4.9. P3HB (a) ve P3HB/PBA (b) matrikslere ait TGA termogramları.	74

Şekil 4.10. Rastgele (a-b) ve hizalı (c-d) P3HB/PBA fiber matrikslerin farklı büyütmelerde SEM fotoğrafları; rastgele (e-f) ve hizalı (g-h) P3HB/PBA fiber matrikslerin 2B ve 3B AFM görüntüleri (ölçek: 2,8 µm (e); 4,4 µm (g)).	76
Şekil 4.11. Rastgele ve hizalı P3HB ve PBA katkılı P3HB fiber matrikslerin XRD desenleri (a), XRD deseninde kristalin bölgeler (b) ve yüzde kristalinite değerleri (c).	79
Şekil 4.12. Rastgele ve hizalı P3HB/PBA nanofiber matrikslerin 7 hafta boyunca yürütülen hidrolitik ve enzimatik bozunma çalışmalarını sırasındaki SEM fotoğrafları (ölçek: 20 µm (başlangıç); 10 µm (bozunma)).	85
Şekil 4.13. C2C12 hücre hattına ait büyüme eğrisi.	87
Şekil 4.14. C2C12 hücrelerinin 14 günlük kültürasyonu boyunca belirlenen günlerde elde edilen yüzde canlılık değerleri.	88
Şekil 4.15. C2C12 hücrelerinin kültürün 1 ve 3. günlerinde farklı büyütmelerde boyama görüntüleri. Hücre iskeleti yeşil, hücre çekirdeği mavi olarak görünmektedir.	89
Şekil 4.16. C2C12 hücrelerinin kültürün 1., 3. ve 7. günlerinde kristal viyole boyama görüntüleri.	90
Şekil 4.17. TCPS yüzeyindeki C2C12 hücrelerinin kültürün 1., 3., 7., 10., 14. ve 21. günlerindeki yüzde canlılık değerleri (İstatistiksel anlamlı farklılıklar $n = 4$, $**p < 0,01$, büyüme ortamındaki hücrelerin kontrol grubu olduğu, aynı gündeki farklılaşma ortamı ile karşılaştırıldığında).	91
Şekil 4.18. TCPS yüzeyindeki C2C12 hücrelerinin kültürün 1., 3. ve 7. günlerinde büyüme ve farklılaşma ortamındaki optik mikroskop görüntüleri (büyütme: 4 X).	93
Şekil 4.19. Büyüme ve farklılaşma ortamındaki C2C12 hücrelerinin kültürün 1., 3., 7., 14. ve 21. günlerindeki F-aktin/DAPI boyama floresan mikroskop görüntüleri.	94
Şekil 4.20. Büyüme ve farklılaşma ortamındaki C2C12 hücrelerinin kültürün 1., 3., 7., 14. ve 21. günlerindeki kristal viyole boyama görüntüleri.	95
Şekil 4.21. Kültürün 7. gününde büyüme ve farklılaşma ortamındaki C2C12 hücrelerinin soldan sağa sırasıyla optik mikroskop, kristal viyole ve F-aktin/DAPI görüntülerinin farklı büyütmelerde karşılaştırılması.	96
Şekil 4.22. Rastgele ve hizalı P3HB/PBA nanofiber matriksler üzerinde kültürlenmiş C2C12 hücrelerinin yüzde canlılık değerleri (İstatistiksel anlamlı farklılıklar $n = 4$,	97

*** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ TCPS kontrol grubu olduğunda; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ rastgele fiberler kontrol grubu olduğunda).

Şekil 4.23. Rastgele ve hizalı P3HB/PBA nanofiber matriksler üzerinde kültürlenmiş C2C12 hücrelerinin kültürün 21. gününde canlı (yeşil) / ölü (kırmızı) konfokal mikroskop görüntüleri. Kırmızı oklar füzyona uğramış miyotüpleri belirtmektedir. 99

Şekil 4.24. Rastgele ve hizalı P3HB/PBA nanofiber matriksler üzerinde kültürlenmiş C2C12 hücrelerinin kültürün 3., 7., 14. ve 21. günlerinde farklı büyütme ölçeklerindeki SEM fotoğrafları. Kırmızı oklar füzyona uğramış miyotüpleri, sarı oklar nöromusküler bağlantı noktalarını, mor oklar yırtılmaları belirtmektedir. 100

Şekil 4.25. Rastgele ve hizalı P3HB/PBA nanofiber matriksler üzerinde kültürlenmiş C2C12 hücrelerinin kültürün 7., 14. ve 21. günlerinde hücre iskeleti (yeşil) / çekirdeği (mavi) konfokal mikroskop görüntüleri. 3B fotoğraflar z-eksen görüntülemeleri ile elde edilmiştir. Kırmızı oklar füzyona uğramış miyotüpleri, sarı oklar nöromusküler bağlantı noktalarını temsil etmektedir. 103

Şekil 4.26. Rastgele ve hizalı P3HB/PBA nanofiber matriksler üzerinde kültürlenmiş C2C12 hücrelerinin kültürün 7., 14. ve 21. günlerinde bağıl MyoD, Myogenin ve MHC gen ifadesi grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılıklar, $n = 4$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$ kontrol grubu rastgele matriksler olduğunda; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ kontrol grubu hizalı matriksler olduğunda). 105

Şekil 4.27. Rastgele ve hizalı P3HB/PBA nanofiber matriksler üzerinde kültürlenmiş C2C12 hücrelerinin kültürün 7., 14. ve 21. günlerinde MyoD, Myogenin ve MHC immünohistokimyasal boyama konfokal mikroskop görüntüleri. Sarı oklar miyofibrilleri belirtmektedir. MyoD (yeşil) antijeni hücre çekirdeğinde, Myogenin (yeşil) antijeni hücre iskeletinde ve MHC (kırmızı) antijeni kalın filamentlerde lokalize olmuştur. 107

Şekil 4.28. Tez çalışmasının ikinci kısmına ait akış şeması. 109

Şekil 4.29. Yüzde 15 sabit gerinimde, 7 gün boyunca, 6 sa çekme/18 sa dinlenme, 1 sa çekme/5 sa dinlenme ve 20 dk çekme/2 sa dinlenme döngüsel uygulama sıklıklarında çift yönlü mekanik uyarıya maruz bırakılan hizalı P3HB/PBA nanofiber matrikslerin 2 Hz, 1 Hz ve 0,5 Hz frekanslarda mekanik özelliklerindeki değişimler. 112

Şekil 4.30. Yüzde 15 sabit gerinimde, 7 gün boyunca, 6 sa çekme/18 sa dinlenme, 1 sa çekme/5 sa dinlenme ve 20 dk çekme/2 sa dinlenme döngüsel uygulama sıklıklarında 115

çift yönlü mekanik uyarıma maruz bırakılan hizalı P3HB/PBA nanofiber matrikslerin 2 Hz, 1 Hz ve 0,5 Hz frekanslarda çekme dayanımındaki değişimler (İstatistiksel olarak önemli farklar $n = 3$, $*p < 0,05$ ve $**p < 0,01$ mekanik uyarım öncesi matriksler kontrol grubu olduğunda).

Şekil 4.31. Yüzde 15 gerinimde, 6 sa çekme/18 sa dinlenme döngüsel uygulama sıklığında, 0,5 Hz, 1 Hz ve 2 Hz frekansta 7 gün boyunca çift yönlü mekanik uyarıma maruz bırakılan hizalı P3HB/PBA nanofiber matrikslere ait farklı büyütme SEM fotoğrafları. 116

Şekil 4.32. Yüzde 15 gerinimde, 1 sa çekme/5 sa dinlenme döngüsel uygulama sıklığında, 0,5 Hz, 1 Hz ve 2 Hz frekansta 7 gün boyunca çift yönlü mekanik uyarıma maruz bırakılan hizalı P3HB/PBA nanofiber matrikslere ait farklı büyütme SEM fotoğrafları. 117

Şekil 4.33. Yüzde 15 gerinimde, 20 dk çekme/2 sa dinlenme döngüsel uygulama sıklığında, 0,5 Hz, 1 Hz ve 2 Hz frekansta 7 gün boyunca çift yönlü mekanik uyarıma maruz bırakılan hizalı P3HB/PBA nanofiber matrikslere ait farklı büyütme SEM fotoğrafları. 118

Şekil 4.34. Yüzde 15 gerinimde, 0,5 Hz, 1 Hz ve 2 Hz frekansta, 7 gün boyunca çift yönlü mekanik uyarıma maruz bırakılan hizalı P3HB/PBA nanofiber matrikslerin farklı döngüsel uygulama sıklıklarındaki karşılaştırmalı SEM fotoğrafları (500X). 119

Şekil 4.35. Altı ms atım periyodunda, 7 gün boyunca, 20 dk atım/2 sa dinlenme döngüsel uygulama sıklığında elektriksel uyarıma maruz bırakılan hizalı P3HB/PBA nanofiber matrikslerin 0,4 V ve 1,2 V voltajlarda mekanik özelliklerindeki değişimler. 121

Şekil 4.36. Altı ms atım periyodunda, 7 gün boyunca, 0,4 V ve 1,5 V voltajda, 20 dk atım/2 sa dinlenme döngüsel uygulama sıklığında elektriksel uyarıma maruz bırakılan hizalı P3HB/PBA nanofiber matrikslere ait farklı büyütme SEM fotoğrafları. 122

Şekil 4.37. Statik kültürün 7. ve 14. günlerinde (S-7.gün ve S-14.gün) ve mekanik uyarımlı dinamik kültürün 14. gününde (M-D1, M-D2, M-D3, M-D4 ve M-D5 14.gün) hizalı P3HB/PBA nanofiber matriksler üzerindeki C2C12 hücrelerinin yüzde canlılık değerleri (İstatistiksel anlamlı farklılıklar $n = 4$, $**p < 0,01$, $****p < 0,0001$ statik kültürün 14. günü kontrol grubu olduğunda). 124

Şekil 4.38. Statik kültürün 7. ve 14. günlerinde (S-7 ve S-14) ve mekanik uyarımlı dinamik kültürün 14. gününde (M-D1, M-D2, M-D3, M-D4 ve M-D5) hizalı P3HB/PBA 126

nanofiber matrisler üzerindeki C2C12 hücrelerinin farklı büyütmelelerdeki SEM fotoğrafları (büyütme, sol: 500 X, sağ: 1500 X).

Şekil 4.39. Hizalı P3HB/PBA matrisler üzerindeki farklı parametrelerde mekanik 128 uyarım verilmiş C2C12 hücrelerinin SEM fotoğrafları, sabit %5 gerinim ve 20 dk çekme/2 sa dinlenme uygulama sıklığında frekans etkisi (a); sabit 0,5 Hz frekans ve 20 dk çekme/2 sa dinlenme uygulama sıklığında gerinim etkisi (b); sabit 0,5 Hz frekans ve 1 sa çekme/5 sa dinlenme uygulama sıklığında gerinim etkisi (c); sabit %5 gerinim ve 0,5 Hz frekansta uygulama sıklığı etkisi (d); sabit %10 gerinim ve 0,5 Hz frekansta uygulama sıklığı etkisi (e) (büyütme: 500X).

Şekil 4.40. Statik kültürün 7. ve 14. günlerinde ve mekanik uyarımlı dinamik kültürün 131 14. gününde (M-D1, M-D2, M-D3, M-D4 ve M-D5) hizalı P3HB/PBA nanofiber matrisler üzerindeki C2C12 hücrelerinin F-aktin/DAPI boyama floresan mikroskop görüntüleri (büyütme: 10 X).

Şekil 4.41. Mekanik uyarım öncesi, 7 günlük hücresiz mekanik uyarım sonrası, statik 7. 134 ve 14. gün (S-7. gün ve S-14.gün) ve dinamik 14. gün örneklerine (M-D1 ve M-D3) ait karşılaştırmalı çekme dayanımı, kopmadaki uzama ve elastik modül değerleri (İstatistiksel olarak önemli farklar $n = 3$, $**p < 0,01$, $****p < 0,0001$ mekanik uyarım öncesi matrisler kontrol grubu olduğunda, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,0001$ statik 14. gün matrisler kontrol grubu olduğunda, $^{\#}p < 0,05$ dinamik gruplar karşılaştırıldığında).

Şekil 4.42. Statik kültürün 7. ve 14. günlerinde (S-7 ve S-14) ve mekanik uyarımlı 136 dinamik kültürün 14. gününde (M-D1 ve M-D3) C2C12 hücrelerine ait bağıl MyoD, Myogenin, MHC, NF-H ve AChR- α gen ifadeleri (İstatistiksel anlamlı farklılıklar $n = 4$, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$ statik kültürün 14. günü kontrol grubu olduğunda, $**p < 0,01$ dinamik kültür grupları karşılaştırıldığında).

Şekil 4.43. Statik kültürün 7. ve 14. günlerinde ve mekanik uyarımlı dinamik kültürün 139 14. gününde (M-D1 ve M-D3) C2C12 hücrelerine ait MyoD, Myogenin ve MHC immünohistokimyasal boyama konfokal mikroskobu görüntüleri. MyoD (yeşil) antijeni hücre çekirdeğinde, Myogenin (yeşil) antijeni hücre iskeletinde ve MHC (kırmızı) antijeni kalın filamentlerde lokalize olmuştur. (Büyütme, statik kültür: 10 X ve dinamik kültür: 20 X).

Şekil 4.44. Statik kültürün 7. ve 14. günlerinde (S-7 ve S-14) ve elektrik uyarımlı 143 dinamik kültürün 14. gününde (E-D1 ve E-D2) hizalı P3HB/PBA nanofiber matrisler

üzerindeki C2C12 hücrelerinin yüzde canlılık değerleri (İstatistiksel anlamlı farklılıklar $n = 4$, $*p < 0,05$, $***p < 0,001$ statik kültürün 14. günü kontrol grubu olduğunda).

Şekil 4.45. Statik kültürün 7. ve 14. günlerinde ve elektrik uyarımlı dinamik kültürün 14. gününde (E-D1 ve E-D2) hizalı P3HB/PBA nanofiber matrisler üzerindeki C2C12 hücrelerinin 500X ve 1500X büyütmelelerdeki SEM fotoğrafları. 144

Şekil 4.46. Statik kültürün 7. ve 14. günlerinde ve elektrik uyarımlı dinamik kültürün 14. gününde (E-D1 ve E-D2) hizalı P3HB/PBA nanofiber matrisler üzerindeki C2C12 hücrelerinin F-aktin/DAPI boyama floresan (statik kültür) ve konfokal (dinamik kültür) mikroskop görüntüleri (Büyütmeler, statik kültür: 10 X ve dinamik kültür: 20 X). 146

Şekil 4.47. Elektriksel uyarım öncesi, 7 günlük hücresiz elektriksel uyarım sonrası, statik 7. ve 14. gün (S-7 ve S-14) ve dinamik 14. gün örneklerine (E-D1 ve E-D2) ait karşılaştırmalı çekme dayanımı, kopmadaki uzama ve elastik modül değerleri (İstatistiksel olarak önemli farklar $n = 3$, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$ elektriksel uyarım öncesi matrisler kontrol grubu olduğunda; $\bullet p < 0,05$, $\bullet\bullet p < 0,01$, $\bullet\bullet\bullet p < 0,001$, $\bullet\bullet\bullet\bullet p < 0,0001$ statik 14. gün matrisler kontrol grubu olduğunda; $\blacksquare p < 0,05$, $\blacksquare\blacksquare p < 0,01$ dinamik kültür grupları karşılaştırıldığında). 149

Şekil 4.48. Statik kültürün 7. ve 14. günlerinde (S-7 ve S-14) ve elektrik uyarımlı dinamik kültürün 14. gününde (E-D1 ve E-D2) C2C12 hücrelerine ait bağıl MyoD, Myogenin, MHC, NF-H ve AChR- α gen ifadeleri (İstatistiksel anlamlı farklılıklar $n = 4$, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$ statik kültürün 14. günü kontrol grubu olduğunda, $\bullet p < 0,05$, $\bullet\bullet p < 0,01$, $\bullet\bullet\bullet p < 0,001$ dinamik kültür grupları karşılaştırıldığında). 151

Şekil 4.49. Statik kültürün 7. ve 14. günlerinde ve elektriksel uyarımlı dinamik kültürün 14. gününde (E-D1 ve E-D2) C2C12 hücrelerine ait MyoD, Myogenin ve MHC immünohistokimyasal boyama konfokal mikroskopu görüntüleri. MyoD (yeşil) antijeni hücre çekirdeğinde, Myogenin (yeşil) antijeni hücre iskeletinde ve MHC (kırmızı) antijeni kalın filamentlerde lokalize olmuştur. (Büyütmeler, statik kültür: 10 X ve dinamik kültür: 20 X). 154

Şekil 4.50. Statik kültürün 7. ve 14. günlerinde (S-7 ve S-14), mekanik uyarımlı dinamik kültürün 14. gününde (M-D1), elektrik uyarımlı dinamik kültürün 14. gününde (E-D2) ve elektromekanik uyarımlı dinamik kültürün 14. gününde (EM-D) hizalı P3HB/PBA nanofiber matrisler üzerindeki C2C12 hücrelerinin yüzde canlılık değerleri 157

(İstatistiksel anlamlı farklılıklar $n = 4$, $*p < 0,05$ statik kültürün 14. günü kontrol grubu olduğunda, $**p < 0,01$ dinamik kültür grupları karşılaştırıldığında).

Şekil 4.51. Statik kültürün 7. ve 14. günlerinde ve elektromekanik uyarımlı dinamik 159
kültürün 14. gününde (EM-D) hizalı P3HB/PBA nanofiber matrisler üzerindeki C2C12
hücrelerinin farklı büyütmelede SEM fotoğrafları.

Şekil 4.52. Statik kültürün 7. ve 14. günlerinde, mekanik uyarımlı dinamik kültürün 14. 160
gününde (M-D1), elektrik uyarımlı dinamik kültürün 14. gününde (E-D2) ve
elektromekanik uyarımlı dinamik kültürün 14. gününde (EM-D) hizalı P3HB/PBA
nanofiber matrisler üzerindeki C2C12 hücrelerinin SEM fotoğrafları (büyütme: 500 X).

Şekil 4.53. Statik kültürün 7. ve 14. günlerinde ve elektrik uyarımlı dinamik kültürün 14. 161
gününde (EM-D) hizalı P3HB/PBA nanofiber matrisler üzerindeki C2C12 hücrelerinin
F-aktin/DAPI floresan (statik kültür) ve konfokal (dinamik kültür) mikroskop
görüntüleri (büyütme: 10 X).

Şekil 4.54. Statik kültürün 7. ve 14. günlerinde, mekanik uyarımlı dinamik kültürün 14. 162
gününde (M-D1), elektrik uyarımlı dinamik kültürün 14. gününde (E-D2) ve
elektromekanik uyarımlı dinamik kültürün 14. gününde (EM-D) hizalı P3HB/PBA
nanofiber matrisler üzerindeki C2C12 hücrelerinin F-aktin/DAPI floresan (statik
kültür) ve konfokal (dinamik kültür) mikroskop görüntüleri (Büyütmeler E-D2 hariç 10
X; E-D2: 20 X).

Şekil 4.55. Uyarım öncesi, 7 günlük hücresiz mekanik ve elektriksel uyarım sonrası, 164
statik 7. gün (S-7), statik 14. gün (S-14) ve dinamik 14. gün örneklerine (M-D1, E-D2
ve EM-D) ait karşılaştırmalı çekme dayanımı, kopmadaki uzama ve elastik modül
değerleri (İstatistiksel olarak önemli farklar $n = 3$, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $****p < 0,0001$
uyarım öncesi matrisler kontrol grubu olduğunda, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $**p < 0,001$,
 $***p < 0,0001$ statik 14. gün matrisler kontrol grubu olduğunda, $*p < 0,05$, $**p < 0,001$
dinamik kültür grupları karşılaştırıldığında).

Şekil 4.56. Statik kültürün 7. ve 14. günlerinde (S-7 ve S-14) ve dinamik 14. gün 166
örneklerinde (M-D1, E-D2 ve EM-D) C2C12 hücrelerine ait bağıl MyoD, Myogenin,
MHC, NF-H ve AChR- α gen ifadeleri (İstatistiksel anlamlı farklılıklar $n = 4$, $*p < 0,05$,
 $****p < 0,0001$ dinamik kültür grupları karşılaştırıldığında, $**p < 0,01$, $**p < 0,001$,
 $***p < 0,0001$ statik kültürün 14. günü kontrol grubu olup EM-D grubu ile
karşılaştırıldığında).

Şekil 4.57. Statik kültürün 7. ve 14. günlerinde, mekanik, elektriksel ve elektromekanik 169 uyarımlı dinamik kültürlerin 14. gününde (M-D1, E-D2 ve EM-D) C2C12 hücrelerine ait MyoD, Myogenin ve MHC immünohistokimyasal boyama konfokal mikroskobu görüntüleri. MyoD (yeşil) antijeni hücre çekirdeğinde, Myogenin (yeşil) antijeni hücre iskeletinde ve MHC (kırmızı) antijeni kalın filamentlerde lokalize olmuştur. (Büyütmeler, statik kültür: 10 X ve dinamik kültür: 20 X).

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. <i>In vitro</i> iskelet kası doku mühendisliğinde kullanılan biyomalzemeler, [1]’den değiştirilerek.....	23
Çizelge 2.2. Mekanik uyarımlı biyoreaktör çalışmaları, [11]’den değiştirilerek..	28
Çizelge 2.3. Elektrik uyarımlı biyoreaktör çalışmaları, [11]’den değiştirilerek...	30
Çizelge 2.4. Elektromekanik uyarımlı biyoreaktör çalışmaları, [11]’den değiştirilerek.....	31
Çizelge 3.1. Rastgele ve hizalı P3HB/PBA fibröz matrikslerin üretiminde parametreler.....	39
Çizelge 3.2. C2C12 hücre hattı karakterizasyonunda yapılan analizler.....	44
Çizelge 3.3. C2C12 hücre hattı karakterizasyonunda kullanılan hücre kültür kapları, yüzey alanı ve çalışma hacmi değerleri.....	45
Çizelge 3.4. RT-qPCR analizinde kullanılan primerler ve yapışma sıcaklıkları....	49
Çizelge 3.5. Biyoreaktörde hücre kültürü çalışmalarından önce test edilen mekanik ve elektriksel uyırım koşulları.....	53
Çizelge 3.6. Hücre kültürü biyoreaktör çalışmalarında kullanılan ön ve ileri analiz grupları, grup kısaltmaları ve analizler.....	56
Çizelge 3.7. Biyoreaktör çalışmalarına ait RT-qPCR analizinde kullanılan primerler ve yapışma sıcaklıkları.....	60
Çizelge 4.1. P3HB ve P3HB/PBA fiber matrikslerin elementel analizi.....	72
Çizelge 4.2. Rastgele ve hizalı P3HB ve PBA katkılı P3HB fiber matrikslerin d ₃₃ piezoelektrik gerinim sabitleri.....	80
Çizelge 4.3. Rastgele ve hizalı P3HB ve PBA katkılı P3HB fiber matrikslerin mekanik özellikleri.....	82

Çizelge 4.4. Rastgele ve hizalı P3HB/PBA fiber matrikslerin su temas açıları.....	87
Çizelge 4.5. Belirlenen koşullarda uygulanan mekanik uyarımlar sonucunda hizalı P3HB/PBA nanofiber matrikslerin mekanik özelliklerindeki değişimler....	111
Çizelge 4.6. Belirlenen koşullarda uygulanan elektriksel uyarımlar sonucunda hizalı P3HB/PBA nanofiber matrikslerin mekanik özelliklerindeki değişimler....	120
Çizelge 4.7. Mekanik uyarımlı biyoreaktör çalışmalarında kullanılan ön ve ileri analiz grupları, grup kısaltmaları ve analizler.....	123
Çizelge 4.8. Mekanik uyarımlı biyoreaktör ön hücre kültürü çalışmalarında elde edilen sonuçlara göre gruplar arası skorlama.....	132
Çizelge 4.9. Mekanik uyarımlı biyoreaktör ileri hücre kültürü çalışmalarında mekanik özelliklerdeki değişimler.....	133
Çizelge 4.10. Mekanik uyarımlı biyoreaktör hücre kültürü çalışmalarında elde edilen sonuçlara göre gruplar arası skorlama.....	141
Çizelge 4.11. Elektrik uyarımlı biyoreaktör çalışmalarında kullanılan ön ve ileri analiz grupları, grup kısaltmaları ve analizler.....	142
Çizelge 4.12. Elektrik uyarımlı biyoreaktör ön hücre kültürü çalışmalarında elde edilen sonuçlara göre gruplar arası skorlama.....	147
Çizelge 4.13. Elektrik uyarımlı biyoreaktör ileri hücre kültürü çalışmalarında mekanik özelliklerdeki değişimler.....	148
Çizelge 4.14. Elektrik uyarımlı biyoreaktör hücre kültürü çalışmalarında elde edilen sonuçlara göre gruplar arası skorlama.....	156
Çizelge 4.15. Mekanik, elektrik ve elektromekanik uyarımlı biyoreaktör ileri hücre kültürü çalışmalarında mekanik özelliklerdeki değişimler.....	163

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

CuK α	Bakır K- α x-ışını enerjisi
d ₁₄	kesme piezoelektirisitesi
d ₃₃	Piezoelektrik gerinim sabiti
mA	Miliamper
p	İstatistiksel anlamlılık
pC	Piko Coulomb
r _{amp}	Aktivasyon fonksiyonu
rpm	Dakikadaki devir sayısı
T _a	Yapışma sıcaklığı
U	Birim
V	Volt
v/v	Hacim/hacim
W	Watt
w/v	Kütle/hacim
w/w	Kütle/kütle
θ	Teta
μ	Özgül büyüme hızı

Kısaltmalar

2B	2 boyutlu
3B	3 boyutlu
3HB	3-hidroksi butirat
75T	75 cm ² hücre kültür şişesi
ACh	Asetilkolin
AChR	Asetilkolin reseptörü
AChR- α (Chrna1)	Asetilkolin reseptörü-alfa
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskopisi
bHLH	Basic helix-loop-helix
BSA	Sığır serum albümini
cDNA	Komplementer DNA
DAPI	4',6-diamidino-2- fenilindol, dihidroklorür
DMSO	Dimetil sülfoksit
DPBS	Dulbecco'nun fosfat tampon çözeltisi
DPBS+	Ca ²⁺ ve Mg ²⁺ içeren DPBS
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
ECM	Hücre dışı matris
EDX	Enerji Dağılımlı X-Işını Spektroskopisi
EthD-1	Etidyum homodimer-1
FBS	Fetal sığır serumu
FFMT	Serbest fonksiyonel kas transferi
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
FWHM	Full width at half maximum
G	Büyüme fazı
G0	Suskun faz
GA	Glutaraldehit
GAG	Glikozaminoglikan
GS	Keçi serumu
HFIP	1,1,1,3,3,3-hekzafloro-2-propanol
HGF	Hepatosit büyüme faktörü

HMDS	Heksametildisilazan
HS	At serumu
HSC	Hematopoetik kök hücre
IF	Intermediate filaments
IGF	İnsülin büyüme faktörü
IHC	İmmünohistokimya
<i>in situ</i>	Yerinde
<i>in vitro</i>	Laboratuvar ortamında
<i>in vivo</i>	Canlı organizmada
M	Mitoz fazı
MGF	Mekanik büyüme faktörünün
MHC	Miyozin ağır zincir
MHC	Miyozin ağır zincir
MHC-I	Miyozin ağır zincir-izoform I
MHC-IIa	Miyozin ağır zincir-izoform II
MHC-IIx	Miyozin ağır zincir-izoform IIx
MMP-2	Matriks metalloproteinaz-2
MPC	Kas projenitör hücre
MRF4	Miyojenik faktör 6
mRNA	Mesajcı RNA
MSC	Mezenkimal kök hücre
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-difenil tetrazolyum bromür
Myf5	Miyojenik faktör 5
MyH1	Miyozin ağır zincir 1
MyH2	Miyozin ağır zincir 2
MyH7	Miyozin ağır zincir 7
MyoD	Miyoblast belirleme proteini 1
Myogenin	Miyojenik faktör 4
NF	Nörofilament
NF-H (mNefh)	Nörofilament ağır zincir
P/S	Penisilin/streptomisin
P3HB	Poli[(R)-3-hidroksibütirik asit]

PANI	Polianilin
PBA	Poli- β -alanin
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PBS/A	%1 (w/v) BSA içeren PBS
PCL	Polikaprolakton
PEG	Polietilen glikol
PGA	Poliglikolik asit
PHA	Polihidroksialkanoat
PLA	Polilaktik asit
PLCL	Poli (L-laktid-ko- ϵ -kaprolakton)
PLGA	Poli(laktik-ko-glikolik asit)
PLLA	Poli-L-laktik asit
PU	Poliüretan
PVDF	Polivinilidin florür
RPE	Yıkama tamponu
RT-qPCR	Gerçek Zamanlı-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RW1	Guanidin tuzu içeren tampon çözeltisi
S	Sentez fazı
SDF-1	Stroma hücresi türevli büyüme faktörü 1
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TCPS	Tissue culture polystyrene
TGA	Termogravimetrik Analiz
TGF- β	Dönüştürücü büyüme faktörü beta
UV	Ultraviyole
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
XRD	X Işını Kristalografisi

1. GİRİŞ

İnsanı diğer canlılardan ayıran bilinçli davranışlarıdır. İnsan bilinçli olarak uyur, beslenir, konuşur ve bunları gerçekleştirebilmek için hareket eder. Ancak vücut bütünlüğünde bir hasar meydana geldiğinde hareketleri kısıtlanır. Bu kısıtlamaların başında kas-iskelet sisteminde meydana gelen hasarlar gelir. Özellikle kas sisteminde oluşan yaralanmalar ve travmalar hareketleri kısıtlamasının yanında, psikolojik ve maddi kayıplar da meydana getirir. Çünkü insanın bilinçli olarak yürüttüğü tüm faaliyetler hareket kabiliyeti kısıtlandığı için sekteye uğrar.

İskelet kası rejenerasyon yeteneğine sahip bir doku olmasına rağmen, hacimsel kas kayıplarında ve ağır yaralanmalarda kendini yenileyebilme yeteneği sınırlı kalmaktadır. İskelet kası hasarlarının tedavisine yönelik klinikte **otolog kas transferi** gibi cerrahi teknikler ve bu teknikleri destekleyen **fizik tedavi** gibi cerrahi olmayan tedavi yöntemleri mevcuttur [1, 2]. Ancak cerrahi yöntemlerin birçoğunda donör bölge morbiditesi, enfeksiyon ve nekroz gerçekleşmekte ve bunların sonucunda greft başarısızlığı ile karşılaşmaktadır. Fizik tedavi ise kas kaybını azaltsa da büyük hacimli kas kayıplarında kas rejenerasyonunu sağlayamamaktadır. Bu nedenle iskelet kası doku mühendisliği yaklaşımları geliştirilmektedir. İskelet kası doku mühendisliği, canlı kas yapısını *in vitro*, *in vivo* ve *in situ* koşullarda taklit ederek kas rejenerasyonunda kullanılacak mühendislik ürünü dokuların üretimini amaçlar.

İskelet kası nano boyuttan mikro boyuta kadar hizalı ve düzenli bir morfolojiye sahip birden fazla hücre tipini barındıran bir dokudur [3, 4]. Ayrıca kas dokusu yumuşak ve elastik bir dokudur ve uygulanan mekanik kuvvet altında lineer olmayan elastik gerinim-gerilim davranışlarıyla ilgili pasif mekanik özelliklere sahiptir [4]. Ek olarak, iskelet kası etrafını çevreleyen nöral ağlar ve nöromusküler bağlantı noktaları ile elektroaktif, kasılma aktivitesi gösteren ve elektromekanik kuvvetlerin baskın olduğu bir dokudur [4, 5, 6]. Bu özelliklerin tümüyle taklit edilmesi fonksiyonel bir kas dokusunun eldesi için şarttır. Bu amaçla geliştirilen biyomalzeme temelli yaklaşımlarda kas dokusunun hizalı ve düzenli yapısının taklidi, kas dokusuna benzer mekanik ve elektriksel özelliklere sahip malzeme seçimi ve buna bağlı olarak uygun iskele üretim yönteminin seçilmesi temel tasarım parametreleri olarak karşımıza çıkmaktadır.

Literatürde iskelet kası doku mühendisliği çalışmalarında kas dokusuna uygun yapay hücre dışı matriks (ECM) olarak kolajen, fibrin, aljinat ve ipek fibroin gibi doğal polimerler ve poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), poli-L-laktik asit (PLLA), polikaprolakton (PCL), polianilin (PANI) ve poliüretan (PU) gibi sentetik polimerler kullanılmıştır [1]. Bu polimerler ile kas dokusunun karmaşık morfolojik özelliklerini taklit edebilmek amacıyla gözenekli doku iskeleleri, rastgele ve hizalı fibröz matriksler ve hidrojeller üretilmiş; bu yapıların iskelet kası farklılaşmasındaki etkinliği incelenmiştir. Yalnızca hizalı fiber matriksler ile yapılan çalışmalar, yapının morfolojik olarak doğal kas dokusuna benzerliği nedeniyle, kas rejenerasyonunda umut vadetmiştir [1]. Uygun malzeme arayışında bir diğer göz önünde bulundurulması gereken özellik, gerinime dirençli mekanik özelliklere sahip elastik doku iskelelerinin geliştirilmesidir. Malzeme mekanik özelliklerinin yetersiz olduğu koşullarda miyojenik farklılaşma kapasitesi sınırlı kalmaktadır. Çalışmalarda malzeme topografisi ve mekanik özelliklerin her ikisi birlikte doğal kas dokusuna uygun şekilde ayarlanmadığından miyoblastlardan miyotüplere farklılaşma, miyotüp hizalanması ve miyotüp füzyonu istenilen düzeyde olmamıştır [7]. Son olarak, tasarlanan malzemelerin çevresel uyarıyı tanıyabilmesi ve uyarıyı hücrelere iletebilmesi için elektriksel olarak iletken veya piezoelektriklik gibi pasif elektriksel özelliklere sahip olması beklenmektedir. Bu bağlamda, polivinilidinden florür (PVDF) polimeri doku mühendisliği çalışmalarında elektriksel özellikleri nedeniyle tercih edilmektedir. Ancak PVDF biyobozunur bir polimer değildir ve bu nedenle iskelet kası doku mühendisliğinde kısıtlı bir kullanım alanına sahiptir [8]. Tüm bunlar birlikte değerlendirildiğinde, malzeme temelli yaklaşımlarda önemli gelişmeler olmasına rağmen, iskelet kasını tam anlamıyla taklit etmek için gerekli biyokimyasal, morfolojik, mekanik ve elektriksel özelliklerin tümüne sahip olan bir biyomalzemeyi içeren bir tasarıma henüz ulaşamamıştır.

Kas rejenerasyonunda malzemenin morfolojik, mekanik ve elektriksel özelliklerinin dışında, fonksiyonel miyojenik farklılaşma için mekanik ve elektriksel uyarıların da varlığı gereklidir [9]. Miyojenik farklılaşma mekanik uyarılar ile tetiklenirken, miyojenik maturasyon elektriksel uyarılar varlığında gerçekleşir. Yüksek düzeyde farklılaşmış fonksiyonel bir doku eldesi için kas dokusuna özgü elektromekanik uyarıların taklit edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla kas dokusu biyoreaktör sistemleri geliştirilmektedir [10]. Bu reaktör sistemleri arasında kasılma sırasında doğal kas dokusunda gerçekleşen mekanik hareketleri ve nöral aktiviteyi taklit edebilen mekanik

ve elektrik uyarımlı biyoreaktör sistemleri öne çıkmaktadır. Literatürde birçok mekanik ve elektriksel uyarımlı biyoreaktör çalışması mevcuttur [11]. Ancak bu çalışmalarda kullanılan uyarım parametreleri değişkenlik göstermekte olup, henüz bu konuda ortak bir görüş oluşmamıştır. Yapılan çalışmalar, ön çalışmalar ile sistematik olarak gerçekleştirilmemesine rağmen literatüre *in vitro* iskelet kası doku mühendisliğinde çevresel uyarımların gerekliliği konusunda önemli veriler sunmuştur. Kas dokusundaki elektromekanik çevreyi senkronize bir şekilde taklit edebilen mekanik ve elektriksel uyarımların birleştirilebildiği elektromekanik uyarımlı hibrit biyoreaktör tasarımı oldukça önemlidir. Literatürde elektromekanik uyarımlı biyoreaktör çalışmaları oldukça sınırlıdır. Bu çalışmalarda uyarımlar tek başlarına ve daha sonra simultane olarak sistematik bir şekilde test edilmemiştir. Bu nedenle miyojenik farklılaşma ve maturasyon yeteneği sınırlı mühendislik ürünleri elde edilmiştir. Malzeme topografisinin, mekanik ve elektriksel özelliklerinin bir arada istenilen düzeyde ayarlanmasının yanında, kas dokusundaki çevresel uyarımların sistematik çalışmalar ile malzemeye uygun bir şekilde taklit edilmesi iskelet kası doku mühendisliğinde başarı için kilit faktördür.

Tez çalışmasında, literatürdeki çalışmalardan farklı olarak, iskelet kas dokusunu morfolojik, mekanik ve elektriksel özellikleri ile bir arada taklit edebilen, miyojenik olarak uyumlu ve miyojenik farklılaşmayı destekleyebilen; mekanik, elektriksel ve elektromekanik uyarımlarla birlikte miyojenik maturasyon aşamasında başarı sergileyebilen ve böylece fonksiyonel bir *in vitro* iskelet kası dokusunun elde edilmesini sağlayacak biyomalzeme temelli bir yaklaşım geliştirilmiştir. Bu amaçla literatürde ilk defa ana polimer olarak poli(3-hidroksibutirat) (P3HB), katkı polimeri olarak poli- β -alanin (PBA) kullanılmıştır. P3HB iskelet kası dokusunu taklit edebilecek kimyasal, mekanik ve elektroaktif (piezoelektrik) özelliklere sahip doğal bir polimerdir. Ancak yüksek kristalinite kaynaklı kırılabilirliğe, düşük biyobozunma hızına ve yüksek hidrofobisiteye sahip olması doku mühendisliği çalışmalarında tek başına kullanımını kısıtlamaktadır [12, 13]. Bu nedenle genellikle daha esnek polimerlerle harmanlanarak kısıtlayıcı özelliklerinde istenen değişimler sağlanmaktadır. Poliamid ailesinin bir üyesi olan PBA ise esnek zincirlere sahip bir sentetik polimer olup, amid grupları (CONH) içeriğiyle α -amino asit bazlı protein moleküllerine benzemektedir [14]. P3HB polimeri PBA polimeri ile katkılanarak, P3HB'nin doku mühendisliği açısından olumsuzluk yaratan özellikleri iyileştirilebilmektedir [13]. 2017 yılında tamamlanan çalışmamızda piezoelektrik özellikler sergileyen PBA ile katkılanmış P3HB fiber iskelelerin yumuşak

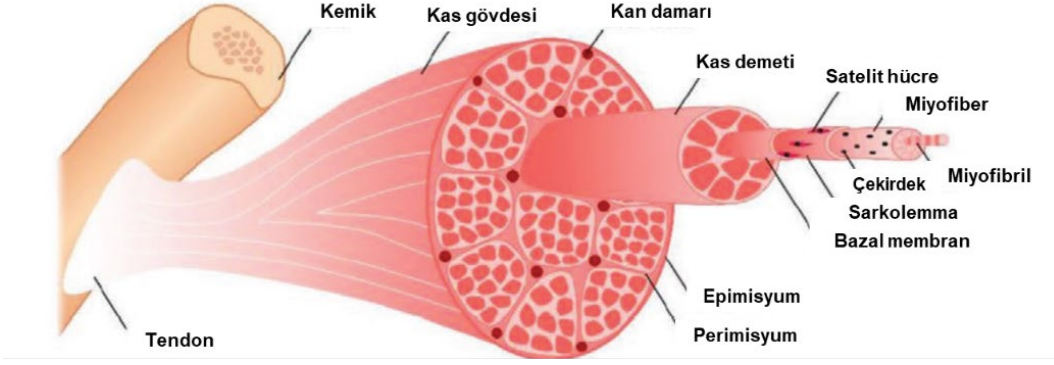
doku uygulamalarında kullanılabileceği önerilmiştir [13]. Buradan yola çıkarak, tez çalışmasının ilk aşamasında elektroğirme yöntemi ile rastgele ve hizalı fiber morfolojisine sahip P3HB/PBA nanofiber matriksler üretilmiştir. Matriksler karakterize edilerek, matriks özelliklerinin kas dokusuna uygunluğu araştırılmıştır. Daha sonra C2C12 fare miyoblast hücre hattı ile statik hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiş ve çeşitli analizler ile matrikslerin miyojenik uyumluluğu ve miyojenik farklılaşmadaki etkinliği araştırılmıştır. Hizalı matrikslerin morfolojik, mekanik ve piezoelektrik özellikleri ile miyojenik farklılaşmayı üstün bir şekilde desteklediği ve hücreleri miyojenik maturasyon yolağına yönlendirdiği tespit edilmiştir. Tez çalışmasının ikinci aşamasında, literatürde ilk defa, hem mekanik ve elektriksel uyarımları tek başına sağlayabilen hem de bu uyarımların birleştirilerek simultane olarak kullanılabildiği elektromekanik uyarımlı bir hibrit biyoreaktör grubumuzca tasarlanmış ve hizalı matriksler ile sistematik dinamik hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bildiğimiz kadarıyla, hücre kültürü çalışmaları öncesinde malzemenin mekanik ve elektriksel uyarımlara verdiği cevap daha önce hiç araştırılmamıştır. Malzemenin uyarımlara vereceği cevap hücre kültürü aşamasında miyojenik farklılaşma başarısını doğrudan etkileyeceğinden, tez çalışmasında, dinamik hücre kültürü çalışmalarından önce birçok parametrede matriksler ile mekanik ve elektriksel uyarımlı biyoreaktörde denemeler yapılmıştır. Denemeler sonrasında en uygun parametreler ile mekanik, elektriksel ve elektromekanik biyoreaktörde dinamik kültür çalışmaları gerçekleştirilmiş ve elde edilen doku mühendisliği ürününün iskelet kası doku mühendisliğinde kullanımı değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Tez çalışmasında incelenen konulara yönelik literatür bilgileri bu bölümde verilmiştir. İlk kısımda iskelet kası fizyolojisi ve histolojisi, iskelet kasının kasılma aktivitesi, iskelet kası yenilenmesi (miyogenez) ve miyojenik farklılaşmanın yanı sıra bu süreçleri kontrol eden gen ve faktörlerin regülasyonu ile ilgili bilgiler sunulmuştur. İkinci kısımda iskelet kası kayıplarında ve hasarlarında uygulanan mevcut tedavi yöntemleri, tedavilerde başarı sağlanamamasından dolayı geliştirilen iskelet kası doku mühendisliği yöntemleri ve kullanılan biyomalzemeler ve biyoreaktörlere ait bilgiler ve çalışmalar özetlenmiştir. Son kısımda ise çalışmada kullanılan poli(3-hidroksibutirat) (P3HB) ve poli- β -alanin (PBA) polimerlerinin özellikleri, iskelet kası doku mühendisliği için önemli pasif elektriksel özelliklerden biri olan piezoelektrisite ve P3HB'ye özgü piezoelektrik özellikler ile ilgili bilgiler verilmiştir.

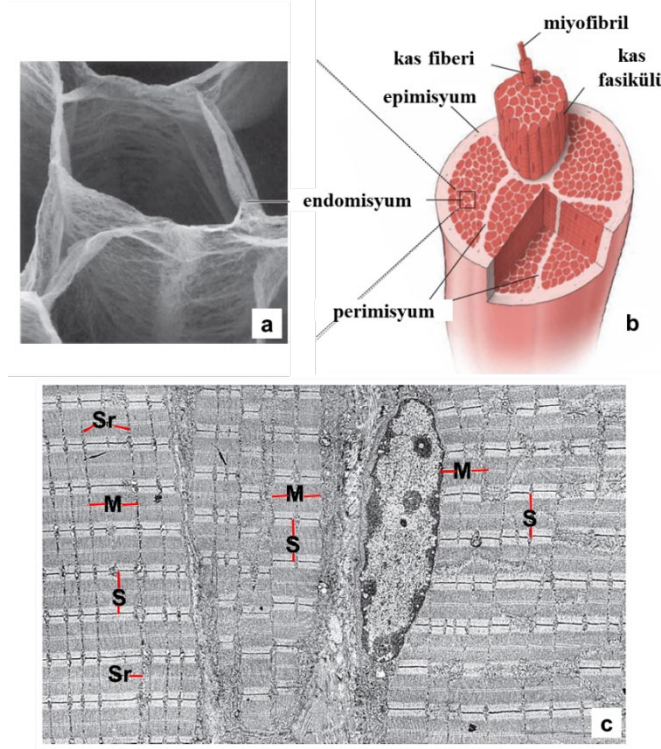
2.1. İskelet Kası Fizyolojisi ve Histolojisi

İskelet kası; miyofibrilleri, kan damarlarını, sinirleri, hücre-dışı bağ dokusunu ve birden fazla hücre tipini barındıran kompozit bir dokudur. Temel yapısal birimi miyofibrillerdir. Miyofibriller, organize kasılabilen proteinlerden oluşan paralel yönelimli fibröz birimlerdir. Bu yapıların çapı genellikle kas yapısına bağlı olarak 1-3 μm civarındadır [15, 16]. Miyofibriller paketler halinde bir araya gelerek iskelet kasını oluşturur. Her bir miyofibril paketi bağ dokusu ile sarılıdır. Bağ dokusu kas şeklini korur ve hareket sırasında miyofibrillerin arasında sinerji sağlar. Miyofibrillerin dış bölgelerinde yüksek oksijen gereksiniminin karşılandığı kan damarı ağları bulunur. Ayrıca kas sistemi, elektriksel uyarıların iletildiği nöromusküler bağlantı noktaları ile sinir sistemine bağlıdır [17]. İskelet kası nano boyuttan mikro boyuta kadar birbirine paralel olarak hizalanmış fiber yapılardan oluşur [3, 4]. İskelet kasının hiyerarşik yapısı **Şekil 2.1**'de verilmiştir.



Şekil 2.1. İskelet kasının hiyerarşik yapısı, [18]'den değiştirilerek.

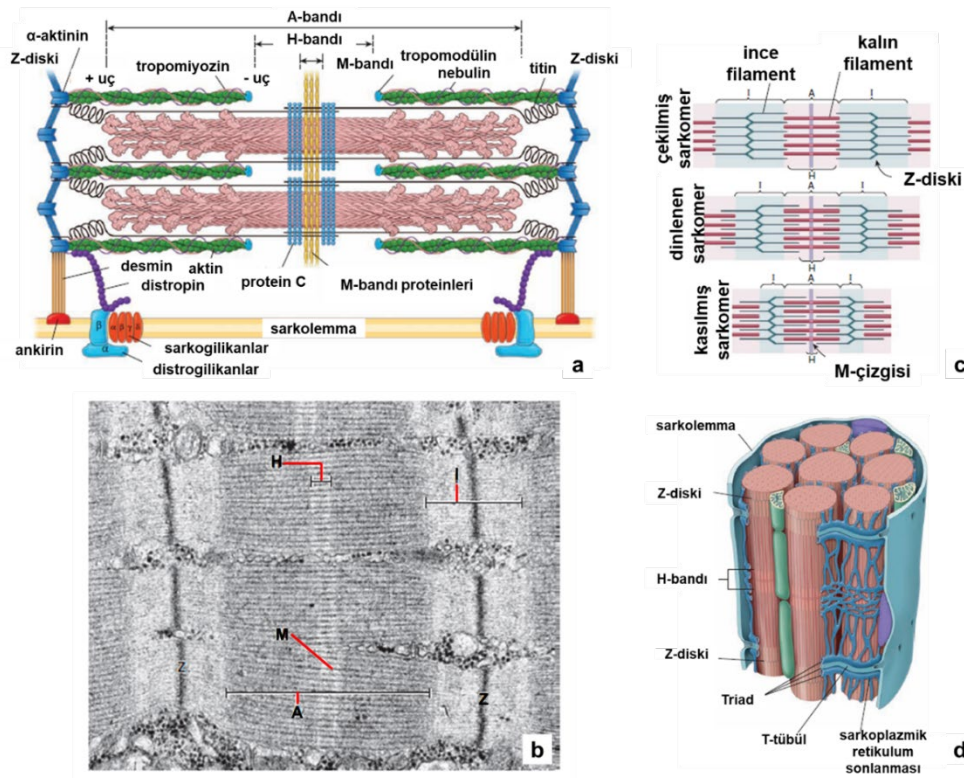
Kas hücresinin zarına sarkolemma, sitoplazmasına sarkoplazma, mitokondrisine sarkozom ve endoplazmik retikulumuna sarkoplazmik retikulum adı verilir. Sarkolemma her kas demetini saran ve bir nevi bariyer oluşturan tübüler bir kılıftır. Sarkolemma içindeki oyuklar "transvers tübül" (T tübül) olarak adlandırılır ve iyon değişimi için önemli bir işlev görür [19]. Çizgili kas hücreleri hücre sınırları seçilemeyecek şekilde diğer kas hücreleri ile füzyona uğrar. Bu nedenle iskelet kas dokusu çok çekirdekli bir görünüm alır. Oval ve uzamış formdaki çekirdekler genellikle dış kısımda, sarkolemma'nın hemen altında yer alır [20]. İskelet kası hücre dışı matriksi (ECM), glikozaminoglikanları (GAG); hiyalüronik asit, kondroitin sülfat, dermatan sülfat, heparin, heparin sülfat ve keratan sülfat gibi bileşenleri; yapısal fibröz proteinleri (kolajen ve elastin gibi); adeziv proteinleri (fibronektin, laminin, tenasin, entaktin, vitronektin, integrin, selektin, VCAM ve ICAM gibi) ve diğer proteinleri (fibrillin, fibulin, nudelin, netrin, galaktin ve glutaktin gibi) içerir [21]. Kas dokusunu çevreleyen bağ dokusu ise dıştan içe doğru; epimisyum, perimisyum ve endomisyumdan oluşur. Endomisyumda kas fibrillerinin besin ve O₂ alışverişini sağlayan kılcak damarlar bulunur. Birden fazla kas fibrilli perimisyum tarafından sarılarak fasikülleri oluşturur. Perimisyum, 10 ila 100 fasikülü çevreleyebilir. Kas fasikülleri gruplanarak epimisyum tarafından çevrelenen kas demetini oluşturur [22]. Katmanlı bağ dokusu ile sarılmış düzenli fiberlerin şematik ve elektron mikroskopu fotoğrafları **Şekil 2.2**'de verilmiştir.



Şekil 2.2. Sığır semitendinosus kası intramusküler bağ dokusu (endomisyum) elektron mikroskobu fotoğrafı (büyütme: 480X) (a), iskelet kası organizasyonuna ve kası çevreleyen bağ dokularına ait şematik görüntü (b) ve iskelet kası fiberlerinin genel organizasyonunu gösteren elektron mikroskobu fotoğrafı (büyütme: 6,5KX) (Sr, S ve M ile belirtilen bölgeler sırasıyla; sarkoplazma tabakalarını, sarkomerleri ve miyofibrilleri ifade etmektedir.) (c), [22]'den değiştirilerek.

Kas fibrilleri, birkaç yüz ile birkaç bin miyofibril içerir. Miyofibriller, aktin, miyozin ve destek proteinlerinden meydana gelir. İskelet kas filamentleri aktin, tropomiyozin, troponin ve tiyozin olmak üzere 4 temel proteinden oluşur. Ek olarak, titin, dezmin, vimentin, nebulin, α -aktinin, miyomezin ve C proteini gibi yapısal proteinler de bulunur (Şekil 2.3). Çizgili kasın %55'ini miyozin ve aktin proteinleri oluşturur. İnce filamentler aktin, tropomiyozin ve troponinden oluşurken; kalın filamentler miyozinden oluşur. Aktin ve miyozin düzeni iskelet kasına mikroskobik çizgili görünümünü verir ve sarkomer adı verilen fonksiyonel birimleri oluşturur. Sarkomer, M-çizgisi, Z-disk, H-bandı, A-bandı ve I-bandını içerir [23]. Sarkomer, Z-diskleri arasında bulunan miyofibril bölgesi olarak tanımlanır. Bir sarkomer, kasılma hareketi başlamamış memeli kasında 2-3 μm uzunluğundadır ve kasılma hareketi başladığında 4 μm 'den fazla uzayabilir ya da 1 μm 'ye kadar kısalabilir [22]. Koyu renkli A bandı, miyozinden oluşan kalın filamentleri içerir ve sarkomerin merkezine doğru uzanırken Z-disklere doğru genişler. Kalın

filamentler, sarkomerin ortasında M-çizgisi (miyomesin proteini) ile ortalanır. Daha açık I-bandı bölgeleri, α -aktinin ile Z-disklere bağlanan ince filamentleri içerir. İnce filamentler A-bandına doğru uzanır ve kalın filament bölgeleriyle örtüşür. A-bandı, kalın miyozin ve ince aktin filamentleri içerdiği için koyu renklidir. A-bandının ortasındaki H-bandı, sadece kalın filamentleri içerdiği için biraz daha açık renklidir. Kasılma sırasında miyofilamentler birbirlerinin üzerinde kayarlar ve miyofilament uzunluğu değişmez. Z-diskler arasındaki mesafe azalır ve sarkomer kısalır. Sarkomer ile ilişkilendirilen diğer yapısal proteinler aktif kuvvet üretiminde doğrudan rol oynamaz. Yapısal proteinler, hizalanmaya yardımcı olur ve sarkomer elastisitesini artırır [24].

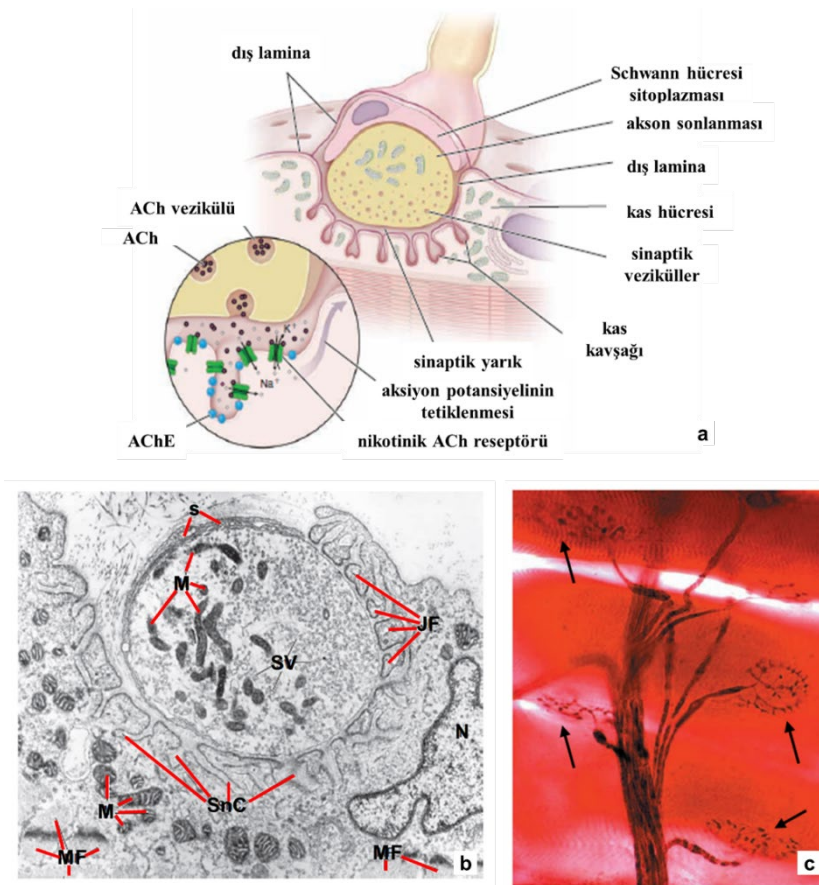


Şekil 2.3. Sarkomerin moleküler yapısı (a), miyofibril elektron mikroskobu fotoğrafı (büyütme: 35 KX) (İnce (aktin) filamentlerden oluşan ve Z diski tarafından ikiye bölünen I bandı, kalın (miyozin) filamentlerden oluşan A bandı. A bandında bulunan diğer bantlar ve çizgiler; H bandı ve M çizgisi.) (b), uyarılmış ve dinlenme konumundaki sarkomer (c) ve çizgili kas sarkomer organizasyonu (d), [22]’den değiştirilerek.

2.2. İskelet Kasında Kasılma Aktivitesi

İskelet kası vücudun %40'ını ve dinlenme metabolizmasının %30'unu oluşturur. Dinlenme koşullarında, kalp debisinin yaklaşık %20'si kas boyunca geçer, ağır egzersiz sırasında ise kas, kalp debisinin %80'ini kullanır [25]. Bu nedenle iskelet kası, kıkırdak

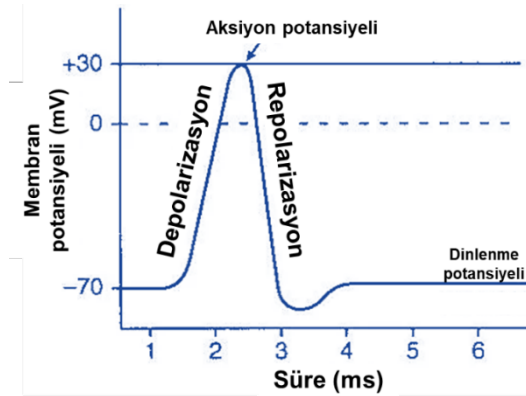
ve kemik dokudan daha yüksek kütle transferine ihtiyaç duyar. Miyozin ağır zincir (myosin heavy chain-MHC) izoformlarına göre iskelet kasındaki fibriller, oksidatif yavaş kasılan (tip-I) ve glikolitik hızlı kasılan (tip-II) olmak üzere iki ana kategoriye ayrılırlar. İki fibril tipi de hem metabolizmaları açısından hem de sarkomerlerinin bileşimi açısından farklıdır. Yavaş kasılan fibriller uzun mesafe koşuları gibi az yoğun ancak uzun süreli aktivitelerde, hızlı kasılan fibriller ise sprint koşuları gibi çok yoğun ancak kısa süreli aktivitelerde etkindir.



Şekil 2.4. Nöromusküler bağlantı noktası şematik görüntüsü (a), nöromusküler bağlantı noktası elektron mikroskop fotoğrafı (büyütme: 32 KX) (M, SV ve S ile belirtilen bölgeler sırasıyla; mitokondri topluluklarını, sinaptik vezikülleri ve Schwann hücre sitoplazmasını ifade ederken, JF, SnC, N ve MF ile gösterilen bölgeler sırasıyla; bağlantı katlanma noktalarını, subnöral çatlakları, kas fiberinin çekirdeğini ve miyofibrilleri temsil etmektedir.), (b) nöromusküler bağlantı noktasında motor sinir fotomikrografı (büyütme: 620X) (siyah oklar kas içerisine sinyal iletimini sağlayan sinir dallarını göstermektedir.) (c), [22]'den değiştirilerek.

İskelet kası dokusu elektriksel uyarılara cevap verebilen, elektroaktif özelliklere sahip ve kasılma aktivitesi gösterebilen bir dokudur. Özellikle elektromekanik sinyaller iskelet kası dokusundaki ana fiziksel uyarılardan biridir [5, 6]. Kalp kası kendiliğinden kasılma özelliğine sahipken, iskelet kası spontan membran depolarizasyonunu sağlayan iyon kanalları olmadığından, kendiliğinden kasılma aktivitesi gösteremez ve iskelet kasının aktivasyonu ancak sinir uyarımı ile gerçekleştirilebilir. İskelet kası, omurilik veya beyincikten köken alan motor nöronlar tarafından yoğun bir şekilde innerve edilir. İskelet kasına bağlanan motor sinirlere ek olarak çok sayıda duyu siniri de bulunur. Duyu sinirlerinin bir kısmı ağrı duyusunu algılar ve kasılmanın sonlanması gerektiğini merkezi sinir sistemine iletir [26]. Motor nöron uçlarına ulaşan elektriksel uyarım büyük kas fiberlerini aktive etmek için yetersiz olduğundan nöronların iskelet kas fiberlerine bağlandığı kompartımanlar yani sinir-kas kavşakları (nöromusküler bağlantı noktaları) kullanılır (Şekil 2.4).

Nöromusküler bağlantı noktaları asetilkolin gibi önemli nörotransmitterleri iletmek için uygun bir ortam sağlar [18]. Elektriksel uyarım, nöromusküler bağlantı noktalarında artırılarak kas plakalarına iletilir ve kas kasılması tetiklenmiş olur. Sarkolemma, membran potansiyelini korumak ve aksiyon potansiyeli oluşturmak için gerekli voltaj kapılı iyon kanallarını içerir [27]. İskelet kas dokusunda oluşan aksiyon potansiyeli Şekil 2.5'te verilmiştir.

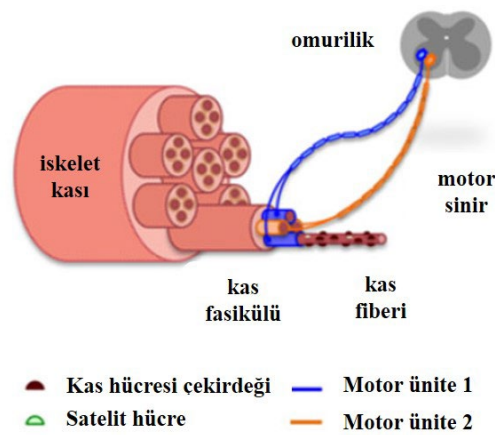


Şekil 2.5. İskelet kasında aksiyon potansiyeli.

İskelet kas demetinin kasılması, motor nöronun aksonu boyunca iletilen sinir impulsunun nöromusküler bağlantıya ulaşması ile başlatılır. Sinir impulsu, asetilkolinin sinaptik boşluğa salınmasını tetikler. Kas zarında bulunan asetilkolin kapılı katyon kanalları açılır. Kas lifi zarında yoğun olarak bulunan Na^+ iyonları bu kanallardan içeri girer. Bu yolla bölgesel bir depolarizasyon oluşur. Depolarizasyonla birlikte kas lifi zarında aksiyon

potansiyeli başlar. Aksiyon potansiyeli tüm kas lifi zarını depolarize eder ve kas lifi merkezine doğru yayılarak, sarkoplazmik retikulumda depolanmış Ca^{2+} iyonları serbest kalır. Kalsiyum iyonları aktin ve miyozin iplikçiklerin çekici güç oluşturmasını sağlar. Bir saniye gibi kısa bir sürede kalsiyum, zar pompası ile sarkoplazmik retikuluma geri pompalanır ve yeni bir kas aksiyon potansiyeli gelinceye kadar orada depolanır. Kalsiyum iyonlarının uzaklaştırılması kasılma işleminin sonlanmasına neden olur [22].

Aksiyon potansiyeli oluştuğunda, sarkolemma üzerinde dalgalar halinde yayılır. İskelet kası sarkolemması, hücre yüzeyine dik bir şekilde hücre içine doğru uzanan t-tübüleri adı verilen yapılardan oluşur. Aksiyon potansiyeli t-tübüleri membran boyunca ilerleyerek elektriksel sinyali kimyasal sinyale dönüştüren ve kasılabilir elemanların aktivasyonunu tetikleyecek yapılara iletilir. Tek bir iskelet kas fiberi tarafından üretilen kuvvet hem fiberin kesit alanının hem de uzunluğunun bir fonksiyonudur. Tek bir motor nöron birden fazla kas fiberini uyarır. Bir motor nöron ve uyardığı kas fiberleri bir araya gelerek bir motor birimi oluşturur. Motor birim içindeki kas fiberlerinin sayısı farklılık gösterir. En küçük motor birim, 3 ile 10 kas fiberini içerebilen ince ve karmaşık hareketler için kullanılan kaslarda bulunur. Daha büyük motor birimler ise, birkaç yüz kas fiberine sahip olabilen ve güçlü hareketler için kullanılan kaslarda bulunur. Bir kasın giderek artan bir gerilim üretmesi gerektiğinde, başlangıçta kasın içindeki en küçük motor birimler kullanılır. Yük arttıkça giderek daha büyük motor birimler devreye alınır [27]. Bu nedenle fonksiyonel bir motor birim kas dokusunun en önemli bileşenidir. **Şekil 2.6**'da kas dokusundaki motor birim şematize edilmiştir.



Şekil 2.6. İskelet kası dokusunda motor birim, [28]'den değiştirilerek.

2.3. İskelet Kasının Görevleri

İskelet kasının başlıca görevleri; hareket üretebilmek amacıyla kasılmak, vücut postürünü ve pozisyonunu sürdürmek, vücut sıcaklığını korumak, besinleri depolamak ve eklemleri stabilize etmektir. Mekanik olarak, iskelet kasının temel işlevi kimyasal enerjiyi mekanik enerjiye dönüştürmek, böylece kuvvet ve güç üretmektir. Metabolik olarak, iskelet kasının temel işlevi karbonhidrat ve amino asit gibi temel bileşenlerin depolama alanı olarak hizmet etmek ve bazal enerji metabolizmasına katkıda bulunmaktır. Vücut ısısı üretmek de iskelet kasının temel işlevleri arasındadır. Üretilen bu ısı aslında kas aktivitesinin bir yan ürünüdür ve genellikle boşa harcanır. Vücut, aşırı soğuk ile karşılaştığında, homeostatik bir yanıt olarak kaslara titreme kasılmalarını tetiklemek üzere sinyaller gönderir ve bu işlem gerekli ısıyı üretir [29].

2.4. İskelet Kası Yenilenmesi (Miyogenez) ve Farklılaşma

İskelet kası, satelit hücreler olarak bilinen yerleşik multipotent kök hücrelerinin aktivasyonu ile endojen yeteneğine sahiptir. Satelit hücrelerin kas yenilenmesindeki görevinin yanında, dokudaki farklılaşmamış hücre popülasyonunu koruyabilmek için kendini yenileyebilme kapasitesi de bulunmaktadır. Herhangi bir yaralanma/travma sonrası kas yenilenmesi (miyogenez) başlar, satelit hücreler aktive olur, proliferasyona gider ve ardından miyoblastlara farklılaşırlar. Miyoblastlar bir araya gelerek miyotüpleri, miyotüpler ise miyofibrilleri oluşturarak kas dokusuyla bütünleşirler [30]. Ancak, her yaralanma satelit hücrelerinin aktive olması ile iyileşemez. Bu iyileşme %1-5 ile sınırlıdır. Birçok vakada (örneğin askeri yaralanmalar, trafik kazaları, cerrahi müdahaleler) hacimsel kas kaybı yaşanır ya da yara bölgesinde fibröz yara dokusu veya yağ dokusu oluşumu gerçekleşir. Bu dokular, kas dokusunun kasılma gibi işlevlerinden farklı özelliklere sahiptir ve ana kas dokusu ile bütünleşemediklerinden kas dokusunun işlevini yitirmesine neden olurlar [31].

İskelet kası hasarlarında, miyojenik çevre çok fazla miktarda immünolojik hücre barındırmaktadır. Yaralanma sonrası kas fibrilleri yırtılır ve nekroza giderler. Kesintiye uğrayan fibriller tarafından salgılanan faktörler, inflamatuvar hücrelerin yara bölgesine gelmesi için kemotaktik sinyaller yayarak mononükleer inflamasyonu etkinleştirirler. Yaralanmayı takip eden 2 saat içerisinde bölgeye ulaşan makrofaj ve nötrofiller yaralı bölgeyi tamamen sararlar. Ardından nekrotik fibriller ve hücre atıklar makrofajlar tarafından fagosite edilmeye başlar. Yaralanma sonrası ortamda iki tip makrofaj yer alır.

Pro-enflamatuar makrofajlar (M1) kopan fibrillerin fagositozundan, satelit hücreler dâhil olmak üzere kas progenitör hücrelerinin aktivasyonundan ve takviyesinden sorumludur. Anti-enflamatuar makrofajlar (M2) ise yeni kas fibrillerinin oluşmasını sağlayan satelit hücrelerinden türemiş miyoblastların proliferasyonundan ve farklılaşmasından sorumludur. Son olarak ise yeni oluşan miyotüpler mevcut miyotüplerle birlikte yapılandırılır. Yara dokusu şekil değiştirir ve kas dokusu yeniden kasılma fonksiyonunu yerine getirmeye başlar [32].

Miyojenik farklılaşma ise, farklılaşma aşaması (erken dönem) ve maturasyon aşaması (geç dönem) olmak üzere iki aşamada incelenebilir. Erken dönemde miyoblastlar çoğalır ve yayılırlar, ardından miyositlere farklılaşarak düzenli ve hizalanmış yapılar oluşturmaya başlarlar. Oluşan düzenli yapılar füzyona uğrayarak miyotüpleri meydana getirir. Geç dönemde ise oluşan miyotüpler sıkıca paketlenir, nöromusküler bağlantı noktaları oluşur ve kasılma aktivitesi başlar [32].

2.5. İskelet Kası Dokusunda Gen Regülasyonu

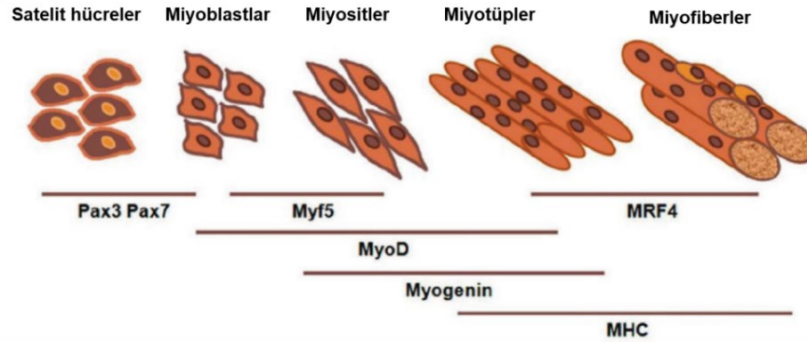
Hücre döngüsü temel olarak mitoz (M fazı), sentez (S fazı) ve bu fazların arasında boşluk olarak da adlandırılan G1 ve G2 fazlarından oluşur. G1, S ve G2 hep birlikte hücre döngüsünün interfaz bölümünü meydana getirir. Hazırlık evresi olan G1 fazı mitozdan hemen sonra başlar ve bu süreçte ribozomlar, enzimler ve membran türevi organeller gibi pek çok sitoplazmik elementin sentezi yapılır. Kopyalama evresi olan S fazında, DNA replikasyonu her bir kromozomu kopyalayarak kromozom sayısının ikiye katlanmasını sağlar. Son kontrollerin yapıldığı G2 fazında mitozun başlamasına öncülük edilir. Hücre döngüsü süresi organizmalar arasında çeşitlilik gösterir. Bu değişkenlik G1 fazında harcanan süreden kaynaklanır. Örneğin insan deri hücrelerinin döngüsü devamlıdır. Sinir hücreleri hiçbir zaman G1 fazından çıkamazlar. Ancak beyaz kan hücreleri, özelleşmiş miyoblast alt popülasyonu olan satelit hücreler gibi hücreler zaman zaman suskun faz olan G0 fazından çıkıp hücre döngüsüne girebilirler. Hücre döngüsü, ilgili genler ve proteinler tarafından oldukça sıkı kontrol edilir. Bu kontrol G1/S ve G2/M geçiş noktalarının yakınlarında protein kinazlar ve siklin proteinlerince gerçekleştirilir.

Hücresel ekspresyon ve sinyalizasyon açısından, miyoblastların farklılaşması ve maturasyonu miyojenik prekürsörler tarafından mRNA'ları eksprese edilen basic-helix-loop-helix (bHLH) ailesinin birer üyesi olan MyoD, Myogenin, Myf5 ve MRF4/Myf6 miyojenik faktörleri ile programlanır (**Şekil 2.7**). Myf5 ve MyoD en erken dönemde,

Myogenin ve MRF4 ise erken dönem farklılaşmada eksprese olur. MyoD eksprese olduktan sonra hücre döngüsünden çıkışı düzenli bir şekilde kontrol eder. Hücreler farklılaşmak üzere G1 fazında hücre döngüsünden çıktıklarında farklılaşma kararlarını Myogenin verir. Bu nedenle farklılaşmış hücreler yüksek oranda MyoD ve Myogenin eksprese eder [33]. Farklılaşmamış miyoblastlar, hücre döngüsünden G0 fazına çıkmış %10'luk bir popülasyona tekabül eden ve hücre havuzunun korunmasını sağlayan bir grup hücreyi de bulundurur.

MHC, sitokinezden kas kasılmasına kadar çeşitli hücrel aktivitelere aktin ile etkileşime giren ökaryotik bir motor proteindir. MHC genleri hem yaşa hem de yaşanan coğrafyaya bağlı olarak düzenlenir. Bu nedenle MHC proteinlerinin farklı ifadesi, kas gruplarının fiber kompozisyonunu kasın bulunduğu konumun bir fonksiyonu olarak değiştirir [34]. İskelet kasının kasılma fonksiyonu temel olarak MHC izoformlarının ekspresyonu tarafından düzenlenir. Yetişkin insan iskelet kası üç MHC izoformunu (MHC-I, MHC-IIa ve MHC-IIx) ifade eder. MHC-I ifade eden kaslar yavaş kasılır ancak yorgunluğa dirençlidir, MHC-IIa ve MHC-IIx ifade eden kaslar ise hızlı ve güçlü kasılır ancak yorgunluğa daha az dirençlidir. İskelet kasının kasılma süresi, kasılma gücü ve yorgunluğa karşı direnci gibi karakteristikleri kas fiberlerinde farklı MHC izoformlarının ifade derecesine büyük ölçüde bağlıdır [35].

İskelet miyoblastlarının farklılaşması kültür ortamında serum tarafından kontrol edilir. Serum oranı belli bir değerin altına düştüğünde farklılaşma başlar. İlk erken gen ürünleri olan c-myc, c-fos ve c-jun, miyogenez için inhibitör etkisi gösterirler. Bu ürünlerin ifadesi serum varlığı ile indüklenir. Bugüne kadar yapılmış çalışmalarda belli bir seviyenin üzerindeki serum miktarının miyoblastların S fazına girmesini indüklediği ve farklılaşmayı inhibe ettiği gösterilmiştir. Aynı zamanda çeşitli sinyal yolları büyüme faktörleri ile indüklenirse proliferasyon tetiklenir, ancak miyogenez inhibe olur. En bilinen farklılaşma inhibitörleri fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve dönüştürücü büyüme faktörü (TGF- β)'dür. Bu büyüme faktörlerinin yukarıda bahsedilen ilk gen ürünlerinin sentezini tetiklediği ve ayrıca TGF- β 'nin Myogenin ve MyoD aktivasyonunu inhibe ettiği bilinmektedir. FGF ve TGF- β 'nin aksine, insülin benzeri büyüme faktörü IGF I ve IGF II miyoblast farklılaşmasını aktive eder [33].



Şekil 2.7. Miyoblastlardan miyotüplere farklılaşma ve süreçlerdeki gen ifadeleri, [18]'den değiştirilerek.

Ara filamentler (Intermediate filaments, IFs) mikrofilamentlerden daha kalın, mikrotübüllerden daha ince yapıda hücre iskeleti elemanlarıdır. Ara filamentler farklılaşan kas hücrelerinde ifade edilmektedir. Ara filament proteinleri hücre türüne bağlı olarak değişkenlik gösterir ve hücre farklılaşması sırasında gelişimsel olarak düzenlenir. Ara filament proteinleri altı ana gruba ayrılır: Epitelyal ve epitelyal kökenli hücrelerde bulunan asidik keratin filamentler (tip I) ve nötr veya bazik keratin filamentler (tip II), glial ve glial kökenli hücrelerde bulunan glial filamentler (tip III), düz kas, iskelet kası ve kalp kası hücrelerinde ve mezenkimal kökenli hücrelerde bulunan desmin ve vimentin filamentleri (tip III), merkezi ve periferik sinir sistemi nöronlarında bulunan nörofilamentler (tip IV), nükleer matrikslerde bulunan laminler (tip V) ve gelişmekte olan merkezi sinir sisteminde bulunan nestin (tip VI). Desmin gibi ara filamentler doğrudan iskelet kasında bulunsalar da nörofilamentlerin (NF) iskelet kası dokusunda ifade edilmesi miyogenik farklılaşma, olgunlaşma ve miyofibrillogeniz aşamalarında oldukça önemli bir işlev görmektedir. Nörofilamentler, 68 kDa, 140 kDa ve 200 kDa molekül ağırlıklarına sahip üç ana polipeptitten oluşur ve sırasıyla NF68K, NF140K ve NF200K şeklinde adlandırılırlar. Yapılan çalışmalarda miyoblast hücrelerinin NF140K ve NF200K proteinlerini ifade ettikleri gösterilmiştir [36, 37].

Nöromusküler bağlantı noktası, motor nöron aksonundan salınan asetilkolinin (AChR) iskelet kasındaki reseptörü ile etkileşimi yoluyla kas fiberini uyardığı kimyasal bir sinapsis noktasıdır. Nöromusküler bağlantı noktalarının sarkolemma (postsinaptik) tarafında asetilkolin reseptörleri ve Na^{2+} kanalları bulunur. Bu bölgede, membran geniş krestler ve çukurlar halinde katlanmıştır; AChR'lar bunlardan birine, Na^{2+} kanalları diğerine yerleşik konumdadır. Bu düzenleme, AChR'ların nöron tarafından kimyasal bir sinyal aldığı anda yanıtı transdüksiyon yoluyla sodyum kanallarına göndererek aksiyon

potansiyeli üretmesini sağlar [38]. Yapılan çalışmalar, AChR ifadesinin ve miyotüplerdeki kümelenmelerinin, kas fiberlerinde aktivasyonun indüklenmesi için gereken bir faktör olduğunu göstermektedir [39]. İskelet kasının innerve edildiği nöromusküler bağlantı noktalarının gelişimi, miyofiberlerde AChR kümelenmesinin fonksiyonel modülasyonunu gerektirir. Ancak, *in vitro* AChR kümelenmesi üzerine yapılan çalışmalar genellikle üç boyutlu bir yapıya sahip olmayan monokatmanlı kas hücresi kültürlerinde gerçekleştirilir. İskelet kası uyarılmasının temelindeki yapı-fonksiyon ilişkisinin daha iyi anlaşılabilmesi için canlı kas yapısını taklit eden morfolojiye sahip bir kas sistemi gereklidir [40].

2.6. İskelet Kası Kaybı ve Hasarlarında Mevcut Tedavi Yöntemleri

Hacimsel kas kayıpları için mevcut tedavi yöntemleri genellikle otolog kas greftlerinin transplantasyonunu ve fizik tedaviyi temel almaktadır [1, 2]. Otolog kas transferi, genellikle travma, tümör rezeksiyonu veya sinir yaralanması sonrasında büyük kas kayıpları yaşandığında uygulanmaktadır. İleri sinir yaralanmaları veya ciddi travmalar nedeniyle ilgili kas kullanılmadığında ise serbest fonksiyonel kas transferi (FFMT) adı verilen otolog kas nakli de uygulanabilmektedir. Kas flepleri makul düzeyde fonksiyoneliteyi sağlayabilmektedir, ancak donör bölge morbiditesine ve yetersiz innervasyona neden olmaktadır. Ayrıca, rekonstrüktif cerrahilerin %10'undan fazlasında enfeksiyon ve nekroz gibi komplikasyonlar nedeniyle greft başarısızlığı görülmektedir. Ek olarak, bu tip cerrahiler için otolog kas kaynağı bulmak, özellikle hasta ciddi bir yaralanma geçirmişse, sorun yaratmaktadır.

Egzersiz, iskelet kas kütlelerinin azalmasını önleme potansiyeline sahiptir. Bu nedenle fizik tedavi, cerrahi tekniklere ek olarak, kas dokusunun onarımını ve rejenerasyonunu sağlamanın invaziv olmayan bir yoludur. Fiziksel rehabilitasyonun, bağışıklık tepkisini modüle ettiği, büyüme faktörlerinin salınımını ve vaskülarizasyonu arttırdığı ve yara izi oluşumunu azalttığı yönünde çalışmalar bulunmaktadır. Ayrıca, egzersizin hayvanlarda ve insanlarda kas dokusundaki IGF-1 sinyal yolağını indüklediği ve kas atrofisini önlediği bildirilmiştir. Fizik tedavi kas kaybını azaltmaktadır; ancak büyük hacimli kas kayıplarında kas rejenerasyonunu sağlayamamaktadır. Ek olarak, ciddi hastalıkları veya yaralanmaları olan hastalar sık sık düzenli egzersiz yapamamaktadır. Bir diğer tedavi yöntemi ise elektrikli akupunktur tedavisidir. Bu yöntemin satelit hücre proliferasyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Akupunktur ve düşük frekansta elektriksiz uyarımın (Akup-LFES) birleştirilmesi ile kas kasılması uyarılarak fiziksel egzersiz taklit edilmekte ve bu

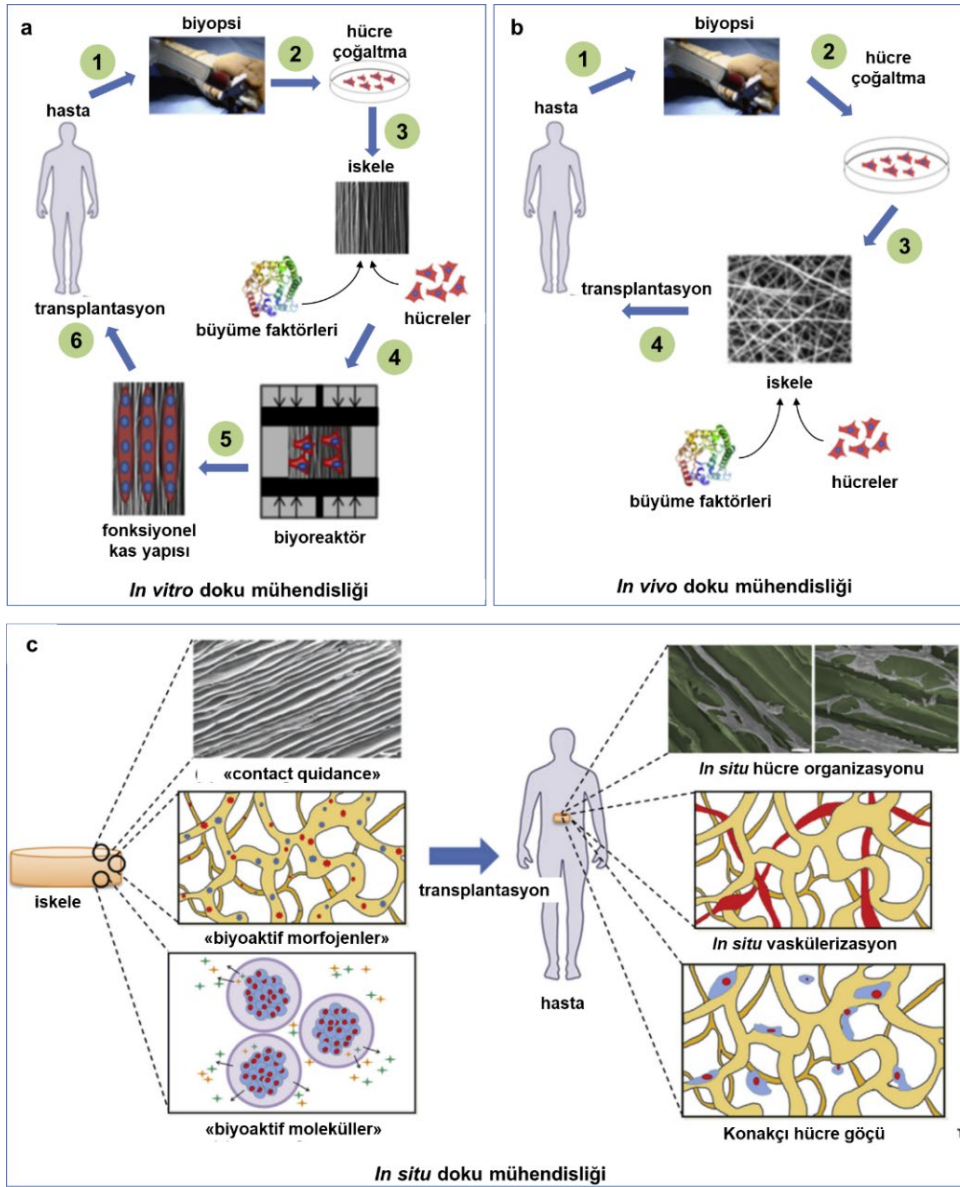
tip bir uyarım ile kas rejenerasyonu arttırılmaktadır. Bu yöntem sık olarak egzersiz yapamayan hastalar için uygun olmakla birlikte, travma veya tümör rezeksiyonu sonrası büyük hacimli kas defektlerinin rejenerasyonunda başarılı değildir. Ayrıca, Akup-LFES'nin standart bir kas atrofisi tedavisi olarak kullanılabilmesi için uygulama koşullarının optimize edilmesine yönelik çalışmaların yapılması gereklidir.

ECM proteinlerinden oluşan biyolojik iskeleler de genellikle doku rekonstrüksiyonu ve rejenerasyonu için cerrahi müdahalelerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Biyolojik iskeleler yapısal ve biyokimyasal bir çerçeve sunmaktadır. Küçük miktarlardaki kas kayıpları için birçok dokudan türetilmiş biyolojik iskele, hayvan modellerinde test edilmiş ve cerrahi uygulamalarda kullanılmıştır. Ancak, allojenik veya zenojenik iskeleler, deselülerize edildiklerinde dahi olumsuz immün tepkiye neden olabilmekte ve enfeksiyon riskini arttırmaktadır. Bu nedenle, büyük kas dokularının onarımı ve rejenerasyonunu daha güvenli bir şekilde sağlayabilen yeni stratejilere ihtiyaç vardır [1, 2].

2.7. İskelet Kası Doku Mühendisliği

İskelet kası doku mühendisliği, mevcut tedavi yöntemlerine alternatif olacak yaklaşımlar geliştirmektedir (Şekil 2.8). Bu konu dâhilinde temel iki yaklaşım söz konusudur. İlki, 3 boyutlu (3B) veya 2 boyutlu (2B) biyomalzemelerden üretilmiş doku iskelelerinin hücrelerle kültürasyonu sonrası *in vitro*, *in vivo* ve *in situ* çalışmaları kapsar. İkincisi ise, aselüler biyolojik doku iskelelerinin kök hücrelerle etkileşimi ve implantasyonunu kapsamaktadır [1].

Bu iki yaklaşımda da ortak problem hücre kaynağıdır. İlk tercih edilen hücre kaynağı insan kaynaklı satelit hücreleridir. Ancak bu tip hücrelerin izolasyonu ve kültürasyonu oldukça zordur. Hayvan kökenli primer satelit hücreleri ise immün yanıt oluşturmayacak şekilde geliştirilen hayvan modellerinden izole edilerek kullanılabilir, izolasyonu ve kültürasyonu daha kolaydır. Mezenkimal kök hücreler (MSC), hematopoetik kök hücreler (HSC) ve embriyonik kök hücreler gibi miyojenik karakterli hücrelere farklılaşma kapasitesi olan hücreler de kullanılabilir.



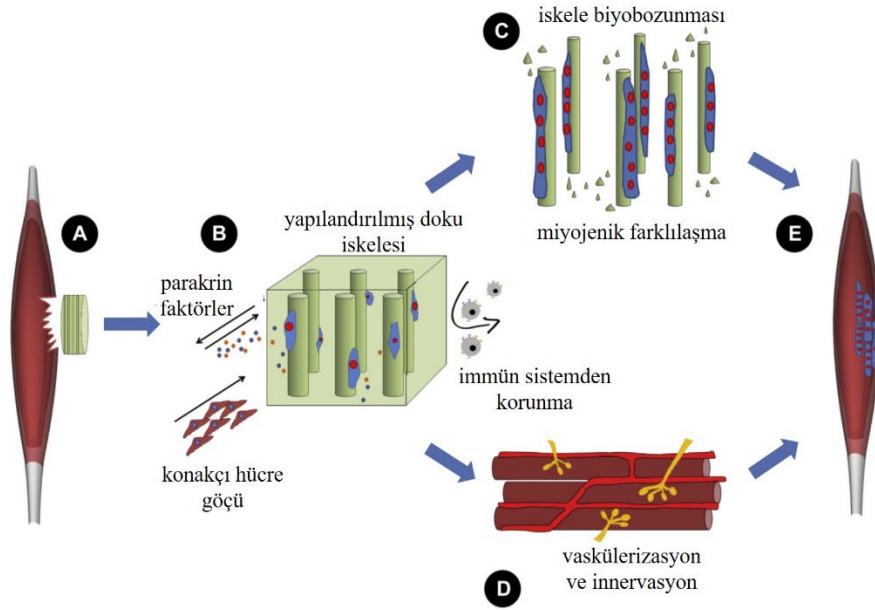
Şekil 2.8. İskelet kası doku mühendisliği yaklaşımları, [1]'den değiştirilerek.

Genellikle, iskelet kası doku mühendisliği yaklaşımlarında satelit hücrelerinin rejeneratif kabiliyeti ile çoğalma ve farklılaşma potansiyellerine güvenilir. Ancak, miyofiberlere yönelik farklılaşma süreçlerinin, *in vitro* ortamda indüklenip kontrol edilmesi hala oldukça zor görünmektedir. Bu nedenle, iskelet kası dokusunun *in vitro* oluşumu ile ilgili birçok çalışmada C3H fare iskelet kasından izole edilen satelit hücrelerinin doğrulanmış bir hücre dizisi olan C2C12 hücre hattı kullanılmaktadır [41]. C2C12 hücrelerine erişim oldukça kolaydır, kültürasyonu daha ucuzdur ve birincil hücrelere göre daha hızlı çoğalırlar. Bununla birlikte, kas fizyolojisini incelemek için C2C12 hücre hattının kullanımı, primer hücrelere kıyasla yapılaşma özelliklerinde ve metabolik profillerdeki farklılıklara bağlı olarak sorgulanmaktadır. Diğer yandan, C2C12 hücre hattının doğal

kas ile benzer uzunluk-gerilim ilişkileri sergilediği gösterilmiştir. Primer hücre izolasyonunun oldukça değişken parametrelere sahip olduğu düşünüldüğünde, tekrar edilebilirlik ve kontrol edilebilirlik açısından C2C12 hücre hattının kullanımının uygun olduğu değerlendirilmiştir [42].

İskelet kası doku mühendisliğinde *in vitro*, *in vivo* ve *in situ* çalışmaların bir diğer ortak problemi, miyojenik farklılaşmayı destekleyen yapay ECM malzemelerinin eksikliğidir. Malzeme kaynaklı problemler, çalışmalar açısından önemli sınırlamalar getirmektedir. Miyoblastların miyotüplere istenilen şekilde farklılaştırılmaması ve farklılaşan miyotüplerin doğru dizilimde olmaması nedeniyle kas fonksiyonlarının sağlanamaması, yüksek miyofiber yoğunluğuna ve dizilimine sahip büyük kas yapılarının üretilmemesine neden olmaktadır. Miyoblastlar miyotüplere farklılaştırılsa bile, substrat özelliklerinin (elastisite, sertlik ve yumuşaklık problemi) yetersizliği nedeniyle miyotüplerin yüzeyden ayrılmaları ve nanotopografinin kas yapısına benzetilememesi (boyutsal, çap ve uzunluk olarak), üretilen doku mühendisliği ürünlerinin mekanik ve yapısal olarak doğal doku özelliklerini karşılayamamasının en önemli nedenleridir. Bunların dışında vaskülarizasyon ve kas doku yapısının karmaşıklığı gibi durumlar da sorun yaratmaktadır. Miyoblastların miyotüplere farklılaştıktan sonra yüzeyden ayrılma eğilimini engelleyebilmek için kültür ortamı ECM proteinleri ile modifiye edilmekte ya da 3T3 fibroblastik besleyici tabakalar kullanılmaktadır. Yüzeyin miyogenezi destekleyebilmesi için elastik ve görece yumuşak olması gerektiği bilinmektedir [7].

Mevcut sınırlamaların üstesinden gelmek için iki temel çözüm sunulabilir. İlki; hücre tutunmasını, morfolojiyi ve çoğalmayı seçici biçimde kontrol edebilen uygun iskeleleri tasarlamaktır. İkinci olarak da dinamik kültür yaklaşımı kullanılarak, hücreleri *in vivo* organogenez ve büyüme sırasında hâkim olan mekanik, elektriksel ve biyokimyasal sinyaller ile uyarmaktır [43]. **Şekil 2.9**'da iskelet kası rejenerasyonu için ideal *in vitro* yaklaşım verilmiştir.



Şekil 2.9. *İn vitro* iskelet kası doku mühendisliğinde ideal yaklaşım; hasarlı bölgeye uygun fiziksel, kimyasal, morfolojik ve mekanik özellikteki doku iskelesinin implantasyonu (a), hasarlı bölgede doku iskelesinin implantasyonu ile meydana gelen parakrin faktörlerin salımı, konakçı hücre göçü ve immün sistem cevabından korunma (b), miyoblast farklılaşması ile miyotüplerin oluşumu ve doku iskelesinin bozularak yerini fonksiyonel iskelet kası dokusuna bırakması (c), fonksiyonel iskelet kası oluşumuna bağlı olarak gerçekleşen vaskülerizasyon ve innervasyon (d), hasarlı bölgede fonksiyonel iskelet kası oluşumu (e), [1]'den değiştirilerek.

2.7.1. İskelet Kası Doku Mühendisliği Tasarım Parametreleri

İn vitro doku mühendisliği için temel tasarım parametreleri; biyomalzeme seçimi ve uygun mekanik/elektriksel uyarımlardır. *İn vitro* iskelet kası doku mühendisliğinde başarı, miyojenik farklılaşma aşamalarının iyi anlaşılması ve kas yapısının iyi taklit edilebilmesi ile mümkündür.

2.7.1.1. Morfolojik özellikler

“Contact guidance” teorisine göre hücrelerin paralel oryantasyonu, substratın kimyasal, yapısal ve mekanik özelliklerine doğrudan bağlıdır [44]. Kas yapısında bulunan miyofibrillerin paralel oryantasyonu nedeniyle kullanılacak yapay hücre dışı matrislerin de paralel oryantasyonda olması gereklidir [45]. Ayrıca iskelet kası dokusunun fibril morfolojisindeki molekülleri ve yapıları (hücre dışı matriksteki fibriller ve kolajenler, aktin ve miyozin filamentler vb.) içermesinden dolayı malzemenin topografik ve

morfolojik özelliklerinin de bu yapıyı taklit etmesi gerekmektedir. Literatürde 2B rastgele hizalanmış fiberlere hücrelerin daha az yapıştığı, agregatlar oluşturduğu ve farklılaşmadığı gözlemlenirken, 2B düzenli hizalanmış fiberlerde hücrelerin iyi yapıştığı ve farklılaştığı, bunun yanında oluşan miyotüplerin istenilen oryantasyona yakın olduğu gözlenmiştir. Uygun olmayan substrat topografisi nedeniyle, miyoblastların miyotüplere istenilen şekilde farklılaştırılmaması ve farklılaşan miyotüplerin de doğru dizilimde olmaması nedeniyle kas fonksiyonlarının sağlanamaması, yüksek miyofiber yoğunluğuna ve dizilimine sahip büyük kas yapılarının üretilmemesine neden olmaktadır [7].

2.7.1.2. Mekanik özellikler

Doğal iskelet kası dokusu, kas kasılması sırasında sarkomer hareketleriyle ilgili aktif mekanik özelliklere ve uygulanan mekanik kuvvet altında lineer olmayan elastik gerinim-gerilim davranışlarıyla ilgili pasif mekanik özelliklere sahiptir. Bu nedenle, gerinimi destekleyebilen pasif mekanik özelliklere sahip doku iskelelerinin geliştirilmesi, iskelet kası dokusunu taklit etmek için önemlidir. Ancak doğal iskelet kası dokusunun pasif mekanik özellikleri, kas dokusunun bulunduğu bölgeye göre değişir. Çekme testlerinde doğal iskelet kaslarının çekme dayanımlarının 70 ile 800 kPa arasında, kopmadaki uzama değerlerinin %30 ile %60 arasında, elastik modül değerlerinin ise 30 ile 8000 kPa arasında olduğu bildirilmiştir [4]. Bu bağlamda iskelet kası dokusunun yumuşak ve elastik bir doku olduğu söylenebilir. Ayrıca iskelet kası doku mühendisliği çalışmalarında iskelet kası hücrelerinin yumuşak malzemelere daha kolay yapıştığı, çoğaldığı ve olgunlaşma evresine yönlendiği belirlenmiştir [2, 46, 47]. Bu nedenle doku iskelelerinin elastik modül, kopmadaki uzama ve çekme dayanımı gibi mekanik özelliklerinin de doğal dokuya benzemesi gerekmektedir [11]. Mekanik özelliklerin yetersiz olduğu koşullarda, miyoblastlar miyotüplere farklılaştırılsa bile, farklılaşan miyotüplerin maturasyon aşamasına geçmeden yüzeyden ayrıldığı gözlemlenmiştir.

2.7.1.3. Biyokimyasal özellikler

İskelet kası doku mühendisliğinde kullanılacak olan biyomalzemelerin, biyobozunur ve biyolojik olarak emilebilir olmalarının yanısıra, iskelet kası hasarlarında miyojenik çevrenin immünolojik özellikleri nedeniyle M1 tip makrofajları aktive etmeden bu makrofajların hasarlı bölgeye geçmesini engellerken, doku oluşumuna yardımcı olan M2 tip makrofajların hasarlı bölgeye ulaşmasına izin vermeleri gerekmektedir [32].

2.7.1.4. Mekanik ve elektriksel uyarılar

Miyojenik farklılaşmada morfolojik, mekanik ve biyokimyasal etkenlerin dışında, mekanik ve elektriksel uyarıların da varlığı gereklidir. Farklılaşmanın indüklenmesi ilk olarak mekanik uyarıların varlığında olur. Mekanik uyarılar; gen regülasyonu, endojen protein ekspresyonu, protein akümülyasyonu ve metabolik aktivitelere rol oynar. Pasif veya aktif mekanik kuvvetler iskelet kasının embriyonik formdan olgun forma geçişinde etkindir. Doğrudan uygulanan mekanik gerilim, miyoblastların fonksiyonel dizilmiş miyotüplere organize olmasını sağlarken, olgun miyofibril protein izoformlarının ekspresyonu için gerekli uyarıyı sağlar. Ayrıca yapılan çalışmalarda mekanik kuvvetlerin olgun iskelet kasındaki miyofibrillerin çapını, hücre sayısını ve oluşan miyofibrillerin bileşimini etkilediği tespit edilmiştir. Mekanik uyarımın olmadığı durumlarda ECM içeriğinin çok yoğun, miyofiber yoğunluğunun az ve olgunlaşmanın tamamlanmamış olduğu da belirlenmiştir. Farklılaşmanın devamı için gerekli olan bir diğer etki ise elektriksel uyarımlardır. Elektriksel uyarımlar yüksek kapasitede farklılaşma için çok önemlidir. Bu tip bir uyarım *in vivo* koşullardaki sinir ağlarını taklit eder. İskelet kasının en önemli özelliği olan kasılma yeteneği bu uyarım ile indüklenir ve bu yolla miyotüp farklılaşmasına destek sağlanır. Elektriksel etkiler doğrudan stimüle edildiğinde nöral miyotüpler ve nöral transmitter kasılma aktivitesi oluşur, ikincil ekspresyon faktörleri devreye girer ve ikincil miyotüplerin oluşmasını destekler. Kronik elektriksel etkilerin birincil miyoblastların MHC ekspresyonlarını değiştirdiği tespit edilmiştir [9].

İskelet kası hücreleri işlevsel özelliklerini düzenlemek için mekanotransdüksiyon yollarını kullanır. Mekanotransdüksiyon, matriks sertliği veya kesme gerilimi gibi mekanik sinyallerin hücreler tarafından kimyasal tepkilere çevrildiği bir süreçtir. Kas hücreleri, integrin adı verilen transmembran proteinleri ile çevrelerinden gelen mekanik sinyalleri algılayabilirler. İntegrinler, hücre içi iskelet ile ECM arasındaki bağlanma noktalarını oluştururlar ve dış mekanik uyarıların amplifikasyonu ve aşağı doğru sinyalleme için hayati öneme sahiptirler. Ayrıca, doğrudan aktin remodellemesini etkileyerek, kas fiberlerinin mekanik özelliklerini ve davranışlarını belirlerler, fonksiyonel kas dokusu oluşumunun düzenlenmesinde öneme sahip proteinlerin ifadesini ve aktivasyonunu arttırırlar. Aynı zamanda MHC'nin bir izoformdan diğerine dönüştürülmesinde rol alırlar. Kas dokusundaki elektriksel fonksiyonel alanlar ise aktin ve miyozin proteinlerini miyofibrillerin içinde tekrar tekrar uyararak fiberlerin elektriksel

uyarıya yanıtını etkilemektedir ve bu mekanizma mekanotransdüksiyon yolağından farklıdır. Ancak mekanik ve elektriksel uyarımlar kas fiberlerinin MHC bileşimine önemli derecede etki etmektedir [18].

2.7.2. İskelet Kası Doku Mühendisliğinde Kullanılan Biyomalzemeler

Yukarıda verilen tasarım parametrelerinin test edilmesi amacıyla, iskelet kası doku mühendisliği çalışmalarında kolajen, fibrin, aljinat, hiyaluronik asit, jelatin ve ipek fibroin gibi doğal polimerler, poliglolik asit (PGA), polilaktik asit (PLA), poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), poli-L-laktik asit (PLLA), polietilen glikol (PEG), polikaprolakton (PCL), polianilin (PANI) ve poliüretan (PU) gibi sentetik polimerler kullanılmıştır [11]. İskelet kası doku mühendisliğinde gerçekleştirilmiş biyomalzeme temelli çalışmaların bir özeti **Çizelge 2.1**'de sunulmuştur.

Çizelge 2.1. *In vitro* iskelet kası doku mühendisliğinde kullanılan biyomalzemeler, [1]'den değiştirilerek.

İstenilen özellik	Kullanılan malzeme	Kaynaklar
Gözeneklilik	Aljinat, Kolajen	[48-51]
-2B- • Desenli yüzeyler • Hizalı fiber yamaları	PLLA, PLGA, PCL, Kolajen, PANI, Fibrin, Jelatin	[52-65]
-3B- • Oluklu iskeleler • Hizalı gözenekler	Kolajen, Kitosan	[66, 67]
Enjekte edilebilirlik (Hidrojel)	Aljinat, Kolajen, Hiyaluronik asit, PEG, Fibrin	[68-74]
Doğal dokuya uygun yapısal ve biyokimyasal özellikler (Deselülerize doku ve ECM)	Tibialis anterior, extensor digitorum longus, abdominal kaslar, domuz mesanesi, domuz bağırsağı mukozası	[75-86]
Büyüme faktörlerinin varlığı	Aljinat (SDF-1), Aljinat (VEGF, IGF-1), Aljinat (HGF, FGF)	[87-89]

Biyomalzeme destekli iskelet kası doku mühendisliği çalışmalarında hücre sel fonksiyonları desteklemek amacıyla gözenekli yapılar, 2B/3B desenli ve hizalı yüzeyler, enjekte edilebilir hidrojel ve deselülerize dokular kullanılmış, büyüme faktörleri ile iskelet kası biyokimyasal mikroçevresi taklit edilmeye çalışılmıştır. Kas dokusunun karmaşık yapısını taklit edebilmek amacıyla giderek daha kompleks biyomalzeme

sistemleri geliştirilmiştir. İlk aşamada yüksek yüzey alanı/hacim oranına sahip gözenekli iskeleler ile hücre yayılması ve göçü uyarılmış ve göç eden hücreler ile doğal dokunun etkileşime girmesi sağlanarak rejenerasyon süreci desteklenmeye çalışılmıştır. Gözenekli iskeleler tasarlanırken gözenek boyutları, gözeneklerin içsel bağlantıları ve hücre tutunma noktalarının varlığı önemli parametreler olarak belirlenmiştir. Bu nedenle çalışmalarda çoğunlukla RGD peptit motiflerini içeren aljinat temelli gözenekli iskeleler tercih edilmiştir [48-50]. Daha sonraki çalışmalarda, farklı malzemelerin bir araya getirilerek istenilen mekanik ve fizikokimyasal özelliklere sahip kompozitler oluşturma potansiyelinden yararlanılarak, hizalanmış ve desenli topografiler üzerinde miyoplast farklılaşması çalışmaları yapılmıştır. Değiştirilebilir yapısal ve mekanik özelliklere sahip hizalanmış ve desenli yüzeyler ile hücresel hizalanma, miyotüp füzyonu, miyotüp hizalanması ve yüksek yoğunluklu miyotüp oluşumu desteklenmiştir. Özellikle kas yapısına benzer morfolojik özellikler sergileyen, elektroğirme yöntemi ile üretilmiş hizalı fiber iskeleler ile önemli başarılar sağlanmıştır [52, 55-59]. Ek olarak, hizalı 2B veya 3B yüzeylerde farklılaştırılmış miyotüplerden oluşan hücre tabakalarının doğrudan nakil için kullanılabilmesi de öngörülmüştür. Hizalı ve desenli topografilere sahip biyomalzeme çalışmaları ile eş zamanlı olarak minimal invaziv uygulamaya izin veren hidrojel çalışmaları da yürütülmüştür [68-74]. Hidrojellerin hızlı bozunma özelliğinden yararlanılmış ve hidrojel içerisine enkapsüle edilen hücrelerin bozunma ile birlikte ortama salınarak hasarlı dokuya hücre göçü sağlanmaya çalışılmıştır. Enkapsülasyon ile hücrelerin hasarlı bölgedeki immün sistem hücrelerinin etkilerinden korunması amaçlanırken, ayarlanabilir mekanik özelliklere sahip hidrojel sistemler ile de hücresel mikroçevrenin taklidi amaçlanmıştır. Ek olarak pro-miyojenik ortam sağlayan, korunmuş doğal ECM yapısına sahip, yapısal proteinleri, sitokinleri ve büyüme faktörlerini içeren deselülerize dokuların hacimsel kas kayıplarında klinik potansiyele sahip olduğu görülmüştür [75-86]. Ayrıca bu dokuların biyoaktivite kaybı olmadan enjekte edilebilir hidrojel formuna dönüştürülebileceği gösterilmiştir [83]. Ancak deselüerizasyonun tam olarak sağlanamaması ve buna karşı oluşan immün yanıt, deselüerizasyon sürecinde kullanılan kimyasal ajanların ve deterjanların istenmeyen etkileri bu yaklaşımın klinikte kullanımını sınırlayan önemli faktörler olmuştur.

Kas rejenerasyonunu başlatan satelit hücrelerin aktivasyonu ve proliferasyonunda çeşitli transkripsiyon faktörleri rol almaktadır. Bu nedenle *in vitro* çalışmalarda birçok trofik faktör satelit hücre aktivasyonu başlatıcısı olarak kullanılmıştır. Bu faktörler arasında

hepatosit büyüme faktörü (HGF) ve fibroblast büyüme faktörünün (FGF) satelit hücrelerin aktivasyonunda güçlü mitojenler olduğu bilinmektedir. Aljinat iskeleler ile yapılan bir çalışmada, HGF ve FGF büyüme faktörleri bir arada kullanıldığında miyoblastların canlılığını ve göçünü önemli ölçüde artırdığı, ancak FGF'in tek başına kullanıldığında miyojenik farklılaşmayı ve rejenerasyonu engellediği belirlenmiş ve bu faktörün uygun bağlamda kullanılmasının önemli olduğu belirtilmiştir [87]. İskelet kas rejenerasyonunda bir diğer önemli etken olan neovaskülarizasyon, kas öncül hücreleri tarafından salgılanan parakrin faktörler ile gerçekleşmektedir. Bu faktörlerden biri olan hasarlı kas hücrelerinden salgılanan stromal hücre türevli faktör-1 (SDF-1), kan dolaşımındaki öncül hücrelerin kemik iliği gibi uzak dokulardan hasarlı dokuya yönlendirilmesini sağlamaktadır. Yönlendirilmiş öncül hücrelerin pro-anjiyojenik olduğu ve vaskülarizasyonu teşvik ederek fonksiyonel iyileşmeyi artırabileceği düşünülmektedir. SDF-1 yüklenmiş aljinat mikroküreler ile yapılan bir çalışmada, SDF-1 varlığı ile inflamatuvar sitokinlerin hasarlı bölgede azaldığı ve anjiyojenik aktivitenin arttığı tespit edilmiştir [88]. Ancak miyojenik farklılaşma inhibitörü FGF'in ifadesinde de artış belirlenmiştir. Ayrıca, vaskülarizasyon tetiklenmiş ancak miyojenik rejenerasyon kapasitesi azalmıştır. Vaskülarizasyon ve miyogenez üzerinde etkili bir diğer önemli faktör ise vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)'dür. Polimerik taşıyıcılar ile VEGF'in sürekli salımının neovaskülarizasyona etkisi birçok çalışmada incelenmiş ve hasarlı kas dokusunda kan damarı oluşumunu ve perfüzyonu artırdığı gösterilmiştir. Ek olarak VEGF'in kas rejenerasyonuna katkı sağlayan kan damarları ile ilişkili kök hücreleri de aktive ettiği belirlenmiştir. Ancak, VEGF pro-anjiyojenik bir düzenleyici olduğundan neovaskülarizasyonu sağlarken, miyojenik farklılaşma üzerinde olumsuz etkiler yaratabilmektedir. İnsülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) ise miyogenez ve kas rejenerasyonunun tüm aşamalarında görev alan en önemli düzenleyici faktördür. IGF-1 satelit hücrelerin aktivasyonu ve proliferasyonunu, MyoD ve Myogenin gibi miyojenik farklılaşma ifadelerini, protein sentezini ve miyofiberlerin sağkalımını düzenler. Aljinat iskeleler ile gerçekleştirilen bir çalışmada VEGF ve IGF-1 faktörleri arasındaki etkileşimler ve bu iki faktörün fonksiyonel kas rejenerasyonu üzerindeki etkileri incelenmiştir [89]. VEGF tek başına kullanıldığında vaskülarizasyonu desteklemiş ancak kas rejenerasyonu üzerine olumlu bir etkide bulunmamıştır. Bununla beraber VEGF ve IGF-1 birlikte kullanıldığında hem vaskülarizasyon hem de miyojenik rejenerasyon desteklenmiştir.

Çizelge 2.1'de belirtilen biyomalzemelere ek olarak, son yıllarda ferroelektrik ve piezoelektrik özellikler sergileyen polivinilidin florür (PVDF) polimeri doku mühendisliği çalışmalarında elektriksel özellikleri nedeniyle tercih edilmektedir [90]. PVDF filmler üzerinde kültüre edilen C2C12 miyoblast hücrelerinin daha uzamış bir morfoloji gösterdiği belirlenmiştir. Öte yandan, hücresel sinyal yollarının aktivasyonu ile hücre iskeleti yerleşimine bağlı olarak net yüzey yüküne (yük kutbundan bağımsız olarak) sahip piezoelektrik malzemelere hücrelerin daha kolay tutunduğu, çoğaldığı ve farklılaştığı tespit edilmiştir [91]. Ancak iskelet kası doku mühendisliğinde kullanılacak olan doku iskelesinin belirli bir süre sonunda bozunarak yerini rejenere olan dokuya bırakması ve bozunma ürünlerinin de insan vücuduna toksik olmaması beklenmektedir. PVDF biyobozunur bir polimer değildir. Bu nedenle, oldukça iyi elektriksel özellikler sergilemesine rağmen iskelet kası doku mühendisliğinde kısıtlı bir kullanım alanına sahiptir [8].

Özetle yapılan çalışmalar ile şu sonuçlara ulaşılmıştır:

1. Yüksek yüzey alanı, hücrelerin çoğalmasına olanak tanır. Makro gözenekli yapı, nakledilen hücrelerin dışa doğru göçünü ve konakçı hücrelerin ise içe doğru göçünü destekler. Göç eden hücreler daha sonra doğal dokudaki hücrelerle etkileşime girer ve rejenerasyon sürecine katılır.
2. İstenilen mekanik ve fizikokimyasal özellikleri sağlayabilmek amacıyla kompozit malzemeler oluşturulmalıdır. Örneğin, hücrelere elektriksel uyarım sağlayabilmek için elektrik iletken polimerler kullanılmalıdır. Miyoblast farklılaşması, elektroaktivite ve fiber hizalanmasının sinerjik etkileriyle artırılabilir.
3. Malzeme topografisi ve mekanik özellikleri doğal dokuya uygun olduğunda; hücre iskeleti hizalanması, miyotüp füzyonu ve hizalanması desteklenir. Ayarlanabilir mekanik özellikler hücresel mikro ortamın taklidine olanak tanır.

Belirtilen polimerler kullanılarak hidrojeller, fibröz matriksler, mikro desenli substratlar ve tibialis anterior, ekstansör digitorum longus ve karın kaslarının deselülerizasyonu ile elde edilen iskeleler ile yapılan çalışmalar fonksiyonel iskelet kası dokusu eldesinde umut vadetmektedir [1, 92]. Ancak iskelet kasını tam anlamıyla taklit etmek için gerekli tüm biyokimyasal, morfolojik, mekanik ve elektriksel özelliklere sahip bir biyomalzemeyi içeren uyarımlı bir biyoreaktör tasarımı gereklidir.

2.7.3. İskelet Kası Biyoreaktör Sistemleri

Kas biyoreaktör sistemleri, karıştırmalı kap biyoreaktörler, döner duvarlı biyoreaktörler, perfüzyon biyoreaktörleri ve kas doku mühendisliğine özgü mekanik ve elektriksel uyarım sağlayan biyoreaktörlerdir. Hücre fizyolojisinin düzenlenmesi ve doku oluşumunun kolaylaştırılması amacıyla mekanik sıkıştırma ve siklik hidrostatik sıvı basıncının uygulandığı sistemler geliştirilmektedir [93]. Uygulanan kuvvetlerin genlik ve yön bakımından, iskelet büyümesine bağlı statik gerilme ve kas kasılmasından kaynaklanan dinamik gerilimi yani *in vivo* embriyogenezi taklit etmek üzere tasarlanması gerekmektedir [10]. Bu nedenle kasılma sırasında doğal kas dokusunda gerçekleşen mekanik hareketleri ve nöral aktiviteyi taklit edebilen mekanik ve elektrik uyarımlı biyoreaktör sistemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Hem mekanik hem elektriksel çevreyi senkronize bir şekilde taklit edebilen elektromekanik uyarımlı biyoreaktör tasarımı *in vitro* fonksiyonel kas dokusu oluşumu için şarttır. Elektromekanik uyarımlı biyoreaktörler literatürde hibrit biyoreaktör olarak adlandırılmakta ve çalışmaya özgü olarak araştırmacılar tarafından özel olarak tasarlanmaktadır. İskelet kası doku mühendisliğinde kullanılan mekanik, elektrik ve elektromekanik biyoreaktör sistemlerine ait özet bilgiler sırasıyla **Çizelge 2.2**, **Çizelge 2.3** ve **Çizelge 2.4**'te verilmiştir.

Çizelge 2.2. Mekanik uyarımlı biyoreaktör çalışmaları, [11]’den değiştirilerek.

Mekanik uyarımlı biyoreaktör çalışmaları						
Hücre	Biyomalzeme	Düzenek	Uyarım rejimi ve frekansı	Gerinim	Uyarım süresi	Yıl/Kaynak
Embriyonik kuş pectoralis kas hücreleri	Kolajen	Bilgisayarlı mekanik uyarım cihazı	0,35 mm/sa hızında döngüsel r_{amp} fonksiyonu	%300’e kadar	3 gün	1989, [94]
C2C12 miyoblastları	Kolajen hidrojel	Özel tasarlanmış stres haznesi	Döngüsel 60 Hz	%5	7 gün	1998, [95]
İnsan iskelet kası hücreleri	Kolajen/Matrigel® karışımı	Özel yapım mekanik uyarım cihazı	2 dk boyunca 5 Hz’te 5 uyarım ardından 28 dk dinlenme	8-10. günler %5 10-12. günler %10 12-16. günler %15	8 gün	2002, [96]
Miyoblastlar	Gözenekli kolajen iskeleler	Bio-Stretch sistemi	Sürekli veya döngüsel tek eksenli hızlı r_{amp} fonksiyonu veya döngüsel r_{amp} fonksiyonu	%7,5 ve %15	6 sa	2005, [97]
C2C12 miyoblastları	Kolajen	Biyoreaktörün gerinimi ile uygulanan mekanik uyarım	Tekrarlayan döngüsel gerinim ve r_{amp} gerinimi	%1 ve %10	12 sa	2005, [98]
Miyoblastlar	Fibrin	Özel yapım mekanik uyarım cihazı	Çekme gerinimi	%25 ve %50	7 gün	2007, [99]
Primer kas öncül hücreleri	Kolajen bazlı ECM iskeleler	Bilgisayarlı biyoreaktör sistemi	Döngüsel gerinim	%10	5-21 gün	2008, [100]
C2C12 miyoblastları	Düzenli PU fiberler	Tübüler özel yapım bilgisayar kontrollü biyoreaktör	Tekrarlayan döngüsel gerinim 6 sa boyunca her saatte 1 Hz	%5 ve %10 %5 statik ön gerilimli veya ön gerilimsiz	2-14 gün	2008, [101]

Çizelge 2.2. Mekanik uyarımlı biyoreaktör çalışmaları (devam).

Hücre	Biyomalzeme	Düzenek	Uyarım rejimi ve frekansı	Gerinim	Uyarım süresi	Yıl/Kaynak
C2C12 miyoblastları	Biyobozunur mikrofiber iskeleler DegraPol®	Özel yapım uyarım cihazı	2 gün ramp gerinimi (%3,3) ardından döngüsel gerinim (5 uyarım, 0,5 Hz, %3,4 gerinim)	%6,7	7-10 gün	2010, [102]
Yetişkin sıçan kas projenitör hücreler (MPC'ler)	Deselülerize mesane ECM'si	Bilgisayarlı biyoreaktör sistemi	Her saat başı dakikada 3 kez döngüsel gerinim	%10	7 gün	2011, [103] 2012, [104]
Sıçan primer hücreleri	Kolajen	Kayan hazneli sistem	İsometrik gerinim	-	21 gün	2012, [105]
C2C12 miyoblastları	Fibrin hidrojeller	MagneTissue biyoreaktörü ile uyarım	Statik gerinim	%10	9 gün	2015, [106]
Primer insan iskelet kası miyoblastları	Deselülerize fare diyaframı	Özel yapım mekanik uyarım cihazı	Yavaş ramp fonksiyonu: 7 sa boyunca %0'dan %10'a kadar mekanik gerinim ardından 17 sa dinlenme Egzersiz protokolü: 8. günden itibaren, 10 dk boyunca 1 gerinim/dk ve %5 mekanik gerinim 3 döngü/gün döngüsel mekanik uyarım	%0-%10 ve %5	Yavaş ramp fonksiyonu: 5 gün Egzersiz protokolü: 7 gün	2022, [107]
Fare embriyonik ön kol kas dokusu	Fare embriyonik doku	Ebers TC-3 biyoreaktör	0,67 Hz 2 saatte bir 2 mm yer değiştirme, günde 3 kere	-	6 gün	2023, [108]

Çizelge 2.3. Elektrik uyarımlı biyoreaktör çalışmaları, [11] 'den değiştirilerek.

Elektrik uyarımlı biyoreaktör çalışmaları					
Hücre	Biyomalzeme	Düzenek	Uyarım rejimi, frekans, voltaj, atım genliği, gerinim	Uyarım süresi	Yıl/Kaynak
Primer sıçan miyoblastları	Fibrin	Platin elektrotlar kullanılarak kültür haznesinin iki fazlı uyarılması	6,8 mA (4 ms süre), 250 ms'lik atım, her 4 saniyede bir aralıklarla	8 gün	2005, [109]
Sıçan primer hücreleri	Fibrin	Özel yapım dönüştürücü aracılığıyla miyoid yapıların uyarılması	20 Hz'de 5 atım/ 4 s, 5 V, 1,5 ms	14 gün	2006, [110]
C2C12 miyoblastları	-	Elektriksel atım uyarımı	40 V/60mm, 1Hz	1, 2 veya 6 saatlik farklılaşmadan 8 gün sonra	2007, [111]
%90 C2C12 miyoblastları %10 3T3	Fibrin	Özel yapım uyarım reaktörü ile miyoid yapıların uyarılması	4 atım, 1,25, 2,5 ve 5 V/mm'lik periyotlar, 400 ms'lik bir sekansta 0,1 ms, 3,6 saniyelik dinlenme	7 gün	2010, [112]
C2C12 miyoblastları ve kas öncül hücreleri	Kolajen Tip 1	C-Pace Culture Pacer aracılığıyla bipolar alan uyarımı	4 V/cm, 2 Hz'te 6 ms atım	48 sa	2011, [113]
%90 C2C12 miyoblastları %10 3T3	Fibrin	Özel yapım elektriksel uyarım reaktörü	0,7, 1, 1,4 V/mm, 0,25 ile 1, 4, 9 ve 16 ms atım genliği	24 sa	2012, [114]

Çizelge 2.4. Elektromekanik uyarımlı biyoreaktör çalışmaları, [11]’den değiştirilerek.

Elektromekanik uyarımlı biyoreaktör çalışmaları					
Hücre	Biyomalzeme	Düzenek	Uyarım rejimi, frekans, atım genliği, gerinim	Uyarım süresi	Yıl/Kaynak
C2C12 miyoblastları	PU fiberler	Tübüler özel yapım bilgisayar kontrollü biyoreaktör	Döngüsel gerinim, 4 V/mm, 1 Hz, %5 1 sa uygulama/5 sa dinlenme	7 gün	2008, [115]
C2C12 miyoblastları	Biyobaskılanmış çekirdek/kabuk aljinat	Özel yapım biyoreaktör	Mekanik: Gerinim 1 s ara ile 0,5 mm s ⁻¹ 3. gün %5, 7. gün %10 ve 10. gün %20 8 sa döngüsel gerinim/16 sa dinlenme Elektrik: 1 sa uyarım/7 sa dinlenme, 70 mA, 2 ms Elektromekanik: Mekanik+elektrik protokolleri	10 gün	2023, [116]

İskelet kası doku mühendisliğinde ilk mekanik uyarımlı biyoreaktör çalışmaları 1989 yılında Vandenburg ve Karlisch tarafından gerçekleştirilirken, ilk elektrik uyarımlı biyoreaktör çalışmaları 2005 yılında Stern-Straeter ve arkadaşları tarafından yürütülmüştür [94, 109]. Elektromekanik uyarımlı hibrit biyoreaktör çalışmaları ise ilk defa 2008 yılında Liao ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir [115]. Yapılan çalışmalar ile, iskelet kasının elektroaktif özellikleri nedeniyle elektrik uyarımlı veya elektromekanik uyarımlı biyoreaktör çalışmalarında kullanılan biyomalzemenin de elektroaktif özellikler göstermesi gerektiği tespit edilmiştir. İskelet kasının temel işlevi olan kasılma aktivitesinin gerçekleşmesi biyomalzemenin dışarıdan uygulanan elektriksel uyarılara cevap vermesi ile ilişkilidir [5, 6]. Bu nedenle iskelet kası dokusundaki elektriksel ortamı taklit edebilen elektroaktif polimerlerin kullanılması önemlidir [90].

2.8. Poli(3-Hidroksibutirat) (P3HB) ve Poli- β -Alanin (PBA) Polimerleri

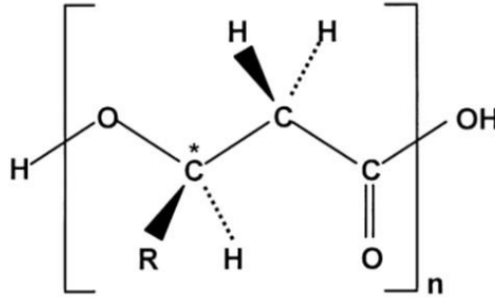
Piezoelektrik özelliklere sahip kemik, kıkırdak ve tendon gibi dokular ile piezoelektrik özelliği olmayan ancak elektroaktif özellikler sergileyen kas ve sinir dokularını içeren doku mühendisliği çalışmalarında piezoelektrik polimerlerin kullanımı ile elektrik sinyallerinin mekano-elektriksel transdüksiyon yoluyla hücrelere iletilmesinin mümkün olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle piezoelektrik malzemelerin iskelet kası doku mühendisliği çalışmalarında kullanımı araştırılmaktadır [8, 91].

Bahsedilen tüm bilgiler ışığında, iskelet kas dokusunun taklidi için daha önceki çalışmalarımızda yumuşak doku uygulamalarında kullanılmak üzere önerdiğimiz PBA polimeri ile katkılanmış P3HB polimerik fibröz matrikslerin başarılı olacağı öngörülmüştür [13]. Daha önce literatürde hiçbir iskelet kası doku mühendisliği çalışmasında kullanılmamış olan matrikslerin morfolojik, mekanik, piezoelektrik ve biyokimyasal özellikleri miyojenik farklılaşmayı ve maturasyonu başarı ile destekleyeceği hipotezi ile çalışmalar yürütülmüştür. P3HB ve PBA polimerlerinin özellikleri aşağıda detaylandırılmıştır.

2.8.1. P3HB Polimeri

Poli(3-hidroksibutirat) (P3HB), hücre içi karbon ve enerji depolama bileşiği olarak birçok mikroorganizma tarafından üretilen polihidroksialkanoat (PHA) ailesinin üyesi doğal poliesterlerden bir tanesidir. Mikrobiyal P3HB optikçe aktif, biyoyumlu ve biyobozunur bir polimerdir. Bakteri türüne bağlı olarak elde edilen PHA'ların kimyasal bileşimi ve molekül ağırlığı değişmektedir. P3HB, orta zincirli PHA sınıfına girmektedir [117].

P3HB'nin molekül ağırlığı yaklaşık olarak 300 kDa'dur ve erime sıcaklığı molekül ağırlığına bağlı olarak 172°C ile 179°C arasında değişir. P3HB yüksek kristaliniteye [118, 119] ve düşük biyobozunma hızına (6-12 ay) [120, 121] sahiptir. Oldukça hidrofobik bir yapıdadır [122, 123]. P3HB'nin moleküler yapısı Şekil 2.10'da verilmiştir.



Şekil 2.10. P3HB polimerinin moleküler yapısı.

P3HB'nin 3-hidroksi butirat (3HB) monomeri, insan kanında keton formunda 3-10 mg/100 mL oranında bulunmaktadır ve beynin glikoz kaynağı sınırlandığında, enerji kaynağı olarak 3HB monomeri kullanılır. Ayrıca, nörodejeneratif bozukluklar ve epilepsi tedavisi de dahil olmak üzere birçok metabolik hastalığın kontrolü için ağız veya damar yolu ile 3HB verilebilmektedir. Bununla beraber, 3-hidroksibutirat (3HB) olan P3HB'nin bozunma monomerinin, kalsiyum iyonlarının varlığında hücrenin L tipi voltaja bağlı kalsiyum kanalları üzerinde etki ederek hücre çoğalmasını desteklediği gösterilmiştir [124]. Ek olarak, birkaç biyomateryali karşılaştıran bir kardiyak rejenerasyon çalışmasında, P3HB'nin M1 tipi makrofajları filtrelerken M2 tipi makrofajlara izin verdiği gösterilmiştir. Ayrıca, kullanılan materyaller arasında en yüksek biyoyumluluk ve anjiyogenik kapasiteyi P3HB göstermiştir [125]. Biyobozunur, biyoyumlu ve biyolojik metabolizma tarafından emilebilir olma özellikleri nedeniyle P3HB'nin biyomedikal uygulamalarda kullanımına yönelik birçok çalışma yapılmıştır. Ancak, literatürdeki çalışmalarda P3HB, doku iskelesi uygulamalarının çoğunda tek başına değil, kompozit veya karışım halinde kullanılmıştır. Bunun nedeni P3HB'nin tek başına kullanılmasını engelleyen bazı yetersizliklerinin bulunmasıdır. Bunlar; yüksek kristalinite kaynaklı kırılma, polilaktitlere göre düşük biyobozunma hızı, erime noktası civarında termal kararsızlıktan kaynaklı işlenebilirlik zorluğu ve yüksek hidrofobisiteye sahip olmasıdır. Daha esnek polimerlerle veya plastikleştiricilerle karıştırılarak P3HB'nin mekanik dayanıklılık, hidrofobisite ve biyobozunurluk özelliklerinde istenen değişimler sağlanmaktadır [126-128]. P3HB aynı zamanda iskelet

kası dokusunun elektriksel özelliklerinin taklidi için önem arz eden pasif elektriksel özelliklere sahip piezoelektrik bir polimerdir. Piezoelektrisite fenomeni ve P3HB'nin piezoelektrik özellikleri aşağıdaki bölümlerde detaylı olarak açıklanmıştır.

2.8.1.1. Piezoelektrisite

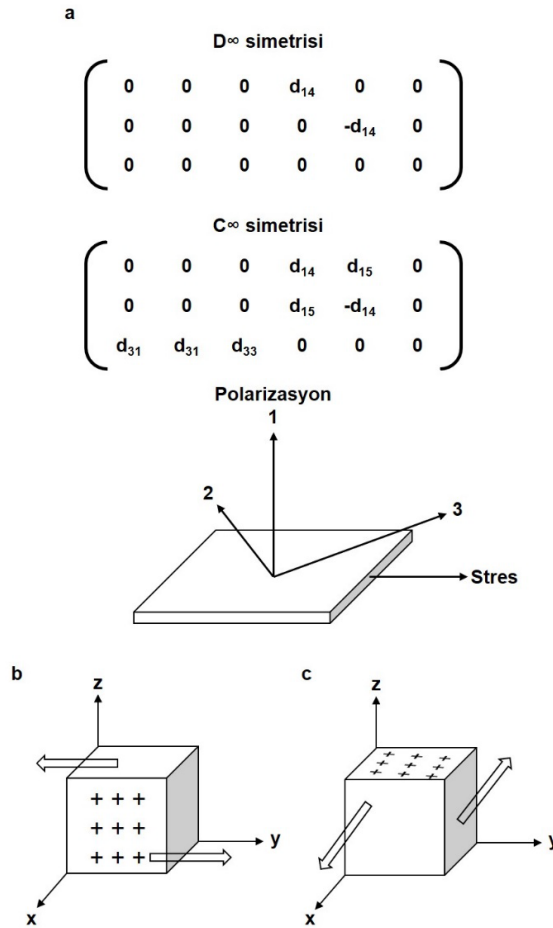
Piezoelektrisite uygulanan mekanik strese karşı olarak malzemede biriken elektrik yüküdür. Kristal ve seramik gibi katı malzemelerin yanı sıra kemik ve tendon gibi biyolojik yapılar da piezoelektrik özellikler sergilemektedir. Piezoelektrik etki tersine çevrilebilir bir süreçtir. Piezoelektrik özellikler sergileyen malzemeler, uygulanan elektrik alan ile mekanik değişimler de gösterir [129]. Polipeptitler, polisakkaritler ve polinükleotidler gibi optik olarak aktif ve yarı-kristalin biyopolimerler, dipol rotasyonlara bağlı olarak elektriksel polarizasyonlar üretir ve piezoelektrik özellikler gösterir [130]. Teoride, sarmal polimerlerde, gerilime bağlı olarak kristalin ve kristalin olmayan bölgeler yönelir ve lameller arasında düzenli fazlar oluşur [131]. Piezoelektrik özelliklere sahip polimerler 3 gruba ayrılmaktadır:

- 1- Optikçe aktif polimerler (fibröz proteinler, polisakkaritler, polipeptitler ve poliaminoasitler)
- 2- Yüksek voltaj altında kutuplanan polimerler (PVDF ve naylon)
- 3- Ferroelektrik seramikler ile kompozit haline getirilmiş polimerler (Kurşun zirkonat titanat)

Optikçe aktif polimerlerde piezoelektrisitenin kaynağı, optik aktivite ile ilişkili asimetric karbon atomlarına bağlı polar atomik grupların iç rotasyonudur. Doğal kaynaklı malzemeler için piezoelektrik sabitinin büyüklüğü 0,1 pC/N civarındadır. Çoğunlukla kolajen liflerden oluşan kemik, tendon, diş, deri ve trake, bağ doku, kan damarları ve bağırsak piezoelektrik özellikler gösterir [130]. Piezoelektrik malzemelerde elektromekanik etkileşimin yönü malzemenin mekanik etki altında göstereceği elektriksel tepkiyi belirlediğinden oldukça önemlidir. Bu etkileşim üç şekilde gerçekleşmektedir:

- 1- Uzunlamasına piezoelektrik etki,
- 2- Transvers piezoelektrik etki,
- 3- Kesme piezoelektrik etki [132].

Uzunlamasına piezoelektrik etkiye mekanik gerilim altında, kristal bir miktar uzar ve bunun sonucunda mekanik olarak indüklenen bir elektriksel kutuplanma meydana gelir. Transvers piezoelektrik etki ise genellikle altıgen kristal sistemlerde pozitif ve negatif iyonların düzenlenerek düzlemsel merkezi olmayan bir yapı oluşturması ile meydana gelir. Kesme piezoelektrik etki, yapısında üç kutupsuz eksen içeren kristallerde oluşur. Bu kristallerde yönlendirme içsel polarite ile gerçekleşir, herhangi bir mekanik etkiye elektriksel tepki gösteremez. Ancak, yönlendirilmiş (tensor) etkileşimler hem uzunlamasına hem de transvers piezoelektrik etkileri birlikte sağlayarak kayma piezoelektrisitesi gösterir [132]. Yönlendirilmiş polimerler için piezoelektrik matris, uzunlamasına ve transvers kesme piezoelektrik etki şematik görüntüleri Şekil 2.11’de verilmiştir.



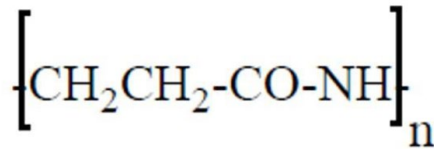
Şekil 2.11. Yönlendirilmiş polimerler için D^∞ ve C^∞ simetrilerinde piezoelektrik matris ve stres yönüne bağlı oluşan polarizasyonlar; d_{14} ve d_{15} kesme piezoelektrisite, d_{31} ve d_{33} uzunlamasına piezoelektrisite (a), [130]’den değiştirilerek, uzunlamasına (b) ve transvers (c) kesme piezoelektrik etki modelleri, [132]’den değiştirilerek.

2.8.1.2. P3HB'nin piezoelektrik özellikleri

P3HB biyobozunur, biyoyumlu ve biyolojik olarak emilebilir olmasının yanı sıra iskelet kası dokusunu taklit edebilecek kimyasal ve elektroaktif (piezoelektrik ve piroelektrik) özelliklere sahiptir [130-132, 133-135]. P3HB, asimetrik karbon atomları ile sarmal formda optik olarak aktif, yarı-kristalin bir polimerdir. Buradan yola çıkarak poli-β-hidroksibutiratın (PHB) (veya P3HB) piezoelektrik özelliklere sahip olabileceği ilk defa Fukada'nın piezoelektrik doğal polimerler üzerine yaptığı bir çalışmada belirtilmiştir [130]. Daha sonra PHB ve kopolimerlerinin piezoelektrik özelliklerini araştıran bir çalışmada PHB'nin kesme piezoelektrik (d_{14}) özellikleri gösterdiği tespit edilmiştir [131]. Bir başka çalışmada ise farklı oranlarda PHB/kurşun zirkonat titanat karışımları içeren filmlerle yapılan ölçümlerde PHB polimerinin uzunlamasına (d_{33}) piezoelektrik özellikler gösterdiği tespit edilmiş ve d_{33} sabiti 1,6–2,0 pC/N olarak belirlenmiştir [136].

2.8.2. PBA Polimeri

Nylon-3 olarak da bilinen poli-β-alanin (PBA), poliamid ailesinin bir üyesidir. PBA zincirleri, amid grupları (CONH) içeriğiyle α-amino asit bazlı protein moleküllerine benzer [137]. Sentez türüne göre molekül ağırlığı değişmekle birlikte, molekül ağırlığı yaklaşık 40 kDa'dur. Erime sıcaklığı yaklaşık 300°C'dir. PBA'nın moleküler yapısı Şekil 2.12'de verilmiştir.



Şekil 2.12. PBA polimerinin moleküler yapısı.

PBA, hidrofobik alt birimleri ile konakçı savunma peptitleri taklit eden antibakteriyel ve antifungal özelliklere sahiptir [138, 139]. Ayrıca protein adsorplayıcı özelliği ile PBA'nın kolajen gibi pozitif hücre kültürü substratlarından daha üstün hücre yapışma özellikleri sergilediği gösterilmiştir [137]. Bununla beraber PBA da P3HB'ye benzer şekilde, sarmal formda optik olarak aktif bir polimerdir. Ek olarak diğer poliamidlere kıyasla yüksek kristaliniteye sahiptir [140]. Bu nedenle, protein benzeri PBA polimerinin, elektroğirme gibi işlemler sırasındaki elektriksel gerilim altında piezoelektrik özellikler sergileyeceği öne sürülebilmektedir.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

P3HB/PBA fibröz matrislerin iskelet kası rejenerasyonundaki etkinliğinin incelendiği tez kapsamında, deneysel çalışmalar 2 kısımda gerçekleştirilmiştir. İlk kısımda, rastgele ve hizalı P3HB/PBA nanofiber matrisler üretilmiş ve karakterize edilmiştir. Ardından hücre kültürü çalışmaları ile miyojenik uyumlulukları ve miyojenik farklılaşmadaki etkinlikleri incelenmiştir. İkinci kısımda, miyojenik olarak uyumlu olduğuna ve miyojenik farklılaşmayı desteklediğine karar verilen matris grubu ile mekanik, elektrik ve elektromekanik uyarımlı biyoreaktörde miyojenik farklılaşmanın iyileştirilmesi ve maturasyonun desteklenmesi kapsamında çalışmalar yürütülmüştür.

3.1. Kullanılan Malzemeler

Çalışmada kullanılan ana polimer, poli[(R)-3-hidroksibütirik asit] (P3HB) Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Katkı polimeri poli- β -alanin (PBA), hidrojen transfer polimerizasyonu ile sentezlenmiştir [13]. Elektroegirme işleminde kullanılan polimer çözücüsü 1,1,1,3,3,3-hekzafloro-2-propanol (HFIP) ve çeşitli çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan mutlak etanol ($\geq 99,5\%$, v/v) Merck (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Sterilizasyon amaçlı çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan teknik etanol (96%, v/v), Colony Sugar Mills (Pakistan) firmasından tedarik edilmiştir. Dağıtma ve yıkama ortamı fosfat tampon çözeltisi tabletleri (PBS) (pH: 7,4), enzimatik bozunma deneylerinde kullanılan lipaz enzimi (30–90 U/mg) ve mikroorganizma kontaminasyonunu önlemek için kullanılan sodyum azid, Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından satın alınmıştır.

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan C2C12 fare miyoblast hücreleri (ACC 565) Leibniz Enstitüsü DSMZ-Alman Mikroorganizmalar ve Hücre Kültürleri Koleksiyonundan temin edilmiştir. RPMI 1640 besi ortamı, büyüme ve farklılaşma ortamı bileşeni L-glutamin, farklılaşma ortamı bileşeni at serumu (HS), Capricorn Scientific (Almanya) firmasından tedarik edilmiştir. Büyüme ortamı bileşeni fetal sıgır serumu (FBS), büyüme ve farklılaşma ortamı bileşeni penisilin/streptomisin (P/S) ve steril yıkama işlemlerinde kullanılan Dulbecco'nun fosfat tampon çözeltisi (DPBS), Biowest (ABD) firmasından satın alınmıştır. Hücreleri yüzeyden kaldırmak amacıyla kullanılan tripsin-EDTA çözeltisi ve canlılık analizlerinde kullanılan 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-difenil tetrazolyum bromür (MTT) tozu, Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Kriyoprotektan ajan olarak kullanılan steril dimetil sülfoksit

(DMSO), Santa Cruz (ABD) firmasından tedarik edilmiştir. Hücre fiksasyonu için kullanılan glutaraldehit (25%, v/v) (GA) ve hücre dehidrasyonu için kullanılan hekzametildisilazan (HMDS), Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Formazan kristallerinin çözülmesi amacıyla kullanılan, isopropanol Isolab (Almanya) firmasından, sodyum dodesil sülfat (SDS) ve DMSO Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından tedarik edilmiştir.

Hücre zarı geçirgenliğini arttıran Triton X-100 ajanı ve gen ekspresyon analizlerinde kullanılan kloroform, Merck (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Floresan görüntülemelerde kullanılan sığır serum albümini (BSA), FlouromountTM ve bloklama çözeltisi bileşeni keçi serumu (GS), Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından tedarik edilmiştir. Floresan boyamalarda kullanılan Alexa Fluor 488 konjuge anti F-aktin antikor ve 4',6-diamidino-2- fenilindol, dihidroklorür (DAPI), Invitrogen (ABD) firmasından satın alınmıştır. Gen ekspresyonu analizlerinde kullanılan miyoblast belirleme proteini 1 (MyoD), miyojenik faktör 4 (Myogenin), miyozin ağır zincir (MHC), asetilkolin reseptörü-alfa (AChR- α veya Chrna1) ve nörofilament ağır zincir (NF-H veya mNefh) primerleri, Oligomer Biyoteknoloji (Türkiye) firması tarafından sentezlenmiştir. mRNA izolasyonunda kullanılan RNeasy Mini Kit ve QIAzol liziz reaktifi, Qiagen (Almanya) firmasından temin edilmiştir. cDNA sentezinde kullanılan yüksek kapasite cDNA ters transkripsiyon kiti, Applied Biosystems (ABD) firmasından, gen ekspresyonu analizinde kullanılan 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCRMix Plus, Solis Biodyne (Estonya) firmasından tedarik edilmiştir. İmmünohistokimyasal analizlerde kullanılan anti-myod1 (ab203383), anti-myogenin (ab124800), anti-fast myosin skeletal heavy chain (ab91506) primer antikorları ile yeşil floresan Alexa Fluor® 488 (ab175471) ve kırmızı floresan Alexa Fluor® 568 (ab150077) sekonder antikorları, Abcam (Birleşik Krallık) firmasından satın alınmıştır.

KISIM I

Rastgele ve hizalı P3HB/PBA nanofiber matrikslerin üretimi, karakterizasyonu ve hücre kültürü çalışmalarına ait yöntemler bu kısımda verilmiştir.

3.2. Polimer Çözeltilerinin Hazırlanması

2017 yılında tamamlanmış çalışmamızda, P3HB ve PBA polimerlerinin 10:1 (w/w) oranındaki karışımı ile 3-boyutlu (3B) ıslak elektroğirme işlemleri gerçekleştirilmiştir [13]. Sunulan tez çalışmasında önceki bu çalışmanın sonuçları dikkate alınmış ve iskelet kası için gerekli mekanik özelliklere uygun olarak daha elastik matrikslerin hazırlanmasına karar verilmiştir. Matrikslerin elastikiyetini artırmak amacıyla, P3HB/PBA oranı 5:1 (w/w) olacak şekilde azaltılmıştır. P3HB (%5, w/v) ve PBA (%20, w/w) polimerleri HFIP içerisinde ve 80°C'lik su banyosunda bir gün boyunca manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılarak çözülmüştür.

3.3. Elektroğirme Parametrelerinin Belirlenmesi

Elektroğirme işlemleri, nem ve sıcaklığın sabit tutulabildiği kontrollü elektroğirme koşullarına izin veren NE300 Multinozzle Elektroğirme Cihazı (Inovenso, Türkiye) ile gerçekleştirilmiştir. Rastgele nanofiber matriksler geleneksel düz toplayıcı ile, hizalanmış nanofiber matriksler döner toplayıcı ile elde edilmiştir. Fibröz matrikslerin üretim parametreleri **Çizelge 3.1**'de listelenmiştir.

Çizelge 3.1. Rastgele ve hizalı P3HB/PBA fibröz matrikslerin üretiminde parametreler.

Rastgele fiber			
Akış hızı (mL/sa)	Uzaklık (cm)	Voltaj (kV)	
1,0	22,5	15	
0,9		15	
0,8		23	
0,7		24	
0,6		24,5	
0,5		25	
Hızlı fiber			
Akış hızı (mL/sa)	Uzaklık (cm)	Voltaj (kV)	Toplayıcı dönüş hızı (rpm)
1	15	15, 20 ve 22,5	1000
	18		
1	15	15, 20 ve 22,5	1500
	18		
1	15	15, 20 ve 22,5	2000
	18		
1	21	20 ve 22,5	2000
	25		

Rastgele fiber üretiminde, akış hızı, voltaj ve iğne ucu-toplayıcı uzaklığı değiştirilerek fiber morfolojisindeki ve fiber çapındaki değişim izlenmiştir. Bu denemeler sonucunda rastgele ve hizalı fiberlerin üretiminde akış hızının 1 mL/sa olarak sabit tutulmasına karar verilmiştir. Malzeme kaybını önlemek amacıyla daha yüksek akış hızlarına çıkılmamıştır. Hizalı fiberlerin üretimi amacıyla 15 kV ile 22,5 kV voltaj aralığında denemeler yapılmıştır. Ayrıca, 1000 rpm, 1500 rpm ve 2000 rpm olmak üzere 3 farklı hızda döner toplayıcı hızı denenmiştir. Toplayıcı-iğne ucu uzaklığı daha önceki çalışmalar göz önünde bulundurularak 15 cm ve 18 cm olarak 2 farklı değerinde sabit tutulmuştur. Toplayıcı-iğne ucu uzaklığı bir miktar daha arttırılarak fiber morfolojisinin düzeltilip daha hizalı bir morfoloji elde edilebileceği öngörülmüştür. Bu nedenle, akış hızı 1 mL/sa, toplayıcı dönüş hızı 2000 rpm olarak sabit tutulup; 21 ve 25 cm toplayıcı-iğne ucu uzaklığında, 20 ve 22,5 kV voltajda denemeler yapılmıştır. Elektroeğirme cihazında yapılan tüm eğirme işlemleri boyunca ortam sıcaklığı 25-30°C aralığında, nem 30-35% aralığında sabit tutulmuştur.

3.4. Matrislerin Karakterizasyonu

Rastgele ve hizalanmış P3HB/PBA nanofiber matrislerin kimyasal yapısı, termal, morfolojik, kristalografik, piezoelektrik ve mekanik özellikleri çeşitli analizlerle belirlenmiştir. Ek olarak su temas açısı ölçümleri yapılmış ve enzimatik/hidrolik bozunma davranışları incelenmiştir. Karakterizasyonlar öncesinde, rastgele nanofiber matrisler düz toplayıcı üzerine 10 sa boyunca, hizalanmış nanofiber matrisler döner toplayıcı üzerine 15 sa boyunca, kalınlıkları 0,1 mm olacak şekilde toplanmıştır. Matrisler analizler öncesinde ilgili analize uygun boyutlarda hazırlanmıştır.

3.4.1. Kimyasal Karakterizasyon

Matrislerin kimyasal yapısının belirlenmesi amacıyla Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) analizi, Enerji Dağılımlı X-Işını Spektroskopisi (EDX) analizi ve elementel analiz yapılmıştır.

3.4.1.1. FTIR analizi

PBA'nın katkılama sonrasında yapıdaki varlığını doğrulamak amacıyla FTIR analizi (Thermo Scientific Nicolet iS10, ABD) gerçekleştirilmiştir. FTIR analizi, ATR tekniği ile 500-4000 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında yapılmıştır.

3.4.1.2. EDX analizi

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) cihazına (Tescan, FIB-SEM, GAIA 3, Çek Cumhuriyeti) entegre Enerji Dağılımlı X-Işınları Spektroskobu (EDX) (Oxford XMax 150 EDS, Çek Cumhuriyeti) yardımıyla fiberlerin elementel analizi yapılmıştır. EDX analizi SEM görüntülemesi sırasında gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle örnekler altın-paladyum kaplı ve alüminyum mat üzerindedir.

3.4.1.3. Elementel analiz

EDX analizinin doğrulanması amacıyla matrikslerin elementel analizi Truspec Micro Elementel Cihazı (Leco, ABD) ile gerçekleştirilmiştir. Birer mg'lık örnekler, kalay ve gümüş kapsüllerin içine yerleştirilmiş ve yüksek sıcaklıkta (1000–1500°C'de) yakılmıştır. Ardından, örneklerdeki karbon (C), azot (N), oksijen (O) ve hidrojen (H) atomlarının yüzdeleri belirlenmiştir. Yapılan tüm ölçümler 3 kez tekrarlanmıştır.

3.4.2. Termal Karakterizasyon

Matrikslerin termal özelliklerinin araştırılması amacıyla Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) analizi ve Termogravimetrik Analiz (TGA) yapılmıştır.

3.4.2.1. DSC analizi

DSC analizi Diamond DSC (PerkinElmer, ABD) cihazı kullanılarak yapılmıştır. Analiz oda sıcaklığından başlayarak 300°C'ye kadar 10°C/dk ısıtma hızında gerçekleştirilmiştir. Yapıdaki kristal suyu uzaklaşınca (75-175°C aralığında) hızla soğutma işlemi uygulanarak ikinci tarama yapılmıştır.

3.4.2.2. TGA

TGA öncesinde her gruptan matriks kuru halde kütlece aynı miktarda olacak şekilde (yaklaşık 50 mg) tartılmıştır. Ardından TG/DTA 6300 (Seiko Instruments, ABD) cihazı kullanılarak, azot atmosferinde 25–400°C aralığında ve 10°C/dk ısıtma hızıyla analiz gerçekleştirilmiştir.

3.4.3. Morfolojik Karakterizasyon

Matrikslerin morfolojik özellikleri Taramalı Elektron Mikroskobisi (SEM) ve Atomik Kuvvet Mikroskobisi (AFM) analizleri ile belirlenmiştir.

3.4.3.1. SEM analizi

Matrikslerin morfolojik incelemeleri SEM cihazı (Tescan, FIB-SEM, GAIA 3, Çekya) ile yapılmıştır. Matriksler, analiz öncesinde altın-palyadyum ile kaplanmıştır. Analizde farklı büyütme oranlarında görüntüler alınmıştır. SEM fotoğrafları kullanılarak ImageJ yazılımı (NIH, Bethesda, MD) ile fiber çapları belirlenmiştir.

3.4.3.2. AFM analizi

Matrikslerin AFM görüntülemesi NanoMagnetics ezAFM⁺ cihazı ile Hacettepe Üniversitesi Elektrik-Elektronik Mühendisliği bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Dinçer Gökçen'in laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Hizalanmış fiberlerin analizi 5 µm/sa tarama hızında 45° açıyla aralıklı temas (tapping) modunda yapılmıştır. Ayrıca 7 µm/sa, 10 µm/sa, 20 µm/sa tarama hızı, 90 ve 135° tarama açıları, örneğin farklı bölgelerinde denemeler gerçekleştirilmiştir. Görüntüleme ile birlikte AFM cihazına ait yazılım yardımıyla yüzey profili çıkartılarak fiber çapları belirlenmiştir. Rastgele fiberlerin analizi 5 µm/s tarama hızında 90° (yüzeye dik) açıyla aralıklı temas (tapping) modunda yapılmıştır. Ayrıca 10 µm/sa ve 20 µm/sa tarama hızı, 45 ve 135° tarama açıları, örneğin farklı bölgelerinde denemeler gerçekleştirilmiştir. Ek olarak, AFM iğnesinin yüzeye olan uzaklığı da belirlenmiştir.

3.4.4. Kristalografik Karakterizasyon

Matrikslerin kristalografik özellikleri X-Işını Kristalografisi (XRD) analizi ile tespit edilmiştir. XRD analizi, Hacettepe Üniversitesi Fizik Mühendisliği bölümü emekli öğretim üyesi Prof. Dr. Şadan Özcan'ın laboratuvarında X-Işını Difraktometresi ile CuKα radyasyon kaynağı kullanılarak, 10°-50° tarama aralığı (2θ), 1°/dk tarama hızı koşullarında yapılmıştır. XRD desenleri OriginPro 8.1 yazılımı (ABD) kullanılarak elde edilmiştir.

3.4.5. Piezoelektrik Özelliklerin Belirlenmesi

Matrikslerin piezoelektrik gerinim sabiti veya piezoelektrik modülü, d₃₃, Berlincourt Piezo D33 Meter (Piezotest PM300) kullanılarak belirlenmiştir. Analizde matrikslere mekanik stres uygulanmış ve oluşan polarizasyon piezometre aracılığıyla piezoelektrik gerinim sabitine dönüştürülmüştür (doğrudan piezoelektrik etki). Tüm ölçümler, her bir örnek grubu için 4 kez tekrarlanmıştır.

3.4.6. Mekanik Özelliklerin Belirlenmesi

Matrikslerin mekanik özelliklerinin araştırılması amacıyla örneklerle çekme testi uygulanmıştır. Texture Analyzer TA.XTplusC (Stable Micro Systems, Birleşik Krallık) kullanılarak ASTM 638 standartlarına göre çekme dayanımı, kopmadaki uzama ve elastik modül değerleri ölçülmüştür. Örnekler 1 cm genişliğinde ve 5 cm uzunluğunda dikdörtgen parçalara kesilmiş ve analiz öncesinde 37°C'de 1 sa boyunca PBS (pH: 7,4) içinde bekletilmiştir. Analiz 50 N yük ve 10 mm/dk sabit piston başlığı hızında gerçekleştirilmiştir. Tüm ölçümler, her bir örnek grubu için 3 kez tekrarlanmıştır.

3.4.7. Hidrolitik ve Enzimatik Bozunma Davranışı

Matrikslerin hidrolitik bozunma davranışı enzim içermeyen PBS ortamında incelenirken, enzimatik bozunma davranışı enzim içeren PBS ortamında incelenmiştir [141]. Enzim olarak lipaz kullanılmıştır. Elli mg lipaz enzimi, 100 mL PBS içerisinde çözdürülmüş ve çözeltiye %0,1 (w/v) oranında sodyum azid eklenmiştir. Bozunma ortamları ile etkileştirilen matriksler 37°C sıcaklıkta 50 rpm hızında çalkalama yapan inkübatörde muhafaza edilmiştir. Matrikslerin üzerindeki bozunma ortamları haftada bir yenilenmiştir. İskelelerin kuru ağırlıkları inkübasyonun 1., 3., 5. ve 7. haftalarında ölçülmüş ve gravimetrik olarak kütle kaybı belirlenmeye çalışılmıştır. Ancak, anlamlı sonuçlar elde edilememiştir. Bu nedenle bozunurluğun belirlenmesi için, test süresince malzemelerin morfolojilerindeki değişimler SEM görüntülemeleri ile incelenmiştir.

3.4.8. Su Temas Açıları

Matrikslerin hidrofobisitesi, su temas açısı ölçümü ile değerlendirilmiştir. Su temas açısı Kruss DSA 100 (Almanya) cihazı kullanılarak durgun damla (sessile drop) yöntemi ile oda koşullarında ölçülmüştür. Tüm ölçümler her örnek grubu için 15 kez tekrarlanmıştır.

3.5. Hücre Kültür Çalışmaları

Hücre kültürü çalışmaları, C2C12 fare miyoblast hücre hattı ile hücre kültür kapları ve rastgele ve hizalanmış morfolojiye sahip P3HB/PBA nanofiber matriksler üzerinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar öncesinde C2C12 hücre hattı karakterize edilmiştir. Karakterizasyon çalışmalarından sonra hücre kültür çalışmalarına geçilmiştir.

Hücre kültürü öncesinde 0,1 mm kalınlığındaki matriksler, 1 cm × 1 cm boyutlarında kare şeritlere kesilmiştir. Matriksler, sterilizasyon amacıyla, %70 etanol (v/v) içerisine alınmış, vakum etüvünde çöktürülerek 1 sa boyunca bekletilmiş ve laminer kabin

içerisinde steril DPBS ile yıkanmıştır. Ardından, her bir yüzeyi 30 dk boyunca UV ışığına maruz bırakılmıştır. Hücre kültürü çalışmalarında, %10 (v/v) FBS, %2 (v/v) L-glutamin ve %0,5 (v/v) P/S içeren RPMI 1640 büyüme ortamı kullanılmıştır. Hücreler 75T flaskta kültürlenmiş, %70 proliferasyon oranına ulaşıldığında yüzeyden tripsin/EDTA ile kaldırılmıştır. Farklılaşma ortamı olarak %2 (v/v) HS, %2 (v/v) L-glutamin ve %0,5 (v/v) P/S içeren RPMI 1640 kullanılmıştır. Farklılaşma çalışmalarında hücreler, proliferasyon için süre tanınması amacıyla, kültürün 3. gününe kadar büyüme ortamı ile inkübe edilmiştir. Üçüncü gün hücrelerin üzerindeki büyüme ortamı uzaklaştırılmış ve farklılaşma ortamı eklenmiştir. C2C12 hücreleri, 21 gün boyunca CO₂ inkübatöründe (Heraus, Almanya) kültürlenmiş ve ortamlar her 2 günde bir yenilenmiştir.

3.5.1. C2C12 Hücre Hattının Karakterizasyonu

DSMZ hücre bankasından temin edilen C2C12 hücre hattının üreme davranışı MTT analizi ve hücre sayımı ile incelenmiş; ayrıca F-aktin/DAPI ve kristal viyole boyamaları ile de morfolojik karakterizasyonu yapılmıştır. Belirlenen yoğunluktaki hücreler kültür kaplarına ekilmiş ve hücre büyüme eğrisi ve hücre ikilenme süresinin belirlenmesi amacıyla 10 gün boyunca kesikli kültüre tabi tutulmuşlardır (**Çizelge 3.2**).

Çizelge 3.2. C2C12 hücre hattı karakterizasyonunda yapılan analizler.

Analiz	Gün	Kültür kabı	Paralel sayısı
MTT	1, 2, 3, 5, 7, 10, 14	24-gözlü	4
Hücre sayımı	1, 2, 3, 5, 7, 10, 14	24-gözlü	4
Kristal viyole	1, 3, 7	6-gözlü	2
F-aktin/DAPI	1, 3	48-gözlü	1

Hücre ekim yoğunluğu, DSMZ hücre bankasının önerdiği şekilde, 1×10^5 hücre/80 cm² olarak seçilmiştir. Bu bağlamda 6-gözlü hücre kültür kaplarına yaklaşık 12×10^3 hücre/göz, 24-gözlü hücre kültür kaplarına yaklaşık $2,375 \times 10^3$ hücre/göz, 48-gözlü hücre kültür kaplarına yaklaşık $1,375 \times 10^3$ hücre/göz olacak şekilde ekim yapılmıştır (**Çizelge 3.3**). Pasaj 2’de (P2) dondurulan hücreler uygun ortam ile 75T kültür flasklarına açılmış (P3), hücreler %70 yayılıma geldiğinde pasaj 4’te (P4) ekim yapılmıştır.

Çizelge 3.3. C2C12 hücre hattı karakterizasyonunda kullanılan hücre kültür kapları, yüzey alanı ve çalışma hacmi değerleri.

Hücre kültür kabı	Yüzey alanı (cm ²)	Ortam miktarı (mL)
6 gözlü	9,6	3
24 gözlü	1,9	1
48 gözlü	1,1	0,5

3.5.1.1. Hücre büyüme eğrisi

Kültürün 1., 2., 3., 5., 7., 10. ve 14. günlerinde yüzeyden 0,5 mL %0.25 tripsin/EDTA çözeltisi ile 5 dk boyunca 37°C CO₂ etüvünde muamele edilip kaldırılan hücreler hemositometreyle sayılmıştır. Dört paralel gözden ve her gözden 2 kere sayım gerçekleştirilmiştir. Hücre büyüme eğrisinin elde edilebilmesi için grafikten doğrusallığa en yakın zaman aralığı seçilmiş ve bu saatlerdeki hücre sayısının doğal logaritması (ln) alınarak zamana karşı grafiği çizilmiştir. Grafiğin eğiminden özgül üreme hızı (μ) tespit edilmiştir. Hücre ikilenme süresinin (t_d) tespiti için ise $t_d = \ln 2 / \mu$ formülü kullanılmıştır.

3.5.1.2. Canlılık analizi

Hücre canlılığının tespiti için kültürün 1., 2., 3., 5., 7., 10. ve 14. günlerinde MTT analizi yapılmıştır. Hücreler üzerindeki besi ortamı uzaklaştırılmış ve her bir göze 600 μ L serumsuz besi ortamı ve 60 μ L MTT çözeltisi eklenmiştir. Ardından 3 sa boyunca 37°C CO₂ etüvünde inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda hücreler üzerindeki ortam uzaklaştırılmış ve her bir göze 400 μ L DMSO çözeltisi eklenerek formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır. Elde edilen çözeltilerden 200 μ L alınarak 96-gözlü kültür kaplarına aktarılmıştır. Ölçümler, 690 nm referans olmak üzere 570 nm'de spektrofotometrik olarak yapılmış ve çözeltilerin optik yoğunlukları belirlenmiştir (Asys UVM 340, Avusturya). Ek olarak, kültürdeki hücre sayısı ile MTT analiz sonuçları birlikte değerlendirilerek hücre sayısı-absorbans ilişkisi belirlenmiştir.

3.5.1.3. Floresan görüntüleme

Hücre morfolojisinin görüntülenmesi F-aktin/DAPI boyama ile gerçekleştirilmiştir. Hücre iskeletini boyamak için Alexa Fluor 488 konjuge anti F-aktin antikor, çekirdeğini boyamak için DAPI boyası kullanılmıştır. Kültürün belirlenen günlerinde hücreler üzerindeki ortam uzaklaştırılmış, 3 kez PBS ile yıkanmış ve GA (%2,5; v/v) ile 10 dk boyunca fiksasyon gerçekleştirilmiştir. Fiksasyon işlemi sonrasında, tekrar PBS ile 3 kez

yıkama işlemi uygulanmıştır. Ardından hücreler %0,1 (v/v) Triton X-100 içeren PBS çözeltisinde 10 dk bekletilmiştir. Çözelti uzaklaştırıldıktan sonra örnekler %1 (w/v) sığır serum albümini (BSA) içeren PBS (PBS/A) ile 3 kez 5 dk çalkalanarak yıkanmıştır. Daha sonra her bir göze 100 µL F-aktin/DAPI (1:100 dilüsyonda anti F-aktin antikoru, 1:1000 dilüsyonda DAPI) eklenerek karanlıkta 30 dk boyunca inkübe edilmiş ve bu sürenin sonunda hücreler tekrardan PBS/A çözeltisi ile 3 kez 5 dk yıkanarak boyama işlemi tamamlanmıştır. Görüntülemeler invert floresan mikroskop (Olympus, ABD) ile yapılmıştır.

3.5.1.4. Histolojik boyama

Kristal viyole ile histolojik boyaması yapılan hücrelerin morfolojileri takip edilmiştir. Hücreler üzerindeki ortam uzaklaştırılmış ve 3 kez PBS ile yıkama yapılmıştır. Fiksasyon işlemi için hücreler 4°C'de 20 dk boyunca aseton/metanol çözeltisinde bekletilmiştir. Fiksasyon gerçekleştikten sonra hücreler üzerine 500 µL kristal viyole çözeltisi eklenmiş ve 30 dk inkübe edilmiştir. Boyanan yüzey su ile yıkanmış ve invert mikroskop altında görüntüleme yapılmıştır.

3.5.2. Hücre Kültür Kaplarında Miyojenik Farklılaşma Çalışmaları

C2C12 fare miyoblast hücre hattı ile kültür kaplarında yapılan hücre kültürleri 21 gün boyunca sürdürülmüştür. Hücrelerin kap yüzeyine tutunmaları, çoğalmaları ve farklılaşmaları incelenmiştir. MTT analizi için 12-gözlü kültür kapları; kristal viyole ve F-aktin/DAPI boyamaları için 6-gözlü kültür kapları tercih edilmiştir. Hücreler 7×10^3 hücre/cm² yoğunluğunda kültür kaplarına ekilmiştir. Kontrol grubu olarak hücreler büyüme ortamında kültür edilmiştir. Farklılaşma grubundaki hücreler ilk 3 gün büyüme ortamında kültüre edilmiştir. Kültürün 3. gününde hücrelerin üzerindeki büyüme ortamı uzaklaştırılıp yerine farklılaşma ortamı eklenmiştir. Hücreler, %95 nem ve %5 CO₂ içeren inkübatörde 2 günde bir ortamları tazelenerek kültüre edilmişlerdir.

3.5.2.1. Canlılık analizi

Kültür kaplarındaki hücrelerin canlılığı MTT analizi ile belirlenmiştir. Hücreler üzerindeki besi ortamı kültürün 1., 3., 7., 10., 14. ve 21. günlerinde uzaklaştırılmış ve Bölüm 3.5.1-ii kısmında belirtilen protokol uygulanmıştır. Kültürün ilk gününde elde edilen çözeltiden 200 µL alınarak 96-gözlü kültür kaplarına aktarılmıştır. Ancak kültürün ilerleyen günlerinde sırasıyla 4, 8, 8, 4 ve 2 kat seyreltme uygulanarak optik yoğunluklar belirlenmiştir.

3.5.2.2. Morfolojik analizler

İnvert mikroskop aracılığıyla hücrelerin, büyüme ve farklılaşma ortamında kültürün farklı günlerindeki dağılımları ve morfolojileri incelenmiştir. Kültürün 1., 3., 7., 14. ve 21. günlerinde hücre iskeleti ve çekirdeği Alexa Fluor 488 konjuge anti F-aktin antikor/DAPI boyaması ile incelenmiş ve Bölüm 3.5.1.3'te belirtilen protokol uygulanmıştır.

3.5.2.3. Histolojik analizler

Kristal viyole ile histolojik boyaması yapılan hücrelerin morfolojileri kültürün 1., 3., 7., 14. ve 21. günlerinde, Bölüm 3.5.1.4'te belirtilen protokol uygulanarak incelenmiştir.

3.5.3. P3HB/PBA Matrislerde Miyojenik Farklılaşma Çalışmaları

C2C12 hücrelerinin matrisler üzerinde kültürasyonunda $2,1 \times 10^4$ hücre/matris yoğunluğunda hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. Hücre ekimi yapıldıktan 1 sa sonra matrislerin üzerine belirli oranlarda hücre büyüme ortamı eklenmiş ve 6 saat sonunda toplam besi ortamı hacmi 1 mL'ye tamamlanmıştır. Farklılaşma ortamı kültürün 3. günde eklenmiştir. Hücreler, %95 nem ve %5 CO₂ içeren inkübatörde 21 gün boyunca 2 günde bir ortamları değiştirilerek kültüre edilmiştir. Malzeme yüzeyindeki hücrelerin canlılığı MTT ve canlı/ölü hücre boyama analizleri ile; tutunma, yayılma ve farklılaşma davranışları SEM ve hücre iskeleti-çekirdeği boyama analizleri ile; gen ve belirteç düzeyinde miyotüp farklılaşması ve maturasyonu RT-qPCR (Gerçek Zamanlı-Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ve immünohistokimyasal boyama (IHC) analizleri ile incelenmiştir.

3.5.3.1. Canlılık analizleri

Matrisler üzerindeki C2C12 hücrelerinin canlılığı, MTT analizi ve canlı/ölü boyama ile belirlenmiştir. Kültürün 1., 3., 7., 14. ve 21. günlerinde MTT analizi gerçekleştirilmiştir. MTT analizi için Bölüm 3.5.1.2'de belirtilen protokol uygulanmıştır.

Canlı/ölü boyama analizinde, matrisler üzerindeki canlı ve ölü C2C12 hücreleri, sırasıyla Calcein AM ve Etidyum homodimer-1 (EthD-1) boyaması ile kültürün 21. gününde gözlemlenmiştir. Bu amaçla, matrisler üzerindeki kültür ortamı aspire edilmiş ve örnekler, Ca²⁺ ve Mg²⁺ içeren DPBS (DPBS⁺) ile 3 kez yıkanmıştır. Ardından, matrisler, oda sıcaklığında 30 dk boyunca 1 µM Calcein AM ve 1 µM EthD-1 (1:1000 seyreltme) içeren DPBS⁺ içinde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında matrisler, 3 kez DPBS⁺ ile yıkanmış ve görüntülemeler konfokal mikroskobu (Zeiss LSM 510,

Almanya) ile yapılmıştır. Canlı (yeşil) ve ölü (kırmızı) hücre oranları ImageJ Yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır.

3.5.3.2. Morfolojik analizler

Hücrelerin matriks üzerindeki tutunma ve yayılma davranışları ve miyojenik morfolojileri SEM analizi ile belirlenmiştir. Bu amaçla kültürün 3., 7., 14. ve 21. günlerinde örnekler üzerindeki besi ortamı uzaklaştırılmış ve PBS ile iki kez yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından %2,5'lük (v/v) GA çözeltisi ile yaklaşık 30 dk boyunca fiksasyon yapılmıştır. Fiksasyon işleminden sonra PBS ile yıkama bir kez daha tekrar edilmiştir. Matriksler etanol serilerinden (%30, %50, %70, %90, %100; v/v) geçirilerek hücrelerin yapısındaki su uzaklaştırılmıştır. Daha sonra örneklerin üzerine HMDS eklenmiştir. Beş dk sonunda HMDS uzaklaştırılmış, örnekler 1 gece boyunca çeker ocakta kurutulmuşlardır. SEM ile görüntüleme işlemine geçilmeden önce matriksler vakum ortamında altın-paladyum ile kaplanmıştır.

Matriksler üzerindeki C2C12 hücrelerinin iskeleti ve çekirdeği kültürün 7., 14. ve 21. günlerinde Alexa Fluor 488 konjuge anti F-aktin antikor/DAPI boyaması ile tespit edilmiştir. Analiz için Bölüm 3.5.1.3'te belirtilen protokol uygulanmıştır. Görüntülemeler konfokal mikroskobu ile gerçekleştirilmiştir.

3.5.3.3. Gen ekspresyonu analizleri

In vitro kültürde C2C12 hücrelerinin kültür kapları ve matriksler üzerinde farklılaşmasının gen düzeyinde belirlenebilmesi için RT-qPCR analizi ile MyoD, Myogenin ve MHC gen ekspresyonları incelenmiştir. Bağlı gen ifadesi için housekeeping gen olarak β -aktin kullanılmıştır. RT-qPCR analizi için kültürün 7., 14. ve 21. günlerinde Trizol yöntemi ile RNeasy Mini Kit kullanarak mRNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzolasyonda ilk olarak matrikslerin üzerine 500 μ L QIAzol liziz reaktifi eklenmiş ve matriksler mikro-makas yardımı ile parçalanmıştır. Ardından 12000 rpm'de +4°C'de 10 dk boyunca santrifüj yapılmış ve süpernatant yeni bir tüpe aktarılmıştır. Örnekler 10-20 s vortekslenmiş ve 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda her bir örneğe 100 μ L kloroform eklenmiş ve örnekler 15-20 kere altüst edilerek çalkalanmış, oda sıcaklığında 3-5 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra 13000 rpm'de +4°C'de 15 dk santrifüj yapılmıştır. Oluşan şeffaf faz (\approx 200 μ L) dikkatlice çekilerek yeni tüplere aktarılmıştır. Örneklerin üzerine fazdan alınan miktar kadar %70 etanol (v/v) eklenmiştir. Bu aşamadan sonra tüm işlemler oda sıcaklığında RNeasy Mini Kit ile

gerçekleştirilmiştir. Örnekler pipetlenerek kolonlara aktarım yapılmış ve 13000 rpm’de 1 dk boyunca santrifüjlenmiş, kolonun altında kalan sıvı uzaklaştırılmıştır. Ardından her bir örneğe 700 µL RW1 tamponu eklenmiş ve 13000 rpm’de 30 s santrifüj yapılmış, kolonun altında kalan sıvı uzaklaştırılmıştır. Daha sonra her bir örneğe 500 µL RPE tamponu eklenmiş, 13000 rpm’de 30 s santrifüjlenmiş, kolon altında kalan sıvı uzaklaştırılmıştır. RPE tamponu ile bir yıkama daha gerçekleştirilmiş, ancak bu defa 2 dk boyunca aynı koşullarda santrifüj yapılmıştır. Bu aşamadan sonra kolon altında kalan toplama tüpü değiştirilmiştir, 13000 rpm’de 1 dk santrifüjden sonra toplama tüpleri bu kez kit içerisindeki 1,5 mL’lik tüplerle değiştirilmiştir. Kolonlara 30 µL RNase-free su eklenerek 1 dk inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Son olarak 13000 rpm’de son bir kez 1 dk boyunca santrifüj yapılmış ve mRNA izolasyonu tamamlanmıştır. Üretici firmanın kit için önerdiği protokol kapsamında mRNA izolasyonu sonrası Yüksek Kapasite cDNA Ters Transkripsiyon Kiti yardımı ile cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Light Cycler Nano (Roche, İsviçre) analiz sistemi ile yapılan RT-qPCR analizi için 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCRMix Plus kiti kullanılmıştır. Analiz için kullanılan primerler ve yapışma sıcaklıkları (T_a) Çizelge 3.4’te listelenmektedir.

Çizelge 3.4. RT-qPCR analizinde kullanılan primerler ve yapışma sıcaklıkları.

Gen	Forward 5’-3’	Reverse 5’-3’	T_a
MyoD	CTGGTTCTTCACGCCAAA	TAGGACAGACTTCTGCTCTTCC	55°C
Myogenin	CCATGGTGCCAGTGAAT	AAATGATCTCCTGGGTTGGG	53°C
MHC	AGAACAAGGACCCACTGAAC	CACTACTGCCTCTGCTTCA	53°C

3.5.3.4. İmmünohistokimyasal analizler

İmmünohistokimyasal analiz ile MyoD, Myogenin ve MHC miyojenik farklılaşma belirteçleri incelenmiştir. Bu analiz için kültürün 7., 14. ve 21. günlerinde alınan örnekler PBS ile 3 kez yıkanmış, ardından %2,5 (v/v) GA ile fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Fiksasyon işleminden sonra örnekler tekrardan PBS ile yıkanmıştır.

Satıcı firmanın önerileri göz önünde bulundurularak MyoD ve Myogenin antikorları ile örnekleri muamele etmeden önce antijen geri-kazanım protokolü uygulanmıştır. Zarar görmemeleri için matrisler doku kasetlerine alınmıştır. Kasetler beher içerisine konulmuş ve üzerlerine 500 mL sodyum sitrat tampon çözeltisi (pH: 6,0) eklenmiştir.

Ardından mikrodalga yardımıyla örnekler 20 dk boyunca 850 W gücünde kaynatılmıştır. Bu aşamadan sonra örnekler soğuk su içerisine alınmıştır ve soğuduktan sonra %0,01 (v/v) Triton X-100 içeren PBS'te 30 dk bekletilmişlerdir. Yıkama tamponu olarak %5 (v/v) GS içeren PBS kullanılmıştır. Spesifik olmayan protein bağlanmalarını engellemek için %5 (v/v) GS ile 1 sa boyunca inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Daha sonra örnekler anti-myod1, anti-myogenin, anti-fast myosin skeletal heavy chain primer antikorlar ile (sırasıyla, 1:250, 1:200 ve 1:500 dilüsyonlarında) 4°C'de bir gece boyunca bekletilmiştir. Son olarak örnekler 1:500 dilüsyondaki yeşil floresan Alexa Fluor® 488 ve kırmızı floresan Alexa Fluor® 568 sekonder antikorlar ile 1 sa boyunca PBS/A içerisinde inkübe edilerek immünohistokimyasal boyama tamamlanmıştır. Analiz öncesinde Flouromount™ yardımı ile lam ve lameller arasına örnekler sıkıştırılmış ve ardından konfokal analizi yapılmıştır.

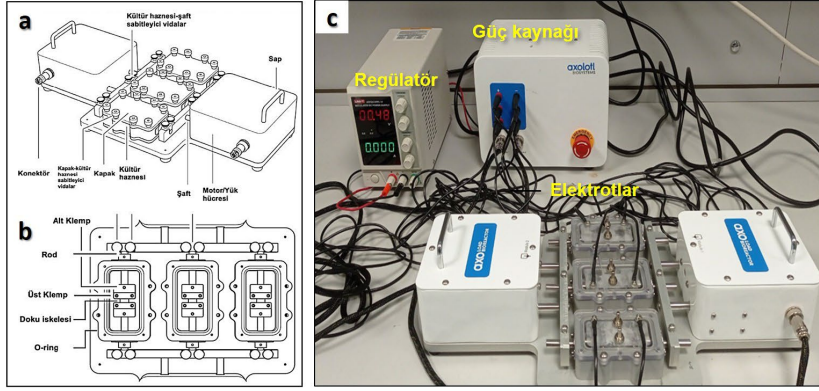
KISIM II

Miyojenik olarak uyumlu olduğu ve miyojenik farklılaşmayı desteklediği belirlenen hizalı P3HB/PBA nanofiber matrikslerin mekanik, elektrik ve elektromekanik uyarımlı biyoreaktör koşullarında miyojenik farklılaşma ve maturasyon üzerine etkilerinin incelendiği çalışmalara ait yöntemler bu kısımda verilmiştir.

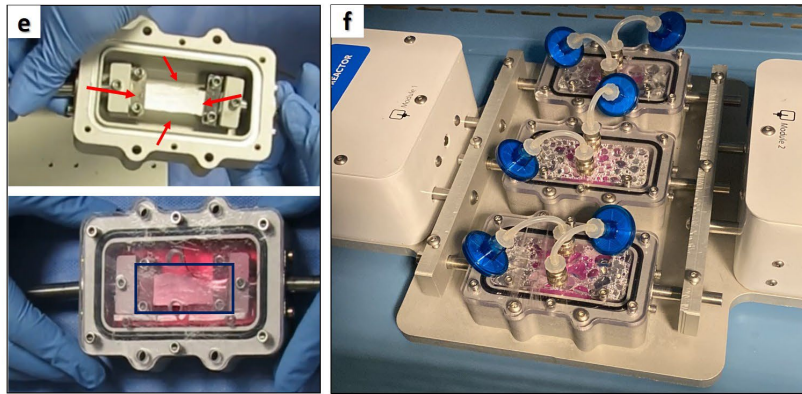
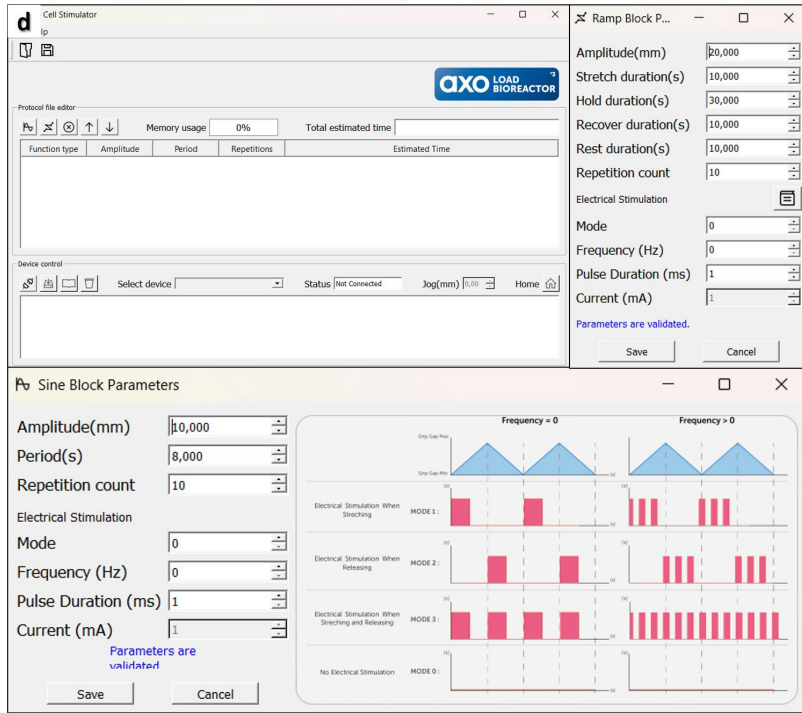
3.6. Mekanik, Elektrik ve Elektromekanik Uyarımlı (Hibrit) Biyoreaktör

Mekanik, elektriksel ve elektromekanik uyarım biyoreaktörü olarak Hücre ve Doku Mühendisliği Araştırma Grubu'nda Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu'nun danışmanlığında tasarlanan biyoreaktör kullanılmıştır. İlgili cihaz, yatay düzlemde iki yönlü olarak 0,01 mm çözünürlüğünde çekme hareketi yapabilen, 0,5 mm ile 4 mm arasında hareket edebilme kabiliyetine sahip, 2 adet elektriksel uyarım noktası bulunan, 1 mA çözünürlükte 10-40 Hz arası frekans ayarlaması yapılabilen, 1 ms çözünürlükte sinyal ayarlamaya uygun üretici üniteye sahip bir biyoreaktördür. Çekme hareketinin sıklığı, frekansı ve genliği sisteme bağlı bilgisayar ara yüzü ile ayarlanabilmektedir. Bunun yanında sistem sinüs fonksiyonu ve aktivasyon (ramp) fonksiyonu ile döngüsel olarak çalışabilmektedir. Özel tasarım biyoreaktör Axolotl (Türkiye) firmasından tedarik edilmiştir. Biyoreaktöre ait görseller **Şekil 3.1**'de verilmiştir.

Mekanik, elektriksel ve elektromekanik uyarım biyoreaktörüne ait şematik görseller **Şekil 3.1.a** ve **b**'de verilmiştir. Çalışmalar öncesinde sökülebilir tüm parçalar otoklavlanmış, ana gövdedeki motor ve diğer aksamlar %70 etanol (v/v) ile temizlenmiştir. Reaktör ile hücre kültüründe çalışılırken tam steril ortamda; ameliyat eldiveni ve ameliyat örtüsü kullanılarak çalışmalar gerçekleştirilmiştir. **Şekil 3.1.e**'de görüldüğü üzere klempler aracılığıyla matriksler reaktör haznesine sabitlenip yerleştirilmiştir. Bağlantı noktaları aracılığı ile gerginlik ve çalışma uzunluğu ayarlanmıştır. Reaktör üst kapağında bulunan büyük deliklere yerleştirilen aparatlar ve hidrofobik filtreler aracılığı ile reaktörün havalandırılması yapılmıştır (**Şekil 3.1.f**).



Bilgisayar kontrollü ayarlanabilir sistem



Şekil 3.1. Mekanik, elektriksel ve elektromekanik uyarmı biyoreaktörüne ait şematik görseller (a-b); elektrik uyarmılı biyoreaktör görüntüsü (c); sistem ara yüzü (d); biyoreaktör haznesine yerleştirilmiş fiber matiks (Kırmızı oklar matiks hatlarını göstermektedir.) (e-üst); tam kurulumu yapılmış reaktör haznesi (Lacivert çerçeve matiks hatlarını göstermektedir.) (e-alt); tam kurulumu yapılmış reaktör (f).

Reaktör üst kapağındaki küçük deliklere yerleştirilen iletken vidalara elektrotlar takılarak elektriksel uyarımın gerçekleştirilmesi sağlanmıştır (**Şekil 3.1.c**). Elektrotlar ayrıca bir güç ünitesinin pozitif ve eksi kutuplarına bağlanmış, böylece güç ünitesinden voltaj ve akım ayarları yapılabilmektedir. **Şekil 3.1.d**'de sisteme ait parametrelerin ayarlanabildiği ara yüz görüntüsü verilmiştir. Ara yüz aracılığı ile mekanik uyarım için; çekme (veya bırakma) ve dinlenme hızı, miktarı ve süresi ayarlanmıştır. Bununla beraber elektriksel uyarım için; hangi aşamada elektriksel uyarım verileceği, hangi frekansta verileceği, atım süresi, voltaj ve akım gibi değerler de ayarlanabilmektedir. Yazılıma bilgiler tanıtıldıktan sonra reaktör programlandığı süre ve miktarda çalıştırılmıştır.

3.7. Biyoreaktörde Hücre Kültürü Öncesi Çalışmalar

Biyoreaktörde hücre kültürü çalışmalarına başlamadan önce literatürden derlenen mekanik ve elektriksel uyarım parametreleri hizalı P3HB/PBA fiber matriksler üzerinde denenerek, iskelet kası farklılaşmasında malzeme açısından en önemli parametreler olan mekanik ve morfolojik özellikler üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu bağlamda ilk aşamada mekanik ve elektrik uyarımlı reaktör çalışma koşulları belirlenerek dinamik hücre kültürü çalışmalarına geçilmiştir. Ön denemelerde test edilen mekanik ve elektriksel uyarım parametreleri **Çizelge 3.5**'te verilmiştir.

Çizelge 3.5. Biyoreaktörde hücre kültürü çalışmalarından önce test edilen mekanik ve elektriksel uyarım koşulları.

Mekanik uyarım koşulları				
Gerinim (%)	Frekans (Hz)	Çekme süresi	Dinlenme süresi	Toplam süre
15	0,5, 1 ve 2	6 sa	18 sa	7 gün
15	0,5, 1 ve 2	1 sa	5 sa	7 gün
15	0,5, 1 ve 2	20 dk	2 sa	7 gün
15	2	20 dk	2 sa	14 gün*
Elektriksel uyarım koşulları				
Atım periyodu (ms)	Voltaj (V)	Atım süresi	Dinlenme süresi	Toplam süre
6	0,4	20 dk	2 sa	7 gün
6	1,2	20 dk	2sa	7 gün

*Matrikslere 7 gün boyunca mekanik uyarım uygulamadan önce 7 gün boyunca PBS'te bekletilmişlerdir.

3.7.1. Mekanik ve Elektrik Uyarımlı Biyoreaktör Çalışma Koşullarının Belirlenmesi

İskelet kası doku mühendisliği çalışmalarında kullanılan mekanik uyarım parametreleri üzerine ortak bir görüş bulunmamaktadır. Bu nedenle yapılan literatür taramasından sonra Maleiner ve arkadaşlarının derleme makalesi temel alınarak ön denemeler için kullanılacak parametreler belirlenmiştir [11]. Temel mekanik uyarım parametreleri arasında gerinim, frekans, çekme-dinlenme süresi ve toplam uygulama süresi bulunmaktadır. İskelet kası doku mühendisliği mekanik uyarım çalışmalarında maksimum gerinim miktarı %15 olarak ve maksimum frekans 2 Hz olarak belirlenmiştir. Bu bağlamda malzemenin dayanabileceği maksimum koşulları test edebilmek amacıyla **Çizelge 3.5**'teki parametreler seçilmiştir.

Örnekler (1 cm × 5 cm boyutlarında) reaktöre yerleştirildikten sonra haznelere 25 mL PBS ilave edilmiş ve hücre kültürü ortam koşullarının taklit edilebilmesi amacıyla reaktör 37°C etüvde tutulmuştur. Yedi gün sonunda örnekler reaktörden alınarak mekanik ve morfolojik özellikleri belirlenmiştir. Ek olarak, ayrı bir deneysel grupta örnekler 7 günlük biyoreaktör uygulamasından önce 7 gün boyunca statik koşullarda PBS içinde bekletilmiştir.

Temel elektriksel uyarım parametreleri arasında voltaj, atım periyodu, atım-dinlenme süresi ve toplam uygulama süresi bulunmaktadır. Literatürdeki voltaj değerleri iskele uzunluğu baz alınarak mm başına düşen voltaj değeri üzerinden hesaplanmıştır [11]. Ancak bu çalışmada, maksimum ve minimum uygulama voltajları fiber matriks uzunluğu, kas dokusu motor birimi ve maksimum/minimum aksiyon potansiyeli değerleri üzerinden hesaplanarak belirlenmiştir. Matriksler 5 cm uzunluğunda kesilerek reaktöre yerleştirilmiştir. Matrikslerin reaktöre sabitlenmesi amacıyla kullanılan klempler için iskeleden 2 cm pay verilmesi gerekmiştir. Bu durumda çalışma uzunluğu 3 cm olmuştur. Kas doku motor ünitesi ise yaklaşık 3-10 kas fiberinden oluşmaktadır (ortalama 5 fiber, yaklaşık uzunluk 50-55 µm) [27]. Çalışma uzunluğu 3 cm olan bir örnekte %5 gerinim 750 µm yer değiştirmeye yol açmaktadır. Böylece her bir %5'lik çekme döngüsünde teorik olarak ≈14 kasılan motor birim bulunmaktadır. İskelet kası aksiyon potansiyeli grafikleri incelendiğinde motor birim başına membran potansiyeli maksimum 30 mV değerini alırken, minimum -90 mV değerini aldığı görülmektedir [142]. Kasılan 14 motor birim göz önünde bulundurulduğunda, çalışma uzunluğu 3 cm ise minimum voltaj değerinin yaklaşık 0,4 V; maksimum voltaj değerinin ise yaklaşık 1,2 V olması gerektiği hesaplanmıştır. Atım-dinlenme süresi, çalışmalar arasında korelasyon ve eşgüdüm

sağlamak amacıyla, mekanik uyarım çalışmalarından elde edilen en uygun parametreye göre revize edilmiştir. Atım periyodu ise aksiyon potansiyeli eğrilerindeki maksimum değere göre belirlenmiştir. Bu bağlamda malzemenin dayanabileceği maksimum koşulları test edebilmek amacıyla **Çizelge 3.5**'te verilen parametreler seçilmiştir. Reaktöre örnekler (1 cm × 5 cm) yerleştirildikten sonra haznelere 25 mL PBS ilave edilmiş ve hücre kültürü ortam koşullarının taklit edilebilmesi amacıyla reaktör 37°C inkübatörde tutulmuştur. Yedi gün sonunda örnekler reaktörden alınarak mekanik ve morfolojik özelliklerinin tayini gerçekleştirilmiştir.

3.7.2. Uyarımın Mekanik Özelliklere Etkisi

Çizelge 3.5'te belirtilen koşullarda mekanik ve elektriksel uyarıma maruz bırakılmış matrikslerin uygulama sonrası mekanik özellikleri çekme testleri ile belirlenmiştir. Analizler Bölüm 3.4.6'da verilen protokol ile, analiz öncesinde PBS içerisinde bekletme aşaması uygulanmadan, gerçekleştirilmiştir. Çekme dayanımı başlangıç değerine göre %25'in altında azalma gösteren veya başlangıç değerine göre artış gösteren parametreler ile hücre kültürü çalışmalarına devam edilmiştir.

3.7.3. Uyarımın Morfolojik Özelliklere Etkisi

Çizelge 3.5'te belirtilen koşullarda mekanik ve elektriksel uyarıma maruz bırakılmış matrikslerin uygulama sonrası morfolojik özellikleri SEM analizi ile belirlenmiştir. Analiz Bölüm 3.4.3.1'de verilen protokol ile gerçekleştirilmiştir. Mekanik ve elektriksel uyarım sonrasında hizalanmış fiber yapısı korunmuş gruplara ait parametreler ile hücre kültürü çalışmalarına devam edilmiştir.

3.8. Biyoreaktör Koşullarında Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültürü öncesi çalışmalar ile devam edilmesine karar verilen mekanik ve elektriksel uyarım parametreleri biyoreaktör çalışmalarına yön vermiştir. Böylelikle hizalı P3HB/PBA nanofiber matrikslere en uygun, aynı zamanda literatür ve iskelet kası dokusu ile uyumlu parametreler belirlenmiştir. Reaktörde hücre kültür çalışmaları iki aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir. İlk aşama Faz 1 analizler olarak, ikinci aşama Faz 2 analizler olarak adlandırılmıştır. Hücre kültüründe Faz 1 ve 2 analizlerde kullanılan gruplar **Çizelge 3.6**'da verilmiştir. Faz 1 analizlerde, hücre canlılığı ve hücre morfolojisi incelenerek deney grubu sayısı azaltılmıştır. Faz 2 analizlerde ise ön denemelerdeki analizlere ek olarak, seçilen grupların mekanik özellikleri, miyojenik gen ifadeleri ve

miyojenik belirteçleri incelenerek skorumla yöntemi ile miyojenik farklılaşmayı en iyi destekleyen gruba karar verilmiştir.

Çizelge 3.6. Hücre kültürü biyoreaktör çalışmalarında kullanılan ön ve ileri analiz grupları, grup kısaltmaları ve analizler.

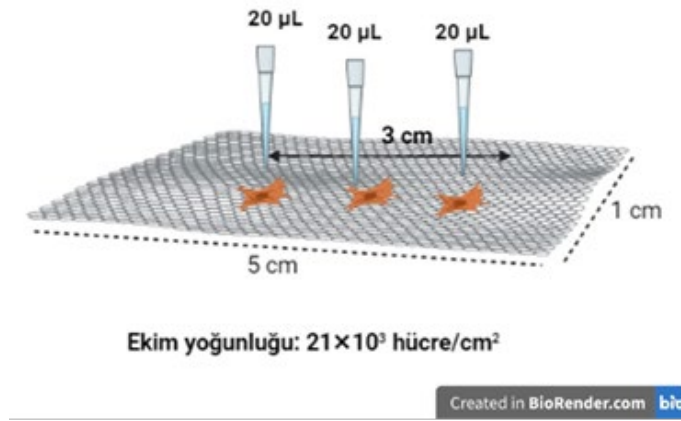
Kısaltmalar		Analizler				
S-7	Statik kültür – 7. Gün	Faz 1*-2**				
S-14	Statik kültür – 14. Gün	Faz 1-2				
Mekanik uyarımlı biyoreaktör – 14. Gün						
	Uygulama süresi	Gerinim (%)	Frekans (Hz)			
M-D1	20 dk çekme 2 sa dinlenme	5	0,5	Faz 1-2		
M-D2	20 dk çekme 2 sa dinlenme	5	1	Faz 1		
M-D3	20 dk çekme 2 sa dinlenme	10	0,5	Faz 1-2		
M-D4	1 sa çekme 5 sa dinlenme	5	0,5	Faz 1		
M-D5	1 sa çekme 5 sa dinlenme	10	0,5	Faz 1		
Elektrik uyarımlı biyoreaktör – 14. Gün						
	Uygulama süresi	Voltaj (V)	Atım periyodu (ms)			
E-D1	20 dk atım 2 sa dinlenme	0,4	6	Faz 1-2		
E-D2	20 dk atım 2 sa dinlenme	0,4	2	Faz 1-2		
Elektromekanik uyarımlı biyoreaktör – 14. Gün						
	Uygulama süresi	Gerinim (%)	Frekans (Hz)	Voltaj (V)	Periyot (ms)	
EM-D	20 dk/2 sa	5	0,5	0,4	2	Faz 1-2

*Faz 1 analizler: MTT, SEM ve F-aktin/DAPI boyama.

**Faz 2 analizler: Mekanik analizler, RT-qPCR, İmmünohistokimyasal boyama.

Biyoreaktör çalışmaları öncesinde fiber matrisler 1 cm × 5 cm boyutlarında kesilmiştir. Sterilizasyon amacıyla %70 etanolde (v/v) 1 sa boyunca bekletilmiş, steril DPBS ile yıkanmış ve ardından laminer kabin içerisinde her iki yüzü 30 dk boyunca UV ışımaya maruz bırakılmıştır. Kültür çalışmaları boyunca büyüme ortamı olarak %10 FBS, %2 L-glutamin ve %0,5 P/S içeren RPMI 1640; farklılaşma ortamı olarak %2 HS, %2 L-glutamin ve 0,5 P/S içeren RPMI-1640 kullanılmıştır. Sterilizasyon işleminden sonra

hücre ekimi cm^2 başına $2,1 \times 10^4$ hücre olacak şekilde **Şekil 3.2**'de gösterildiği gibi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.2. Biyoreaktör çalışmalarında hücre ekimi.

Örnekler 6-gözlü bakteriyolojik kültür kaplarında kültüre edilmiş olup, ekimden sonra 3. günde örnekler üzerindeki büyüme ortamı uzaklaştırılarak farklılaşma ortamı eklenmiştir. Kültürün 7. gününde statik kültürden alınan örnekler reaktöre yerleştirilmiş ve mekanik uyarım başlatılmıştır. Yedi gün boyunca mekanik uyarıya maruz kalan örnekler kültürün 14. gününde reaktörden dikkatlice uzaklaştırılarak analizlere tabii tutulmuştur (**Şekil 3.3**). Kontrol grubu olarak $1 \text{ cm} \times 5 \text{ cm}$ fiber matriksler bakteriyolojik 6-gözlü plakalarda statik olarak kültüre edilmiş, kültürün 7. ve 14. günlerinde ortamdaki uzaklaştırılarak ilgili analizler gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.3. Biyoreaktörde hücre kültürü için çalışma planlaması.

3.8.1. Mekanik Uyarımlı Biyoreaktör Çalışmaları

Hücre kültürü öncesi yapılan mekanik uyarımlı biyoreaktör çalışmaları sonrasında gerçekleştirilen mekanik ve morfolojik analizler ile deney grubu sayısı 5'e indirgenmiştir (**Çizelge 3.6**). Ayrıca, hizalanmış P3HB/PBA nanofiber matrikslerin belirli parametreler içinde en yüksek gerinime (%15) dayandığı belirlenmiştir. Hücre kültürü çalışmalarında

özellikle kas dokusuna daha yakın olan %5 ve %10 gerinim değerleri kullanılmıştır. Faz 1 analizlerde hücre canlılığı ve hücre morfolojisi incelenerek deney grubu sayısı skorlama yöntemi ile 2'ye indirgenmiştir. Faz 2 analizlerde, Faz 1'deki analizlere ek olarak, 2 grubun mekanik özellikleri, miyojenik gen ifadeleri ve miyojenik belirteçleri incelenerek skorlama yöntemi ile miyojenik farklılaşmayı en iyi destekleyen gruba karar verilmiştir.

3.8.2. Elektrik Uyarımlı Biyoreaktör Çalışmaları

Hücre kültürü öncesi yapılan elektrik uyarımlı biyoreaktör çalışmalarında aksiyon potansiyeli eğrisindeki maksimum atım periyodu değeri kullanılmıştır. Bu denemeler sonrasında gerçekleştirilen mekanik ve morfolojik analizler ile en uygun voltaja karar verilmiştir. Belirlenen uygun voltaja göre, iskelet kas dokusu aksiyon potansiyeli eğrilerinde belirtilen minimum atım periyodu (2 ms) da eklendiğinde, deney grubu sayısı 2'ye indirgenmiştir (**Çizelge 3.6**). Faz 1 analizlerde hücre canlılığı ve hücre morfolojisi skorlama yöntemi ile incelenerek, her iki grubun da Faz 2 analizlere taşınması gerektiğine karar verilmiştir. Faz 2 analizlerde, Faz 1'deki analizlere ek olarak, 2 grubun mekanik özellikleri, miyojenik gen ifadeleri ve miyojenik belirteçleri incelenerek skorlama yöntemi ile miyojenik farklılaşmayı en iyi destekleyen gruba karar verilmiştir.

3.8.3. Elektromekanik Uyarımlı Biyoreaktör Çalışmaları

Mekanik ve elektriksel uyarımlı biyoreaktör çalışma koşullarına karar verildikten sonra her iki çalışmadan çıkan en iyi veriler birleştirilerek elektromekanik uyarımlı biyoreaktör çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Elektromekanik uyarımlı biyoreaktör çalışmalarında kullanılan parametreler **Çizelge 3.6**'da verilmiştir. Faz 1 analizlerde hücre canlılığı ve morfolojisi incelenmiş, Faz 2 analizlerde mekanik özellikler, gen ifadeleri ve belirteçleri tespit edilmiştir.

3.9. Biyoreaktör Çalışmalarına Ait Hücre Kültürü Analizleri

Hücre kültürü analizleri, hücre canlılığının ve morfolojisinin belirlenmesini, matriks/hücre kompleksinin mekanik özelliklerinin tayin edilmesini, miyojenik gen ifadelerinin ve miyojenik belirteçlerin araştırılmasını kapsamaktadır. Analizler öncesinde, statik kültürün 7. ve 14. günlerinde ve dinamik kültürün 14. gününde matriksler kültür kaplarından alınmış ve diseksiyon makası ile 1 cm × 1 cm boyutlarında kesilerek 24-gözlü kültür kaplarına aktarılmıştır.

3.9.1. Hücre Canlılığının Belirlenmesi

Hızalı P3HB/PBA nanofiber matriksler üzerindeki C2C12 fare miyoblast hücrelerinin statik ve dinamik kültürde mitokondriyal aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla Bölüm 3.5.1.2’de verilen protokole uygun olarak MTT analizi gerçekleştirilmiştir.

3.9.2. Hücre Morfolojisi

Hızalı P3HB/PBA nanofiber matriksler üzerindeki C2C12 hücrelerinin statik ve dinamik kültürdeki morfolojilerinin belirlenmesi amacıyla SEM ve hücre iskeleti/çekirdeği boyama analizleri gerçekleştirilmiştir. SEM analizi Bölüm 3.6.4-ii’de verilen protokole uygun olarak yapılmıştır. Matriksler üzerindeki hücrelerin statik ve dinamik kültürde iskeleti ve çekirdeği Alexa Fluor 488 konjuge anti F-aktin antikor/4',6-diamidino-2-fenilindol, dihidroklorür (DAPI) boyaması ile tespit edilmiştir. Analiz Bölüm 3.5.1-iii’de verilen protokole göre gerçekleştirilmiştir. Statik kültür örnekleri floresan mikroskop ile görüntülenirken, dinamik kültür örnekleri konfokal mikroskop ile görüntülenmiştir.

3.9.3. Mekanik Özelliklerin Belirlenmesi

Statik kültürün 7. ve 14. günlerinde, dinamik kültürün 14. gününde matrikslerin mekanik özelliklerindeki değişimin belirlenebilmesi için çekme mekanik analizi yapılmıştır. Matriksler kesilmeden orijinal boyutları (1 cm × 5 cm) ile analize tabii tutulmuşlardır. Analizler Bölüm 3.4.6’da verilen protokol ile, analiz öncesinde PBS içerisinde bekletme aşaması uygulanmadan, gerçekleştirilmiştir.

3.9.4. Miyojenik Gen İfadeleri

Statik kültürün 7. ve 14. günlerinde, dinamik kültürün 14. gününde hızalı P3HB/PBA nanofiber matriksler üzerindeki C2C12 hücrelerinin gen ifadelerinin belirlenmesi amacıyla RT-qPCR analizi Bölüm 3.6.4.3’te verilen protokol ile gerçekleştirilmiştir. Belirtilen protokolden farklı olarak RT-qPCR analizi Viia7 Real-Time PCR (Applied Biosystems, ABD) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Ek olarak miyojenik maturasyon ve nöromusküler bağlantı noktalarının belirteçleri olan NF-H ve AChR- α gen ifadeleri de araştırılmıştır. Analiz için kullanılan primerler ve yapışma sıcaklıkları (T_a) **Çizelge 3.7**’de listelenmektedir.

Çizelge 3.7. Biyoreaktör çalışmalarına ait RT-qPCR analizinde kullanılan primerler ve yapışma sıcaklıkları.

Gen	Forward 5' -3'	Reverse 5' -3'	T _a
MyoD	CTGGTTCTTCACGCCCAAA	TAGGACAGACTTCTGCTCTTCC	55°C
Myogenin	CCATGGTGCCCAAGTGAAT	AAATGATCTCCTGGGTTGGG	53°C
MHC	AGAACAAGGACCCACTGAAC	CACTACTTGCCTCTGCTTCA	53°C
NF-H (mNefh)	CTCCCAAAAATCCCTCCAT	TCACCCGGATCTCTTCTGTC	54°C
AChR- α (Chrna1)	CTTAACCAGCCTGGTGTCTACC	GCTCCACAATGACCAGAAGGAAC	59°C

3.9.5. Miyojenik Belirteçler

Statik kültürün 7. ve 14. günlerinde, dinamik kültürün 14. gününde hizalı P3HB/PBA nanofiber matrisler üzerindeki C2C12 hücrelerinin MyoD, Myogenin ve MHC belirteçlerinin incelenmesi amacıyla immünohistokimyasal boyama analizleri gerçekleştirilmiştir. Analizler Bölüm 3.6.4.4'te verilen protokole uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Statik kültür örnekleri floresan mikroskop ile görüntülenirken, dinamik kültür örnekleri konfokal mikroskop ile görüntülenmiştir.

3.10. İstatistiksel Analiz

GraphPad InStat yazılımı (ABD) kullanılarak istatistiksel analizler yapılmıştır. Tüm analiz verileri mekanik analizler için üç defa, diğer analizler için dört defa tekrar edilen deneyin ortalama \pm standart sapması ile birlikte verilmiştir. Gruplar arasındaki anlamlı farkları değerlendirmek için Tek Yönlü ANOVA yöntemi Tukey–Kramer post hoc testiyle birlikte ve çift yönlü Student's t-test kullanılmış, p değerlerinin 0,05'ten küçük olduğu durumlar anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

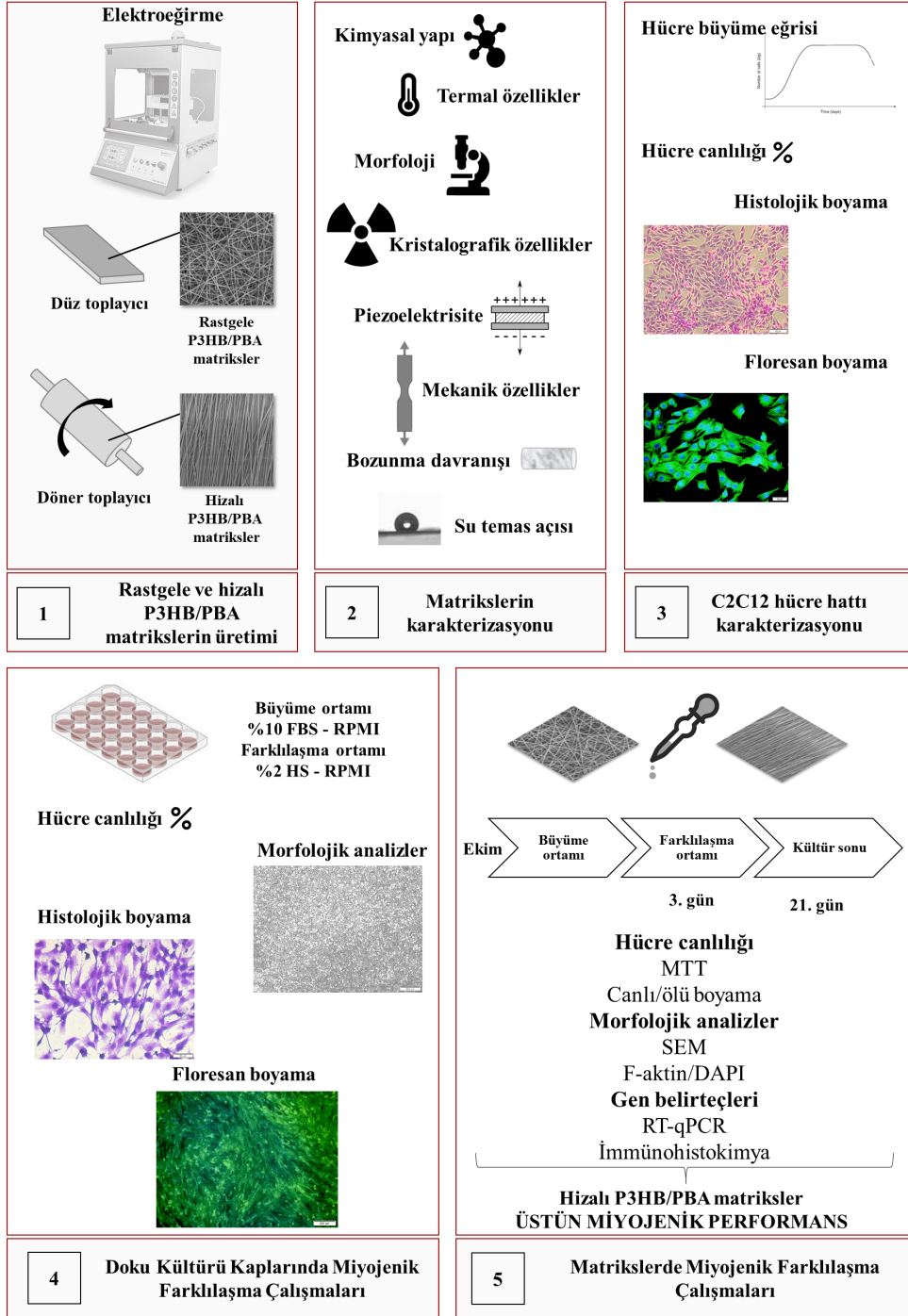
İskelet kasını tüm özellikleri ile taklit edebilen bir biyomalzemeyi geliştirmeyi amaçlayan tez çalışması iki kısımda gerçekleştirilmiştir. İlk kısımda rastgele ve hizalı P3HB/PBA fiber matrisler elektroğirme yöntemi ile üretilmiş ve karakterize edilmiştir. Ardından C2C12 fare miyoblast hücre hattı ile miyojenik uyumlulukları ve miyojenik farklılaşma kapasiteleri statik hücre kültüründe incelenmiştir. İkinci kısımda miyojenik farklılaşmayı başarılı bir şekilde destekleyen hizalı P3HB/PBA fiber matrisler ile mekanik, elektrik ve elektromekanik uyarımlı biyoreaktörde dinamik hücre kültürü koşullarında miyojenik olgunlaşma çalışmaları yürütülmüş ve fonksiyonel iskelet kası dokusu oluşumu çeşitli analizler ile incelenmiştir. Tez çalışmasının birinci ve ikinci kısımlarına ait sonuçlar ve tartışmalar aşağıda detayları ile verilmiştir.

KISIM I

İskelet kası doku mühendisliği çalışmaları, iskelet kas dokusu hücrel süreçlerinin aydınlatılması ile hızlanmıştır. Ancak, malzeme temelli iskelet kası doku mühendisliğinde önemli gelişmeler olmasına rağmen, henüz doğal dokuyu tam olarak taklit edebilen bir malzeme geliştirilememiştir. İskelet kası doku mühendisliğinde, miyoblastların istenildiği gibi miyotüplere farklılaştırılmaması ve farklılaşmış miyotüplerin uygun yoğunlukta hizalanmaması temel problemlerdir. Ek olarak, miyoblastlar miyotüplere farklılaştırılsa bile, yetersiz substrat özellikleri nedeniyle miyotüplerin yüzeyden ayrılması da önemli bir problem teşkil etmektedir [7].

İskelet kasını morfolojik olarak başarı ile taklit edebilmek için fiber morfolojisinde iskelelerin üretimi önemlidir. Bu bağlamda fibröz matrislerin üretimi için sıklıkla elektroğirme yöntemi kullanılmaktadır [1]. P3HB polimeri kimyasal ve elektriksel özellikleri nedeniyle elektroğirme yöntemi ile fiber üretimine uygun bir polimerdir [13]. Bununla beraber yüksek molekül ağırlığına sahip olan P3HB'nin mekanik dayanımı oldukça yüksektir [13]. P3HB'nin bu özellikleri ile iskelet kası için gerekli olan yüksek çekme dayanımı ve elastik modül değerlerini karşılayabileceği öngörülmüştür. Ancak P3HB'nin elastik özellikleri sınırlıdır. Bu nedenle daha elastik zincirlere sahip olan, ancak diğer poliamitlere kıyasla yüksek mekanik dayanıma sahip PBA polimeri ile katkılanarak P3HB'nin elastikiyeti artırılabilen ve katkılama oranı değiştirilerek elastikiyeti ayarlanabilmektedir [13]. Ayrıca P3HB piezoelektrisite gösteren bir

polimerdir [130-135]. İskelet kasının elektriksel özelliklerini, P3HB'nin pasif elektriksel (piezoelektrik) özellikleri ile hücrelerin mekanotransdüksiyon yollarını uyararak, taklit edebilme potansiyeli vardır. Ek olarak aminoasit benzeri bir zincire sahip olan PBA katkılanması ile hücre tutunmasının, hücre yayılmasının ve hücre farklılaşmasının desteklenebileceği düşünülmüştür. P3HB'ye benzer şekilde PBA polimeri de elektrik alanında zincir yönelimleri gösterebildiğinden elektroegirme yöntemi ile fiber üretiminde başarılı olmaktadır [13]. Her iki polimer de sarmal yapıda benzer geometrilere sahiptir. Ayrıca P3HB ve PBA arasında hidrojen bağları kurulabilmektedir. Bu nedenle her iki polimer arasında bir uyum bulunmaktadır [13]. İskelet kası doku mühendisliğindeki problemlere çözüm üretmek amacıyla tez çalışmasının bu ilk kısmında, üstün morfolojik, mekanik, kimyasal ve piezoelektrik özelliklere sahip PBA katkılı P3HB nanofiber matrisler geliştirilmiştir. **Şekil 4.1**'de Kısım I çalışmalarına ait akış özetlenmiştir.

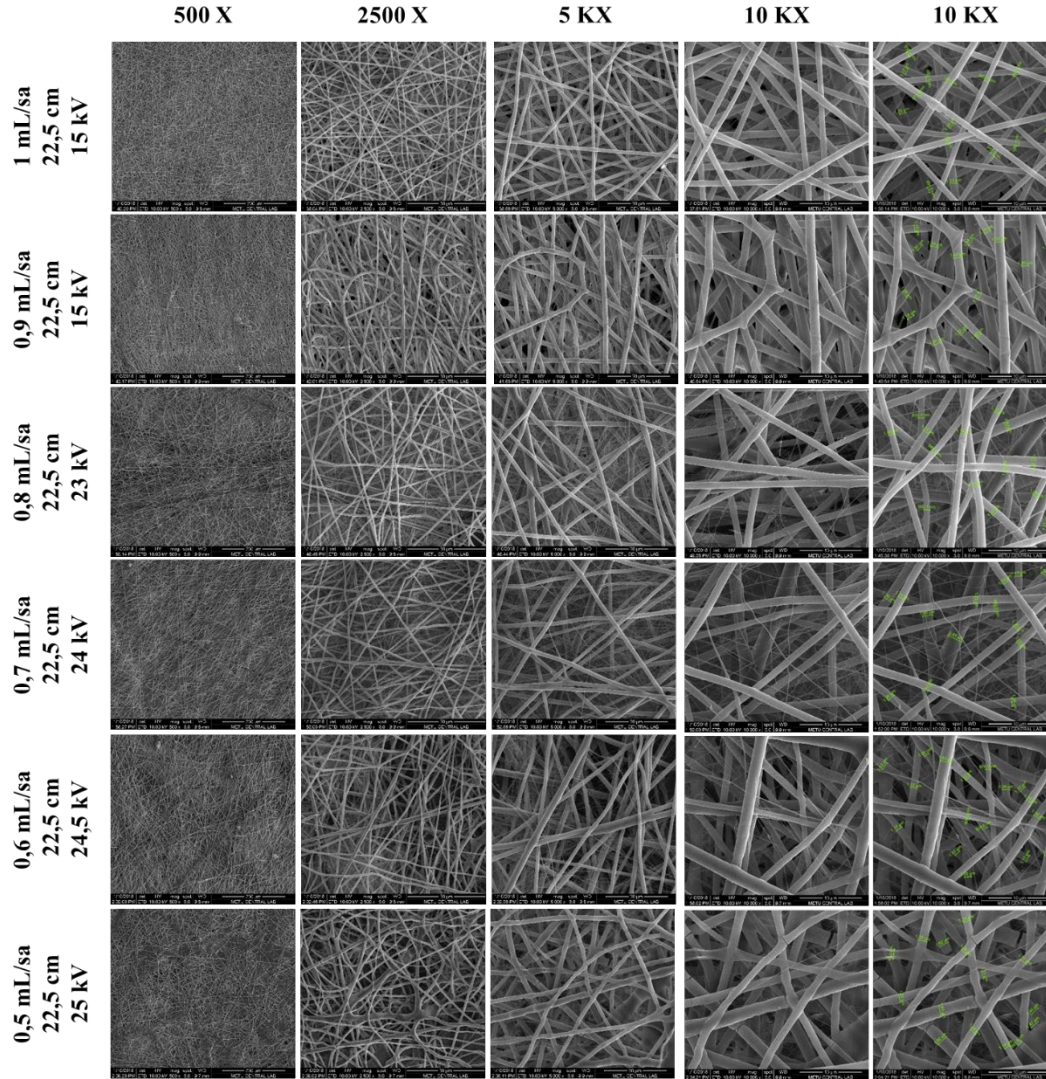


Şekil 4.1. Tez çalışmasının ilk kısmına ait akış şeması.

4.1. Elektroegirme Koşulları

2017 yılında tamamlanan çalışmamızdan farklı olarak, tez çalışmasında P3HB oranı %5 (w/v)'e düşürülmüş ve PBA, P3HB'ye %20 (w/w) oranında katılmıştır [13]. Egirme işlemindeki sürücü gücün viskozite olduğu göz önüne alınmış ve PBA oranının artırılmasının polimer çözeltisinin viskozitesinde önemli bir değişiklik yaratmadığı gözlemlenmiştir.

Viskoz polimer çözeltilerinin eğrilmesinde diğer temel parametre akış hızıdır. Akış hızı artırıldığında polimer zincirleri daha rahat hareket ederek elektriksel alanda daha kolay fiber formuna dönüşürler [143]. Bu nedenle akış hızı değerleri değiştirilerek rastgele fiber morfolojisindeki ve fiber çapındaki değişimler izlenmiştir. Rastgele fiberlerin morfolojisi SEM analizi ile incelenmiş ve SEM fotoğrafları **Şekil 4.2**'de verilmiştir.



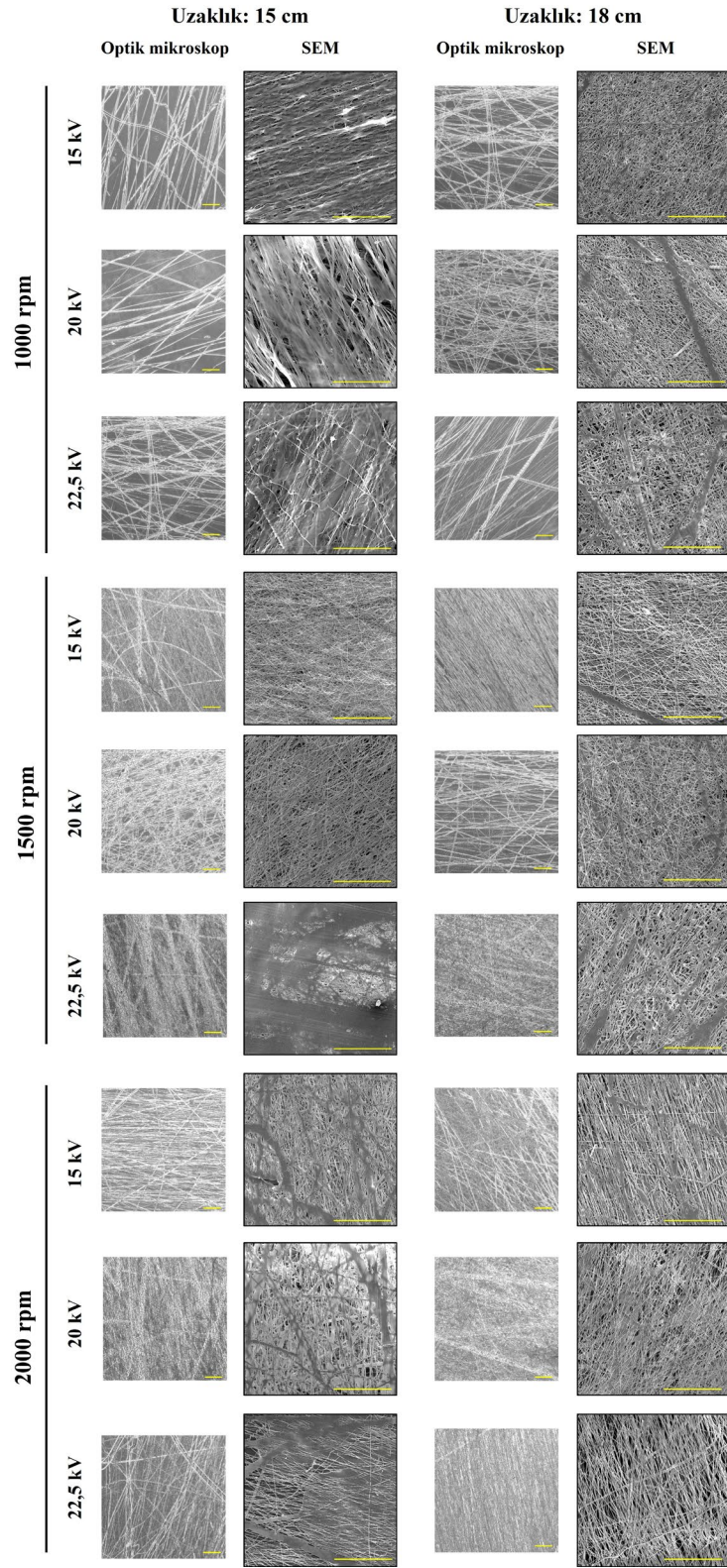
Şekil 4.2. Sabit iğne ucu-toplayıcı uzaklığında (22,5 cm), değişen akış hızları (0,5 – 1,0 mL/sa aralığında) ve voltajlarda (15 – 25 kV aralığında) elde edilen rastgele P3HB/PBA fiberlerin farklı büyütmelerdeki SEM fotoğrafları.

Elektroeğirme sırasında akış hızı 0,8 mL/sa değerinin altına düştüğünde polimer çözeltisinin eğrilmesinin zorlaştığı, Taylor konisi oluşumunun gerçekleşmediği görülmüştür. Akış hızı düşürüldüğünde voltaj artırılarak fiberlerin daha rahat eğrilmesi sağlanmaya çalışılmıştır. P3HB oldukça yüksek molekül ağırlığına (yaklaşık 300 kDa)

sahip doğal bir polimer olduğundan, %5 (w/v) oranında P3HB içeren bir çözelti hazırlandığında dahi çözelti viskoz olmaktadır. Polimer çözeltisinin viskozitesi arttıkça, elektroğirme aşamasında elektriksel alanın yenmesi gereken sıvı yüzey gerilimi de artmaktadır. Bu durumda P3HB/PBA çözeltisindeki temel fiber oluşum parametresi voltajdır [144]. Ayrıca, literatürde kullanılan polimerlerden beklenenin aksine, akış hızı düştükçe fiber çapları azalmamış, artmıştır [143]. Bunun en önemli nedeni birim zamanda elektriksel alana giren P3HB miktarının artması ve daha fazla piezoelektrik özellikteki polimer zincirinin elektrik alana maruz kalması ve bunun sonucunda polimer zincirlerinin belirli bir düzene girmesidir. Düzenli şekilde elektriksel alanda dizilen polimer zincirleri fiber çapında azalmaya yol açmıştır. Bu deneme sonucunda rastgele fiberlerin üretiminde akış hızının 1 mL/sa olarak sabit tutulmasına karar verilmiştir. Daha yüksek akış hızlarına malzeme kaybını önlemek için çıkılmamıştır. Rastgele P3HB/PBA fiber matrikslerin üretimi için en uygun elektroğirme parametreleri olarak, 1 mL/sa akış hızı, 22,5 cm iğne ucu-toplayıcı uzaklığı ve 15 kV voltaj seçilmiştir.

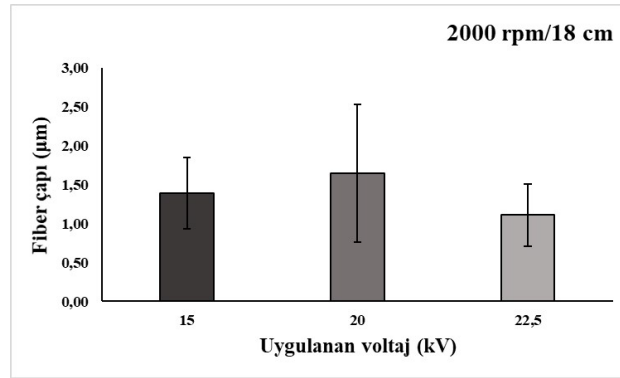
Şekil 4.2'deki SEM fotoğraflarının son kolonunda verilen 10 KX büyütmelede SEM cihazının yazılımı kullanılarak fiber çapları tespit edilmiştir. Akış hızının azalması fiber çapında önemli bir değişikliğe neden olmamıştır. Tüm fotoğraflarda fiber çapları 800 nm ile 1100 nm arasında değişmektedir. Fiber çapındaki minimal düşüşün iki nedeni olabilir. Birincisi, katkılama polimeri olan PBA'nın düşük molekül ağırlığı (40 kDa) nedeniyle elektriksel alanın sıvı yüzey gerilimini kolaylıkla yenmiş olabilmesidir. PBA ve P3HB polimer zincirleri birbiri ile elektrostatik etkileşime girerek sarmal haline gelmiş ve elektriksel alan tarafından çekilerek daha küçük çapta fiber oluşumuna neden olmuş olabilir [13]. İkincisi ise NE300 elektroğirme cihazında toplayıcı ve şırınga yere göre dikey pozisyonudur. Bu durumda yüzey gerilimi, elektriksel alan ve yer çekimi kuvvetleri bir arada değerlendirilmelidir. Elektriksel alan bir yandan sıvı yüzey gerilimini yenerken bir yandan da yer çekimine karşı iş yapmaktadır. Yani polimer birden fazla kuvvet tarafından çekilmektedir. Bu nedenle fiber çapında düşüş meydana gelmiş olabilir. Rastgele fiber üretiminde akış hızı, uzaklık ve voltaj parametreleri değiştirilirken, hizalı fiber üretiminde bu parametrelere ek olarak toplayıcı dönüş hızı da katılmaktadır. Hizalı morfolojideki fiberlerin oluşabilmesi için döner toplayıcı hızının minimum 500 rpm olması gerekmektedir [143]. Bu nedenle ilk denemeler için dönüş hızı 1000 rpm olarak seçilmiştir. Buradaki temel amaç mevcut polimer ve sistem ile hizalı morfolojide fiber elde edilip edilemediğini test etmektir. Elektroğirme cihazında hizalı fiberlerin

eğrilmesinde P3HB polimeri için optimum voltaj aralığının 15 kV ile 22,5 kV arasında olduğu görülmüştür. Bin rpm, 1500 rpm ve 2000 rpm olmak üzere 3 farklı hızda döner toplayıcı hızı denenmiştir. Ayrıca toplayıcı-iğne ucu mesafesi, daha önceki çalışmalar da göz önünde bulundurularak, 15 cm ve 18 cm olarak iki farklı uzaklıkta sabit tutulmuştur. **Şekil 4.3**'te 1000 rpm, 1500 rpm ve 2000 rpm dönüş hızlarında elde edilen hizalı fiberlerin optik mikroskop ve SEM fotoğrafları verilmiştir.



Şekil 4.3. 1 mL/sa sabit akış hızında, farklı toplayıcı dönüş hızı, uzaklık ve voltajlarda elde edilen hizalı P3HB/PBA fiberlerin optik mikroskop (10 X) ve SEM fotoğrafları (500 X) (sarı ölçek barları: 200 µm).

Bin rpm ve 1500 rpm toplayıcı dönüş hızlarında hizalı fiber üretimi gerçekleştirilememiştir. Daha yüksek toplayıcı dönüş hızı olan 2000 rpm’de daha hizalı morfolojide fiber üretimi gerçekleştirilebilse de fiberlerin hala istenilen hizalanmaya sahip olmadığı görülmektedir. Ayrıca tüm toplayıcı dönüş hızlarında, 15 cm iğne ucu-toplayıcı mesafesinde fiber formunun bozulduğu, fiberlerin birbirine yapıştığı ve daha yayvan bir morfolojide olduğu tespit edilmiştir. Bunun nedeni elektroegirme aşamasında çözücünün uçması için gerekli olan mesafenin yeterli olmayışı olabilir. Çözücü yeteri miktarda buharlaşmadığından fiberler yapıda kalan çözücü ile birbirine yapışmış olabilir. Bu nedenle bir sonraki aşamada iğne ucu-toplayıcı mesafesi arttırılmıştır. İğne ucu-toplayıcı mesafesi 18 cm olduğu durumda daha hizalı morfolojide fiberler elde edilmiştir. Bu uzaklıkta elde edilen fiberlerin boyut analizi SEM fotoğrafları üzerinden her gruba ait 3 fotoğraf ve her fotoğraftan 75 veri kullanılarak ImageJ yazılımı ile yapılmıştır. **Şekil 4.4**’te analiz sonucunda elde edilen çap değerleri verilmiştir.



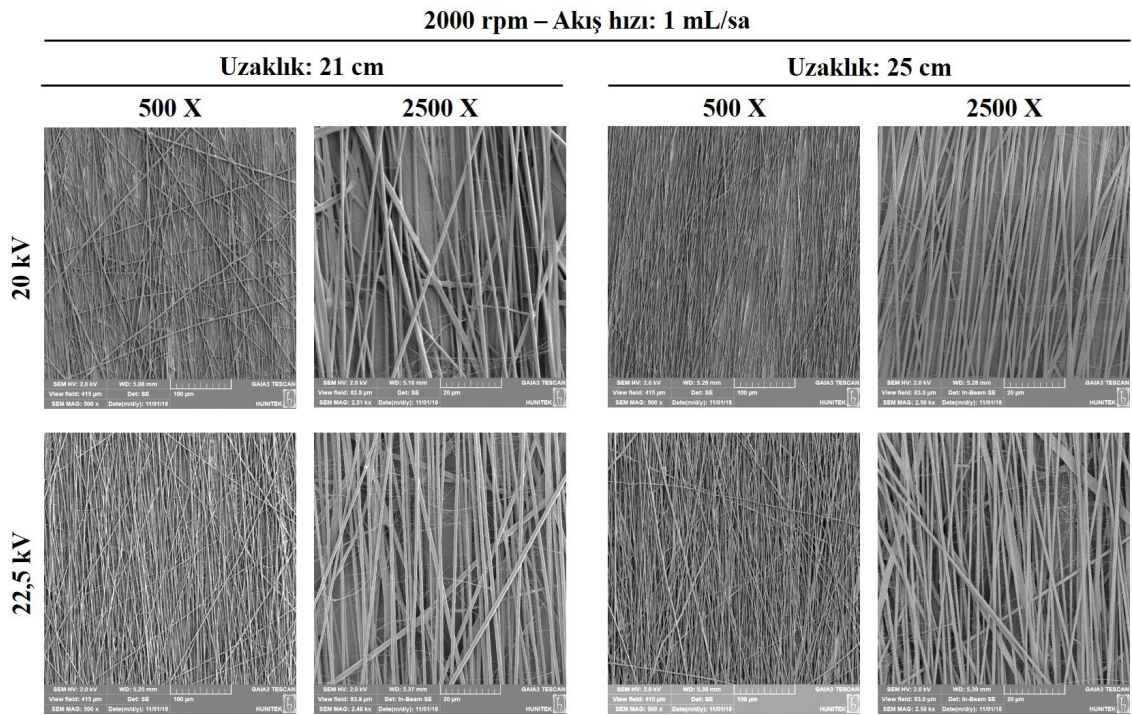
Şekil 4.4. 1 mL/sa akış hızı, 2000 rpm toplayıcı dönüş hızı ve 18 cm toplayıcı-iğne ucu uzaklığı sabitken farklı voltajlarda elde edilen hizalı P3HB/PBA fiberlerin çap değerleri.

On beş kV voltaj değerinde çap ortalaması $1.38 \pm 0.46 \mu\text{m}$, 20 kV voltaj değerinde çap ortalaması $1.64 \pm 0.88 \mu\text{m}$, 22,5 kV voltaj değerinde çap ortalaması $1.10 \pm 0.40 \mu\text{m}$ olarak bulunmuştur. İstatistiksel olarak çap değerlerinde anlamlı bir farklılık görülmemiştir. İğne ucu-toplayıcı mesafesi arttırılarak daha düzenli bir fiber morfolojisi elde edilebileceği öngörülmüştür.

Tüm bunlara ek olarak, aynı parametre gruplarına ait optik mikroskop ve SEM görüntüleri karşılaştırıldığında fiber morfolojilerinde farklılık olduğu görülmektedir. Optik mikroskopta görüntüleme yapmak amacıyla toplama işlemi lam üzerine yaklaşık 2 dk süreyle yapılmıştır. SEM analizi için ise 30 dk süreyle toplama işlemi yapılmıştır. Uzun süreli toplama işleminde üst üste toplanan fiber miktarı arttıkça uzaklığın yetersiz

gelmesi ile birlikte fiberlerin oluşturduğu katmanlar çözücünün buharlaşmasını zorlaştırmış ve fiber morfolojisi daha da bozulmuştur. Ayrıca P3HB piezoelektrik bir polimer olduğundan bir araya gelen fiberler mekanik ve elektriksel etkiye maruz kaldıkça morfolojik olarak değişimler gösterebilmektedir [13]. Görüntüler arasındaki farklılığın temel nedenleri bunlardır.

Akış hızı 1 mL/sa, toplayıcı dönüş hızı 2000 rpm olarak sabit tutulup; iğne ucu-toplayıcı mesafesi 21 ve 25 cm değerlerine artırılarak, 20 ve 22,5 kV voltajda denemeler yapılmıştır. Elde edilen fiberlerin morfolojileri SEM analizi ile incelenmiştir. Şekil 4.5'te üretilen hizalı fiberlere ait SEM fotoğrafları verilmiştir.



Şekil 4.5. 1 mL/sa akış hızı ve 2000 rpm toplayıcı dönüş hızı sabit olmak üzere, farklı uzaklık ve voltajlarda elde edilen hizalı fiberlerin SEM fotoğrafları.

Tüm parametrelerde hizalı fiber üretimi gerçekleştirilebilmiştir. Ancak 25 cm iğne ucu-toplayıcı mesafesi ve 20 kV voltaj koşullarında üretilen fiberlerin diğerlerine göre çok daha düzenli bir yapı oluşturduğu tespit edilmiştir. Ayrıca diğer gruplarda fiberler arasında elektriksel alanın kararsızlığından kaynaklanan ağsı yapılar bulunurken, bahsedilen parametrelerde üretilen fiberlerde bu yapıların çok daha az olduğu görülmüştür. Bu nedenle hizalı P3HB/PBA fiber matrikslerin, 1 mL/sa akış hızı, 2000 rpm toplayıcı dönüş hızı, 25 cm toplayıcı-iğne ucu uzaklığı ve 20 kV voltaj parametrelerinde üretilmesine karar verilmiştir.

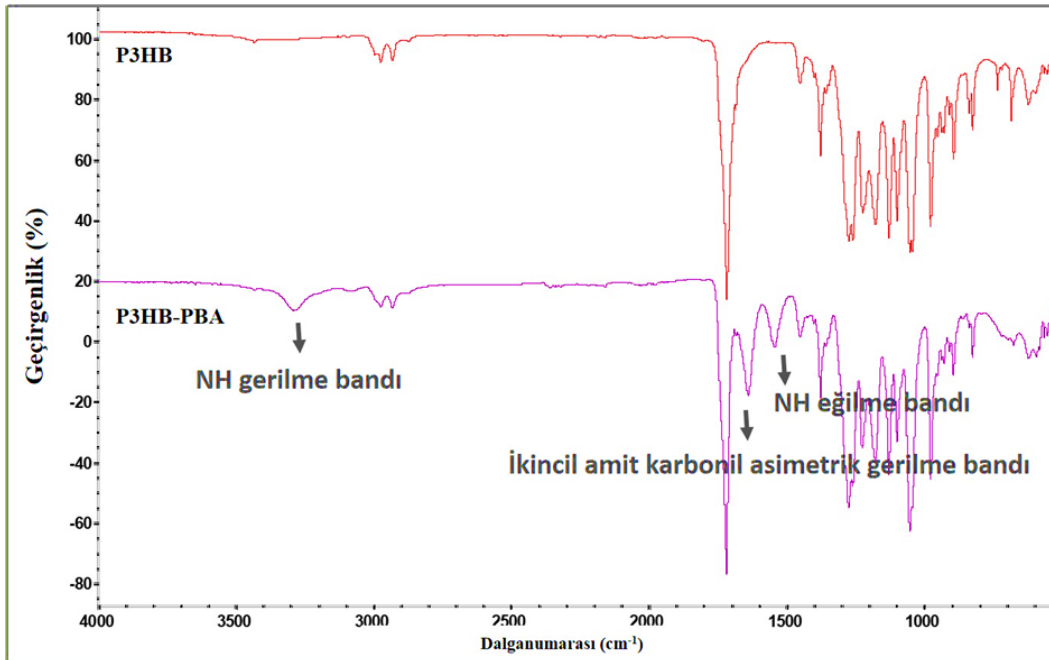
4.2. Matrislerin Karakterizasyonu

Rastgele ve hizalı P3HB/PBA fiber matrislerin kimyasal yapıları, termal, morfolojik, mekanik ve piezoelektrik özellikleri belirlenmiştir. Ek olarak hidrolitik/enzimatik bozunma davranışları ve su temas açıları da incelenmiştir.

4.2.1. Kimyasal Yapı Karakterizasyonu

4.2.1.1. FTIR

P3HB polimerine PBA katkılanmasının başarı ile gerçekleştirildiğini tespit edebilmek amacıyla üretilen fiber matrislerin kimyasal yapı karakterizasyonu ATR-FTIR analizi ile gerçekleştirilmiştir. P3HB fiber matrise ve PBA katkılanmış P3HB fiber matrise ait FTIR spektrumları Şekil 4.6'da verilmiştir.



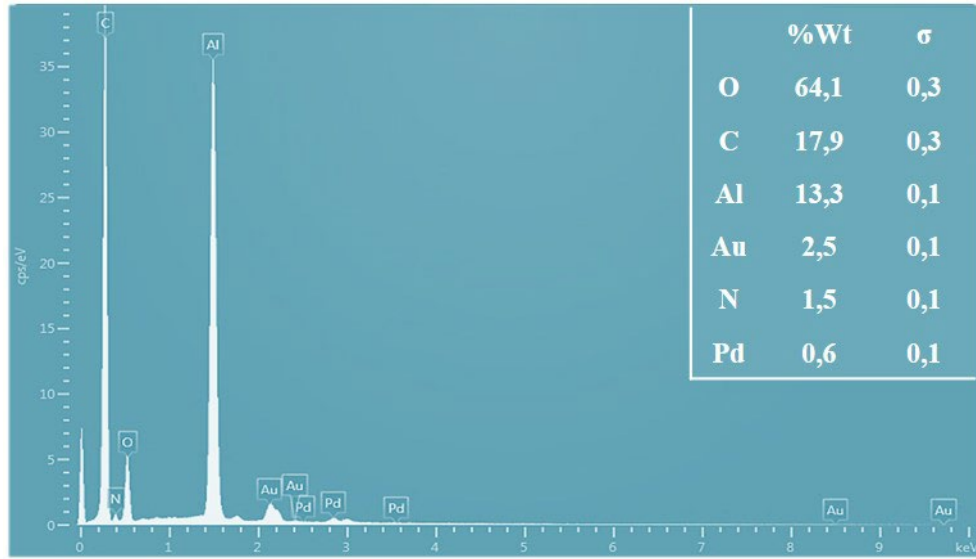
Şekil 4.6. P3HB ve P3HB/PBA fiber matrislere ait FTIR spektrumları.

P3HB/PBA matrislerine ait FTIR spektrumunda yer alan NH gerilme bandı (3291 cm^{-1}), ikincil amit karbonil asimetrik gerilme bandı (1640 cm^{-1}) ve NH eğilme bandı (1544 cm^{-1}) PBA'nın yapıdaki varlığına işaret etmektedir [13, 140]. P3HB helikal formda, PBA ise β heliks formunda bir polimerdir. Bu nedenle aralarında geometrik bir uyum vardır. Bununla birlikte her iki polimerin zincirleri arasında hidrofobik ve hidrofilik etkileşimlerden dolayı elektrostatik bir çekim kuvveti olduğu da söylenebilmektedir. Ayrıca P3HB'nin karbonil grubu ile PBA'nın amit grubu arasında potansiyel bir hidrojen

bağı bulunmaktadır. İkincil amit karboksil asimetrik gerilme bandı (1640 cm^{-1}), P3HB ve PBA arasında hidrojen bağlarının kurulduğunu desteklemektedir.

4.2.1.2. EDX

P3HB polimerine PBA katkılmasının başarı ile gerçekleştirildiğini tespit edebilmek amacıyla üretilen fiber matrislerin kimyasal karakterizasyonu FTIR analizine ek olarak EDX analizi ile de gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.7’de PBA katkılanmış P3HB polimerine ait EDX spektrumu verilmiştir.



Şekil 4.7. P3HB/PBA fiber matrislere ait EDX spektrumu.

Spektrum incelendiğinde, karbon (C), oksijen (O), azot (N), alüminyum (Al), altın (Au) ve paladyum (Pd) elementlerine ait pikler görülmektedir. EDX cihazı SEM cihazına entegre olduğundan SEM cihazı ile görüntüleme sonrasında EDX analizi yapılmıştır. SEM analizi öncesinde örnekler altın/paladyum kaplanmıştır. Yapıdaki altın ve paladyum elementlerinin varlığı bu şekilde açıklanabilmektedir. Alüminyum elementinin kaynağı ise elektroçirme işlemi sırasında fiberlerin toplandığı alttaştır. Örnekler alüminyum alttaştan ayrılmadan analiz yapılmıştır. Azot elementinin yapıdaki varlığı ise PBA polimerinin P3HB polimerine başarı ile katkılındığının bir göstergesidir. Şekil 4.7’de sağ üstte verilen kütlece değerler normalize edilmemiş değerlerdir. Değerler altın, paladyum ve alüminyum elementleri çıkarılıp normalize edildiğinde, azot oranı kütlece 1,8 olmaktadır. PBA polimerinin P3HB’ye oranla kütlece %20 oranında katkılındığı ve P3HB polimerinin de çözeltide kütlece %5 oranında bulunduğu göz önünde

bulundurulduğunda yapıdaki azotun toplam kütleyle oranının oldukça az olması beklenen bir sonuçtur.

4.2.1.3. Elementel analiz

FTIR ve EDX analizlerine ek olarak fiber matrisler için elementel analiz de yapılmıştır.

Çizelge 4.1'de P3HB ve PBA katkılanmış P3HB fiber matrislere ait elementel analiz sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4.1. P3HB ve P3HB/PBA fiber matrislerin elementel analiz sonuçları.

Element (%)	P3HB matrisler	P3HB/PBA matrisler
C	57,5 ± 0,5	58,9 ± 4,6
N	0,4 ± 0,1	3,2 ± 0,1
O	33,0 ± 1,1	28,3 ± 5,7
H	6,9 ± 0,2	7,1 ± 0,6

P3HB matrislerinin %57,5 oranında karbon, %33,0 oranında oksijen, %6,9 oranında hidrojen ve %0,4 oranında azot elementlerini içerdiği belirlenmiştir. P3HB polimeri ise teorik olarak, %55,8 oranında karbon, %37,2 oranında oksijen ve %7,02 oranında hidrojen içermektedir [145]. P3HB matrislerin elementel analizinde tespit edilen azotun varlığı kontaminasyona bağlanmaktadır. P3HB/PBA matrisler ise %58,9 oranında karbon, %28,3 oranında oksijen, %7,1 oranında hidrojen ve %3,2 oranında azot elementleri içermektedir. Protein benzeri bir polimer olan PBA, yapısında azot atomları barındırmaktadır. P3HB/PBA matrislerde artış gösteren azot içeriği, PBA katkılanmasının başarı ile gerçekleştiğini göstermektedir [146].

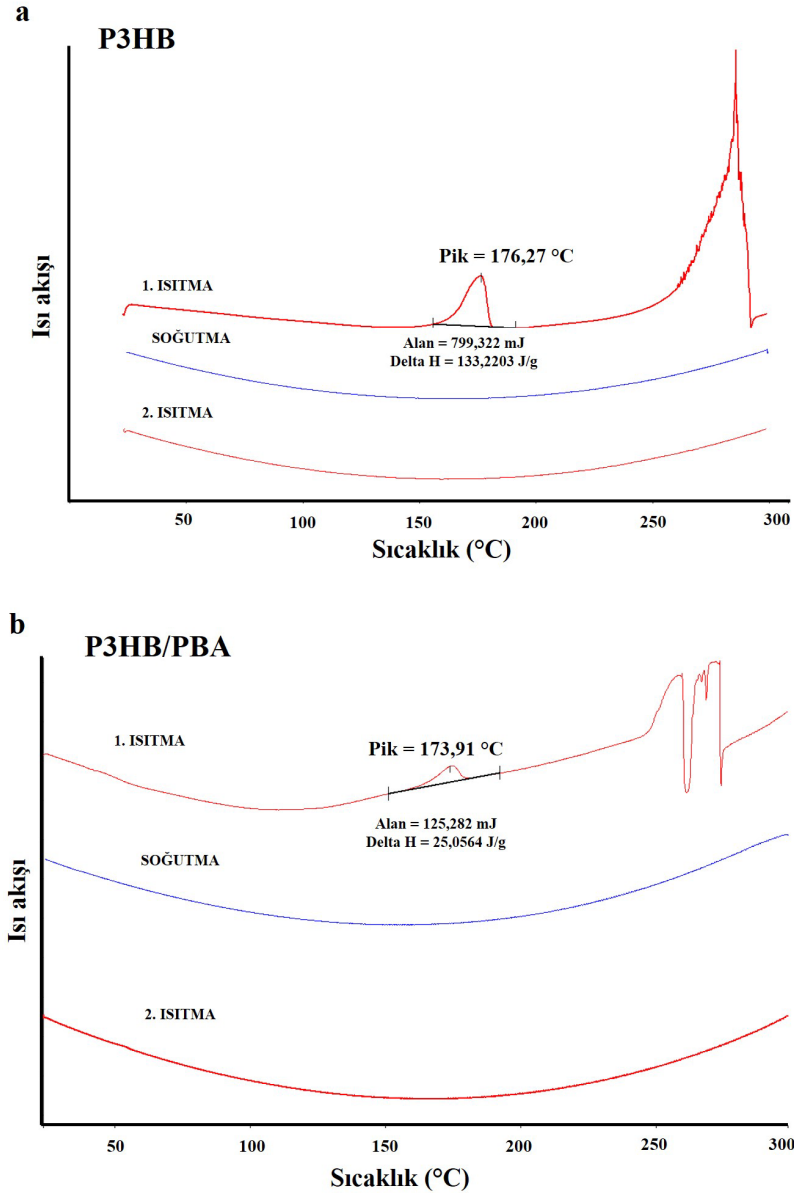
4.2.2. Termal Karakterizasyon

4.2.2.1. DSC

PBA katkılanmasının, P3HB polimerinin termal özelliklerindeki etkisinin araştırılması amacıyla DSC analizi gerçekleştirilmiştir. P3HB ve P3HB/PBA matrislerin DSC termogramları sırasıyla **Şekil 4.8.a** ve **Şekil 4.8.b**'de verilmiştir.

Termoplastik polimerlerin molekül ağırlığı arttıkça erime sıcaklığı (T_m) artar. Bu nedenle, yaklaşık 300 kDa molekül ağırlığına sahip P3HB'nin yüksek bir T_m 'ye sahip olması beklenir [117]. P3HB'nin literatürde belirtilen T_m değeri 179 °C'dir [90]. Sadece P3HB içeren fiberlerin T_m değeri ise literatürden farklı olarak 176 °C bulunmuştur.

Elektroegirme için hazırlanan çözelti 80 °C sıcaklıkta karıştırılmaktadır. Bu işlem ile zincirler bir miktar kırılmakta, kristalinite düşmektedir. Kristalinitedeki düşüşle beraber erime sıcaklığında düşüş gözlemlenmiştir.



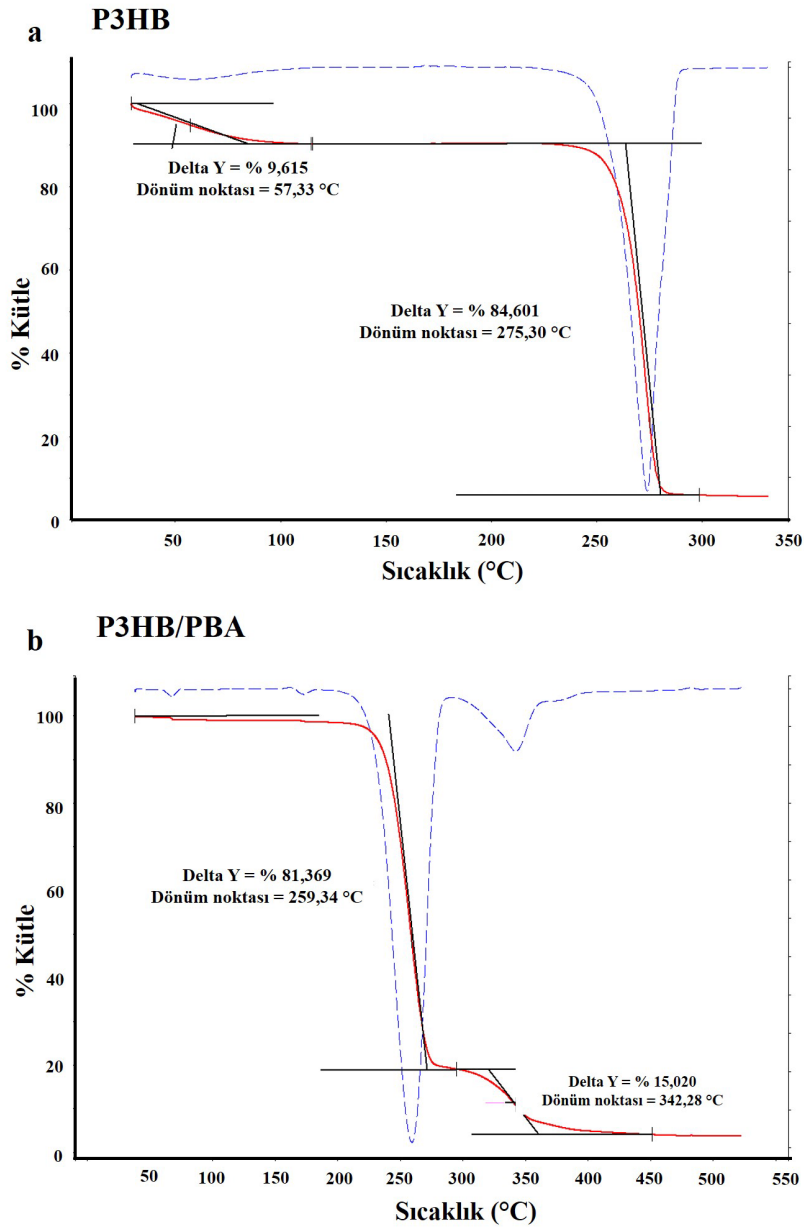
Şekil 4.8. P3HB (a) ve P3HB/PBA (b) fiber matrislere ait DSC termogramları.

PBA ile katkılanan P3HB'nin T_m değeri ise yaklaşık 173 °C olarak belirlenmiştir. Moleküller arasında kurulan ikincil bağlar kristaliniteyi etkiledikleri için erime sıcaklığını değiştirebilir. Zincirdeki dallanmalar polimer zincirlerinin daha az yoğunlukta paketlenmesine neden olur. Yapıdaki ikincil bağlar arttıkça polimerin kristalinitesi azalacağından erime noktası düşer [147]. P3HB ile PBA arasında kurulan ikincil bağlar (hidrojen bağları) kimyasal analizler ile kanıtlanmıştır. Hidrojen bağlarının kurulması ile

P3HB'nin erime noktasının düştüğü belirlenmiştir. Hem yüksek sıcaklıkta karıştırma işleminin hem de PBA ile katkılama işleminin polimerin kristalinitesini düşürdüğü söylenebilir.

4.2.2.2. TGA

PBA katkılamasının, P3HB polimerinin termal özelliklerindeki etkisinin araştırılması amacıyla termogravimetrik analiz gerçekleştirilmiştir. P3HB ve P3HB/PBA matrislerin TGA termogramları sırasıyla Şekil 4.9.a ve Şekil 4.9.b'de verilmiştir.



Şekil 4.9. P3HB (a) ve P3HB/PBA (b) matrislere ait TGA termogramları.

P3HB matrikslerin termal bozunma sıcaklığı (T_d) 275,30 °C olarak belirlenirken, P3HB/PBA matrikslerin bozunma sıcaklığının 259,34 °C ile 342,28 °C arasında olduğu tespit edilmiştir. P3HB/PBA matrikslerin termogramında iki ayrı dönüm noktası belirlenmiştir. İlk dönüm noktasında (259,34 °C), PBA katkılanması, P3HB ve PBA zincirleri arasında hidrojen bağları oluşturarak P3HB'nin termal bozunma sıcaklığını azaltmıştır. PBA'nın bozunma sıcaklığı literatürde yaklaşık 360 °C olarak belirtilmektedir. [140]. İkinci dönüm noktası (342,28 °C) ise PBA polimerinin P3HB/PBA matrikslerde varlığının bir kanıtıdır. Ancak, P3HB ve PBA zincirleri arasında oluşan ikincil bağlar nedeniyle, PBA'nın literatürdeki bozunma sıcaklığına göre, ikinci dönüm noktası sıcaklığında düşüş gözlemlenmiştir.

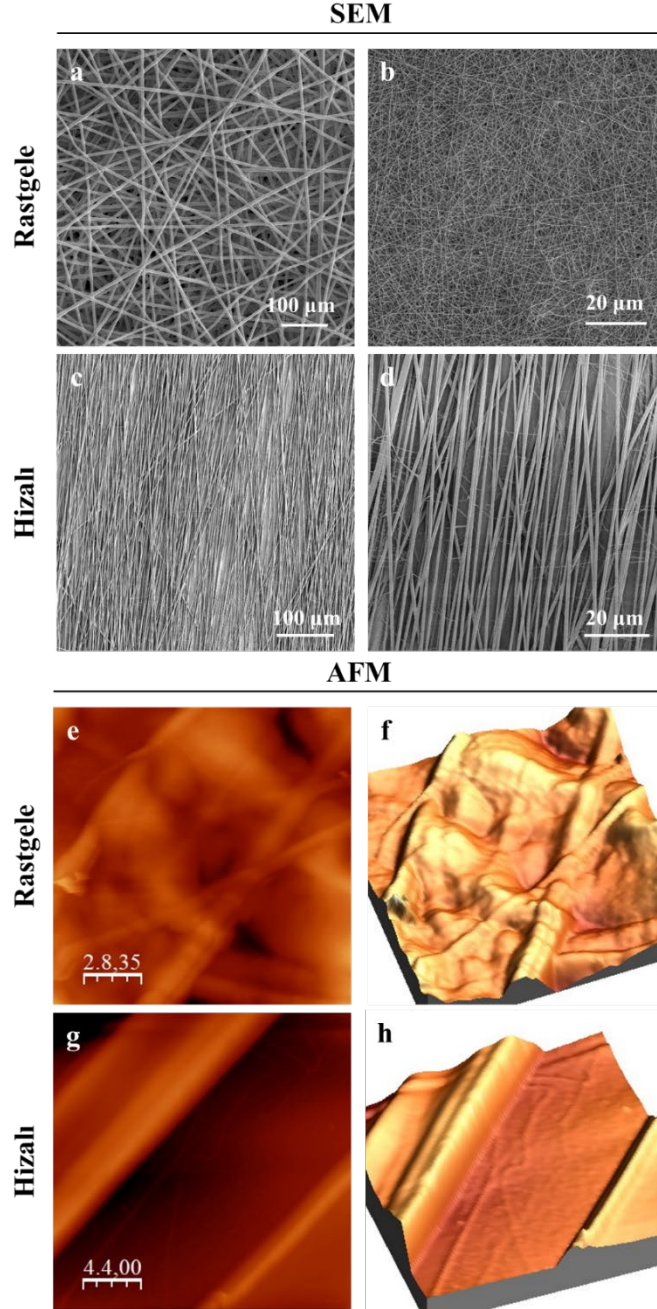
4.2.3. Morfolojik Karakterizasyon

4.2.3.1. SEM

İskelet kas dokusu mühendisliğinde en önemli parametrelerden biri, doku iskelesinin morfolojik özellikleridir. Hücrelerin hizalanması, malzemenin morfolojik özelliklerine doğrudan bağlıdır [44]. Doğal kas yapısındaki miyofibrillerin paralel hizalanması nedeniyle yapay hücre dışı matriksler de paralel yönlendirilmelidir [95]. Huber ve ark. hücrelerin rastgele yönlendirilmiş yüzeylere yetersiz şekilde tutunduğunu, agregatlar oluşturduğunu ve farklılaşmadığını tespit etmişlerdir [7]. Ancak, hücrelerin düzenli topografiye sahip yüzeylere yeterli düzeyde tutunduğunu ve istenen hizalanmada miyotüplere farklılaştığını gözlemlemişlerdir. Bu nedenle tez çalışmasında, hizalamanın hücresel davranış üzerindeki etkisini incelemek amacıyla rastgele ve hizalı yönelimlerde P3HB/PBA fiber matriksler hazırlanmıştır. Rastgele matrikslere ait farklı büyütmelelerdeki SEM fotoğrafları **Şekil 4.10.a** ve **b**'de, hizalı matrikslere ait farklı büyütmelelerdeki SEM fotoğrafları **Şekil 4.10.c** ve **d**'de verilmiştir.

Her iki grupta da boncuksuz ve homojen fiberler elde edilmiştir. Hizalı matrikslerde, doğal kas dokusu morfolojisine benzer homojen ve paralel bir dağılım gözlemlenmiştir. Miyofibriller, düzenli kasılabilen proteinler içeren paralel yönlendirilmiş temel birimlerdir. Miyofibriller genellikle kas yapısına bağlı olarak 1–3 µm çapa sahiptir [15, 16]. İskelet kas dokusu mühendisliğinde başarı, miyofibrilleri taklit etme yeteneği ile yakından ilişkilidir. Fiber çaplarının tespit edilebilmesi amacıyla SEM görüntüleri kullanılmış ve ImageJ yazılımı ile fiber çapları hesaplanmıştır. Rastgele ve hizalı matrikslerin fiber çapları sırasıyla 951 ± 153 nm ve 891 ± 247 nm olarak belirlenmiştir.

Bu değerlerin doğal dokudaki miyofibril çaplarına çok yakın olduğu görülmüştür. Bu bağlamda, hizalı P3HB/PBA nanofiber matrislerin, fiber çaplarının benzerliği ve hizalı yönlenmeleri nedeniyle morfolojik olarak miyofibrilleri başarıyla taklit edebileceği düşünülmüştür.



şekil 4.10. Rastgele (a-b) ve hizalı (c-d) P3HB/PBA fiber matrislerin farklı büyütmelerde SEM fotoğrafları; rastgele (e-f) ve hizalı (g-h) P3HB/PBA fiber matrislerin 2B ve 3B AFM görüntüleri (lek: 2,8 μm (e); 4,4 μm (g)).

4.2.3.2. AFM

Rastgele ve hizalı P3HB/PBA nanofiber matrikslerin AFM görüntüleri sırasıyla **Şekil 4.10.e-f** ve **Şekil 4.10.g-h**'de verilmiştir. Rastgele matrikslerin AFM analizi, örneğin farklı bölgelerinde 5 $\mu\text{m/s}$, 10 $\mu\text{m/s}$ ve 20 $\mu\text{m/s}$ tarama hızları, 45°, 90° ve 135° tarama açıları ile aralıklı temas modunda gerçekleştirilmiştir. Ancak, rastgele matriksler için yalnızca 5 $\mu\text{m/s}$ tarama hızında ve 90° (yüzeye dik) tarama açısında görüntü alınabilmiştir. Hizalı matriksler de rastgele matrikslerle aynı parametreler kullanılarak analiz edilmiştir. Ancak, yalnızca 5 $\mu\text{m/s}$ tarama hızında ve 45° tarama açısında görüntü alınabilmiştir. Literatürde P3HB fiber matrikslerin AFM ile görüntülendiği sadece birkaç çalışma bulunmaktadır ve bu çalışmalarda yüksek çözünürlüklü fiber görüntüleri elde edilememiştir [148-150]. P3HB'nin AFM ile görüntülenmesindeki en büyük problem, P3HB'nin piezoelektrik özellikleri nedeniyle AFM iğnesi ile etkileşime girmesidir [130]. Aralıklı temas modunda, atomlar arasındaki itici ve çekici kuvvetler, P3HB moleküllerinin gerilim farkı üretmesine neden olmaktadır.

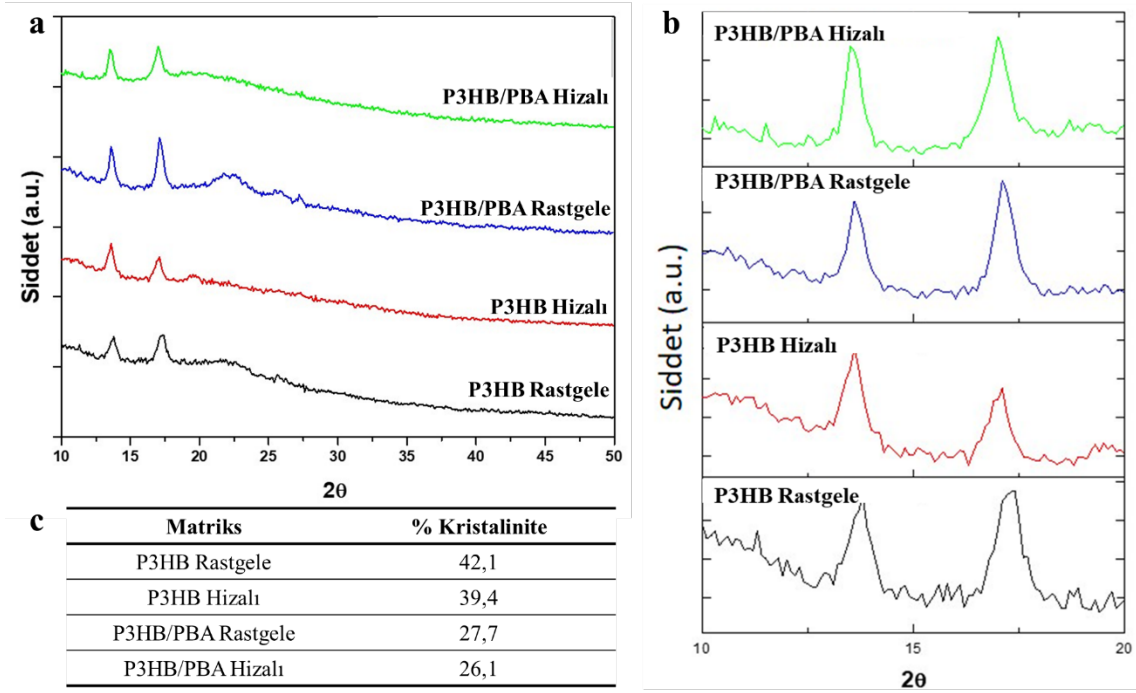
AFM; temas, temassız ve aralıklı temas olmak üzere 3 temel modda çalıştırılabilmektedir. Temas modunda iğne ile yüzey arasındaki atomlar arası kuvvet iticiyken, temassız modda bu kuvvet çekicidir. Aralıklı temas modu (tapping) ise temassız moduna benzemektedir. Ancak konsol temassız modundakinden farklı olarak yüzey üzerinde aralıklarla hafifçe vurma şeklinde hareket eder. Doku mühendisliğinde kullanılan biyomalzemeler için en çok kullanılan mod, aralıklı temas modudur. Bu modda yüzeye mekanik bir kuvvet uygulansa da uygulanan kuvvetin aralıklı olması ve buna ek olarak yan sürtünme kuvvetinin olmaması nedeniyle yüzeydeki hasar azaltılmış olur. Özellikle biyopolimerlerin yüksek çözünürlükte nano ölçekte görüntülenmesi açısından aralıklı temas modu oldukça etkindir [151]. Genellikle aralıklı temas modunda polimerik malzemeye zarar vermemek için AFM iğnesine açı verilmemektedir. Ancak, çalışmada piezoelektrisiteden kaynaklanan zorlukları aşmak için iğne açısı ve buna bağlı olarak AFM iğnesinin yüzeye uzaklığı ve tarama hızı optimize edilmiştir. Tarama hızı, P3HB'nin kristalin bölgelerini daha az uyararak piezo özelliklerinin aktifleşmesini en aza indirmek için düşürülmüştür. Yaşanan bu zorluklar ile, P3HB/PBA matrikslerin morfolojik analizinin yanı sıra, P3HB'nin baskın piezoelektrik özellikleri de vurgulanabilmiştir. Yüksek çözünürlüklü AFM görüntülemesi ile boncuksuz ve homojen morfolojide rastgele ve hizalı fiberlerin varlığı doğrulanmıştır.

Şekil 4.10.g-h'de verilen hizalı fiberlerin hizalanma açılarının birbirine eş olduğu, yükseklik ve çap değerleri bakımından birbirlerine yakın olduğu görülmektedir. **Şekil 4.10.e-f**'de verilen rastgele fiberlerin üst üste binerek farklı yükseklikler oluşturduğu ve buna bağlı olarak görüntülemenin oldukça zorlaştığı söylenebilmektedir. Bununla beraber AFM cihazı sadece üst katmanlardaki fiberleri algılayabildiğinden alt katmanlardaki fiberlerden yalnızca yüksekliği fazla olan fiberler görüntülenebilmiş, alt katmanlardaki fiberlerden doğru sonuç alınamamıştır. Görüntüler SEM analizi ile karşılaştırıldığında sanal değil gerçek görüntülerdir. Bu nedenle AFM analizi sonucunda elde edilen üst katmanlardaki fiberlere ait görüntülerinin topografi, çap ve fiber dağılımı açısından daha gerçekçi sonuçlar verdiği söylenebilmektedir. Rastgele ve hizalı matrikslerin fiber çapları AFM cihazına entegre edilmiş profilometre ile de tespit edilmiştir. Profilometre eğrilerinden Full Width at Half Maximum (FWHM) değerleri analiz edilmiştir. Rastgele fiberlerin çaplarının 700 nm ile 2 µm arasında; hizalı fiber çaplarının 800 nm ile 1,5 µm arasında değiştiği belirlenmiştir. Bu değerler SEM analizi sonucunda ImageJ programı ile elde edilen değerler ile uyuşmaktadır.

4.2.4. Kristalografik Karakterizasyon

P3HB ve PBA katkılı P3HB matrikslerin kristalografik özellikleri XRD analizi ile incelenmiştir. Karşılaştırmalı XRD desenleri ve XRD desenlerinden OriginPro 8.1 yazılımı ile hesaplanmış % kristalinite değerleri **Şekil 4.11**'de verilmiştir.

Şekil 4.11.a ve **Şekil 4.11.b** incelendiğinde doku mühendisliğinde kullanılan diğer polimerlere ait XRD desenlerinden daha farklı bir desen elde edildiği tespit edilmiştir. Polimerler genellikle metal ve seramiklere göre şiddeti oldukça düşük 1 veya 2 kristalin bölge piki verirken, P3HB'ye ait XRD deseninde şiddeti diğer polimerlere göre oldukça yüksek, belirgin 2 kristalin bölge piki ve belirgin olmayan kristalin pikleri görülmektedir. Bu durum P3HB'nin %50'nin üzerinde kristalin bir polimer olmasından kaynaklanmaktadır [152]. Yapılan analiz ile aynı zamanda üretim yönteminin kristaliniteye etkisi de incelenmiştir. Rastgele ve hizalı P3HB matrikslerin kristaliniteleri sırasıyla %42,1 ve %39,4 olarak belirlenmiştir. Rastgele ve hizalı P3HB/PBA matriksler için ise değerler sırasıyla %27,7 ve %26,1 olarak tespit edilmiştir (**Şekil 4.11.c**). Fiberleri rastgele veya hizalı eğirme işlemi kristalin ve amorf bölgelere ait desenlerde değişiklik yaratmıştır. Hizalı fiberlerde hem P3HB'ye ait XRD deseninde hem de PBA katkılı P3HB'ye ait XRD deseninde amorf bölgelerin arttığı, kristalin bölgelere ait piklerin şiddetinde ve pik alanlarında azalma olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.11. Rastgele ve hizalı P3HB ve PBA katkılı P3HB fiber matrislerin XRD desenleri (a), XRD deseninde kristalin bölgeler (b) ve yüzde kristalinite değerleri (c).

Rastgele fiberlere ait XRD desenleri incelendiğinde amorf olması beklenen 2θ değerlerinde yer yer kristalin bölgelerin bulunduğu görülmektedir. Bunun en önemli nedeni eğirme sırasında dizilime gidemeyen kristalin bölgelerin bulunmasıdır. Hizalı eğirme sırasında merkezkaç kuvvetine maruz kalan polimer molekülleri hidrofobik-hidrofilik etkileşimlerden dolayı daha amorf yapıdadırlar. Bu durumu katlanan bir kâğıt ile benzerlik kurarak açıklarsak, düzenli (kristalin) bölgeler merkezkaç kuvveti etkisiyle içeride kalarak katlanırken, düzensiz (amorf) bölgeler dışarı doğru savrulurarak kristal örgüyü bozmaktadır. Yani yapı morfolojik olarak daha düzenli iken elektriksel alan ve merkezkaç kuvvetinin etkisiyle kristalografik özellikleri daha düzensiz ve amorf bir hal almıştır. PBA katkısıyla kristalin özellikleri azaltılmaya çalışılan P3HB'nin, hizalı fiber morfolojisinde eğildiğinde de kristalin özelliklerinin bir miktar daha azaltılabildiği tespit edilmiştir. Kristalin bölgelerin daha detaylı incelenebilmesi amacıyla **Şekil 4.11.b**'de ayrıca örgünün sadece kristalin bölgelerine ait desenler de verilmiştir. Verilen şiddet değerleri indirgenmiş ve normalize edilmiş değerler olsa da karşılaştırma yapmak mümkündür. PBA katkılması ve hizalı eğirmenin kristalin bölgelere ait piklerin şiddet ve genişliklerine etkisi daha net bir biçimde gösterilmektedir. PBA molekülleri elektriksel alanda aminoasitlere benzer şekilde davranış göstererek P3HB moleküllerinin etrafına sarılmaktadır. PBA polimeri, P3HB'ye göre daha amorf bir yapı olduğundan P3HB'nin

kristalinitesi azalmaktadır. PBA katkılması ile P3HB'nin kristalinitesinde önemli derecede azalma meydana geldiği ve bununla beraber hizalı elektroöğirme üretim yönteminin de kristalinite de bir miktar düşüş yarattığı görülmüştür.

4.2.5. Piezoelektrik Özelliklerin Belirlenmesi

Rastgele ve hizalı P3HB ve P3HB/PBA fiber matrikslerin d_{33} piezoelektrik gerinim sabitleri piezometre kullanılarak belirlenmiş ve **Çizelge 4.2**'de verilmiştir. Rastgele ve hizalı P3HB matrikslerin d_{33} piezoelektrik sabiti 5 pC/N olarak ölçülmüştür. Rastgele P3HB/PBA matrikslerin d_{33} piezoelektrik sabiti P3HB matrikslerine benzer şekilde 5 pC/N olarak belirlenirken, hizalı P3HB/PBA matrikslerin d_{33} piezoelektrik sabiti 5,3 pC/N olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.2. Rastgele ve hizalı P3HB ve P3HB/PBA fiber matrikslerin d_{33} piezoelektrik gerinim sabitleri.

Matriks	d_{33} piezoelektrik gerinim sabiti (pC/N)
P3HB Rastgele	5,0
P3HB Hizalı	5,0
P3HB/PBA Rastgele	5,0
P3HB/PBA Hizalı	5,3

Fukada'nın piezoelektrik doğal polimerler üzerine yaptığı bir çalışmada, optikçe aktif ve asimetrik karbon atomu içeren poli- β -hidroksibütirat (PHB) (veya P3HB) polimerinin piezoelektrik özelliklere sahip olabileceği belirtilmiştir [130]. Daha sonra, Fukada ve Ando, PHB ve kopolimerlerinin piezoelektrik özelliklerini araştırdıkları bir çalışmada, PHB'nin kayma piezoelektrisitesi (d_{14}) gösterdiğini belirlemişlerdir [131]. Malmonge ve ark. farklı oranlarda PHB/kurşun zirkonyum titanat karışımlarını içeren filmlerle yaptıkları ölçümlerde PHB polimerinin piezoelektrik sabitini 1.6-2.0 pC/N olarak tespit etmişlerdir [136].

Optikçe aktif ve yarı kristalin biyopolimerler, polipeptitler, polisakkaritler ve polinükleotitler dipol rotasyonlar ile elektriksel polarizasyonlar oluşturarak piezoelektrik özellikler gösterir [130]. Helikal polimerlere çekme kuvveti uygulandığında, kristalin ve kristalin olmayan bölgeler yönelir ve lamellalar arasında düzenli fazlar oluşur [133]. P3HB, asimetrik karbon atomlarına sahip, helikal formda, optikçe aktif, kristalin ve piezoelektrik bir polimerdir. PBA, diğer poliamidlere kıyasla yüksek kristallığe sahip

helikal bir polimerdir [140]. Bu nedenle, PBA polimerinin protein benzeri özellikleri ile elektroğirme işlemi sırasında elektriksel çekme kuvvetine bağlı olarak piezoelektrik özellikler göstereceği düşünülmektedir. Ancak, rastgele ve hizalı P3HB matriksler ile rastgele P3HB/PBA matrikslerin d_{33} piezoelektrik sabitlerinde bir fark tespit edilememiştir. Bununla birlikte, hizalı elektroğirme işlemi sırasında daha elastik PBA zincirlerinin P3HB zincirleri etrafına sarılması ve daha düzenli bir yapı oluşturması nedeniyle hizalı P3HB/PBA matrikslerin d_{33} piezoelektrik sabitinde artış olduğu düşünülmektedir. Hizalı P3HB/PBA matrikslerin mekanik etkiye karşı daha yüksek elektrik polarizasyonları üretebileceği ve bu nedenle piezoelektrik sabitin artabileceği sonucuna varılabilir.

İskelet kas dokusu piezoelektrik özelliklere sahip değildir. Ancak, iskelet kasları doğrudan piezoelektrik özelliklere sahip kemik ve tendonlara bağlıdır. Ek olarak, miyojenik farklılaşma ve maturasyon için elektromekanik uyarıların gerekli olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, iskelet kası doku mühendisliği çalışmalarında piezoelektrik malzemelerin kullanımı araştırılmaktadır. Net yüzey yüküne sahip (yük kutbundan bağımsız olarak) piezoelektrik malzemelerde hücrel sinyalizasyon yollarının aktivasyonu nedeniyle, hücrelerin yüzeye daha kolay tutunduğu, çoğaldığı ve farklılaştığı tespit edilmiştir [91]. Piezoelektrik PVDF filmler ile yapılan bir çalışmada, C2C12 miyoblast hücrelerinin net yüzey yükü nedeniyle daha uzamış bir morfoloji gösterdiği belirlenmiştir [91]. Piezoelektrik rastgele ve hizalı P3HB ve P3HB/PBA fiber matrikslerinin, hücre tutunma, çoğalma, farklılaşma ve maturasyon süreçlerini desteklemesi öngörülmektedir. Ayrıca, daha yüksek piezoelektrik sabite (5,3 pC/N) sahip hizalı P3HB/PBA matrikslerin, rastgele P3HB/PBA matrikslere göre hücrel süreçlerde üstün özellikler sergilemesi beklenmektedir.

4.2.6. Mekanik Özelliklerin Belirlenmesi

Doku iskeleleri, *in vivo* ya da klinik çalışmalarda implantasyon sonrası çeşitli kuvvetlere maruz kalacağı için mekanik olarak dayanıklı olmalıdır. Aynı zamanda iskelelerin manipülasyonunun kolaylaşması için de optimum dayanım değerlerinin belirlenmesi gerekir [11]. Bunun yanında, doku iskeleleri iskelet kası dokusunda kullanılacağından bu dokuya yakın mekanik özellikler sergilemesi beklenmektedir. Ayrıca iskelet kası hücrelerinin farklılaşma davranışlarına mekanik özellikler doğrudan etki etmektedir. Özellikle ikincil farklılaşma aşamasında elastik modülü değerlerinin 12 MPa değerinden yüksek olması, miyotüplerin yüzeye bağlı kalması için öncül bir koşuldur [1]. Bu nedenle

malzemelerin mekanik özelliklerinin incelenmesi oldukça önemlidir. Çekme testlerinde elde edilen sonuçlar **Çizelge 4.3**'te verilmiştir. Çekme dayanımı, kopmadaki uzama ve elastik modül değerleri test sonucu elde edilen gerilim-gerinim (stress-strain) eğrilerinden hesaplanmıştır.

Çizelge 4.3. Rastgele ve hizalı P3HB ve P3HB/PBA fiber matrikslerin mekanik özellikleri.

Matriks	Çekme dayanımı (MPa)	Kopmadaki uzama (%)	Elastik modül (MPa)
P3HB Rastgele	2,3 ± 0,3	23,0 ± 2,7	91,7 ± 10,6
P3HB Hizalı	9,1 ± 0,4	16,4 ± 5,9	295,6 ± 29,3
P3HB/PBA Rastgele	3,9 ± 1,0	124,4 ± 3,3	86,2 ± 10,6
P3HB/PBA Hizalı	8,5 ± 1,8	76,0 ± 1,3	378,2 ± 4,2

P3HB gibi poliesterlerin gerilim-gerinim eğrileri incelendiğinde başlangıçta elastik akma davranışı ve sonrasında plastik şekil değişimi gözlenir. Bu tip polimerlere ait gerilim-gerinim eğrilerinde hasarın meydana geldiği gerilmeye karşılık gelen değer çekme dayanımı olarak adlandırılır. Elastik modülü ise malzemenin kuvvet altında elastik şekil değiştirmesinin bir ölçüsüdür. Yarı kristalin polimerlere ait gerilim-gerinim eğrilerinde üst akma noktasında küçük bir boyun oluşur. Bu boyun bölgesinde, polimer zincirleri gerilme yönünde uzanacak şekilde yönlendirilerek bölgesel dayanım artışına neden olur. Hizalı fiber yapısında tüm fiberler çekme eksenine boyunca yönlendirilmiş iken, rastgele fiberlerde fiberlerin bir kısmı çekme eksenine ile aynı yönde bir kısmı farklı yönlerde dir. Zincir yönlendirilmesi boyun bölgesindeki uzama ile birlikte gerçekleşir. Hizalı matrikslerde, fiberler çekme eksenine boyunca yönlendirildiği için çekme dayanımı ve elastik modül artmıştır. Ayrıca, P3HB zincirlerinin C–O bağlarının hizalı fiber üretim sürecinde elektriksel alanda yönlendirilmesine bağlı olarak elastik modülde artış gözlemlenmiştir [130]. Ek olarak, çekme analizi sırasında zincirlerin yönlendirilme yeteneği ile de elastik modül artmıştır. Benzer şekilde, Ricotti ve ark. rastgele P3HB nanofiber matrikslerin çekme dayanımını $6,3 \pm 1,5$ MPa ve elastik modülünü $184,0 \pm 26,0$ MPa olarak belirlerken; hizalı P3HB nanofiber matrikslerin çekme dayanımı ve elastik modülünün sırasıyla $10,5 \pm 1,1$ MPa ve $277,0 \pm 31,0$ MPa değerlerine yükseldiğini göstermişlerdir [153].

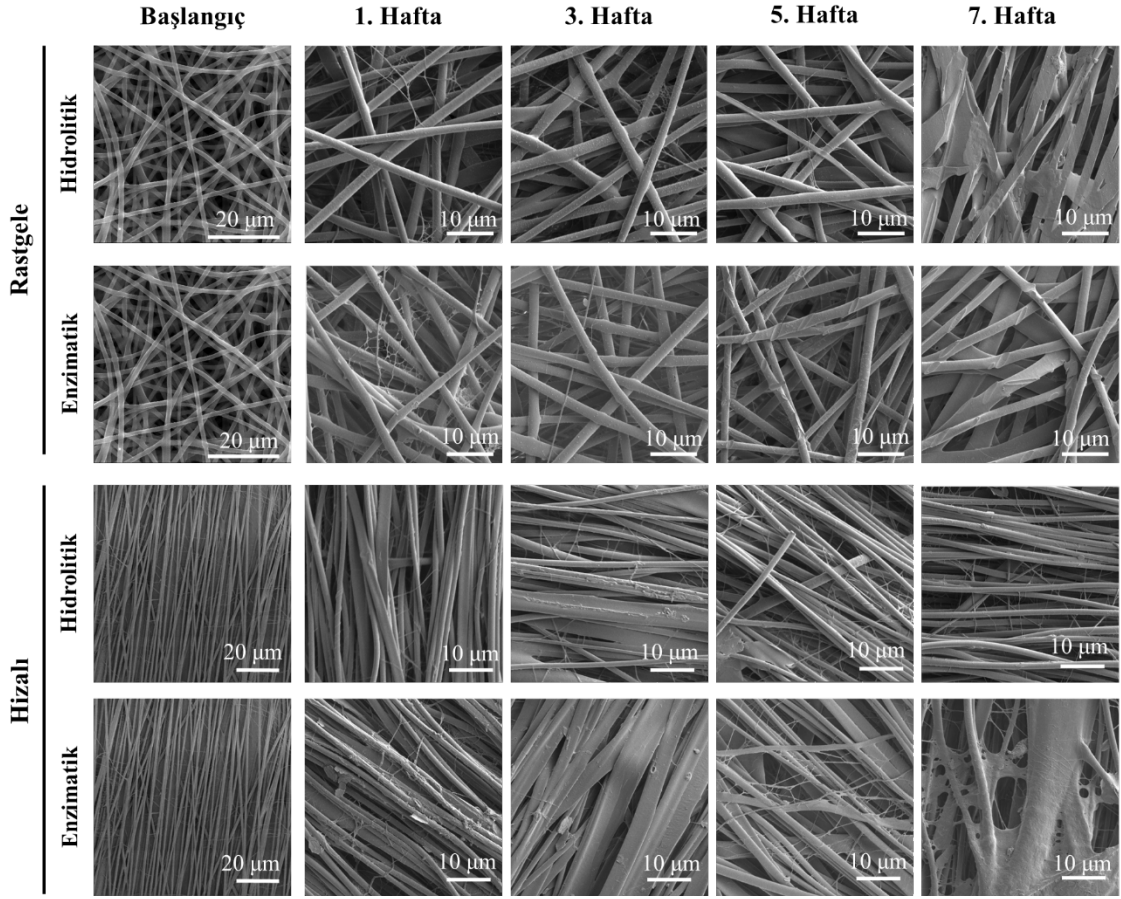
P3HB, kristalinitesinin ve hidrofobitesinin azaltılması, mekanik ve hücrel uyumluluğunun artırılması amacıyla farklı polimerlerle karıştırılmaktadır. Bu amaçla yapılan bir çalışmada P3HB kitosan ile karıştırılmış ve fiber doku iskeleleri elde edilmiştir [154]. Ancak, karışımdaki kitosan oranının artmasıyla çekme dayanımı olumsuz etkilenmiştir. Başka bir çalışmada, poli (L-laktid-ko-ε-kaprolakton) (PLCL) ve P3HB'nin karıştırılmasıyla nanofiber iskeleler hazırlanmış, ancak çekme dayanımında anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir [155]. Daha önceki çalışmamızda, rastgele %5 (w/v) P3HB fiber matrikslerin %10 (w/w) PBA katkılması ile çekme dayanımının 4 MPa'dan 8,2 MPa'ya ve elastik modülünün 152 MPa'dan 290 MPa'ya artış gösterdiği tespit edilmiştir [13].

Polimerlerin birçoğu sferulitlerden oluşan yarı kristal yapıdadır. Sferulitik yapı, çok sayıda merkezden dışa doğru yayılan, kurdele şeklindeki katlanmış zincirler ve lamellerden oluşur. Bu lamelleri birbirinden ayıran bölgeler amorfudur. Komşu lameller amorf bölgenin içinden geçen bağlayıcı zincirlerle birbirine bağlanır. P3HB de yarı kristalin bir polimer olduğundan elastik şekil değişiminin başlangıcı amorf molekül zincirlerinin uygulanan gerilme yönünde hizalanmasıyla başlar. Amorf zincirler, belirli doğrultuda dizilerek uzamaya devam ederken kristal yapıdaki lamellerin arasındaki kuvvetli kovalent bağlarda eğilme ve uzamalar başlar [147]. Protein benzeri bir yapıya sahip olan PBA'nın daha esnek zincirleri vardır. PBA, elektriksel alanda dipol rotasyonlar göstererek elektriksel polarizasyonlar üretebilir ve bu nedenle, rastgele ve hizalı kristalin fazlar oluşturulabilir [131]. Elastik deformasyondan plastik deformasyona geçiş esnasında lamellerdeki komşu zincirler birbiri üzerinde kaymaya başlar. Böylece katlanmış zincirler açılarak çekme eksenine doğru daha iyi hizalanma başlar. Bu mekanizma, elektroegirme sırasında PBA zincirlerinin daha serbest hareket etmesine neden olmuş olabilir. Hidrofobik-hidrofilik etkileşimlerle, PBA zincirleri P3HB zincirleri etrafına dolanarak P3HB'yi daha dayanıklı hale getirmiştir. Son olarak ise ikincil bağlar ile birbirine bağlanmış olan kristal blok parçaları lamellerden ayrılır. Zincirlerin yoğun bir şekilde birbirine dolanması veya zincirler arasında hareketi engelleyen çok miktarda moleküller arası bağların bulunması dayanımı artırırken, ikincil bağların güçlenmesi ve zincirlerin kuvvet doğrultusunda yönelmesi elastik modülünü artırır. P3HB ve PBA arasında yüksek miktarda ikincil bağ (hidrojen bağları) bulunmaktadır. İkincil bağların varlığı ve polimer zincirlerinin kuvvet yönünde yönlendirilmesi ile elastik modülde artış gözlemlenmiştir.

Doğal iskelet kas dokusu, Bölüm 2.7.1.2’de detayları ile belirtilen kas kasılmasına bağlı aktif ve pasif mekanik özelliklere sahip bir dokudur. İskelet kası mekanik özelliklerine benzer mekanik özelliklere sahip doku iskelelerinin geliştirilmesi iskelet kasını taklit etmek açısından önemlidir. İskelet kasının mekanik özellikleri, kas dokusunun bulunduğu bölgeye bağlı olarak farklılık göstermektedir; iskelet kaslarının çekme dayanımı 70 ile 800 kPa arasında, kopma uzaması değerleri %30 ile %60 arasında ve elastik modülü 30 ile 8000 kPa arasında değişmektedir [4]. Bu veriye dayanarak iskelet kasının yumuşak ve elastik bir doku olduğu söylenebilmektedir. Ayrıca, yumuşak malzemelere iskelet kası hücrelerinin daha kolay tutunduğu, çoğaldığı ve farklılaştığı iskelet kası doku mühendisliği çalışmalarında belirlenmiştir [2, 46, 47]. İskelet kasının yumuşaklığı, mekanik stres altındaki elastik özelliklerine bağlıdır [156]. Bu nedenle, yumuşak bir doku iskelesinin yüksek uzama davranışı ve yüksek çekme dayanımı sergilemesi beklenir. Rastgele ve hizalı P3HB matrikslerin kopmadaki uzama değerleri, P3HB’nin kristalinitesi nedeniyle %30’un altında kalmıştır. Ancak, rastgele P3HB/PBA matriksler %120’nin üzerinde uzama ile, hizalı P3HB/PBA matriksler ise yaklaşık %70 uzama ile elastik davranış göstermiştir. Elde edilen değerler doğal iskelet dokusuna oldukça benzerdir. Ayrıca, hizalı P3HB/PBA matrikslerin $8,5 \pm 1,8$ MPa çekme dayanımı değeri ile, doğal iskelet kas dokusunun çekme dayanımına en yakın davranışı gösterdiği belirlenmiştir. Bu bağlamda, hizalı P3HB/PBA nanofiber matrikslerin, rastgele P3HB/PBA nanofiber matrikslere göre iskelet kasına daha yakın mekanik özelliklere sahip olduğu değerlendirilmiştir.

4.2.7. Hidrolitik ve Enzimatik Bozunma Davranışı

Matrikslerin hidrolitik ve enzimatik ortamdaki bozunma davranışları 7 hafta boyunca takip edilmiştir ve SEM fotoğrafları **Şekil 4.12**’de verilmiştir.



Şekil 4.12. Rastgele ve hizalı P3HB/PBA nanofiber matrikslerin 7 hafta boyunca yürütülen hidrolitik ve enzimatik bozunma çalışmaları sırasındaki SEM fotoğrafları (ölçek: 20 μm (başlangıç); 10 μm (bozunma)).

Hidrolitik bozunmanın 5. haftasına kadar belirgin bir bozunma gözlenememiştir. Ancak 5. haftadan itibaren rastgele ve hizalı fiber yüzeylerinde aşınmalar ve fiber yapısında belirgin bozulmalar tespit edilmiştir. Bunun en önemli nedeni olarak P3HB'nin yüksek kristalinitesi ve yüksek molekül ağırlığı gösterilebilir. Bununla beraber elektroçirme işlemi sırasında katkı polimeri olan PBA'nın P3HB zincirlerine hem hidrojen bağları hem de elektrostatik etkileşimler ile bağlandığı düşünülmektedir. Hidrolitik bozunma ortamında bulunan tuzlara ait iyonlar polimer yüzeyinde bulunan bu hidrojen bağları arasına girerek etkileşimleri zayıflatmış ve bu etkileşimlerin zayıflamasıyla zincirler arasındaki boşluklara su molekülleri girmiş ve böylelikle kristalinitede düşüş yaşanmış olabilir [141]. Kristalinitedeki düşüş ile birlikte bozunma hızlanmış ve molekül ağırlığı azalmaya başlamıştır. Bozunma ürünlerinin yer yer hidrofobik ve piezoelektrik bir polimer olan P3HB'nin yüzeyine elektrostatik etkileşimler ile tutunduğu SEM fotoğraflarından görülebilmektedir. Bununla beraber hidrolitik bozunma ortamında

bulunan tuzlar iskele yüzeyine elektrostatik etkileşimler ile tutunmuştur. Özellikle 7. haftadaki görüntülerde ortamdaki iyonik etkileşimlerin arttığı, polimerin kristalinitesinde azalma ve molekül ağırlığında düşüş ile birlikte rastgele fiberlerin morfolojisinde önemli derecede bozulmalar meydana geldiği, fiberlerin daha yayvan bir görünümde olduğu tespit edilmiştir. Hizalı fiberlerin ise hidrolitik bozunmanın 7. haftasında yer yer koptuğu ve yüzeydeki polimerik birikintilerinin arttığı gözlemlenmiştir. Daha önce yapılan XRD analizi ile hizalı morfolojideki fiberlerin kristalinitesinin rastgele morfolojideki fiberlere göre daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bu bağlamda hizalı morfolojideki fiberlerin daha fazla bozunmaya uğrayacağı öngörülebilmektedir. Hizalı fiberlere ait SEM fotoğrafları incelendiğinde fiber yüzeyindeki aşınma ve pürüzlerin rastgele fiberlere göre daha fazla olduğu görülmüştür. Yer yer fiberlerde bozunmaya bağlı açılma ve ipliklenmelerin olduğu da belirlenmiştir.

P3HB poliester ailesinden bir polimer olup, yüzey erozyonu ile bozunmaktadır. Bu tip polimerlerde enzimler polimer matrisine difüze olamadığından, bozunma yüzeyde gerçekleşmektedir [153]. Hidrolitik bozunma için açıklanan neden-sonuç ilişkileri enzimatik bozunma ortamında bulunan PBS'ten dolayı burada da geçerlidir. Hidrolitik bozunmaya ek olarak, enzimatik ataklarla yüzeyde erozyonların olduğu tespit edilmiştir. Rastgele fiberlere ait görüntülerde bozunmanın 5. haftasından itibaren yüzeyin enzim ataklarıyla sürekli erozyona uğraması ile birlikte kristalinitedeki düşüş artmıştır [154]. Bununla beraber kristalin bölgeler ile amorf bölgeler arasındaki arayüzlerde enzimatik ataklar nedeniyle kırılma noktalarının olduğu görülmektedir. Hizalı fiberlere ait görüntülerde bozunmanın 5. ve 7. haftalarında polimerik yapının yüzey erozyonunun artmasıyla yer yer yırtıldığı ve yüzeydeki pürüzlülüğün ve bozulmanın diğer gruplara göre çok daha fazla olduğu belirlenmiştir. Tüm bunlara ek olarak, PBA'nın protein adsorplayıcı özellikleri göz önüne alındığında, lipaz enziminin PBA'nın bozunma miktarını ve hızını arttırmış olabileceği düşünülmektedir [157].

4.2.8. Su Temas Açıları

Rastgele ve hizalı P3HB/PBA nanofiber matrikslerin su temas açısı ölçümleri **Çizelge 4.4**'te verilmiştir. Rastgele fiber morfolojisine sahip matrikslerin su temas açısı yaklaşık 107,6° olarak ölçülürken, hizalı fiber morfolojisine sahip matrikslerin su temas açısı yaklaşık 113,6° olarak ölçülmüştür. Değerler birbirine yakın olup, malzemelerin hidrofobik olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.4. Rastgele ve hizalı P3HB/PBA fiber matrikslerin su temas açısı değerleri.

Matriks	Su temas açısı (°)
P3HB/PBA Rastgele	107,6 ± 8,4
P3HB/PBA Hizalı	113,6 ± 6,6

P3HB'nin oldukça hidrofobik bir polimer olduğu göz önüne alındığında, PBA katkılmasıyla birlikte elektroçirme işlemi sonucunda elde edilen su temas açısı değerleri kabul edilebilir aralıklardadır.

4.3. Hücre Kültürü Çalışmaları

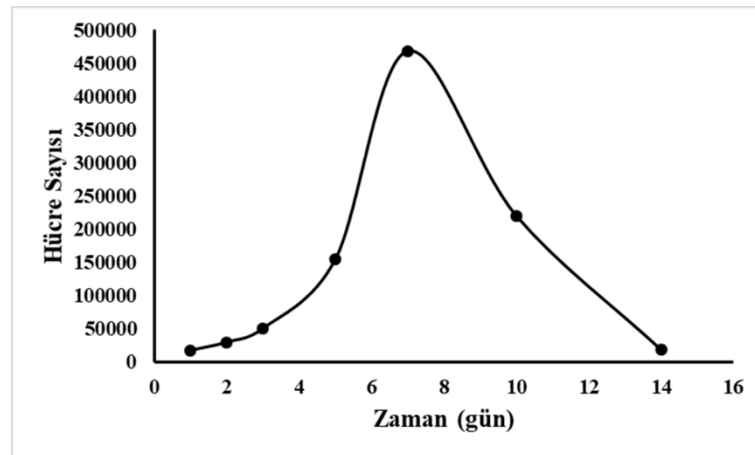
Rastgele ve hizalı P3HB/PBA nanofiber matrikslerin kimyasal, termal, morfolojik, mekanik ve piezoelektrik karakterizasyonları tamamlandıktan sonra 21 gün boyunca C2C12 fare miyoblast hücre hattı ile statik kültür çalışmaları yürütülmüştür. Kontrol grubu olarak hücre kültür kapları (tissue culture polystyrene-TPCS) kullanılmıştır.

4.3.1. C2C12 Hücre Hattının Karakterizasyonu

Hücre kültür aşaması öncesi, DSMZ'den satın alınan C2C12 hücre hattının karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

4.3.1.1. Hücre büyüme eğrisi

Kültürün 1., 2., 3., 5., 7., 10. ve 14. günlerinde yüzeyden kaldırılan hücreler hemositometrik olarak sayılmıştır. Sayım sonucunda elde edilen büyüme eğrisi **Şekil 4.13**'te verilmiştir.

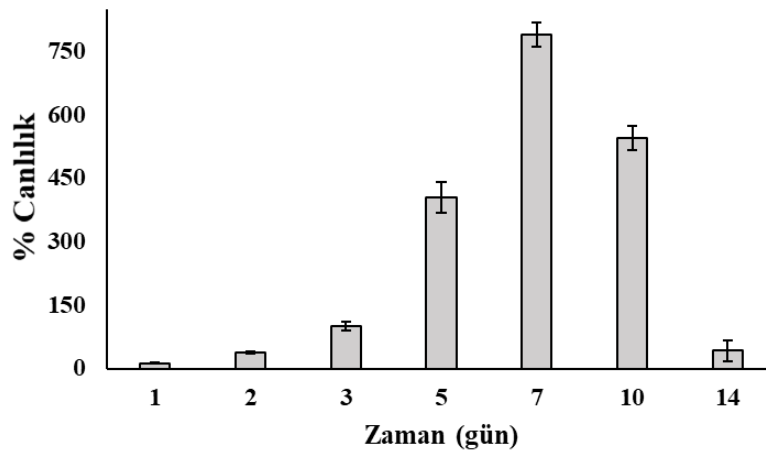


Şekil 4.13. C2C12 hücre hattına ait büyüme eğrisi.

Hücre büyüme eğrisi incelendiğinde 1. ve 2. günler arasında pozitif üreme (lag) fazı, 2. ve 5. günler arasında üstel üreme fazı, 7. günde durağan faz ve 8. günden itibaren ölüm fazı gözlemlenmiştir. Hücreler döngülerinin büyük bir bölümünü pozitif üreme fazı ve üstel üreme fazında geçirmişler, durağan fazda kısa süreli bulunmuşlar, ardından hızlıca ölüm fazına geçmişlerdir. Hücre ölümüne bağlı olarak ortamda oluşan asiditeye direnç göstererek ani ölüm yerine, belirli bir süreye yayılmış ölüm gözlemlenmiştir. Hücre büyüme eğrisinin doğrusallığa en yakın zaman aralığı olan 2. ile 5. günler arasındaki hücre sayılarının doğal logaritması (\ln) zamana karşı grafiğe geçirilmiş, doğrunun eğiminden özgül üreme hızı (μ) $0,023 \text{ sa}^{-1}$ olarak tespit edilmiştir. Hücre ikilenme süresinin ise 30 sa olduğu belirlenmiştir.

4.3.1.2. Canlılık analizi

Hücre canlılığının tespiti için kültürün 1., 2., 3., 5., 7., 10. ve 14. günlerinde MTT analizi yapılmıştır. Üçüncü gün absorban değeri (optik yoğunluk: 0,8; 570 nm/690 nm ref) %100 canlılık olarak kabul edilerek diğer günler oranlanmış ve C2C12 hücrelerine ait yüzde canlılık değerleri **Şekil 4.14**'te verilmiştir.



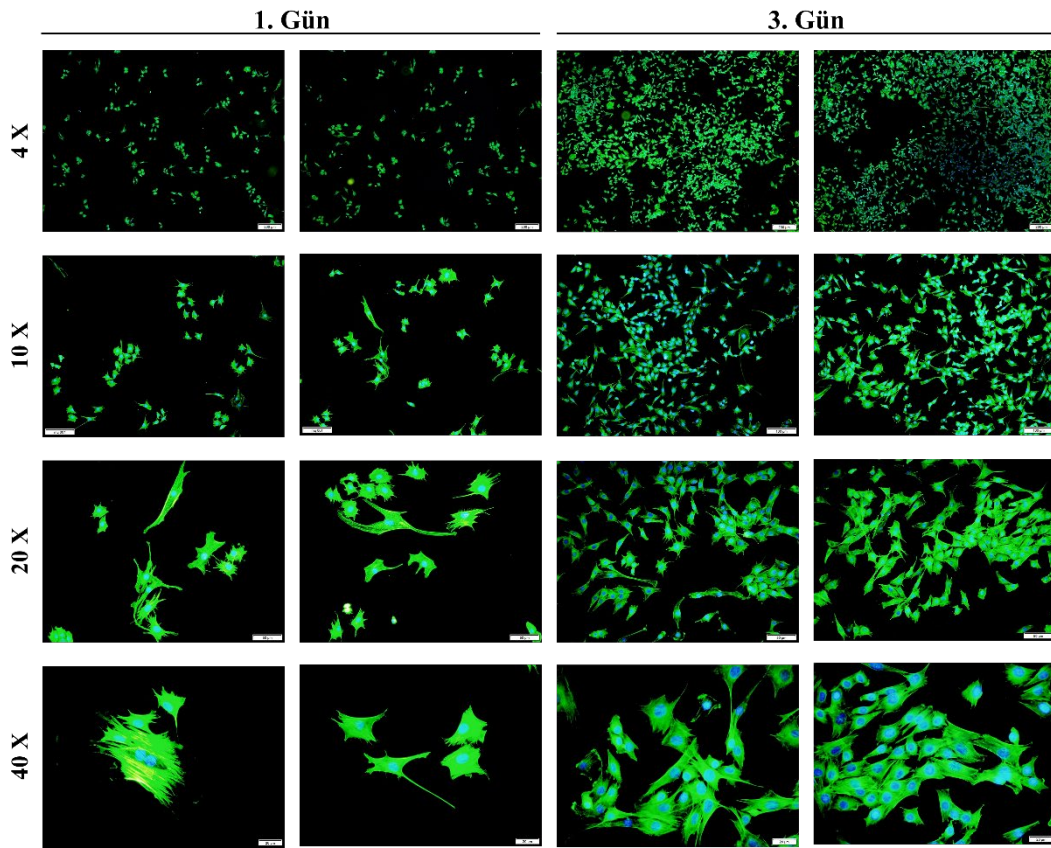
Şekil 4.14. C2C12 hücrelerinin 14 günlük kültürasyonu boyunca belirlenen günlerde elde edilen yüzde canlılık değerleri.

Elde edilen grafiğin eğiliminin büyüme eğrisi ile uyumlu olduğu görülmüştür. Çok çekirdekli C2C12 hücrelerinin özellikle 3. günden itibaren oldukça yüksek canlılık değerlerine ulaştığı tespit edilmiştir. Hücrelerin kültürün 1. ve 2. günlerinde ortama uyum sağlama sürecine girdikleri, ardından üstel üreme fazına giriş yaparak 7. güne kadar çoğaldıkları ve 10. günden itibaren ölüm fazına girdikleri doğrulanmıştır.

4.3.1.3. Floresan görüntüleme

Hücre iskeleti ve çekirdeğinin görüntülenmesi floresan F-aktin/DAPI boyama ile gerçekleştirilmiştir. **Şekil 4.15**'te kültürün 1. ve 3. günlerinde yapılan floresan boyama görüntüleri verilmiştir.

Miyoblast hücrelerinin morfolojik karakteristiklerinin literatüre uygun ve beklenen şekilde olduğu gözlemlenmiştir. Özellikle çok çekirdekli ve fibroblastik hücre tipleri belirlenmiştir. Bununla beraber fibroblastik hücre tipi dışında küresel ve yıldız formunda hücrelerin de varlığı tespit edilmiştir. Küresel formdaki hücreler satelit hücrelerin varlığını, yıldız formundaki hücreler ise nöromusküler bağlantı noktalarına farklılaşacak hücre popülasyonunun varlığını göstermektedir.

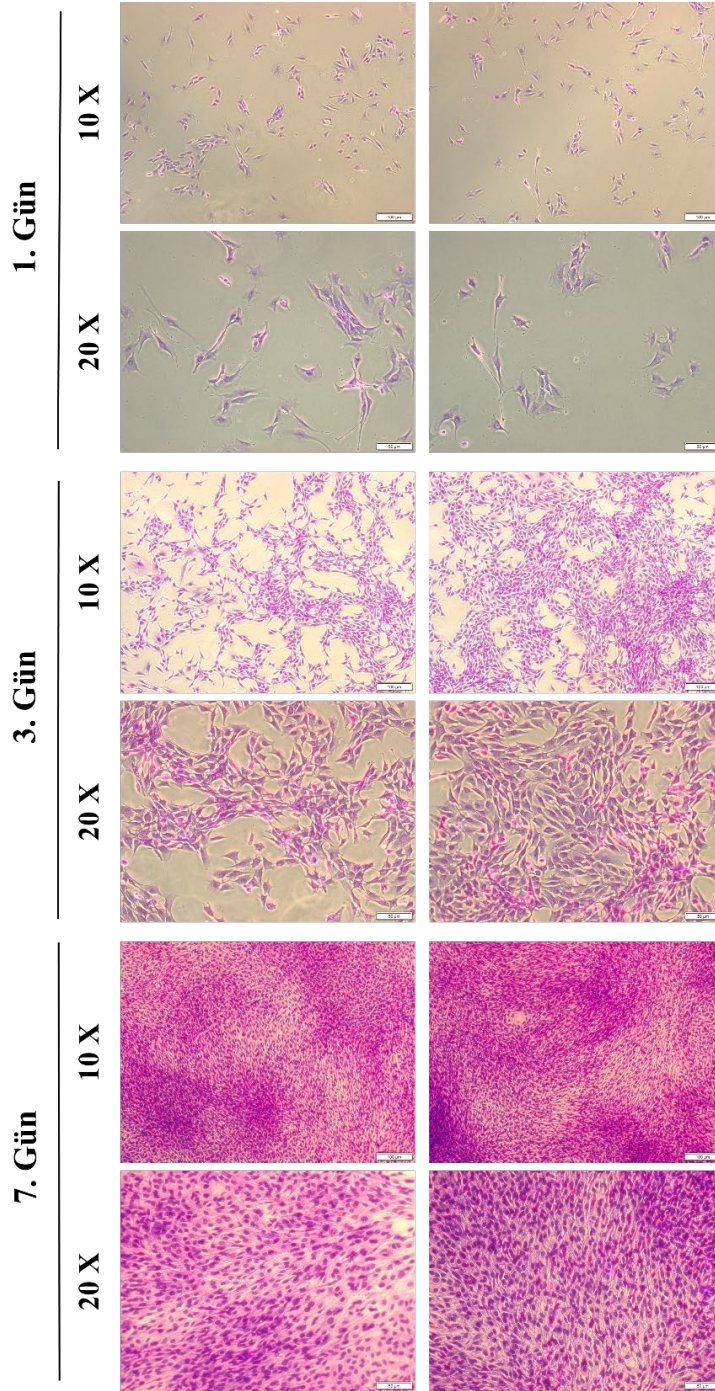


Şekil 4.15. C2C12 hücrelerinin kültürün 1 ve 3. günlerinde farklı büyütme ölçeklerinde boyama görüntüleri. Hücre iskeleti yeşil, hücre çekirdeği mavi olarak görünmektedir.

4.3.1.4. Histolojik boyama

Kristal viyole ile hücrelerin morfolojileri takip edilmiştir. **Şekil 4.16**'da kültürün 1., 3. ve 7. günlerinde yapılan histolojik boyama görüntüleri verilmiştir.

Floresan boyama görüntüleri ile paralel şekilde, kristal viyole boyamada da kültürün ilk 7 gününde hücrelerin çok çekirdekli ve fibroblastik morfolojide olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca hücrelerin çok yoğunlaştığı bölgelerde belirgin dizilime gitme eğilimi olduğu belirlenmiştir. Beklenen şekilde, kültürün 7. gününden sonra hücrelerin besin yetersizliği ve hızlı hücresel atık salımından dolayı parçalandığı, koptuğu ve ölüme gittiği gözlemlenmiştir.



Şekil 4.16. C2C12 hücrelerinin kültürün 1., 3. ve 7. günlerinde kristal viyole boyama görüntüleri.

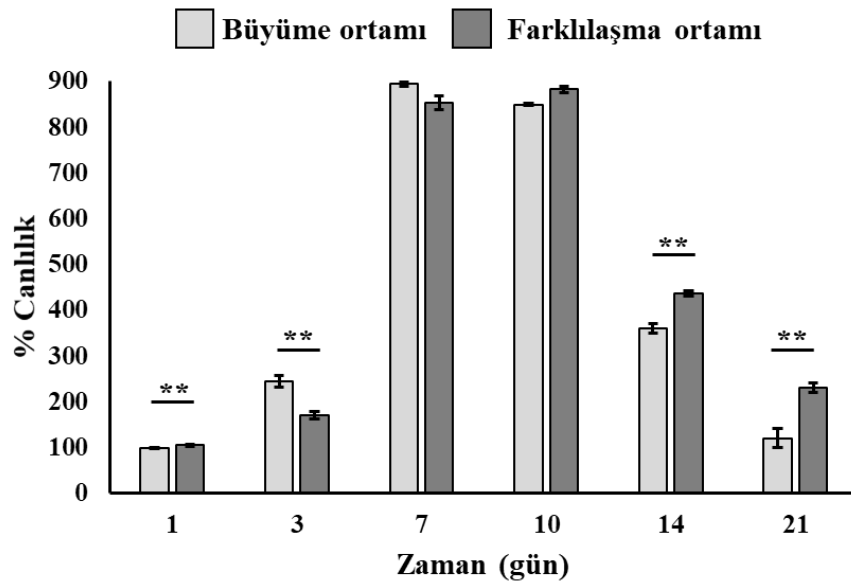
Miyoblast hücreleri oldukça yüksek metabolik aktiviteye sahiptir. Bu nedenle ortamlarının 2-3 günde bir değiştirilmesi gerekmektedir. Karakterizasyon boyunca ortam değişikliği yapılmamış olup, hücrelerin 7. güne kadar çoğaldıkları ve yayıldıkları tespit edilse de 3. günden itibaren sağlıklı görüntülerini kısmen yitirmeye başladıkları ve 7. günden sonra apoptoza gittikleri görülmektedir.

4.3.2. Doku Kültürü Kaplarında Miyojenik Farklılaşma Çalışmaları

Doku kültür kaplarında yapılan miyojenik farklılaşma çalışmalarında büyüme ortamı olarak %10 FBS içeren RPMI 1640 kullanılırken, farklılaşma ortamı olarak %2 HS içeren RPMI 1640 kullanılmıştır. Hücre ekimi büyüme ortamında gerçekleştirilmiş ve üstel üreme fazının başlangıcı olan kültürün 3. gününde hücreler üzerindeki büyüme ortamı uzaklaştırılarak farklılaşma ortamına geçilmiştir. Kültür ortamı 3 günde bir yenilenerek, 21 gün boyunca kültürasyon gerçekleştirilmiştir.

4.3.2.1. Canlılık analizi

TCPS yüzeyindeki C2C12 hücrelerinin kültürün 1., 3., 7., 10., 14. ve 21. günlerindeki mitokondriyal aktiviteleri Şekil 4.17’de verilmiştir.



Şekil 4.17. TCPS yüzeyindeki C2C12 hücrelerinin kültürün 1., 3., 7., 10., 14. ve 21. günlerindeki yüzde canlılık değerleri (İstatistiksel anlamlı farklılıklar $n = 4$, $**p < 0,01$, büyüme ortamındaki hücrelerin kontrol grubu olduğu, aynı gündeki farklılaşma ortamı ile karşılaştırıldığında).

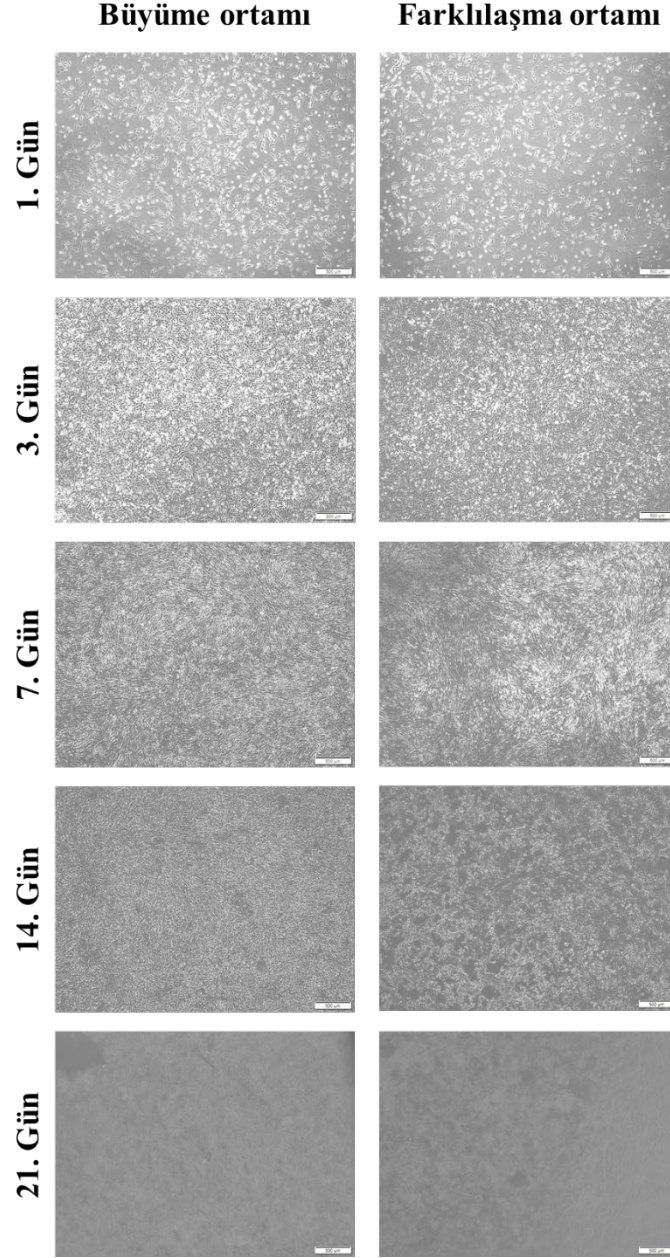
Kültürün 1., 3., 14. ve 21. günlerinde, farklılaşma ortamları büyüme ortamları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar elde edilmiştir (** $p < 0,01$). Sonuçlar incelendiğinde ilk 7 gün boyunca farklılaşma grubundaki fibroblastik hücreler hücre döngüsünden çıkıp farklılaşmaya gitmiş olabilecekleri ve bu nedenle farklılaşma ortamındaki hücrelerin canlılık değerinin büyüme ortamındaki hücrelere göre azaldığı düşünülmüştür. Miyoblast hücreleri birbirleri ile temas ettiklerinde de farklılaşabilme özelliği gösterdiğinden farklılaşma başlangıcı, büyüme ortamında da beklenmektedir.

Kültürün 7. ve 10. günlerinde yüzde canlılık değerlerinin büyüme ve farklılaşma grupları için maksimum değerde olduğu görülmektedir. Kültürün 7. gününe kadar canlılık artmış olmakla birlikte kültürün 10. gününden itibaren canlılıkta önemli bir düşüş gözlemlenmiştir. Büyüme ortamındaki hücrelerin canlılıklarındaki düşüş farklılaşma ortamındaki hücrelere göre daha azdır. Hücreler bir süre sonra tek tabaka olmaktan çıkıp üst üste tabakalar oluşturmaya başlamış, fakat bir süre sonra kontak inhibasyonun da etkisiyle ölüme gitmişlerdir. Var olan canlılığın ise karma hücre popülasyonunda bulunan satelit hücrelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ölüme giden hücrelerin salgıladığı kemotaktik sinyaller ile satelit hücrelerin hücre döngüsünün suskun fazından ayrılıp çoğalmaya başlamış oldukları tahmin edilmektedir.

4.3.2.2. Morfolojik analizler

Büyüme ve farklılaşma ortamındaki hücrelerin kültür çalışmasının farklı günlerindeki dağılımları ve morfolojilerini gösteren optik mikroskop görüntüleri **Şekil 4.18**'de, hücre iskeleti/çekirdeği floresan mikroskop görüntüleri **Şekil 4.19**'da verilmiştir.

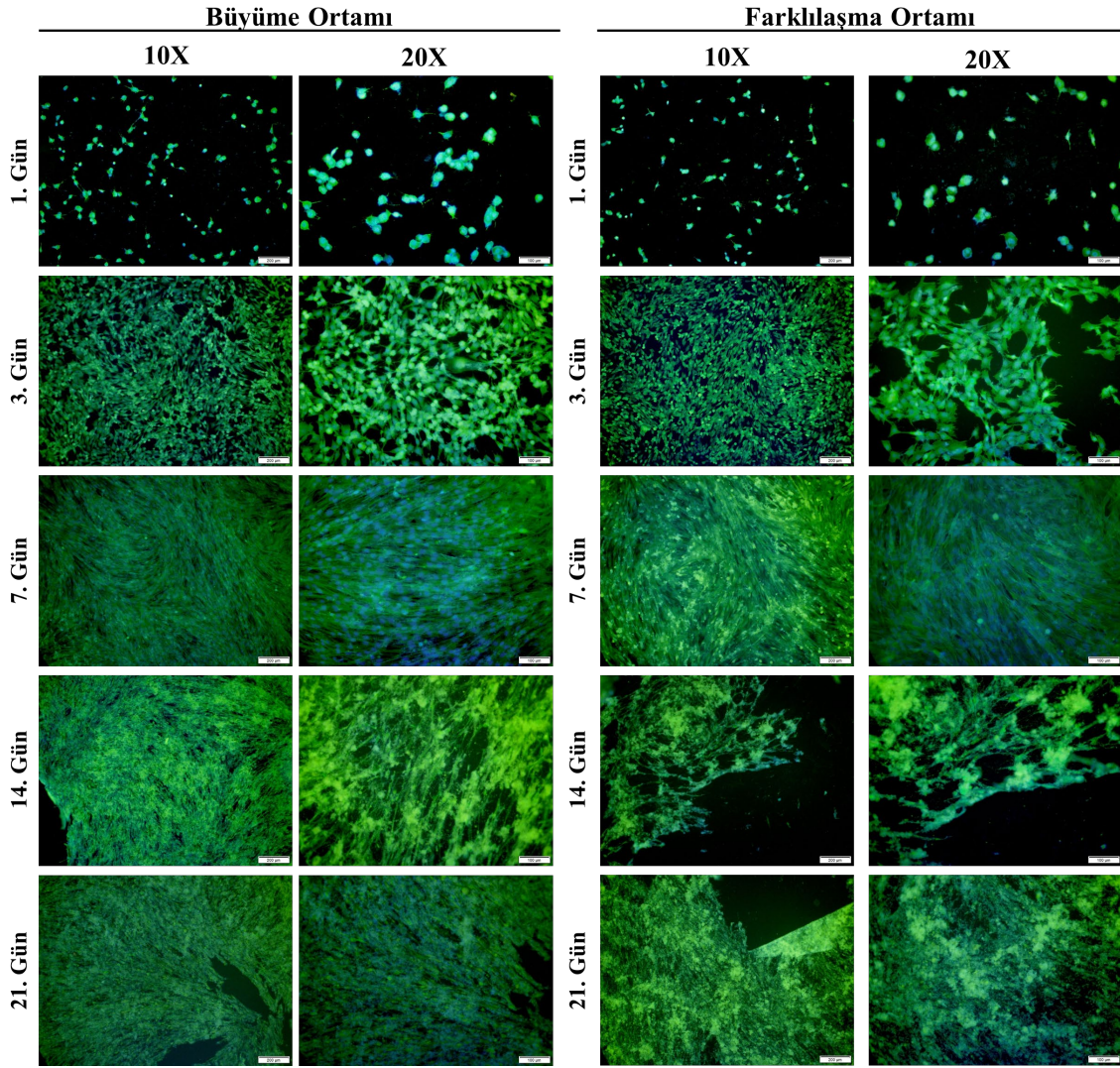
Farklılaşma ortamındaki hücrelerin 3. günden itibaren dizilime gittikleri ancak 14. günden itibaren her iki grupta da hücre ölümlerinin başladığı ve yer yer gruplar halinde hücrelerin yüzeyden ayrıldıkları optik mikroskop fotoğraflarından tespit edilmiştir. Floresan görüntülemelerde, büyüme ortamındaki hücrelerin belirli bir dizilime gittikleri ancak bunun miyotüp oluşumu için yeterli olmadığı tespit edilmiştir. Büyüme ortamındaki hücrelerin 14. günden itibaren hücresel yapı bütünlüklerinin belirli bölgelerde bozularak yaşlanma belirtileri göstermeye başladığı görülmüştür.



Şekil 4.18. TCPS yüzeyindeki C2C12 hücrelerinin kültürün 1., 3. ve 7. günlerinde büyüme ve farklılaşma ortamındaki optik mikroskop görüntüleri (büyütme: 4 X).

Farklılaşma ortamındaki hücrelerin ise daha düzenli bir yapı oluşturdukları, hatta yer yer miyotüp oluşturdukları gözlemlenmiştir. Büyüme ortamındaki hücelere benzer şekilde, 14. günden itibaren hücrelerin oluşturduğu düzenli yapı bozulmaya başlamış ve hücresel bütünlük 21. günde neredeyse tamamen bozulmuştur. Çekirdeklerin füzyona uğradıkları ve filamentlerin tübüler forma geçmeye başladıkları 3. ve 7. gün görüntülerinden anlaşılmaktadır. Daha sonraki günlerde ise oluşan miyotüplerin ortamdaki mekanik ve elektriksel etkilerin olmaması ve yüzey morfolojik ve mekanik özelliklerinin yetersizliği nedeniyle birbirleri ile bağlantı kuramadığı belirlenmiştir. Birincil farklılaşma aşamasını

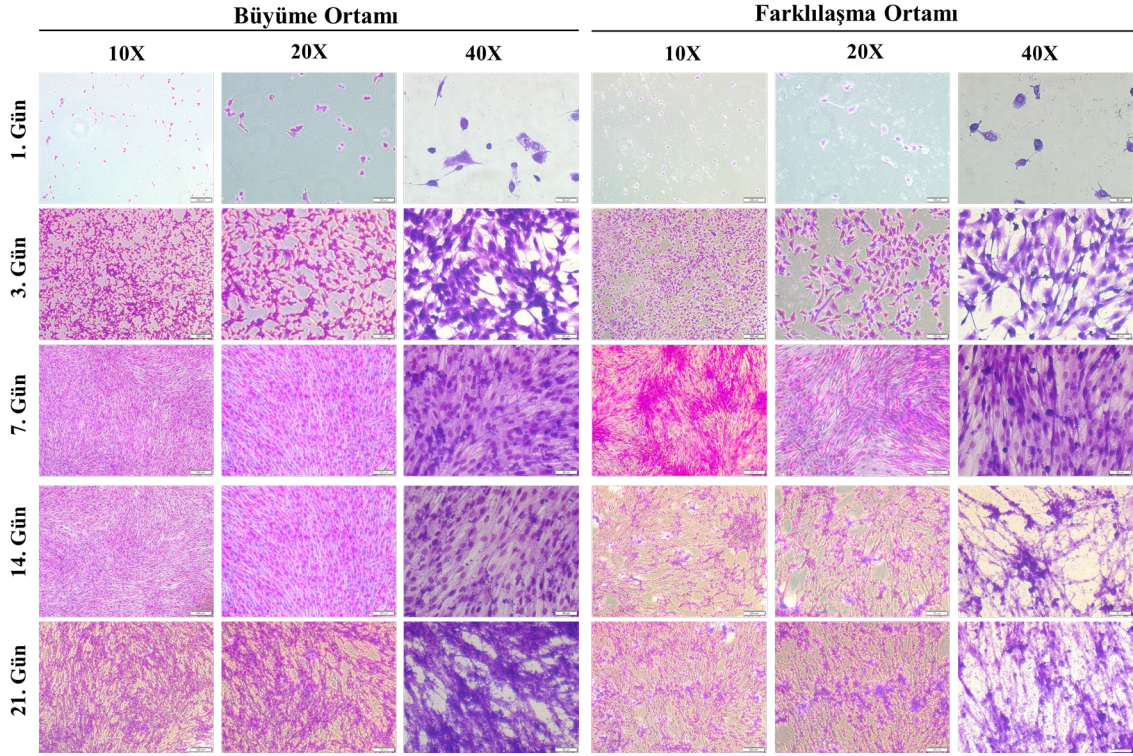
tamamlayamayan farklılaşma ortamındaki hücreler 14. günden itibaren yaşlanmış, parçalar halinde yüzeyden uzaklaşmış ve ölüme gitmişlerdir.



Şekil 4.19. Büyüme ve farklılaşma ortamındaki C2C12 hücrelerinin kültürün 1., 3., 7., 14. ve 21. günlerindeki F-aktin/DAPI boyama floresan mikroskop görüntüleri.

4.3.2.3. Histolojik analizler

Büyüme ve farklılaşma ortamındaki hücrelerin kristal viyole ile boyama sonrası fotoğrafları Şekil 4.20’de verilmiştir.

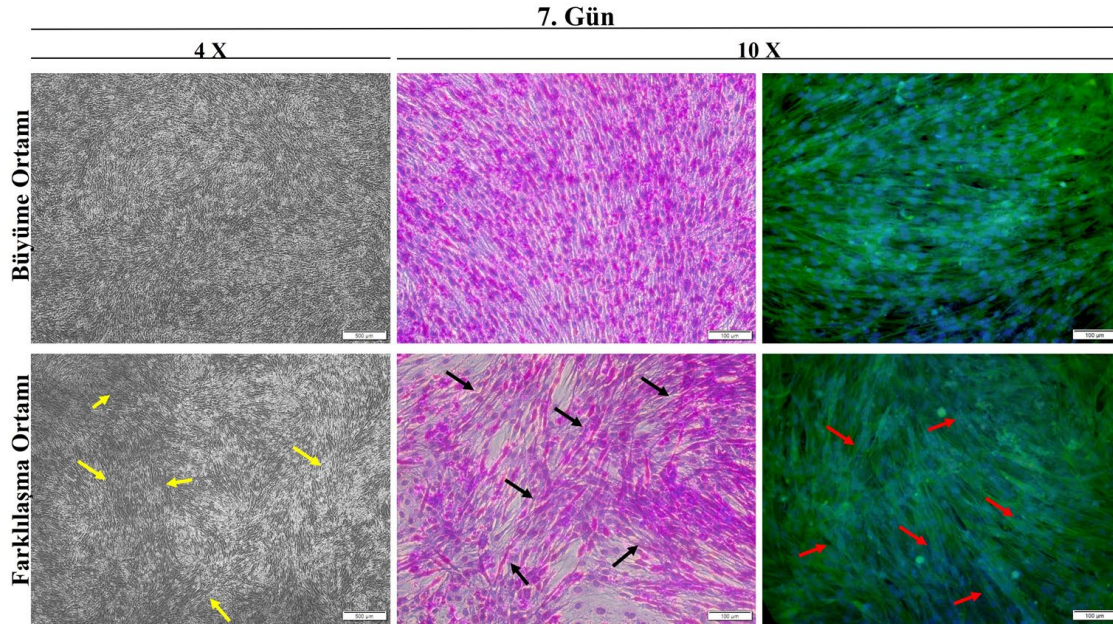


Şekil 4.20. Büyüme ve farklılaşma ortamındaki C2C12 hücrelerinin kültürün 1., 3., 7., 14. ve 21. günlerindeki kristal viyole boyama görüntüleri.

Büyüme ortamındaki hücrelerin belirli bir dizilime gittikleri ancak bunun miyotüp oluşumu için yeterli olmadığı ve 14. günden itibaren yaşlanma belirtileri göstermeye başladığı tespit edilmiştir. Farklılaşma ortamındaki hücrelerin ise daha düzenli bir yapı oluşturdukları gözlemlenmiştir. Oluşan miyotüplerin birbirleri ile bağlantı kuramadığı belirlenmiştir. Birincil farklılaşma aşamasını tamamlayamayan farklılaşma ortamındaki hücreler 14. günden itibaren parçalar halinde yüzeyden uzaklaşmış ve ölüme gitmişlerdir.

Elde edilen verilerin ışığında farklılaşma başlangıcının kültürün 7. gününde belirgin olduğu tespit edilmiştir. Buradan yola çıkılarak 7. günde büyüme ve farklılaşma ortamlarında bulunan hücrelerin optik mikroskop, kristal viyole ve F-aktin/DAPI görüntüleri **Şekil 4.21**'de karşılaştırılmıştır. Farklılaşma ortamındaki hücrelerin (oklar ile gösterilen bölgelerde) daha düzenli bir yönelime girdikleri, çekirdeklerinin füzyona uğradıkları ve kesikli de olsa tübüler yapı oluşturdukları belirgin bir şekilde gözlemlenmektedir. Ancak mekanik, fiziksel ve elektriksel özelliklerin olmadığı TCPS kültürü hücrelerin farklılaşması için yeterli değildir. Bu nedenle hücrelerin birincil farklılaşmayı tamamlayamamaları ve ikincil farklılaşma aşamasına geçememeleri beklenen bir sonuçtur [11]. Statik kültürde TCPS'de yapılan bu çalışmalar miyojenik

farklılaşmanın çeşitli uyarılar olmadan gerçekleşmesinin mümkün olmadığını kanıtlar niteliktedir.



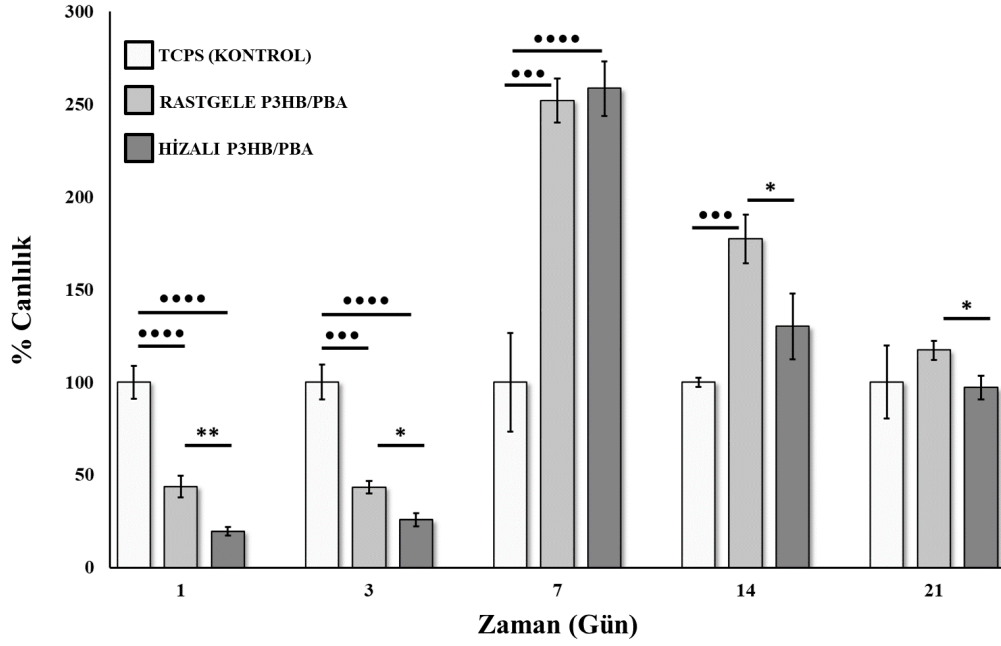
Şekil 4.21. Kültürün 7. gününde büyüme ve farklılaşma ortamındaki C2C12 hücrelerinin soldan sağa sırasıyla optik mikroskop, kristal viyole ve F-aktin/DAPI görüntülerinin farklı büyütmelelerde karşılaştırılması.

4.3.3. Matrislerde Miyojenik Farklılaşma Çalışmaları

Rastgele ve hizalı P3HB/PBA matrisler üzerinde gerçekleştirilen miyojenik farklılaşma çalışmalarında büyüme ortamı olarak %10 FBS içeren RPMI 1640 kullanılırken, farklılaşma ortamı olarak %2 HS içeren RPMI 1640 kullanılmıştır. Hücre ekimi büyüme ortamında gerçekleştirilmiş ve üstel üreme fazının başlangıcı olan kültürün 3. gününde hücreler üzerindeki büyüme ortamı uzaklaştırılarak farklılaşma ortamına geçilmiştir. Kültür ortamı 3 günde bir yenilenerek, 21 gün boyunca kültürasyon gerçekleştirilmiştir.

4.3.3.1. Canlılık analizleri

Rastgele ve hizalı P3HB/PBA nanofiber matrisler üzerindeki C2C12 hücrelerinin mitokondriyal aktiviteleri MTT analizi ile belirlenmiştir. TCPS'te kültürlenmiş hücreler kontrol grubu olarak seçilmiştir. Kültürün 1., 3., 7., 14. ve 21. günlerinde C2C12 hücrelerinin yüzde canlılık değerleri **Şekil 4.22'**de verilmiştir.



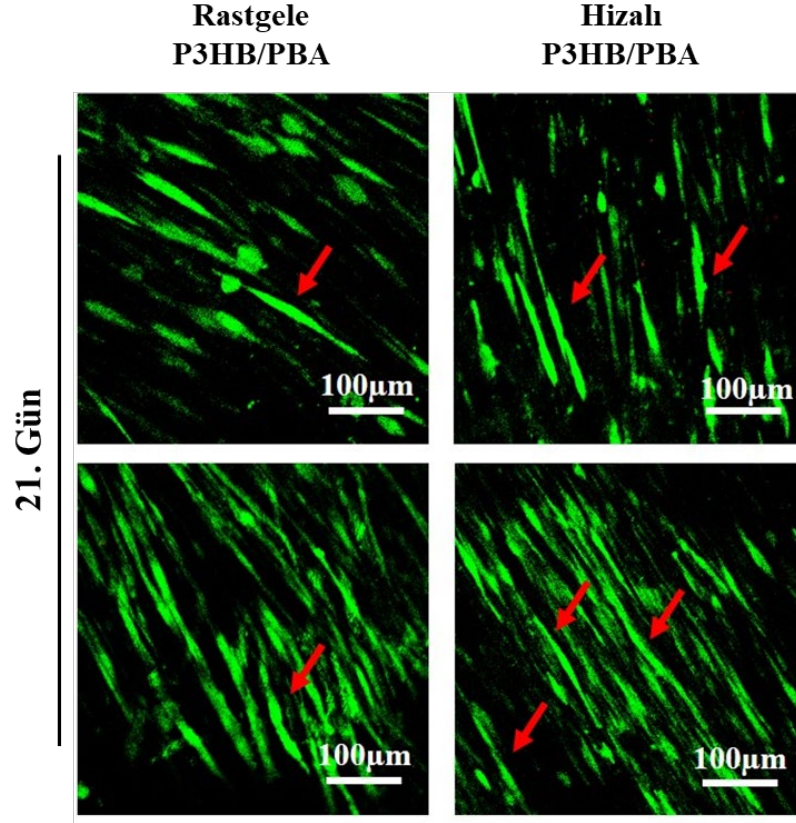
Şekil 4.22. Rastgele ve hizalı P3HB/PBA nanofiber matrisler üzerinde kültürlenmiş C2C12 hücrelerinin yüzde canlılık değerleri (İstatistiksel anlamlı farklılıklar $n = 4$, $•••p < 0,001$, $••••p < 0,0001$ TCPS kontrol grubu olduğunda; $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ rastgele fiberler kontrol grubu olduğunda).

P3HB'nin iskelet kas doku mühendisliğinde kullanımı üzerine tek temel araştırma Ricotti ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmadır. Çalışmada, C2C12 hücrelerinin izotropik ve anizotropik P3HB nanofiber matrisler üzerindeki üreme ve farklılaşma kapasitesi incelenmiştir [153]. P3HB matrislerinin C2C12 hücrelerinin tutunmasını ve proliferasyonunu desteklediği gösterilmiştir. Ancak, P3HB'nin yüksek kristalinite kaynaklı kırılganlığı ve düşük biyobozunma hızının diğer polimerlerle karıştırılarak iyileştirilmesi gerektiğini vurgulamışlardır.

Tez çalışmasında ise, kontrol grubundaki C2C12 hücrelerinin canlılığı, kültürün 1. ve 3. günlerinde rastgele ve hizalı P3HB/PBA nanofiber matrislere göre istatistiksel olarak daha yüksek bulunmuştur (1. gün, $••••p < 0,0001$; 3. gün, sırasıyla $•••p < 0,001$ ve $••••p < 0,0001$). Ayrıca, rastgele ve hizalı matrisler arasında kültürün 1. ve 3. günlerinde de önemli farklar saptanmıştır (sırasıyla, $**p < 0,01$ ve $*p < 0,05$). Bu farklılıklar, hücrelerin farklı yüzey topografyalarına uyum süresi ile açıklanabilmektedir. Kültürün 3. gününden itibaren bu eğilim değişmiş, kültürün 21. günü haricinde, matrislerdeki canlılık oranının TCPS'ten yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Özellikle kültürün 7. ve 14. günlerinde rastgele matrislerde istatistiksel olarak daha yüksek canlılık elde edilmiştir.

($***p<0,001$). Ayrıca, hizalı matrislerde kültürün 7. gününde TCPS'e göre önemli farklar ($****p<0,0001$) tespit edilmiştir. Rastgele ve hizalı matrislerde, farklılaşmaya bağlı olarak, canlılık 14. günden itibaren azalmıştır. Burada farklılaşmaya bağlı olarak hücre canlılığında bir azalma meydana geldiği söylenebilir. Hücreler mitoz döngülerinde yüksek metabolik aktivite gösterirler ve hücre döngüsündeki hücrelerin canlılık değerlerinin sürekli artması beklenir. Fakat hücreler mitoz döngüsünden çıkıp farklılaşmaya başladıklarında bölünme kapasiteleri azaldığından MTT analizi sonucunda hücre canlılığında azalma görülür [9]. Buradan, hizalı matrisler üzerindeki hücrelerin daha fazla farklılaşmış olduğu düşünülebilir. Ek olarak, C2C12 hücreleri, hücre temasına bağlı olarak fonksiyonel olmayan farklılaşma kapasitesine sahiptir [158, 159].

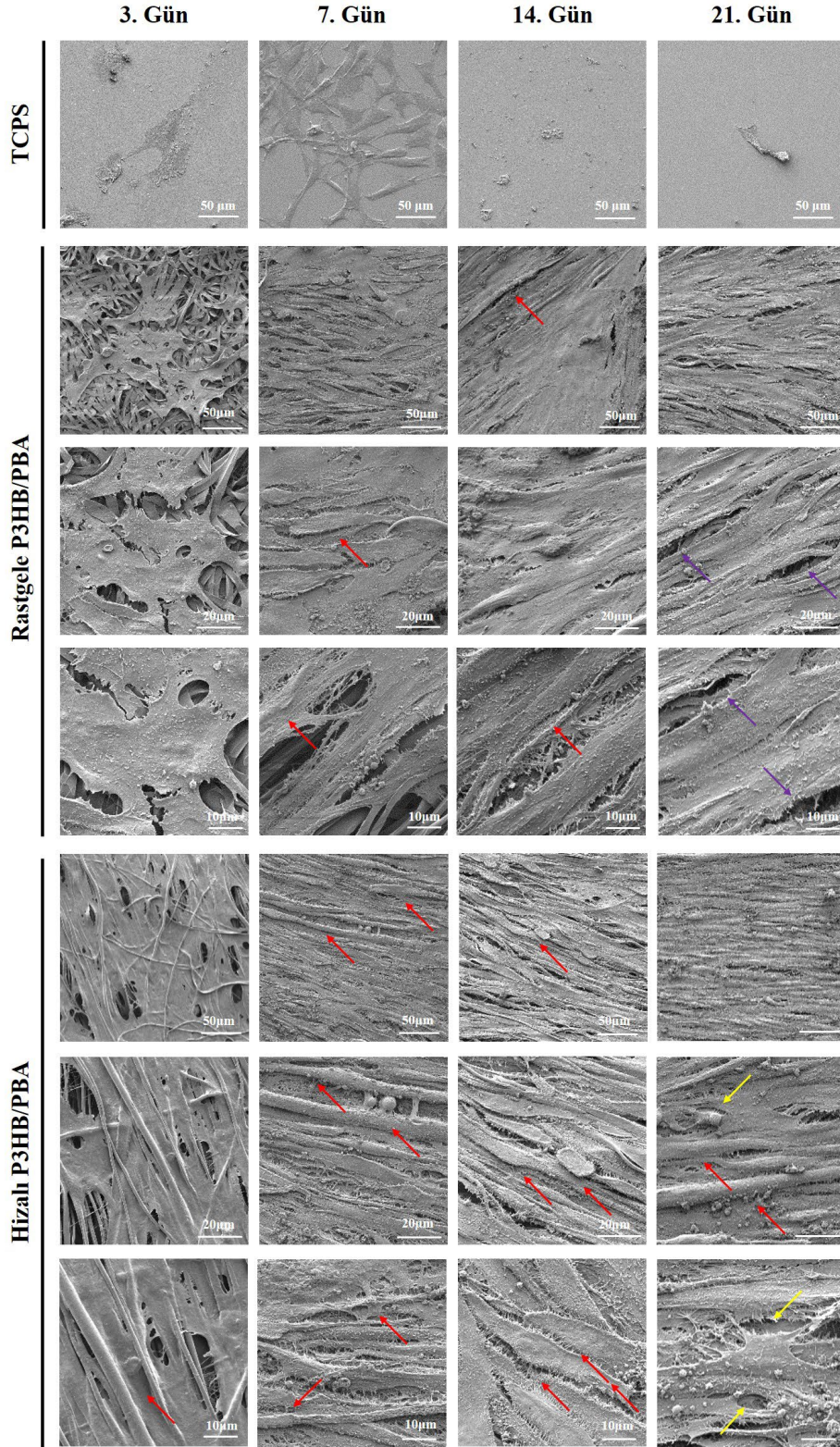
Kültürün 21. gününde rastgele ve hizalı P3HB/PBA nanofiber matrisler üzerindeki C2C12 hücrelerinin canlı/ölü boyama görüntüleri **Şekil 4.23**'te verilmiştir. Konfokal görüntülemeleri, kültürün 21. gününde, her iki grup için de yüksek canlılık oranı göstermiştir ve elde edilen görüntüler 21. gün MTT analizi sonuçlarını desteklemektedir. Konfokal fotoğrafları üzerinden ImageJ ile yapılan hücre sayımı sonuçlarına göre, rastgele ve hizalı P3HB/PBA matrislerde hücre canlılığı sırasıyla %99 ve %97 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara dayanarak, hücrelerin mitotik hücre döngüsünden çıktığı ve miyoblastlardan miyotüplere farklılaştığı sonucuna varılabilmektedir. Ayrıca, her iki grupta da miyotübüler oluşumlar tespit edilmiştir (kırmızı oklar). Ancak beklenildiği gibi, oluşan miyotübüler yapıların hizalı P3HB/PBA matrislerde daha uzun ve kalın olduğu gözlemlenmiştir. Sonuç olarak hem rastgele hem de hizalı P3HB/PBA nanofiber matrislerin, C2C12 hücrelerinin proliferasyonunu teşvik ettiği, ancak hizalı P3HB/PBA nanofiber matrislerin rastgele matrislere göre daha yüksek miyojenik uyumluluğa sahip olduğu söylenebilmektedir.



Şekil 4.23. Rastgele ve hizalı P3HB/PBA nanofiber matrisler üzerinde kültürlenmiş C2C12 hücrelerinin kültürün 21. gününde canlı (yeşil) / ölü (kırmızı) konfokal mikroskop görüntüleri. Kırmızı oklar füzyona uğramış miyotüpleri belirtmektedir.

4.3.3.2. Morfolojik analizler

C2C12 hücrelerinin, kültürün 3., 7., 14. ve 21. günlerinde rastgele ve hizalı P3HB/PBA nanofiber matrisler üzerindeki morfolojisi SEM analizi ile belirlenmiş ve SEM görüntüleri **Şekil 4.24**'te verilmiştir.



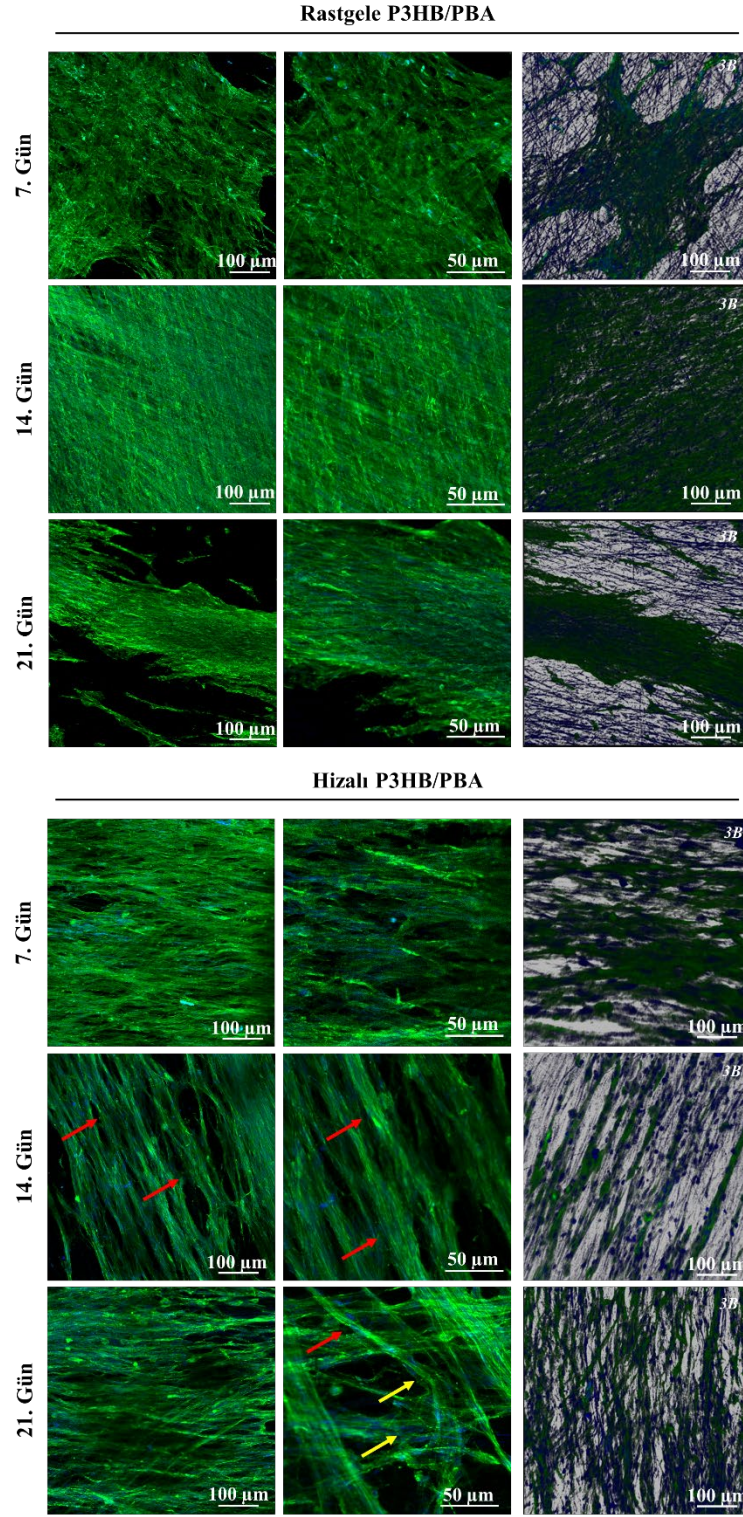
Şekil 4.24. Rastgele ve hizalı P3HB/PBA nanofiber matrisler üzerinde kültürlenmiş C2C12 hücrelerinin kültürün 3., 7., 14. ve 21. günlerinde farklı büyütme ölçeklerindeki SEM fotoğrafları. Kırmızı oklar füzyona uğramış miyotüpleri, sarı oklar nöromusküler bağlantı noktalarını, mor oklar yırtılmaları belirtmektedir.

SEM fotoğrafları incelendiğinde, C2C12 hücrelerinin rastgele ve hizalı fiberlere tutunduğu ve çoğaldığı görülmüştür. Kültürün 3. gününde farklılaşma ortamına geçildikten sonra, hücrelerin her iki matriks üzerinde de farklılaştığı, ancak hizalı fiberler üzerindeki hücrelerin kültürün 7. gününden itibaren daha düzenli bir dağılıma sahip olduğu morfolojik olarak belirlenmiştir. C2C12 hücreleri birbirleri ile temas ettiklerinde ve %70'ten fazla yayılım gösterdiklerinde belirli bir miktarda farklılaşabilmektedirler [33]. Buradan yola çıkarak rastgele matriksler üzerindeki hücrelerin proliferasyona bağlı olarak farklılaştıkları, ancak bu aşamayı tamamlayamadıkları daha sonraki günlerdeki SEM fotoğraflarından anlaşılabilir. Fonksiyonel bir kas dokusunun ön şartı doğal dokuya benzer miyofibriler ve miyotübüler yapıların oluşabilmesidir [11]. Kültürün 7. gününde hizalı matriksler üzerindeki hücrelerin morfolojilerinde önemli değişiklikler meydana gelmiştir. Farklılaşma öncesinde, miyoblastların pürüzsüz yüzeylere sahip olduğu ve nadiren mikrovilli içerdiği gözlemlenmiştir. Kültürün 7. gününden sonra hücrelerin kalın ve pürüzlü bir yüzey morfolojisi sergiledikleri, füzyon ile çok çekirdekli miyotübüler yapılar oluşturdukları ve yoğun mikrovilli ile kaplandıkları belirlenmiştir. Curci ve ark., iskelet kası farklılaşmasında miyotüp oluşumu sırasında C2C12 hücrelerinin plazma membranındaki morfolojik değişiklikleri incelemişlerdir [160]. Farklılaşma yolağına giren hücrelerin yoğun mikrovilli yapıları ile kaplandığını ve giderek kalınlaşan ve uzayan bir morfolojiye sahip olduğunu göstermişlerdir. C2C12 hücreleri ile yapılan diğer çalışmalarda da benzer morfolojik değişiklikler gösterilmiştir [161, 162].

Şekil 4.24'teki kırmızı oklar, hizalı matriksler üzerindeki hücrelerin, kültürün 14. gününden itibaren düzenli yönlenmelerini ve miyotüplerin füzyonunu göstermektedir. Bu morfolojik değişiklikler rastgele matrikslerde çok daha azdır. Rastgele matriksler, yeterli morfolojik ve mekanik özelliklere sahip olmadığından, C2C12 hücreleri proliferasyon olsalar da uygun şekilde farklılaşmamışlardır. C2C12 hücreleri birbirleriyle temas ettiğinde farklılaşabilirler, ancak hücreler maturasyon evresine geçemezlerse yüzeyden ayrılırlar. **Şekil 4.24**'teki mor oklar, rastgele matrikslerin yüzeyinde kültürün 21. gününde hücre yırtılmalarının meydana geldiğini göstermektedir. Buna karşılık, hizalı P3HB/PBA matrikslerdeki tübüler yapılar, özellikle kültürün 21. gününde, doğal kas dokusuna daha yakın boyutlara sahiptir. Doğal kas dokusunda, miyotübüler yapının uzunluğu 50-55 µm, kalınlığı 1-3 µm'dir [15, 16]. **Şekil 4.24**'te görüldüğü gibi, 50-60 µm uzunluğundaki fibriller yaklaşık 10-15 µm kalınlığındadır. Doğal dokuya benzer şekilde, 1-3 µm

kalınlığındaki miyotübüler yapıların füzyonu ile daha kalın miyofibril yapıların oluştuğu sonucuna varılabilmektedir. Ayrıca, bölgesel bağlantı noktalarının oluştuğu görülmüştür (sarı oklar muhtemel nöromusküler bağlantıları göstermektedir).

Rastgele ve hizalı matriksler üzerindeki C2C12 hücrelerinin aktin filamentlerinin ve çekirdeklerinin floresan boyama ile görüntülemesi konfokal mikroskobu ile tespit edilmiştir. Kültürün 7., 14. ve 21. günlerindeki F-aktin/DAPI konfokal analizi fotoğrafları **Şekil 4.25**'te verilmiştir.



Şekil 4.25. Rastgele ve hizalı P3HB/PBA nanofiber matrisler üzerinde kültürlenmiş C2C12 hücrelerinin kültürün 7., 14. ve 21. günlerinde hücre iskeleti (yeşil) / çekirdeği (mavi) konfokal mikroskobu görüntüleri. 3B fotoğraflar z-eksen görüntülemeleri ile elde edilmiştir. Kırmızı oklar füzyona uğramış miyotüpleri, sarı oklar nöromusküler bağlantı noktalarını temsil etmektedir.

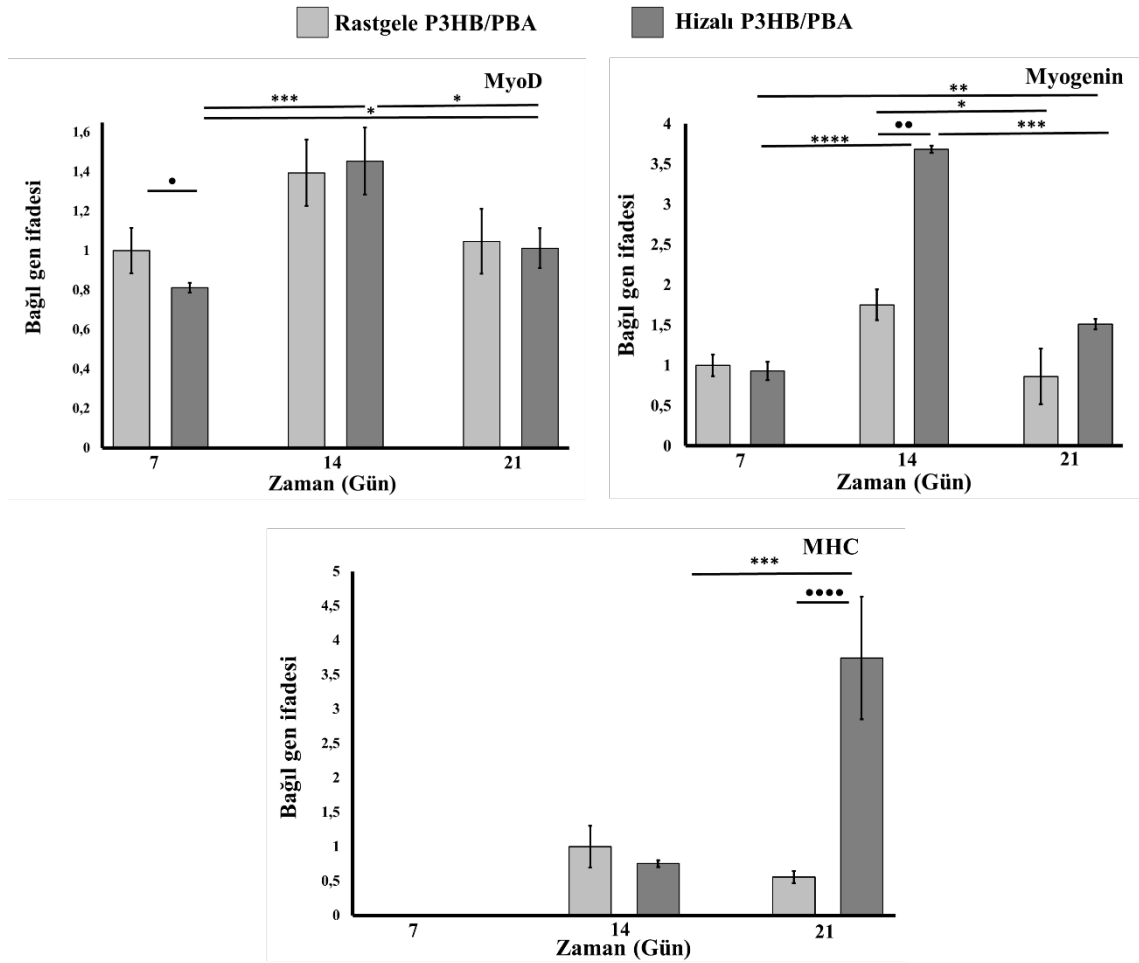
Rastgele matrikslerdeki hücrelerin boşluk bırakmayacak kadar yayıldıkları ve yer yer düzenli yapılar oluşturabildikleri tespit edilmiştir. Hizalı matriksler üzerindeki hücrelerin 14. günden itibaren, miyojenik farklılaşmanın önemli bir göstergesi olan, düzenli ve paralel oryantasyonda fiber benzeri yapılar oluşturduğu belirlenmiştir. **Şekil 4.25**'te çok çekirdekli miyofibriller kırmızı oklarla gösterilmiştir. Hizalanmış matrikslerin z-ekseninden alınan görüntülerde, 14. günden itibaren, hücrelerin derinlik boyunca hizalandıkları ve bu yönelimi kültürün 21. gününde de koruyabildikleri tespit edilmiştir.

Ayrıca, **Şekil 4.25**'te sarı oklar ile belirtilen yapıların muhtemel nöromusküler bağlantı noktaları olduğu düşünülmektedir. Benzer morfolojik yapılara aynı güne ait SEM fotoğraflarında da rastlanmıştır. Buna karşılık, rastgele matriksler üzerindeki hücrelerin yüzeyden kısmen ayrıldığı ve az sayıda oluşmuş düzenli yapıların da 21. güne gelindiğinde bozulduğu gözlemlenmiştir.

4.3.3.3. Gen ekspresyonu analizleri

Rastgele ve hizalı P3HB/PBA nanofiber matriksler üzerindeki C2C12 hücrelerinin miyojenik farklılaşma belirteci MyoD ve Myogenin gen ifadeleri ve miyojenik maturasyon belirteci MHC bağıl gen ifadesi RT-qPCR analizi ile belirlenmiştir. Kültürün 7., 14. ve 21. günlerinde yapılan RT-qPCR analizi sonuçları **Şekil 4.26**'da verilmiştir.

Birincil miyojenik faktörlerden biri olan MyoD, miyoblast farklılaşmasını kontrol eden önemli bir belirteç olup G1 fazında en yüksek düzeyde ifade edilirken, G1'den S fazına geçişte minimum düzeyde ifade edilir [33]. Rastgele matriksler üzerindeki C2C12 hücrelerinin MyoD bağıl gen ifadeleri gün bazında karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$). Ancak, farklılaşmanın erken bir aşaması olan kültürün 7. gününde, hizalı matrikslerde, MyoD ifadesinde anlamlı bir artış gözlemlenirken ($***p<0,001$), farklılaşmasının geç bir aşaması olan kültürün 14. gününde MyoD ifadesinde anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir ($*p<0,05$). Hizalı matriksler üzerindeki C2C12 hücrelerinin MyoD ifadesindeki değişimlerin doğal iskelet kası dokusu ile uyumlu olduğu belirlenmiştir. Rastgele ve hizalı matriksler karşılaştırıldığında, MyoD ifadesi rastgele matrikslerde sadece kültürün 7. gününde anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($*p<0,05$). Aynı günlerde yapılan MTT ve SEM analizleri ile de açıklandığı üzere, rastgele matriksler üzerindeki hücrelerin aşırı üremesine ve temasına bağlı olarak, hücrelerde farklılaşma gerçekleşmiştir. Beklendiği üzere, bu etki kültürün takip eden günlerinde fonksiyonel farklılaşma için yeterli olamamıştır.



Şekil 4.26. Rastgele ve hizalı P3HB/PBA nanofiber matrisler üzerinde kültürlenmiş C2C12 hücrelerinin kültürün 7., 14. ve 21. günlerinde bağımlı MyoD, Myogenin ve MHC gen ifadesi grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılıklar, $n = 4$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$ kontrol grubu rastgele matrisler olduğunda; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ kontrol grubu hizalı matrisler olduğunda).

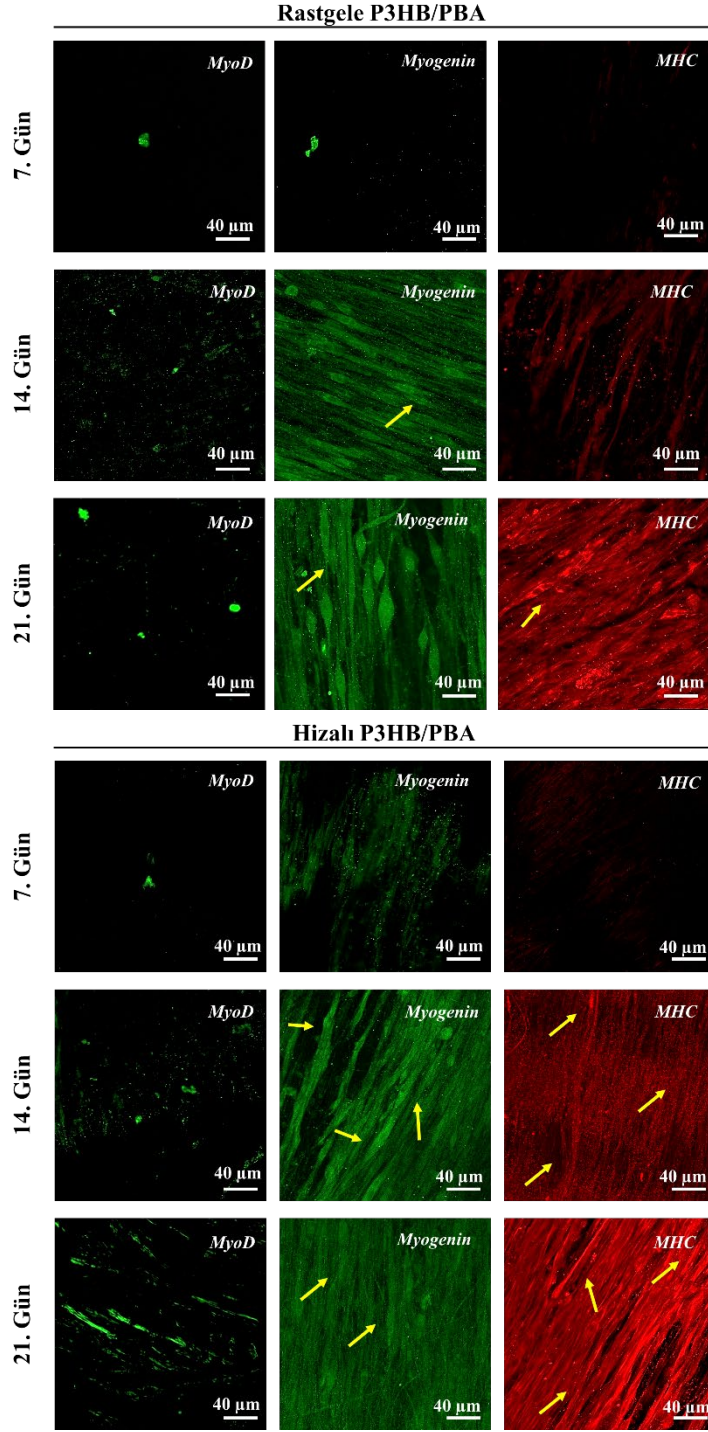
Miyoblast farklılaşmasını kontrol eden diğer önemli bir miyojenik faktör Myogenindir. Myogenin, miyojenik farklılaşmanın geç aşamasında ifade edilir. Myogenin gen ifadesi miyotübüler yapıların oluşumunda etkilidir ve MyoD gen ifadesi tarafından kontrol edilir. Farklılaşmış hücreler yüksek düzeyde MyoD ve Myogenin genlerini ifade eder [160]. Rastgele matrisler üzerindeki C2C12 hücrelerinin Myogenin bağımlı gen ifadeleri gün bazında karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p > 0,05$). Ayrıca, kültürün 7. gününde, her iki grup matrisde de Myogenin ifadesinde anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p > 0,05$). C2C12 hücrelerinin hizalı matrisler üzerindeki Myogenin ifadesi kültürün 7. gününden 14. gününe gelindiğinde yaklaşık 3,5 kat artış (**** $p < 0,0001$) gösterirken,

rastgele matrikslerde anlamlı bir artış gözlemlenmemiştir ($p>0,05$). Aynı günlerde, hizalı matriksler üzerindeki hücreler daha yüksek oranda MyoD ifade ettiklerinden Myogenin ifadesinde de büyük bir artış gözlemlenmiştir. Miyotübüler yapıların oluşumunu kontrol eden Myogenin'in yüksek ifadesi, SEM analizi ve F-aktin/DAPI floresan boyama analizleri ile de gösterilmiştir. Ancak, kültürün 21. gününde C2C12 hücrelerinin hizalı matriksler üzerindeki Myogenin ifadesi matürasyon aşamasına geçiş nedeniyle önemli ölçüde azalmıştır ($***p<0,001$).

Diğer bir önemli miyojenik faktör miyofibrillerin entegrasyonunu ve kasılma aktivitesinin başlamasını kontrol eden MHC'dir. Olgunlaşmış kas hücreleri, kalın filament proteini olan MHC'yi yüksek oranda ifade eder [34]. Farklılaşmanın 7. gününde rastgele ve hizalı matriksler üzerindeki C2C12 hücrelerinde MHC ifadesine rastlanmamıştır. Rastgele matriksler üzerindeki C2C12 hücrelerinin MHC bağıl gen ifadeleri gün bazında karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Kültürün 14. gününe gelindiğinde MHC gen ifadesinin, rastgele ve hizalı matriksler arasında anlamlı bir fark olmadan, arttığı gözlemlenmiştir ($p>0,5$). Hizalı matrikslerde MHC gen ifadesi kültürün 21. gününde yaklaşık 5 kat artış göstermiştir ($***p<0,001$). Bu artış, SEM analizi ve F-aktin/DAPI floresan boyama analizi ile de gösterildiği üzere, füzyona uğramış miyotüpler tarafından oluşturulan kalın filamentlerden kaynaklanmaktadır. Ayrıca, hizalı matrikslerdeki MHC gen ifadesinin rastgele matrikslere göre yaklaşık 7 kat daha yüksek olduğu belirlenmiştir ($***p<0,0001$). Sonuç olarak, hizalı matriksler üzerinde kültürlenmiş C2C12 hücrelerinin farklılaşma aşamasından matürasyon aşamasına geçebileceği gösterilmiştir.

4.3.3.4. İmmünohistokimyasal analizler

Rastgele ve hizalı matriksler üzerindeki C2C12 hücrelerinin miyojenik belirteçleri immünohistokimya analizi ile belirlenmiştir. Kültürün 7., 14. ve 21. günlerinde yapılan MyoD, Myogenin ve MHC antikor boyaması konfokal mikroskop görüntüleri **Şekil 4.27**'de verilmiştir.



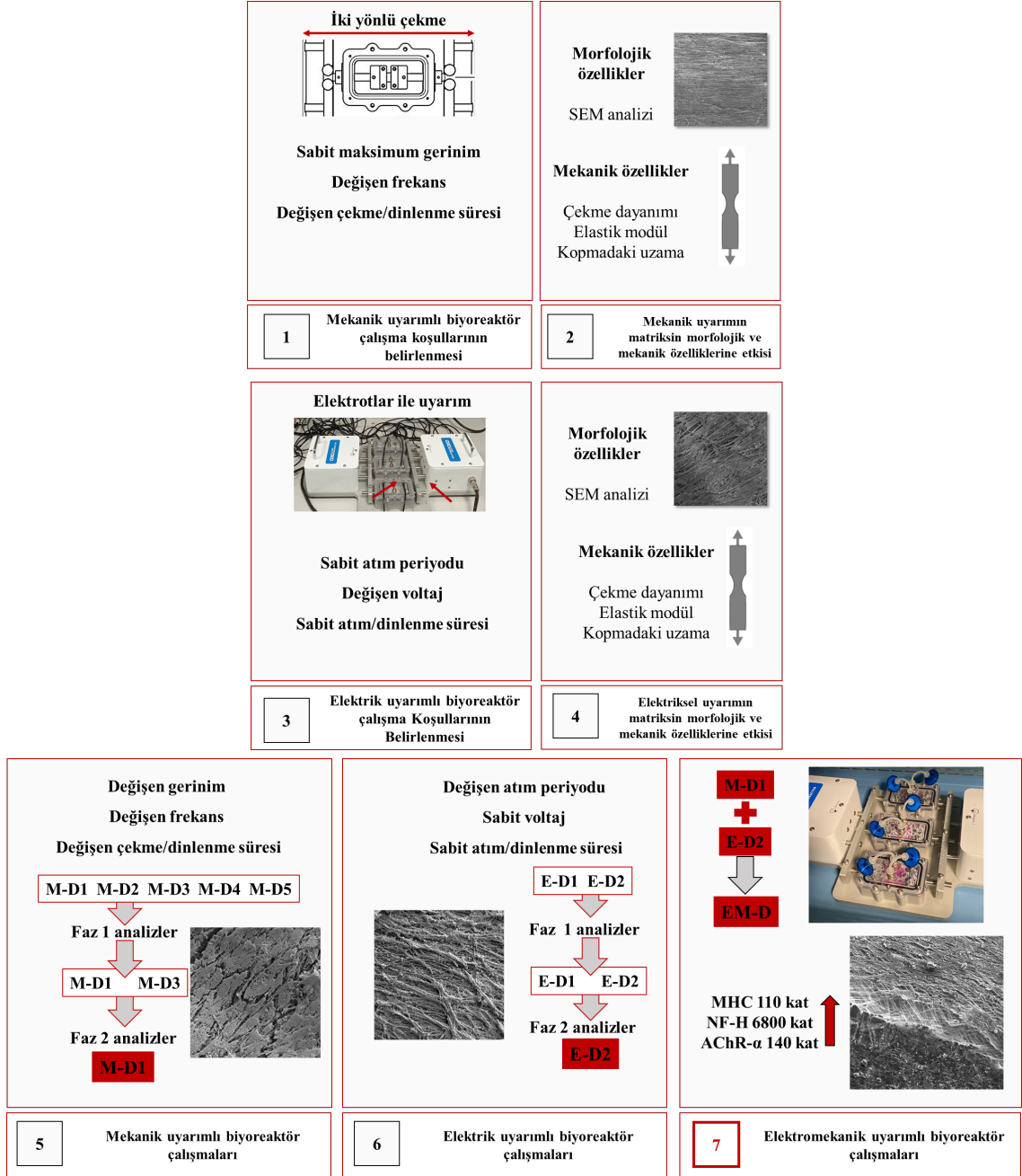
Şekil 4.27. Rastgele ve hizalı P3HB/PBA nanofiber matrisler üzerinde kültürlenmiş C2C12 hücrelerinin kültürün 7., 14. ve 21. günlerinde MyoD, Myogenin ve MHC immünohistokimyasal boyama konfokal mikroskobu görüntüleri. Sarı oklar miyofibrilleri belirtmektedir. MyoD (yeşil) antijeni hücre çekirdeğinde, Myogenin (yeşil) antijeni hücre iskeletinde ve MHC (kırmızı) antijeni kalın filamentlerde lokalize olmuştur.

Kasa spesifik proteinler kas farklılaşmasının farklı aşamalarında aktivasyon gösterirler [163]. Bu nedenle, miyojenik düzenleyici faktörler olan MyoD ve Myogenin antijenleri ile farklılaşmanın erken aşama analizleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, MHC antijeni ile maturasyon aşaması analizleri gerçekleştirilmiştir. MyoD antijeni çekirdekte lokalize olurken, Myogenin antijeni ifade yoğunluğuna bağlı olarak çekirdek veya sitoplazmada lokalize olmuştur. Rastgele ve hizalı matrikslerde kültürün 7. gününde MyoD ve Myogenin pozitif hücreler arasında anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. Ancak 14. günden itibaren hizalı matrikslerde MyoD ve Myogenin pozitif hücrelerde artış belirlenmiştir. Hizalı matrikslerde Myogenin pozitif hücreler, fonksiyonel miyojenik farklılaşmaya bağlı olarak hizalanmış tübüler yapıların oluştuğunu göstermiştir.

MHC antijeni ise kalın filamentlerde lokalize olmuştur. Kültürün 7. gününde her iki matriks grubunda da MHC pozitif hücrelere rastlanamazken, 14. günden itibaren her iki matriks grubunda da MHC pozitif hücreler, RT-qPCR analizine benzer şekilde gözlemlenmiştir. Rastgele matrikslerde, kültürün 14. gününden itibaren miyofilamentler oluşmaya başlasa da bu filamentler matrikslerin yetersiz mekanik ve morfolojik özellikleri nedeniyle fonksiyonel hale gelememiştir. Sarı oklar, rastgele matrikslerde 21. günde oluşan ince miyofibril yapıları göstermektedir. Hizalı matrikslerde ise kültürün 14. gününden itibaren anlamlı derecede kalın miyofilament oluşumu belirlenmiştir. Sarı oklar, hizalı matriksler üzerindeki fonksiyonel miyofibril yapılarını kültürün 14. gününden itibaren göstermektedir. Miyojenik farklılaşma (MyoD ve Myogenin) ve miyojenik maturasyon (MHC) belirteçleri, hizalı P3HB/PBA nanofiber matrikslerin, RT-qPCR analizi, SEM analizi ve F-aktin/DAPI konfokal görüntüleme sonuçlarıyla uyumlu olarak, miyojenik farklılaşmayı başarılı bir şekilde desteklediğini göstermiştir.

KISIM II

Miyojenik uyumluluğu gösterilen ve miyojenik farklılaşmayı üstün bir şekilde desteklediği belirlenen hizalı P3HB/PBA nanofiber matrisler ile literatürde ilk defa gerçekleştirilen mekanik, elektrik ve elektromekanik uyarımlı biyoreaktör çalışmalarına ait sonuç ve tartışmalar bu bölümde detayları ile verilmiştir. Şekil 4.28'de Kısım II çalışmalarına ait akış özetlenmiştir.



Şekil 4.28. Tez çalışmasının ikinci kısmına ait akış şeması.

4.4. Hücre Kültürü Öncesi Çalışmalar

Dinamik hücre kültüründe mekanik, elektrik ve elektromekanik uyarımlı biyoreaktör çalışmaları öncesinde mekanik ve elektrik uyarımlı biyoreaktör çalışma koşullarının belirlenmesine yönelik ön denemeler gerçekleştirilmiştir. Ön denemelerde hizalı P3HB/PBA nanofiber matrikslerin mekanik ve elektriksel uyarımlara verdiği cevaplar morfolojik ve mekanik analizler ile tespit edilmiştir.

4.4.1. Mekanik Uyarımlı Biyoreaktör Çalışma Koşullarının Belirlenmesi

Mekanik uyarımlı biyoreaktör çalışmaları, %15 sabit maksimum gerinimde, farklı frekans (0,5 Hz, 1 Hz ve 2 Hz) ve farklı döngüsel uygulama sıklıklarında (6 sa çekme/18 sa dinlenme, 1 sa çekme/5 sa dinlenme ve 20 dk çekme/2 sa dinlenme) gerçekleştirilmiştir. Yüzde 15 maksimum gerinim değeri, literatürdeki en yüksek gerinim değeri belirlenerek seçilmiştir. Matrikslerin %15 gerinime gösterdiği mekanik dayanımın yeterli olması durumunda, hücre kültüründe kullanılması planlanan gerinim değerlerine de (%5 ve %10) mekanik dayanım göstereceği varsayılmıştır. Yedi günlük uygulama sonrasında biyoreaktörden alınan matrikslere çekme testleri ve SEM analizi uygulanmıştır.

4.4.1.1. Mekanik uyarımın mekanik özelliklere etkisi

Mekanik uyarımlar sonucunda hizalı P3HB/PBA nanofiber matrikslerin mekanik özelliklerindeki değişimler **Çizelge 4.5**'te özetlenmiş ve **Şekil 4.29**'da karşılaştırmalı grafikleri verilmiştir. Kısım I'de yapılan analizler ile mekanik uyarım öncesinde hizalı matrikslere ait çekme dayanımı, kopmadaki uzama ve elastik modül değerleri sırasıyla; $8,5 \pm 1,8$ MPa, $\%76,0 \pm 1,3$ ve $378,2 \pm 4,2$ MPa olarak belirlenmiştir.

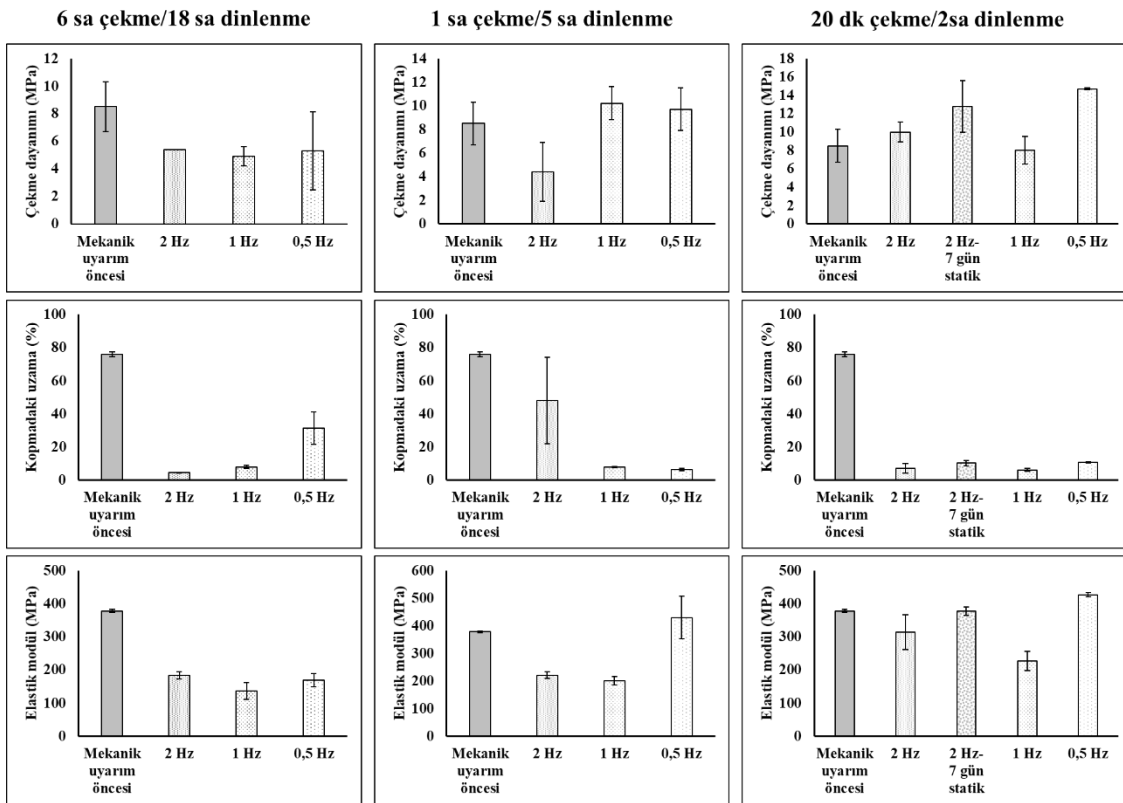
Çizelge 4.5. Belirlenen farklı koşullarda uygulanan mekanik uyarımlar sonucunda hizalı P3HB/PBA nanofiber matrikslerin mekanik özelliklerindeki değişimler.

Uyarım öncesi mekanik özellikler						
Çekme dayanımı (MPa)		Kopmadaki uzama (%)		Elastik modül (MPa)		
8,5 ± 1,8		76,0 ± 1,3		378,2 ± 4,2		
Mekanik uyarımlı biyoreaktör ön denemeleri						
6 sa çekme / 18 sa dinlenme - %15 gerinim						
Frekans (Hz)	Çekme dayanımı (MPa)	Değişim (%)	Kopmadaki uzama (%)	Değişim (%)	Elastik modül (MPa)	Değişim (%)
0,5	5,3 ± 2,8	37 ↓	31,40 ± 9,8	58 ↓	168,9 ± 20,7	55 ↓
1	4,9 ± 0,7	42 ↓	7,85 ± 0,9	91 ↓	136,9 ± 25,2	67 ↓
2*	5,4 ± 0,1	Başarısız	4,4 ± 0,2	Başarısız	183,5 ± 11,1	Başarısız
1 sa çekme / 5 sa dinlenme - %15 gerinim						
Frekans (Hz)	Çekme dayanımı (MPa)	Değişim (%)	Kopmadaki uzama (%)	Değişim (%)	Elastik modül (MPa)	Değişim (%)
0,5	9,7 ± 1,8	14 ↑	6,4 ± 0,7	91 ↓	429,4 ± 77,2	13 ↑
1	10,2 ± 1,4	20 ↑	7,7 ± 0,3	89 ↓	199,9 ± 15,0	47 ↓
2	4,4 ± 2,5	48 ↓	47,9 ± 26,1	36 ↓	220,8 ± 11,5	41 ↓
20 dk çekme / 2 sa dinlenme - %15 gerinim						
Frekans (Hz)	Çekme dayanımı (MPa)	Değişim (%)	Kopmadaki uzama (%)	Değişim (%)	Elastik modül (MPa)	Değişim (%)
0,5	14,7 ± 0,1	72 ↑	10,7 ± 0,4	85 ↓	427,3 ± 6,9	13 ↑
1	8,0 ± 1,5	6 ↓	6,1 ± 0,8	92 ↓	227,3 ± 28,8	40 ↓
2	10,0 ± 1,1	17 ↑	6,9 ± 2,9	87 ↓	314,9 ± 52,6	16 ↓
2**	12,8 ± 2,8	50 ↑	10,2 ± 1,7	86 ↓	377,6 ± 12,5	0,2 ↓

*3 örnekten biri başarısız oldu.

**Matriksler 7 günlük mekanik uyarımdan önce 7 gün boyunca PBS içerisinde statik ortamda bekletilmiştir.

Matrikslerin mekanik özellikleri mekanik uygulamalar öncesinde iskelet kası dokusuna uygun olduğundan, uygulamalar sonrasında da bu özelliklerin bir kısmını korumaları beklenmiştir. İskelet kası kasılma özelliği olan bir doku olduğundan, en önemli mekanik parametrelerden biri çekme dayanımıdır. Çekme dayanımının, uygulama öncesindeki değerine göre %25 oranından daha fazla azaldığı gruplar başarısız olarak kabul edilmiştir. Yüzde 15 gerinimde 7 gün boyunca 2 Hz frekansta 6 sa çekme/18 sa dinlenme döngüsel uygulama sıklığında mekanik uyarım yapılan matrikslerin 3'te biri, uygulama sırasında, reaktör içerisinde kopmuştur. Kalan matriksler ile yapılan mekanik analizler ile, çekme dayanımı değeri $5,4 \pm 0,1$ MPa, kopmadaki uzama değeri $\%4,4 \pm 0,2$ ve elastik modül değeri $183,5 \pm 11,1$ MPa olarak tespit edilmiştir. Yüzde 15 gerinimde 7 gün boyunca 1 Hz ve 0,5 Hz frekanslarda 6 sa çekme/18 sa dinlenme döngüsel uygulama sıklığında mekanik uyarım yapılan matrikslerin çekme dayanımları uygulama öncesine göre sırasıyla %42 ve %37 oranında azalarak $4,9 \pm 0,7$ MPa ve $5,3 \pm 2,8$ MPa değerlerine düşmüştür.



Şekil 4.29. Yüzde 15 sabit gerinimde, 7 gün boyunca, 6 sa çekme/18 sa dinlenme, 1 sa çekme/5 sa dinlenme ve 20 dk çekme/2 sa dinlenme döngüsel uygulama sıklıklarında çift yönlü mekanik uyarıma maruz bırakılan hizalı P3HB/PBA nanofiber matrikslerin 2 Hz, 1 Hz ve 0,5 Hz frekanslarda mekanik özelliklerindeki değişimler.

Benzer uyarımda matrikslerin kopmadaki uzama değerleri uygulama öncesine göre sırasıyla %91 ve %58 oranında azalma göstermiş, $7,8 \pm 0,9$ ve $31,4 \pm 9,8$ kopmadaki uzama değerleri elde edilmiştir. Elastik modül değerleri ise uygulama öncesine göre sırasıyla %67 ve %55 oranında azalma göstererek $136,9 \pm 25,2$ MPa ve $168,9 \pm 20,7$ MPa değerlerine düşmüştür. Yüksek frekans ve uzun süreli uygulama sıklığında P3HB ve PBA polimer zincirlerinin ve dolayısıyla hizalı fiber matriks yapısının başarısız olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle 6 sa çekme/18 sa dinlenme sıklığı şeklindeki uygulama elenmiştir.

Yüzde 15 gerinimde 7 gün boyunca 2 Hz, 1 Hz ve 0,5 Hz frekanslarda 1 sa çekme/5 sa dinlenme döngüsel uygulama sıklığında mekanik uyarım yapılan matrikslerin çekme dayanımları uygulama öncesine göre sırasıyla, %48 oranında azalma, %20 ve %14 oranında artış göstererek $4,4 \pm 2,5$ MPa, $10,2 \pm 1,4$ MPa ve $9,7 \pm 1,8$ MPa değerlerini almıştır. Benzer uyarımda matrikslerin kopmadaki uzama değerleri uygulama öncesine göre sırasıyla %36, %89 ve %91 oranında azalma göstermiş, $47,9 \pm 26,1$, $7,7 \pm 0,3$ ve $6,4 \pm 0,7$ kopmadaki uzama değerleri elde edilmiştir. Elastik modül değerleri ise uygulama öncesine göre sırasıyla %41 ve %47 oranında azalma ve %13 oranında artış göstererek $220,8 \pm 11,5$ MPa, $199,9 \pm 15$ MPa ve $429,4 \pm 77,2$ MPa değerlerini almıştır. Sadece 2 Hz frekansta mekanik uyarım öncesine göre istatistiksel olarak anlamlı düşüş gözlemlenmiş, diğer frekanslardaki artış anlamlı bir farklılık yaratmamıştır. Daha kısa süreli uygulama sıklığında, özellikle düşük frekanslarda hizalı fiber matrikslerin daha başarılı olabileceği görülmüştür.

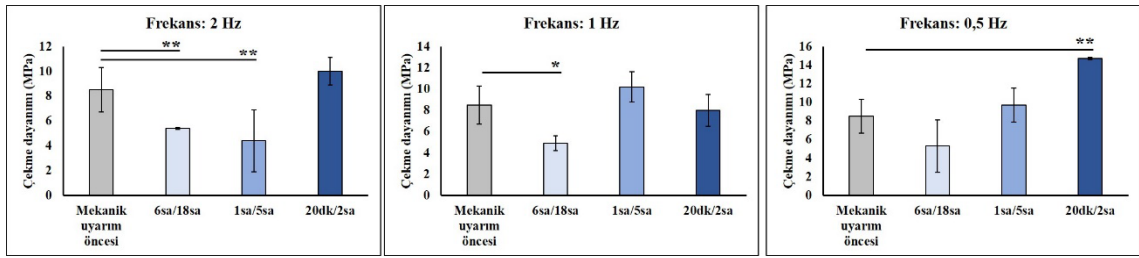
P3HB, asimetrik karbon atomlarına sahip helikal formda optik olarak aktif, kristalin ve piezoelektrik bir polimerdir. PBA ise diğer poliamitlere kıyasla yüksek kristaliniteye sahip bir helikal polimerdir [140]. Buna rağmen PBA katkılanması ve elektroçirime işlemi ile P3HB'nin kristalinitesi azalmaktadır. P3HB ve PBA zincirleri arasında hidrojen bağları kurulmakta ve elektroçirime işlemi sırasında heliks yapıların birbirine dolandığı tahmin edilmektedir. Helikal polimerlerde, çekme ile kristalin ve kristalin olmayan bölgeler yönlenebilir ve lamellalar arasında düzenli fazlar oluşturmaktadır [133]. Hizalı fiber eksenini boyunca çekme işlemi uygulandığında ilk önce amorf bölgeler yer değiştirmekte, ardından kristalin bölgelerde deformasyonlar başlamaktadır [147]. Mekanik uyarım biyoreaktörü 1 sa boyunca çekme/bırakma hareketi uygulamaktadır. Bu süre, yapıdaki amorf bölgelerin çekme hareketi ile açılmasına, bırakma hareketi ile tekrar

eski haline gelmesine olanak tanımaktadır. Böylece yapının temel mekanik özelliklerini belirleyen kristalin ve yarı kristalin bölgeler kısmen korunmaktadır.

Yüzde 15 gerinimde 7 gün boyunca 2 Hz frekansta 20 dk çekme/2 sa dinlenme döngüsel uygulama sıklığında mekanik uyarım yapılan matriksler iki farklı uygulamaya tabii tutulmuştur. İlkinde matriksler uygulama öncesinde 7 gün boyunca PBS ortamında statik koşulda bekletildikten sonra reaktör uygulamasına alınmışlardır. İkincisinde ise matriksler doğrudan reaktör uygulamasına alınmışlardır. PBS ortamında bekletilen matrikslerin çekme dayanımı uygulama öncesine göre %50 oranında artış göstererek $12,8 \pm 2,8$ MPa değerine yükselmiştir. Kopmadaki uzama değeri uygulama öncesine göre %86 oranında azalma ile $10,2 \pm 1,7$ değerine, elastik modül değeri uygulama öncesine göre %0,2 oranında azalma ile $377,6 \pm 12,5$ MPa değerine düşmüştür. Doğrudan reaktöre alınan matrikslerin çekme dayanımı uygulama öncesine göre %17 oranında artışla $10,0 \pm 1,1$ MPa değerini, kopmadaki uzama değeri %87 oranında azalma ile $6,9 \pm 2,9$ değerini, elastik modülü ise %16 oranında azalma ile $314,9 \pm 52,6$ MPa değerini almıştır. PBS içerisinde bulunan tuzların ve ortamda bulunan su moleküllerinin polimer zincirleri arasına girerek zincirlerin daha rahat hareket etmesini sağladığı ve böylece çekme/bırakma hareketi sırasında amorf bölgelerin çok daha az strese maruz kaldığı söylenebilir. Ayrıca P3HB/PBA hizalı matriksler hidrolitik bozunmaya karşı dayanıklı olduğundan bu süre zarfında bozunmadan kalabilmiştir. Hücre kültürü çalışmaları su içeren ortamda gerçekleştirildiğinden alınan sonuç önemlidir.

Yüzde 15 gerinimde 7 gün boyunca 1 Hz ve 0,5 Hz frekanslarda 20 dk çekme/2 sa dinlenme döngüsel uygulama sıklığında mekanik uyarım yapılan matrikslerin çekme dayanımları uygulama öncesine göre sırasıyla %6 oranında azalma ve %72 oranında artış göstererek $8,0 \pm 1,5$ MPa ve $14,7 \pm 0,1$ MPa değerlerini almışlardır. Benzer uyarımda matrikslerin kopmadaki uzama değerleri uygulama öncesine göre 1 Hz ve 0,5 Hz frekanslarda sırasıyla %92 ve %85 oranında azalma göstermiş, $6,1 \pm 0,8$ ve $10,7 \pm 0,4$ kopmadaki uzama değerleri elde edilmiştir. Elastik modül değerleri ise uygulama öncesine göre 1 Hz ve 0,5 Hz frekanslarda sırasıyla %40 oranında azalma ve %13 artış göstererek $227,3 \pm 28,8$ MPa ve $427,3 \pm 6,9$ MPa değerlerini almıştır. Sabit %15 gerinim ve 20 dk çekme/2 sa dinlenme uygulama sıklığında, tüm frekanslarda çekme dayanımında artış veya %25'ten az azalma belirlenmiştir. Buradan en başarılı uygulama grubunun 20 dk çekme/2 sa dinlenme uygulama sıklığı içeren gruplar olduğu sonucuna varılabilmektedir. Yukarıda açıklanan amorf ve kristalin bölgelerin yer değiştirmesi ve

buna bağılı sonuçlar bu uygulama sıklığı için de geçerlidir. Ek olarak çekme/bırakma süresinin daha da kısa olması ile, amorf bölgelerin yeniden düzenlenme esnasında hizalandığı ve buna bağılı olarak çekme dayanımında artış görüldüğü söylenebilmektedir [164, 165]. Literatürde gerinim ile malzeme çekme dayanımında artış gözlenen birçok çalışma mevcuttur [166-167]. İskelet kas dokusu için en kritik mekanik özelliklerden biri çekme dayanımı olduğundan maksimum gerinimde, ancak farklı frekans ve farklı uygulama sıklıklarında elde edilen çekme dayanımı değerleri istatistiksel anlamlılığın belirlenmesi amacıyla analiz edilmiş ve sonuçlar Şekil 4.30’da verilmiştir.



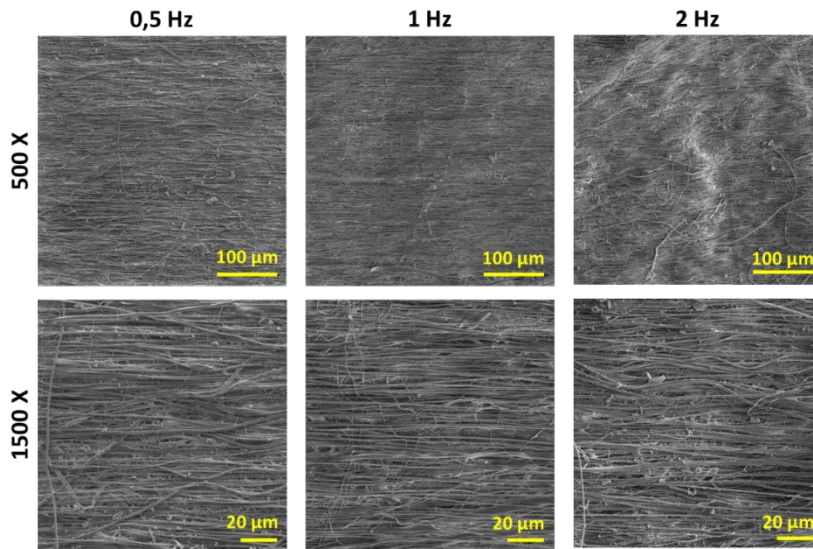
Şekil 4.30. Yüzde 15 sabit gerinimde, 7 gün boyunca, 6 sa çekme/18 sa dinlenme, 1 sa çekme/5 sa dinlenme ve 20 dk çekme/2 sa dinlenme döngüsel uygulama sıklıklarında çift yönlü mekanik uyarıma maruz bırakılan hizalı P3HB/PBA nanofiber matrislerin 2 Hz, 1 Hz ve 0,5 Hz frekanslarda çekme dayanımındaki değişimler (İstatistiksel olarak önemli farklar $n = 3$, $*p < 0,05$ ve $**p < 0,01$ mekanik uyarım öncesi matrisler kontrol grubu olduğunda).

Mekanik uyarım öncesi matrisler kontrol grubu seçilerek yapılan istatistiksel analizlerde 2 Hz frekansta 6 sa çekme/18 sa dinlenme ve 1 sa çekme/5 sa dinlenme döngüsel uygulama sıklıklarında matrislerin çekme dayanımında anlamlı ölçüde azalma olduğu tespit edilmiştir ($**p < 0,01$). Uygulama sıklığının 20 dk çekme/2 sa dinlenme olduğu durumda ise uyarım öncesine göre anlamlı bir değişim belirlenmemiştir ($p > 0,05$). Frekans 1 Hz’e düşürüldüğünde mekanik uyarım öncesine göre sadece 6 sa çekme/18 sa dinlenme uygulaması yapılan grupta anlamlı derecede düşüş gözlemlenirken ($*p < 0,05$), diğer uygulama sıklıklarında anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir ($p > 0,05$). En düşük frekans değeri 0,5 Hz’te ise mekanik uyarım öncesine göre sadece 20 dk çekme/2 sa dinlenme uygulaması yapılan grupta anlamlı ölçüde artış gözlemlenirken ($**p < 0,01$), diğer uygulama sıklıklarında anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir ($p > 0,05$). Bulgular ışığında 1 sa çekme/5 sa dinlenme-0,5 Hz, 1 sa çekme/5 sa dinlenme-1 Hz, 20 dk çekme/2 sa dinlenme-0,5 Hz ve 20 dk çekme/2 sa dinlenme-1 Hz parametreleri, çekme

dayanımında mekanik uyarım öncesine göre %25 oranından fazla azalmanın olmadığı koşulları içermektedir.

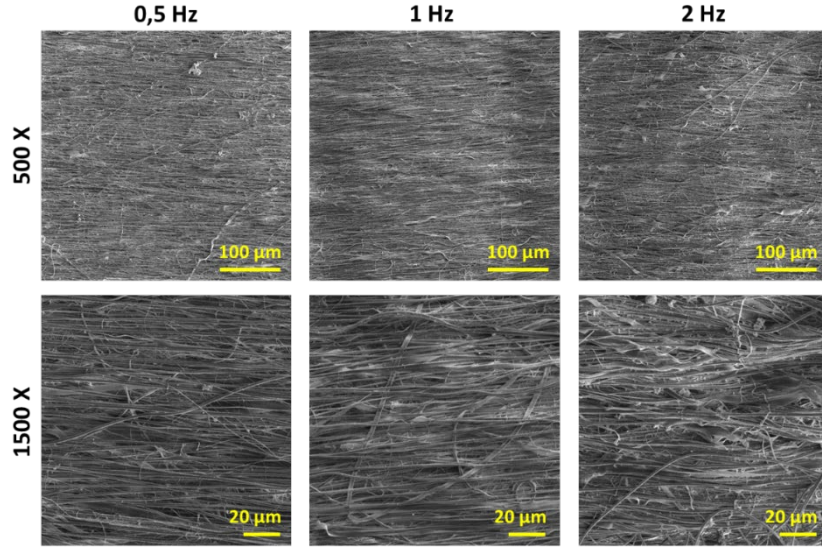
4.4.1.2. Mekanik uyarımın morfolojik özelliklere etkisi

Hızalı P3HB/PBA nanofiber matrislerin mekanik uyarım sonrası morfolojileri SEM analizi ile incelenmiştir. Şekil 4.31, Şekil 4.32 ve Şekil 4.33'te farklı frekans ve uygulama sıklıklarında, maksimum gerinimde mekanik uyarıya maruz bırakılan matrislerin farklı büyütmelelerdeki SEM fotoğrafları verilmiştir.



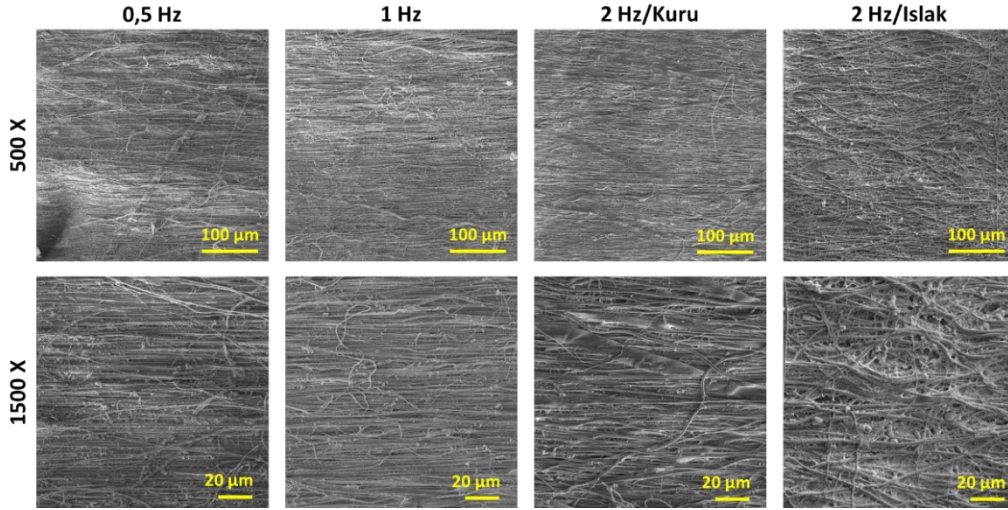
Şekil 4.31. Yüzde 15 gerinimde, 6 sa çekme/18 sa dinlenme döngüsel uygulama sıklığında, 0,5 Hz, 1 Hz ve 2 Hz frekansta 7 gün boyunca çift yönlü mekanik uyarıya maruz bırakılan hizalı P3HB/PBA nanofiber matrislere ait farklı büyütmelelerde SEM fotoğrafları.

Yüzde 15 gerinimde, 6 sa çekme/18 sa dinlenme döngüsel uygulama sıklığında, 0,5 Hz, 1 Hz ve 2 Hz frekansta 7 gün boyunca çift yönlü mekanik uyarıya maruz bırakılan matrislere ait SEM fotoğrafları incelendiğinde hizalı fiber morfolojisinin büyük ölçüde korunduğu ancak fiberlerde yüksek oranda kopma ve deformasyonların meydana geldiği tespit edilmiştir. Bunlara bağlı olarak mekanik özelliklerdeki olumsuz değişimler bu grubun elenmesine karar verilmesinde önemli bir etken olmuştur.



Şekil 4.32. Yüzde 15 gerinimde, 1 sa çekme/5 sa dinlenme döngüsel uygulama sıklığında, 0,5 Hz, 1 Hz ve 2 Hz frekansta 7 gün boyunca çift yönlü mekanik uyarıya maruz bırakılan hizalı P3HB/PBA nanofiber matrislere ait farklı büyütme ölçeklerinde SEM fotoğrafları.

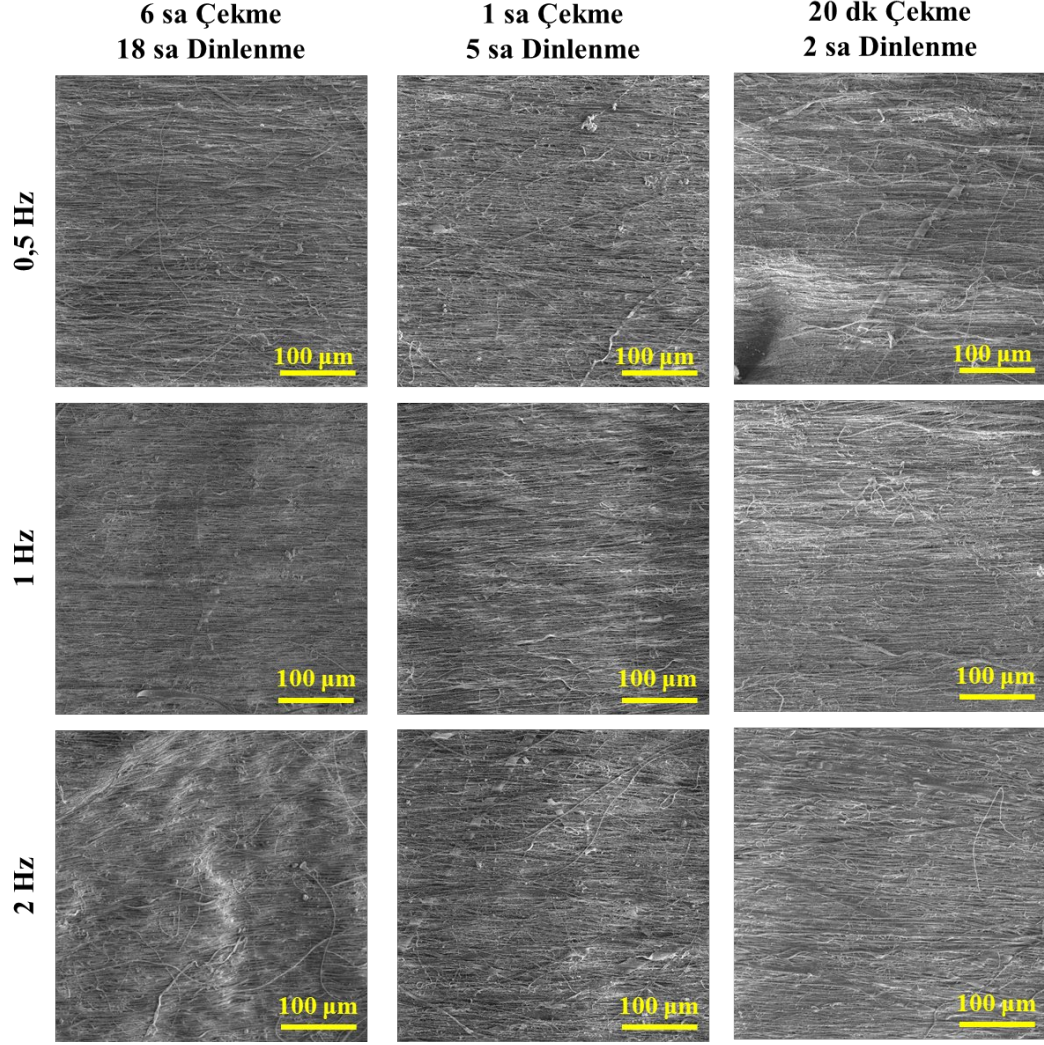
Yüzde 15 gerinimde, 1 sa çekme/5 sa dinlenme döngüsel uygulama sıklığında, 0,5 Hz, 1 Hz ve 2 Hz frekansta 7 gün boyunca çift yönlü mekanik uyarıya maruz bırakılan matrislere ait SEM fotoğrafları incelendiğinde, 0,5 Hz frekans uygulaması yapılan grup haricinde, 1 Hz ve 2 Hz frekans uygulaması yapılan gruplarda hizalı fiber morfolojisinin bozulduğu, fiberlerin koptuğu ve deforme olduğu tespit edilmiştir. Sadece 0,5 Hz grubunda hizalı morfolojinin korunması, fiberlerin deforme olmaması ve bunlara bağlı olarak çekme dayanımında artış belirlenmesi bu grubun hücre kültürü ön çalışmalarına geçmesinde önemli bir etken olmuştur.



Şekil 4.33. Yüzde 15 gerinimde, 20 dk çekme/2 sa dinlenme döngüsel uygulama sıklığında, 0,5 Hz, 1 Hz ve 2 Hz frekansta 7 gün boyunca çift yönlü mekanik uyarıya maruz bırakılan hizalı P3HB/PBA nanofiber matrislere ait farklı büyütme SEM fotoğrafları.

Yüzde 15 gerinimde, 20 dk çekme/2 sa dinlenme döngüsel uygulama sıklığında, 0,5 Hz, 1 Hz ve 2 Hz frekansta 7 gün boyunca çift yönlü mekanik uyarıya maruz bırakılan matrislere ait SEM fotoğrafları incelendiğinde, 2 Hz frekansta 7 günlük PBS uygulaması yapılan ve doğrudan reaktöre alınan matrislerin hizalanmış morfolojilerinde ve fiber yapılarında ciddi deformasyonların meydana geldiği belirlenmiştir. Fiberlerin kopmaması ve yapısal olarak deforme olmaması mekanik özelliklerin korunmasının bir açıklaması olabilmektedir. Ancak 0,5 Hz ve 1 Hz frekansta uygulama yapılan matrislerin hizalanmış formunu koruduğu ve fiber kopmalarının minimal düzeyde olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenler ile 0,5 Hz ve 1 Hz frekans grupları hücre kültürü çalışmalarında kullanılmak üzere seçilen diğer grupları oluşturmuştur.

Mekanik uyarım gruplarının karşılaştırmalı morfolojisi **Şekil 4.34**'te verilmiştir. Yapılan analizler sonucunda hücre kültürü çalışmalarına 0,5 Hz ve 1 Hz frekans değerleri ve 1 sa çekme/5 sa dinlenme ve 20 dk çekme/2 sa dinlenme döngüsel uygulama sıklığı değerleri ile devam edilmesi gerektiğine karar verilmiştir.



Şekil 4.34. Yüzde 15 gerinimde, 0,5 Hz, 1 Hz ve 2 Hz frekansta, 7 gün boyunca çift yönlü mekanik uyarıya maruz bırakılan hizalı P3HB/PBA nanofiber matrislerin farklı döngüsel uygulama sıklıklarındaki karşılaştırmalı SEM fotoğrafları (500X).

4.4.2. Elektrik Uyarımlı Biyoreaktör Çalışma Koşullarının Belirlenmesi

Elektrik uyarımlı biyoreaktör çalışmaları, 6 ms sabit atım periyodu ve 20 dk atım/2 sa dinlenme sabit döngüsel uygulama sıklığında, farklı voltajlarda (0,4 V ve 1,2 V) gerçekleştirilmiştir. Yedi günlük uygulamanın ardından biyoreaktörden alınan matrisler çekme testlerine ve SEM analizine tabii tutulmuştur.

4.4.2.1. Elektriksel uyarımın mekanik özelliklere etkisi

Elektriksel uyarımlar sonucunda hizalı P3HB/PBA nanofiber matrislerin mekanik özelliklerindeki değişimler **Çizelge 4.6**'da özetlenmiş ve **Şekil 4.35**'te karşılaştırmalı grafikleri verilmiştir. Kısım I'de yapılan analizler ile elektriksel uyarım öncesinde hizalı matrislere ait çekme dayanımı, kopmadaki uzama ve elastik modül değerleri sırasıyla; $8,5 \pm 1,8$ MPa, $\%76,0 \pm 1,3$ ve $378,2 \pm 4,2$ MPa olarak belirlenmiştir.

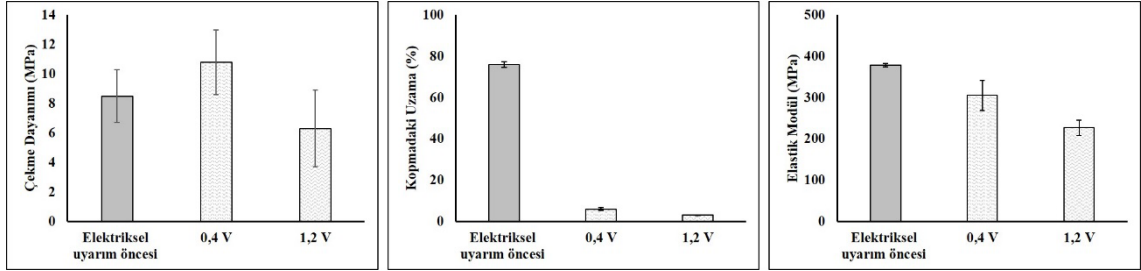
Çizelge 4.6. Belirlenen farklı koşullarda uygulanan elektriksel uyarımlar sonucunda hizalı P3HB/PBA nanofiber matrislerin mekanik özelliklerindeki değişimler.

Uyarım öncesi mekanik özellikler						
Çekme dayanımı (MPa)		Kopmadaki uzama (%)		Elastik modül (MPa)		
8,5 ± 1,8		76,0 ± 1,3		378,2 ± 4,2		
Elektrik uyarımlı biyoreaktör ön denemeleri						
20 dk atım / 1 sa dinlenme – 6 ms atım periyodu						
Voltaj (V)	Çekme dayanımı (MPa)	Değişim (%)	Kopmadaki uzama (%)	Değişim (%)	Elastik modül (MPa)	Değişim (%)
0,4	10,8 ± 2,2	27 ↑	5,9 ± 0,7	92 ↓	305,6 ± 36,6	19 ↓
1,2	6,3 ± 2,6	25 ↓	3,1 ± 0,1	95 ↓	226,7 ± 18,0	40 ↓

Hızlı P3HB/PBA nanofiber matrislerin piezoelektrik özellikleri belirlenmiş ve d_{33} piezoelektrik sabiti 5,3 pC/N olarak ölçülmüştür. Piezoelektrisite tersinir bir süreçtir. Bu nedenle elektriksel uyarımın malzemenin mekanik özelliklerinde değişimlere yol açması beklenmelidir. Hızlı P3HB/PBA nanofiber matrisler pasif elektroaktif (piezoelektrik) özellikler göstermesine karşın elektriksel olarak iletken değildir. Bu nedenle hücre kültürü çalışmalarından önce malzemenin elektriksel uyarıma vereceği cevap test edilmiştir.

Altı ms atım periyodunda, 7 gün boyunca, 20 dk atım/2 sa dinlenme döngüsel uygulama sıklığında elektriksel uyarıma maruz bırakılan matrislerin 0,4 V voltaj değerinde çekme dayanımı uygulama öncesine göre %27 oranında artış göstererek $10,8 \pm 2,2$ MPa değerine yükseldiği tespit edilmiştir. Ancak kopmadaki uzama değeri uygulama öncesine göre %92 oranında azalma göstererek $\%5,9 \pm 0,7$ değerine, elastik modül değeri %19 oranında azalma göstererek $305,6 \pm 36,6$ MPa değerine düşmüştür. Uygun voltajda uygulanan

potansiyel farkın, piezoelektrik tersinir süreçleri aktive ederek, malzemenin çekme dayanımında olumlu yönde bir değişiklik yapabildiği bu çalışma ile gösterilmiştir. Elektrik uygulaması ile zincir hareketliliğinin artmış olabileceği ve dipol rotasyonlar boyunca hizalanma ile çekme dayanımında artış gerçekleşmiş olabileceği düşünülmektedir.



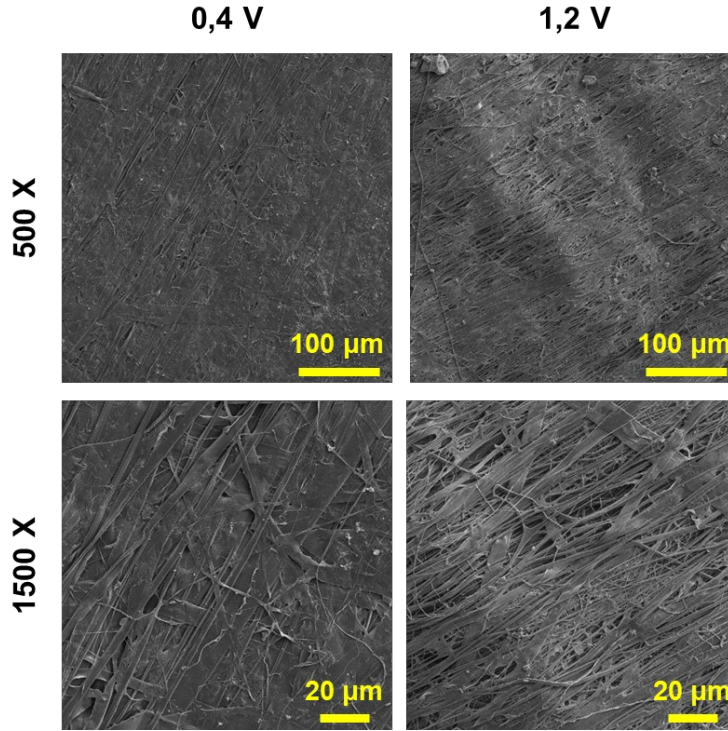
Şekil 4.35. Altı ms atım periyodunda, 7 gün boyunca, 20 dk atım/2 sa dinlenme döngüsel uygulama sıklığında elektriksel uyarıya maruz bırakılan hizalı P3HB/PBA nanofiber matrislerin 0,4 V ve 1,2 V voltajlarda mekanik özelliklerindeki değişimler.

Altı ms atım periyodunda, 7 gün boyunca, 20 dk atım/2 sa dinlenme döngüsel uygulama sıklığında elektriksel uyarıya maruz bırakılan matrislerin 1,2 V voltaj değerinde çekme dayanımı uygulama öncesine göre %25 oranında azalma ile $6,3 \pm 2,6$ MPa değerine, kopmadaki uzama miktarı %95 azalma ile $3,1 \pm 0,1$ değerine ve elastik modülü ise %40 oranında azalma ile $226,7 \pm 18,0$ MPa değerine düşmüştür. Hizalı P3HB/PBA nanofiber matrisler daha önce de belirtildiği gibi elektriksel olarak iletken değildir. Bu nedenle elektriğin iletilmesi pasif elektroaktif özellikler üzerinden belirli bir miktarda gerçekleşebilir. Verilen 1,2 V voltajın bu kapasiteyi aşmış olması mümkündür.

Düşük voltaj uygulaması ile çekme dayanımında artış gözlemlense de 0,4 V ve 1,2 V voltajlarda uyarım öncesi çekme dayanımı değerleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir ($p > 0,05$). Ancak çekme dayanımındaki artış ile 0,4 V voltaj parametresi, uygulama öncesi çekme dayanımına göre %25 oranından fazla azalma olmaması koşuluna uymaktadır.

4.4.2.2. Elektriksel uyarımın morfolojik özelliklere etkisi

Elektriksel uyarıma maruz bırakılmış hizalı P3HB/PBA nanofiber matrislerin morfolojileri incelenmiş ve Şekil 4.36'da matrislerin farklı büyütme ölçeklerindeki SEM fotoğrafları verilmiştir.



Şekil 4.36. Altı ms atım periyodunda, 7 gün boyunca, 0,4 V ve 1,5 V voltajda, 20 dk atım/2 sa dinlenme döngüsel uygulama sıklığında elektriksel uyarıma maruz bırakılan hizalı P3HB/PBA nanofiber matrislere ait farklı büyütme ölçeklerindeki SEM fotoğrafları.

Elektriksel uyarım her iki voltaj değerinde de fiber yapısında değişikliklere yol açmıştır. Özellikle 1,2 V voltaj değerinde fiberlerin yassılaştığı, kopmaların meydana geldiği, burğu biçimli yapıların oluştuğu ve hizalanmış morfolojinin bozulduğu görülmüştür. Ayrıca gözlemsel olarak yer yer oksitlenmelerin meydana geldiği de belirlenmiştir. Düşük voltajlı 0,4 V uygulamasında ise bölgesel olarak fiber hizalanmasının bozulduğu ve fiberlerin yassılaştığı ancak fiber hizalanmasının ve morfolojisinin kabul edilebilir düzeyde olduğu tespit edilmiştir. Ek olarak bu gruptaki hiçbir matrisde herhangi bir oksitlenme olmadığı belirlenmiştir.

Yapılan mekanik ve morfolojik analizler değerlendirildiğinde maksimum atım periyodunda dahi bir voltaj grubunun başarılı olduğu görülmüş ve hücre kültürü

çalışmalarına 0,4 V voltaj ve 20 dk atım/2 sa dinlenme döngüsel uygulama sıklığı ile devam edilmesine karar verilmiştir.

4.5. Hücre Kültürü Çalışmaları

In vitro hücre kültüründe mekanik, elektrik ve elektromekanik uyarımlı biyoreaktör çalışmalarına ait bulgular bu bölümde sunulmuştur. Mekanik ve elektrik uyarımlı biyoreaktör çalışmaları, en iyi grupları tayin edebilmek amacıyla, aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada Faz 1 analizler, ikinci aşamada Faz 2 analizler tamamlanmıştır. Her aşamadan sonra skorlama yöntemi ile miyojenik farklılaşma ve maturasyonu en iyi destekleyen gruplara karar verilmiş ve grup sayısında azaltma yapılmıştır. Mekanik ve elektrik uyarımlı biyoreaktör çalışmalarında karar verilen parametreler birleştirilerek elektromekanik uyarımlı biyoreaktör çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

4.5.1. Mekanik Uyarımlı Biyoreaktör Çalışmaları

Mekanik uyarımlı biyoreaktör Faz 1 çalışmalarda hücre canlılığı MTT analizi ile, hücre tutunması, yayılması ve miyojenik hücre morfolojisi SEM analizi ve F-aktin/DAPI boyama ile belirlenmiştir. Test edilen mekanik uyarım parametreleri **Çizelge 4.7'**de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Mekanik uyarımlı biyoreaktör çalışmalarında kullanılan Faz 1 ve Faz 2 analiz grupları, grup kısaltmaları ve analizler.

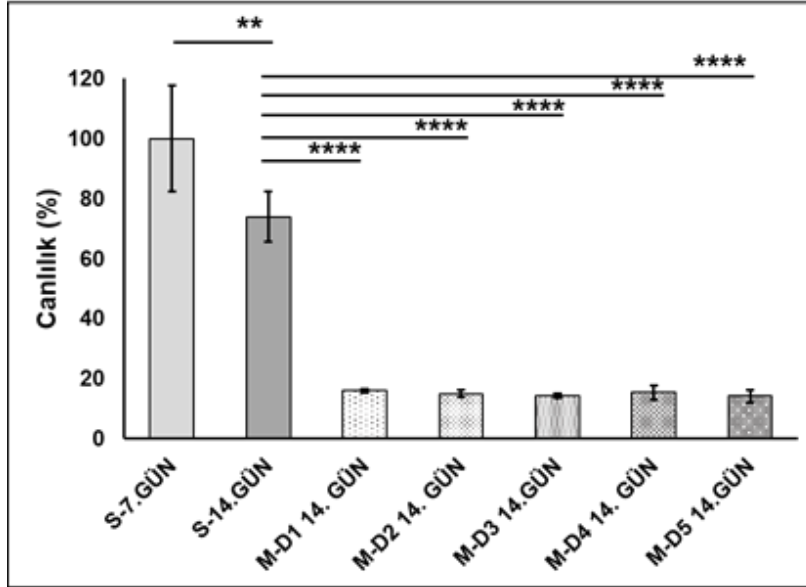
Kısaltmalar		Analizler		
S-7	Statik kültür – 7. Gün	Faz 1*-2**		
S-14	Statik kültür – 14. Gün	Faz 1-2		
Mekanik uyarımlı biyoreaktör – 14. Gün				
	Uygulama süresi	Gerinim (%)	Frekans (Hz)	
M-D1	20 dk çekme 2 sa dinlenme	5	0,5	Faz 1-2
M-D2	20 dk çekme 2 sa dinlenme	5	1	Faz 1
M-D3	20 dk çekme 2 sa dinlenme	10	0,5	Faz 1-2
M-D4	1 sa çekme 5 sa dinlenme	5	0,5	Faz 1
M-D5	1 sa çekme 5 sa dinlenme	10	0,5	Faz 1

*Faz 1 analizler: MTT, SEM ve F-aktin/DAPI boyama.

**Faz 2 analizler: Mekanik analizler, RT-qPCR, İmmünohistokimyasal boyama.

4.5.1.1. Hücre canlılığının belirlenmesi

Hızalı P3HB/PBA nanofiber matriksler üzerindeki C2C12 fare miyoblast hücrelerinin, statik kültürün 7. ve 14. gününde (S-7.gün ve S-14.gün) ve mekanik uyarımlı kültür gruplarının 14. gününde (M-D1, M-D2, M-D3, M-D4 ve M-D5 14.gün) MTT analizi ile elde edilen yüzde canlılık değerleri Şekil 4.37’de verilmiştir.



Şekil 4.37. Statik kültürün 7. ve 14. günlerinde (S-7.gün ve S-14.gün) ve mekanik uyarımlı dinamik kültürün 14. gününde (M-D1, M-D2, M-D3, M-D4 ve M-D5 14.gün) hizalı P3HB/PBA nanofiber matriksler üzerindeki C2C12 hücrelerinin yüzde canlılık değerleri (İstatistiksel anlamlı farklılıklar $n = 4$, $**p < 0,01$, $****p < 0,0001$ statik kültürün 14. günü kontrol grubu olduğunda).

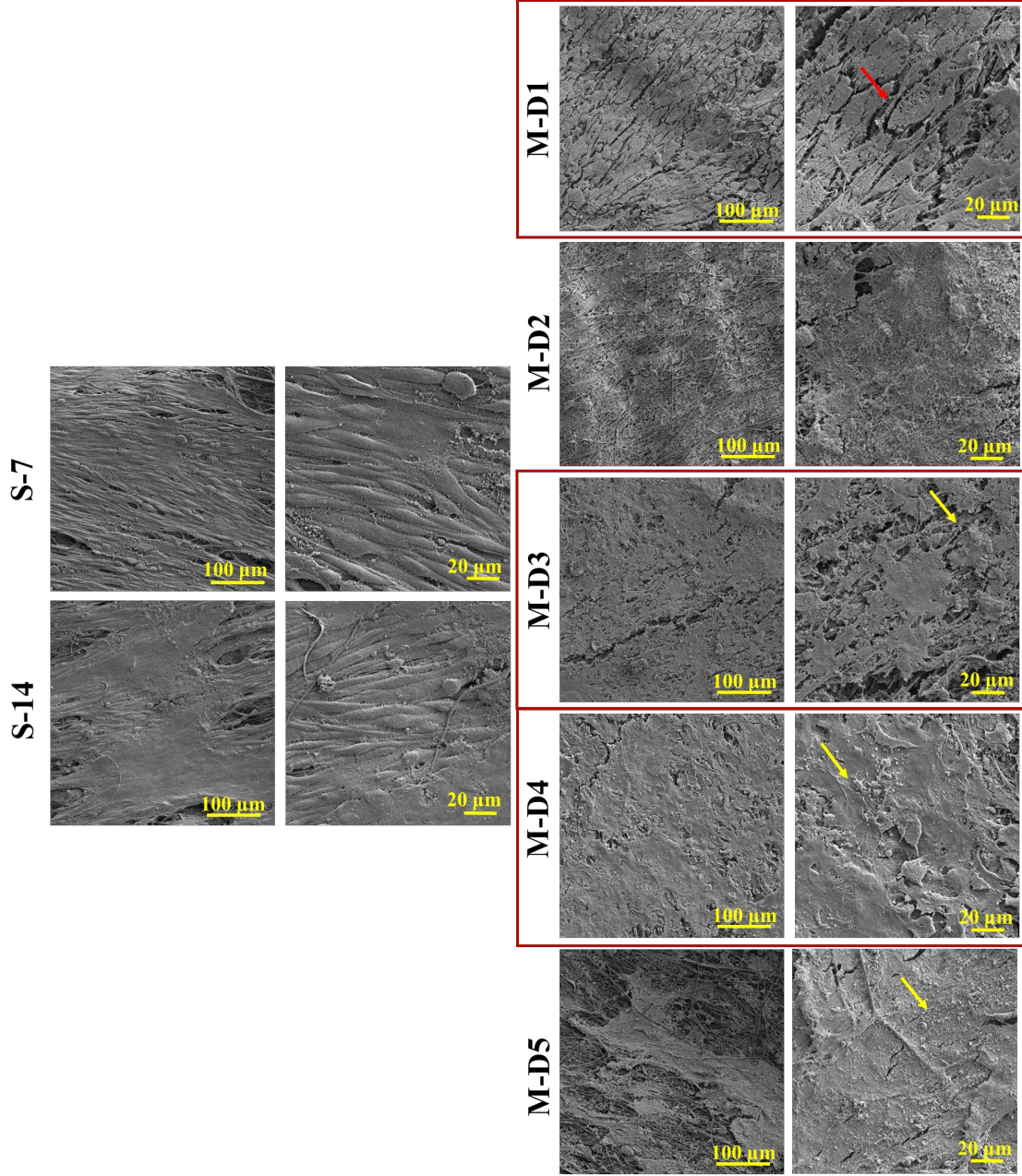
Statik kültürün 7. gününün %100 canlılık gösterdiği kabul edilerek, diğer gruplardan elde edilen absorbans değerleri statik kültürün 7. gününe göre oranlanarak % canlılık değerleri belirlenmiştir. Ancak istatistiksel anlamlılık, karşılaştırılabilir olması amacıyla, statik kültürün 14. günü ile diğer gruplar arasında aranmıştır. Mitoz döngüsündeki hücreler yüksek oranda mitokondriyal aktivite gösterirler. Ancak farklılaşmaya giden hücreler mitoz döngüsünden çıkarlar. Bu nedenle mitokondriyal aktivitelerinde düşüş gözlemlenir. Statik kültürün 14. gününde, statik kültürün 7. gününe oranla, istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş görülmüştür ($**p < 0,01$). Statik kültürün 7. gününde %100 olan canlılık değeri, yaklaşık %80 canlılığa düşmüştür. Statik kültürün 14. günü ile M-D1, M-D2, M-D3, M-D4 ve M-D5 gruplarının 14. gün canlılık değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı büyük bir düşüş tespit edilmiştir ($****p < 0,0001$). Tüm

gruplarda canlılık yaklaşık %20 oranına düşmüştür. Ancak M-D1, M-D2, M-D3, M-D4 ve M-D5 gruplarının canlılık değerleri arasında anlamlı bir farklılık belirlenememiştir ($p>0,05$). Canlılıktaki düşüş iki şekilde açıklanabilmektedir. İlk olarak, farklılaşmış ve maturasyon aşamasına girmiş miyofiberler mitoz geçiremez [18]. Statik kültürün 3. gününde farklılaşma aşamasına giren, ardından 7. günde mekanik biyoreaktör uygulamasına alınan matriksler üzerindeki hücrelerin farklılaşmalarını tamamladıkları ve maturasyon aşamasına geçmiş olabilecekleri göz önünde bulundurulduğunda, mitoz döngüsüne girebilen hücreler, popülasyonun yalnızca %5-10'unu oluşturan satelit hücrelerdir [30]. İkinci olarak çekme hareketinin etkisi ile hücreler iskele derinliği boyunca göç etmişlerdir. Yüzeyde bulunan hücre sayısı kesme gerilimleri nedeniyle de azalma göstermiştir. MTT çözeltisi ve çözücü DMSO matrikse penetre olmakta zorlanmış ve daha düşük absorbanans değerleri elde edilmiştir.

4.5.1.2. SEM analizi

Hızalı P3HB/PBA nanofiber matriksler üzerindeki C2C12 fare miyoblast hücrelerinin statik kültürün 7. ve 14. gününde (S-7 ve S-14) ve M-D1, M-D2, M-D3, M-D4 ve M-D5 mekanik uyarım gruplarının 14. gününde tutunma, yayılma ve miyojenik morfolojileri **Şekil 4.38**'de verilmiştir.

Statik kültürün 7. ve 14. günlerinde ve mekanik uyarımlı dinamik kültürün 14. gününde hücrelerin tutunduğu ve matriks boyunca yayıldığı tespit edilmiştir. Ancak statik kültürün 7. gününde hücrelerin oluşturduğu düzenli yapının, 14. güne gelindiğinde yer yer bozulduğu ve hücrelerin oluşturduğu tübüler yapıların oldukça ince oldukları gözlemlenmiştir. Buna karşın M-D1 grubunda oldukça kalın tübüler yapıların oluştuğu, hücre dışı matriks sentezinin oldukça arttığı ve belirgin sınırlı fiber yapıların oluştuğu tespit edilmiştir. M-D2 grubu incelendiğinde ise düzenli yapının bozulduğu, tübüler yapıların azaldığı, miyoblastik morfolojiden uzak yapıların oluştuğu görülmüştür. M-D3 grubunda düzenli yapının büyük ölçüde korunduğu, tübüler yapıların kalınlaşarak fiber yapısına farklılaştıkları tespit edilmiştir. M-D4 grubunda, M-D2 grubunda gözlemlenen kadar olmasa da düzenli yapının bozulduğu, tübüler yapıların azaldığı, miyoblastik morfolojiden uzak yapıların oluştuğu tespit edilmiştir. M-D5 grubu incelendiğinde ise, M-D2 grubuna benzer şekilde, hücrelerin belirli bölgelerde yüzeyden kalktığı, düzenli yapının bozulduğu, tübüler yapıların oldukça azaldığı, miyoblastik morfolojiden uzak yapıların oluştuğu tespit edilmiştir.



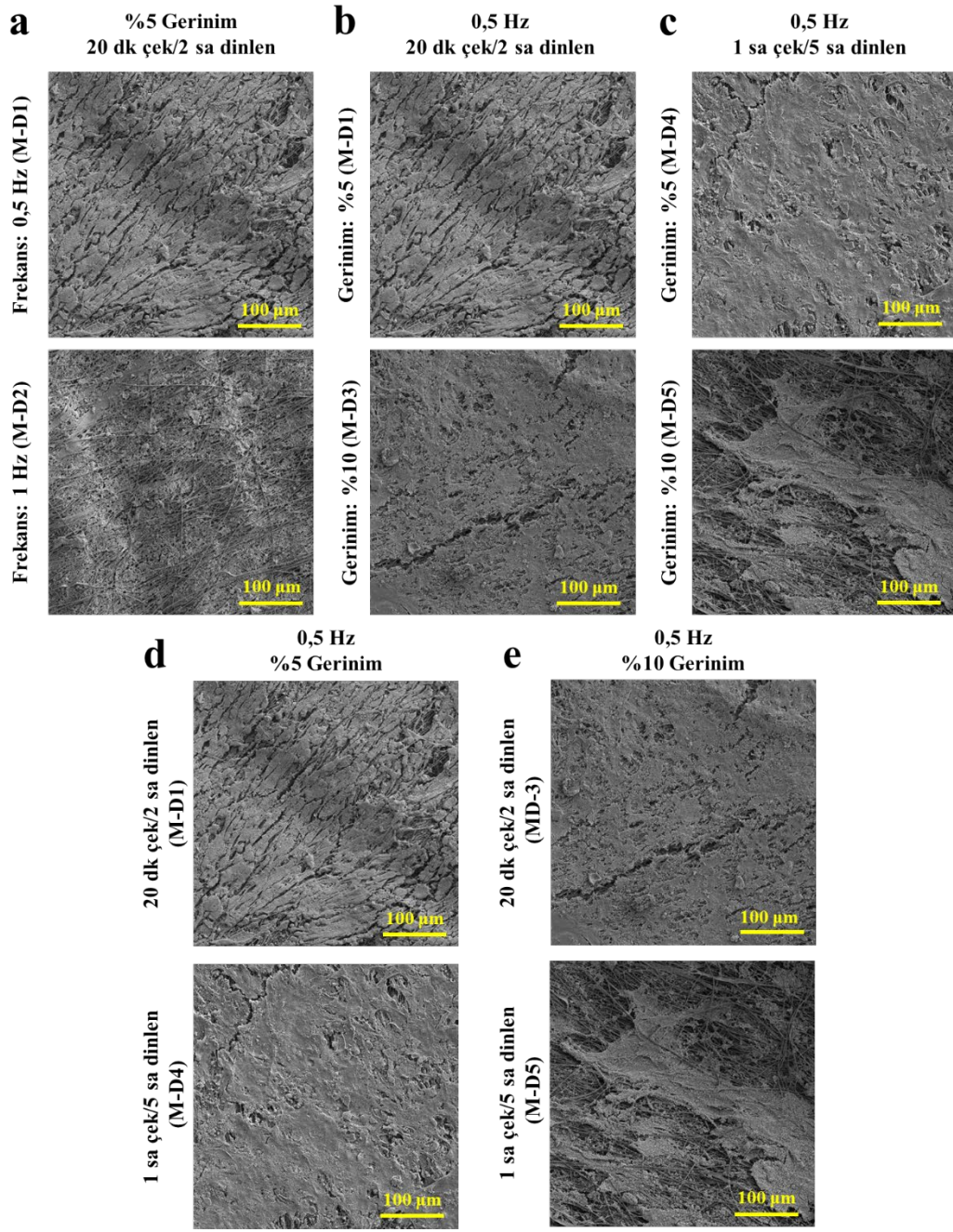
Şekil 4.38. Statik kültürün 7. ve 14. günlerinde (S-7 ve S-14) ve mekanik uyarımlı dinamik kültürün 14. gününde (M-D1, M-D2, M-D3, M-D4 ve M-D5) hizalı P3HB/PBA nanofiber matrisler üzerindeki C2C12 hücrelerinin farklı büyütmelerdeki SEM fotoğrafları (büyütmeler, sol: 500 X, sağ: 1500 X).

Kas dokusu farklılaşmasında miyotüp oluşumu sırasında C2C12 hücrelerinin plazma zarındaki morfolojik değişikliklerinin incelendiği bir çalışmada, farklılaşma yolağına girmiş hücrelerin mikrovilluslarla kaplandıkları ve miyotüplerin giderek daha kalın ve daha uzun bir morfolojiye sahip oldukları belirlenmiştir [161]. Statik kültürde, 14. güne gelindiğinde artış olsa da miyoblastların nadir olarak mikrovilluslarla kaplı ve uzun

pürüzsüz yüzeylere sahip olduğu gözlemlenmiştir. Biyoreaktörden çıkarılan M-D1, M-D3 ve M-D4 gruplarında miyojenik farklılaşmaya bağlı olarak daha kalın ve pürüzlü, çok çekirdekli organizasyona sahip, yüksek oranda mikrovilluslarla kaplı bir yüzey morfolojisi sergilediği gözlemlenmiştir (sarı oklar).

Doğal kas dokusunda miyotübüler yapıların uzunluğu 50–55 μm , kalınlığı ise 1–3 μm 'dir [15, 16]. Belirgin miyotüp oluşumu yalnızca M-D1 grubunda gerçekleşmiştir (kırmızı ok). Bu miyotübüler yapıların uzunluğu 100-120 μm , kalınlığı ise yaklaşık 25-30 μm 'dir. Kısım I'de yapılan statik kültür çalışmasında hizalı matrisler üzerinde oluşan miyotübüler yapıların uzunluğu 50-60 μm , kalınlığı ise yaklaşık 10-15 μm olarak belirlenmiştir. Buradan, doğal dokuya benzer şekilde, 1-3 μm kalınlığındaki miyotübüler yapıların füzyonu ile M-D1 mekanik uyarımlı biyoreaktörde kültürün 14. gününde daha kalın miyotübüler yapılarının oluştuğu sonucu çıkarılabilir.

Yapılan çalışmalar ile gerinim, frekans ve uygulama sıklığının hücre morfolojisi üzerindeki etkileri de incelenmiştir. Mekanik uyarımlı biyoreaktör çalışmalarında frekans, gerinim ve uygulama sıklığının hücre morfolojisine etkisi **Şekil 4.39**'da görülmektedir.



Şekil 4.39. Hizalı P3HB/PBA matrisler üzerindeki farklı parametrelerde mekanik uyarmı verilmiş C2C12 hücrelerinin SEM fotoğrafları, sabit %5 gerinim ve 20 dk çekme/2 sa dinlenme uygulama sıklığında frekans etkisi (a); sabit 0,5 Hz frekans ve 20 dk çekme/2 sa dinlenme uygulama sıklığında gerinim etkisi (b); sabit 0,5 Hz frekans ve 1 sa çekme/5 sa dinlenme uygulama sıklığında gerinim etkisi (c); sabit %5 gerinim ve 0,5 Hz frekansta uygulama sıklığı etkisi (d); sabit %10 gerinim ve 0,5 Hz frekansta uygulama sıklığı etkisi (e) (büyütme: 500X).

Gerinim ve uygulama sıklığının aynı olduğu M-D1 ve M-D2 gruplarında frekanslar sırasıyla 0,5 Hz ve 1 Hz olarak uygulanmıştır. Düşük frekans uygulamasında hücrelerin hizalanmış olduğu ve miyoblastik morfolojilerini korudukları belirlenmiştir. Oldukça kalın tübüler ve miyofiberlere farklılaşan yapıların meydana geldiği ve bunun yanında mikrovilli oluşumlarının arttığı gözlemlenmiştir. Ancak yüksek frekans uygulamasında hizalanmış miyoblastik morfolojinin bozulduğu, tübüler yapıların azaldığı belirlenmiştir. Frekans ve uygulama sıklığının (20 dk çekme/2 sa dinlenme) aynı olduğu M-D1 ve M-D3 gruplarında gerinim sırasıyla %5 ve %10 oranında uygulanmıştır. Düşük gerinim uygulamasında hücrelerin hizalanmış olduğu ve miyoblastik morfolojilerini korudukları gözlemlenmiştir. Ayrıca kalın miyotübüler ve miyofiberlere farklılaşan yapıların oluştuğu ve mikrovilli oluşumlarının arttığı belirlenmiştir. Yüksek gerinim uygulamasında hücreler hizalanmış ve miyoblastik morfolojilerini büyük oranda korumuş olsalar da yer yer tübüler yapıların bozulduğu ve fibroblastik yapıların oluştuğu tespit edilmiştir.

Frekans ve uygulama sıklığının (1 sa çekme/5sa dinlenme) aynı olduğu M-D4 ve M-D5 gruplarında gerinim sırasıyla %5 ve %10 oranında uygulanmıştır. Her iki uygulamada da hücrelerin hizalanmış morfolojilerini kaybettiği görülmüştür. Hücrelerin miyoblastik morfolojilerini kaybederek fibroblastik yapıya geçtikleri belirlenmiştir. Ancak düşük gerinim uygulamasında bazı bölgelerde hizalanmış morfolojinin büyük miktarda korunduğu ve hücrelerin matriks boyunca yayılabildikleri tespit edilmiştir. Buna karşın yüksek gerinimde hücrelerin yüzeyden bölgesel olarak kalktıkları ve tüm yüzey boyunca yayılamadıkları görülmüştür.

Frekans ve gerinim oranının (%5) aynı olduğu M-D1 ve M-D4 gruplarında uygulama sıklığı sırasıyla 20 dk çekme/2 sa dinlenme ve 1 sa çekme/5 sa dinlenme olarak uygulanmıştır. M-D1 grubunda hücrelerin hizalanmış ve miyoblastik morfolojilerini korumalarının yanında oldukça kalın tübüler ve fiberlere farklılaşan yapılar oluşturduğu ve yine mikrovilli oluşumlarının arttığı gözlemlenmiştir. M-D4 grubunda ise hücrelerin hizalanmış ve miyoblastik morfolojilerini kaybederek fibroblastik yapıya geçtikleri belirlenmiştir. Buna karşın bazı bölgelerde hizalanmış morfolojinin korunduğu ve hücrelerin matriks boyunca yayılabildikleri tespit edilmiştir.

Frekans ve gerinim oranının (%10) aynı olduğu M-D3 ve M-D5 gruplarında uygulama sıklığı sırasıyla 20 dk çekme/2 sa dinlenme ve 1 sa çekme/5 sa dinlenme olarak

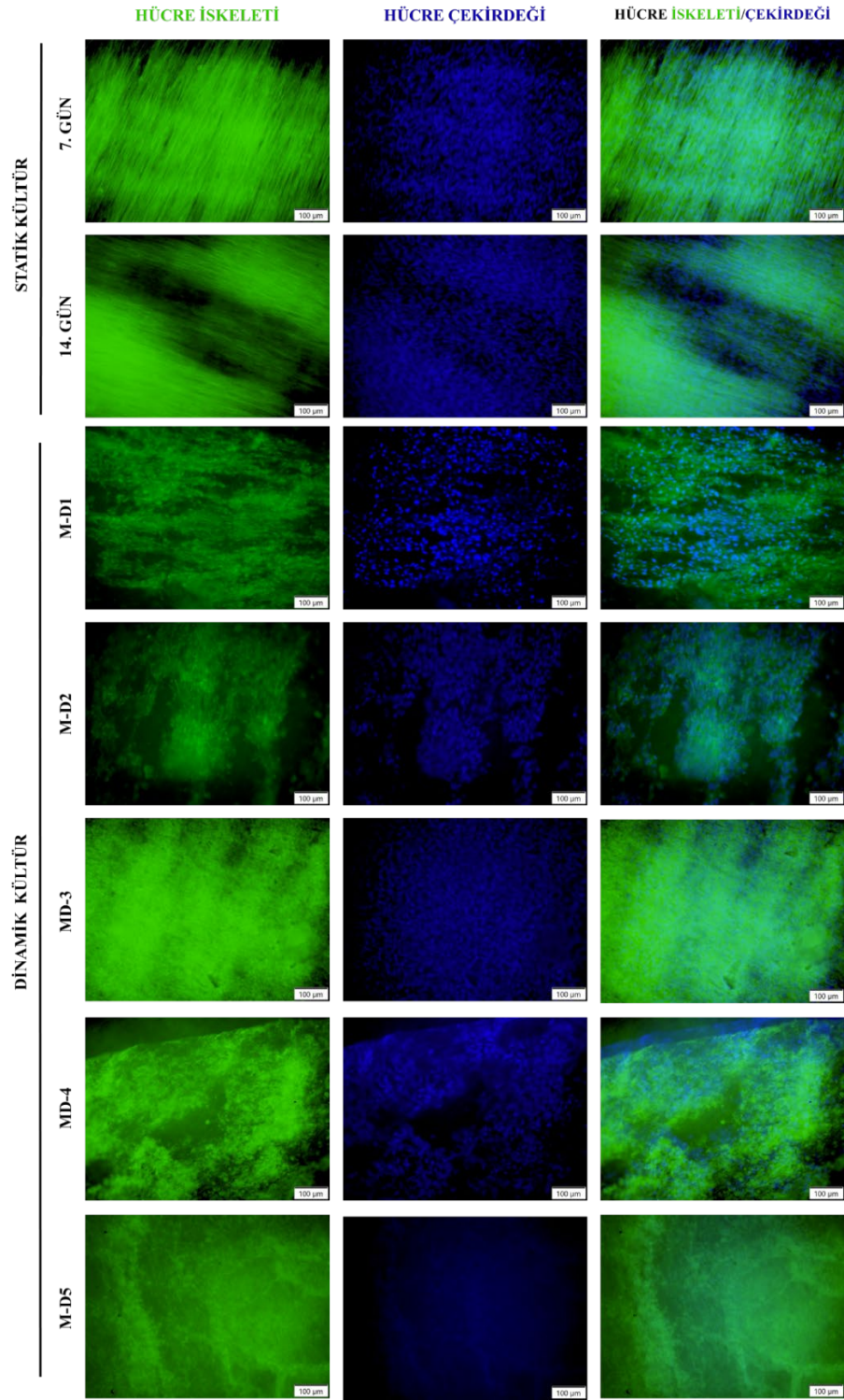
uygulanmıştır. M-D3 uygulamasında hücreler hizalanmış ve miyoblastik morfolojilerini büyük oranda korumuş olsalar da yer yer tübüler yapıların bozulduğu ve fibroblastik yapıların oluştuğu tespit edilmiştir. M-D5 uygulamasında hücrelerin hizalanmış morfolojilerini kaybettiği, miyoblastik morfolojilerini kaybederek fibroblastik yapıya geçtikleri belirlenmiştir. Ayrıca hücrelerin yüzeyden bölgesel olarak kalktıkları ve tüm yüzey boyunca yayılamadıkları görülmüştür.

4.5.1.3. Hücre iskeleti/çekirdeği boyama

Hizalı P3HB/PBA nanofiber matrisler üzerindeki C2C12 hücrelerinin statik kültürün 7. ve 14. gününde (S-7 ve S-14) ve M-D1, M-D2, M-D3, M-D4 ve M-D5 mekanik uyarım gruplarının 14. gününde tutunma, yayılma ve miyojenik morfolojileri F-aktin/DAPI boyama ile belirlenmiştir. Floresan (statik kültür) ve konfokal (dinamik kültür) mikroskop görüntüleri **Şekil 4.40**'ta verilmiştir.

Statik kültürün 7. ve 14. günlerinde hücrelerin matris yüzeyi boyunca hizalı yayıldıkları, 7. günden itibaren ince miyotübüler yapılar oluşturdukları hücre iskeleti boyamalarından tespit edilmiştir. Ancak 14. güne gelindiğinde, yetersiz çevresel uyarım nedeniyle, bölgesel olarak hücrelerin matris yüzeyinden ayrıldıkları gözlemlenmiştir. Uygun mekanik ve elektriksel uyarım olmadığında birincil farklılaşmayı tamamlayan miyositlerin, maturasyon aşamasına geçemedikleri bilinmektedir [7]. Hücre çekirdekleri ise füzyona uğrayarak uzamış ve 14. güne gelindiğinde sınırları kaybolarak tübüler yapı ile uyumlu bir hizalanmaya geçmiştir. Statik kültürde hücrelerin yüzeyde konumlandıkları, derinlik boyunca göç edemedikleri belirlenmiştir.

M-D1, M-D2, M-D3, M-D4 ve M-D5 gruplarına ait hücre iskeleti/çekirdeği görüntüleri karşılaştırmalı olarak incelendiğinde SEM fotoğrafları ile benzer sonuçlar elde edilmiştir. SEM analizinde yüzeyden görüntüleme alınabilirken, floresan ve konfokal mikroskop ile sırasıyla matrisin yaklaşık 10 µm ve 200 µm derinliğine kadar hücrelerin yayılımı ve dağılımı belirlenebilmektedir. Bu nedenle floresan ve konfokal mikroskop ile yapılan analizlerde oluşan dokunun niteliği daha açık bir şekilde görülmüştür. M-D1 ve M-D3 gruplarında hücrelerin matris derinliği boyunca yayıldıkları ve oldukça kalın, hizalanmış bir doku oluşturduğu gözlemlenmiştir. M-D4 ve M-D5 gruplarında derinlik boyunca yayılım gözlemlense de hizalı, tübüler ve füzyona uğramış çekirdekli yapılar oldukça azdır. M-D2 grubunda ise bölgesel hizalanmalar olsa da hücrelerin tümüyle yayılamadığı ya da yer yer yüzeyden kalktıkları belirlenmiştir.



Şekil 4.40. Statik kültürün 7. ve 14. günlerinde ve mekanik uyarımlı dinamik kültürün 14. gününde (M-D1, M-D2, M-D3, M-D4 ve M-D5) hizalı P3HB/PBA nanofiber matriksler üzerindeki C2C12 hücrelerinin F-aktin/DAPI boyama floresan mikroskop görüntüleri (büyütme: 10 X).

Canlılık analizi, SEM analizi ve F-aktin/DAPI boyama ile gerinim, frekans ve uygulama sıklığı etkileri incelenmiş ve gruplar skorlamaya tabii tutulmuştur. Skorlama Çizelge 4.8’de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Mekanik uyarımlı biyoreaktör Faz 1 hücre kültürü çalışmalarında elde edilen sonuçlara göre gruplar arası skorlama.

		M-D1*	M-D2*	M-D3*	M-D4*	M-D5*
Morfolojik özellikler (SEM)	Gerinim etkisi	4	3	3	2	1
	Frekans etkisi	4	3	3	2	1
	Süre etkisi	4	3	3	2	1
Morfolojik özellikler (Faktin/DAPI)	Gerinim etkisi	3	1	4	2	3
	Frekans etkisi	3	1	4	2	3
	Süre etkisi	3	1	4	2	3
% Canlılık	MTT	2	3	1	1	1
Toplam		23	15	22	13	13

*M-D1: 20 dk çekme /2 sa dinlenme %5 gerinim 0,5 Hz; M-D2: 20 dk çekme /2 sa dinlenme %5 gerinim 1 Hz; M-D3: 20 dk çekme /2 sa dinlenme %10 gerinim 0,5 Hz; M-D4: 1 sa çekme/5 sa dinlenme %5 gerinim 0,5 Hz; M-D5: 1 sa çekme/5 sa dinlenme %10 gerinim 0,5 Hz.

Yapılan skorlama ile M-D1 (20 dk çekme/2 sa dinlenme, %5 gerinim, 0,5 Hz) ve M-D3 (20 dk çekme/2 sa dinlenme, %10 gerinim, 0,5 Hz) grupları ile Faz 2 analizlere devam edilmesine karar verilmiştir. Bu durumda mekanik uyarımlı biyoreaktör çalışmaları için en uygun uygulama sıklığının 20 dk çekme/2 sa dinlenme ve en uygun frekansın 0,5 Hz olduğu belirlenmiştir. Faz 2 analizlerde %5 ve %10 gerinim oranları ile çalışılarak en iyi grup belirlenmiştir. Böylece Faz 2 analizlerde gerinimin miyojenik farklılaşma üzerindeki etkileri daha detaylı incelenmiştir.

Mekanik uyarımlı biyoreaktör Faz 2 analizlerinde matriks ve hücre kompleksinin mekanik özellikleri çekme testleri ile, miyojenik gen ifadeleri RT-qPCR analizi ile, miyojenik belirteçleri ise immünohistokimyasal boyamalar ile incelenmiştir. Faz 2 hücre kültürü çalışmalarında kontrol grubu olarak statik 14. gün örnekleri seçilmiştir. Bununla birlikte matrikslerin reaktöre alınmadan önceki durumlarının belirlenmesi amacıyla statik 7. gün örneklerine de analizler yapılmıştır.

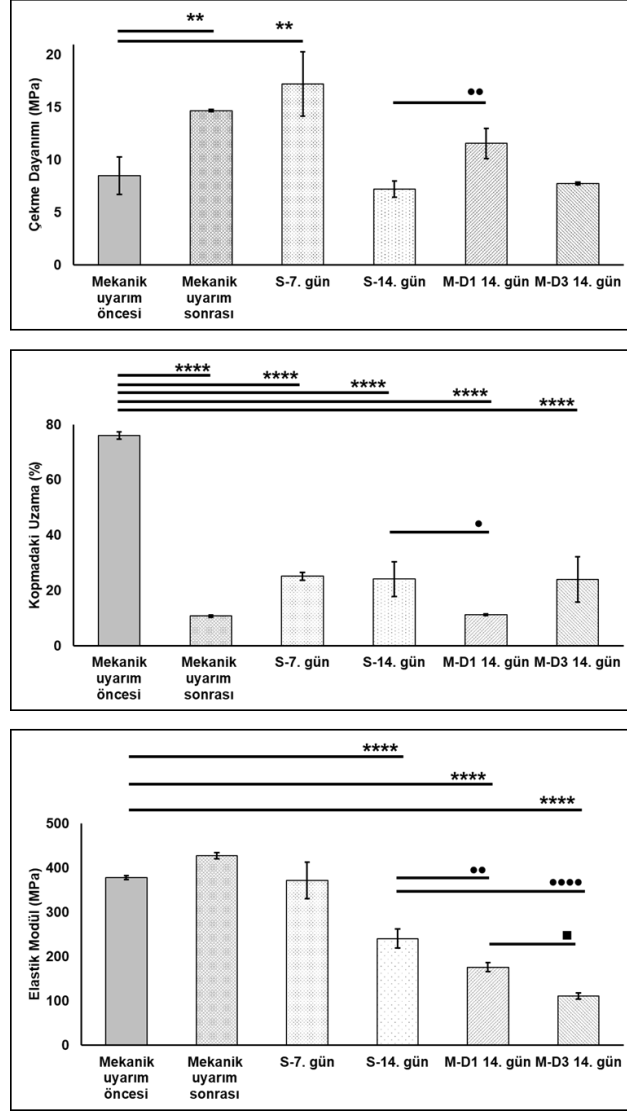
4.5.1.4. Mekanik testler

Statik kültürün 7. ve 14. günlerinde kontrol ve karşılaştırma amacıyla matriksler mekanik analizlere tabii tutulmuştur. M-D1 ve M-D3 gruplarında mekanik uyarım uygulamasının hizalı P3HB/PBA nanofiber matrikslerin mekanik özelliklerinde yarattığı değişimler **Çizelge 4.9**'da verilmiştir. Çekme dayanımı, kopmadaki uzama ve elastik modül değerlerine ait istatistiksel farklılıklar **Şekil 4.41**'de verilmiştir. İskelet kası için en önemli parametrelerinden biri olan çekme dayanımındaki değişimler detayları ile tartışılmıştır.

Çizelge 4.9. Mekanik uyarımlı biyoreaktör hücre kültürü çalışmalarında mekanik özelliklerdeki değişimler.

Kültür öncesi mekanik özellikler						
	Çekme dayanımı (MPa)		Kopmadaki uzama (%)		Elastik modül (MPa)	
	8,5 ± 1,8		76,0 ± 1,3		378,2 ± 4,2	
Statik kültürde mekanik özelliklerdeki değişim						
	Çekme dayanımı (MPa)	Değişim (%)	Kopmadaki uzama (%)	Değişim (%)	Elastik modül (MPa)	Değişim (%)
S-7	17,2 ± 3,1	102 ↑	25,1 ± 1,4	67 ↓	372,2 ± 41,0	1,6 ↓
S-14	7,2 ± 0,8	13 ↓	24,1 ± 6,3	68 ↓	240,4 ± 21,5	36 ↓
Mekanik uyarımlı biyoreaktörde mekanik özelliklerdeki değişim						
	Çekme dayanımı (MPa)	Değişim (%)	Kopmadaki uzama (%)	Değişim (%)	Elastik modül (MPa)	Değişim (%)
Ön denemeler*	14,7 ± 0,1	72 ↑	10,7 ± 0,4	85 ↓	427,3 ± 6,9	13 ↑
M-D1	11,6 ± 1,4	36 ↑	11,3 ± 0,3	85 ↓	175,8 ± 9,9	53 ↓
M-D3	7,7 ± 0,1	10 ↓	24,0 ± 8,2	68 ↓	110,8 ± 7,4	70 ↓

*Matrikslerle 7 günlük hücresiz mekanik uyarımlı biyoreaktör ön denemeleri sonrası: %15 gerinim, 0,5 Hz frekans ve 20 dk çekme/2 sa dinlenme parametrelerinde.



Şekil 4.41. Mekanik uyarım öncesi, 7 günlük hücretsiz mekanik uyarım sonrası, statik 7. ve 14. gün (S-7. gün ve S-14.gün) ve dinamik 14. gün örneklerine (M-D1 ve M-D3) ait karşılaştırmalı çekme dayanımı, kopmadaki uzama ve elastik modül değerleri (İstatistiksel olarak önemli farklar $n = 3$, $**p < 0,01$, $****p < 0,0001$ mekanik uyarım öncesi matriksler kontrol grubu olduğunda, $\bullet p < 0,05$, $\bullet\bullet p < 0,01$, $\bullet\bullet\bullet p < 0,0001$ statik 14. gün matriksler kontrol grubu olduğunda, $\blacksquare p < 0,05$ dinamik gruplar karşılaştırıldığında).

Statik 7. gün örneklerinde çekme dayanımı %102 artış göstererek $17,2 \pm 3,1$ MPa değerine çıkmıştır. Mekanik uyarım öncesi matriksler kontrol grubu kabul edildiğinde, hücretsiz mekanik uyarım verilmiş grup ve statik 7. gün grubu ile çekme dayanımında istatistiksel farklılıklar belirlenmiştir. Hücretsiz mekanik uyarım sonrasında, mekanik uyarım öncesine göre, çekme dayanımında anlamlı artış tespit edilmiştir ($**p < 0,01$). Statik 7. gün grubunda, mekanik uyarım öncesine göre, çekme dayanımında anlamlı artış

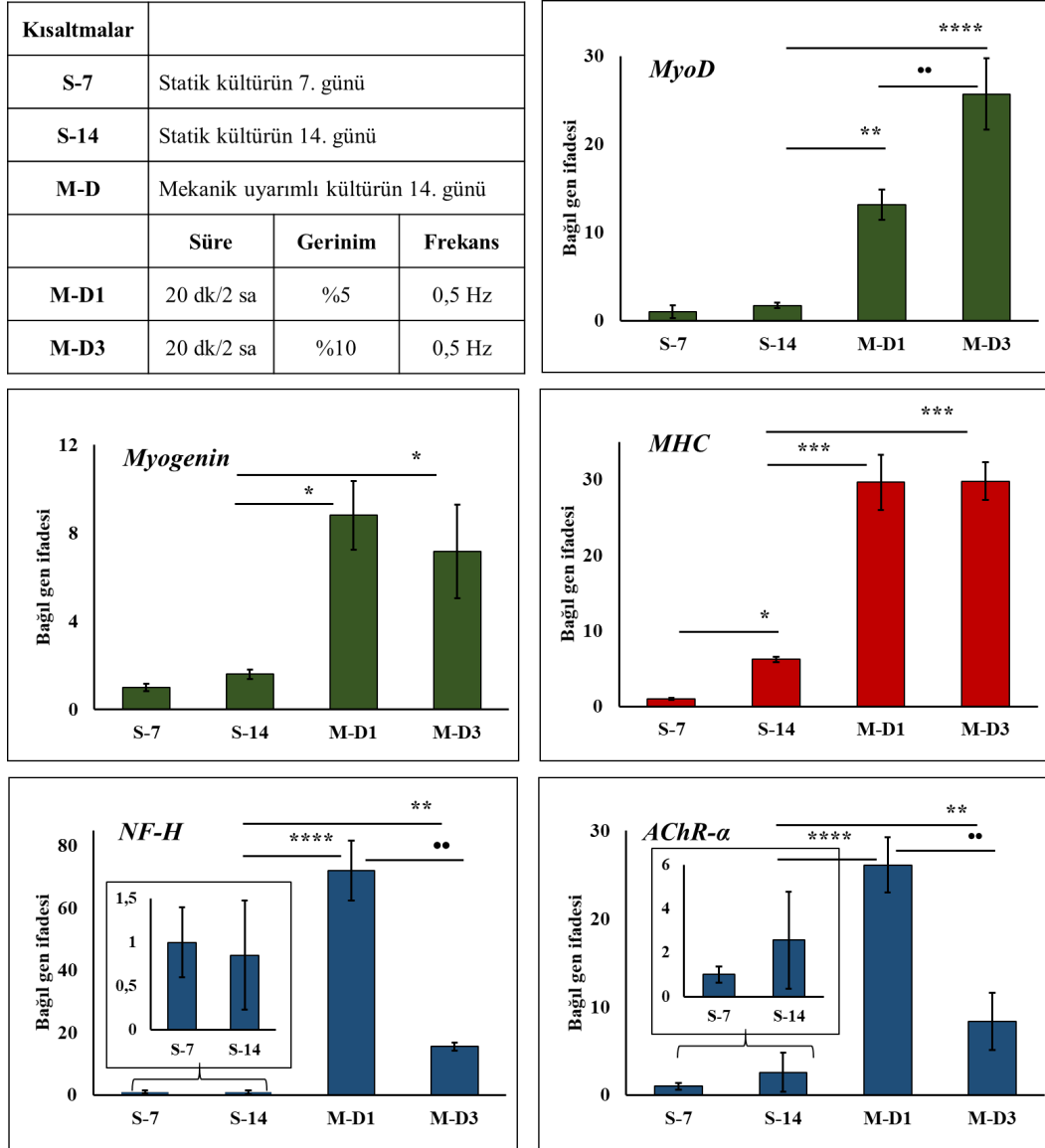
görülmüştür (** $p<0,01$). Diğer gruplarla anlamlı farklılıklara rastlanmamıştır ($p>0,05$). Mekanik uyarım öncesi çekme dayanımına göre, hücre proliferasyonu, miyotüp diziliminin artması ve farklılaşmaya bağlı olarak çekme dayanımında artış görülmüştür. Statik 14. gün örneklerinde çekme dayanımı %13 azalma ile $7,2 \pm 0,8$ MPa değerine düşmüştür. Hücre proliferasyonunun farklılaşmaya bağlı olarak oldukça azalması, yetersiz uyarımlar ve hücrelerin yüzeyden kalkma eğilimi göstermesi ile birlikte çekme dayanımında, uyarım öncesine göre azalma gerçekleşmiştir.

M-D1 grubunda 14. günde çekme dayanımı %36 artış göstererek $11,6 \pm 1,4$ MPa değerine çıkmıştır. M-D1 grubunun SEM fotoğrafları ve F-aktin/DAPI boyamalarında tartışıldığı üzere, oldukça hizalanmış ve kalın miyofibrillerin olduğu tespit edilmiştir. Buradan yola çıkılarak oluşan doku, malzemeye %36 oranında katkı vererek çekme dayanımını arttırmıştır. M-D3 grubunda 14. günde çekme dayanımı %10 azalma ile $7,7 \pm 0,1$ MPa değerine düşmüştür. M-D3 grubunun 14. günündeki SEM fotoğraflarında hücrelerin miyoblastik morfolojilerini büyük oranda korumuş olsalar da yer yer tübüler yapıların bozulduğu ve fibroblastik yapıların olduğu tespit edilmiştir. Oluşan doku iskelet kası ile aynı mekanik özellikleri göstermediğinden çekme dayanımında uyarım öncesine göre azalma gerçekleşmiştir. Statik 14. gün matriksler kontrol grubu kabul edildiğinde, dinamik örnekler ile karşılaştırma yapıldığında, sadece M-D1 grubunun çekme dayanımında istatistiksel anlamlı artış tespit edilmiştir (** $p<0,01$). Dinamik örnek grupları birbirleri ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık belirlenememiştir ($p>0,05$).

Statik 14. gün matriksler kontrol grubu kabul edildiğinde, dinamik örnekler ile karşılaştırma yapıldığında, sadece M-D1 grubunun kopmadaki uzama miktarında istatistiksel anlamlı azalma tespit edilmiştir ($p<0,05$). Dinamik örnek grupları birbirleri ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık belirlenememiştir ($p>0,05$). Mekanik uyarım öncesi matriksler kontrol grubu kabul edildiğinde M-D1 ve M-D3 gruplarının 14. günleri ile elastik modül değerlerinde istatistiksel farklılıklar belirlenmiş ve elastik modül değerlerinde anlamlı azalma tespit edilmiştir (**** $p<0,0001$). Statik 14. gün matriksler kontrol grubu kabul edildiğinde, dinamik örnekler ile karşılaştırma yapıldığında, M-D1 grubunda (** $p<0,01$) ve M-D3 grubunun elastik modül değerlerinde (*** $p<0,0001$) anlamlı azalma görülmüştür. Dinamik örnek grupları birbirleri ile karşılaştırıldığında, M-D3 grubunun elastik modül değerinin M-D1 grubunun elastik modül değerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$).

4.5.1.5. Miyojenik gen ifadelerinin belirlenmesi

Hızalı P3HB/PBA nanofiber matrisler üzerindeki C2C12 hücrelerinin statik kültürde (S-7 ve S-14) ve mekanik uyarımlı biyoreaktörde (M-D1 ve M-D3) miyojenik gen ifadelerinin belirlendiği RT-qPCR analizi sonuçları Şekil 4.42’de verilmiştir.



Şekil 4.42. Statik kültürün 7. ve 14. günlerinde (S-7 ve S-14) ve mekanik uyarımlı dinamik kültürün 14. gününde (M-D1 ve M-D3) C2C12 hücrelerine ait bağıl MyoD, Myogenin, MHC, NF-H ve AChR- α gen ifadeleri (İstatistiksel anlamlı farklılıklar $n = 4$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ statik kültürün 14. günü kontrol grubu olduğunda, ** $p < 0,01$ dinamik kültür grupları karşılaştırıldığında).

Miyojenik farklılaşmanın belirlenmesi amacıyla MyoD, Myogenin ve MHC gen ifadeleri; miyojenik maturasyonun belirlenmesi amacıyla NF-H ve AChR- α gen ifadeleri tespit edilmiştir. Statik kültürde hizalanmış fiber morfolojisi ve malzemenin piezoelektrik ve mekanik özelliklerine bağlı olarak farklılaşmanın başlaması, 14. güne gelindiğinde maturasyona doğru miyojenik farklılaşmanın ilerlemesi Kısım I çalışmaları ile tutarlıdır. MyoD ve Myogenin bağlı gen ifadelerinde statik 7. ve 14. gün grupları arasında anlamlı farklılık tespit edilemezken ($p>0,05$), MHC bağlı gen ifadesinde statik 14. gün grubunda yaklaşık 4 kat artış ile anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($*p<0,05$). Karma hücre popülasyonuna sahip C2C12 hücrelerinde, popülasyondaki sinir hücrelerine bağlı olarak, miyojenik maturasyon ve nöromusküler bağlantı noktalarının oluşmasına yönelik NF-H ve AChR- α bağlı gen ifadeleri statik 7. ve 14. gün gruplarında oldukça düşük düzeyde eksprese edilmiştir, aralarında anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p>0,05$).

Statik kültürün 14. günü kontrol grubu olduğunda, MyoD bağlı gen ifadesinde M-D1 grubunda yaklaşık 7 kat artış ($**p<0,01$), M-D3 grubunda yaklaşık 14 kat artış ($****p<0,0001$) tespit edilmiştir. Dinamik kültür grupları karşılaştırıldığında M-D3 grubundaki MyoD bağlı gen ifadesinin M-D1 grubundaki MyoD bağlı gen ifadesinden yaklaşık 2 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir ($**p<0,01$). Statik kültürün 14. günü kontrol grubu olduğunda, Myogenin bağlı gen ifadesinde M-D1 ve M-D3 gruplarında yaklaşık 5 kat artış ($*p<0,05$) tespit edilmiştir. Dinamik kültür grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı farklılık belirlenememiştir ($p>0,05$). Benzer şekilde, Heher ve ark. fibrin hidrojeller kullanarak C2C12 hücre hattı ile mekanik uyarım çalışmaları gerçekleştirmişlerdir [106]. Örneklere 9 gün boyunca %10 statik gerinim uygulamışlardır. Gen ifadesi analizleri ile mekanik uyarım uygulanan gruplarda, farklılaşmaya bağlı olarak MyoD ve Myogenin ekspresyonlarının anlamlı olarak arttığı belirlenmiştir.

Statik kültürün 14. günü kontrol grubu olduğunda, MHC bağlı gen ifadesinde M-D1 ve M-D3 gruplarında yaklaşık 5 kat artış ($***p<0,001$) tespit edilmiştir. Dinamik kültür grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı farklılık belirlenememiştir ($p>0,05$). Benzer olarak, Candiani ve ark. biyobozunur DegraPol® mikrofiber iskeleler kullanarak C2C12 hücre hattı ile mekanik uyarım çalışmaları gerçekleştirmişlerdir [102]. Örneklere 2 gün boyunca %3,3'lük sabit gerinim uygulanmış, ardından 7 gün boyunca 0,5 Hz frekans, %3,4 gerinim ve 5 uyarım/gün uygulama sıklığında uygulama yapılmıştır. Kontrol grubu olarak statik kültür koşullarını kullanmışlardır. Western blot analizlerinde

statik ve dinamik kültürlerde MHC bant yoğunluğu karşılaştırması yapmışlar ve dinamik kültürde MHC bant kalınlıklarında 8 kat artış tespit etmişlerdir. Kültürün 7. gününden itibaren farklılaşmaya bağlı olarak dinamik kültürde %67'lik bir artış gözlemlerken, hücrelerin farklılaşma yolağına girememesine bağlı olarak statik kültürde %36'lık bir azalma gözlemlenmiştir. Tez çalışmasında da mekanik uyarım miyojenik farklılaşmaya önemli ölçüde katkı sağlamış, hücrelerin miyojenik maturasyon yolağına girmelerini sağlamıştır. MyoD, Myogenin ve MHC gen ifadeleri birlikte değerlendirildiğinde, M-D1 grubundaki hücrelerin miyotüp farklılaşmalarını büyük ölçüde tamamladığı, miyofibriler yapıların oluşmaya başladığı ve maturasyona hazır oldukları öngörülebilir.

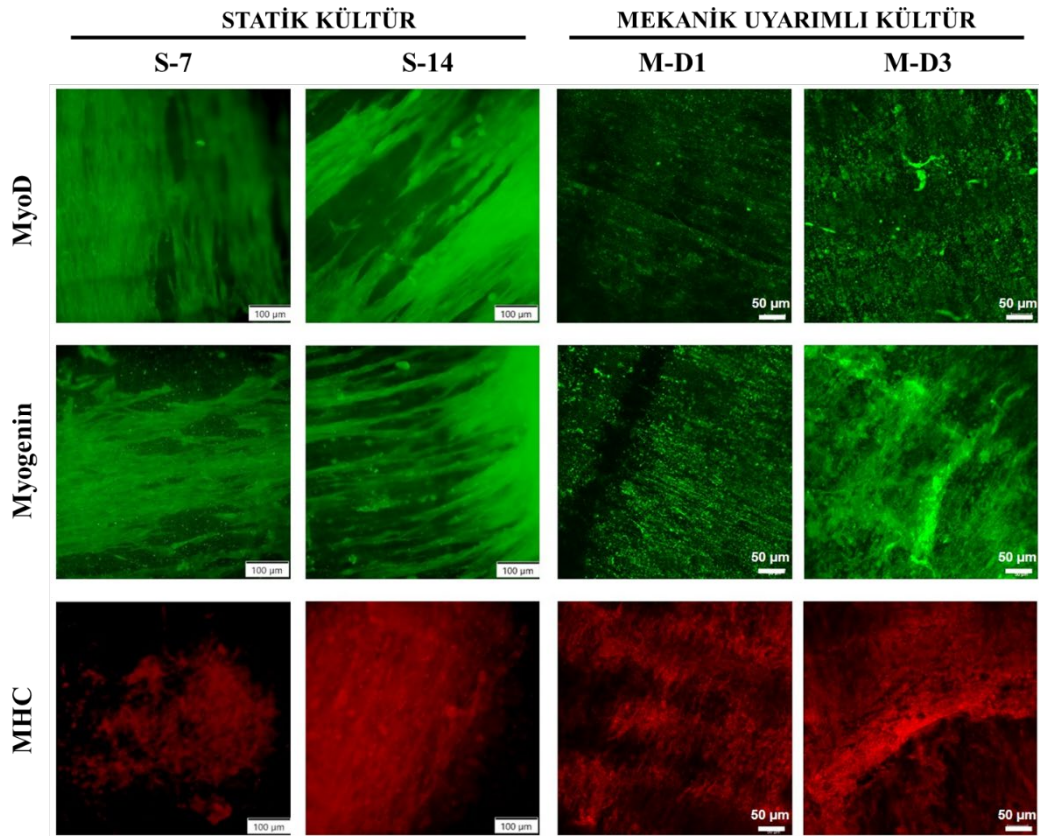
Bunu destekler şekilde, statik kültürün 14. günü kontrol grubu olduğunda, NF-H bağlı gen ifadesinde M-D1 grubunda yaklaşık 85 kat artış (**** $p<0,0001$), M-D3 grubunda yaklaşık 18 kat artış (** $p<0,01$) tespit edilmiştir. Dinamik kültür grupları karşılaştırıldığında M-D1 grubundaki NF-H bağlı gen ifadesinin M-D3 grubundaki NF-H bağlı gen ifadesinden yaklaşık 4,6 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir (** $p<0,01$). Miyojenik maturasyonun önemli bir belirteci olan nöromusküler bağlantı noktalarının oluşumu NF-H gen ifadesi ile incelenmiştir. Bu bağlamda M-D1 grubundaki artış, bu uyarım grubunda hücrelerin büyük ölçüde maturasyon yolağına olduğunu göstermektedir. Benzer olarak, Machingal ve ark. deselülerize mesane ECM'si kullanarak yetişkin sıçan kas progenitör hücreler (MPC'ler) ile mekanik uyarım çalışmaları gerçekleştirmişlerdir [103]. *In vivo* implantasyon öncesinde örneklere 7 gün boyunca saat başı dakikada 3 kez %10 döngüsel gerinim uygulamışlardır. Histolojik analizler ile implantasyon öncesinde mekanik uyarım uygulanan gruplarda nörofilament 200 (NF-200) ifadesinde anlamlı artış olduğunu belirlemişlerdir.

Fonksiyonel nöromusküler bağlantı noktalarında asetilkolin reseptörü kümelenmeleri bulunmalıdır [39]. Sinyal molekülleri için olan reseptörler plazma zar proteinlerinin (≈ 106 molekül) yaklaşık %0,1 ile %5'lik bir kısmını oluşturur [168]. Bu nedenle izolasyonu ve tespiti oldukça zordur. Ancak çalışmada başarı ile reseptörlere ait mRNA'lar izole edilebilmiş ve gen ifadeleri tespit edilebilmiştir. AChR- α bağlı gen ifadesinde M-D1 grubunda yaklaşık 10 kat artış (**** $p<0,0001$), M-D3 grubunda yaklaşık 3 kat artış (** $p<0,01$) tespit edilmiştir. Dinamik kültür grupları karşılaştırıldığında M-D1 grubundaki AChR- α bağlı gen ifadesinin M-D3 grubundaki AChR- α bağlı gen ifadesinden yaklaşık 3 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir (** $p<0,01$).

M-D1 grubunda AChR kümelenmelerinin oldukça yüksek olduğu ve dolayısıyla fonksiyonel bağlantı noktalarının oluştuğu tespit edilmiştir.

4.5.1.6. Miyojenik belirteçlerin belirlenmesi

Hızalı P3HB/PBA nanofiber matrisler üzerindeki C2C12 hücrelerinin statik (S-7 ve S-14) ve mekanik uyarımlı dinamik kültürde (M-D1 ve M-D3) MyoD, Myogenin ve MHC miyojenik belirteçleri immünohistokimyasal boyamalar ile belirlenmiş ve floresan/konfokal mikroskop görüntüleri Şekil 4.43'te verilmiştir.



Şekil 4.43. Statik kültürün 7. ve 14. günlerinde ve mekanik uyarımlı dinamik kültürün 14. gününde (M-D1 ve M-D3) C2C12 hücrelerine ait MyoD, Myogenin ve MHC immünohistokimyasal boyama konfokal mikroskobu görüntüleri. MyoD (yeşil) antijeni hücre çekirdeğinde, Myogenin (yeşil) antijeni hücre iskeletinde ve MHC (kırmızı) antijeni kalın filamentlerde lokalize olmuştur. (Büyütmeler, statik kültür: 10 X ve dinamik kültür: 20 X).

Statik kültürde MyoD, Myogenin ve MHC gen belirteçleri Kısım I çalışmaları ile tutarlıdır. Statik gruplara ait örneklerde hücrelerin yalnızca yüzeyde konumlandığı, matris derinliği boyunca yayılamadıkları görülmüştür. Bu nedenle yüzeyden floresan

mikroskobu ile görüntüleme yapılabilmektedir. Ancak dinamik gruplara ait örneklerde hücreler derinlik boyunca yayıldığından, floresan mikroskop ile görüntülemeye oldukça zorlanılmış ve z ekseninden kesit görüntüsü alan konfokal mikroskop ile görüntüleme yapılmıştır. MyoD, Myogenin ve MHC antijenlerinin tüm gruplarda bulunduğu ancak statik örneklerde hücrelerin yalnızca yüzeyde bulunduğu, derinlik boyunca pozitif ışımaya vermediği gözlemlenmiştir.

Candiani ve ark.'larının biyobozunur DegraPol® mikrofiber iskeleler kullanarak C2C12 hücre hattı ile gerçekleştirdikleri mekanik uyarım çalışmalarında MHC immünohistokimyasal boyamalarında kültürün 7. gününe kadar statik ve dinamik kültür gruplarında MHC pozitif hücrelere rastlamamışlardır [102]. Ancak kültürün 7. gününden itibaren, özellikle dinamik kültürde yüksek yoğunlukta kalın fibrillerin oluştuğunu MHC pozitif hücreler üzerinden tespit etmişlerdir. Bir diğer çalışmada fibrin hidrojeller kullanarak C2C12 hücre hattı ile mekanik uyarım çalışmaları gerçekleştirilmiştir [106]. MHC histolojik boyamalarında kültürün 6. gününden itibaren sadece mekanik uyarım verilen gruplarda miyotüp hizalanmasına rastlanmıştır. Kültürün 9. gününden itibaren tüm gruplarda MHC pozitif hücrelere rastlansa da mekanik uyarımlı grupta yüksek yoğunlukta MHC pozitif hücre olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmadan farklı olarak, tez çalışmasında, hizalı P3HB/PBA nanofiber iskelelerinde 7. günde statik kültür koşullarında dahi hizalanmış miyotüplere ve MHC pozitif hücrelere rastlanmıştır. Böylece, matrikslerin mekanik, morfolojik ve piezoelektrik özellikleri ile, uyarımlar olmadan, miyojenik farklılaşmayı desteklediği kanıtlanmıştır.

Biyoreaktör örneklerinde yüzeyde ve iskele derinliği boyunca yaklaşık 70 µm'lik bir derinliğe kadar hücrelerin tüm antikorlar için pozitif ışımaya verdiği görülmüştür. İmmünohistokimyasal boyamalar RT-qPCR analizleri ile tutarlı sonuçlar vermiştir. M-D1 ve M-D3 grupları arasında MyoD pozitif ışımalar arasında belirgin bir farklılık bulunamamıştır. Ancak M-D3 grubunda, M-D1 grubuna göre, Myogenin ve MHC pozitif ışımalar bölgesel olarak daha kalın tübüler yapıların oluştuğu gözlemlenmiştir. Benzer sonuçlar, Liao ve ark.'larının hizalı PU fiberler kullanarak C2C12 hücre hattı ile gerçekleştirdikleri mekanik uyarım çalışmalarında da elde edilmiştir [101]. Örneklere 14 gün süre ile, günde 6 saat boyunca her saatte 1 Hz frekansta %5 veya %10 gerinim uygulamışlardır. Western blot analizleri ile Myogenin ve MHC ifadelerinde %5 gerinim uygulanan gruplarda artış tespit etmişlerdir. Yüksek gerinim uygulanan gruplarda başarı sağlanamamıştır.

Düşük frekans (0,5 Hz), düşük gerinim (%5) ve 20 dk çekme/2 sa dinlenme uygulama sıklığındaki mekanik uyarım kasların deneyimlediği doğal mekanik kuvvetleri taklit etmiş ve miyojenik olgunlaşmayı arttırmıştır. Bu nedenle kas fiberleri daha uygun şekilde hizalanmış ve daha işlevsel bir doku elde edilmiştir. Bununla beraber NF-H ve AChR- α gen ifadeleri ile de desteklendiği üzere kasılma fonksiyonuna sahip bir dokunun oluşmasına katkı sağlamıştır. Ayrıca morfolojik analizlerle gösterildiği üzere, uygun mekanik uyarım kas hücrelerinin uygulanan gerinim yönünde hizalanmasını teşvik etmiş ve vücuttaki kas fiberlerinin doğal düzenini taklit edebilmiştir. Mekanik uyarımın mekanotransdüksiyon yoluyla miyojenik farklılaşma ve maturasyon yolaklarını uyardığı, daha kalın fibriller oluşmasına yol açtığı ve kas gelişimi için şart olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir [169]. Tez kapsamında piezoelektrik bir malzeme üzerinde gerçekleştirilen mekanik uyarımlı biyoreaktör çalışmalarında alınan sonuçlar da bu bulgular ile uyumludur.

Analizler sonrası bir skora daha yapılmış ve en iyi mekanik uyarım grubuna karar verilmiştir (**Çizelge 4.10**).

Çizelge 4.10. Mekanik uyarımlı biyoreaktör hücre kültürü çalışmalarında elde edilen sonuçlara göre gruplar arası skorlama.

Analizler		M-D1*	M-D3**		
Morfolojik özellikler	SEM	4	3		
	F-aktin/DAPI	3	4		
Mekanik özellikler	Çekme testleri	4	2		
Miyojenik gen ifadesi	RT-qPCR	MyoD	3	MyoD	5
		Myogenin	5	Myogenin	4
		MHC	5	MHC	5
		NF-H	5	NF-H	2
		AChR- α	5	AChR- α	2
Miyojenik belirteç	IHC	MyoD	3	MyoD	3
		Myogenin	3	Myogenin	3
		MHC	2	MHC	4
% Canlılık	MTT	2	1		
Toplam		44	38		

*M-D1: 20 dk çekme /2 sa dinlenme %5 gerinim 0,5 Hz.

**M-D3: 20 dk çekme /2 sa dinlenme %10 gerinim 0,5 Hz.

Yapılan skorlama ile M-D1 grubunun mekanik uyarımlı biyoreaktör çalışmalarındaki en iyi grup olduğu tespit edilmiştir. Bu durumda mekanik uyarımlı biyoreaktör çalışmaları için en uygun döngüsel uygulama sıklığının 20 dk çekme/2 sa dinlenme, en uygun frekansın 0,5 Hz, en uygun gerinimin %5 olduğu belirlenmiştir. Elektromekanik uyarım çalışmalarında mekanik uyarım parametresi olarak M-D1 grubu ile devam edilmesine karar verilmiştir.

4.5.2. Elektrik Uyarımlı Biyoreaktör Çalışmaları

Elektrik uyarımlı biyoreaktör Faz 1 çalışmalarında hücre canlılığı MTT analizi ile, hücre tutunması, yayılması ve miyojenik hücre morfolojisi SEM analizi ve hücre iskeleti/hücre çekirdeği floresan boyaması ile belirlenmiştir. Test edilen elektriksel uyarım parametreleri **Çizelge 4.11**'de verilmiştir.

Çizelge 4.11. Elektrik uyarımlı biyoreaktör çalışmalarında kullanılan Faz 1 ve Faz 2 analiz grupları, grup kısaltmaları ve analizler.

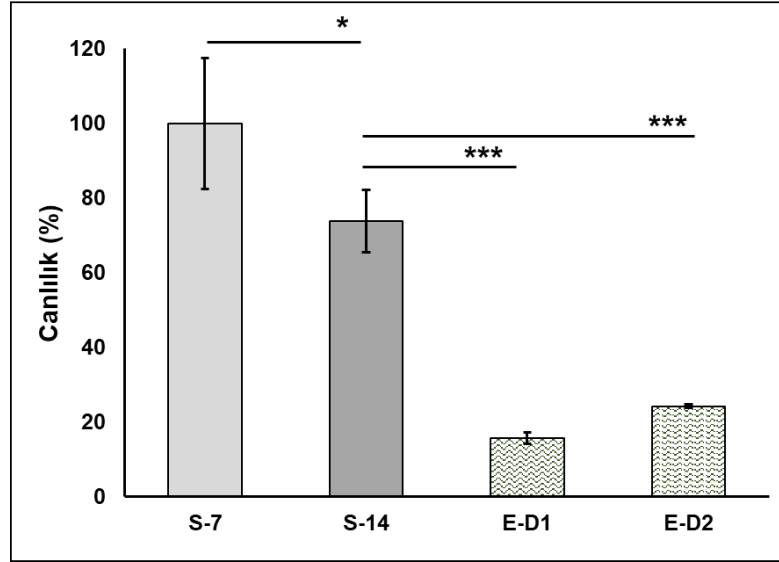
Kısaltmalar		Analizler		
S-7	Statik kültür – 7. Gün	Faz 1*-2**		
S-14	Statik kültür – 14. Gün	Faz 1-2		
Elektrik uyarımlı biyoreaktör – 14. Gün				
	Uygulama süresi	Voltaj (V)	Atım periyodu (ms)	
E-D1	20 dk atım 2 sa dinlenme	0,4	6	Faz 1-2
E-D2	20 dk atım 2 sa dinlenme	0,4	2	Faz 1-2

*Faz 1 analizler: MTT, SEM ve F-aktin/DAPI boyama.

**Faz 2 analizler: Mekanik analizler, RT-qPCR, İmmünohistokimyasal boyama.

4.5.2.1. Hücre canlılığının belirlenmesi

Hızalı P3HB/PBA nanofiber matrisler üzerindeki C2C12 fare miyoblast hücrelerinin, statik kültürün 7. ve 14. gününde (S-7 ve S-14) ve elektrik uyarımlı kültür gruplarının 14. gününde (E-D1 ve E-D2) MTT analizi ile belirlenen yüzde canlılık değerleri Şekil 4.44'te verilmiştir.

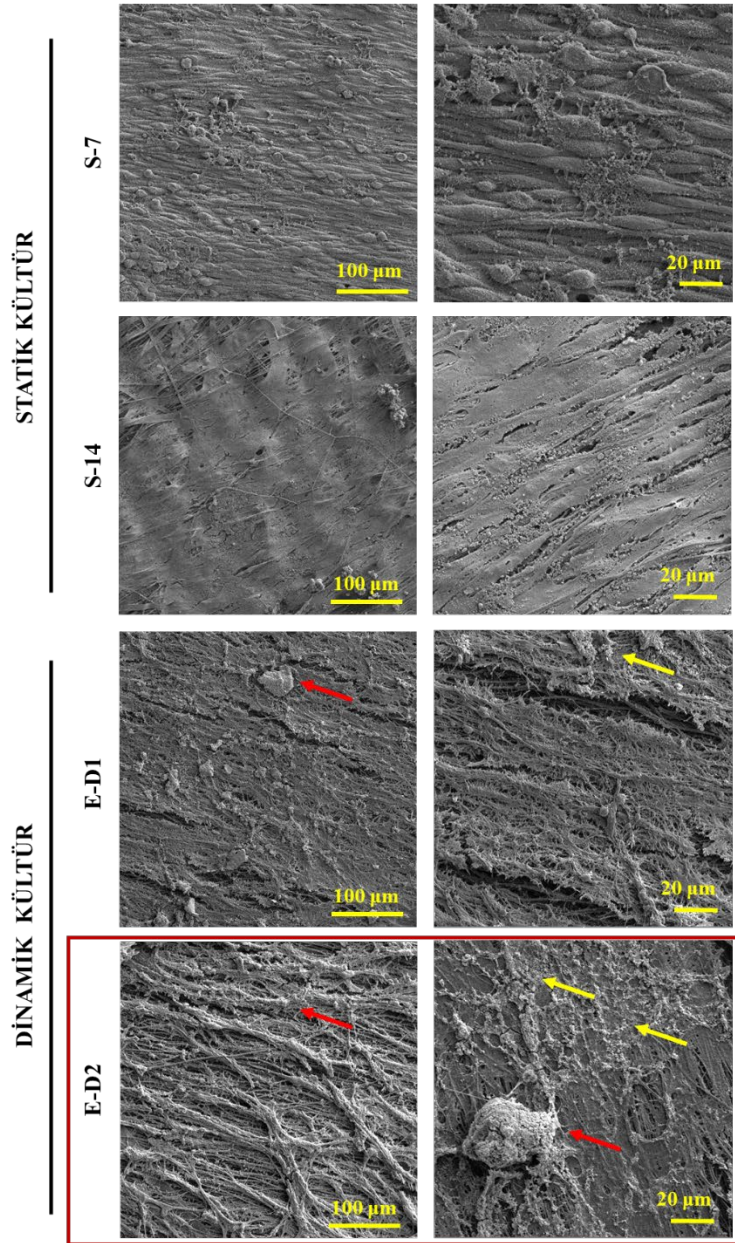


Şekil 4.44. Statik kültürün 7. ve 14. günlerinde (S-7 ve S-14) ve elektrik uyarımlı dinamik kültürün 14. gününde (E-D1 ve E-D2) hızalı P3HB/PBA nanofiber matrisler üzerindeki C2C12 hücrelerinin yüzde canlılık değerleri (İstatistiksel anlamlı farklılıklar $n = 4$, $*p < 0,05$, $***p < 0,001$ statik kültürün 14. günü kontrol grubu olduğunda).

Statik kültür gruplarında Kısım I ve mekanik uyarımlı biyoreaktör çalışmalarından elde edilen sonuçlar ile benzer sonuçlar elde edilmiştir. Statik kültürün 14. gününde, statik kültürün 7. gününe oranla, istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş görülmüştür ($*p < 0,05$). Statik kültürün 7. gününde %100 olan canlılık değeri, yaklaşık %75 canlılığa düşmüştür. Statik kültürün 14. günü ile E-D1 ve E-D2 gruplarının 14. gün canlılık değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı büyük bir düşüş tespit edilmiştir ($***p < 0,001$). Her iki grupta da canlılık yaklaşık %20 oranına düşmüştür. E-D1 ve E-D2 gruplarının canlılık değerleri arasında anlamlı bir farklılık belirlenememiştir ($p > 0,05$). Canlılıktaki düşüşün nedeni, mekanik uyarımlı biyoreaktör çalışmalarında detayları ile açıklandığı üzere, hücrelerin farklılaşması ve hücrelerin iskele derinliği boyunca göçü ile açıklanmaktadır.

4.5.2.2. SEM analizi

Hızalı P3HB/PBA nanofiber matrisler üzerindeki C2C12 fare miyoblast hücrelerinin statik kültürün 7. ve 14. gününde (S-7 ve S-14) ve elektrik uyarımlı dinamik kültür gruplarının (E-D1 ve E-D2) 14. gününde tutunma, yayılma ve miyojenik morfolojileri Şekil 4.45'te verilmiştir.



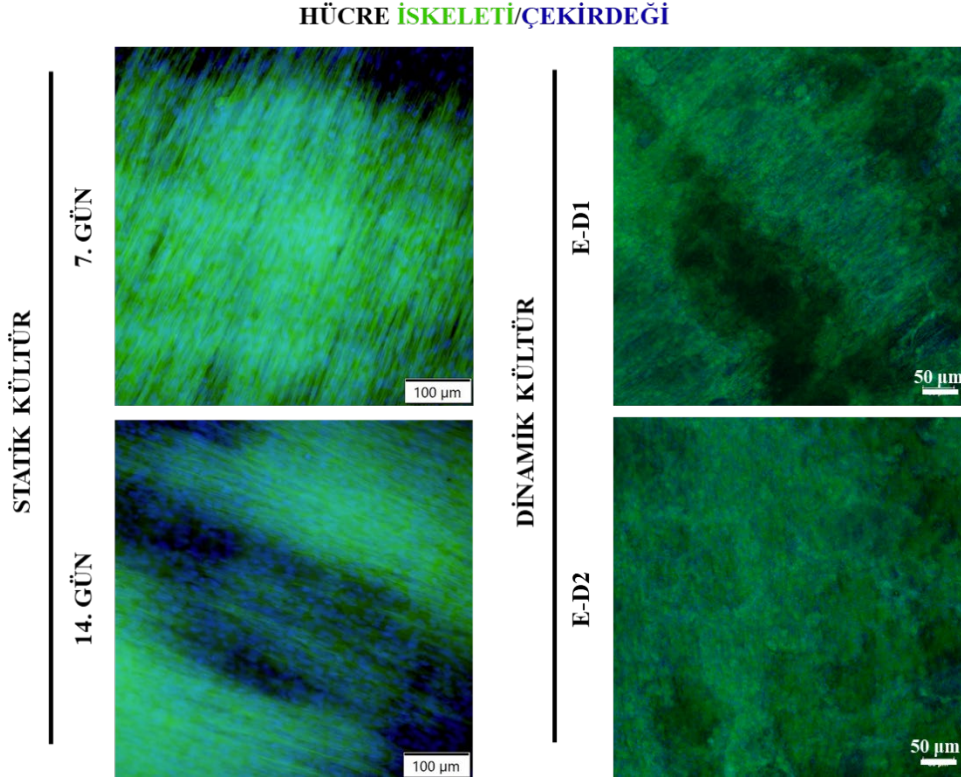
Şekil 4.45. Statik kültürün 7. ve 14. günlerinde ve elektrik uyarımlı dinamik kültürün 14. gününde (E-D1 ve E-D2) hizalı P3HB/PBA nanofiber matrisler üzerindeki C2C12 hücrelerinin 500X ve 1500X büyütmelemedeki SEM fotoğrafları.

Statik kültür gruplarında Kısım I ve mekanik uyarımlı biyoreaktör çalışmalarına benzer şekilde hücre davranışı gözlemlenmiştir. Statik grupların aksine, elektriksel uyarımlı her iki dinamik kültür grubunda düzenli ve tübüler yapıların korunduğu belirlenmiştir. Mikrovilli oluşumu her iki dinamik kültür grubunda da gözlemlense de E-D2 grubunda oldukça yoğun mikrovilli yapısı tespit edilmiştir (sarı oklar). Bununla beraber E-D2 grubunda oluşan fiber yapıların kalın ve sürekli olduğu, bir ağ oluşturduğu, bölgesel nöromusküler bağlantı noktası benzeri yapıların olduğu gözlemlenmiştir (kırmızı oklar).

E-D1 grubunda oluşan miyofibrillerin uzunluğu 200-250 μm , kalınlığı ise yaklaşık 40-45 μm olarak tespit edilirken, E-D2 grubunda oluşan miyofibrillerin uzunluğu 300-350 μm , kalınlığı yaklaşık 25-30 μm olarak belirlenmiştir. Buradan, doğal dokuya benzer şekilde, 1-3 μm kalınlığındaki miyotübüler yapıların füzyonu ile elektrik uyarımlı biyoreaktörde kültürün 14. gününde daha kalın, uzun ve sürekli miyofibril yapılarının olduğu sonucu çıkarılabilmektedir.

4.5.2.3. Hücre iskeleti/çekirdeği boyama

Hızalı P3HB/PBA nanofiber matrisler üzerindeki C2C12 hücrelerinin statik kültürün 7. ve 14. günlerinde (S-7 ve S-14) ve elektrik uyarımlı dinamik kültürlerin (E-D1 ve E-D2) 14. gününde yayılma ve miyojenik morfolojisi F-aktin/DAPI boyama ile belirlenmiştir, floresan ve konfokal mikroskop fotoğrafları Şekil 4.46’da verilmiştir.



Şekil 4.46. Statik kültürün 7. ve 14. günlerinde ve elektrik uyarımlı dinamik kültürün 14. gününde (E-D1 ve E-D2) hizalı P3HB/PBA nanofiber matrisler üzerindeki C2C12 hücrelerinin F-aktin/DAPI boyama floresan (statik kültür) ve konfokal (dinamik kültür) mikroskop görüntüleri (Büyütmeler, statik kültür: 10 X ve dinamik kültür: 20 X).

Statik gruplara ait görüntülerin Kısım I ve mekanik uyarımlı biyoreaktör çalışma sonuçları ile uyumlu olduğu görülmüştür. E-D1 ve E-D2 gruplarına ait F-aktin/DAPI görüntüleri karşılaştırmalı olarak incelendiğinde ise SEM fotoğrafları ile benzer morfolojik bulgular tespit edilmiştir. SEM analizinden farklı olarak E-D1 ve E-D2 gruplarında hücrelerin matris derinliği boyunca yayıldıkları (70-80 µm derinlik) ve hizalanmış bir doku oluşturduğu gözlemlenmiştir. E-D1 grubunda derinlik boyunca yayılım gözlemlense de hizalı, tübüler ve füzyona uğramış çekirdekli yapılar E-D2 grubu ile karşılaştırıldığında daha azdır.

Ön analizler sonrasında skorlama yapılmış ve **Çizelge 4.12**'de sonuçlar paylaşılmıştır. Canlılık analizi, SEM analizi ve F-aktin/DAPI boyamalarında elde edilen sonuçlar birlikte değerlendirilmiş ve gruplar arasında anlamlı farklılıklar olmaması nedeniyle, Faz 2 analizlere her iki grupta da devam edilmesi gerektiğine karar verilmiştir.

Çizelge 4.12. Elektrik uyarımlı biyoreaktör Faz 1 hücre kültürü çalışmalarında elde edilen sonuçlara göre gruplar arası skorlama.

		E-D1*	E-D2**
Morfolojik özellikler (SEM)	Atım periyodu etkisi	3	5
Morfolojik özellikler (F-aktin/DAPI)	Atım periyodu etkisi	4	4
% Canlılık	MTT	2	2
	Toplam	9	11

*E-D1: 20 dk atım/2 sa dinlenme, 6 ms atım periyodu ve 0.4 V.

**E-D2: 20 dk atım/2 sa dinlenme, 2 ms atım periyodu ve 0.4 V.

Elektrik uyarımlı biyoreaktör Faz 2 çalışmalarında matriks ve hücre kompleksinin mekanik özellikleri çekme testleri ile, miyojenik gen ifadeleri RT-qPCR analizi ile, miyojenik belirteçleri ise immünohistokimyasal boyamalar ile belirlenmiştir. Faz 2 hücre kültürü çalışmalarında kontrol grubu olarak statik 14. gün örnekleri seçilmiştir. Bununla birlikte matrikslerin reaktöre alınmadan önceki durumlarının belirlenmesi amacıyla statik 7. gün örneklerine de analizler yapılmıştır.

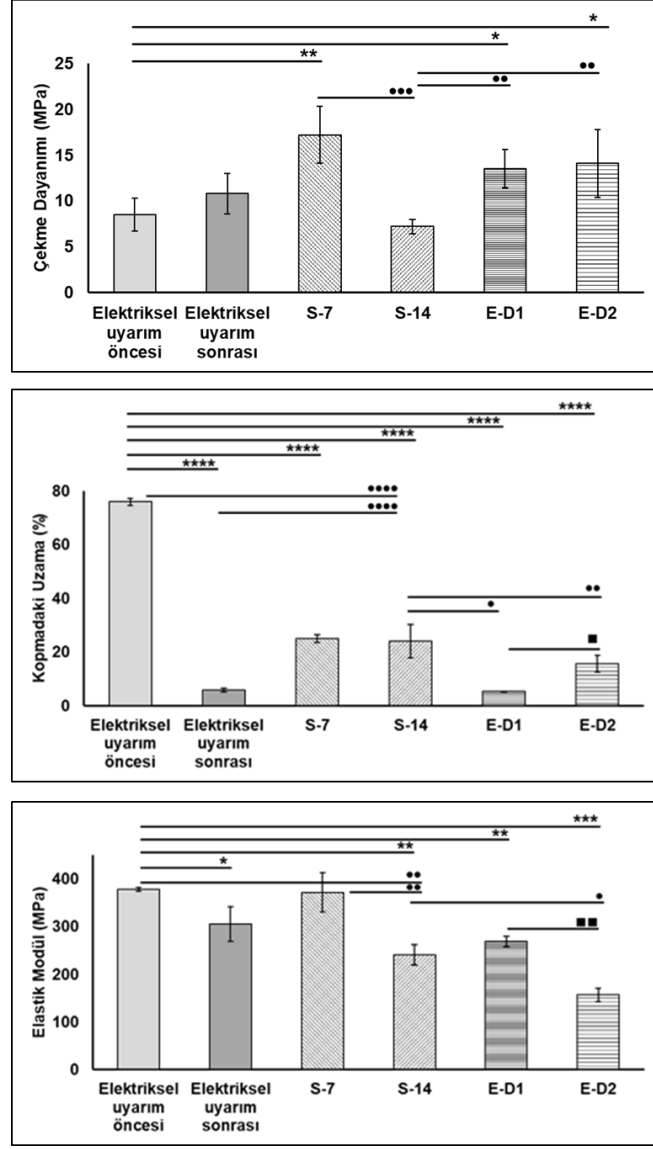
4.5.2.4. Mekanik özelliklerin tayin edilmesi

C2C12 hücrelerinin statik 7 ve 14. gün (S-7 ve S-14) kültürde ve elektriksel uyarım uygulandığı dinamik kültürün 14. gününde (E-D1 ve E-D2) hizalı P3HB/PBA nanofiber matrikslerin mekanik özelliklerinde yarattığı değişimler **Çizelge 4.13**'te; çekme dayanımı, kopmadaki uzama ve elastik modül değerlerine ait istatistiksel farklılıklar **Şekil 4.47**'de verilmiştir.

Çizelge 4.13. Elektrik uyarımlı biyoreaktör ileri hücre kültürü çalışmalarında mekanik özelliklerdeki değişimler.

Kültür öncesi mekanik özellikler						
	Çekme dayanımı (MPa)		Kopmadaki uzama (%)		Elastik modül (MPa)	
	8,5 ± 1,8		76,0 ± 1,3		378,2 ± 4,2	
Statik kültürde mekanik özelliklerdeki değişim						
	Çekme dayanımı (MPa)	Değişim (%)	Kopmadaki uzama (%)	Değişim (%)	Elastik modül (MPa)	Değişim (%)
S-7	17,2 ± 3,1	102 ↑	25,1 ± 1,4	67 ↓	372,2 ± 41,0	1,6 ↓
S-14	7,2 ± 0,8	13 ↓	24,1 ± 6,3	68 ↓	240,4 ± 21,5	36 ↓
Elektrik uyarımlı biyoreaktörde mekanik özelliklerdeki değişim						
	Çekme dayanımı (MPa)	Değişim (%)	Kopmadaki uzama (%)	Değişim (%)	Elastik modül (MPa)	Değişim (%)
Ön denemeler*	10,8 ± 2,2	27 ↑	5,9 ± 0,7	92 ↓	305,6 ± 36,6	19 ↓
E-D1	13,5 ± 2,1	59 ↑	5,3 ± 0,2	93 ↓	269,7 ± 10,7	29 ↓
E-D2	14,1 ± 3,7	65 ↑	15,6 ± 3,1	80 ↓	156,8 ± 14,4	59 ↓

***7 günlük hücresiz elektrik uyarımlı biyoreaktör ön denemeleri sonrası: 6 ms atım periodu, 0.4 V voltaj ve 20 dk atım/2 sa dinlenme parametrelerinde.*



Şekil 4.47. Elektriksel uyarım öncesi, 7 günlük hücresiz elektriksel uyarım sonrası, statik 7. ve 14. gün (S-7 ve S-14) ve dinamik 14. gün örneklerine (E-D1 ve E-D2) ait karşılaştırmalı çekme dayanımı, kopmadaki uzama ve elastik modül değerleri (İstatistiksel olarak önemli farklar $n = 3$, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$ elektriksel uyarım öncesi matrisler kontrol grubu olduğunda; $\bullet p < 0,05$, $\bullet\bullet p < 0,01$, $\bullet\bullet\bullet p < 0,001$, $\bullet\bullet\bullet\bullet p < 0,0001$ statik 14. gün matrisler kontrol grubu olduğunda; $\blacksquare p < 0,05$, $\blacksquare\blacksquare p < 0,01$ dinamik kültür grupları karşılaştırıldığında).

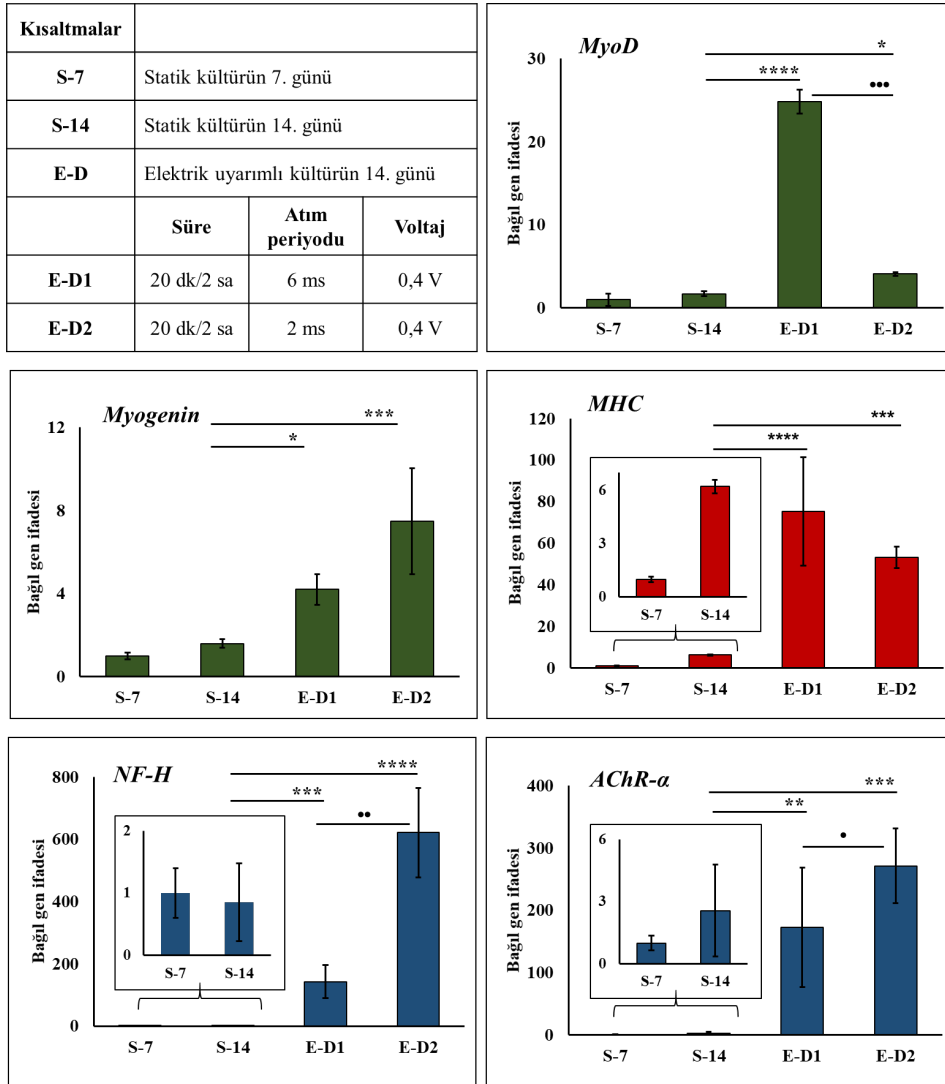
E-D1 ve E-D2 gruplarının çekme dayanımında, elektriksel uyarım öncesine göre, anlamlı artış tespit edilmiştir ($*p < 0,05$). Çekme dayanımı 14. günde E-D1 grubunda %59 artış göstererek $13,5 \pm 2,1$ MPa değerine, E-D2 grubunda %65 artış göstererek $14,1 \pm 3,7$ MPa değerine çıkmıştır. Diğer gruplarla anlamlı farklılıklara rastlanmamıştır ($p > 0,05$). Statik 14. gün matrisler ile dinamik örnekler karşılaştırıldığında, E-D1 ve E-D2 gruplarının her

ikisinin de çekme dayanımında istatistiksel anlamlı artış tespit edilmiştir ($^{**}p<0,01$). Dinamik örnek grupları birbirleri ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık belirlenmemiştir ($p>0,05$). E-D1 ve E-D2 gruplarının SEM fotoğrafları ve F-aktin/DAPI boyamalarında tartışıldığı üzere, yüksek oranda hizalanmış ve kalın miyofibrillerin oluştuğu tespit edilmiştir. Buradan yola çıkılarak oluşan doku, malzemeye sırasıyla %59 ve %65 oranında katkı vererek çekme dayanımını anlamlı olarak arttırmıştır.

Statik 14. gün matriksler kontrol grubu kabul edildiğinde, dinamik örnekler ile karşılaştırma yapıldığında, E-D1 ve E-D2 gruplarının kopmadaki uzama miktarında istatistiksel anlamlı azalma tespit edilmiştir (sırasıyla, $^{*}p<0,05$ ve $^{**}p<0,01$). Dinamik örnek grupları birbirleri ile karşılaştırıldığında E-D2 grubunun kopmadaki uzama miktarının E-D1 grubuna göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir ($^{*}p<0,05$). Statik 14. gün matriksler kontrol grubu kabul edildiğinde, statik 7. güne göre elastik modül değerlerinde azalma tespit edilmiştir ($^{**}p<0,01$). Dinamik örnekler ile karşılaştırma yapıldığında, sadece E-D2 grubunun elastik modül değerlerinde anlamlı azalma görülmüştür ($^{*}p<0,05$). Dinamik örnek grupları birbirleri ile karşılaştırıldığında, E-D1 grubunun elastik modül değerinin E-D2 grubunun elastik modül değerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu belirlenmiştir ($^{**}p<0,01$). Gerilim-gerinim eğrisi göz önünde bulundurulduğunda malzemenin plastik bölgedeki deformasyonuna bağlı olarak kopmadaki uzama miktarının azalması, çekme dayanımındaki artışa bağlı olarak da elastik modülde artışın gözlemlenmesi beklenen bir durumdur.

4.5.2.5. Miyojenik gen ifadelerinin belirlenmesi

Hızalı P3HB/PBA nanofiber matrisler üzerindeki C2C12 hücrelerinin statik (S-7 ve S-14) ve elektrik uyarımlı dinamik kültürde (E-D1 ve E-D2) miyojenik gen ifadelerinin belirlendiği RT-qPCR analizi sonuçları Şekil 4.48’de verilmiştir. Miyojenik farklılaşmanın belirlenmesi amacıyla MyoD, Myogenin ve MHC gen ifadeleri; miyojenik maturasyonun belirlenmesi amacıyla NF-H ve AChR- α gen ifadeleri tespit edilmiştir.



Şekil 4.48. Statik kültürün 7. ve 14. günlerinde (S-7 ve S-14) ve elektrik uyarımlı dinamik kültürün 14. gününde (E-D1 ve E-D2) C2C12 hücrelerine ait bağıl MyoD, Myogenin, MHC, NF-H ve AChR- α gen ifadeleri (İstatistiksel anlamlı farklılıklar $n = 4$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ statik kültürün 14. günü kontrol grubu olduğunda, • $p < 0,05$, •• $p < 0,01$, ••• $p < 0,001$ dinamik kültür grupları karşılaştırıldığında).

Statik kültüre ait gen ifadeleri Kısım I ve mekanik uyarımlı biyoreaktör çalışmaları ile tutarlıdır. Statik kültürün 14. günü kontrol grubu olduğunda, MyoD bağıl gen ifadesinde E-D1 grubunda yaklaşık 14 kat artış (**** $p<0,0001$), E-D2 grubunda ise yaklaşık 2,5 kat artış ($*p<0,05$) tespit edilmiştir. Dinamik kültür grupları karşılaştırıldığında E-D1 grubundaki MyoD bağıl gen ifadesinin E-D2 grubundaki MyoD bağıl gen ifadesinden yaklaşık 6 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir (** $p<0,001$). Statik kültürün 14. günü kontrol grubu olduğunda, Myogenin bağıl gen ifadesinde E-D1 grubunda yaklaşık 2,5 kat artış ($*p<0,05$), E-D2 grubunda ise 5 kat artış (** $p<0,001$) tespit edilmiştir. Dinamik kültür grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı farklılık belirlenmemiştir ($p>0,05$). Statik kültürün 14. günü kontrol grubu olduğunda, MHC bağıl gen ifadesinde E-D1 ve E-D2 gruplarında sırasıyla yaklaşık 12 kat (**** $p<0,0001$) ve 8,5 kat (** $p<0,001$) artış tespit edilmiştir. Dinamik kültür grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı farklılık belirlenmemiştir ($p >0,05$). Elektriksel uyarım miyojenik farklılaşmaya önemli ölçüde katkı sağlamış, hücrelerin miyojenik maturasyon yolağına girmelerini sağlamıştır. Ancak MyoD, Myogenin ve MHC gen ifadeleri birlikte değerlendirildiğinde, E-D2 grubundaki hücrelerin miyotüp farklılaşmalarını tamamladığı ve miyofibriler yapıların oluşmaya başladığı öngörülebilir.

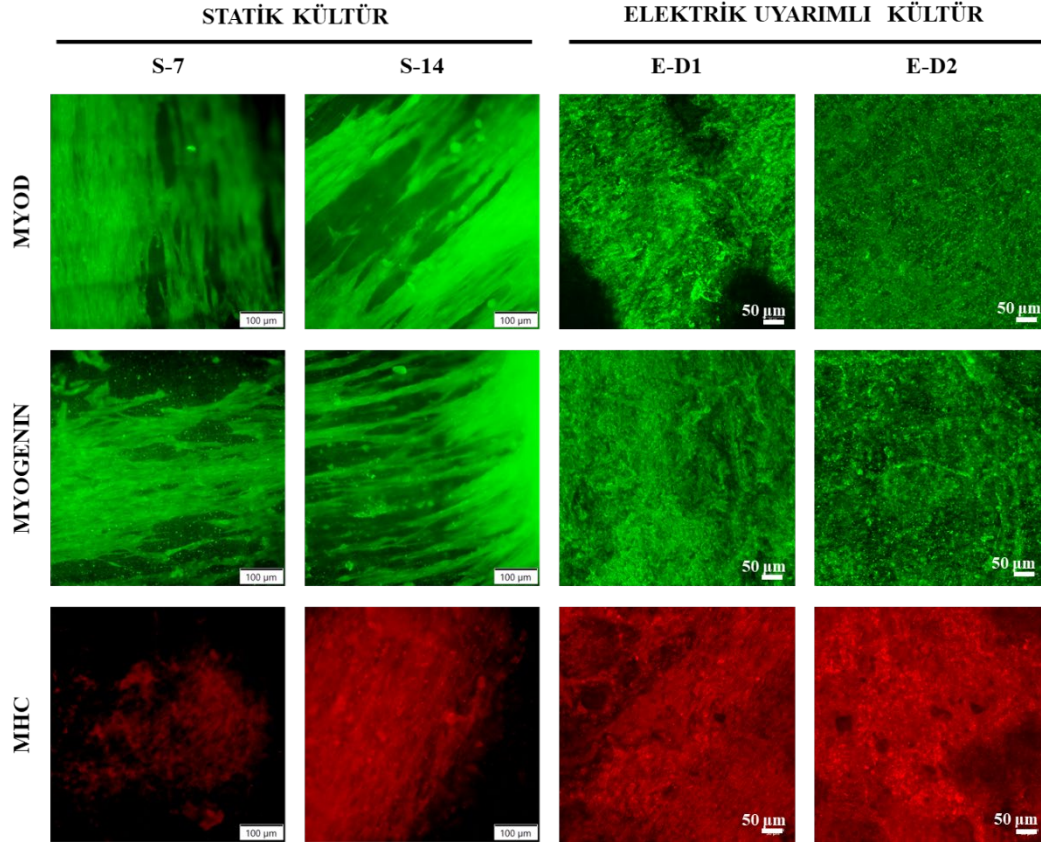
Stern-Straeter ve ark. 2B fibrin jeller üzerinde primer sıçan miyoblastları ile elektriksel uyarım çalışmaları gerçekleştirmişlerdir [109]. Örneklere elektriksel uyarım 6,8 mA şiddetinde, 4 ms atım periyodunda, her 4 saniyede bir aralıklarla 8 gün boyunca uygulanmıştır. Yapılan gen ifadesi analizlerinde beklenenin aksine MyoD, Myogenin ve AChR- ϵ gen ifadelerinde elektriksel uyarımla birlikte azalma belirlenmiştir. Benzer olarak, Huang ve ark. 2B fibrin jeller üzerinde primer sıçan miyoblastları ile elektriksel uyarım çalışmaları gerçekleştirmişlerdir [110]. Örneklere elektriksel uyarım 20 Hz frekansta, 5 atım/4s sıklığında, 5 V voltajda ve 1,5 ms atım periyodunda 14 gün boyunca uygulanmıştır. Yapılan Western blot analizinde MHC protein seviyelerinin elektriksel uyarımla birlikte düştüğü tespit edilmiştir. Langelaan ve ark. 3B kolajen-Matrigel® sistemler üzerinde C2C12 miyoblastları ve kas öncül hücreleri ile elektriksel uyarım çalışmaları gerçekleştirmişlerdir [113]. Örneklere elektriksel uyarım 2 Hz frekansta, 6 ms atım periyodunda ve 4 V/cm voltajında 48 saat boyunca uygulanmıştır. Yapılan gen ifadesi analizlerinde MyoD, Myogenin ve MHC gen ifadelerinde farklılaşmaya bağlı olarak anlamlı artış tespit edilmiştir. Elektriksel uyarımlar 2B ve 3B sistemlere benzer şekilde etki etmemiştir. Bu durumda elektriksel etkinin tek başına miyojenik farklılaşma

için yeterli olmadığı, uygun mekanik, elektrik, morfolojik özelliklere sahip malzemeler ile de desteklenmesi gerektiği açıktır.

Bu öngörüyü destekleyecek şekilde, NF-H bağıl gen ifadesinde E-D1 grubunda yaklaşık 165 kat artış ($***p<0,001$), E-D2 grubunda yaklaşık 720 kat artış ($****p<0,0001$) tespit edilmiştir. Dinamik kültür grupları karşılaştırıldığında E-D2 grubundaki NF-H bağıl gen ifadesinin E-D1 grubundaki NF-H bağıl gen ifadesinden yaklaşık 4,5 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir ($**p<0,01$). E-D2 grubundaki artış, bu uyarım grubunda hücrelerin büyük ölçüde maturasyon yolağında olduğunu göstermektedir. AChR- α bağıl gen ifadesinde ise E-D1 grubunda yaklaşık 65 kat artış ($**p<0,01$), E-D2 grubunda yaklaşık 105 kat artış ($***p<0,001$) tespit edilmiştir. Dinamik kültür grupları karşılaştırıldığında E-D2 grubundaki AChR- α bağıl gen ifadesinin E-D1 grubundaki AChR- α bağıl gen ifadesinden yaklaşık 1,5 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir ($*p<0,05$). E-D2 grubunda AChR kümelenmelerinin oldukça yüksek olduğu ve dolayısıyla fonksiyonel bağlantı noktalarının oluştuğu tespit edilmiştir.

4.5.2.6. Miyojenik belirteçlerin belirlenmesi

Hızalı P3HB/PBA nanofiber matrisler üzerindeki C2C12 hücrelerinin statik (S-7 ve S-14) ve elektrik uyarımlı dinamik kültürde (E-D1 ve E-D2) MyoD, Myogenin ve MHC miyojenik belirteçleri immünohistokimyasal boyamalar ile belirlenmiş ve floresan/konfokal mikroskop görüntüleri Şekil 4.49'da verilmiştir.



Şekil 4.49. Statik kültürün 7. ve 14. günlerinde ve elektriksel uyarımlı dinamik kültürün 14. gününde (E-D1 ve E-D2) C2C12 hücrelerine ait MyoD, Myogenin ve MHC immünohistokimyasal boyama konfokal mikroskobu görüntüleri. MyoD (yeşil) antijeni hücre çekirdeğinde, Myogenin (yeşil) antijeni hücre iskeletinde ve MHC (kırmızı) antijeni kalın filamentlerde lokalize olmuştur. (Büyütmeler, statik kültür: 10 X ve dinamik kültür: 20 X).

Statik kültürde MyoD, Myogenin ve MHC gen belirteçleri Kısım I ve mekanik uyarımlı biyoreaktör çalışmaları ile tutarlıdır. Elektrik uyarımlı biyoreaktör gruplarına ait örneklerde hücreler derinlik boyunca yayıldığından konfokal mikroskop ile görüntüleme yapılmıştır. MyoD, Myogenin ve MHC antijenlerinin tüm gruplarda bulunduğu ancak statik örneklerde hücrelerin yalnızca yüzeyde bulunduğu, derinlik boyunca pozitif ışımaya

vermediği gözlemlenmiştir. Biyoreaktör örneklerinde yüzeyde ve iskele derinliği boyunca yaklaşık 80 µm'lik bir derinliğe kadar hücrelerin tüm antikorlar için pozitif ışımaya verdiği görülmüştür. İmmünohistokimyasal boyamalar RT-qPCR analizleri ile tutarlı sonuçlar vermiştir. E-D1 ve E-D2 grupları arasında MyoD pozitif ışımalar arasında bir farklılık gözlemlenmiştir. E-D2 grubunda, E-D1 grubuna göre, Myogenin ve MHC pozitif ışımalar bölgesel olarak daha kalın ve daha düzenli tübüler yapıların oluştuğunu, miyofibriller yapıların sürekli olduğunu göstermiştir. Langelaan ve ark.'larının 3B kolajen-Matrigel® sistemler üzerinde gerçekleştirdikleri elektriksel uyarım çalışmalarında da benzer şekilde, yapılan immünohistokimyasal boyamalar ile MHC pozitif hücrelerin elektriksel uyarım ile birlikte anlamlı olarak arttığı belirlenmiştir [113].

Elektriksel uyarımlı biyoreaktör, nöral sinyalleri taklit etme yeteneği ile, MHC, NF-H ve AChR-α gen ifadelerinden anlaşıldığı üzere, mekanik uyarımlı biyoreaktöre göre miyojenik maturasyon aşamasında daha iyi sonuçlar vermiştir. Elektriksel uyarımla kas fonksiyonu için kritik olan nöromüsküler kavşakların oluşumunun kolaylaştığı NF-H ve AChR-α gen ifadeleri ile belirlenmiştir. Mekanik uyarımla bu oluşum bir miktar sağlanabilmiş ancak yetersiz kalmıştır. Elektriksel uyarım ile doğrudan kas kasılmaları taklit edilerek kuvvet ile fonksiyonel kas aktivitesi arasında korelasyon oluşturulabildiği, nöral sinyallere yanıt veren ve eşzamanlı olarak kasılan kas fiberlerinin gelişiminin teşvik edildiği ve kas maturasyonunun desteklendiği tespit edilmiştir. Ayrıca sinirsel sinyal yolları uyarılarak, iskelet kasına özgü genlerin ve proteinlerin ifadesi arttırılabildiği gösterilmiştir. Elektriksel uyarımlı biyoreaktörden çıkarılan dokunun implante edildiğinde sinir sistemiyle entegrasyona daha uygun olması ve kas fonksiyonunu geri kazanma potansiyelini arttırması olasıdır.

Faz 2 analizler sonrasında yapılan skorlama **Çizelge 4.14**'te verilmiştir. E-D2 grubunun elektrik uyarımlı biyoreaktör çalışmalarındaki en iyi grup olduğu tespit edilmiştir. Bu durumda elektrik uyarımlı biyoreaktör çalışmaları için en uygun döngüsel uygulama sıklığının 20 dk atım/2 sa dinlenme, en uygun voltajın 0,4 V, en uygun atım periyodunun 2 ms olduğu belirlenmiştir. Elektromekanik uyarım çalışmalarında elektriksel uyarım parametresi olarak E-D2 grubu ile devam edilmesine karar verilmiştir.

Çizelge 4.14. Elektrik uyarımlı biyoreaktör hücre kültürü çalışmalarında elde edilen sonuçlara göre gruplar arası skorlama.

		Analizler	E-D1*	E-D2**	
Morfolojik özellikler		SEM	3	5	
		F-aktin/DAPI	4	4	
Mekanik özellikler		Çekme testleri	4	5	
Miyojenik gen ifadesi	RT-qPCR	MyoD	5	MyoD	3
		Myogenin	3	Myogenin	4
		MHC	5	MHC	5
		NF-H	2	NF-H	5
		AChR- α	3	AChR- α	5
Miyojenik belirteç	IHC	MyoD	4	MyoD	5
		Myogenin	4	Myogenin	4
		MHC	4	MHC	5
% Canlılık		MTT	2	2	
Toplam			43	52	

*E-D1: 20 dk atım/2 sa dinlenme, 6 ms atım periyodu ve 0.4 V.

**E-D2: 20 dk atım/2 sa dinlenme, 2 ms atım periyodu ve 0.4 V.

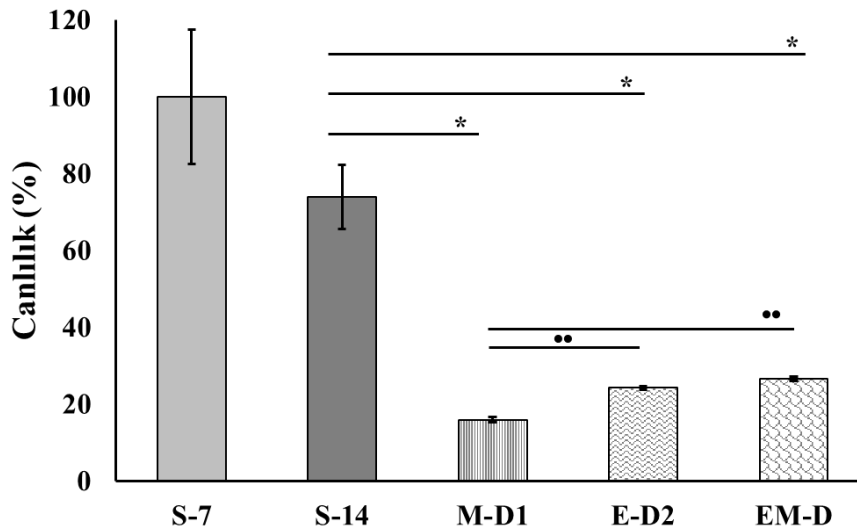
4.5.3. Elektromekanik Uyarımlı Biyoreaktör Çalışmaları

Elektromekanik uyarımlı biyoreaktör çalışmaları mekanik (M-D1) ve elektriksel (E-D2) uyarımlı biyoreaktör çalışmalarında miyojenik maturasyona en iyi cevap veren gruplar birleştirilerek gerçekleştirilmiştir. Hücre canlılığı MTT analizi ile, hücre tutunması, yayılması ve miyojenik hücre morfolojisi SEM analizi ve F-aktin/DAPI boyama ile belirlenmiştir. Matriks ve hücre kompleksinin mekanik özellikleri çekme testleri ile, miyojenik gen ifadeleri RT-qPCR analizi ile, miyojenik belirteçleri ise immünohistokimyasal boyamalar ile belirlenmiştir. Kontrol grubu olarak statik 14. gün örnekleri seçilmiştir. Bununla birlikte matrikslerin reaktöre alınmadan önceki durumlarının belirlenmesi amacıyla statik 7. gün örneklerine de analizler yapılmıştır.

4.5.3.1. Hücre canlılığının belirlenmesi

Hızalı P3HB/PBA nanofiber matrisler üzerindeki C2C12 fare miyoblast hücrelerinin, statik kültürün 7. ve 14. günlerinde (S-7 ve S-14), mekanik (M-D1), elektrik (E-D2) ve elektromekanik (EM-D) uyarımlı dinamik kültür gruplarının 14. gününde MTT analizi ile belirlenen yüzde canlılık değerleri **Şekil 4.50**'de verilmiştir.

Kısaltmalar					
S-7	Statik kültürün 7. günü				
S-14	Statik kültürün 14. günü				
Mekanik uyarımlı kültürün 14. günü					
	Süre	Gerinim	Frekans		
M-D1	20 dk / 2 sa	%5	0,5 Hz		
Elektriksel uyarımlı kültürün 14. günü					
	Süre	Atım süresi	Voltaj		
E-D2	20 dk / 2 sa	2 ms	0,4 V		
Elektromekanik uyarımlı kültürün 14. günü					
	Süre	Gerinim	Frekans	Atım süresi	Voltaj
EM-D	20 dk / 2 sa	%5	0,5 Hz	2 ms	0,4 V



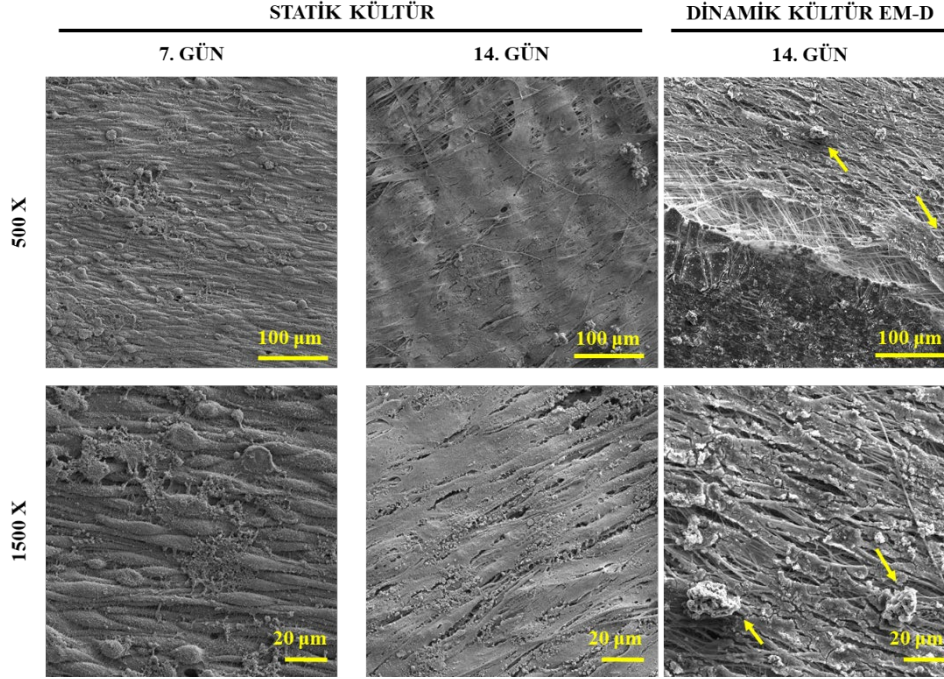
Şekil 4.50. Statik kültürün 7. ve 14. günlerinde (S-7 ve S-14), mekanik uyarımlı dinamik kültürün 14. gününde (M-D1), elektrik uyarımlı dinamik kültürün 14. gününde (E-D2) ve elektromekanik uyarımlı dinamik kültürün 14. gününde (EM-D) hızalı P3HB/PBA nanofiber matrisler üzerindeki C2C12 hücrelerinin yüzde canlılık değerleri (İstatistiksel anlamlı farklılıklar $n = 4$, $*p < 0,05$ statik kültürün 14. günü kontrol grubu olduğunda, $**p < 0,01$ dinamik kültür grupları karşılaştırıldığında).

Statik kültürde mekanik ve elektriksel uyarımlı biyoreaktör çalışmalarından elde edilen sonuçlar ile benzer sonuçlar elde edilmiştir. Statik kültürün 14. gününde farklılaşmanın başlaması ile birlikte canlılıkta istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş görülmüştür (** $p<0,01$) ve canlılık yaklaşık %75 değerine düşmüştür.

Statik kültürün 14. günü ile mekanik uyarımlı dinamik kültür grubu (M-D1), elektrik uyarımlı dinamik kültür grubu (E-D2) ve elektromekanik uyarımlı kültür grubu (EM-D) karşılaştırıldığında anlamlı düşüş tespit edilmiştir (* $p<0,05$). M-D1 grubunda yaklaşık %20, E-D2 grubunda yaklaşık %25 ve EM-D grubunda yaklaşık %30 canlılık belirlenmiştir. Dinamik kültür grupları karşılaştırıldığında M-D1 grubundaki canlılık değerinin E-D2 grubu ve EM-D grubu canlılık değerlerinden daha düşük olduğu tespit edilmiştir (** $p<0,01$). E-D2 ve EM-D grupları arasında anlamlı farklılık belirlenmemiştir ($p>0,05$). Canlılıktaki düşüşün iki nedene bağlanabilmektedir. Önceki bölümlerde detayları ile açıklandığı üzere, matriks üzerindeki hücrelerin farklılaşmalarını tamamladığı ve buna bağlı olarak canlılık değerlerinde azalma olduğu; mekanik ve elektriksel koşulların etkisi ile hücrelerin iskele derinliği boyunca göç ettikleri ve bu nedenle MTT çözeltisi ve çözücü DMSO matrikse penetre olmakta zorlandığı düşünülmektedir.

4.5.3.2. SEM analizi

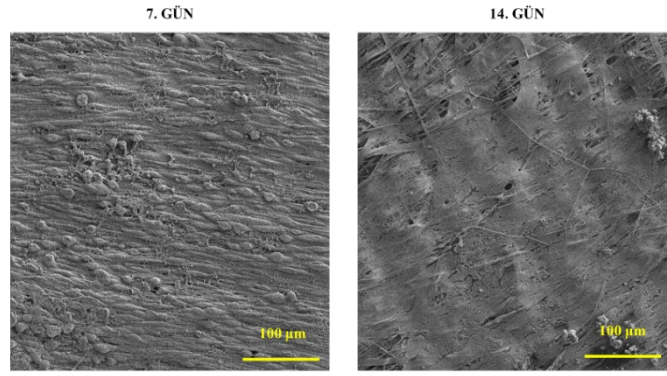
Hızalı P3HB/PBA nanofiber matrisler üzerindeki C2C12 fare miyoblast hücrelerinin statik kültürün 7. ve 14. günlerinde (S-7 ve S-14) ve elektromekanik uyarımlı dinamik kültür grubunun (EM-D) 14. gününde tutunma, yayılma ve miyojenik morfolojileri Şekil 4.51’de verilmiştir.



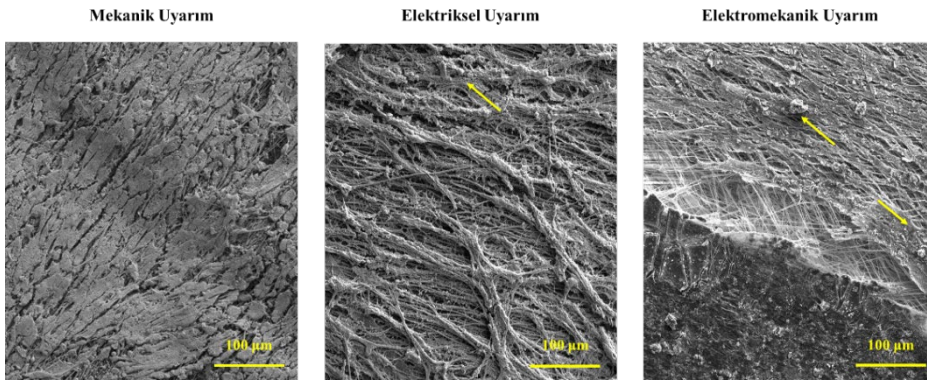
Şekil 4.51. Statik kültürün 7. ve 14. günlerinde ve elektromekanik uyarımlı dinamik kültürün 14. gününde (EM-D) hızalı P3HB/PBA nanofiber matrisler üzerindeki C2C12 hücrelerinin farklı büyütme ölçeklerinde SEM fotoğrafları.

Statik kültür gruplarına ait görüntülerin Kısım I, mekanik ve elektriksel uyarımlı biyoreaktör çalışmaları ile tutarlı olduğu görülmüştür. Elektromekanik uyarımlı matrisler üzerindeki hücrelerin matris yüzeyi ve derinlik boyunca yayıldığı ve oldukça kalın bir doku oluşturduğu belirlenmiştir. EM-D grubunda oldukça yoğun mikrovilli yapısı tespit edilmiştir. Ayrıca nöromusküler bağlantı noktalarının yüzeyde birçok noktada oluştuğu, kalın ve sürekli tübüler yapıların tüm matris boyunca yayıldığı gözlemlenmiştir (sarı oklar). Statik ve dinamik kültür gruplarının karşılaştırmalı SEM fotoğrafları Şekil 4.52’de verilmiştir.

STATİK KÜLTÜR



BİYOREAKTÖR 14. GÜN



Şekil 4.52. Statik kültürün 7. ve 14. günlerinde, mekanik uyarımlı dinamik kültürün 14. gününde (M-D1), elektrik uyarımlı dinamik kültürün 14. gününde (E-D2) ve elektromekanik uyarımlı dinamik kültürün 14. gününde (EM-D) hizalı P3HB/PBA nanofiber matrisler üzerindeki C2C12 hücrelerinin SEM fotoğrafları (büyütme: 500 X).

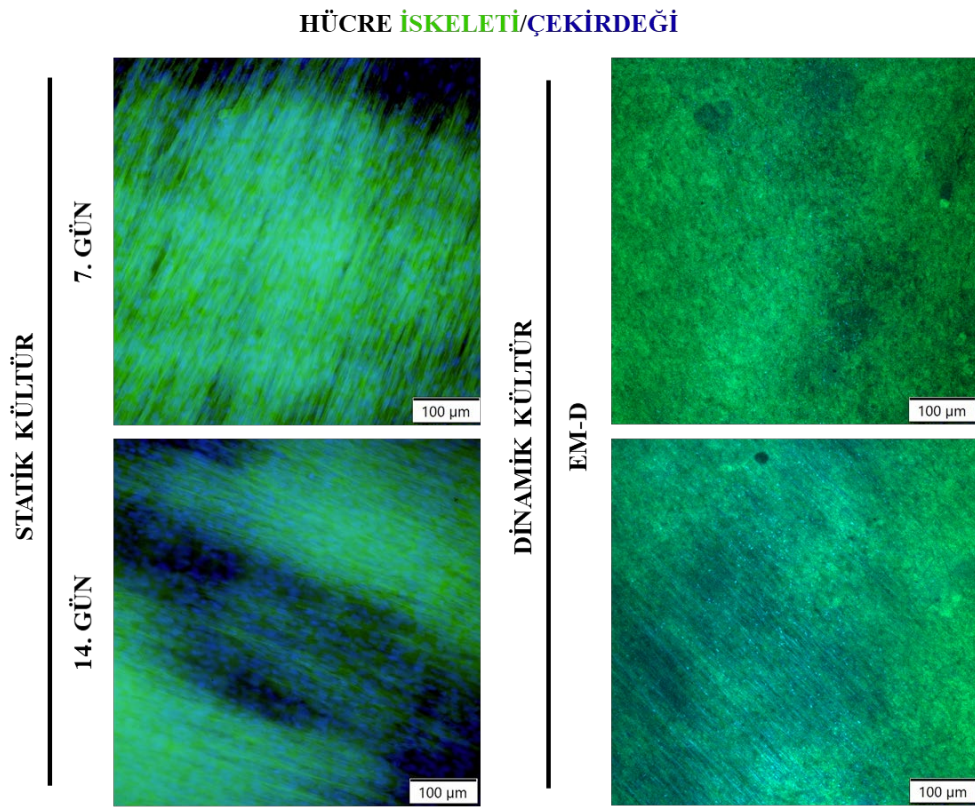
Elektromekanik uyarımlı biyoreaktörde, mekanik ve elektriksel uyarım gruplarına göre daha kalın, uzun ve sürekli miyofibril yapılarının oluştuğu görülmüştür. EM-D grubunda oluşan miyofibrillerin uzunluğu 500-550 µm, kalınlığı yaklaşık 30-35 µm olarak belirlenmiştir.

Mekanik uyarımlı biyoreaktör (M-D1), elektrik uyarımlı biyoreaktör (E-D2) ve elektromekanik uyarımlı biyoreaktör (EM-D) uygulamalarının tümünde hücrelerin matris boyunca yayıldığı, yüzeyden kalkmadıkları, miyojenik karakterlerini korudukları ve devam ettirdikleri tespit edilmiştir. M-D1 grubunda yüzeyde kalın, hizalı ve tübüler yapıda bir doku oluşsa da nöromusküler bağlantı noktaları daha az belirgindir. E-D2 grubunda oldukça yoğun tübüler sürekli kas fiberleri ve belirgin nöromusküler bağlantı noktaları gözlemlenmiştir. EM-D grubunda ise mekanik ve elektriksel uyarımda gözlemlenen tüm miyojenik karaktere uyumlu morfolojik bulgular bulunmaktadır. Ek

olarak nöromusküler bağlantı noktaları artmış ve daha kalın bir doku oluşumu gerçekleşmiştir.

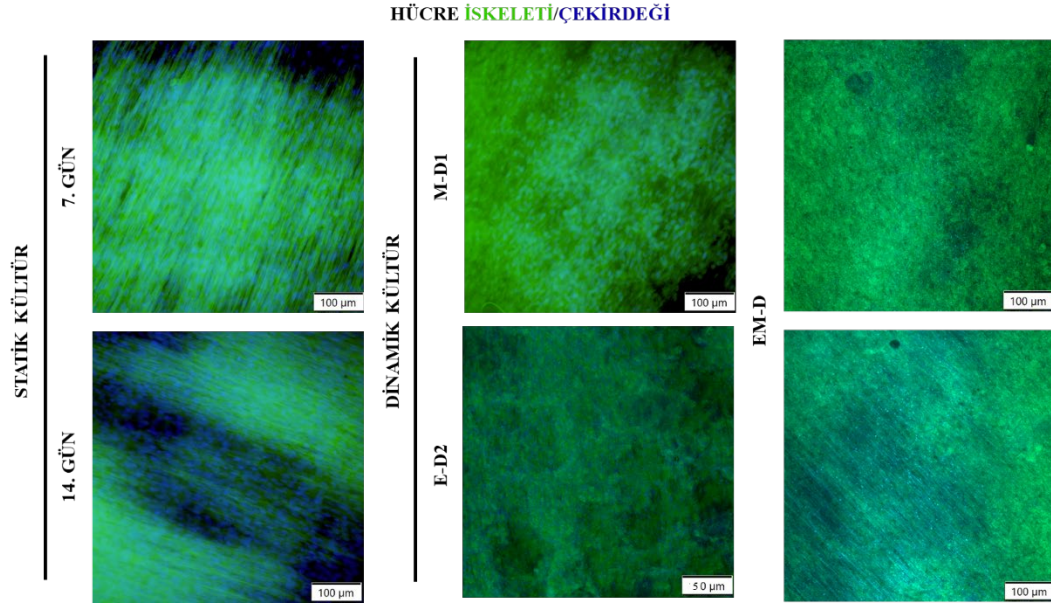
4.5.3.3. Hücre iskeleti/çekirdeği boyama

Hızalı P3HB/PBA nanofiber matrisler üzerindeki C2C12 hücrelerinin statik kültürün 7. ve 14. günlerinde (S-7 ve S-14) ve elektromekanik uyarımlı dinamik kültürün (EM-D) 14. gününde yayılma ve miyojenik morfolojisi F-aktin/DAPI boyama ile belirlenmiştir, floresan ve konfokal mikroskop fotoğrafları **Şekil 4.53**'te verilmiştir. Ayrıca statik ve dinamik kültür gruplarının floresan hücre iskeleti/çekirdeği mikroskop fotoğrafları karşılaştırmalı olarak **Şekil 4.54**'te verilmiştir.



Şekil 4.53. Statik kültürün 7. ve 14. günlerinde ve elektrik uyarımlı dinamik kültürün 14. gününde (EM-D) hizalı P3HB/PBA nanofiber matrisler üzerindeki C2C12 hücrelerinin F-aktin/DAPI floresan (statik kültür) ve konfokal (dinamik kültür) mikroskop görüntüleri (büyütme: 10 X).

EM-D grubuna ait F-aktin/DAPI görüntüleri incelendiğinde SEM fotoğrafları ile benzer sonuçlar elde edilmiştir. Konfokal görüntülerinde doku kalınlığının 85-90 µm'ye çıktığı; kalın, tübüler, sürekli ve miyojenik morfolojide kas dokusunun oluştuğu belirlenmiştir.



Şekil 4.54. Statik kültürün 7. ve 14. günlerinde, mekanik uyarımlı dinamik kültürün 14. gününde (M-D1), elektrik uyarımlı dinamik kültürün 14. gününde (E-D2) ve elektromekanik uyarımlı dinamik kültürün 14. gününde (EM-D) hizalı P3HB/PBA nanofiber matriksler üzerindeki C2C12 hücrelerinin F-aktin/DAPI floresan (statik kültür) ve konfokal (dinamik kültür) mikroskop görüntüleri (Büyütmeler E-D2 hariç 10 X; E-D2: 20 X).

Tüm dinamik kültür gruplarında (M-D1, E-D2 ve EM-D) hücrelerin yayıldığı, farklılaştığı ve iskele boyunca göç ettikleri gözlemlenmiştir. Doku kalınlığı mekanik uyarımlı biyoreaktör grubunda 70 µm, elektrik uyarımlı biyoreaktör grubunda 70-80 µm, elektromekanik uyarımlı biyoreaktör grubunda 85-90 µm olarak z ekseninden alınan konfokal görüntüleri ile belirlenmiştir. Statik kültürlerde hücre yayılımı yalnızca yüzey ile sınırlı kalmıştır.

4.5.3.4. Mekanik özelliklerin tayin edilmesi

Uyarım öncesi matrikslerin ve hüresiz mekanik ve elektriksel uyarım sonrası, statik kültür 7. ve 14. gün (S-7 ve S-14), mekanik uyarımlı dinamik kültür (M-D1), elektrik uyarımlı dinamik kültür (E-D2) ve elektromekanik uyarımlı dinamik kültür (EM-D) 14. gününde biyoreaktörden çıkarılan matrikslerin mekanik özellikleri çekme testi ile belirlenmiş ve bulgular **Çizelge 4.15**'te verilmiştir.

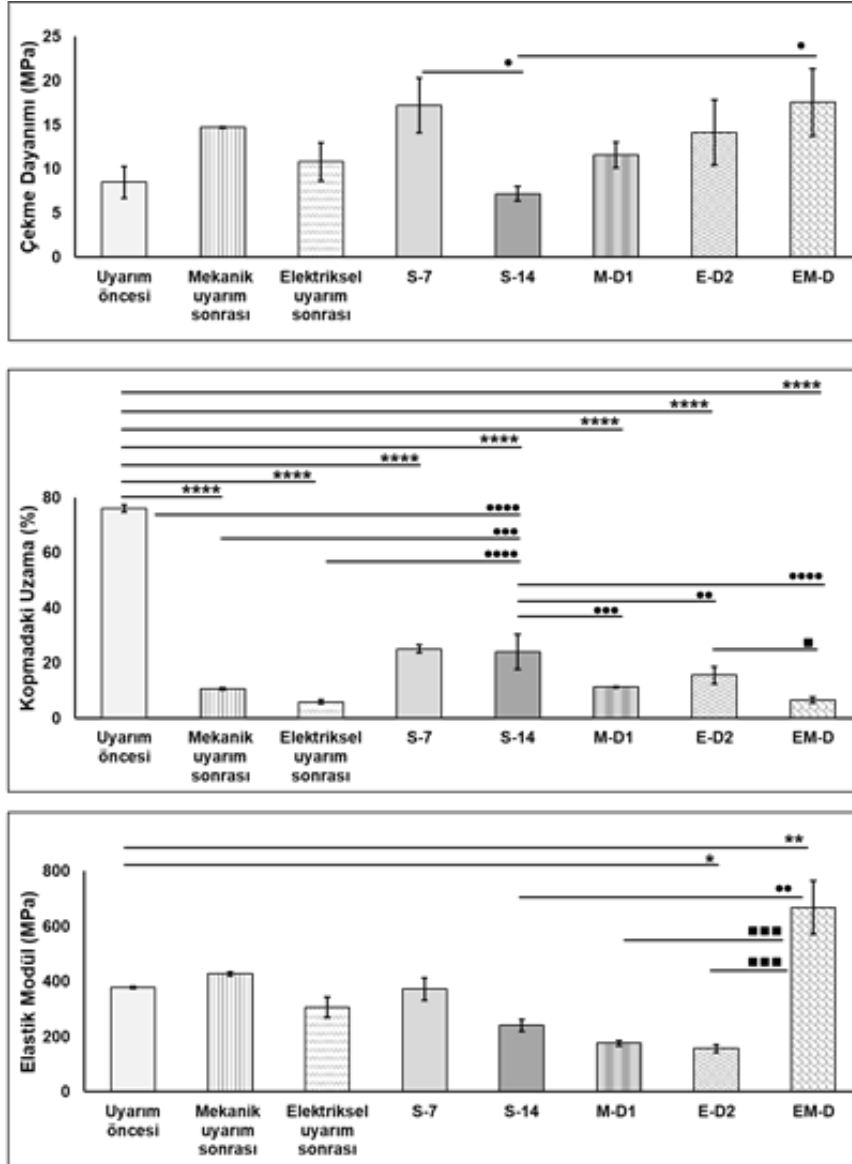
Çizelge 4.15. Mekanik, elektrik ve elektromekanik uyarımlı biyoreaktör ileri hücre kültürü çalışmalarında mekanik özelliklerdeki değişimler.

Uyarım öncesi mekanik özellikler						
	Çekme dayanımı (MPa)		Kopmadaki uzama (%)		Elastik modül (MPa)	
	8,5 ± 1,8		76,0 ± 1,3		378,2 ± 4,2	
Statik kültürde mekanik özelliklerdeki değişim						
	Çekme dayanımı (MPa)	Değişim (%)	Kopmadaki uzama (%)	Değişim (%)	Elastik modül (MPa)	Değişim (%)
S-7	17,2 ± 3,1	102 ↑	25,1 ± 1,4	67 ↓	372,2 ± 41,0	1,6 ↓
S-14	7,2 ± 0,8	13 ↓	24,1 ± 6,3	68 ↓	240,4 ± 21,5	36 ↓
Mekanik uyarımlı biyoreaktörde mekanik özelliklerdeki değişim						
	Çekme dayanımı (MPa)	Değişim (%)	Kopmadaki uzama (%)	Değişim (%)	Elastik modül (MPa)	Değişim (%)
M-D1*	11,6 ± 1,4	36 ↑	11,3 ± 0,3	85 ↓	175,8 ± 9,9	53 ↓
Elektrik uyarımlı biyoreaktörde mekanik özelliklerdeki değişim						
	Çekme dayanımı (MPa)	Değişim (%)	Kopmadaki uzama (%)	Değişim (%)	Elastik modül (MPa)	Değişim (%)
E-D2*	14,1 ± 3,7	65 ↑	15,6 ± 3,1	80 ↓	156,8 ± 14,4	59 ↓
Elektromekanik uyarımlı biyoreaktörde mekanik özelliklerdeki değişim						
	Çekme dayanımı (MPa)	Değişim (%)	Kopmadaki uzama (%)	Değişim (%)	Elastik modül (MPa)	Değişim (%)
EM-D*	17,5 ± 3,8	105 ↑	6,5 ± 1,1	92 ↓	667,9 ± 97,6	78 ↑

M-D1: %5 gerinim, 0,5 Hz frekans ve 20dk/2sa çekme/dinlenme süresi; E-D2: 2 ms atım süresi, 20dk atım/2sa dinlenme ve 0,4 V; EM-D: 20 dk/2 sa uygulama süresi, %5 gerinim, 0,5 Hz, 2 ms atım süresi, 0,4 V.

M-D1 grubunda çekme dayanımı %36 artış göstererek 11,6 ± 1,4 MPa değerine çıkarken, E-D2 grubunda çekme dayanımı %65 artış göstererek 14,1 ± 3,7 MPa değerine yükselmiş, EM-D grubunda ise çekme dayanımı %105 artış ile 17,5 ± 3,8 MPa değerine çıkmıştır.

Oluşan dokunun iskelet kası fonksiyonu gösterebilmesine bağlı olarak çekme dayanımlarında artış gözlemlenmiştir. Buradan yola çıkarak elektromekanik uyarım verilen grupta iskelet kası fonksiyonu gösterebilen bir doku oluştuğu sonucuna varılabilmektedir. Statik ve dinamik grupların çekme dayanımı, kopmadaki uzama ve elastik modül değerlerine ait istatistiksel farklılıklar Şekil 4.55'te verilmiştir.



Şekil 4.55. Uyarım öncesi, 7 günlük hücresiz mekanik ve elektriksel uyarım sonrası, statik 7. gün (S-7), statik 14. gün (S-14) ve dinamik 14. gün örneklerine (M-D1, E-D2 ve EM-D) ait karşılaştırmalı çekme dayanımı, kopmadaki uzama ve elastik modül değerleri (İstatistiksel olarak önemli farklar $n = 3$, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,0001$ uyarım öncesi matriksler kontrol grubu olduğunda, $\bullet p < 0,05$, $\bullet\bullet p < 0,01$, $\bullet\bullet\bullet p < 0,001$, $\bullet\bullet\bullet\bullet p < 0,0001$ statik 14. gün matriksler kontrol grubu olduğunda, $\blacksquare p < 0,05$, $\blacksquare\blacksquare\blacksquare p < 0,001$ dinamik kültür grupları karşılaştırıldığında).

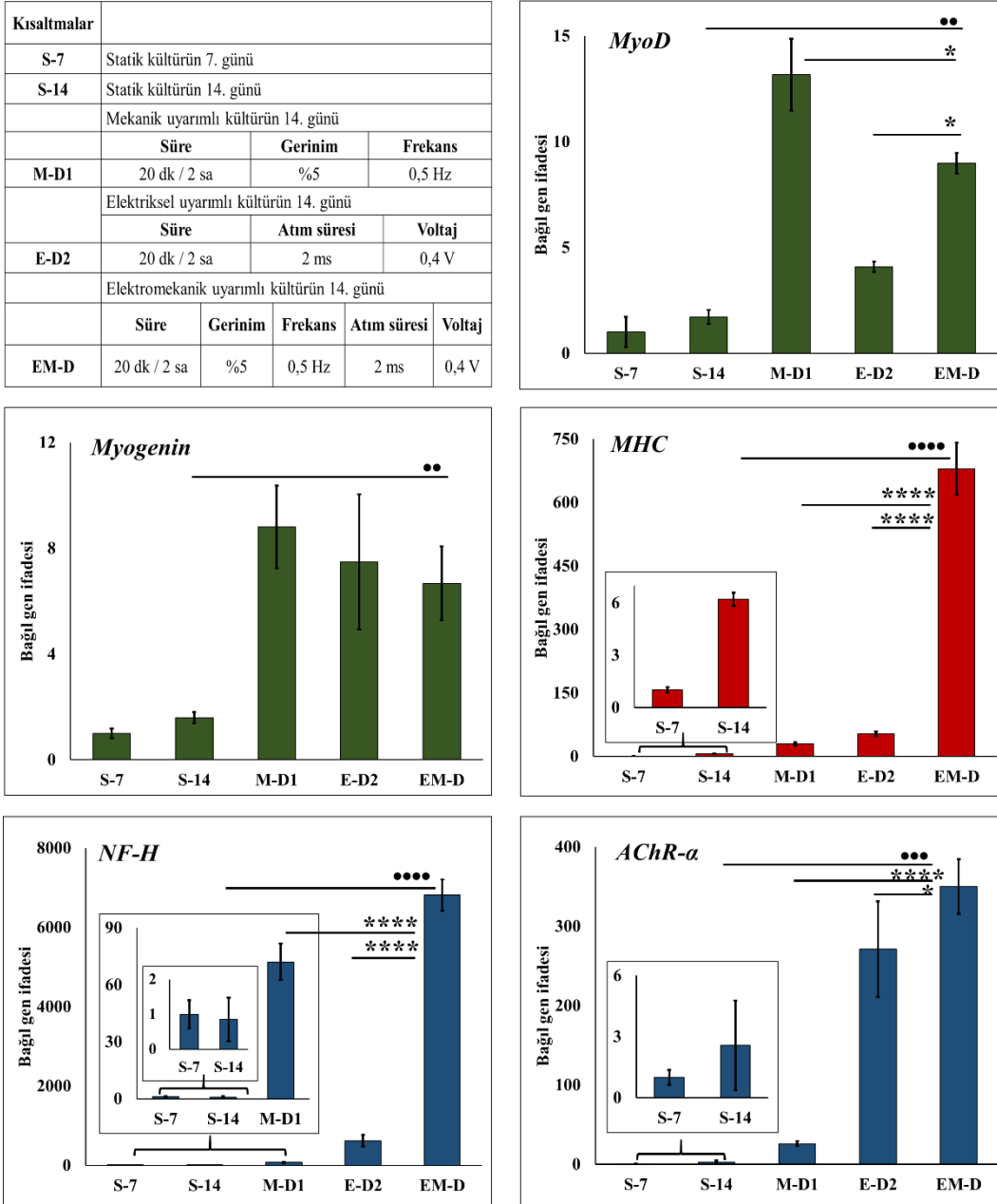
Statik kültürün 14. günü ile karşılaştırma yapıldığında, EM-D grubunun çekme dayanımında anlamlı artış tespit edilmiştir ($*p<0,05$). Mekanik uyarım öncesi kopmadaki uzama miktarları ile karşılaştırma yapıldığında EM-D grubunun kopmadaki uzama miktarında azalma belirlenmiştir ($****p<0,0001$). M-D1 ($***p<0,001$), E-D2 ($**p<0,01$) ve EM-D ($***p<0,0001$) gruplarının tümünde kopmadaki uzama miktarlarında, statik 14. gün grubuna göre, azalma belirlenmiştir. Gerinim-gerilim eğrisi göz önünde bulundurulduğunda biyoreaktördeki sürekli çekme hareketine bağlı olarak (veya elektriksel uyarıma bağlı olarak) elastik bölgede ilk aşamada gerinim sertleşmesi ile çekme dayanımında artış olmuştur. Ancak ardından matriksteki polimerik zincilerin kopmasına bağlı olarak boyun oluşumu ve dolayısıyla kopmadaki uzama değerlerinde azalma gerçekleşmiştir. Dinamik kültür grupları birbirleri ile karşılaştırıldığında, E-D2 ve EM-D gruplarının M-D1 grubu ile anlamlı bir farklılık göstermediği tespit edilmiştir ($p>0,05$). Ancak EM-D grubunun kopmadaki uzama miktarında E-D2 grubuna göre azalma gözlemlenmiştir ($*p<0,05$). Mekanik uyarım öncesi elastik modül değerleri ile karşılaştırma yapıldığında E-D2 grubunda anlamlı düşüş ($*p<0,05$), EM-D grubunda anlamlı artış ($**p<0,01$) tespit edilmiştir. Statik kültürün 14. günü kontrol olarak seçildiğinde yalnızca EM-D grubunda artış ($**p<0,01$) belirlenmiştir. Dinamik kültür grupları birbirleri ile karşılaştırıldığında EM-D grubunda, M-D1 ve E-D2 grubuna göre oldukça yüksek bir artış görülmüştür ($***p<0,001$). Elastik modül değerindeki artış ise çekme dayanımındaki artışa bağlı olarak gerçekleşmiş olabilir. Ek olarak biyoreaktörde çekme hareketi (veya eksen boyunca verilen elektriksel uyarım) ile polimerik zincirlerde düzenli yapının artması ve hücrelerin dizilimine bağlı olarak elastik modülde artış olduğu düşünülmektedir.

EM-D biyoreaktör grubunun SEM fotoğrafları ve F-aktin/DAPI boyamalarında tartışıldığı üzere, yüksek oranda hizalanmış, kalın miyofibrillerin oluştuğu, maturasyonun yüksek oranda olduğu tespit edilmiştir. Buradan yola çıkılarak oluşan doku, malzemeye %105 oranında katkı vererek çekme dayanımını anlamlı olarak arttırmıştır.

4.5.3.5. Miyojenik gen ifadelerinin belirlenmesi

Hızalı P3HB/PBA nanofiber matriksler üzerindeki C2C12 hücrelerinin statik ve dinamik kültürlerde miyojenik gen ifadelerinin belirlendiği RT-qPCR analizi sonuçları **Şekil 4.56**'da verilmiştir. Miyojenik farklılaşmanın belirlenmesi amacıyla MyoD, Myogenin ve

MHC gen ifadeleri; miyojenik maturasyonun belirlenmesi amacıyla NF-H ve AChR- α gen ifadeleri tespit edilmiştir.



Şekil 4.56. Statik kültürün 7. ve 14. günlerinde (S-7 ve S-14) ve dinamik 14. gün örneklerinde (M-D1, E-D2 ve EM-D) C2C12 hücrelerine ait bağıl MyoD, Myogenin, MHC, NF-H ve AChR- α gen ifadeleri (İstatistiksel anlamlı farklılıklar $n = 4$, $*p < 0,05$, $****p < 0,0001$ dinamik kültür grupları karşılaştırıldığında, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$ statik kültürün 14. günü kontrol grubu olup EM-D grubu ile karşılaştırıldığında).

Statik kültürde elde edilen sonuçlar Kısım I, mekanik ve elektriksel uyarımlı biyoreaktör çalışmaları ile uyumludur. Elektromekanik uyarımlı biyoreaktör çalışmasında ise MyoD bağıl gen ifadesinde yaklaşık 5 kat artış ($**p<0,01$) tespit edilmiştir. Dinamik kültür grupları karşılaştırıldığında M-D1 grubundaki MyoD bağıl gen ifadesinin EM-D grubundaki MyoD bağıl gen ifadesinden yaklaşık 1,5 kat daha fazla olduğu ($*p<0,05$), EM-D grubundaki MyoD bağıl gen ifadesinin ise E-D2 grubundaki MyoD bağıl gen ifadesinden yaklaşık 2 kat fazla olduğu ($*p<0,05$) belirlenmiştir. Myogenin bağıl gen ifadesinde EM-D grubunda yaklaşık 4 kat artış ($**p<0,01$) tespit edilmiştir. Dinamik kültür grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı farklılık belirlenmemiştir ($p>0,05$). EM-D grubunda MHC bağıl gen ifadesinde yaklaşık 110 kat artış görülmüştür ($***p<0,0001$). Dinamik kültür grupları karşılaştırıldığında, EM-D grubunda MHC gen ifadesinin M-D1 grubuna göre 23 kat ($****p<0,0001$), E-D2 grubuna göre 13 kat ($****p<0,0001$) arttığı tespit edilmiştir. Benzer şekilde, Liao ve ark., hizalı PU fiberler üzerinde C2C12 miyoblastları ile mekanik, elektrik ve elektromekanik uyarımlı biyoreaktör çalışmaları gerçekleştirmiştir [115]. Elektromekanik uyarımlı çalışmada, %5 dögüsel gerinim, 4 V/mm voltaj, 1 Hz frekans ve 1 sa uygulama/5 sa dinlenme uygulama sıklığında 7 gün boyunca uygulama yapılmıştır. Western blot analizlerinde, en yüksek Myogenin ve MHC ifadesinin elektromekanik uyarımlı biyoreaktör çalışmasında olduğu tespit edilmiştir.

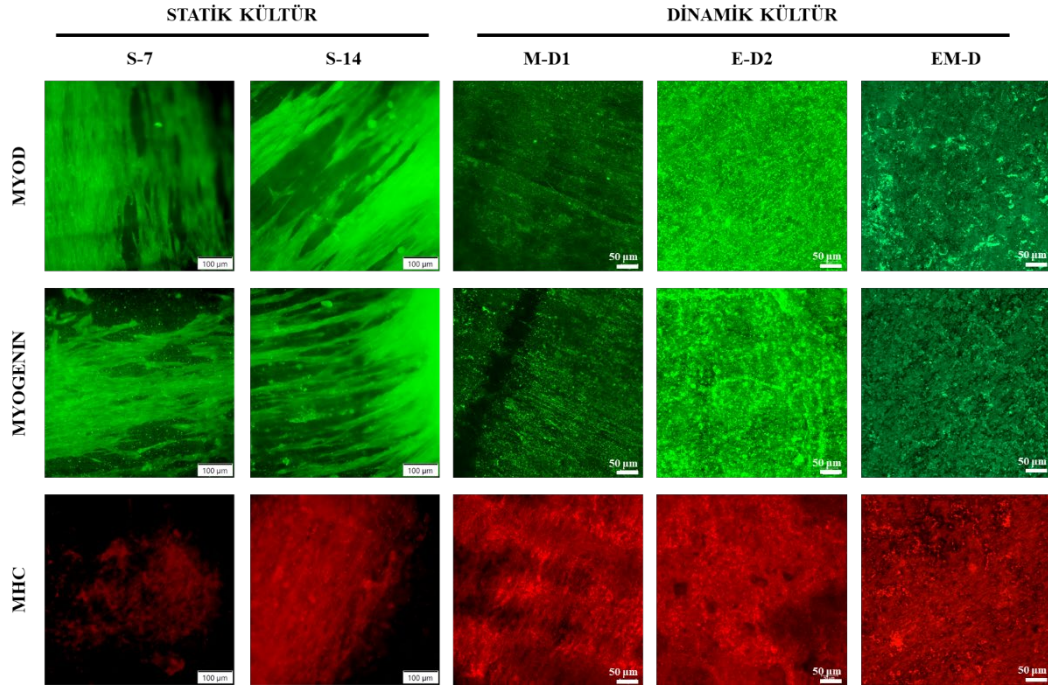
Celikkın ve ark. biyobaskılanmış çekirdek/kabuk yapısındaki aljinat iskeleler ile C2C12 miyoblastları etkileştirmiş ve özel yapım bir biyoreaktör aracılığı ile mekanik, elektrik ve elektromekanik uyarım çalışmaları yürütmüştür [116]. Mekanik uyarım çalışmalarında, kültürün 3. gününde %5, 7. gününde %10 ve 10. gününde %20 oranlarında gerinim, 8 sa dögüsel gerinim/16 sa dinlenme uygulama sıklığında uygulanmıştır. Elektriksel uyarım çalışmalarında 1 sa uyarım/7 sa dinlenme uygulama sıklığında, 70 mA ve 2 ms parametrelerinde uygulama yapılmıştır. Elektromekanik uyarım çalışmalarında ise mekanik ve elektrik uyarımlı biyoreaktör parametreleri birleştirilmiştir. Çalışmada farklı uyarımların miyozin ağır zincir 1 (MyH1), miyozin ağır zincir 2 (MyH2) ve miyozin ağır zincir 7 (MyH7) gibi çeşitli MHC izoform ifadelerinin modölasyonu üzerine etkileri araştırılmıştır. Mekanik uyarımda her üç izoformun, elektriksel uyarımda MyH1 izoformunun, elektromekanik uyarımda MyH2 izoformunun yüksek oranda ifade edildiği ve özellikle elektromekanik uyarımda örneklerdeki maturasyonun arttığı belirlenmiştir. Ancak uyarım parametrelerinin daha sistematik bir biçimde uygulanması gerektiği

belirtilmiştir. Bu bağlamda, bu tez çalışması ile literatürde ilk defa sistematik bir elektromekanik uyarımlı biyoreaktör çalışması gerçekleştirilmiştir.

MyoD, Myogenin ve MHC gen ifadeleri birlikte değerlendirildiğinde, elektromekanik uyarım, mekanik ve elektriksel uyarıma göre, miyojenik farklılaşmaya önemli ölçüde daha fazla katkı sağlamıştır. MHC ifadesindeki yüksek artış hücrelerin maturasyon yolağına büyük ölçüde girdiğini göstermektedir. Bunu destekler nitelikte, NF-H bağıl gen ifadesinde, EM-D grubunda 6800 kat artış görülmüştür (•••• $p<0,0001$). Dinamik kültür grupları karşılaştırıldığında, EM-D grubunda NF-H gen ifadesinin M-D1 grubuna göre 95 kat (**** $p<0,0001$), E-D2 grubuna göre 11 kat (**** $p<0,0001$) artış gösterdiği tespit edilmiştir. AChR- α bağıl gen ifadesinde EM-D grubunda yaklaşık 140 kat artış (••• $p<0,001$) belirlenmiştir. Dinamik kültür grupları karşılaştırıldığında, EM-D grubunda AChR- α gen ifadesinin M-D1 grubuna göre 13 kat (**** $p<0,0001$), E-D2 grubuna göre 1,5 kat (* $p<0,05$) artış gösterdiği tespit edilmiştir. EM-D grubunda AChR kümelenmelerinin özellikle M-D1 grubuna göre oldukça yüksek olduğu ve dolayısıyla fonksiyonel bağlantı noktalarının oluştuğu tespit edilmiştir. Böylece maturasyon için elektriksel uyarımın gerekliliği bir kez daha kanıtlanmıştır.

4.5.3.6. Miyojenik belirteçlerin belirlenmesi

Hızalı P3HB/PBA nanofiber matrisler üzerindeki C2C12 hücrelerinin statik ve dinamik kültürlerde MyoD, Myogenin ve MHC miyojenik belirteçleri immünohistokimyasal boyamalar ile belirlenmiş ve floresan/konfokal mikroskop görüntüleri Şekil 4.57'de verilmiştir.



Şekil 4.57. Statik kültürün 7. ve 14. günlerinde, mekanik, elektriksel ve elektromekanik uyarımlı dinamik kültürlerin 14. gününde (M-D1, E-D2 ve EM-D) C2C12 hücrelerine ait MyoD, Myogenin ve MHC immünohistokimyasal boyama konfokal mikroskobu görüntüleri. MyoD (yeşil) antijeni hücre çekirdeğinde, Myogenin (yeşil) antijeni hücre iskeletinde ve MHC (kırmızı) antijeni kalın filamentlerde lokalize olmuştur. (Büyütmeler, statik kültür: 10 X ve dinamik kültür: 20 X).

Elektromekanik uyarımlı biyoreaktör örneklerinde yüzeyde ve iskele derinliği boyunca yaklaşık 90 µm'lik bir derinliğe kadar hücrelerin tüm antikorlar için pozitif ışığa verdiği görülmüştür. İmmünohistokimyasal boyamalar RT-qPCR analizleri ile tutarlı sonuçlar vermiştir. MyoD ve Myogenin pozitif hücrelerin yoğunluk sıralaması; E-D2, EM-D ve M-D1 olarak belirlenmiştir. MHC pozitif hücreler ise EM-D grubunda en yüksek yoğunluğa ulaşmıştır. Tüm dinamik kültür gruplarında hücrelerin yayıldığı, farklılaştığı ve iskele boyunca göç ettikleri gözlemlenmiştir. Doku kalınlığı mekanik uyarımlı biyoreaktör grubunda 70 µm, elektrik uyarımlı biyoreaktör grubunda 70-80 µm,

elektromekanik uyarımlı biyoreaktör grubunda 85-90 μm olarak z ekseninden alınan konfokal görüntüleri ile belirlenmiştir.

Optimize edilmiş bir elektromekanik uyarımlı biyoreaktör sistemi hem mekanik hem de elektriksel uyarımın avantajlarını birleştirerek, iskelet kası dokusu mühendisliği için mekanik ve elektriksel uyarımın tek başlarına tam olarak sağlayamayacağı avantajlar sunmuştur. Elektromekanik uyarımın iskelet kası hücrelerinin vücutta deneyimlediği mekanik ve elektriksel uyarımlar arasındaki karmaşık etkileşimini taklit ettiği miyojenik maturasyon gen ifadeleri ve belirteçleri ile gösterilmiştir. Elektromekanik uyarım ile doğal kas işlevselliğine daha yakın bir doku oluşumu sağlanmıştır. Elektriksel ve mekanik uyarımların birleşmesi ile, NF-H ve AChR- α gen ifadeleri ile gösterildiği üzere, fonksiyonel kas kasılmalarını sağlayan nöromüsküler bağlantıların oluşumu artmıştır. Mekanik ve elektrik uyarımlı biyoreaktör sistemleri hücre kültürü çalışmaları öncesinde ve hücre kültüründe ön denemeler ile doku davranışı göz önünde bulundurularak optimize edilmiştir. Böylece dokudan gelen gerçek zamanlı geri bildirimlere uyarlanabilir bir tasarım elde edilmiştir. Elektromekanik uyarımın çok yönlü olması, elde edilen dokunun implantasyon sonrasında doku ile entegrasyonunun ve doku restorasyonunun başarılı olmasını sağlayacağı öngörülmektedir.

5. GENEL SONUÇLAR

Sunulan tez çalışmasında PBA katkılı P3HB fibröz doku iskelelerinin iskelet kası rejenerasyonundaki etkinliği incelenmiştir. İlk aşamada rastgele ve hizalı fiber morfolojisine sahip P3HB/PBA matriksler elektroegirme yöntemi ile üretilmiş ve karakterize edilmiştir. Ardından C2C12 hücre hattı ile 21 gün boyunca statik hücre kültürü çalışmaları yürütülmüştür. Hizalı P3HB/PBA nanofiber matrikslerin miyojenik uyumluluğu ve miyojenik farklılaşmadaki etkinliği kanıtlanmış, bu matriksler ile ikinci aşama olan dinamik hücre kültürü çalışmalarına geçilmiştir. Dinamik hücre kültürü çalışmaları mekanik, elektrik ve elektromekanik uyarımlı biyoreaktör ile gerçekleştirilmiştir. Kültür çalışmaları öncesinde, mekanik ve elektrik uyarımlı biyoreaktörde malzemenin morfolojik ve mekanik özelliklerindeki değişimleri belirleyebilmek amacıyla çeşitli parametrelerde ön denemeler yapılmıştır. Ön denemeler ile hücre kültüründe kullanılacak parametrelere karar verilmiş ve bu parametreler hücre kültüründe aşamalı olarak test edilmiştir. Mekanik ve elektriksel uyarım biyoreaktöründe yürütülen dinamik hücre kültürü çalışmaları ile miyojenik farklılaşmayı ve maturasyonu en iyi destekleyen parametrelere karar verilmiştir. Ardından bu parametreler birleştirilerek elektromekanik uyarımlı biyoreaktör çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Tüm aşamalarda elde edilen önemli bulgular aşağıda özetlenmiştir.

Rastgele ve hizalı P3HB/PBA nanofiber matrikslerin üretimi, karakterizasyonu ve statik hücre kültürü çalışmaları:

- Matrikslerin elastikiyetini artırmak amacıyla P3HB/PBA oranı 5:1 (w/w) şeklinde seçilmiştir. P3HB (%5, w/v) ve PBA (%20, w/w) polimerleri HFIP içerisinde çözdürülmüş ve 80°C'lik su banyosunda bir gün boyunca manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılmıştır. Fibröz matrikslerin üretimi için elektroegirme yöntemi kullanılmıştır. Rastgele fiberlerin üretimi düz toplayıcıda, hizalı fiberlerin üretimi döner silindri toplayıcıda gerçekleştirilmiştir. Elektroegirme işlemleri kontrollü egirme koşullarına izin veren Ne300 elektroegirme cihazında yürütülmüştür.
- Rastgele P3HB/PBA fiber matrikslerin üretimi için en uygun elektroegirme parametreleri olarak, 1 mL/sa akış hızı, 22,5 cm iğne ucu-toplayıcı uzaklığı ve 15 kV voltaj belirlenmiştir. Hizalı P3HB/PBA fiber matrikslerin üretimi için ise en uygun elektroegirme parametreleri olarak, 1 mL/sa akış hızı, 2000 rpm toplayıcı dönüş hızı, 25 cm toplayıcı-iğne ucu uzaklığı ve 20 kV voltaj belirlenmiştir.

- SEM analizi ile rastgele ve hizalı matrislerin fiber çapları sırasıyla 951 ± 153 nm ve 891 ± 247 nm olarak belirlenmiştir. Bu değerlerin doğal dokudaki miyofibril çaplarına çok yakın olduğu görülmüştür.
- Literatürde ilk defa P3HB içeren fiberlerin yüksek çözünürlüklü AFM görüntülemesi yapılmıştır. Rastgele fiberler 5 μ m/s tarama hızında ve 90° (yüzeğe dik) tarama açısında, hizalı fiberler 5 μ m/s tarama hızında ve 45° tarama açısında görüntülenmiştir. Rastgele fiberlerin çaplarının 700 nm ile 2 μ m arasında; hizalı fiber çaplarının 800 nm ile 1,5 μ m arasında değiştiği belirlenmiştir. Bu değerlerin SEM analizi ile elde edilen değerler ile uyduğu tespit edilmiştir.
- Yapılan FTIR, EDX ve elementel analizler ile PBA katkılamasının başarı ile gerçekleştiği belirlenmiştir. P3HB matrislerin erime sıcaklığı 176°C olarak, P3HB/PBA matrislerin erime sıcaklığı 173°C olarak tespit edilmiştir. P3HB matrislerin termal bozunma sıcaklığı 275°C olarak belirlenirken, P3HB/PBA matrislerin bozunma sıcaklığının 259°C ile 342°C arasında olduğu belirlenmiştir. Termal analizler ile PBA katkılamasının başarılı olduğu bir kez daha kanıtlanmıştır.
- XRD analizi ile rastgele ve hizalı P3HB matrislerin kristaliniteleri sırasıyla %42,1 ve %39,4 olarak belirlenmiştir. Rastgele ve hizalı P3HB/PBA matrisler için ise değerler sırasıyla %27,7 ve %26,1 olarak tespit edilmiştir. PBA katkılaması ile P3HB'nin kristalinitesinde düşüş olduğu kanıtlanmıştır. Ek olarak fiberleri rastgele veya hizalı eğirme işleminin de kristalinitede değişiklik yarattığı belirlenmiştir.
- Çekme analizleri ile rastgele ve hizalı P3HB fiber matrislerin çekme dayanımları sırasıyla $2,3 \pm 0,3$ MPa ve $9,1 \pm 0,4$ MPa, kopmadaki uzama değerleri sırasıyla $\%23,0 \pm 2,7$ ve $\%16,4 \pm 5,9$ ve elastik modülleri sırasıyla $91,7 \pm 10,6$ MPa ve $295,6 \pm 29,3$ MPa olarak belirlenmiştir. Rastgele ve hizalı P3HB/PBA nanofiber matrislerin ise çekme dayanımları sırasıyla $3,9 \pm 1,0$ MPa ve $8,5 \pm 1,8$ MPa, kopmadaki uzama değerleri sırasıyla $\%124,4 \pm 3,3$ ve $\%76,0 \pm 1,3$ ve elastik modülleri sırasıyla $86,2 \pm 10,6$ MPa ve $378,2 \pm 4,2$ MPa olarak tespit edilmiştir. PBA katkılaması ile P3HB'nin kopmadaki uzama ve elastik modül değerlerinde artış görülmüştür. Ayrıca rastgele ve hizalı fiber yönelimi mekanik özelliklerde büyük değişimler yaratmıştır. Hizalı fiberlerin çekme dayanımı ve elastik modüllerinde artış belirlenmiştir.
- Rastgele ve hizalı P3HB/PBA matrislerin hidrolitik/enzimatik bozunma testlerinde 7. haftadan itibaren hidrolitik bozunmaya uğradığı, enzimatik bozunmanın ise 5.

haftadan itibaren başladığı gözlemlenmiştir. Hizalı matrislerde kristalinitedeki düşüşe bağlı olarak bozunmanın daha fazla olduğu belirlenmiştir.

- Rastgele ve hizalı P3HB matrislerin d_{33} piezoelektrik sabiti 5 pC/N olarak ölçülmüştür. Rastgele ve hizalı P3HB/PBA matrislerin d_{33} piezoelektrik sabitleri sırasıyla 5 pC/N ve 5,3 pC/N olarak belirlenmiştir. PBA katkılması ve hizalı elektroğirme işlemi ile piezoelektrik gerinim sabitinde artış tespit edilmiştir.
- Rastgele ve hizalı P3HB/PBA nanofiber matrislerle gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmalarında C2C12 hücrelerinin her iki matrise de tutunduğu ve yayıldığı gözlemlenmiştir. Matrisler üzerindeki hücrelerin kültürün 21. gününe kadar canlılıklarını korudukları görülmüştür.
- Hizalı matrisler üzerindeki hücrelerin hizalandığı, uzadığı, yoğun mikrovilli barındırdığı ve uzun miyotübüler yapılar oluşturduğu tespit edilmiştir.
- Rastgele matrisler üzerindeki hücrelerin bölgesel olarak hizalandığı, ince ve kesikli miyotübüler yapılar oluşturduğu, az sayıda mikrovilli barındırdığı ve kültürün ilerleyen günlerinde yüzeyden tabakalar halinde kalkmaların başladığı belirlenmiştir.
- Kültürün 21. gününde MHC bağıl gen ifadesinin, hizalı matrislerde rastgele matrislere göre yaklaşık 7 kat daha yüksek olduğu belirlenmiştir.
- Gen belirteçleri analizleri ile, hizalı matrisler üzerindeki hücrelerin miyojenik farklılaşma aşamasını tamamladıkları ve maturasyon yolağına girdikleri doğrulanmıştır.

Hizalı P3HB/PBA nanofiber matrisler ile mekanik, elektrik ve elektromekanik uyarımlı biyoreaktörde dinamik hücre kültürü çalışmaları:

Mekanik uyarımlı biyoreaktör çalışmaları

- Mekanik uyarımlı biyoreaktör ön deneme çalışmaları, %15 sabit maksimum gerinimde, farklı frekans (0,5 Hz, 1 Hz ve 2 Hz) ve farklı döngüsel uygulama sıklıklarında (6 sa çekme/18 sa dinlenme, 1 sa çekme/5 sa dinlenme ve 20 dk çekme/2 sa dinlenme) gerçekleştirilmiştir.
- Yüzde 15 gerinimde 7 gün boyunca 2 Hz, 1 Hz ve 0,5 Hz frekanslarda 6 sa çekme/18 sa dinlenme döngüsel uygulama sıklığında mekanik uyarımlı matrislerin mekanik ve morfolojik olarak uygun olmadığı belirlenmiştir. Uzun süreli uygulama sıklığında hizalı fiber matris yapısı başarısız olmuştur.
- Yüzde 15 gerinimde 7 gün boyunca 2 Hz frekansta 1 sa çekme/5 sa dinlenme döngüsel uygulama sıklığında mekanik uyarımlı matrislerin mekanik ve morfolojik

olarak uygun olmadığı tespit edilmiştir. Diğer frekanslarda başarı sağlanmıştır. Daha kısa süreli uygulama sıklığında, özellikle düşük frekanslarda hizalı fiber matrikslerin daha başarılı olabileceği görülmüştür.

- Yüzde 15 gerinimde 7 gün boyunca 2 Hz frekansta 20 dk çekme/2 sa dinlenme döngüsel uygulama sıklığında mekanik uyarım yapılan matrikslerin mekanik ve morfolojik olarak uygun olmadığı tespit edilmiştir. Diğer frekanslarda başarı sağlanmıştır. En başarılı uygulama grubunun 20 dk çekme/2 sa dinlenme uygulama sıklığı içeren gruplar olduğu sonucuna varılmıştır.
- Mekanik uyarımlı hücre kültürü çalışmaları ve Faz 1 analizleri 0,5 Hz ve 1 Hz frekans değerleri, 1 sa çekme/5 sa dinlenme ve 20 dk çekme/2 sa dinlenme döngüsel uygulama sıklığı değerleri ve %5 ve %10 gerinim değerleri ile yürütülmüştür.
- Faz 2 analizlere %5 gerinim, 0,5 Hz frekans ve 20 dk çekme/2 sa dinlenme döngüsel uygulama sıklığı (M-D1) ve %10 gerinim, 0,5 Hz frekans ve 20 dk çekme/2 sa dinlenme döngüsel uygulama sıklığı (M-D3) parametreleri ile devam edilmiştir.
- M-D1 grubunda kalın tübüler yapıların oluştuğu, hücre dışı matriks sentezinin oldukça arttığı ve belirgin sınırlı fiber yapıların oluştuğu tespit edilmiştir. M-D3 grubunda ise düzenli yapının büyük ölçüde korunduğu, tübüler yapıların kalınlaşarak fiber yapısına farklılaştıkları tespit edilmiştir. Ancak belirgin miyotüp oluşumu yalnızca M-D1 grubunda gerçekleşmiştir. Bu miyotübüler yapıların uzunluğu 100-120 µm olarak, kalınlığı ise yaklaşık 25-30 µm olarak belirlenmiştir.
- Çekme dayanımı, M-D1 grubunda %36 artış göstererek $11,6 \pm 1,4$ MPa değerine çıkarken, M-D3 grubunda %10 azalma ile $7,7 \pm 0,1$ MPa değerine düşmüştür.
- Gen ifadesi analizlerinde statik kültür ile karşılaştırma yapılmıştır. MyoD bağıl gen ifadesinde, M-D1 ve M-D3 gruplarında sırasıyla yaklaşık 7 ve 14 kat artış tespit edilmiştir. Myogenin ve MHC bağıl gen ifadelerinde, M-D1 ve M-D3 gruplarında yaklaşık 5 kat artış belirlenmiştir. NF-H bağıl gen ifadesinde, M-D1 ve M-D3 gruplarında sırasıyla yaklaşık 85 ve 18 kat artış tespit edilmiştir. AChR- α bağıl gen ifadesinde M-D1 ve M-D3 gruplarında sırasıyla yaklaşık 10 ve 3 kat artış tespit edilmiştir.
- M-D1 grubundaki hücrelerin büyük ölçüde maturasyon yolağında olduğu, nöromusküler bağlantı noktalarının oluştuğu ve AChR kümelenmelerinin oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir.

- Bu sistem için en uygun parametrelerin %5 gerinim, 0,5 Hz frekans ve 20 dk çekme/2 sa dinlenme döngüsel uygulama sıklığı (M-D1) olduğuna karar verilmiştir.

Elektrik uyarımlı biyoreaktör çalışmaları

- Elektrik uyarımlı biyoreaktör ön deneme çalışmaları, 6 ms sabit atım periyodu ve 20 dk atım/2 sa dinlenme sabit döngüsel uygulama sıklığında, farklı voltajlarda (0,4 V ve 1,2 V) gerçekleştirilmiştir.
- Altı ms atım periyodunda, 7 gün boyunca, 20 dk atım/2 sa dinlenme döngüsel uygulama sıklığında elektriksel uyarıma maruz bırakılan matrikslerin 0,4 V voltaj değerinde mekanik ve morfolojik olarak başarılı olduğu belirlenmiştir. Uygun voltajda uygulanan potansiyel farkın, piezoelektrik tersinir süreçleri aktive ederek, malzemenin çekme dayanımında olumlu yönde bir değişiklik yapabildiği bu çalışma ile gösterilmiştir.
- Altı ms atım periyodunda, 7 gün boyunca, 20 dk atım/2 sa dinlenme döngüsel uygulama sıklığında elektriksel uyarıma maruz bırakılan matrikslerin mekanik ve morfolojik olarak başarısız olduğu tespit edilmiştir. En başarılı uygulama grubunun düşük voltajda uygulama yapılan grup olduğu sonucuna varılmıştır.
- Elektrik uyarımlı hücre kültürü çalışmaları ve Faz 1 analizleri 0,4 V voltaj, 20 dk atım/2 sa dinlenme döngüsel uygulama sıklığı, 2 ve 6 ms atım periyodu değerleri ile yürütülmüştür.
- Faz 2 analizlere 6 ms atım periyodu, 0,4 V ve 20 dk atım/2 sa dinlenme döngüsel uygulama sıklığı (E-D1) ve 2 ms atım periyodu, 0,4 V ve 20 dk atım/2 sa dinlenme döngüsel uygulama sıklığı (E-D2) parametreleri ile devam edilmiştir.
- Her iki elektriksel uyarım grubunda da düzenli ve tübüler yapıların korunduğu belirlenmiştir. Mikrovilli oluşumu her iki dinamik kültür grubunda da gözlemlense de E-D2 grubunda oldukça yoğun mikrovilli yapısı tespit edilmiştir. E-D2 grubunda oluşan fiber yapıların kalın ve sürekli olduğu ve bölgesel nöromusküler bağlantı noktası benzeri yapıların oluştuğu gözlemlenmiştir. E-D1 grubunda oluşan miyofibrillerin uzunluğu 200-250 μm , kalınlığı ise yaklaşık 40-45 μm olarak, E-D2 grubunda oluşan miyofibrillerin uzunluğu 300-350 μm olarak, kalınlığı ise yaklaşık 25-30 μm olarak belirlenmiştir.
- Çekme dayanımı, E-D1 grubunda %59 artış göstererek $13,5 \pm 2,1$ MPa değerine çıkarken, E-D2 grubunda %65 artış göstererek $14,1 \pm 3,7$ MPa değerine çıkmıştır.

- Gen ifadesi analizlerinde statik kültür ile karşılaştırma yapılmıştır. MyoD bağıl gen ifadesinde E-D1 ve E-D2 gruplarında sırasıyla yaklaşık 14 ve 2,5 kat artış tespit edilirken; Myogenin bağıl gen ifadesinde sırasıyla yaklaşık 2,5 ve 5 kat artış tespit edilmiştir. MHC bağıl gen ifadesinde ise E-D1 ve E-D2 gruplarında sırasıyla yaklaşık 12 ve 8,5 kat artış belirlenmiştir. NF-H bağıl gen ifadesinde E-D1 grubunda yaklaşık 165 kat artış, E-D2 grubunda yaklaşık 720 kat artış tespit edilmiştir. AChR- α bağıl gen ifadesinde ise E-D1 grubunda yaklaşık 65 kat artış, E-D2 grubunda yaklaşık 105 kat artış belirlenmiştir. Bu bağlamda E-D2 grubundaki hücrelerin büyük ölçüde olgunlaştığı ve fonksiyonel nöromusküler bağlantı noktalarının oluştuğu belirlenmiştir.
- Bu sistem için en uygun parametrelerin 2 ms atım periyodu, 0,4 V voltaj ve 20 dk atım/2 sa dinlenme döngüsel uygulama sıklığı (E-D2) olduğuna karar verilmiştir.

Elektromekanik uyarımlı biyoreaktör çalışmaları

- Elektromekanik uyarımlı biyoreaktör çalışmaları mekanik ve elektriksel uyarımlı biyoreaktör çalışmalarından elde edilen en iyi parametreler birleştirilerek simultane gerçekleştirilmiştir. Elektromekanik uyarım %5 gerinim, 0,5 Hz frekans, 2 ms atım periyodu, 0,4 V voltaj ve 20 dk uygulama/2 sa dinlenme döngüsel uygulama sıklığı parametrelerinde (EM-D) uygulanmıştır.
- Elektromekanik uyarımlı matriksler üzerindeki hücrelerin matriks yüzeyi ve derinlik boyunca yayıldığı, oldukça kalın bir doku oluşturduğu ve yoğun mikrovilli yapısı ile kaplandığı belirlenmiştir. Ayrıca nöromusküler bağlantı noktalarının yüzeyde birçok noktada oluştuğu, kalın ve sürekli tübüler yapıların tüm matriks boyunca yayıldığı gözlemlenmiştir. Oluşan miyofibrillerin ise uzunluğu 500-550 μm , kalınlığı yaklaşık 30-35 μm olarak belirlenmiştir.
- EM-D grubunda çekme dayanımı %105 artış ile $17,5 \pm 3,8$ MPa değerine yükselmiştir.
- Gen ifadesi analizlerinde statik kültür ile karşılaştırma yapıldığında, MyoD ifadesinde yaklaşık 5 kat, Myogenin ifadesinde yaklaşık 4 kat, MHC ifadesinde yaklaşık 110 kat, NF-H ifadesinde yaklaşık 6800 kat ve AChR- α ifadesinde yaklaşık 140 kat artış tespit edilmiştir. Dinamik kültür grupları ile EM-D grubu arasında, özellikle miyojenik maturasyon ifadeleri açısından karşılaştırma yapıldığında, MHC ifadesinin M-D1 grubuna göre 23 kat, E-D2 grubuna göre 13 kat arttığı; NF-H ifadesinin M-D1

grubuna göre 95 kat, E-D2 grubuna göre 11 kat artış gösterdiği; AChR- α gen ifadesinin M-D1 grubuna göre 13 kat, E-D2 grubuna göre 1,5 kat arttığı belirlenmiştir.

Tez kapsamında yapılan çalışmalarla hizalı P3HB/PBA nanofiber matrikslerin kimyasal yapısı, morfolojik özellikleri, mekanik özellikleri ve piezoelektrik özellikleri ile miyojenik farklılaşmayı desteklediği ve böylelikle bu matrikslerin iskelet kası doku mühendisliği çalışmalarında kullanımının uygun olduğu gösterilmiştir. Ancak miyojenik maturasyon için mekanik ve elektriksel uyarımların şart olduğu da ortaya konmuştur. Hibrit biyoreaktör çalışmaları için sistem parametrelerinin simultane olarak belirlenmesi gerektiği ve uygun mekanik ve elektriksel uyarımlar ile hücrel mekanotransdüksiyon yollarının uyarılarak miyojenik farklılaşma ve maturasyonun desteklenebileceği gösterilmiştir. Uygun elektriksel uyarımlar ve piezoelektrik özelliklere sahip hizalı P3HB/PBA nanofiber matriksler birlikte kullanılarak sinir ağları taklit edilmiş ve nöral transmise aktive edilmiştir. Optimize edilmiş bir elektromekanik uyarımlı biyoreaktör sisteminin hem mekanik hem de elektriksel uyarımın avantajlarını birleştirerek iskelet kası dokusu mühendisliği için mekanik ve elektriksel uyarımın tek başlarına tam olarak sağlayamayacağı avantajlar sunduğu kanıtlanmıştır.

Tez çalışmasının bulgularının ilerletilmesi için mekanik testler ile birlikte kristalografik ölçümler yapılarak malzemenin mekanik ve elektriksel uyarım altında kristal ve amorf örgüsündeki değişimlerin tespit edilmesi önerilmektedir. Ek olarak hem ön denemelerde hem de hücre kültürü aşamalarında her bir deneme sonrasında parametreler Yüzey Yanıt Yöntemi (RSM) ile işlenerek daha doğru cevaplar alınabilir. Ancak cevapların karmaşıklığı nedeniyle verileri işlemek oldukça zorlu olabilir. Bir diğer değinilmesi gereken nokta ise hücre kaynağıdır. Mevcut matrikslerin C2C12 gibi bir model hücre hattı ile kültürasyonu yerine satelit hücreler veya primer kas hücreleri ile statik ve dinamik kültürasyonu yapılmalıdır. Bu hücreler ile kültürasyon sonrasında matrikslerin miyojenik uyumluluğu bir kez daha kanıtlanırsa *in vivo* hayvan deneyleri gerçekleştirilmez. Böylece klinik çalışmalar öncesinde tamamen fonksiyonel bir iskelet kas dokusu elde edilebileceği öngörülmektedir.

6. KAYNAKLAR

1. T.H. Qazi, D.J. Mooney, M. Pumberger, S. Geissler, G.N. Duda, Biomaterials based strategies for skeletal muscle tissue engineering: existing technologies and future trends, *Biomaterials*, 53 (2015) 502-521.
2. J. Liu, D. Saul, K.O. Böker, J. Ernst, W. Lehman, A.F. Schilling, Current methods for skeletal muscle tissue repair and regeneration, *BioMed research international*, 2018 (2018).
3. L. Draghi, A. Cigada, Nanostructured surfaces for biomedical applications. Part I: nanotopography, *Journal of Applied Biomaterials and Biomechanics*, 5 (2007) 61-69.
4. C. Gotti, A. Sensini, G. Fornaia, C. Gualandi, A. Zucchelli, M.L. Focarete, Biomimetic hierarchically arranged nanofibrous structures resembling the architecture and the passive mechanical properties of skeletal muscles: a step forward toward artificial muscle, *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8 (2020) 767.
5. S. Rangarajan, L. Madden, N. Bursac, Use of flow, electrical, and mechanical stimulation to promote engineering of striated muscles, *Annals of biomedical engineering*, 42 (2014) 1391-1405.
6. R. Dong, P.X. Ma, B. Guo, Conductive biomaterials for muscle tissue engineering, *Biomaterials*, 229 (2020) 119584.
7. A. Huber, A. Pickett, K.M. Shakesheff, Reconstruction of spatially orientated myotubes in vitro using electrospun, parallel microfibre arrays, *Eur Cell Mater*, 14 (2007) 56-63.
8. C. Ribeiro, V. Sencadas, D.M. Correia, S. Lanceros-Méndez, Piezoelectric polymers as biomaterials for tissue engineering applications, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 136 (2015) 46-55.
9. A. Bach, J. Beier, J. Stern-Staeter, R. Horch, Skeletal muscle tissue engineering, *Journal of cellular and molecular medicine*, 8 (2004) 413-422.
10. L.E. Freed, G. Vunjak-Novakovic, Culture of organized cell communities, *Advanced drug delivery reviews*, 33 (1998) 15-30.
11. B. Maleiner, J. Tomasch, P. Heher, O. Spadiut, D. Rünzler, C. Fuchs, The importance of biophysical and biochemical stimuli in dynamic skeletal muscle models, *Frontiers in Physiology*, 9 (2018) 1130.

12. T. Okano, S. Satoh, T. Oka, T. Matsuda, Tissue Engineering of Skeletal Muscle: Highly Dense, Highly Oriented Hybrid Muscular Tissues Biomimicking to Native Tissues, *Asaio Journal*, 43 (1997) 17.
13. E. Çatıker, E. Konuk, T. Gültan, M. Gümüşderelioğlu, Enhancement of scaffolding properties for poly (3-hydroxybutyrate): blending with poly-β-alanine and wet electrospinning, *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 68 (2019) 338-349.
14. M.-R. Lee, S.S. Stahl, S.H. Gellman, K.S. Masters, Nylon-3 copolymers that generate cell-adhesive surfaces identified by library screening, *Journal of the American Chemical Society*, 131 (2009) 16779-16789.
15. J. Feher, 3.5-contractile mechanisms in skeletal muscle, *Quantitative Human Physiology*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, (2012) 249-258.
16. C.J. Chen, L. Thompson, L. Snow, *Muscle Structure and Function, Orthopaedic Physical Therapy Secrets-E-Book*, (2016) 1.
17. A.R. Gillies, R.L. Lieber, Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix, *Muscle & nerve*, 44 (2011) 318-331.
18. C. Mueller, M. Trujillo-Miranda, M. Maier, D.E. Heath, A.J. O'Connor, S. Salehi, Effects of external stimulators on engineered skeletal muscle tissue maturation, *Advanced Materials Interfaces*, 8 (2021) 2001167.
19. W.R. Frontera, J. Ochala, Skeletal muscle: a brief review of structure and function, *Calcified tissue international*, 96 (2015) 183-195.
20. N.A. Campbell, J.B. Reece, L. Mitchell, *Biology Benjamin/Cummings*, Menlo Park, CAMulligan E, (1999) 907-910.
21. P. Uzun, *Kas Dokusu Biyokimyası, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı*.
22. W. Pawlina, M.H. Ross, *Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology*, Lippincott Williams & Wilkins (2018).
23. J.M. Squire, Architecture and function in the muscle sarcomere, *Current opinion in structural biology*, 7 (1997) 247-257.
24. B. MacIntosh, P. Gardiner, A. McComas, *Muscle architecture and muscle fiber anatomy, Skeletal muscle: Form and function*. MacIntosh BR et al editors. 2nd ed. Champaign, Illinois, USA: Human Kinetics, (2006) 3-21.
25. G.A. Truskey, H.E. Achneck, N. Bursac, H.F. Chan, C.S. Cheng, C. Fernandez, S. Hong, Y. Jung, T. Koves, W.E. Kraus, Design considerations for an integrated

- microphysiological muscle tissue for drug and tissue toxicity testing, *Stem cell research & therapy*, 4 (2013) 1-5.
26. D. Can, Kas Dokusu, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi- Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı.
 27. P.M. Hopkins, Skeletal muscle physiology, *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain*, 6 (2006) 1-6.
 28. C.G. Ngan, A. Quigley, R.M. Kapsa, P.F. Choong, Engineering skeletal muscle— From two to three dimensions, *J Tissue Eng Regen Med*, 12 (2018) e1-e6.
 29. M. Periasamy, J.L. Herrera, F.C. Reis, Skeletal muscle thermogenesis and its role in whole body energy metabolism, *Diabetes & metabolism journal*, 41 (2017) 327.
 30. F. Relaix, P.S. Zammit, Satellite cells are essential for skeletal muscle regeneration: the cell on the edge returns centre stage, *Development*, 139 (2012) 2845-2856.
 31. B.T. Corona, X. Wu, C.L. Ward, J.S. McDaniel, C.R. Rathbone, T.J. Walters, The promotion of a functional fibrosis in skeletal muscle with volumetric muscle loss injury following the transplantation of muscle-ECM, *Biomaterials*, 34 (2013) 3324-3335.
 32. N.J. Turner, S.F. Badylak, Regeneration of skeletal muscle, *Cell and tissue research*, 347 (2012) 759-774.
 33. M. Kitzmann, A. Fernandez, Crosstalk between cell cycle regulators and the myogenic factor MyoD in skeletal myoblasts, *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 58 (2001) 571-579.
 34. A. Weiss, L.A. Leinwand, The mammalian myosin heavy chain gene family, *Annual review of cell and developmental biology*, 12 (1996) 417-439.
 35. J. Potau, R. Artells, C. Muñoz, T. Díaz, G. Bello-Hellegouarch, J. Arias-Martorell, A. Pérez-Pérez, M. Monzó, Expression of myosin heavy chain isoforms in the human supraspinatus muscle: variations related to age and sex, *Cells Tissues Organs*, 196 (2012) 456-462.
 36. R. Matsuda, M. Abe, Unfused C2C12 mouse skeletal muscle cells express neurofilament 140K protein, *Cell structure and function*, 22 (1997) 117-121.
 37. A.C. Rodrigues, M.L. Messi, Z.M. Wang, M.C. Abba, A. Pereyra, A. Birbrair, T. Zhang, M. O'Meara, P. Kwan, E.I. Lopez, The sympathetic nervous system regulates skeletal muscle motor innervation and acetylcholine receptor stability, *Acta physiologica*, 225 (2019) e13195.

38. M.C. Towler, S.J. Kaufman, F.M. Brodsky, Membrane traffic in skeletal muscle, *Traffic*, 5 (2004) 129-139.
39. I.K. Ko, B.-K. Lee, S.J. Lee, K.-E. Andersson, A. Atala, J.J. Yoo, The effect of in vitro formation of acetylcholine receptor (AChR) clusters in engineered muscle fibers on subsequent innervation of constructs in vivo, *Biomaterials*, 34 (2013) 3246-3255.
40. L. Wang, J. Shansky, H. Vandeburgh, Induced formation and maturation of acetylcholine receptor clusters in a defined 3D bio-artificial muscle, *Molecular neurobiology*, 48 (2013) 397-403.
41. Y. An, D. Li, Engineering skeletal muscle tissue in bioreactor systems, *Chinese Medical Journal*, 127 (2014) 4130-4139.
42. A. Khodabukus, K. Baar, Factors that affect tissue-engineered skeletal muscle function and physiology, *Cells Tissues Organs*, 202 (2016) 159-168.
43. M.A. Asnaghi, G. Candiani, S. Fare, G.B. Fiore, P. Petrini, M.T. Raimondi, M. Soncini, S. Mantero, Trends in biomedical engineering: focus on Regenerative Medicine, *Journal of Applied Biomaterials and Biomechanics*, 9 (2011) 73-86.
44. G.A. Dunn, J. Heath, A new hypothesis of contact guidance in tissue cells, *Experimental cell research*, 101 (1976) 1-14.
45. T. Okano, S. Satoh, T. Oka, T. Matsuda, Tissue engineering of skeletal muscle. Highly dense, highly oriented hybrid muscular tissues biomimicking native tissues, *ASAIO Journal (American Society for Artificial Internal Organs: 1992)*, 43 (1997) M749-753.
46. A.J. Engler, M.A. Griffin, S. Sen, C.G. Bonnemann, H.L. Sweeney, D.E. Discher, Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness: pathological implications for soft or stiff microenvironments, *The Journal of cell biology*, 166 (2004) 877-887.
47. S. Politi, F. Carotenuto, A. Rinaldi, P. Di Nardo, V. Manzari, M.C. Albertini, R. Araneo, S. Ramakrishna, L. Teodori, Smart ECM-based electrospun biomaterials for skeletal muscle regeneration, *Nanomaterials*, 10 (2020) 1781.
48. C. Borselli, C.A. Cezar, D. Shvartsman, H.H. Vandeburgh, D.J. Mooney, The role of multifunctional delivery scaffold in the ability of cultured myoblasts to promote muscle regeneration, *Biomaterials*, 32 (2011) 8905-8914.
49. E. Hill, T. Boontheekul, D.J. Mooney, Designing scaffolds to enhance transplanted myoblast survival and migration, *Tissue engineering*, 12 (2006) 1295-1304.

50. E. Hill, T. Boontheekul, D.J. Mooney, Regulating activation of transplanted cells controls tissue regeneration, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103 (2006) 2494-2499.
51. J. Ma, K. Holden, J. Zhu, H. Pan, Y. Li, The application of three-dimensional collagen-scaffolds seeded with myoblasts to repair skeletal muscle defects, *BioMed Research International*, 2011 (2011).
52. N.F. Huang, S. Patel, R.G. Thakar, J. Wu, B.S. Hsiao, B. Chu, R.J. Lee, S. Li, Myotube assembly on nanofibrous and micropatterned polymers, *Nano letters*, 6 (2006) 537-542.
53. J.M. Dugan, R.F. Collins, J.E. Gough, S.J. Eichhorn, Oriented surfaces of adsorbed cellulose nanowhiskers promote skeletal muscle myogenesis, *Acta Biomaterialia*, 9 (2013) 4707-4715.
54. J.P. Beier, D. Klumpp, M. Rudisile, R. Dersch, J.H. Wendorff, O. Bleiziffer, A. Arkudas, E. Polykandriotis, R.E. Horch, U. Kneser, Collagen matrices from sponge to nano: new perspectives for tissue engineering of skeletal muscle, *BMC biotechnology*, 9 (2009) 1-14.
55. J.S. Choi, S.J. Lee, G.J. Christ, A. Atala, J.J. Yoo, The influence of electrospun aligned poly (epsilon-caprolactone)/collagen nanofiber meshes on the formation of self-aligned skeletal muscle myotubes, *Biomaterials*, 29 (2008) 2899-2906.
56. K. Aviss, J. Gough, S. Downes, Aligned electrospun polymer fibres for skeletal muscle regeneration, *Eur Cell Mater*, 19 (2010) 193-204.
57. I. Jun, S. Jeong, H. Shin, The stimulation of myoblast differentiation by electrically conductive sub-micron fibers, *Biomaterials*, 30 (2009) 2038-2047.
58. M.C. Chen, Y.-C. Sun, Y.-H. Chen, Electrically conductive nanofibers with highly oriented structures and their potential application in skeletal muscle tissue engineering, *Acta biomaterialia*, 9 (2013) 5562-5572.
59. S.H. Ku, S.H. Lee, C.B. Park, Synergic effects of nanofiber alignment and electroactivity on myoblast differentiation, *Biomaterials*, 33 (2012) 6098-6104.
60. R.L. Page, C. Malcuit, L. Vilner, I. Vojtic, S. Shaw, E. Hedblom, J. Hu, G.D. Pins, M.W. Rolle, T. Dominko, Restoration of skeletal muscle defects with adult human cells delivered on fibrin microthreads, *Tissue Engineering Part A*, 17 (2011) 2629-2640.
61. N.F. Huang, R.J. Lee, S. Li, Engineering of aligned skeletal muscle by micropatterning, *American journal of translational research*, 2 (2010) 43.

62. V. Hosseini, S. Ahadian, S. Ostrovidov, G. Camci-Unal, S. Chen, H. Kaji, M. Ramalingam, A. Khademhosseini, Engineered contractile skeletal muscle tissue on a microgrooved methacrylated gelatin substrate, *Tissue Engineering Part A*, 18 (2012) 2453-2465.
63. C. Monge, K. Ren, K. Berton, R. Guillot, D. Peyrade, C. Picart, Engineering muscle tissues on microstructured polyelectrolyte multilayer films, *Tissue Engineering Part A*, 18 (2012) 1664-1676.
64. Y. Zhao, H. Zeng, J. Nam, S. Agarwal, Fabrication of skeletal muscle constructs by topographic activation of cell alignment, *Biotechnology and bioengineering*, 102 (2009) 624-631.
65. H.S. Yang, N. Ieronimakis, J.H. Tsui, H.N. Kim, K.-Y. Suh, M. Reyes, D.-H. Kim, Nanopatterned muscle cell patches for enhanced myogenesis and dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy, *Biomaterials*, 35 (2014) 1478-1486.
66. S. Jana, A. Cooper, M. Zhang, Chitosan scaffolds with unidirectional microtubular pores for large skeletal myotube generation, *Advanced healthcare materials*, 2 (2013) 557-561.
67. V. Kroehne, I. Heschel, F. Schügner, D. Lasrich, J. Bartsch, H. Jockusch, Use of a novel collagen matrix with oriented pore structure for muscle cell differentiation in cell culture and in grafts, *Journal of cellular and molecular medicine*, 12 (2008) 1640-1648.
68. K. Natsu, M. Ochi, Y. Mochizuki, H. Hachisuka, S. Yanada, Y. Yasunaga, Allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stromal cells promote the regeneration of injured skeletal muscle without differentiation into myofibers, *Tissue engineering*, 10 (2004) 1093-1112.
69. L. Wang, L. Cao, J. Shansky, Z. Wang, D. Mooney, H. Vandenburgh, Minimally invasive approach to the repair of injured skeletal muscle with a shape-memory scaffold, *Molecular Therapy*, 22 (2014) 1441-1449.
70. C.A. Rossi, M. Flaibani, B. Blaauw, M. Pozzobon, E. Figallo, C. Reggiani, L. Vitiello, N. Elvassore, P. De Coppi, In vivo tissue engineering of functional skeletal muscle by freshly isolated satellite cells embedded in a photopolymerizable hydrogel, *The FASEB Journal*, 25 (2011) 2296-2304.

71. J. Liu, H.H. Xu, H. Zhou, M.D. Weir, Q. Chen, C.A. Trotman, Human umbilical cord stem cell encapsulation in novel macroporous and injectable fibrin for muscle tissue engineering, *Acta biomaterialia*, 9 (2013) 4688-4697.
72. J.P. Beier, J. Stern-Straeter, V.T. Foerster, U. Kneser, G.B. Stark, A.D. Bach, Tissue engineering of injectable muscle: three-dimensional myoblast-fibrin injection in the syngeneic rat animal model, *Plastic and reconstructive surgery*, 118 (2006) 1113-1121.
73. J. Liu, H. Zhou, M.D. Weir, H.H. Xu, Q. Chen, C.A. Trotman, Fast-degradable microbeads encapsulating human umbilical cord stem cells in alginate for muscle tissue engineering, *Tissue Engineering Part A*, 18 (2012) 2303-2314.
74. M.H. Kim, H.N. Hong, J.P. Hong, C.J. Park, S.W. Kwon, S.H. Kim, G. Kang, M. Kim, The effect of VEGF on the myogenic differentiation of adipose tissue derived stem cells within thermosensitive hydrogel matrices, *Biomaterials*, 31 (2010) 1213-1218.
75. B. Perniconi, A. Costa, P. Aulino, L. Teodori, S. Adamo, D. Coletti, The pro-myogenic environment provided by whole organ scale acellular scaffolds from skeletal muscle, *Biomaterials*, 32 (2011) 7870-7882.
76. M.T. Wolf, K.A. Daly, J.E. Reing, S.F. Badylak, Biologic scaffold composed of skeletal muscle extracellular matrix, *Biomaterials*, 33 (2012) 2916-2925.
77. P.D. Coppi, S. Bellini, M.T. Conconi, M. Sabatti, E. Simonato, P.G. Gamba, G.G. Nussdorfer, P.P. Parnigotto, Myoblast–acellular skeletal muscle matrix constructs guarantee a long-term repair of experimental full-thickness abdominal wall defects, *Tissue engineering*, 12 (2006) 1929-1936.
78. G.H. Borschel, R.G. Dennis, W.M. Kuzon Jr, Contractile skeletal muscle tissue-engineered on an acellular scaffold, *Plastic and reconstructive surgery*, 113 (2004) 595-602.
79. M.T. Conconi, P. De Coppi, S. Bellini, G. Zara, M. Sabatti, M. Marzaro, G.F. Zanon, P.G. Gamba, P.P. Parnigotto, G.G. Nussdorfer, Homologous muscle acellular matrix seeded with autologous myoblasts as a tissue-engineering approach to abdominal wall-defect repair, *Biomaterials*, 26 (2005) 2567-2574.
80. M.A. Machingal, B.T. Corona, T.J. Walters, V. Kesireddy, C.N. Koval, A. Dannahower, W. Zhao, J.J. Yoo, G.J. Christ, A tissue-engineered muscle repair construct for functional restoration of an irrecoverable muscle injury in a murine model, *Tissue Engineering Part A*, 17 (2011) 2291-2303.

- 81.** B.T. Corona, C.L. Ward, H.B. Baker, T.J. Walters, G.J. Christ, Implantation of in vitro tissue engineered muscle repair constructs and bladder acellular matrices partially restore in vivo skeletal muscle function in a rat model of volumetric muscle loss injury, *Tissue Engineering Part A*, 20 (2014) 705-715.
- 82.** E.K. Merritt, M.V. Cannon, D.W. Hammers, L.N. Le, R. Gokhale, A. Sarathy, T.J. Song, M.T. Tierney, L.J. Suggs, T.J. Walters, Repair of traumatic skeletal muscle injury with bone-marrow-derived mesenchymal stem cells seeded on extracellular matrix, *Tissue Engineering Part A*, 16 (2010) 2871-2881.
- 83.** J.A. DeQuach, J.E. Lin, C. Cam, D. Hu, M.A. Salvatore, F. Sheikh, K.L. Christman, Injectable skeletal muscle matrix hydrogel promotes neovascularization and muscle cell infiltration in a hindlimb ischemia model, *European cells & materials*, 23 (2012) 400.
- 84.** V.J. Mase Jr, J.R. Hsu, S.E. Wolf, J.C. Wenke, D.G. Baer, J. Owens, S.F. Badylak, T.J. Walters, Clinical application of an acellular biologic scaffold for surgical repair of a large, traumatic quadriceps femoris muscle defect, *Orthopedics*, 33 (2010).
- 85.** B.M. Sicari, J.P. Rubin, C.L. Dearth, M.T. Wolf, F. Ambrosio, M. Boninger, N.J. Turner, D.J. Weber, T.W. Simpson, A. Wyse, An acellular biologic scaffold promotes skeletal muscle formation in mice and humans with volumetric muscle loss, *Science translational medicine*, 6 (2014) 234-258.
- 86.** P.M. Crapo, T.W. Gilbert, S.F. Badylak, An overview of tissue and whole organ decellularization processes, *Biomaterials*, 32 (2011) 3233-3243.
- 87.** E. Hill, T. Boonthekul, D.J. Mooney, Designing scaffolds to enhance transplanted myoblast survival and migration, *Tissue engineering*, 12 (2006) 1295-1304.
- 88.** D. Kuraitis, P. Zhang, Y. Zhang, D. Padavan, K. McEwan, T. Sofrenovic, D. McKee, J. Zhang, M. Griffith, X. Cao, A stromal cell-derived factor-1 releasing matrix enhances the progenitor cell response and blood vessel growth in ischaemic skeletal muscle, *Eur Cell Mater*, 22 (2011) e23.
- 89.** C. Borselli, H. Storrie, F. Benesch-Lee, D. Shvartsman, C. Cezar, J.W. Lichtman, H.H. Vandenburgh, D.J. Mooney, Functional muscle regeneration with combined delivery of angiogenesis and myogenesis factors, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107 (2010) 3287-3292.
- 90.** S. Ribeiro, A.C. Gomes, I. Etxebarria, S. Lanceros-Méndez, C. Ribeiro, Electroactive biomaterial surface engineering effects on muscle cells differentiation, *Materials Science and Engineering: C*, 92 (2018) 868-874.

91. S. Ribeiro, C. Puckert, C. Ribeiro, A.C. Gomes, M.J. Higgins, S. Lanceros-Mendez, Surface charge-mediated cell–surface interaction on piezoelectric materials, *ACS applied materials & interfaces*, 12 (2019) 191-199.
92. X. Tang, L. Daneshmandi, G. Awale, L.S. Nair, C.T. Laurencin, Skeletal muscle regenerative engineering, *Regenerative engineering and translational medicine*, 5 (2019) 233-251.
93. H.-C. Chen, Y.-C. Hu, Bioreactors for tissue engineering, *Biotechnology letters*, 28 (2006) 1415-1423.
94. H.H. Vandenburg, P. Karlisch, Longitudinal growth of skeletal myotubes in vitro in a new horizontal mechanical cell stimulator, *In vitro cellular & developmental biology*, 25 (1989) 607-616.
95. T. Okano, T. Matsuda, Tissue engineered skeletal muscle: preparation of highly dense, highly oriented hybrid muscular tissues, *Cell transplantation*, 7 (1998) 71-82.
96. C.A. Powell, B.L. Smiley, J. Mills, H.H. Vandenburg, Mechanical stimulation improves tissue-engineered human skeletal muscle, *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 283 (2002) C1557-C1565.
97. A. Auluck, V. Mudera, N.P. Hunt, M.P. Lewis, A three-dimensional in vitro model system to study the adaptation of craniofacial skeletal muscle following mechanostimulation, *European journal of oral sciences*, 113 (2005) 218-224.
98. U. Cheema, R. Brown, V. Mudera, S.Y. Yang, G. McGrouther, G. Goldspink, Mechanical signals and IGF-I gene splicing in vitro in relation to development of skeletal muscle, *Journal of cellular physiology*, 202 (2005) 67-75.
99. T. Matsumoto, J.-I. Sasaki, E. Alsberg, H. Egusa, H. Yatani, T. Sohmura, Three-dimensional cell and tissue patterning in a strained fibrin gel system, *PloS one*, 2 (2007) e1211.
100. D.G. Moon, G. Christ, J.D. Stitzel, A. Atala, J.J. Yoo, Cyclic mechanical preconditioning improves engineered muscle contraction, *Tissue Engineering Part A*, 14 (2008) 473-482.
101. I.C. Liao, J.B. Liu, N. Bursac, K.W. Leong, Effect of electromechanical stimulation on the maturation of myotubes on aligned electrospun fibers, *Cellular and molecular bioengineering*, 1 (2008) 133-145.
102. G. Candiani, S.A. Riboldi, N. Sadr, S. Lorenzoni, P. Neuenschwander, F.M. Montevecchi, S. Mantero, Cyclic mechanical stimulation favors myosin heavy chain

- accumulation in engineered skeletal muscle constructs, *Journal of Applied Biomaterials and Biomechanics*, 8 (2010) 68-75.
103. M.A. Machingal, B.T. Corona, T.J. Walters, V. Kesireddy, C.N. Koval, A. Dannahower, W. Zhao, J.J. Yoo, G.J. Christ, A tissue-engineered muscle repair construct for functional restoration of an irrecoverable muscle injury in a murine model, *Tissue Engineering Part A*, 17 (2011) 2291-2303.
 104. B.T. Corona, M.A. Machingal, T. Criswell, M. Vadhavkar, A.C. Dannahower, C. Bergman, W. Zhao, G.J. Christ, Further development of a tissue engineered muscle repair construct in vitro for enhanced functional recovery following implantation in vivo in a murine model of volumetric muscle loss injury, *Tissue Engineering Part A*, 18 (2012) 1213-1228.
 105. A. Smith, S. Passey, L. Greensmith, V. Mudera, M. Lewis, Characterization and optimization of a simple, repeatable system for the long term in vitro culture of aligned myotubes in 3D, *Journal of cellular biochemistry*, 113 (2012) 1044-1053.
 106. P. Heher, B. Maleiner, J. Prüller, A.H. Teuschl, J. Kollmitzer, X. Monforte, S. Wolbank, H. Redl, D. Rünzler, C. Fuchs, A novel bioreactor for the generation of highly aligned 3D skeletal muscle-like constructs through orientation of fibrin via application of static strain, *Acta biomaterialia*, 24 (2015) 251-265.
 107. E. Maghin, E. Carraro, D. Boso, A. Dedja, M. Giagante, P. Caccin, R.A.-M. Barna, S. Bresolin, A. Cani, G. Borile, Customized bioreactor enables the production of 3D diaphragmatic constructs influencing matrix remodeling and fibroblast overgrowth, *NPJ Regenerative Medicine*, 7 (2022) 25.
 108. S. Ahmed, A.V. Rogers, N.C. Nowlan, Mechanical loading due to muscle movement regulates establishment of the collagen network in the developing murine skeleton, *Royal Society Open Science*, 10 (2023) 231023.
 109. J. Stern-Straeter, A. Bach, L. Stangenberg, V. Foerster, R. Horch, G. Stark, J. Beier, Impact of electrical stimulation on three-dimensional myoblast cultures-a real-time RT-PCR study, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 9 (2005) 883-892.
 110. Y.C. Huang, R.G. Dennis, K. Baar, Cultured slow vs. fast skeletal muscle cells differ in physiology and responsiveness to stimulation, *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 291 (2006) C11-C17.
 111. H. Fujita, T. Nedachi, M. Kanzaki, Accelerated de novo sarcomere assembly by electric pulse stimulation in C2C12 myotubes, *Experimental cell research*, 313 (2007) 1853-1865.

112. K. Donnelly, A. Khodabukus, A. Philp, L. Deldicque, R.G. Dennis, K. Baar, A novel bioreactor for stimulating skeletal muscle in vitro, *Tissue Engineering Part C: Methods*, 16 (2010) 711-718.
113. M.L. Langelaan, K.J. Boonen, K.Y. Rosaria-Chak, D.W. van der Schaft, M.J. Post, F.P. Baaijens, Advanced maturation by electrical stimulation: Differences in response between C2C12 and primary muscle progenitor cells, *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 5 (2011) 529-539.
114. A. Khodabukus, K. Baar, Defined electrical stimulation emphasizing excitability for the development and testing of engineered skeletal muscle, *Tissue Engineering Part C: Methods*, 18 (2012) 349-357.
115. I.C. Liao, J.B. Liu, N. Bursac, K.W. Leong, Effect of electromechanical stimulation on the maturation of myotubes on aligned electrospun fibers, *Cellular and molecular bioengineering*, 1 (2008) 133-145.
116. N. Celikkin, D. Presutti, F. Maiullari, M. Volpi, Y. Promovych, K. Gizynski, J. Dolinska, A. Wiśniewska, M. Opałło, A. Paradiso, Combining rotary wet-spinning biofabrication and electro-mechanical stimulation for the in vitro production of functional myo-substitutes, *Biofabrication*, 15 (2023) 045012.
117. M. Zinn, B. Witholt, T. Egli, Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate, *Advanced drug delivery reviews*, 53 (2001) 5-21.
118. P. Pan, L. Zhao, B. Zhu, Y. He, Y. Inoue, Fractionated crystallization and self-nucleation behavior of poly (ethylene oxide) in its miscible blends with poly (3-hydroxybutyrate), *Journal of applied polymer science*, 117 (2010) 3013-3022.
119. K. Reis, J. Pereira, A. Smith, C. Carvalho, N. Wellner, I. Yakimets, Characterization of polyhydroxybutyrate-hydroxyvalerate (PHB-HV)/maize starch blend films, *Journal of Food Engineering*, 89 (2008) 361-369.
120. M. Artsis, A. Bonartsev, A. Iordanskii, G. Bonartseva, G. Zaikov, Biodegradation and medical application of microbial poly (3-hydroxybutyrate), *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 523 (2010) 21/[593]-549/[621].
121. T. Freier, C. Kunze, C. Nischan, S. Kramer, K. Sternberg, M. Saß, U.T. Hopt, K.-P. Schmitz, In vitro and in vivo degradation studies for development of a biodegradable patch based on poly (3-hydroxybutyrate), *Biomaterials*, 23 (2002) 2649-2657.
122. C. González-Obeso, W.L. Song, M.A. Rodríguez-Pérez, J.F. Mano, Superhydrophobic to superhydrophilic biomimetic Poly (3-hydroxybutyrate)

- surfaces made by phase inversion, *Materials Science Forum*, Trans Tech Publ, (2013), pp. 44-49.
123. G. Peschel, H.M. Dahse, A. Konrad, G.D. Wieland, P.J. Mueller, D.P. Martin, M. Roth, Growth of keratinocytes on porous films of poly (3-hydroxybutyrate) and poly (4-hydroxybutyrate) blended with hyaluronic acid and chitosan, *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 85 (2008) 1072-1081.
 124. G.Q. Chen, Y. Wang, Medical applications of biopolyesters polyhydroxyalkanoates, *Chinese Journal of Polymer Science*, 31 (2013) 719-736.
 125. D. Castellano, M. Blanes, B. Marco, I. Cerrada, A. Ruiz-Saurí, B. Pelacho, M. Arana, J.A. Montero, V. Cambra, F. Prosper, A comparison of electrospun polymers reveals poly (3-hydroxybutyrate) fiber as a superior scaffold for cardiac repair, *Stem cells and development*, 23 (2014) 1479-1490.
 126. G.Q. Chen, J. Zhang, Microbial polyhydroxyalkanoates as medical implant biomaterials, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46 (2018) 1-18.
 127. J. Zhang, E.I. Shishatskaya, T.G. Volova, L.F. da Silva, G.-Q. Chen, Polyhydroxyalkanoates (PHA) for therapeutic applications, *Materials Science and Engineering: C*, 86 (2018) 144-150.
 128. C. Sanhueza, F. Acevedo, S. Rocha, P. Villegas, M. Seeger, R. Navia, Polyhydroxyalkanoates as biomaterial for electrospun scaffolds, *International Journal of Biological Macromolecules*, 124 (2019) 102-110.
 129. D.A. Skoog, F.J. Holler, S.R. Crouch, Textbook “principles of instrumental analysis”, Cengage learning, (2019).
 130. E. Fukada, Piezoelectricity of natural biomaterials, *Ferroelectrics*, 60 (1984) 285-296.
 131. E. Fukada, Y. Ando, Piezoelectric properties of poly- β -hydroxybutyrate and copolymers of β -hydroxybutyrate and β -hydroxyvalerate, *International Journal of Biological Macromolecules*, 8 (1986) 361-366.
 132. Y. Poplavko, Y. Yakymenko, Functional dielectrics for electronics: Fundamentals of conversion properties, Woodhead Publishing (2020) 161-216.
 133. J. Knowles, F. Mahmud, G. Hastings, Piezoelectric characteristics of a polyhydroxybutyrate-based composite, *Clinical materials*, 8 (1991) 155-158.

134. P. Smith, A. Pasztor, M. McKelvy, D. Meunier, S. Froelicher, F.-Y. Wang, Analysis of synthetic polymers and rubbers, *Analytical Chemistry*, 69 (1997) 95-122.
135. A. Sugita, M. Mitsubayashi, S. Tasaka, Electric activity in rigid rod-like polymer, poly (β -hydroxybutyrate), *Polymer*, 47 (2006) 5141-5144.
136. J. Malmonge, L. Malmonge, G. Fuzari Jr, S. Malmonge, W. Sakamoto, Piezo and dielectric properties of PHB–PZT composite, *Polymer composites*, 30 (2009) 1333-1337.
137. M.-R. Lee, S.S. Stahl, S.H. Gellman, K.S. Masters, Nylon-3 copolymers that generate cell-adhesive surfaces identified by library screening, *Journal of the American Chemical Society*, 131 (2009) 16779-16789.
138. B.P. Mowery, A.H. Lindner, B. Weisblum, S.S. Stahl, S.H. Gellman, Structure–activity relationships among random nylon-3 copolymers that mimic antibacterial host-defense peptides, *Journal of the American Chemical Society*, 131 (2009) 9735-9745.
139. R. Liu, X. Chen, S.P. Falk, K.S. Masters, B. Weisblum, S.H. Gellman, Nylon-3 polymers active against drug-resistant *Candida albicans* biofilms, *Journal of the American Chemical Society*, 137 (2015) 2183-2186.
140. E. Çatiker, E. Sancaktar, Blends of poly (3-hydroxybutyrate) with poly (β -alanine) and its derivatives, *Journal of Applied Polymer Science*, 131 (2014).
141. A. Arslan, S. Çakmak, A. Cengiz, M. Gümüşderelioğlu, Poly (butylene adipate-co-terephthalate) scaffolds: processing, structural characteristics and cellular responses, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 27 (2016) 1841-1859.
142. R. Putnam, N. Sperelakis, *Cell Physiology Source Book*, (2012).
143. W.E. Teo, S. Ramakrishna, A review on electrospinning design and nanofibre assemblies, *Nanotechnology*, 17 (2006) R89.
144. M. Şimşek, S. Çakmak, M. Gümüşderelioğlu, Insoluble poly (ethylene oxide) nanofibrous coating materials: effects of crosslinking conditions on the matrix stability, *Journal of Polymer Research*, 23 (2016) 1-10.
145. A. Cristea, A. Baricz, N. Leopold, C. Floare, G. Borodi, I. Kacso, S. Tripon, P. Bulzu, A.Ş. Andrei, O. Cadar, Polyhydroxybutyrate production by an extremely halotolerant *Halomonas elongata* strain isolated from the hypersaline meromictic Fără Fund Lake (Transylvanian Basin, Romania), *Journal of applied microbiology*, 125 (2018) 1343-1357.

146. R.E. Martínez-Herrera, M.E. Alemán-Huerta, P. Flores-Rodríguez, V. Almaguer-Cantú, R. Valencia-Vázquez, W. Rosas-Flores, H. Medrano-Roldán, L.A. Ochoa-Martínez, O.M. Rutiaga-Quñones, Utilization of *Agave durangensis* leaves by *Bacillus cereus* 4N for polyhydroxybutyrate (PHB) biosynthesis, *International Journal of Biological Macromolecules*, 175 (2021) 199-208.
147. W.D. Callister Jr, D.G. Rethwisch, *Callister's materials science and engineering*, John Wiley & Sons 2020.
148. E.B. Toloue, S. Karbasi, H. Salehi, M. Rafienia, Potential of an electrospun composite scaffold of poly (3-hydroxybutyrate)-chitosan/alumina nanowires in bone tissue engineering applications, *Materials Science and Engineering: C*, 99 (2019) 1075-1091.
149. S. Hosseini, P. Azari, M.F. Jiménez-Moreno, A. Rodriguez-Garcia, B. Pingguan-Murphy, M.J. Madou, S.O. Martínez-Chapa, Polymethacrylate coated electrospun PHB fibers as a functionalized platform for bio-diagnostics: confirmation analysis on the presence of immobilized IgG antibodies against Dengue virus, *Sensors*, 17 (2017) 2292.
150. S. Hosseini, P. Azari, E. Farahmand, S. Gan, H.A. Rothan, R. Yusof, L.H. Koole, I. Djordjevic, F. Ibrahim, Polymethacrylate coated electrospun PHB fibers: An exquisite outlook for fabrication of paper-based biosensors, *Biosensors and Bioelectronics*, 69 (2015) 257-264.
151. A. Bandyopadhyay, S. Bose, *Characterization of Biomaterials*, Elsevier, 2013, Chapter 2, 20-25.
152. S.G. Hong, Y.-C. Lin, C.-H. Lin, Crystallization and degradation behaviors of treated polyhydroxybutyrates, *Reactive and Functional Polymers*, 68 (2008) 1516-1523.
153. L. Ricotti, A. Polini, G.G. Genchi, G. Ciofani, D. Iandolo, H. Vazao, V. Mattoli, L. Ferreira, A. Menciassi, D. Pisignano, Proliferation and skeletal myotube formation capability of C2C12 and H9c2 cells on isotropic and anisotropic electrospun nanofibrous PHB scaffolds, *Biomedical Materials*, 7 (2012) 035010.
154. D. Sadeghi, S. Karbasi, S. Razavi, S. Mohammadi, M.A. Shokrgozar, S. Bonakdar, Electrospun poly (hydroxybutyrate)/chitosan blend fibrous scaffolds for cartilage tissue engineering, *Journal of Applied Polymer Science*, 133 (2016).

- 155.** D. Daranarong, R.T. Chan, N.S. Wanandy, R. Molloy, W. Punyodom, L.J.R. Foster, Electrospun polyhydroxybutyrate and poly (L-lactide-co- ϵ -caprolactone) composites as nanofibrous scaffolds, *BioMed research international*, 2014 (**2014**).
- 156.** L. Vannozzi, L. Ricotti, T. Santaniello, T. Terencio, R. Oropesa-Nunez, C. Canale, F. Borghi, A. Menciassi, C. Lenardi, I. Gerges, 3D porous polyurethanes featured by different mechanical properties: Characterization and interaction with skeletal muscle cells, *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 75 (**2017**) 147-159.
- 157.** J. Zhang, M.J. Markiewicz, B. Weisblum, S.S. Stahl, S.H. Gellman, Functionally diverse nylon-3 copolymers from readily accessible β -lactams, *ACS macro Letters*, 1 (**2012**) 714-717.
- 158.** K. Tanaka, K. Sato, T. Yoshida, T. Fukuda, K. Hanamura, N. Kojima, T. Shirao, T. Yanagawa, H. Watanabe, Evidence for cell density affecting C2C12 myogenesis: possible regulation of myogenesis by cell–cell communication, *Muscle & nerve*, 44 (**2011**) 968-977.
- 159.** R.S. Krauss, Regulation of promyogenic signal transduction by cell–cell contact and adhesion, *Experimental cell research*, 316 (**2010**) 3042-3049.
- 160.** R. Curci, M. Battistelli, S. Burattini, A. D’Emilio, P. Ferri, D. Lattanzi, S. Ciuffoli, P. Ambrogini, R. Cuppini, E. Falcieri, Surface and inner cell behaviour along skeletal muscle cell in vitro differentiation, *Micron*, 39 (**2008**) 843-851.
- 161.** S. Burattini, P. Ferri, M. Battistelli, R. Curci, F. Luchetti, E. Falcieri, C2C12 murine myoblasts as a model of skeletal muscle development: morpho-functional characterization, *European Journal of Histochemistry*, 48 (**2004**) 223-234.
- 162.** S.A. Riboldi, N. Sadr, L. Pignini, P. Neuenschwander, M. Simonet, P. Mognol, M. Sampaolesi, G. Cossu, S. Mantero, Skeletal myogenesis on highly orientated microfibrillar polyesterurethane scaffolds, *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 84 (**2008**) 1094-1101.
- 163.** J. Stern-Straeter, G.A. Bonaterra, S.S. Kassner, S. Zügel, K. Hörmann, R. Kinscherf, U.R. Goessler, Characterization of human myoblast differentiation for tissue-engineering purposes by quantitative gene expression analysis, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 5 (**2011**) e197-e206.

- 164.** F.P. La Mantia, M. Ceraulo, M.C. Mistretta, M. Morreale, Effect of cold drawing on mechanical properties of biodegradable fibers, *Journal of applied biomaterials & functional materials*, 15 (2017) 70-76.
- 165.** Z. Liu, Z. Zhou, Y. Ming, S. Zhang, T. Hao, Y. Nie, Molecular dynamics simulations of nucleation details in stretched polyethylene, *Polymer*, 195 (2020) 122442.
- 166.** S. Sharafi, G. Li, A multiscale approach for modeling actuation response of polymeric artificial muscles, *Soft matter*, 11 (2015) 3833-3843.
- 167.** S. Shabahang, G. Tao, J.J. Kaufman, Y. Qiao, L. Wei, T. Bouchenot, A.P. Gordon, Y. Fink, Y. Bai, R.S. Hoy, Controlled fragmentation of multimaterial fibres and films via polymer cold-drawing, *Nature*, 534 (2016) 529-533.
- 168.** H.F. Lodish, *Molecular cell biology*, Macmillan 2008.
- 169.** T.J. Burkholder, Mechanotransduction in skeletal muscle, *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 12 (2007) 174.

EKLER

EK 1 – Tezden Türetilmiş Yayınlar

Yayın 1: *(yayınlandı)*

Başlık: In-vitro effectiveness of poly- β -alanine reinforced poly (3-hydroxybutyrate) fibrous scaffolds for skeletal muscle regeneration.

Dergi: Materials Science and Engineering: C (Biomaterials Advances)

Etki faktörü: 7.328

Yayın yılı: 2021

Künye: Tokak, E. K., Altındal, D. Ç., Akdere, Ö. E., & Gümüşderelioğlu, M. (2021). In-vitro effectiveness of poly- β -alanine reinforced poly (3-hydroxybutyrate) fibrous scaffolds for skeletal muscle regeneration. Materials Science and Engineering: C, 131, 112528.

Yayın 2: *(hazırlanıyor)*

Başlık: Investigation of Hybrid Bioreactor Efficiency in Myogenic Maturation Using Aligned Poly(3-Hydroxybutyrate) (P3HB)/Poly- β -Alanine (PBA) Nanofibrous Matrices and Determination of Operating Parameters

Dergi: Biomaterials (Tahmini)

Etki faktörü: 14

Yayın yılı: 2024 (Tahmini)

Künye: Konuk Tokak, E. ve Gümüşderelioğlu, M.

EK 2 – Tezden Üretilmiş Projeler

Proje 1:

Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi - Kapsamlı Araştırma Projesi

Proje No: FBA-2017-14509

Yürütücü: Dr. Öğr. Üyesi Damla Çetin Altındal

Araştırmacılar: Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu, Arş. Gör. Elvan Konuk Tokak

Proje 2:

Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi - Doktora tez projesi

Proje No: FDK-2020-18612

Yürütücü: Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu

Araştırmacılar: Arş. Gör. Elvan Konuk Tokak

Proje 3:

TÜBİTAK - 1002 Projesi

Proje No: 122M374

Yürütücü: Arş. Gör. Elvan Konuk Tokak

Danışman: Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu