

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**FARKLI POLİMER MEMBRAN YÜZEYLERDE SIÇAN NEONATAL
SİYATİK SİNİR HÜCREİ ÇOĞALMASI**

Neslihan ÇELİK

KİMYA ANABİLİM DALI

**ANKARA
2011**

Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FARKLI POLİMER MEMBRAN YÜZEYLERDE SIÇAN NEONATAL SİYATİK SİNİR HÜCRESİ ÇOĞALMASI

Neslihan ÇELİK

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN

Bu çalışmada sıçan siyatik sinirinden izole edilen neonatal sinir hücrelerinin farklı membranlar üzerindeki davranışları izlendi. Bunun için döner kaplama yöntemi ile hazırlanmış kollajen (Tip-I), kitosan, kitosan-kollajen, alginat, elastin, elastin-kollajen, poli(ϵ -kaprolakton) (PCL), PCL-C60 (fulleren-60), PCL-TDKNT (tek duvarlı karbon nanotüp) polimer film membranlar ve ayrıca PCL, PCL-C60, PCL-TDKNT nanokompozitlerinin elektroğirme yöntemi ile hazırlanmış lifli yapıdaki membranları kullanıldı. Hazırlanan polimer yüzeylere, hücre ekimi yapılarak 1, 7, 14 ve 21. günlerdeki hücre canlılığının belirlenmesi için MTT [3-(4,5-dimetildiyazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolyum bromür] testi ile mitokondriyel aktiviteleri ölçüldü. Ayrıca membranların yüzeyi fotoğraflanarak, hücre membran ilişkisi, sinir hücrelerinin çoğalması ve yayılmaları incelendi. 570 nm'de yapılan absorbans ölçümlerine göre hücre çoğalmasının ve canlılığının en çok artış gösterdiği polimer yüzeyinin elektroğirme yöntemiyle hazırlanan PCL, PCL-C60 ve PCL-TDKNT yüzeyler olduğu tespit edildi. Elektroğirme yöntemi ile hazırlanan polimerler arasında ise PCL-TDKNT polimer yüzeyin siyatik sinir hücresi çoğalmasını daha fazla desteklediği görülmektedir.

Ocak 2011, sayfa 51

Anahtar Kelimeler: Sinir hasarı, sinir doku mühendisliği, polimerler, elektroğirme.

ABSTRACT

Masters Thesis

PROLIFERATION OF RAT NEONATAL SCIATIC NEURONS ON DIFFERENT POLYMER MEMBRANE SURFACES

Neslihan ÇELİK

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN

The aim of this study was to evaluate a variety of surfaces in vitro as cell substrate for neonatal rat sciatic neurons for a period of 3 weeks. Collagen, chitosan, collagen/chitosan, alginate, elastin, elastin/collagen, poly(ϵ -caprolactone) (PCL), PCL/fullerene (C60) and PCL/SWCNT membranes were fabricated via a computer controlled spin-coating setup. Additionally, PCL, PCL/C60 and PCL/SWCNT composite nanofiber based membranes were fabricated by the electrospinning technique. Metabolic cell viability was assessed at 1,7,14 and 21. days using the mitochondrial metabolic activity assay (MTT). All membranes seeded with cells were routinely investigated by inverted microscope for evaluation of typical neuronal phenotype. Absorbance measurements taken at 570 nm revealed that surfaces, prepared by electrospinning were better substrates for cell adhesion, migration and proliferation, related to the fibrous structure of polymer substrate. The best results, in terms of cell viability and proliferation was obtained with the PCL/SWCNT-ES surfaces fabricated by electrospinning.

January 2011, 51 pages

Key Words: Nerve injury, nerve tissue engineering, polymers, electrospinning.

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmamı yürütmemde bana yol gösteren danışman hocam Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN'e (Ankara Üniversitesi, Kimya ABD), benden yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. A. Eser ELÇİN'e (Gazi Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Biyoloji Öğretmenliği Bölümü), meslektaşım Y. Kimyager Y. Emre ASLAN'a, laboratuvarıda her türlü konuda bana yardımcı olan diğer hocalarıma, arkadaşlarıma, her zaman yanımda olan aileme ve hayatımın anlamına sonsuz teşekkürler.

Neslihan ÇELİK

Ankara, Ocak 2011

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.	iii
SİMGELER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.	vii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	2
2.1 Sinir Sistemi ve Periferal Sinir Sisteminin Yapısı.....	2
2.2 Periferal Sinir Hasarı.....	3
2.3 Periferal Sinir Yenilenmesi.	5
2.4 Sinir Doku Mühendisliğinde Kullanılan Biyomalzemeler.	6
2.4.1 Kollajen	7
2.4.2 Kitosan.	8
2.4.3 Alginat	9
2.4.4 Elastin.....	9
2.4.5 PCL.....	10
2.4.6 Fulleren (C60).....	10
2.4.7 Tek Duvarlı Karbon Nanotüp (TDKNT).....	10
2.5 Döner Kaplama Yöntemi.....	11
2.6 Elektroğirme Yöntemi.	12
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	14
3.1 Kullanılan Kimyasallar.	14
3.2 Döner Kaplama Yöntemi ile Polimer Membranların Hazırlanması.....	14
3.2.1 Kollajen membran.	14
3.2.2 Kitosan membran.....	15
3.2.3 Kitosan-kollajen membran.....	15
3.2.4 Sodyum alginat membran.	15
3.2.5 Elastin membran	16
3.2.6 Elastin-kollajen membran	16
3.2.7 PCL, PCL-C60 ve PCL-TDKNT membranlar.....	16

3.3 Elektroğirme Yöntemi ile Polimerler Membranların Hazırlanması.....	17
3.4 Hücre Karakterizasyonu	19
3.5 MTT [3-(4,5-dimetildiyazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolyum bromür] Testi.....	21
4. DENEY BULGULARI.	22
4.1 MTT Sonuçları ve Görüntüleri.....	22
4.1.1 Kollajen membran	22
4.1.2 Kitosan membran.....	23
4.1.3 Kitosan-kollajen membran.....	25
4.1.4 Sodyum alginat membran	26
4.1.5 Elastin membran	28
4.1.6 Elastin-kollajen membran	29
4.1.7 PCL membran	31
4.1.8 PCL-C60 membran.....	32
4.1.9 PCL-TDCNT membran.....	34
4.1.10 Elektroğirme yöntemi ile hazırlanan PCL membran	34
4.1.11 Elektroğirme yöntemi ile hazırlanan PCL-C60 membran	36
4.1.12 Elektroğirme yöntemi ile hazırlanan PCL-TDKNT membran.....	38
4.1.13 Poli-L-Lizin	39
4.1.14 TCP.....	41
4.1.15 MTT testi sonuçlarının genel olarak incelenmesi.	42
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	44
KAYNAKLAR	47
ÖZGEÇMİŞ.....	51

SİMGELER DİZİNİ

C60	Karbon60 (Fulleren)
DMF	Dimetilformamid
EDC	1-Etil-3-(3-Dimetilaminopropil)karbodiimid)
MES	2-(N-Morfolino)ethanesülfonik asit
MTT	3-(4,5-dimetildiyazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolyum bromür
NHS	N-Hidroksisüksinimid
PBS	Phosphate Buffered Saline (fosfat tamponlu tuzlu su)
PCL	Poli-ε-kaprolakton
TDKNT	Tek Duvarlı Karbon Nanotüp
THF	Tetrahidrofuran

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Çok kutuplu sinirin genel yapısı.....	3
Şekil 2.2 Periferel sinir hasarı sonrası dejenerasyon ve yenilenme adımları.....	6
Şekil 2.3 Döner kaplama yönteminin aşamaları	11
Şekil 2.4 Elektroğırme düzeneğinin iki farklı biçimi.....	13
Şekil 3.1 Lif oluşum kalitesinin pompa akış hızı ile değışimi.....	18
Şekil 3.2 Lif oluşum kalitesinin şırınga ucu iç çapı ile değışimi.....	18
Şekil 3.3 Lif oluşum kalitesinin uygulanan gerilime göre değışimi	19
Şekil 3.4 Siyatik sinir hücre kültürünün görüntüsü.....	20
Şekil 3.5 Siyatik sinir hücrelerinin H&E boyama sonrası ışık mikroskobu görüntüsü .	20
Şekil 3.6 MTT testi ile formazan kristallerinin oluşumu	21
Şekil 4.1 Statik olarak yürütölen neonatal siyatik sinir hücre kültürünün kollajen polimer membran üzerindeki a. 1, b. 7, c. 14 ve d. 21. günlerde yapılan MTT testi sonucu oluşın formazan kristallerinin görüntüsü.....	22
Şekil 4.2 Kollajen membran statik hücre kültürünün MTT testi sonucu 570 nm’de absorbans ölçümlerinin değışimi.....	23
Şekil 4.3 Statik olarak yürütölen neonatal siyatik sinir hücre kültürünün kitosan polimer membran üzerindeki a. 1, b. 7, c. 14 ve d. 21. günlerde yapılan MTT testi sonucu oluşın formazan kristallerinin görüntüsü.	24
Şekil 4.4 Kitosan membran statik hücre kültürünün MTT testi sonucu 570 nm’de absorbans ölçümlerinin değışimi.....	24
Şekil 4.5 Statik olarak yürütölen neonatal siyatik sinir hücre kültürünün kitosan-kollajen polimer membran üzerindeki a. 1, b. 7, c. 14 ve d. 21. günlerde yapılan MTT testi sonucu oluşın formazan kristallerinin görüntüsü.....	25
Şekil 4.6 Kitosan-kollajen membran statik hücre kültürünün MTT testi sonucu 570 nm’de absorbans ölçümlerinin değışimi	26
Şekil 4.7 Statik olarak yürütölen neonatal siyatik sinir hücre kültürünün alginat polimer membran üzerindeki a. 1, b. 7, c. 14 ve d. 21. günlerde yapılan MTT testi sonucu oluşın formazan kristallerinin görüntüsü.	27
Şekil 4.8 Alginat membran statik hücre kültürünün MTT testi sonucu 570 nm’de absorbans ölçümlerinin değışimi.....	27

Şekil 4.9 Statik olarak yürütülen neonatal siyatik sinir hücre kültürünün elastin polimer membran üzerindeki a. 1, b. 7, c. 14 ve d. 21. günlerde yapılan MTT testi sonucu oluşan formazan kristallerinin görüntüsü.	28
Şekil 4.10 Elastin membran statik hücre kültürünün MTT testi sonucu 570 nm'de absorbands ölçümlerinin değişimi.....	29
Şekil 4.11 Statik olarak yürütülen neonatal siyatik sinir hücre kültürünün elastin-kollajen polimer membran üzerindeki a. 1, b. 7, c. 14 ve d. 21. günlerde yapılan MTT testi sonucu oluşan formazan kristallerinin görüntüsü.....	30
Şekil 4.12 Elastin-kollajen membran statik hücre kültürünün MTT testi sonucu 570nm'de absorbands ölçümlerinin değişimi.	30
Şekil 4.13 Statik olarak yürütülen neonatal siyatik sinir hücre kültürünün PCL polimer membran üzerindeki a. 1, b. 7, c. 14 ve d. 21. günlerde yapılan MTT testi sonucu oluşan formazan kristallerinin görüntüsü.	31
Şekil 4.14 PCL membran statik hücre kültürünün MTT testi sonucu 570 nm'de absorbands ölçümlerinin değişimi.....	32
Şekil 4.15 Statik olarak yürütülen neonatal siyatik sinir hücre kültürünün PCL-C60 polimer membran üzerindeki a. 1, b. 7, c. 14 ve d. 21. günlerde yapılan MTT testi sonucu oluşan formazan kristallerinin görüntüsü.....	33
Şekil 4.16 PCL-C60 membran statik hücre kültürünün MTT testi sonucu 570 nm'de absorbands ölçümlerinin değişimi.....	33
Şekil 4.17 PCL-TDKNT membran statik hücre kültürünün MTT testi sonucu 570 nm'de absorbands ölçümlerinin değişimi.....	34
Şekil 4.18 Statik olarak yürütülen neonatal siyatik sinir hücre kültürünün elektroğirme yöntemi ile hazırlanan PCL/EE polimer membran üzerindeki a. 1, b. 7, c. 14 ve d. 21. günlerde yapılan MTT testi sonucu oluşan formazan kristallerinin görüntüsü.....	35
Şekil 4.19 PCL/EE membran statik hücre kültürünün MTT testi sonucu 570 nm'de absorbands ölçümlerinin değişimi.....	36
Şekil 4.20 Statik olarak yürütülen neonatal siyatik sinir hücre kültürünün Elektroğirme yöntemi ile hazırlanan PCL-C60/EE polimer membran üzerindeki a. 1, b. 7, c. 14 ve d. 21. günlerde yapılan MTT testi sonucu oluşan formazan kristallerinin görüntüsü.	37

Şekil 4.21 PCL-C60/EE membran statik hücre kültürünün MTT testi sonucu 570 nm’de absorbens ölçümlerinin değişimi.....	37
Şekil 4.22 Statik olarak yürütülen neonatal siyatik sinir hücre kültürünün elektroğirme yöntemi ile hazırlanan PCL-TDKNT/EE polimer membran üzerindeki a. 1, b. 7, c. 14 ve d. 21. günlerde yapılan MTT testi sonucu oluşan formazan kristallerinin görüntüsü	38
Şekil 4.23 PCL-TDKNT/EE membran statik hücre kültürünün MTT testi sonucu 570 nm’de absorbens ölçümlerinin değişimi.....	39
Şekil 4.24 Pozitif kontrol için statik olarak yürütülen neonatal siyatik sinir hücre kültürünün poli-L-lizin kaplı yüzeydeki a. 1, b. 7, c. 14 ve d. 21. günlerde yapılan MTT testi sonucu oluşan formazan kristallerinin görüntüsü.....	40
Şekil 4.25 Pozitif kontrol statik hücre kültürünün MTT testi sonucu 570 nm’de absorbens ölçümlerinin değişimi.....	40
Şekil 4.26 Negatif kontrol için statik olarak yürütülen neonatal siyatik sinir hücre kültürünün doku kültürü kabında (TCP) a. 1, b. 7, c. 14 ve d. 21. günlerde yapılan MTT testi sonucu oluşan formazan kristallerinin görüntüsü.....	41
Şekil 4.27 Negatif kontrol grubu statik hücre kültürünün MTT testi sonucu 570 nm’de absorbens ölçümlerinin değişimi.....	42
Şekil 4.28 Tüm polimerlerin statik siyatik sinir hücresi kültürünün MTT testi sonucu 570 nm’de absorbens ölçümlerinin zamanla değişimi	43

1. GİRİŞ

İnsanın tüm zihinsel ve fiziksel aktivitelerinin yönlendiricisi olan merkezi sinir sistemi, tüm vücuda çok geniş bir periferik sinir sistemi ağı ile bağlıdır. Erişkin sinir hücrelerinin çoğalma ve kendilerini yenileme kapasiteleri sınırlı olduğu için meydana gelen sinir hasarının tamiri güçtür. Buna bağlı olarak zarar görmüş bir sinirin ilgili olduğu organlar da iş göremez hale gelir ve yeniden iyileşmesi de oldukça zorlaşır (Kim vd. 2008).

Merkezi sinir sisteminin yapısı periferik sinir sistemine göre daha karmaşıktır ve hasarlı sinirlerin iyileşmesi daha zordur. Sinir dokusu hasarlarında özellikle aksonal büyümenin altında yatan mekanizmalar konusundaki bilgi eksikliğimiz, sinir onarımına gerçekçi yaklaşımlar sunmamızı engeller. Ancak son yıllarda edinilen bilgilerin artması, sinir yenilenmesinde yeni cerrahi tekniklerinin ve doku mühendisliği malzemelerinin geliştirilmesine olanak sağlamıştır (Huang ve Huang 2006a).

Sinir hasarının tamirinde sinir yapısının ve rejenerasyon mekanizmasının açıklığa kavuşması, zedelenen siniri tamir etmede bize yol gösterici olacaktır. Sinir doku mühendisliği çalışmalarında genel uygulama sinir yapısına uygun destek malzemeler üretmektir. Üretilen malzemeler hem şekil itibarıyla hem de içerisinde bulunan kimyasal maddelerle aksonal yenilenmeyi tetikleyici, yönlendirici ve tamamlayıcı olmalıdır.

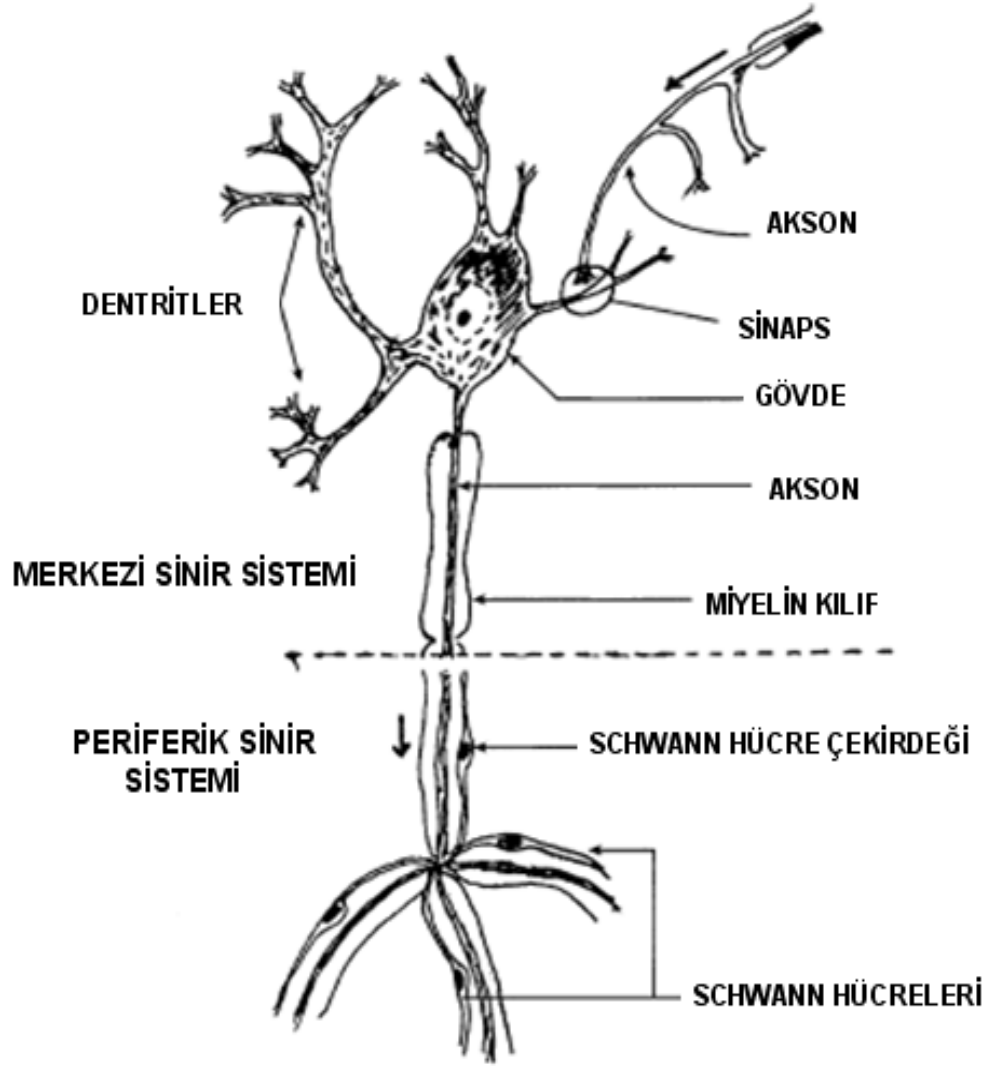
Bu çalışmada, şimdiye kadar periferik sinir hasarında destek olarak sıklıkla kullanılan polimer malzemelerin, aksonal gelişmeyi desteklemesi yönünden yeni geliştirilen polimerlerle karşılaştırılmaları esas alınmıştır. Ayrıca elektroçirme yöntemiyle oluşturulan nanolifli yapıdaki membran şekillerinin ne ölçüde sinir yönlenmesine ve yenilenmesine katkısı olduğu da gözlemlenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1 Sinir Sistemi ve Periferik Sinir Sisteminin Yapısı

Sinir sistemi, merkezi sinir sistemi ve periferik sinir sistemi olmak üzere ikiye ayrılır. Merkezi sinir sistemi beyin ve omurilikten meydana gelmektedir. İç ve dış etkilerle oluşan sinirsel uyarılar periferik sinir sistemi yardımı ile merkezi sinir sistemine iletilir. Merkezi sinir sisteminde, çevreden gelen sinyallerin düzenlenmesinde, tanımlanmasında, yeni sinyal üretiminde ve sinyallerin çoğaltılıp yayılmasında rol oynayan nöronlar, astroglia, mikrogliya ve oligodentrositler gibi çok fazla sayıda hücre vardır. Periferik sinir sistemi ise motor nöronlar, duyu nöronları ve glia hücrelerinden oluşur. Nöronların pek çok farklı tipi olmasına rağmen en yaygın olanı çok kutuplu şekilde olmaktadır. Genel olarak hücre gövdesi, dentrit ve aksondan oluşur (Şekil 2.1). Periferik sinir sisteminde nöronların etrafını sararak destek görevi yapan glia hücrelerine schwann hücreleri denir. Bu hücreler aynı zamanda miyelin kılıf oluşturarak nöronların dış çevreden izole olması ve daha iyi iletim yapmalarını sağlarlar (Seal vd. 2001).

Schwann hücreleri, tutunma ve destek için kollajen ve laminin gibi hücre dışı matriks (HDM) molekülleri, bunun yanında L-1 (Sinirsel aktivitelere rol oynayan hücre adhezyon molekülü), N-kadherin (Nöral kadherin), gamma-1-integrin (Hücre dışı haberleşme proteini) ve N-CAM (Nöral hücre adhezyon molekülü) gibi hücre adhezyon molekülleri ve reseptörleri üretir. Ayrıca NGF (Sinir büyüme faktörü), BDNF (Beyin kökenli nörotrofik faktör) ve CNTF (Siliar nörotrofik faktör) gibi nörotrofik molekül karışımını sentezler. Schwann hücreleri periferik aksonların dizilimi ve biçimlenmesinde kritik rol oynar (Huang ve Huang 2006b).



Şekil 2.1 Çok kutuplu sinirin genel yapısı (Seal vd. 2001)

2.2 Periferik Sinir Hasarı

Açık yaralı periferik sinir hasarlarının %5'i spor, yol kazaları gibi olayların sonucunda uzuvların zarar görmesiyle meydana gelir. Çoğu zor doğumda da yine uzuvların sündürme ve çekme gibi hareketler sonrası zarar görmesi ile periferik sinir hasarı ortaya çıkar. Doğumların %0,12'sinde bu tür durumlarla karşılaşmaktadır ve pek çok insan hayatını bu ve benzeri olaylar yüzünden kaliteli bir şekilde sürdürmez (Huang ve Huang 2006a).

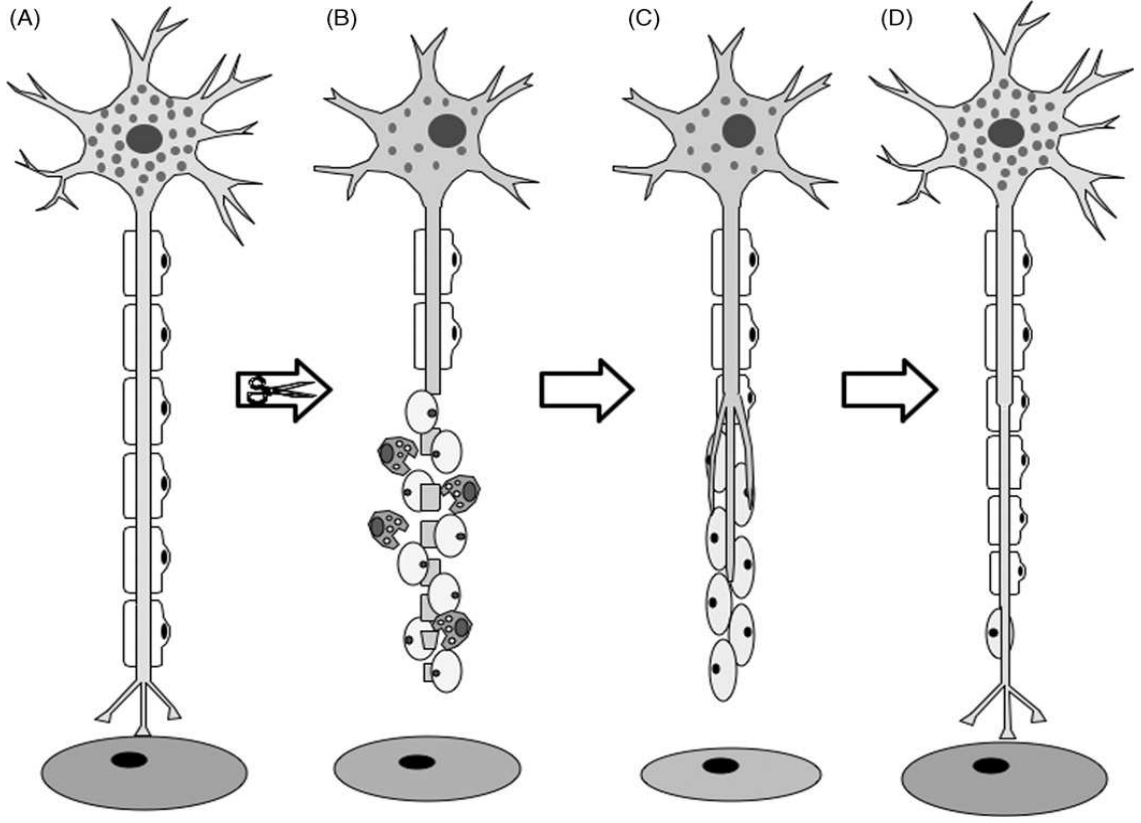
Periferal sinir hasarının en çok kullanılan iki sınıflandırma sistemi Sunderland ve Seddon'a aittir. Sunderland'ın sınıflandırması daha karmaşık olmasına rağmen operatörler tarafından en benimsenen sınıflandırma sistemidir. Pek çok periferal sinir hasarı, zorlama, basınç ve batma gibi olaylar sonrası oluşan kesilme ve ezilmelere bağlıdır. Bu olaylar sonucu sinir gövdesi ya da aksonların anatomik yapısı bozulur (Campbell 2009).

1947'de Seddon'un yaptığı sınıflandırmaya göre sinir hasarı az hasarlıdan çok hasarlıya doğru sırasıyla Nöropraksia, Aksonotmezis ve Nörotmezis olarak 3 sınıfta incelenir. Nöropraksiada sinir üzerinde oluşan hafif hasarın sonucunda bu bölgedeki aksonlarda miyelin kaybı görülür ve lokalize olmuş iletim bloğu meydana gelir. Sinir zedelenmesinde ortaya çıkan akson hasarının hasasiyeti, motor nöronlardan duyu nöronlara, geniş bölgelerden daha küçük bölgelere, yani yüzeyselden daha derine doğru artar. Akson çevresinde sinir kılıfı olması sinirin daha az zarar görmesini sağlar. İnsanlarda, kemirgenlere oranla daha fazla sinir kılıfı vardır. İkinci düzey sinir hasarı olan Aksonotmezis ise daha şiddetli bir ezilme sonucu aksonun kendisinde meydana gelir. Aksonun kopan ucu Wallerian dejenerasyonu geçirir. Bu kısım sinir gövdesinden uzakta kaldığı için yenilenme oranı günde 1-2 mm gibi oldukça az bir değerdir. Sonuçta bazı nöronlar sinir hasarı nedeniyle kaybedilebilir. Sinir gövdesine uzak olan bu kısımda daha az sinir hücresi ölümü görülmesine rağmen yenilenme için gerekli olan transkripsiyon moleküllerinin ekspresyonunun azaldığı görülür. Sinir hasarının üçüncü ve son tipi ise Nörotmezis olarak adlandırılır. Burada ise endonörium, perinörium ve epinöriumdan oluşan bağ dokusu bileşenlerinin hasar görmesi söz konusudur. Bu nedenle Sunderland sinir hasarını 5 sınıfta incelenmesini önermiştir. Bu hasar sinirin tamamen kopması sonucu oluşur ve hasarlı bölge cerrahi girişim ile birleştirilerek tamir edilir. Buradaki ana problem aksonların uyumsuz bir şekilde birleşip fonksiyonel özelliklerini yitirmeleridir. Bu yüzden ayrılmış aksonlardaki sinir tamiri daha yavaş ilerler. Eğer hasarlı bölgenin sinir yenilenmesi, bir yıldan uzun sürerse fonksiyonel bir tamirden umut kesilebilir (Kern 2008).

2.3 Periferal Sinir Yenilenmesi

Sinirin kesilen ucundaki parçanın dejenere olması ile bunun fonksiyonunu yerine getirecek yeni bir sinir ucu, gövde tarafından oluşturulur. Bu adımlar Şekil 2.2'de sırasıyla gösterilmiştir. Şekil 2.2.a'da sinir fiberinin, hedef hücre ile normal bir şekilde sinaptik iletişimini sürdürdüğü, şekil 2.2.b'de fiberin enine kesilmesi sonucu aksonun ve miyelin kılıfın kesilen uç kısmının parçalanması ve bu parçalanan materyallerin makrofajlar ve schwann hücreleri tarafından fagositoz yoluyla ortamdan uzaklaştırılması, bu sırada nöron gövdesindeki kromatolizis sonucu dentritlerin dallı uzantılarının içeri doğru çekilmesi, şekil 2.2.c'de ise gövdeye yakın kısımdaki kesikten aksonal bir filizlenme meydana gelmesi ve Büngner bandı boyunca schwann hücre çoğalması ile bu filizlenmenin devam etmesi ve son olarak şekil 2.2.d'de ise sinir fiberinin olgunlaşmasını tamamlayıp hedef hücre ile yeniden iletişime geçmesi görülmektedir. Yenilenen aksonun normale göre daha küçük boğumlarının olduğu ve yeteneklerinin etkisinin daha az sürdüğü görülür. Nöron normal iletim fenotipine döner. Sinirin kesilmesi sırasında hedef hücrede ise fenotipik değişiklikler ve körelmeler oluşabilir (Navarro vd. 2007).

Sinir yaralanmalarında uygulanan sinir yamalarının başarılı bir şekilde sinir hasarını onarması o bölgede optimal koşulların oluşturulmasına bağlıdır. Hedeflenen başarı, endonörium ve Schwann hücrelerinin duyarlı hale gelip Wallerian dejenerasyonu sonrası nakledilen sinir yamasının %100 başarı göstermesidir. Ancak birçok faktör nedeni ile başarı oranı sınırlıdır (Stang vd. 2009).



Şekil 2.2 Periferel sinir hasarı sonrası dejenerasyon ve yenilenme adımları (Navarro vd. 2007)

2.4 Sinir Doku Mühendisliğinde Kullanılan Biyomalzemeler

Doku mühendisliği uygulamalarındaki temel prensip zarar görmüş bölgedeki yapıya uygun biyomalzemeler geliştirmektir. Sinir doku mühendisliğinde de bu prensibe dayanarak, sinir dokusunu en iyi şekilde taklit edecek yapı oluşturulmaya çalışılmaktadır.

Sinir doku mühendisliğinde karşılaşılan immün-ret ve doku uyumu problemlerinin önlenmesi ile umut verici sonuçlar elde edilebilir. İlk olarak sinir doku greftleri hücre-dostu olacak şekilde modifiye edilmelidir. Yapay malzemeler fiziksel ve kimyasal özellikleri bakımından kolayca şekillenebilir, iletken, gözenekli, biyoyumlu, biyobozunur ve mekanik olarak dayanıklı malzemeler olmalıdır. Bununla birlikte yapıya modifiye edilen substratlar ve Schwann hücreleri gibi destek hücrelerinin

kullanılması da sinir hasarının tamiri için önemli faktörlerdir. Bu özellikler aksonal çoğalma ve büyüme yeteneğini önemli ölçüde değiştirir. Sinir doku mühendisliği uygulamalarında laminin, kollajen ve fibronektin gibi HDM molekülleri; alginat, agaroz ve kitosan gibi kolayca polipeptid iskeleleri oluşturabilen doğal polimerler kullanılmaktadır. Ayrıca biyobozunur ve biyouyumlu olan poli-glikolik asit (PGA), poli-laktik asit (PLA), poli(L-laktid-ko-kaprolakton) gibi poliesterler ve türevleri yapay sinir dokusu uygulamalarında sıklıkla kullanılmaktadır (Huang ve Huang 2006b).

2.4.1 Kollajen

Hayvanlarda ve insanlardaki bağ dokunun temel proteini kollajendir. Sağlam demetler halindeki kollajenler, kollajen lifi olarak adlandırılır. Bu kollajen lifler, dokuların şeklini koruyan ve destek sağlayan HDM temel bileşenidir. Kollajen büyük bir gerilim kuvvetine sahiptir. Literatürde 28 tipten daha fazla kollajen türü tanımlanmıştır. Bunlardan tip I, II, III ve IV vücutta bulunan kollajenin %90'ını oluşturur. Tip I kollajen periferik sinir sistemindeki en baskın kollajen olmakla birlikte Tip III kollajenle beraber sinirleri oluşturan proteinlerin %49'unu meydana getirirler. Kollajen doğal bir malzeme olduğu için toksik olmayan, yüksek biyoabsorblama kapasitesine sahip ve biyouyumu mükemmel bir malzemedir (Stang vd. 2009).

Kollajen tiplerinin hepsi yapısal olarak üçlü sarmal zincirden oluşmuştur. Kollajen fibrilleri genellikle tip I, II, III, V ve XI ağırlıklı olarak farklı dokularda farklı oranlarda birarada bulunurlar. Tip I kollajen uzunluğu 50 nm olan 2 adet $\alpha 1$ zinciri, 1 adet de $\alpha 2$ zincirinden oluşmuştur. En çok deri, kemik, kırık, dentin, kan damarı, kornea ve tendonlarda bulunur. Tip III ise en çok deri, kan damarı ve iç organlarda görülür. Lif uzunluğu 30 ile 130 nm arasında değişir ve yapısında 3 adet $\alpha 1$ zinciri vardır. En önemli özelliği kan damarlarına esneklik kazandırması ve yara iyileşmelerine katkıda bulunmasıdır. Tip IV kollajen bazal laminanın ve membranların temel bileşenidir. Yapısı diğerleri gibi sade lifsi şekilde değildir. Polimer düzeni mikrolifler ve bunların arasında bulunan ağı yapılarından oluşmuştur (Sell vd. 2009).

Kollajen hücre adhezyonu göz önüne alındığında, nöral hücre benzeri PC-12 hücrelerinin yönlendirilmesinde yaygın olarak kullanılır. Ayrıca implantların yüzey kaplamalarında kullanılarak hücrelerin yüzeye tutunmasının yanısıra implantın vücutla uyumunu artırıcı özellik gösterir (Straley ve Heilshorn 2009).

Kollajen, sentetik bir malzeme ile karşılaştırıldığında daha geçirgen ve doğal bir polimer olmasından kaynaklanan birçok avantaja sahiptir. 5 ve 10 mm'lik siyatik siniri hasarında kollajen ve silikon yapay sinir tüpleri ile yapılan çalışmada, kollajenin silikon ile karşılaştırıldığında aksonal yenilenme, Schwann hücresi ile uyumu ve dokuda damarlaşma gibi özellikleri göz önüne alındığında daha iyi bir malzeme olduğu görülmektedir (Kemp vd. 2009).

2.4.2 Kitosan

Kitosan, anti-tümör, antibakteriyel, biyobozunur ve biyouyum özelliklerinden dolayı sinir yenilenmesinde kullanılabilir materyaller arasında uygun bir adaydır. Jianchun ve arkadaşlarının da rapor ettiği gibi kitosan membran üzerinde kültüre edilen nöronların çok iyi geliştikleri ve periferik sinir sistemi uygulamalarında kullanılan kitosan tüplerin sinir tamirini desteklediği görülmüştür (Kim vd. 2008).

Kitosana hazırlanan membran ve liflerin *in vitro* ortamda Schwann hücreleri ile yapılan çalışmada, MTT sonuçlarına göre kitosanın hücre büyümesine sitotoksik etkisinin olmadığı görülmüştür. Kitosan lifler ve polilizin kaplı coverslipler karşılaştırıldığında, schwann hücrelerinin kitosan membranla uyumu nispeten daha yüksektir. Deneysel sonuçlara göre schwann hücreleri kitosan malzeme üzerinde küresel ve oval olmak üzere iki şekilde uzanırlar. Oval şeklindeki hücreler şekil itibariyle de lif yapısındaki kitosana kuşatmaya daha eğilimlidirler. Buna göre hücrelerin kitosan lif yapısı üzerindeki göçü ve uzanımı membran yapısındakinden daha hızlıdır (Yuan vd. 2004).

2.4.3 Alginat

Alginat suyosunundan ekstrakte edilen β -D-mannuronik asit ve α -L-glukonik asitten oluşan iyi düzenlenmiş ve biyobozunur özellikteki bir kopolimerdir. Alginatın *in vitro* ortamda hücre yayılmasını engelleyici hiçbir etkisinin olmadığı ve ayrıca *in vivo* ortamda alginatın yerleştirildiği dokuda çok az vücut reaksiyonuna sebep olduğu görülmüştür. Alginat, schwann hücre göçünde olduğu gibi sinir hücresi yenilenmesi ve yayılmasında da uygun ortamın oluşmasını sağlamaktadır. Hashimoto ve arkadaşları alginat jelde periferik hücre yenilenmesinin erken ve geç dönem analizlerinde, alginatın akson yenilenmesinde kollajen ve fibrinden daha etkili olduğunu göstermişlerdir (Hashimoto vd. 2002).

2.4.4 Elastin

Elastin temelli materyaller doku mühendisliği uygulamalarında gittikçe daha da popüler hale gelmektedir. Bu ilgi elastinin dikkat çekici özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Elastin organ ve dokulara elastiklik özelliği kazandıran HDM proteindir. Bu yüzden elastikliğin çok önemli olduğu, hayat boyunca milyarlarca kez gerilme ve gevşeme hareketi yapan damarlar, akciğerler ya da deri gibi organ ve dokularda oldukça bol miktarda elastin lifler bulunur. Elastin ve benzeri biyomalzemeler deri nakilleri, damar greftleri, kalp kapakçıkları ve elastik kıkırdak gibi çok çeşitli doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmaktadır (Dameen vd. 2007).

Yapılan birçok çalışma dokuya yabancı malzemenin yüzeyi HDM proteinleri ile kaplandığında hücrelerin adhezyonun ve gelişiminin olumlu yönde etkilendiğini göstermektedir. Straley ve Heilshorn'un yaptığı çalışma da HDM proteinlerinin dizilerindeki fonksiyonel gruplardan oluşan protein dizileri üretirken elastinin protein dizileri kullanılmıştır. Elastin yapısının nöral hücre karakterini etkilememesi yani inert olması ve nanoboyutta yüzey kaplama tekniğinde kullanılacak biyofonksiyonel grupların tutturulması için uygun tekrarlanabilir protein dizileri oluşturması elastinin bu çalışma için seçilmesini sağlamıştır (Straley ve Heilshorn 2009).

2.4.5 PCL

Poli-L-kaprolakton (PCL), genellikle farmasötik ürünler ve yara örtüleri yapımında kullanılan, biyoyumlu ve biyobozunur alifatik bir poliesterdir. Su, yağ, diğer kimyasal çözücüler ve kloro karşı iyi direnç gösterir. Fizyolojik şartlarda (insan vücudu gibi) ester bağlarının hidrolizi ile bozunur. Bu özellikleri ile nakillerde kullanılan biyomalzeme olarakta büyük ilgi görür. Schnell ve arkadaşlarının, elektroğirme ile yönlendirilmiş nanolifli sinir kanalı şeklindeki PCL ve PCL/kollajen yapılarını, dorsal kök ganglia'dan elde edilen sinir hücreleri ile kültüre ettikleri çalışmada her iki lifli yapının da sinir ilerlemesini ve glia hücrelerinin göçünü desteklediği gözlenmiştir (Tabesh vd. 2009).

2.4.6 Fulleren (C60)

1985'te keşfedilen fulleren yapısı, yalnızca karbon atomlarının bir araya gelerek oluşturduğu çokgen yapılardır. C60'da 60 adet karbon atomu altıgen beşgen gibi geometrik şekillerde birbirine tutunarak bir futbol topu şekline benzer yapı oluşturmaktadır (Kaladhar ve Sharma 2007).

C60 literatürde nanomalzeme ve molekül olarak tanımlanmaktadır. C60'ın yapısına baktığımızda kristal yapıdadır. Boyutları küçük olduğundan bu nanopartiküllerin biyolojik olarak aktif olma ve normal hücre işleyişini etkileme potansiyelleri vardır. Uzun süreli maruz kalma durumları hakkında günümüzde rapor edilmiş bilgiler bulunmamaktadır. Kısa süreli maruz kalma durumlarında ise memeli akciğerlerinde küçük hava yollarını tıkayabileceği belirtilmiştir (Sayes vd. 2005).

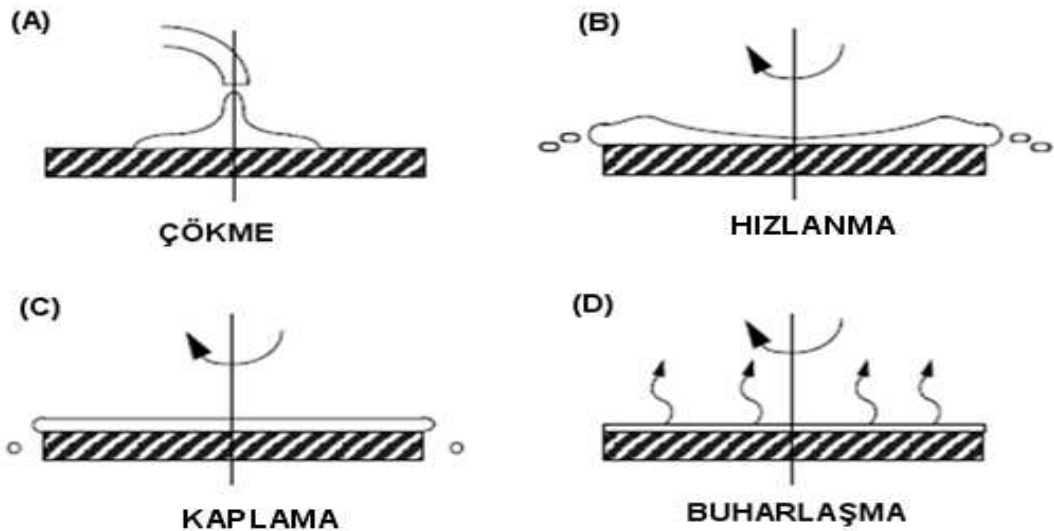
2.4.7 Tek Duvarlı Karbon Nanotüp (TDKNT)

1991'de yapılan uzunluğu 1-3 μ ve çapı 1-3 nm olan karbon iplikler, sık kullanılan adıyla karbon nanotüpler, sıradışı özellikleri sayesinde, karbon araştırmalarında yeni bir çığır açmıştır. Kan ile uyumlu karbon nanotüpler, ilaç salınımı ve doku mühendisliği uygulamalarında sınırsız fırsatlar ortaya koymuştur (Kaladhar ve Sharma 2007).

Bugün nanoteknolojide kullanılan ve diğer malzemelere göre daha etkili olan pek çok materyaller gibi karbon nanotüplerde mekanik, elektronik ve diğer önemli özellikleri bakımından umut vericidir. Mekanik ve elektronik açıdan bakılınca nanofiber kompozit malzemede kullanılan dağınık ya da sıralı KNT yapılarının gelecek vaat ettiği düşünülmektedir. Geniş açı değeri, küçük boyut, yüksek dayanıklılık, düşük yoğunluk, yüksek iletkenlik, yüksek elastikiyet ve esneklik özellikleri eğme, bükülme ve sıkıştırmalara karşı dayanıklılık sağlar. Bu bakımdan KNT'ler nanokompozit malzeme oluşturmak için ideal birer adaydır (Chronakis 2005).

2.5 Döner Kaplama Yöntemi

Döner kaplama yöntemi ile cihazın dönme hızından yararlanılarak membranın hem daha homojen hem de daha ince olması sağlanır. Bu yöntem 4 aşamada incelenebilir (Şekil 2.3). Çökme, hızlanma, kaplama ve buharlaşma aşamaları sırasıyla gerçekleşir. Bu aşamalarda dönme hızı giderek artırılarak, çözeltinin bulunduğu yüzeyi ince bir film şeklinde kaplaması sağlanır. Son aşamada ise yüzeyi kaplayan maddenin içindeki çözücünün buharlaşması sağlanır. Oluşan membran ne kadar ince olursa buharlaşma o kadar kolay olacaktır (Luurtsema 1997).

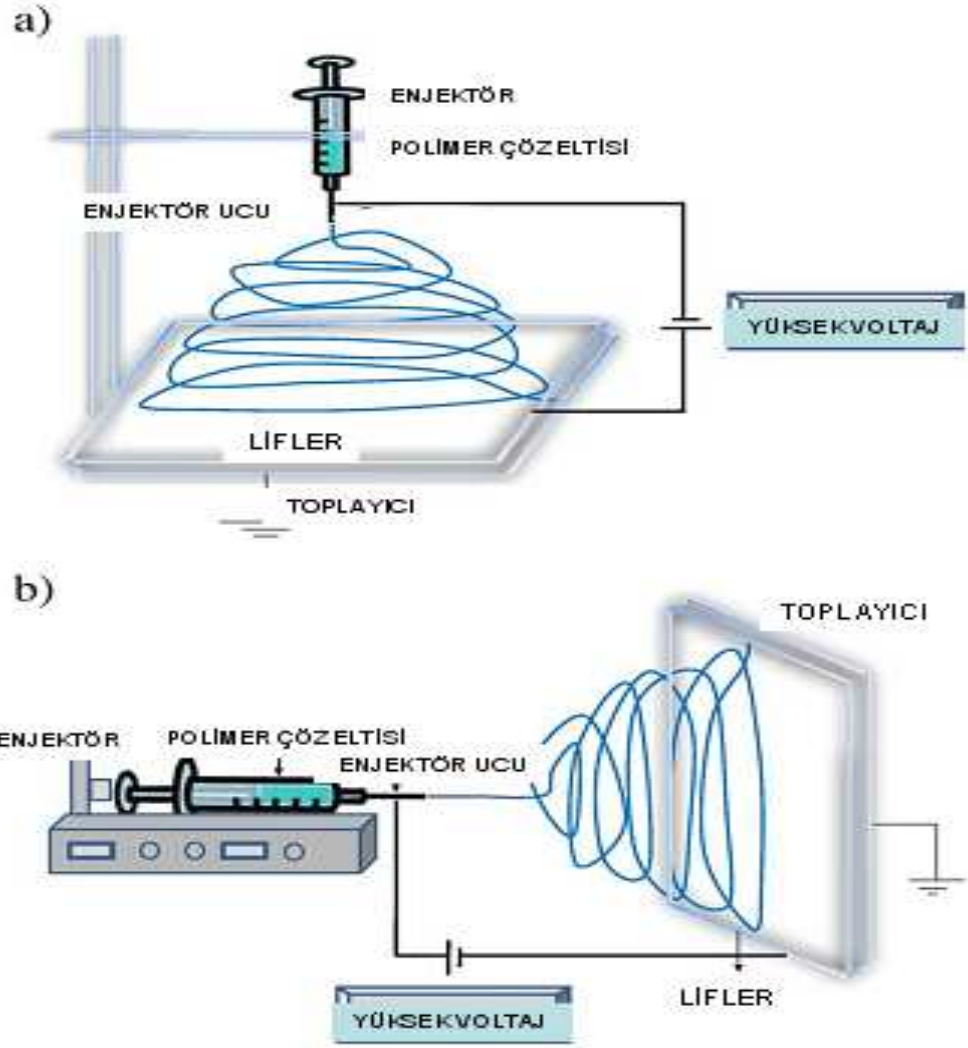


Şekil 2.3 Döner kaplama yönteminin aşamaları (Luurtsema 1997)

2.6 Elektroğirme Yöntemi

Elektroğirme yöntemi, ilk olarak 1897’de Rayleigh tarafından, detaylı olarak da 1914’de Zeleny tarafından elektropüskürtme çalışmaları ile ortaya çıkmış eski bir yöntemdir. 1934’de ise Formhals tarafından tescillenmiştir. Elektroğirme kelimesi elektrostatik eğirmeden türemiş ve günümüzde (1994’den beri) bu şekli ile benimsenmiş bir kelimedir. Formhals elektrostatik güç kullanılarak üretilmiş polimer liflerin deney düzeneği ile ilgili birçok patent yayınlamıştır. Elektroğirme yönteminde elektrostatik çökeltme ve püskürtme gibi çeşitli tekniklere benzer işlemler uygulanır. Temel prensip çift taraflı güçlü gerilim oluşturularak yüklü polimer damlacığının yüzey gerilimini yenmektir. Yöntem oda sıcaklığında ve atmosfer koşullarında yürütülür. Genellikle dikey ve yatay olmak üzere iki standart elektroğirme yöntemi kullanılmaktadır (Şekil 2.4). Temelde sistem üç ana bileşenden oluşur. Bunlar; yüksek voltajlı güç kaynağı, düze (küt enjektör ucu ya da pipet ucu) ve toplama plakası (metal plaka ya da döner mil). Gelişen teknoloji ile birlikte birçok araştırma grubu karmaşık nanolifli yapıları daha kontrollü ve etkili bir şekilde oluşturabilen ileri sistemler geliştirmişlerdir (Bhardwaj ve Kundu 2010).

Elektroğirme yöntemi, genellikle birbiri ile bağlantılı gözenekli sentetik biyopolimer malzemeler üretmek için kullanılır. Bu yöntemde rastgele yönlenmiş nanolifler, yüksek oranda yüzey alanını oluşturarak, hücre çoğalması ve kültür ortamının geçişi için uygun ortamı sağlarlar (Inanç vd. 2009).



Şekil 2.4 Elektroğirme düzeneğinin iki farklı biçimi (Bhardwaj ve Kundu 2010)

- a) Dikey elektroğirme düzeneği
b) Yatay elektroğirme düzeneği

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar

Bu çalışmada polimer membranların hazırlanmasında sıçan kuyruğundan izole edilen Tip-I kollajen, kitosan (Medium Molecular Weight/ 400.000-FLUKA, St. Louis, MO, ABD), alginik asitin sodyum tuzu (Sigma, St.Louis, MO, ABD) ve sığır boynu bağ dokusundan izole edilmiş elastin (Sigma, St.Louis, MO, ABD) kullanılmıştır.

Çapraz bağlayıcı olarak da EDC (1-Etil-3-(3-Dimetilaminopropil)karbodiimid. Hidroklorür), MES (2-(N-Morfolin)ethanesülfonik asit) ve NHS(N-Hidroksisüksinimid) (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, ABD) kullanılmıştır. Hücre canlılığı için MTT [3-(4,5-dimetildiyazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolyum bromür] Testi kitleri (Sigma, St.Louis, MO, ABD) kullanılmıştır.

Deney süresince hücreler Heraus marka (Hera Cell 240, Almanya) inkübatör içerisinde kültüre edilmiştir. Ayrıca laminer kabin Nuair (NU-425-400E, ABD), petriyer (Orange Scientific, Belçika), 24 kuyucuklu plakalar (Orange Scientific, Belçika), hücre kültür kapları (T-25 ve T-75, Corning, ABD) ve görüntüleme için Nikon (TS-100, Japonya) marka mikroskop kullanılmıştır. Polimer membranların hazırlanmasında ise laboratuvarımızda tasarlanan elektroegirme cihazı, güç kaynağı olarak DC high voltage power supply FC60PO2 (Glassman, ABD) ve spincoating için SSE (Almanya) marka cihazlar kullanılmıştır. Absorbans değerleri ise Biotrak II Plate reader (Amersham, İngiltere) ile belirlenmiştir.

3.2 Döner Kaplama Yöntemi ile Polimer Membranların Hazırlanması

3.2.1 Kollajen membran

Kollajen membranların hazırlanmasında çapraz bağlayıcı olarak EDC (1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid.Hidroklorür) kullanıldı. Çapraz bağlayıcının hazırlanmasında Pietrucha ve Marzec'in (2005) kullandığı yöntemden yararlandı.

%0,8'lik kollajen çözeltisi (sıçan kuyruğundan izole edilmiş Tip-I kollajen) teflon kalıp içerisine dökülerek döner kaplama cihazına yerleştirildi. 4 dakika 250-750 rpm arasında döndürme yapıldı. Cihazdan çıkarılan membran 24 saatlik kurumaya bırakıldı. Sonra 25 mL 50 mM MES (2-(N-Morfolin)etansülfonik asit) içerisinde 216 mg EDC ve 160 mg NHS (N-Hidroksisüksinimid) çözülerek pH 5.5'e ayarlandı. Hazırlanan çapraz bağlama çözeltisi, kollajenin üzerine dökülerek membranın her tarafının çapraz bağlayıcı ile teması sağlandı. Sonra çözelti membran üzerinden çekilip 3'er kez PBS (pH=7.4) ve distile su ile yıkama yapıldı. Kurutulan membran UV'de steril edilip kullanıma hazır halde saklandı.

3.2.2 Kitosan membran

Kitosan membran hazırlamak için önce %2'lik asetik asitte çözülmüş %1'lik kitosan çözeltisi hazırlandı. Teflon plaka üzerine dökülerek bu plaka döner kaplama cihazına yerleştirildi yine 4 dk'luk döndürme yapılarak plaka cihazdan alındı. 50°C'de kurutulup ardından 0,5 M NaOH ile 30 dk muamele edildi. Sonra 10 kez distile su ve 3 kezde etanolle yıkandı. UV ile steril edilip kullanıma hazır halde saklandı (Elçin vd. 1998).

3.2.3 Kitosan-kollajen membran

Daha önce hazırlanan %0,8'lik kollajen ve %1'lik kitosan çözeltileri 1:1(w/w) oranında karıştırılarak teflon plakaya döküldü. Döner kaplama cihazında 4 dakikalık döndürme yapıldı ve 24 saat boyunca kurumaya bırakıldı. Ardından çapraz bağlama çözeltisi (EDC-NHS-MES pH:5.5) ile çapraz bağlam işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra da PBS (pH=7.4) ve distile su ile yıkama yapıldı. Kurutulduktan sonra UV ile steril edilip kullanıma hazır hale getirildi.

3.2.4.Sodyum alginat membran

Sodyum alginatın %2'lik çözeltisi hazırlanarak teflon plakaya döküldü. Döner kaplama cihazında 4 dakikalık döndürme yapıldı ve ardından 24 saat boyunca kurutuldu. Kuruyan membran 0,1 M CaCl₂ ile muamele edildikten sonra PBS ve distile su ile

yıkılarak kurutuldu. Ardından UV’de steril edilip kullanılıncaya kadar saklandı (Elçin vd. 1998).

3.2.5 Elastin membran

Elastin membran hazırlanmasında da çapraz bağlayıcı olarak EDC çözeltisi kullanıldı (Daamen vd. 2005). Elastinin %1’lik çözeltisi hazırlanarak Teflon plakaya döküldü ve döner kaplama cihazında 4 dakikalık döndürme yapıldı. Cihazdan çıkarılan membran 24 saat kurutulduktan sonra çapraz bağlama çözeltisi (EDC-NHS-MES pH:5.5) membran üzerine dökülerek elastinin çapraz bağlanma işlemi gerçekleştirildi. Membran sırası ile PBS (pH=7.4) ve distile su ile yıkandı. UV ile steril edilip kullanıma hazır hale getirildi.

3.2.6 Elastin-kollajen membran

Elastin (%1) ve kollajen (%0,8) çözeltileri 1:1 (w/w) oranında karıştırılarak Teflon plaka içine döküldü. Döner kaplama cihazı ile 4 dakikalık döndürme işlemi uygulandıktan sonra membran 24 saat kurutuldu. Membran üzerine çapraz bağlama çözeltisi (EDC-NHS-MES pH:5.5) dökülerek çapraz bağlama işlemi gerçekleştirildi. Membran önce PBS (pH=7.4) sonra da distile su ile yıkandı. UV ile steril edilip kullanıma hazır hale getirildi.

3.2.7 PCL, PCL-C60 ve PCL-TDKNT membranlar

İlk olarak PCL, PCL-C60 ve PCL-TDKNT çözeltileri hazırlandı. Bunun için izlenen adımlar;

1. PCL çözeltisinin hazırlanışı

PCL’un, DCM:THF:DMF çözücü sistemi içerisindeki %8’lik çözeltisi hazırlandı.

2. PCL-C60(Fulleren) çözeltisinin hazırlanışı

DCM:THF:DMF çözücü sistemine C60 karıştırılarak iyice doymun hale getirildi. Sonra PCL bu çözücü sistem ile çözerek %8’lik çözelti hazırlandı.

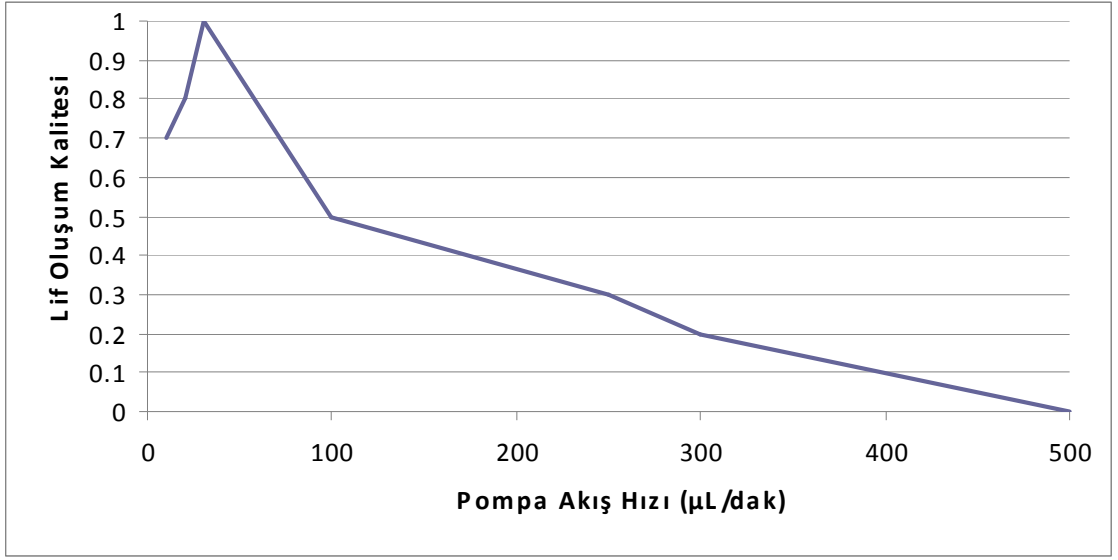
3. PCL-TDKNT çözeltilisinin hazırlanışı

Bu çözelti de C60'lı çözeltinin hazırlanmasına benzer şekilde hazırlandı. DCM:THF:DMF çözücü sistemi TDKNT ile iyice doygun hale getirilip ardından PCL bu çözücü sistemle çözülerek %8'lik çözelti elde edilmiş oldu.

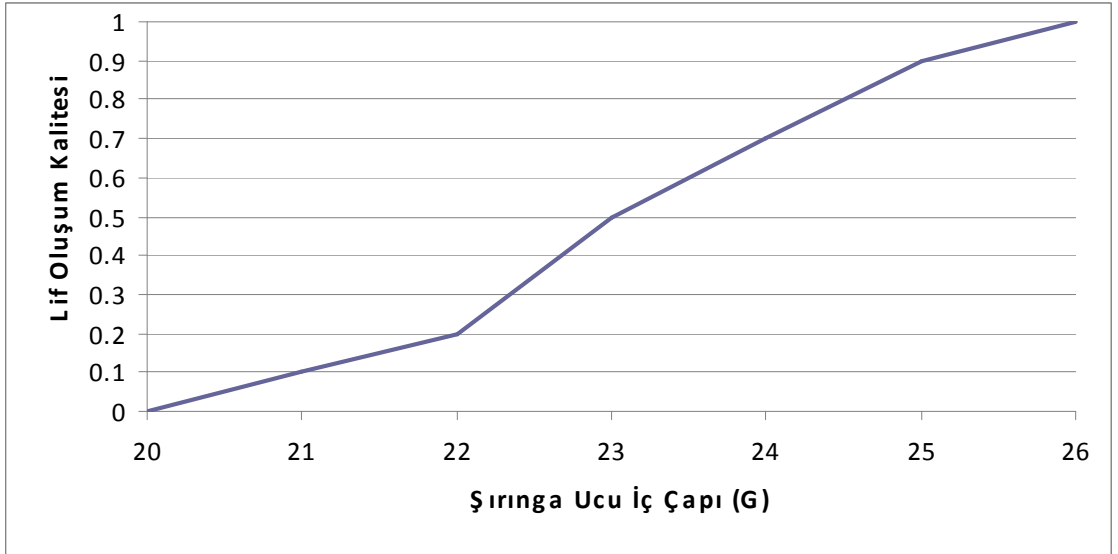
Hazırlanan 3 ayrı polimer çözeltisi 3 ayrı teflon plaka içerisine döküldü. Hazırlanan plakalar döner kaplama cihazına yerleştirilerek 4'er dakikalık döndürme işlemi uygulandı. Cihazdan çıkarılan plaka içerisindeki homojen membranlar, plakadan çıkarılıp çözücüsünün uçması için 5 dakika kurumaya bırakıldı. Bu şekilde hazırlanan 3 ayrı polimer PCL, PCL-C60 ve PCL-TDKNT distile su ile yıkanıp, UV'de steril edilerek kullanıma hazır hale getirildi.

3.3 Elektroğirme Yöntemi ile Polimer Membranların Hazırlanması

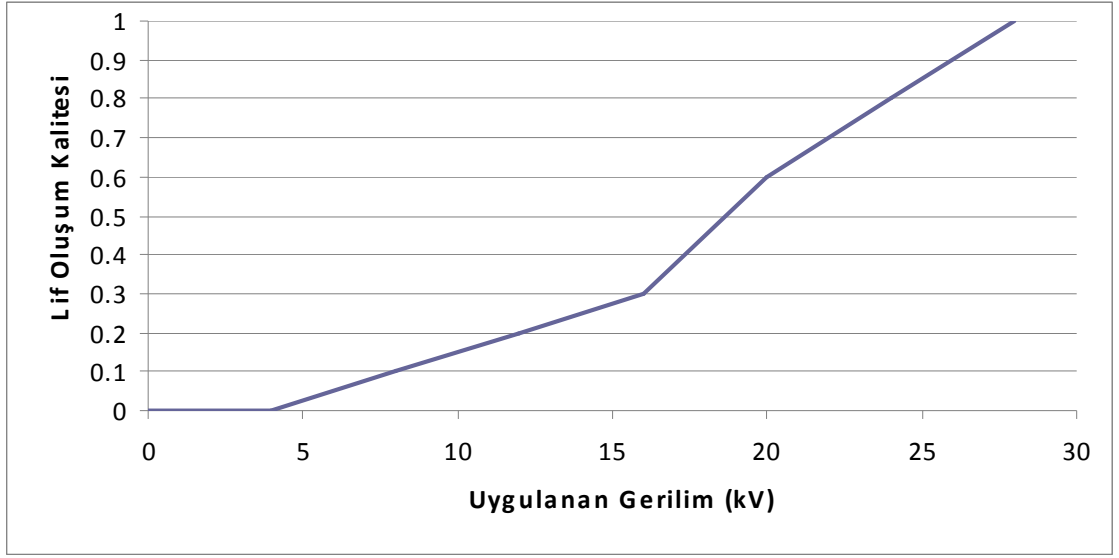
PCL, PCL-C60 ve PCL-TDKNT çözeltileri döner kaplama sistemi için hazırlandığı biçimde PCL oranı %8 olacak şekilde hazırlandı. Elektroğirme işlemi ile kaplama yapmadan önce deneysel olarak optimal değerler bulundu. İlk olarak PCL çözeltisi elektroğirme cihazına yerleştirilir ve pompa akış hızı 0,002 mL/dak olarak belirlendi (Şekil 3.1). Çözeltinin basıldığı şırınganın ucunun iç çapı 26 G olacak şekilde kütleştirildi (Şekil 3.2). Güç kaynağı 28 kV ayarlandı (Şekil 3.3) ve elektroğirme işlemine başlandı. Cihazın iç kısmındaki lif toplama alanına alüminyum plaka konuldu. Onun üzerine de coverslip (poli-L-Lizin kaplı yuvarlak plaka) yerleştirildi. Coverslip yüzeyi istenilen şekilde kaplandıktan sonra membranlar yüzeyden kaldırılıp UV'de steril edilip ve kullanıma hazır halde saklandı. PCL ile yapılan bu işlem PCL-C60 ve PCL-TDKNT kompozitleri ile de tekrarlandı.



Şekil 3.1 Lif oluşum kalitesinin pompa akış hızı ile değişimi (0→1 parçacıklı yapıdan tam lif yapısına doğru oluşum)



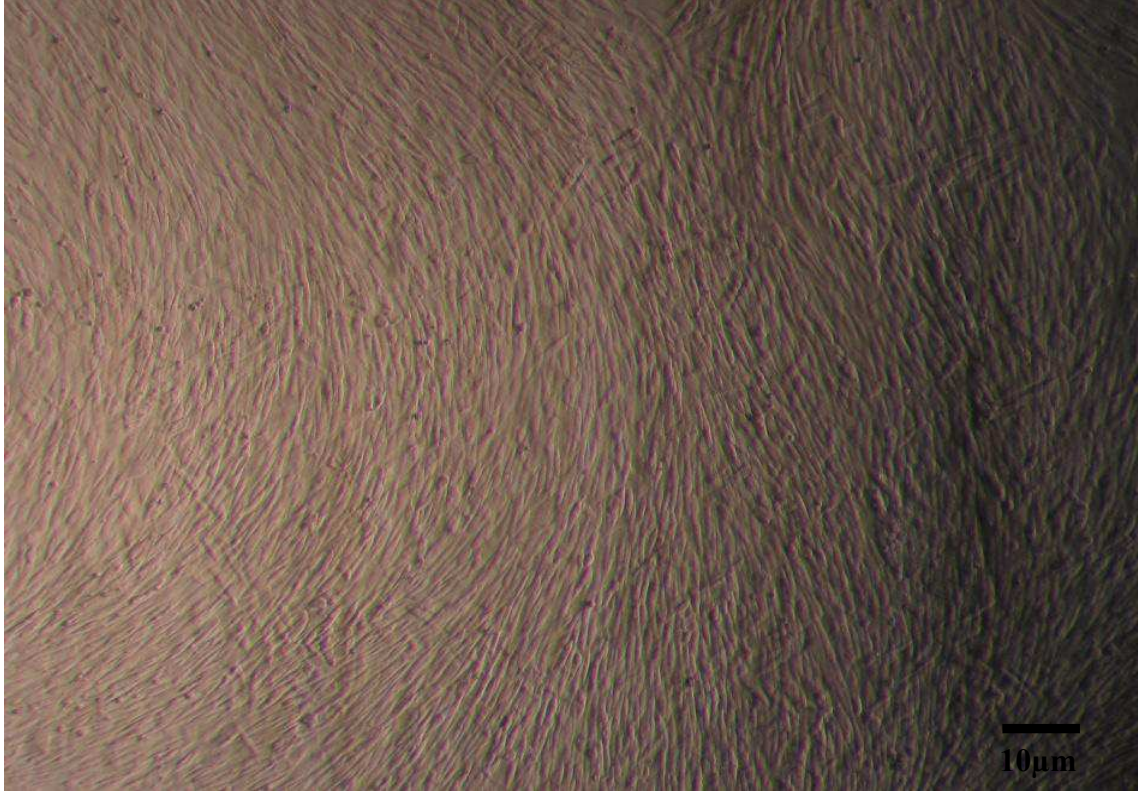
Şekil 3.2 Lif oluşum kalitesinin şırınga ucu iç çapı ile değişimi (0→1 parçacıklı yapıdan tam lif yapısına doğru oluşum)



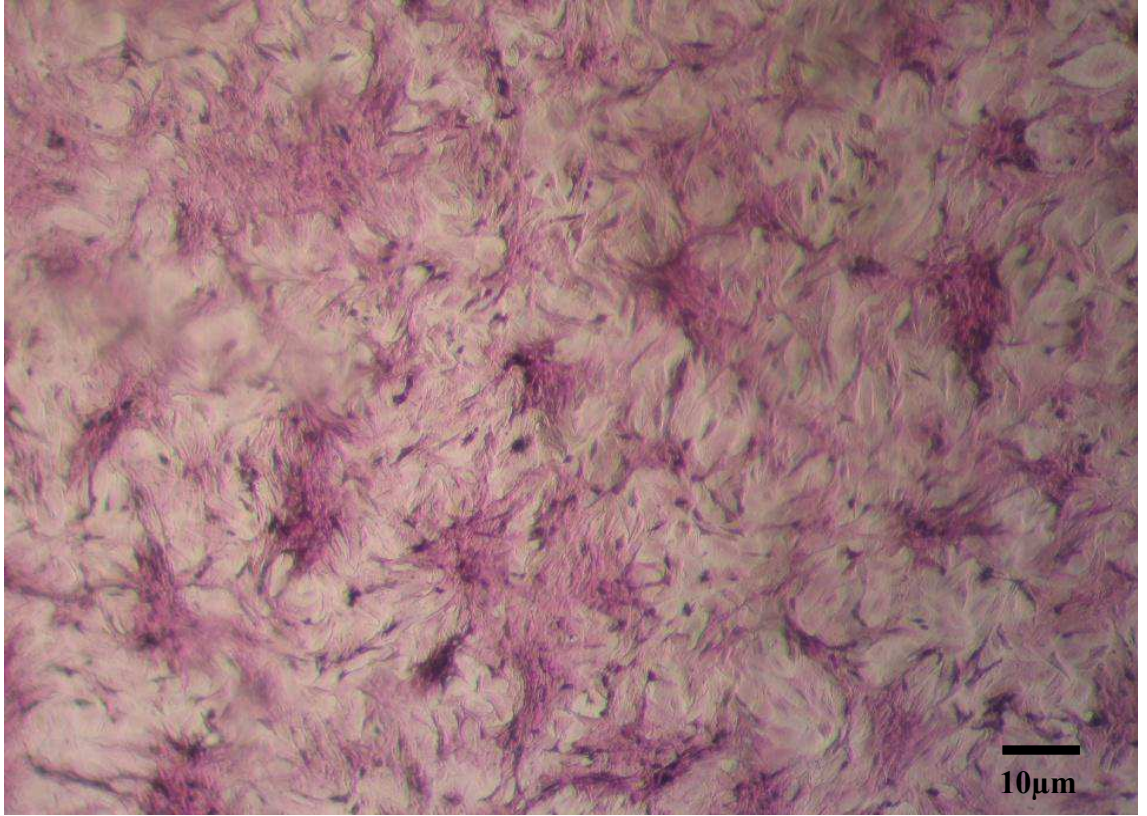
Şekil 3.3 Lif oluşum kalitesinin uygulanan gerilime göre değişimi (0→1 parçacıklı yapıdan tam lif yapısına doğru oluşum)

3.4 Hücre Karakterizasyonu

Laboratuvarımızda izole ettiğimiz neonatal (1 günlük) sıçan siyatik sinir hücreleri %10 fetal sığır serumu, 2 mM L-glutamin, %1 ITS, %1 esansiyel olmayan amino asitler içeren α -MEM içine alınıp kültüre edildi. Kültüre edilen hücrelerin karakterizasyonu hematoksilin-eozin (H&E) hücre boyama yöntemi ile boyanarak belirlendi. 24 kuyucuklu plaka içerisine yerleştirilen önceden hazırlanmış polimer membranlar üzerine hücre ekimi gerçekleştirildi. 24 kuyucuklu plaka %90 nem, %5 CO₂ ve 37°C şartlarındaki inkübatör içinde 2-3 günde bir vasatı değiştirilerek kültüre edildi. Hücre-membran yapılarının 1, 7, 14 ve 21. günlerdeki takiplerine göre polimerlerle hücrelerin etkileşimi ve hücre canlılığı faz kontrast mikroskobu ve MTT [3-(4,5-dimetildiyazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolyum bromür] testi sonuçlarına göre değerlendirildi.



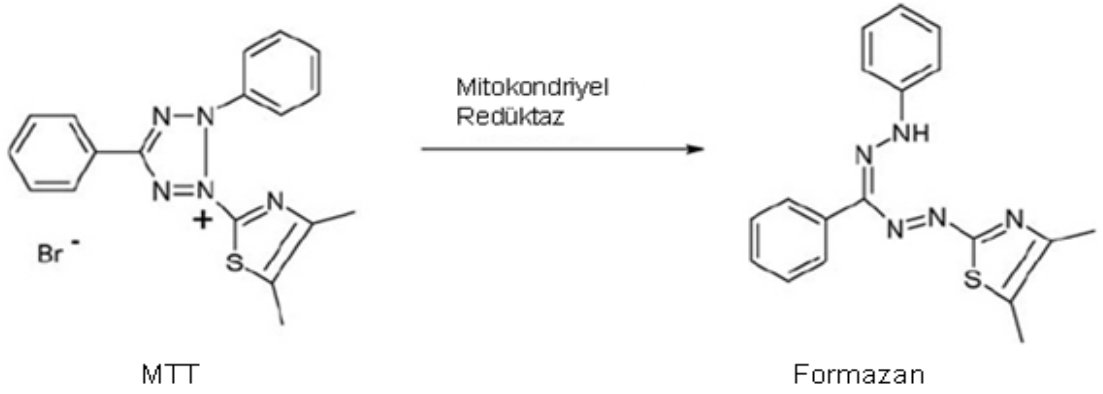
Şekil 3.4 Siyatik sinir hücre kültürünün görüntüsü



Şekil 3.5 Siyatik sinir hücrelerinin H&E boyama sonrası ışık mikroskobu görüntüsü

3.5 MTT [3-(4,5-dimetildiyazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolyum bromür] Testi

MTT testi, hücrelerin hayatta kalması ve çoğalmalarını, mitokondriyel aktivitelerinin kalorimetrik olarak ölçülmesi ile takip edilebilir hale getiren bir yöntemdir. İlk olarak Mosmann tarafından bulunmuş, Denizot ve Lang tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntem, hücredeki solunum zinciri ve diğer elektron taşıma sistemlerinden çıkan elektronların, ortama konulan MTT ya da diğer tetrazolyum tuzlarını indirgemesi ve suda çözünmeyen mor rekli formazan kristalleri oluşturması esasına dayanır. Böylece hücrelerin canlılığı ve çoğalmaları takip edilebilir (Freimoser vd. 1999).



Şekil 3.6 MTT testi ile formazan kristallerinin oluşumu

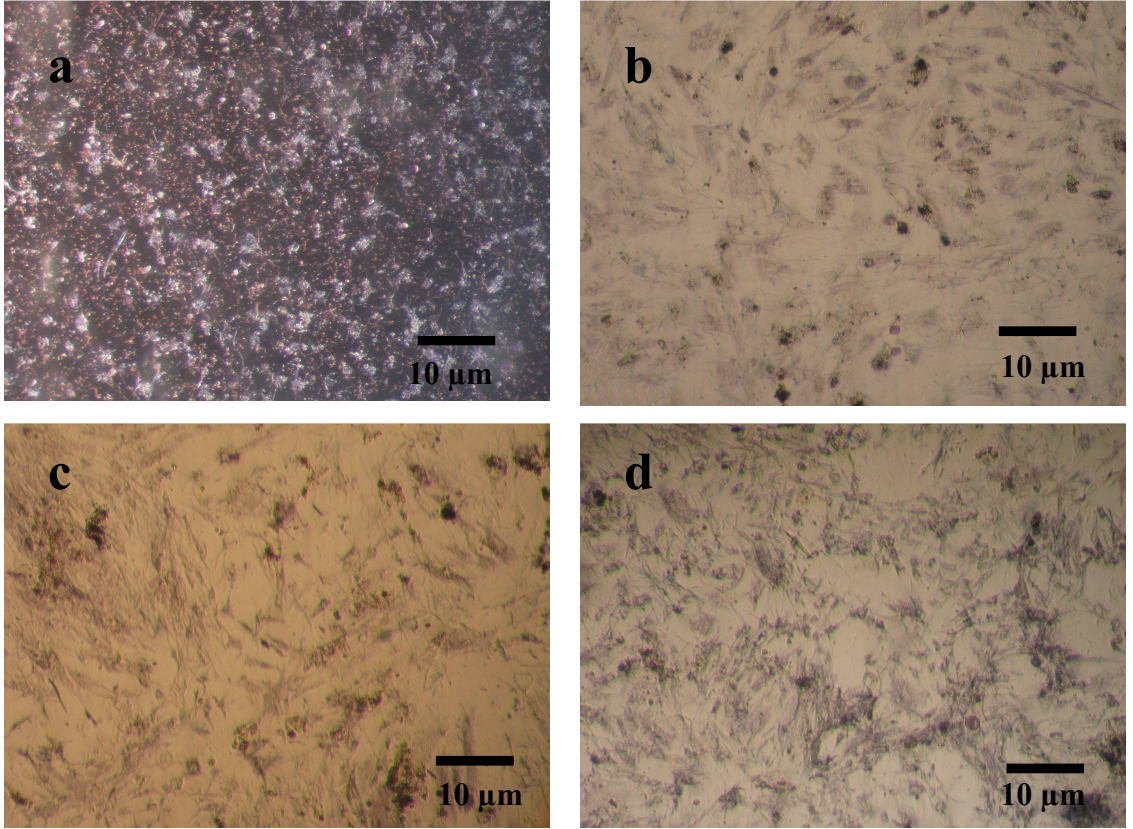
MTT testi, farklı polimer membranlar ile kültüre edilmiş siyatik sinir hücrelerinin 1, 7, 14 ve 21. günlerdeki hücre aktivitelerinin ölçülmesi için uygulandı. 24 kuyucuklu plakalarda bulunan hücre-polimer örneklerinin üzerine herbir örnek için 150 µL MTT çözeltisi eklenip 4 saat boyunca inkübatörde bekletildi. Daha sonra hücrelerin üzerinde oluşan formazan kristallerinin faz kontrast mikroskobu ile görüntülerine bakıldı. Absorbans değerlerinin ölçülebilmesi için örnekler üzerine 300 µL MTT çözücüsü eklendi. Bu çözücü ile oluşturulan formazan kristalleri 30 dk boyunca beklenerek çözüldü ve örnekler üzerinden çözelti alınarak UV spektrometreye yerleştirildi. 570 nm'de örnekler üzerinde oluşan formazan kristallerinin absorbans değerlerine bakıldı. Uygulama sonunda örnek sonuçlarının ortalama değerleri alınarak günler içindeki değişimi grafiğe geçirildi.

4. DENEY BULGULARI

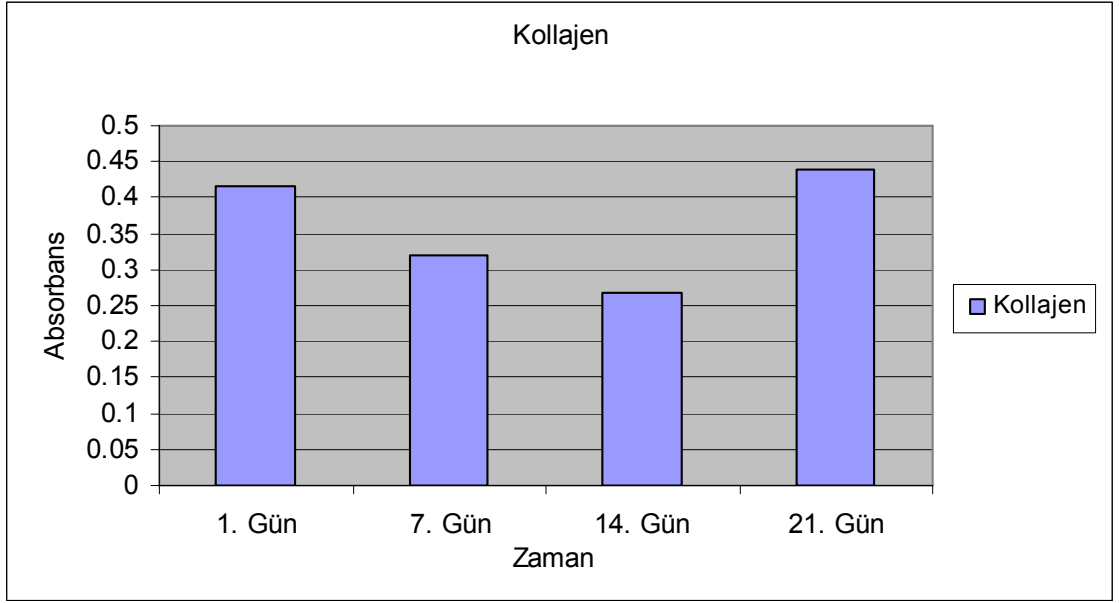
4.1 MTT Sonuçları ve Görüntüleri

4.1.1 Kollajen membran

Kollajen membran üzerinde 1, 7, 14 ve 21. günlerdeki MTT testi sonrası oluşan formazan kristallerinin faz kontrast görüntülerine bakılarak membran yüzeyinde formazan kristallerinin gruplar oluşturarak genellikle homojen dağılım gösterdiği gözlemlenmiştir. Kristallerin en yoğun olduğu günler statik kültürün başı ve sonu olan 1. ve 21. günlerdir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Statik olarak yürütülen neonatal siyatik sinir hücre kültürünün kollajen polimer membran üzerindeki a. 1, b. 7, c. 14 ve d. 21. günlerde yapılan MTT testi sonucu oluşan formazan kristallerinin görüntüsü



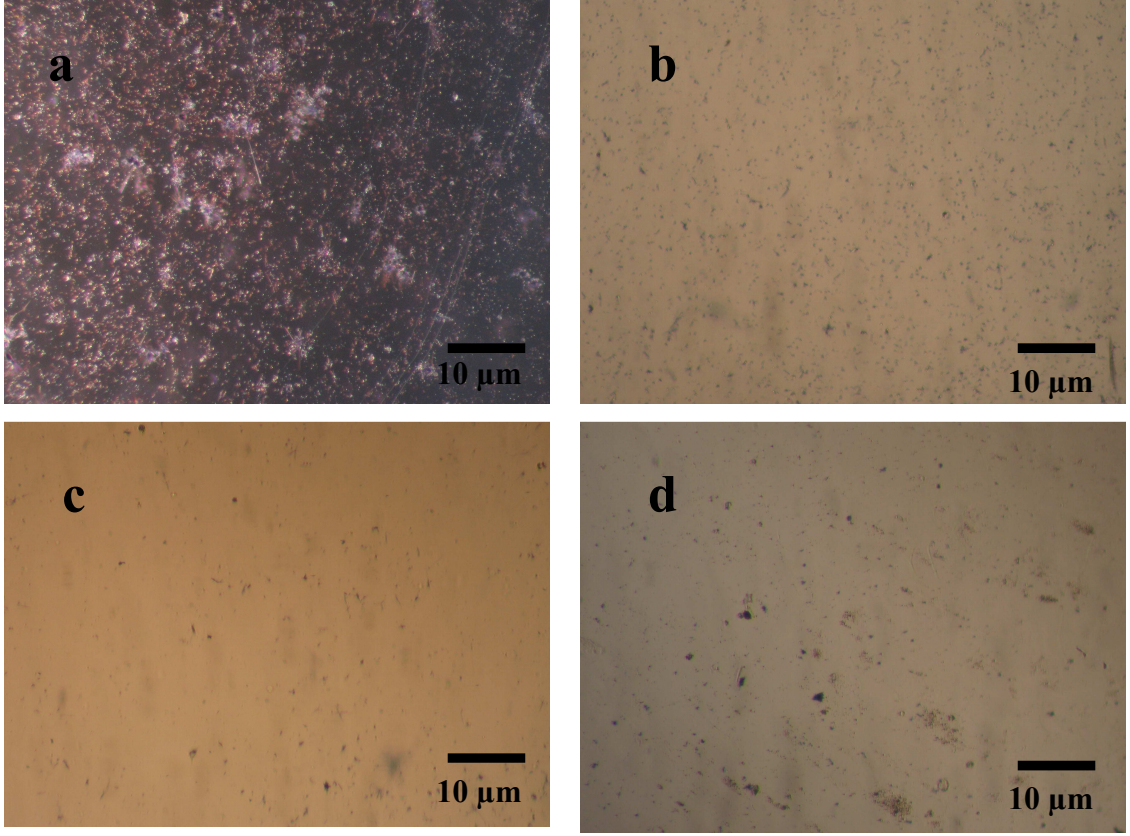
Şekil 4.2 Kollajen membran statik hücre kültürünün MTT testi sonucu 570nm’de absorbans ölçümlerinin değişimi

Kollajen membran üzerinde MTT testi sonucu oluşan formazan kristalleri çözülerek UV spektrometrede 570nm’de absorbans değerleri ölçülmüştür. Ölçülen değerlere göre neonatal siyatik sinir hücrelerinin mitokondriyel aktiviteleri ilk güne göre 7. ve 14. günlerde giderek azalmıştır. 21. günde ise azalma tersine dönmüş ve en yüksek aktivite değerine ulaşmıştır (Şekil 4.2).

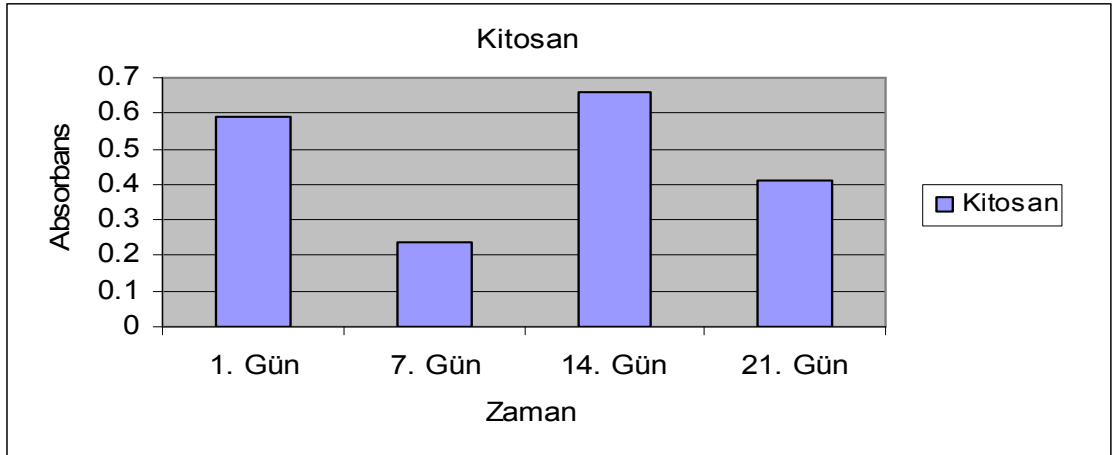
4.1.2 Kitosan membran

Kitosan membran üzerinde 1, 7, 14 ve 21. günlerdeki MTT testi sonrası oluşan formazan kristallerinin görüntülerine bakılarak membran yüzeyinde, formazan kristallerinin nokta nokta dağınık halde buldukları görülmektedir (Şekil 4.3).

Kitosan membran üzerinde MTT testi sonucu oluşan formazan kristalleri çözülerek UV spektrometrede 570 nm’de absorbans değerleri ölçülmüştür. Ölçülen değerlere göre neonatal siyatik sinir hücrelerinin mitokondriyel aktiviteleri 14. gün en yüksek değerindedir (Şekil 4.4).



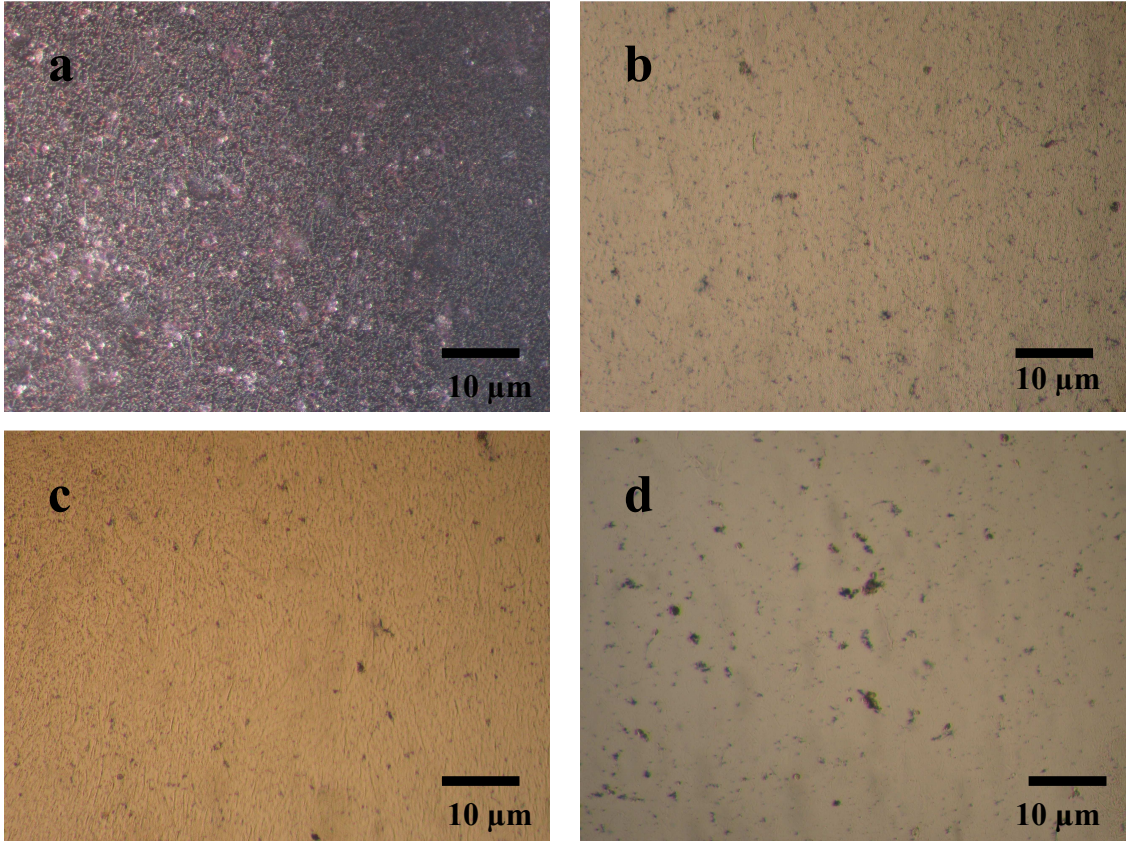
Şekil 4.3 Statik olarak yürütülen neonatal siyatik sinir hücre kültürünün kitosan polimer membran üzerindeki a. 1, b. 7, c. 14 ve d. 21. günlerde yapılan MTT testi sonucu oluşan formazan kristallerinin görüntüsü



Şekil 4.4 Kitosan membran statik hücre kültürünün MTT testi sonucu 570 nm'de absorbans ölçümlerinin değişimi

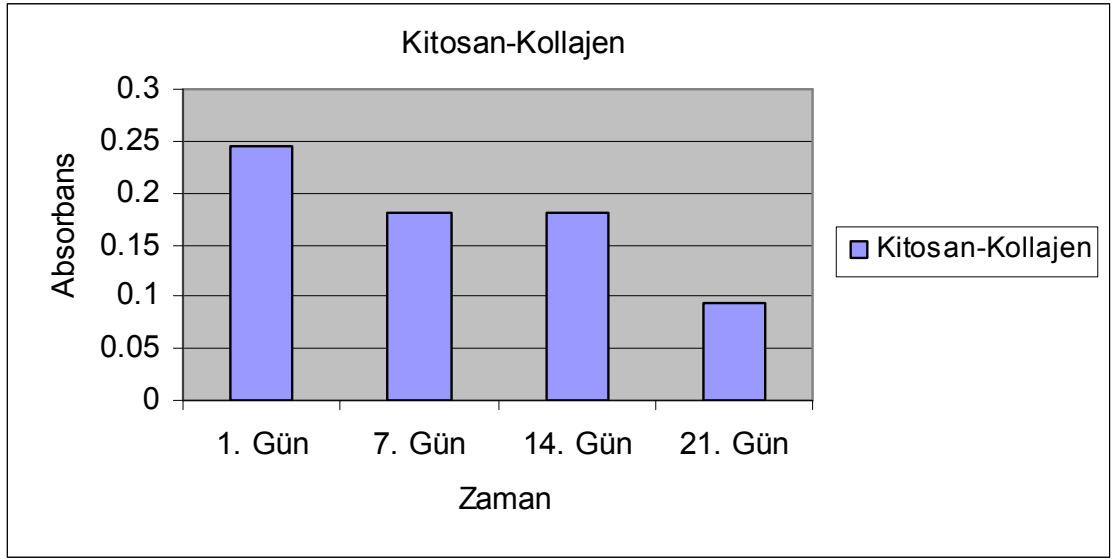
4.1.3 Kitosan-kollajen membran

Kitosan-kollajen membran üzerinde MTT testi sonrası oluşan formazan kristallerinin 1, 7, 14 ve 21. günlerdeki görüntülerine bakılarak formazan kristallerinin bazı bölgelerde gruplar halinde bazı bölgelerde ise dağınık olarak dağılım gösterdiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 Statik olarak yürütülen neonatal siyatik sinir hücre kültürünün kitosan-kollajen polimer membran üzerindeki a. 1, b. 7, c. 14 ve d. 21. günlerde yapılan MTT testi sonucu oluşan formazan kristallerinin görüntüsü

Kitosan-kollajen membran üzerinde MTT testi sonucu oluşan formazan kristalleri çözülerek UV spektrometrede 570 nm'de absorbans değerleri ölçülmüştür. Ölçülen değerlere göre neonatal siyatik sinir hücrelerinin mitokondriyel aktiviteleri ilk gün en yüksek olmak üzere, ilk güne göre 7. ve 14. günlerde azalmış, 21. günde ise en düşük değerine ulaşmıştır (Şekil 4.6).

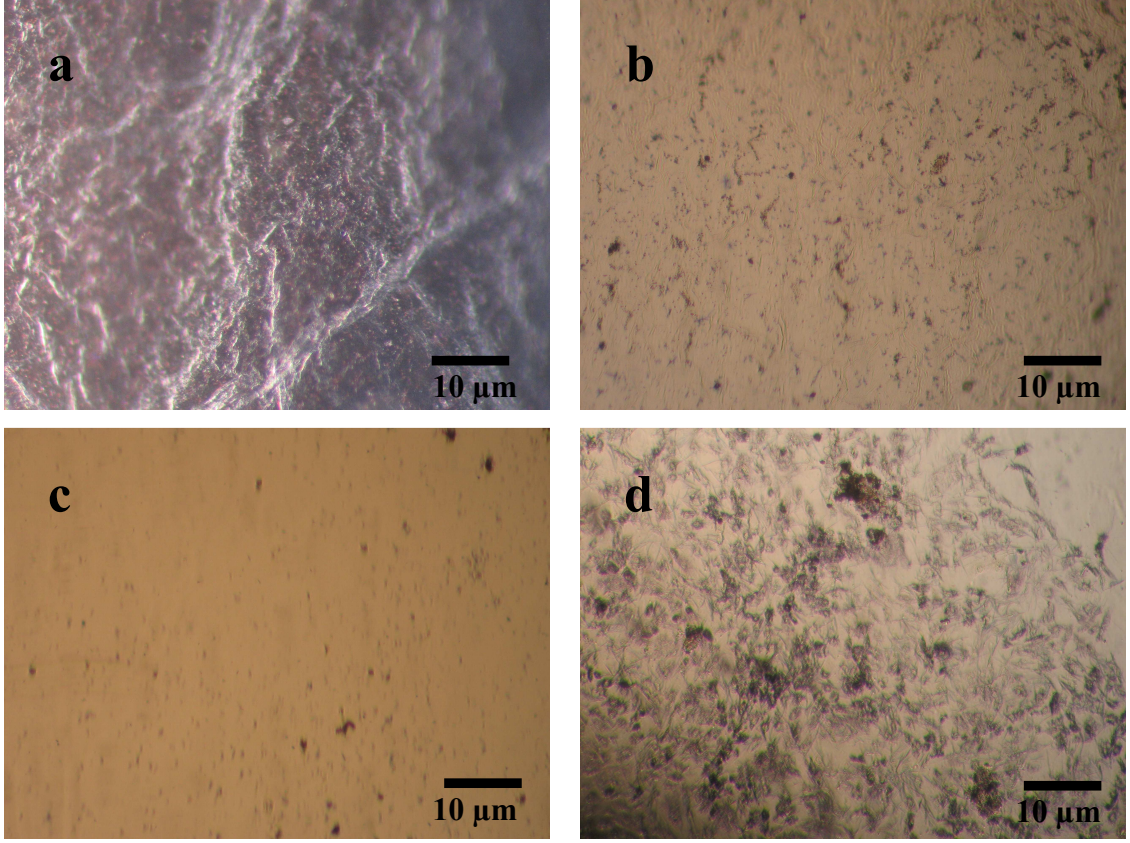


Şekil 4.6 Kitosan-kollajen membran statik hücre kültürünün MTT testi sonucu 570 nm’de absorbans ölçümlerinin değişimi

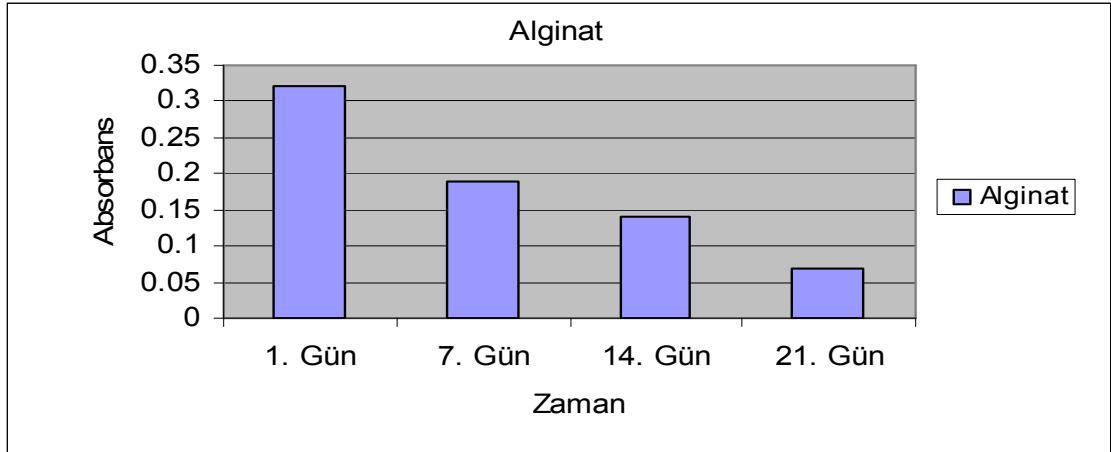
4.1.4 Sodyum alginat membran

Alginat membran üzerinde 1, 7, 14 ve 21. günlerdeki MTT testi sonrası oluşan formazan kristallerinin görüntülerine bakılarak membran yüzeyinde formazan kristallerinin deney günleri boyunca farklı dağılımlar gösterdiği söylenebilir (Şekil 4.7).

Alginat membran üzerinde MTT testi sonucu oluşan formazan kristalleri çözülerek UV spektrometrede 570nm’de absorbans değerleri ölçülmüştür. Ölçülen değerlere göre neonatal siyatik sinir hücrelerinin mitokondriyel aktiviteleri ilk gün en yüksek olmak üzere giderek azalmıştır. 21. günde ise en düşük seviyesine inmiştir (Şekil 4.8).



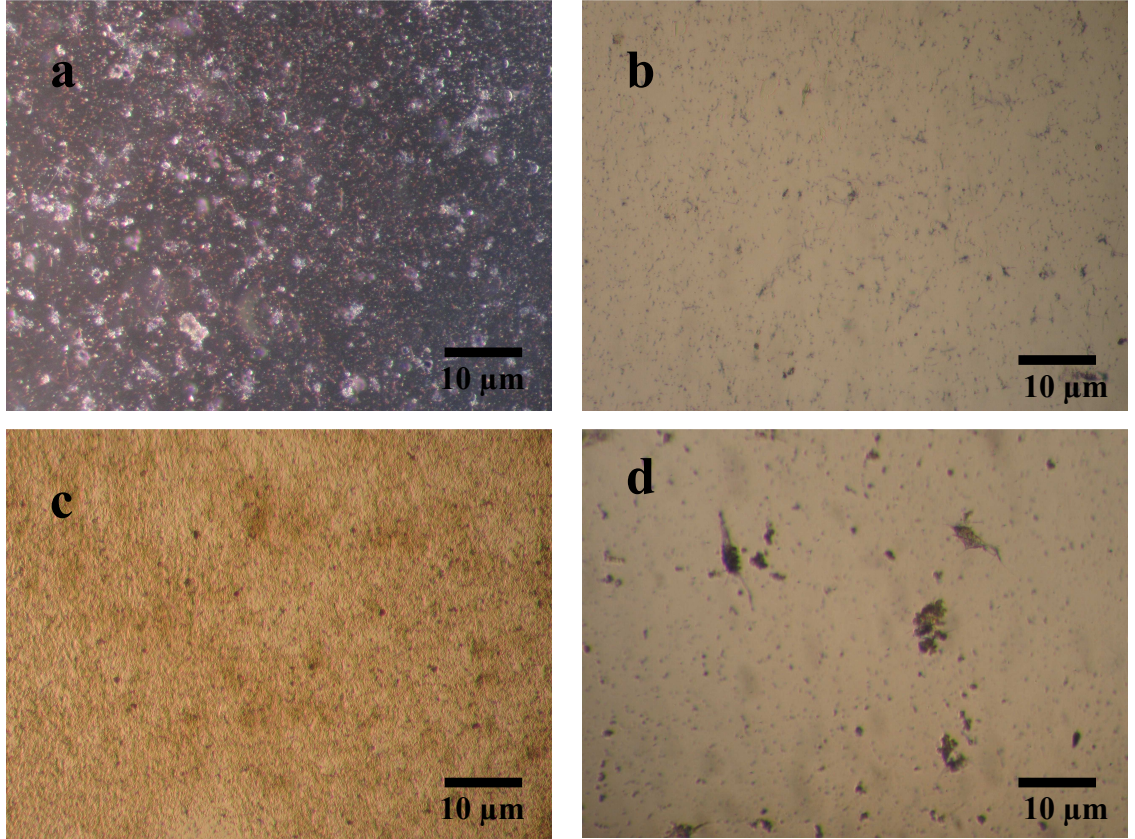
Şekil 4.7 Statik olarak yürütülen neonatal siyatik sinir hücre kültürünün alginat polimer membran üzerindeki a. 1, b. 7, c. 14 ve d. 21. günlerde yapılan MTT testi sonucu oluşan formazan kristallerinin görüntüsü



Şekil 4.8 Alginat membran statik hücre kültürünün MTT testi sonucu 570 nm'de absorbans ölçümlerinin değişimi

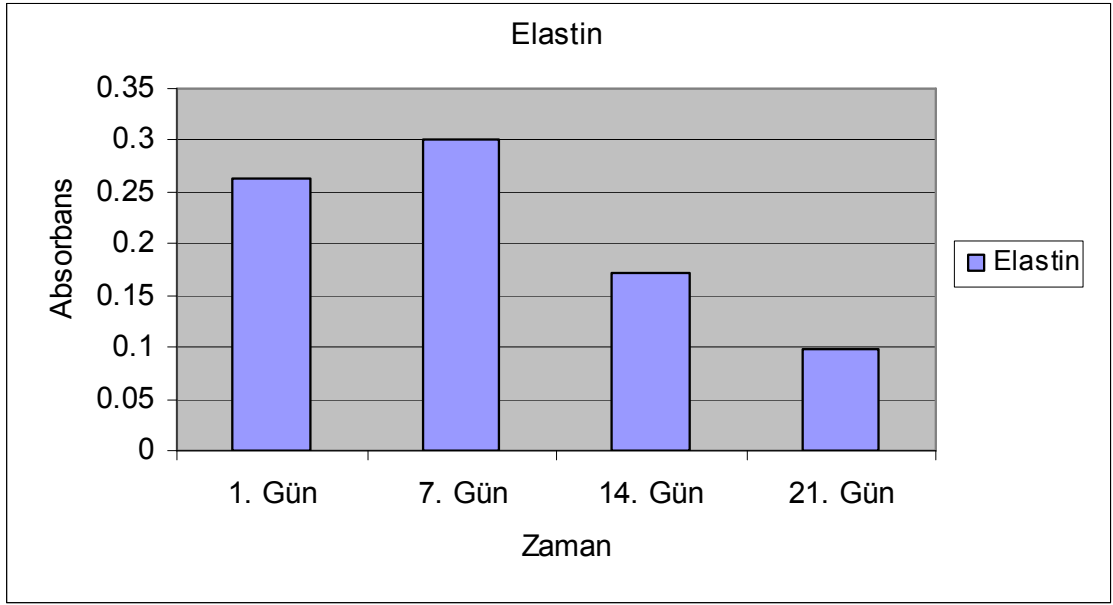
4.1.5 Elastin membran

Elastin membran üzerinde 1, 7, 14 ve 21. günlerdeki MTT testi sonrası oluşan formazan kristallerinin görüntülerine bakılarak membran yüzeyinde formazan kristallerinin dağınık olarak dağılım gösterdiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9 Statik olarak yürütülen neonatal siyatik sinir hücre kültürünün Elastin polimer membran üzerindeki a. 1, b. 7, c. 14 ve d. 21. günlerde yapılan MTT testi sonucu oluşan formazan kristallerinin görüntüsü

Elastin membran üzerinde MTT testi sonucu oluşan formazan kristalleri çözülerek UV spektrometrede 570 nm’de absorbans değerleri ölçülmüştür. Ölçülen değerlere göre neonatal siyatik sinir hücrelerinin mitokondriyel aktiviteleri 7. gün en yüksek olmak üzere zamanla azalmıştır (Şekil 4.10).

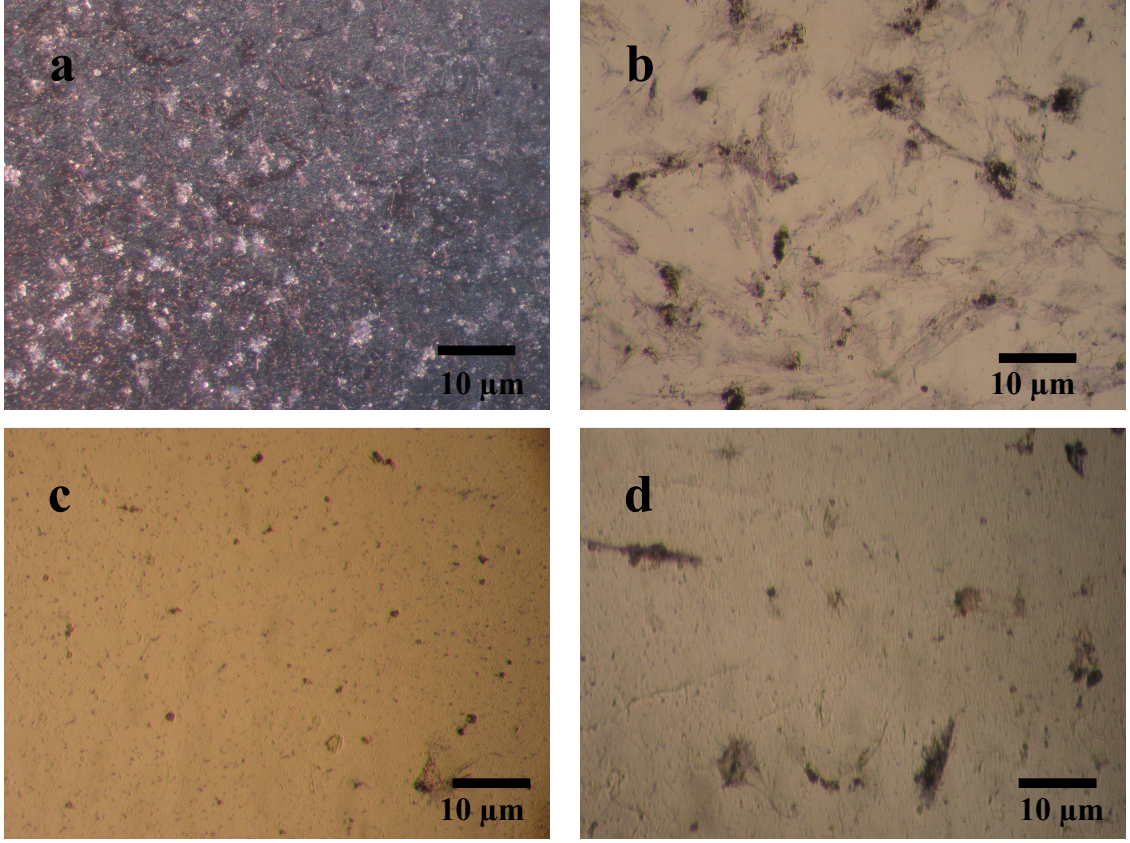


Şekil 4.10 Elastin membran statik hücre kültürünün MTT testi sonucu 570nm’de absorbans ölçümlerinin değişimi

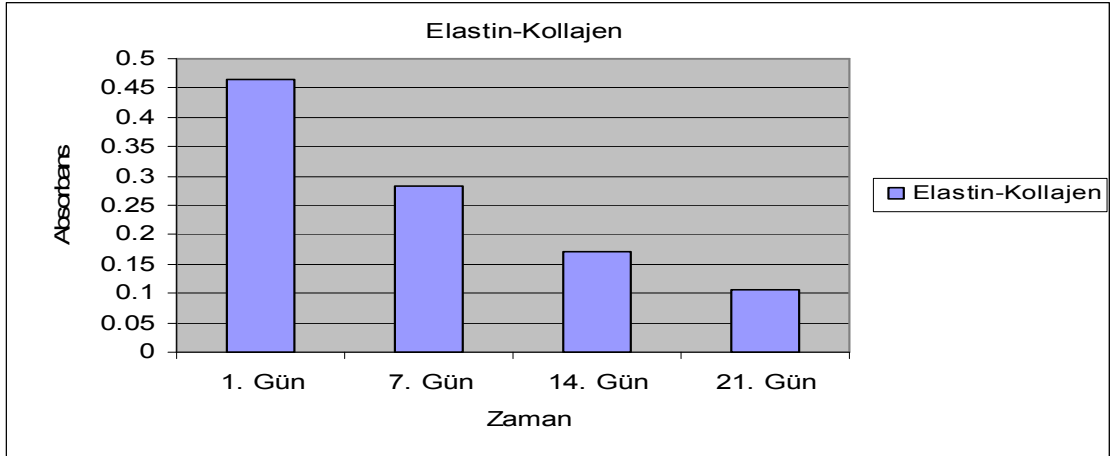
4.1.6 Elastin-kollajen membran

Elastin-kollajen membran üzerinde 1, 7, 14 ve 21. günlerdeki MTT testi sonrası oluşan formazan kristallerinin görüntülerine bakılarak membran yüzeyinde formazan kristallerinin bazı yerlerde gruplar oluşturarak bazı yerlerde dağınık şekilde dağılım gösterdiği gözlemlenmiştir. Kristallerin en yoğun olduğu günler statik kültürün başı olan 1. gündür. Daha sonra gittikçe dağınık yerleşmiş kristal yapılar oluşmuştur (Şekil 4.11).

Elastin-kollajen membran üzerinde MTT testi sonucu oluşan formazan kristalleri çözülerek UV spektrometrede 570 nm’de absorbans değerleri ölçülmüştür. Ölçülen değerlere göre neonatal sıyatik sinir hücrelerinin mitokondriyel aktiviteleri ilk gün en yüksek olmak üzere kültür süresi boyunca giderek azalmış, 21. günde ise en düşük değerine ulaşmıştır (Şekil 4.12).



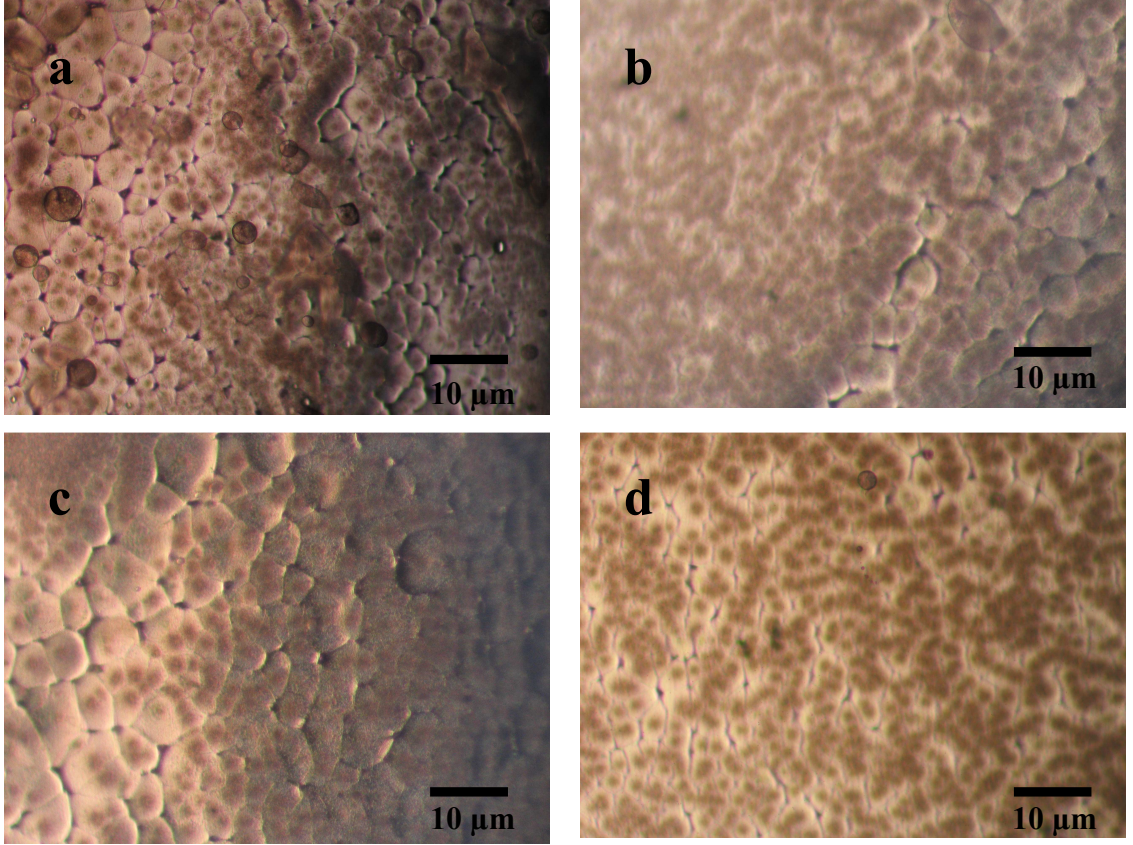
Şekil 4.11 Statik olarak yürütülen neonatal siyatik sinir hücre kültürünün elastin-kollajen polimer membran üzerindeki a. 1, b. 7, c. 14 ve d. 21. günlerde yapılan MTT testi sonucu oluşan formazan kristallerinin görüntüsü



Şekil 4.12 Elastin-kollajen membran statik hücre kültürünün MTT testi sonucu 570 nm'de absorbans ölçümlerinin değişimi

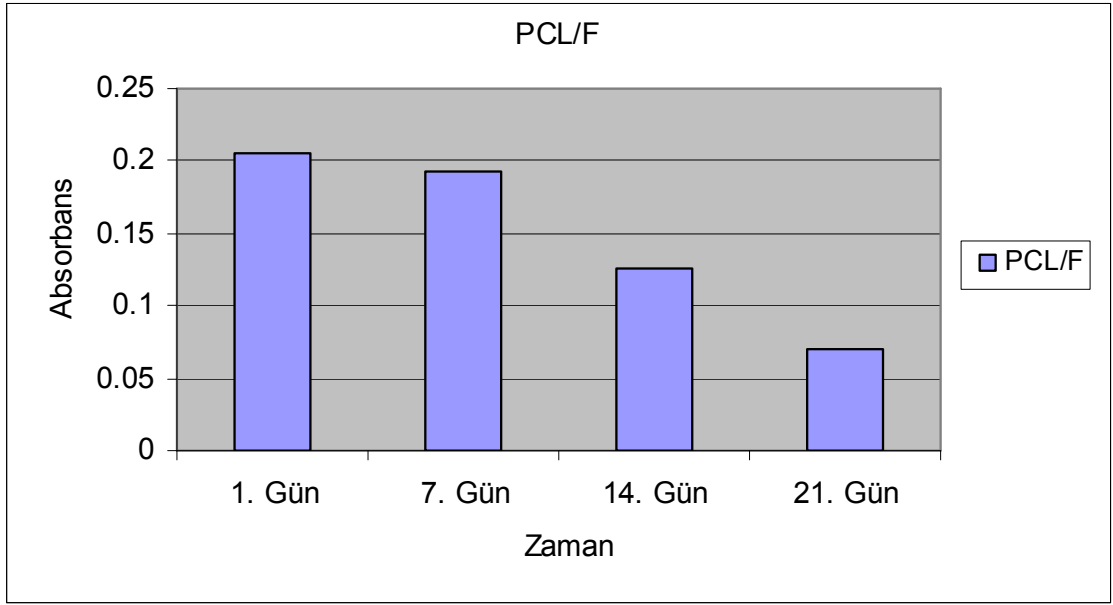
4.1.7 PCL membran

PCL membran üzerinin öbek öbek dairesel yapılardan oluştuğu, 1, 7, 14 ve 21. günlerdeki MTT testi sonrası oluşan formazan kristallerinin de bu yapıların iç kısımlarında ve yapıların aralarında oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13 Statik olarak yürütülen neonatal siyatik sinir hücre kültürünün PCL polimer membran üzerindeki a. 1, b. 7, c. 14 ve d. 21. günlerde yapılan MTT testi sonucu oluşan formazan kristallerinin görüntüsü

PCL membran üzerinde MTT testi sonucu oluşan formazan kristalleri çözülerek UV spektrometrede 570 nm'de absorpsiyon değerleri ölçülmüştür. Ölçülen değerlere göre neonatal siyatik sinir hücrelerinin mitokondriyel aktiviteleri zamanla giderek daha da azalmıştır (Şekil 4.14).

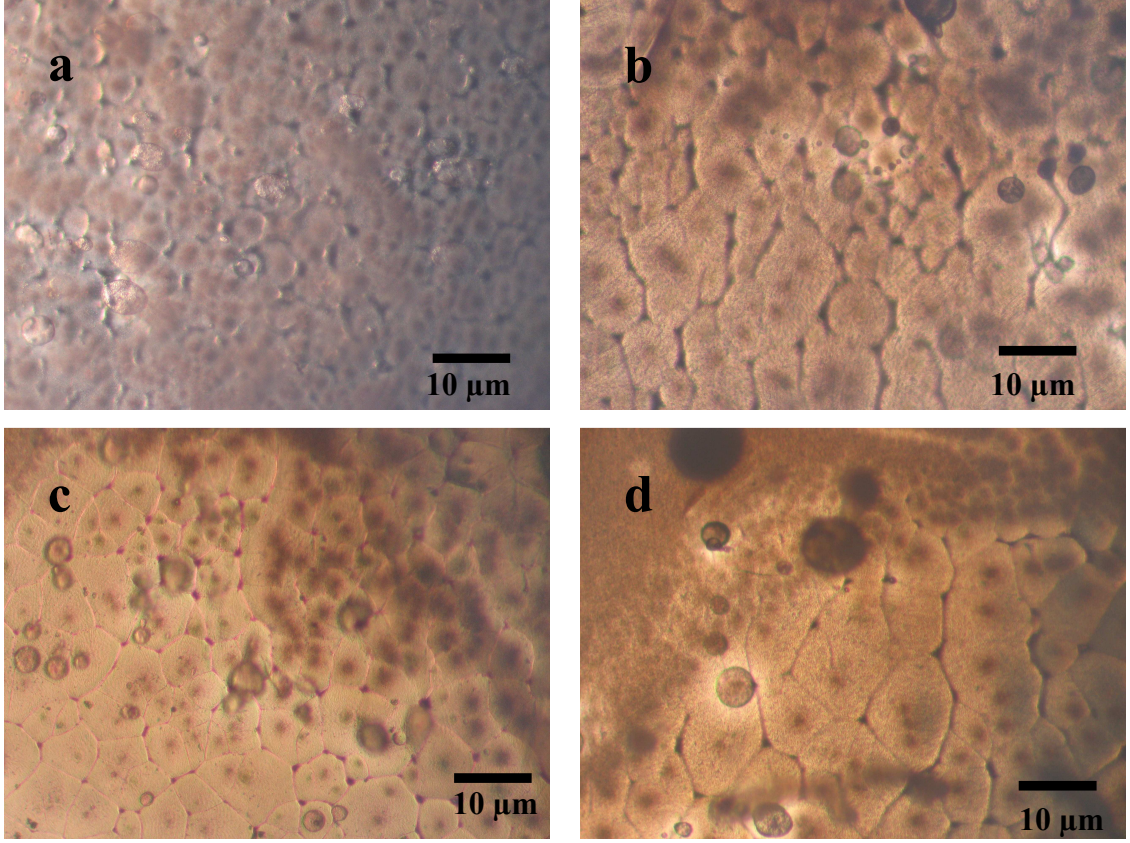


Şekil 4.14 PCL membran statik hücre kültürünün MTT testi sonucu 570 nm’de absorbans ölçümlerinin değişimi

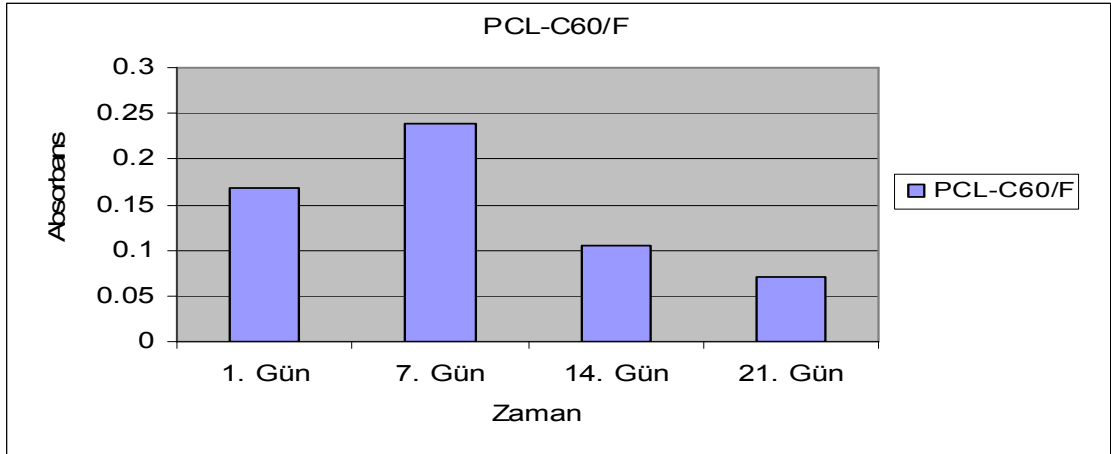
4.1.8 PCL-C60 membran

PCL-C60 membran üzerinin de öbek öbek dairesel yapılardan oluştuğu, 1, 7, 14 ve 21. günlerdeki MTT testi sonrası oluşan formazan kristallerinin de yine bu yapıların iç kısımlarında ve yapıların aralarında çok az miktarda oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 4.15).

PCL-C60 membran üzerinde MTT testi sonucu oluşan formazan kristalleri çözülerek UV spektrometrede 570 nm’de absorbans değerleri ölçülmüştür. Ölçülen değerlere göre neonatal siyatik sinir hücrelerinin 7. gün mitokondriyel aktiviteleri 1. güne göre artmış ve diğer günler giderek azalan bir grafik izlemiştir (Şekil 4.16).



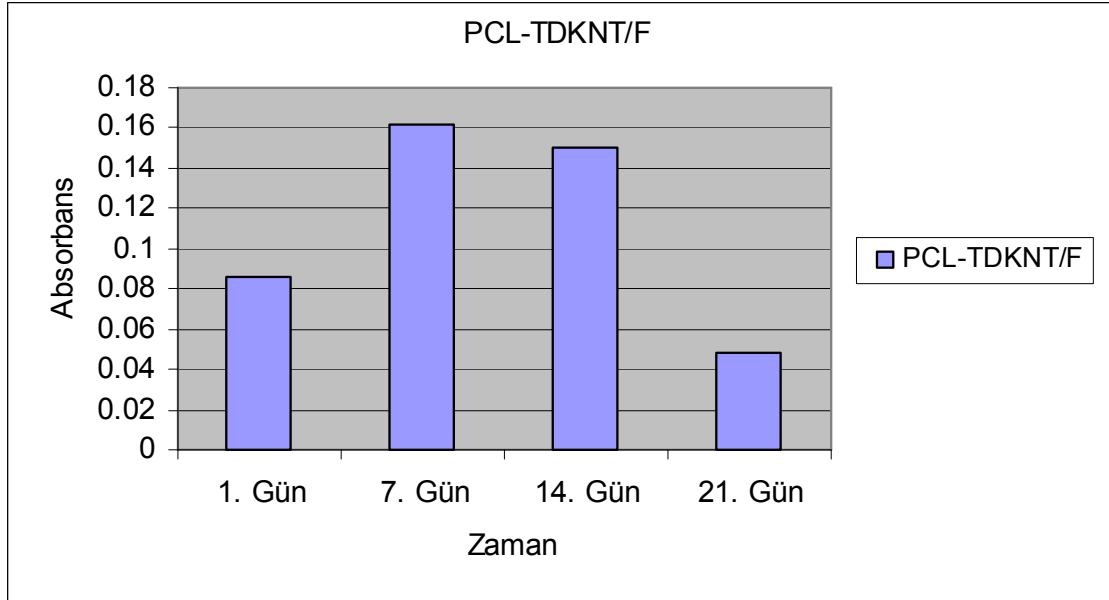
Şekil 4.15 Statik olarak yürütülen neonatal siyatik sinir hücre kültürünün PCL-C60 polimer membran üzerindeki a. 1, b. 7, c. 14 ve d. 21. günlerde yapılan MTT testi sonucu oluşan formazan kristallerinin görüntüsü



Şekil 4.16 PCL-C60 membran statik hücre kültürünün MTT testi sonucu 570 nm'de absorbans ölçümlerinin değişimi

4.1.9 PCL-TDKNT membran

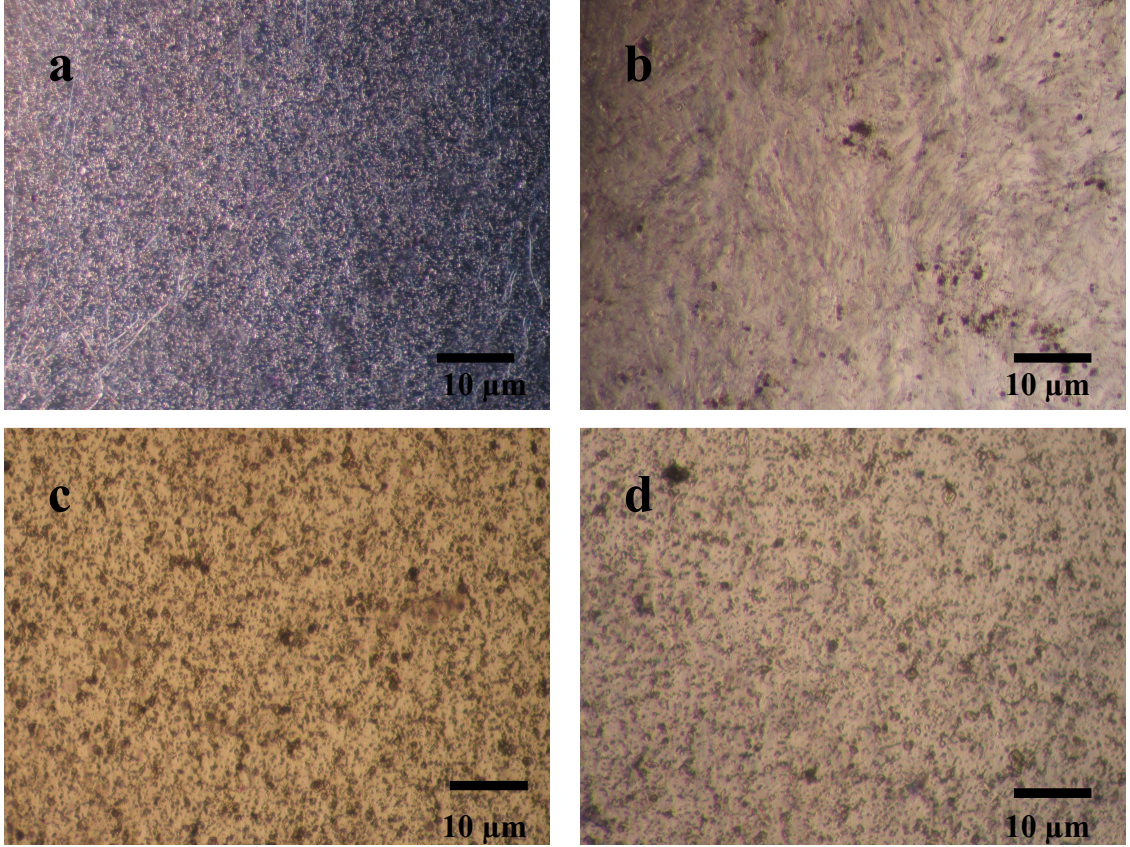
PCL-TDKNT membran yapısının 1, 7, 14 ve 21. günlerdeki mikroskop incelemeleri ve fotoğraflamaları yapılmasına rağmen kayda değer hiçbir görüntü elde edilememiştir. Bunun için yalnızca MTT Testi sonucu oluşan formazan kristalleri çözülerek UV spektrometrede 570 nm’de absorbens ölçümlerine bakılmıştır. Bu ölçüm değerlerine göre neonatal siyatik sinir hücrelerinin mitokondriyel aktiviteleri 7. gün en yüksek değerde olmak üzere 7 ve 14. günler 1. güne oranla yaklaşık iki katı artmış 21. gün ise 1. günün yaklaşık yarısı kadar düşüş göstermiştir (Şekil 4.17).



Şekil 4.17 PCL-TDKNT membran statik hücre kültürünün MTT testi sonucu 570 nm’de absorbens ölçümlerinin değişimi

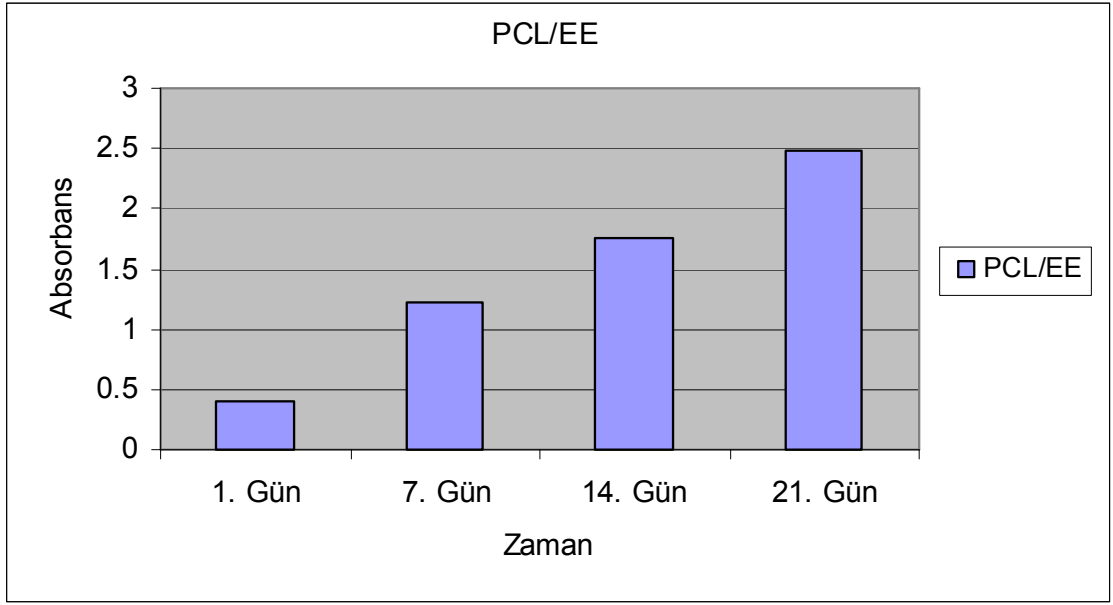
4.1.10 Elektroğirme yöntemi ile hazırlanan PCL membran

Elektroğirme yöntemi kullanılarak hazırlanmış PCL membranlar üzerinde MTT testi sonrası oluşan formazan kristallerinin 1, 7, 14 ve 21. günlerdeki görüntülerine bakılarak lifsi yapıya uygun olarak dağılım gösterdiği gözlemlenmiştir. Buradaki lifler boyunca sık bir şekilde formazan kristalleri oluşmuştur (Şekil 4.18).



Şekil 4.18 Statik olarak yürütülen neonatal siyatik sinir hücre kültürünün Elektroeğirme yöntemi ile hazırlanan PCL polimer membran üzerindeki a. 1, b. 7, c. 14 ve d. 21. günlerde yapılan MTT testi sonucu oluşan formazan kristallerinin görüntüsü

PCL/EE membran üzerinde MTT testi sonucu oluşan formazan kristalleri çözülerek UV spektrometrede 570 nm’de absorbans değerleri ölçülmüştür. Ölçülen değerlere göre neonatal siyatik sinir hücrelerinin mitokondriyel aktiviteleri düzenli bir artış göstermiştir. En yüksek değer ise 21. günde ölçülmüştür (Şekil 4.19).

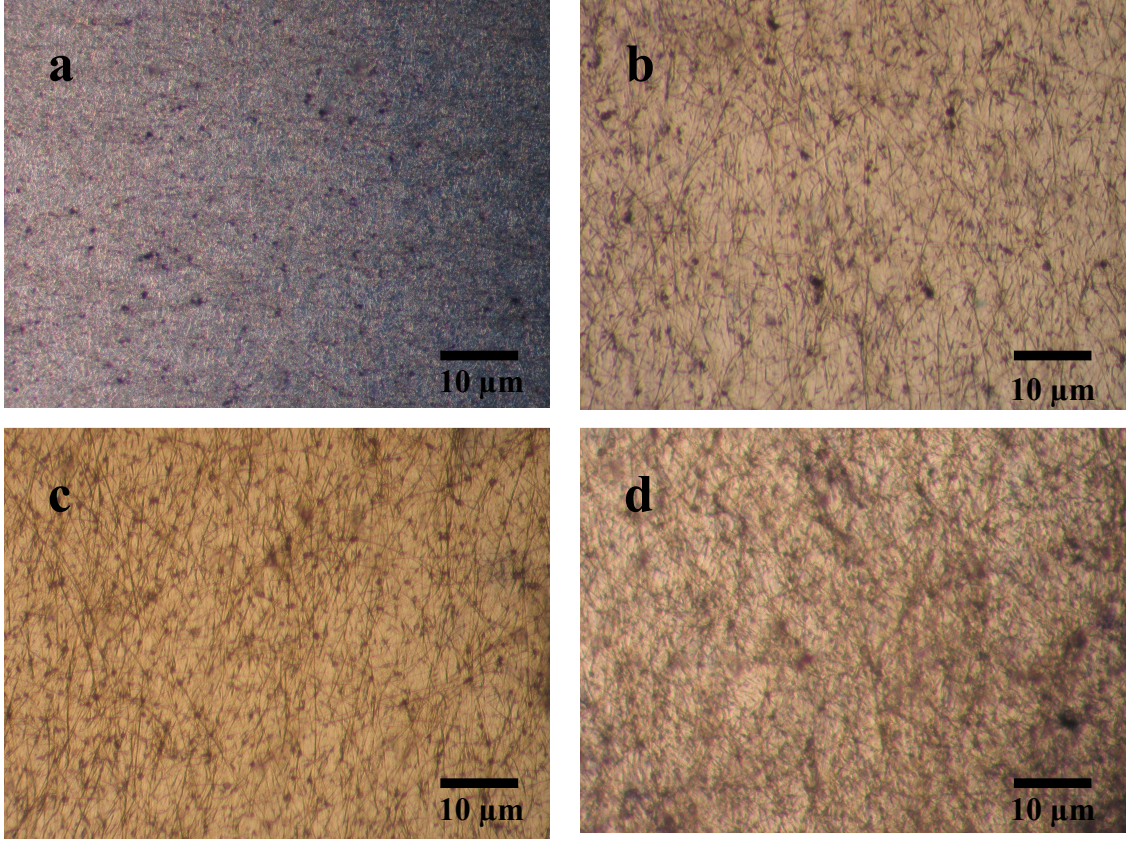


Şekil 4.19 PCL/EE membran statik hücre kültürünün MTT testi sonucu 570 nm’de absorbans ölçümlerinin değişimi

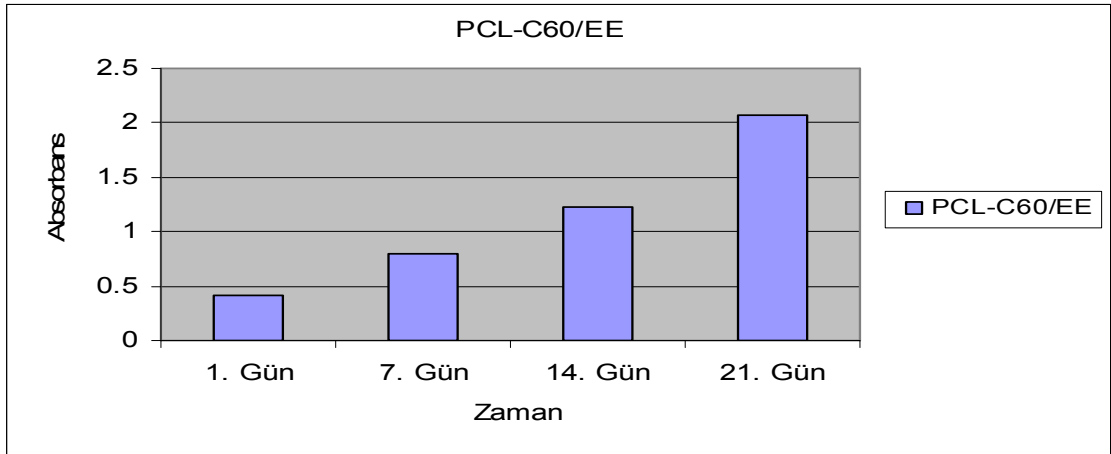
4.1.11 Elektroçirime yöntemi ile hazırlanan PCL-C60 membran

Yine Elektroçirime yöntemi kullanılarak hazırlanmış PCL-C60 membranlar üzerinde MTT testi sonrası oluşan formazan kristallerinin 1, 7, 14 ve 21. günlerdeki görüntülerine bakıldığında da hücrelerin lifsi yapıya uygun olarak dağılım gösterdiği gözlemlenmiştir. Burada da liflerin yönlenme doğrultularında, sıklıkla formazan kristallerinin oluştuğu görülmektedir (Şekil 4.20).

PCL-C60/EE membran üzerinde MTT testi sonucu oluşan formazan kristalleri çözülerek UV spektrometrede 570 nm’de absorbans değerleri ölçülmüştür. Ölçülen değerlere göre neonatal siyatik sinir hücrelerinin mitokondriyel aktiviteleri düzenli bir artış göstermiştir. En yüksek değer ise 21. günde ölçülmüştür (Şekil 4.21).



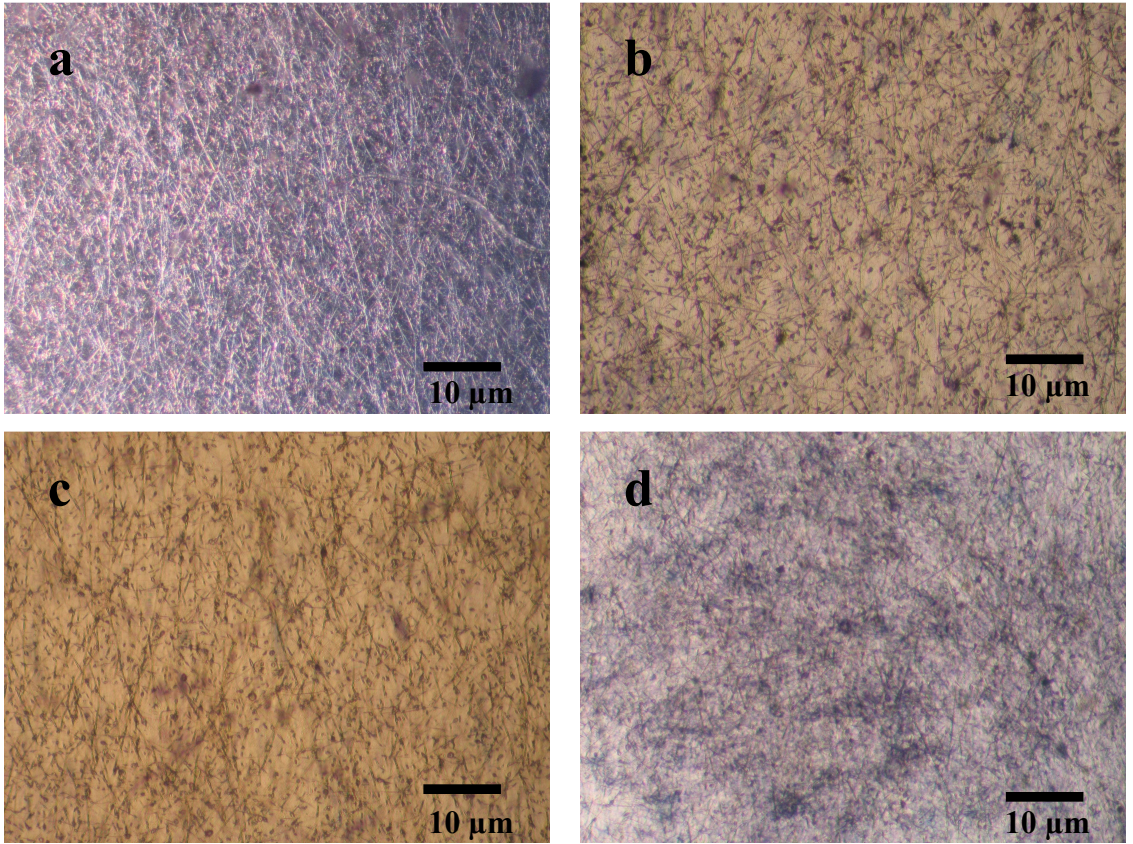
Şekil 4.20 Statik olarak yürütülen neonatal siyatik sinir hücre kültürünün Elektroğirme yöntemi ile hazırlanan PCL-C60 polimer membran üzerindeki a. 1, b. 7, c. 14 ve d. 21. günlerde yapılan MTT testi sonucu oluşan formazan kristallerinin görüntüsü



Şekil 4.21 PCL-C60/ES membran statik hücre kültürünün MTT testi sonucu 570 nm'de absorbans ölçümlerinin değişimi

4.1.12 Elektroğirme yöntemi ile hazırlanmış PCL-TDKNT membran

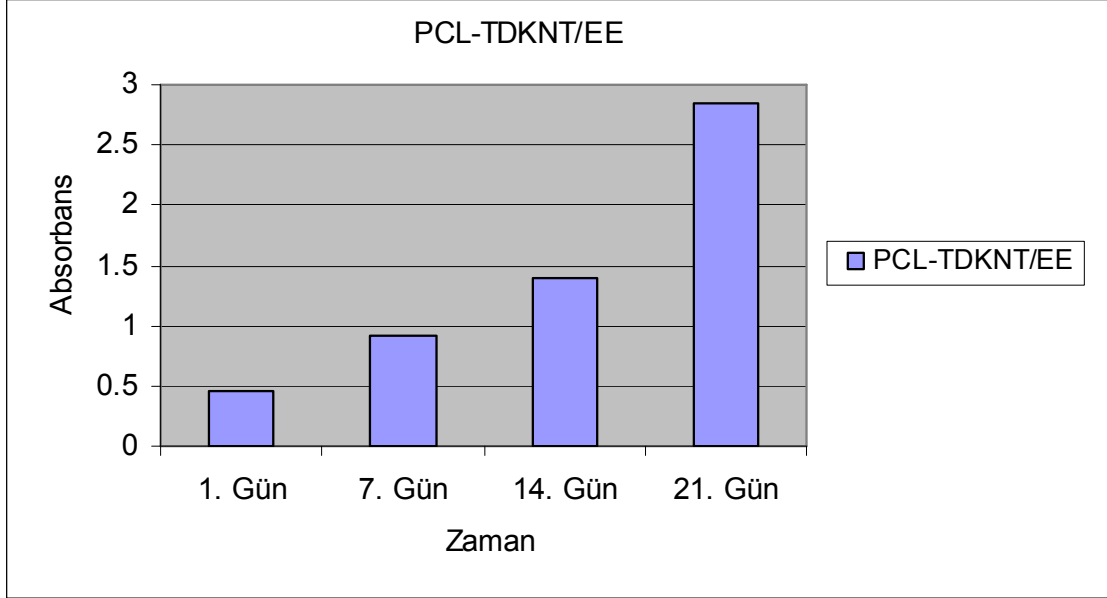
Elektroğirme yöntemi kullanılarak hazırlanan 3. membran olan PCL-TDKNT üzerinde MTT testi sonrası oluşan formazan kristallerinin 1, 7, 14 ve 21. günlerdeki görüntülerine bakıldığında ise yine hücrelerin dağılımının lifsi yapının yönlendiği doğrultuda olduğu gözlemlenmiştir. Burada da liflerin etrafında sıklıkla formazan kristallerinin oluştuğu görülmektedir (Şekil 4.22).



Şekil 4.22 Statik olarak yürütölen neonatal siyatik sinir hücre kültürünün Elektroğirme yöntemi ile hazırlanan PCL-TDKNT polimer membran üzerindeki a. 1, b. 7, c. 14 ve d. 21. günlerde yapılan MTT testi sonucu oluşan formazan kristallerinin görüntüsü

PCL-TDKNT/EE membran üzerinde MTT testi sonucu oluşan formazan kristalleri çözölerek UV spektrometrede 570 nm'de absorbans değerleri ölçölmüştür. Ölçölen değerlere göre neonatal siyatik sinir hücrelerinin mitokondriyel aktiviteleri gittikçe daha

fazla artış göstermiştir. En yüksek değer ise bu polimer içinde 21. günde ölçülmüştür (Şekil 4.23).

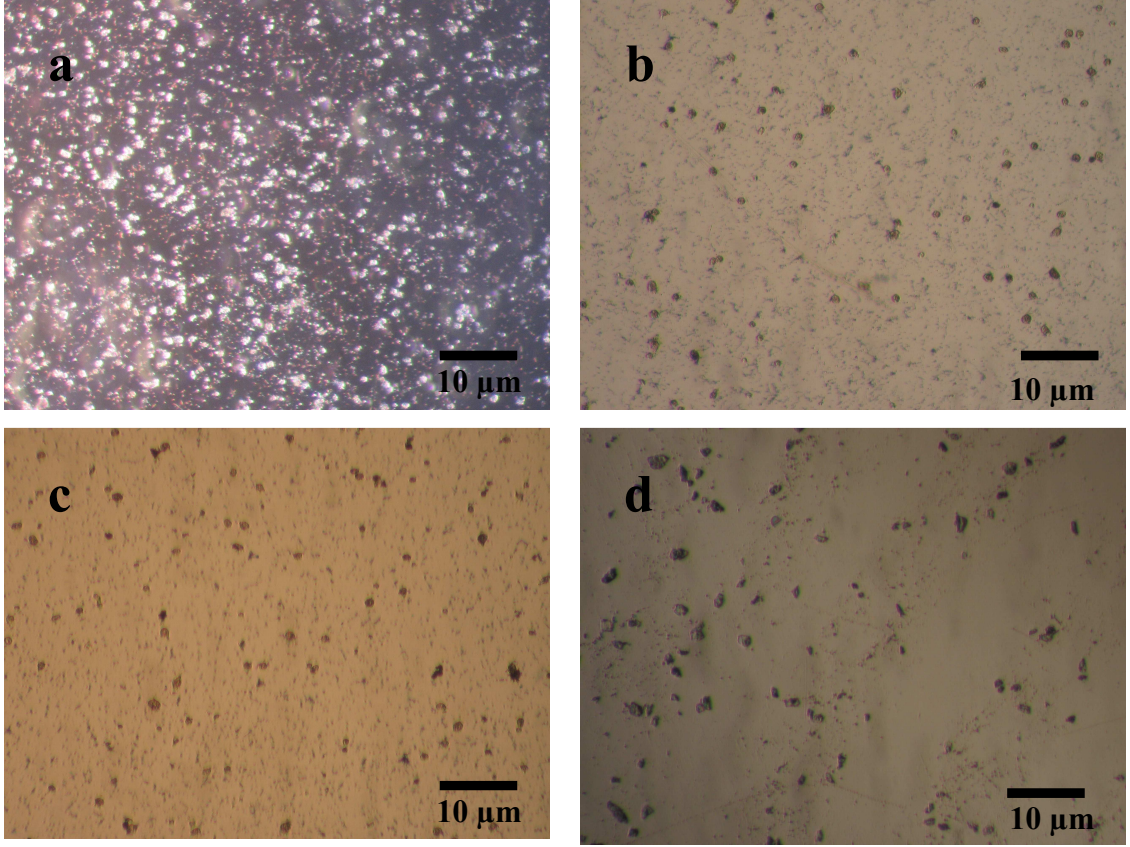


Şekil 4.23 PCL-TDKNT/EE membran statik hücre kültürünün MTT testi sonucu 570 nm’de absorbans ölçümlerinin değişimi

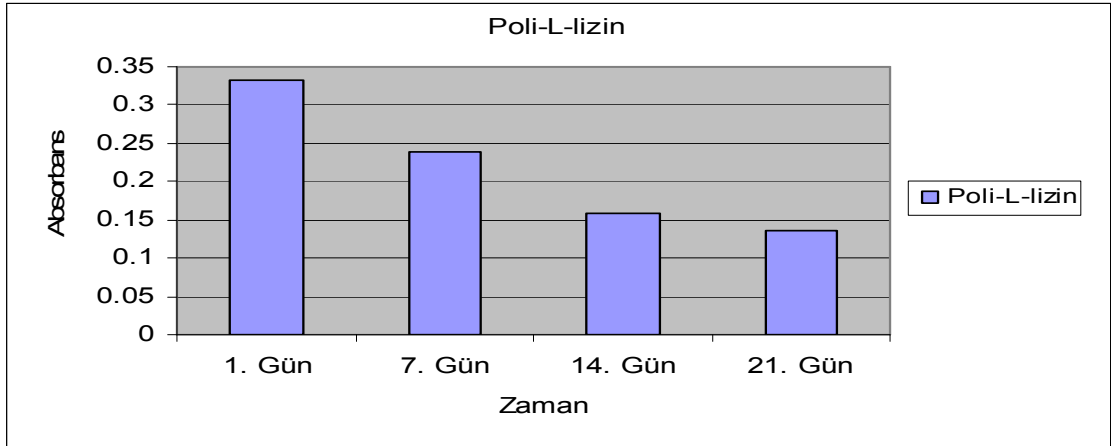
4.1.13 Poli-L-Lizin

Yapılan deneyde hücrelerin tutunmasına ve çoğalmasına uygun ortam olan poli-l-lizin (+) kontrol amaçlı kullanılmıştır. Poli-l-lizin kaplı plakada MTT testi sonrası oluşan formazan kristallerinin 1, 7, 14 ve 21. günlerdeki görüntülerine bakıldığında hücrelerin yüzey üzerindeki dağılımının homojen bir şekilde olduğu gözlenmektedir (Şekil 4.24).

Poli-l-lizin kaplı yüzeyde neonatal siyatik sinir hücreleri ile yapılan deney serisinde MTT testi sonucu oluşan formazan kristalleri çözülerek UV spektrometrede 570 nm’de absorbans değerleri ölçülmüştür. 1, 7, 14 ve 21. günlerde ölçülen değerlere göre sinir hücrelerinin mitokondriyal aktiviteleri giderek azalmıştır (Şekil 4.25).



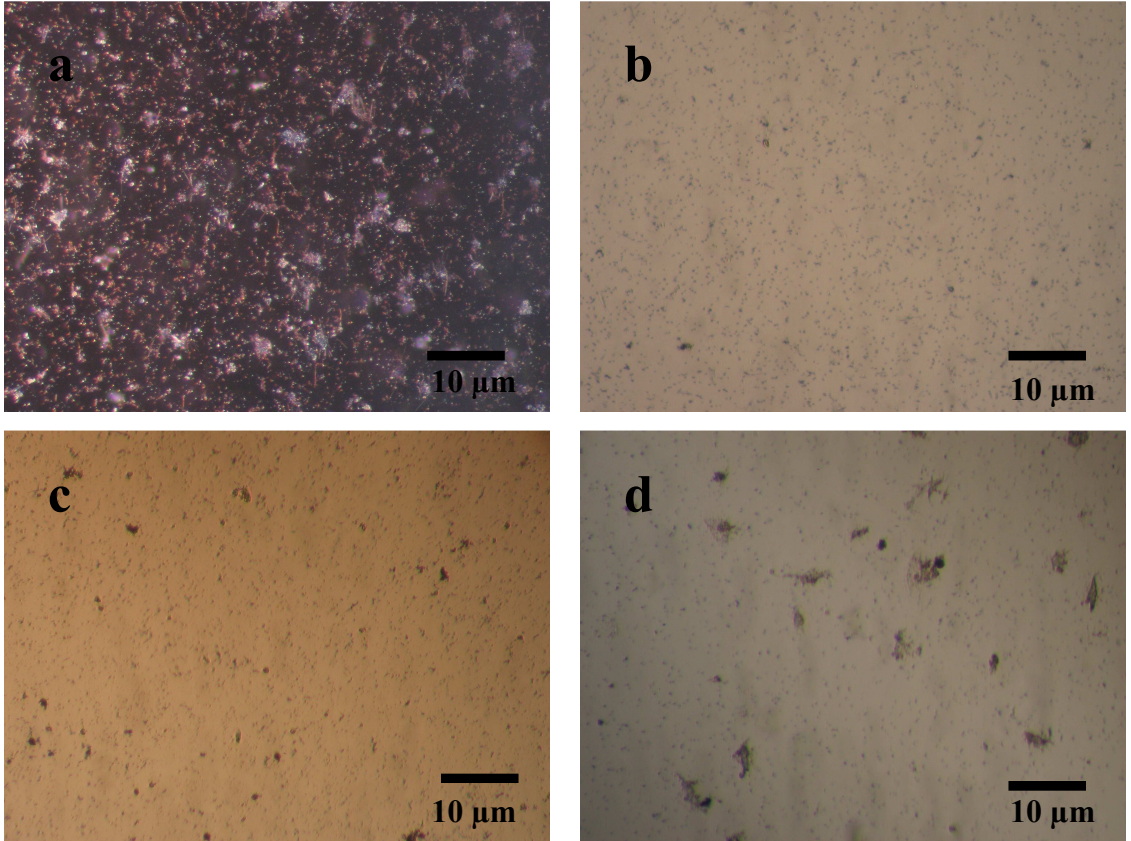
Şekil 4.24 Pozitif kontrol için statik olarak yürütülen neonatal siyatik sinir hücre kültürünün poli-L-lizin kaplı yüzeydeki a. 1, b. 7, c. 14 ve d. 21. günlerde yapılan MTT testi sonucu oluşan formazan kristallerinin görüntüsü



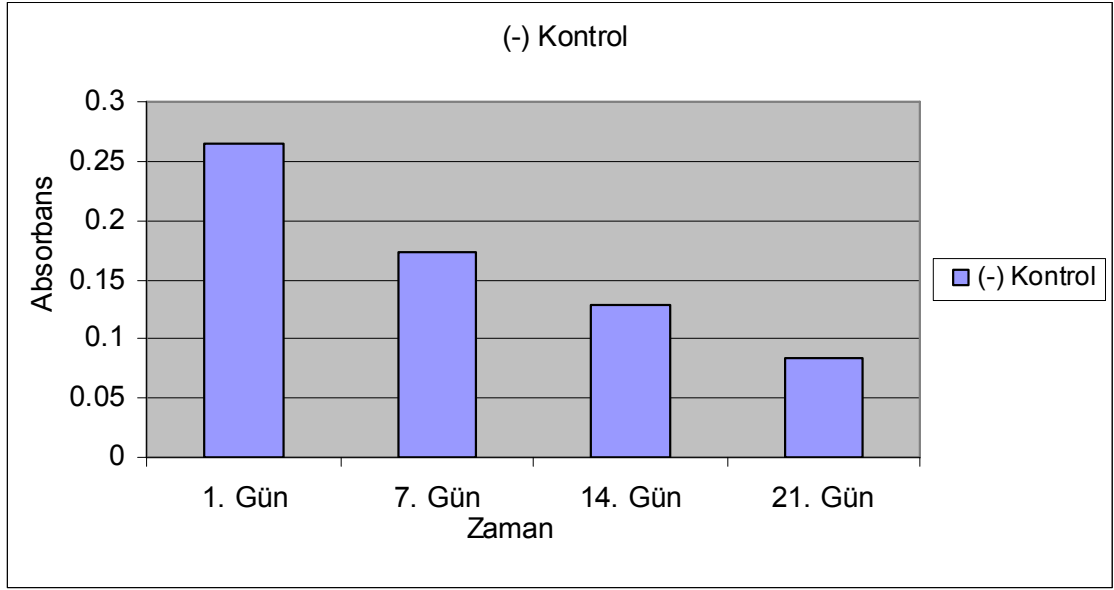
Şekil 4.25 Pozitif kontrol statik hücre kültürünün MTT testi sonucu 570 nm'de absorbans ölçümlerinin değişimi

4.1.14 TCP

Yapılan deneyde hücrelerin ekildiği polistirenden üretilen 24 kuyucuklu plaka yüzeyi (TCP) ise (-) kontrol amaçlı kullanılmıştır. TCP üzerindeki MTT testi sonrası oluşan formazan kristallerinin 1, 7, 14 ve 21. günlerdeki görüntülerine bakıldığında hücrelerin dağılımının seyrek ve dağınık olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.26).



Şekil 4.26 Negatif kontrol için statik olarak yürütülen neonatal siyatik sinir hücre kültürünün doku kültürü kabında (TCP) a. 1, b. 7, c. 14 ve d. 21. günlerde yapılan MTT testi sonucu oluşan formazan kristallerinin görüntüsü



Şekil 4.27 Negatif kontrol grubu statik hücre kültürünün MTT testi sonucu 570 nm’de absorbans ölçümlerinin değişimi

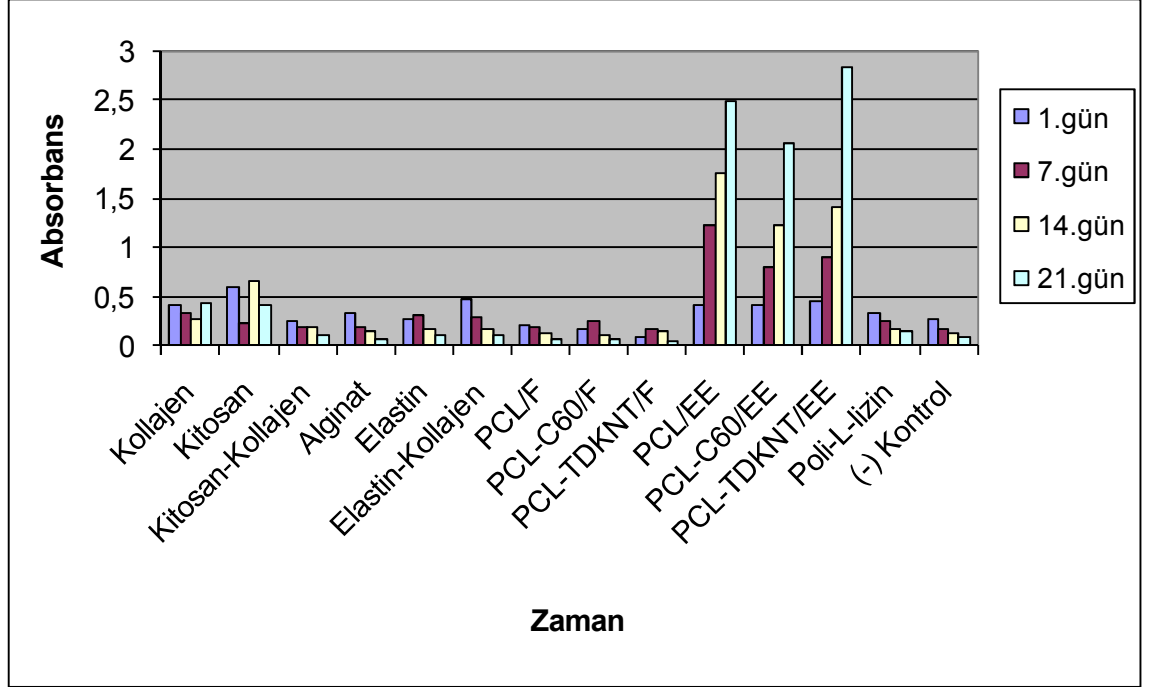
Plaka yüzeyinde, neonatal siyatik sinir hücreleri ile yapılan deney serisinde MTT testi sonucu oluşan formazan kristalleri çözülerek UV spektrometrede 570 nm’de absorbans değerleri ölçülmüştür. 1, 7, 14 ve 21. günlerde ölçülen değerlere göre sinir hücrelerinin mitokondriyel aktiviteleri burada da zamanla azalmıştır (Şekil 4.27).

4.1.15 MTT testi sonuçlarının genel olarak incelenmesi

Deney serisindeki membranlar üzerinde MTT testi sonucu oluşan formazan kristalleri HCl ile çözülerek UV spektrometrede 570 nm’de absorbans değerleri teker teker ölçülmüştür. Ölçülen değerlere göre neonatal siyatik sinir hücrelerinin mitokondriyel aktiviteleri tüm değerlerin bir arada bulunduğu bir grafiğe geçirilmiştir. Oluşturulan grafik üzerinde membranların hücrelerle etkileşiminin karşılaştırmalı tayini için aktivite oranları değerlendirilmiştir.

Elde edilen grafiğe göre elektroegirme yöntemi ile hazırlanmış PCL, PCL-C60 ve PCL-TDKNT membranların, daha önce sinir doku mühendisliğinde kullanılan membranlara oranla mitokondriyel aktivitelerinin oldukça fazla olduğu görülmüştür. Ayrıca deney süresi boyunca diğer polimerlerdeki genel eğilim aktivitenin azalması olurken,

elektroçirme yöntemiyle hazırlanan üç polimer membrandaki eğilim aktivitenin giderek artmasıdır (Şekil 4.28).



Şekil 4.28 Tüm polimerlerin statik siyatik sinir hücresi kültürünün MTT testi sonucu 570 nm’de absorbans ölçümlerinin zamanla değişimi

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Son yıllarda giderek gelişen doku mühendisliği teknikleri, tıbbi tedaviler için önemli bir yaklaşımdır. Bu teknikler kullanılarak geliştirilen fonksiyonel biyomalzemeler sayesinde, hasarlı bölgelerin tedavisinde umut verici sonuçlar elde edilmeye başlanmıştır. Bu paralellikte sinir doku mühendisliği ile sinir hücrelerinin onarımının gerçekleştirilebileceği ortamların tasarlanması amaçlanmaktadır.

Sinir dokusunu oluşturan kanallara benzer yapıların oluşturulması için büyüme faktörlerinin salgılanabileceği, hücre çoğalmasını, filizlenmesini ve elektriksel aktivitelerini gerçekleştirebileceği biyobozunur ve gözenekli bir duvar yapısı oluşturmak gerekir (Huang ve Huang 2006a).

Bir çok alanda yarar sağlayan elektroğirme tekniği ile geniş yüzey alanına sahip 3 boyutlu nanolifler elde etmek mümkündür. Bu tekniğin biyomedikal alandaki kullanımı genellikle malzemelerin kaplanması, elektriksel ve optiksel özelliklere sahip malzeme üretimi ve biyosensör yapımı gibi uygulamalardır. Doku mühendisliği uygulamaların da ise biyoyumlu, biyobozunur ve hücre tutunmasını sağlayacak iskele malzemelerin oluşturulmasında elektroğirme tekniğinden yararlanılmaktadır. Nanoboyutlu malzemelerin gözenekli yapıları sayesinde proteinler malzeme içerisine kolayca emilebilir ve hücre membran reseptörleri çok sayıda bağlanma bölgesinden iskeleye tutunabilir. Bu sayede hücrelerin rahatça çoğalabileceği kendi özgün dokularının mimarisine benzer yapılar oluşturulabilir (Agarwal vd. 2008).

Doku mühendisliği malzemelerinin yapısının gözenekli olması için gaz ile köpüklendirme, dondurma-kurutma, faz ayırma ve liflerin çapraz bağlanması gibi geleneksel yöntemlerin yanısıra elektroğirme tekniğinden de yararlanılmaktadır. Elektroğirme tekniği kullanılarak üretilen PCL nanoliflerin, Schwann hücrelerinin bölünmesi ve birbirleri ile etkileşimleri için birçok fonksiyonel yüzey alanı oluşturduğu gösterilmiştir. Bu sebeple sinir dokusu onarımı için bu teknikle hazırlanan çapı 1µm'den küçük olan lifler diğer yöntemlerle hazırlanan malzemelere göre birçok avantaja sahiptir (Tabesh vd. 2008).

Elektroğirme yöntemi ile hazırlanmış PCL nanolifler üzerindeki sinir uzanımı Schwann hücre göçünden daha hızlı olmaktadır. Bu da yönlenmiş nanoliflerin tekbaşına bile sinir hücresi ilerlemesine katkı sağladığını ortaya koyar. PCL ile aksonların biyokimyasal etkileşimine dair bir bulgu olmasa da topografik bulgular yönlenmiş liflerin sinir yenilenmesinde ve ilerlemesinde PCL'nun muhtemelen etkili olduğunu gösterir. Miktarı belirlenemesinde PCL nanolif üzerinde gelişen sinir demetlerinin yoğunluğu ve tutunması kollajen/PCL nanolife göre daha fazladır. Birçok çalışma Schwann hücre kültürlerinin sentetik sinir tüpleri içerisinde ilerleyip periferel sinir yenilenmesini arttırdığını ortaya koymuştur. Elektroğirme tekniği ile hazırlanmış PCL ve kollajen/PCL nanolifler de Schwann hücre göçünü ve aksonal yenilenmeyi destekledikleri için sinir tamirine uygun birer adaydır (Schnell vd. 2007).

Malzeme seçimi, sinir doku mühendisliğinde hayati önem taşır. Uygun bir malzemenin bozunma oranı ve mekanik özellikleri dokuda oluşacak bağışıklık tepkisini en aza indirmelidir. Ayrıca akson yenilenmesinde yol gösterici ve destek sağlayıcı olmalıdır. Elektroğirme tekniği ile tüm bunları sağlayacak, sinir dokusuna benzer, yönlenmiş nanoboyutlu malzemelerin tasarlanması mümkündür. Biyofonksiyonel nanolifli iskeleler sayesinde sinir hücrelerinin canlı dokuya nakilleri de mümkün olabilir (Cao vd. 2009)

Elektroğirme tekniğinin bir diğer avantajı ise sinir tüplerinin yapımı aşamasında ısıtma ya da kimyasal tepkimeye ihtiyaç duyulmamasıdır. Böylece diğer yöntemlerin aksine elektroğirme tekniği ile mikro ya da nanolifli malzemeler kimyasal tepkimelerin ve ısı işlemlerin kullanılmasına gerek kalmadan kararlı hale getirilebilir. Oluşturulan bu tüpler içerisine de kollajen, fibrin ve peptid kalıntıları gibi çeşitli dolgu malzemeleri rahatlıkla tutturularak tüplerin hücre çoğalmasını daha fazla desteklemesi sağlanabilir (Panseri vd. 2008).

Günümüzde oldukça dikkat çeken nanotüpler iletken ya da yarı iletken yapıda tasarlanabilirler. Fizyolojik şartlara uyumlu KNT'ler elektriksel ve mekaniksel özellikleri sayesinde doku mühendisliği uygulamalarında yeni fırsatlar ortaya koymuştur (Kaladhar ve Sharma 2007).

Kalp kası ve sinir dokusu gibi dokular, hücreleri boyunca elektriksel potansiyel oluşturma konusunda uzmanlaşmışlardır. MacDonald ve arkadaşları kollajen-TDKNT hidrojel yapısını doğal yumuşak dokulardaki elektriksel iletkenliği örnek alarak tasarlamışlardır. Sonuçlarına göre hücre matriksinde ve yapısındaki elektriksel özellikler beklenenden daha yüksek çıkmıştır. Elektriği ileten protein-TDKNT kompozitler kalp kası ve sinir dokusu gibi elektriksel iletimin önem taşıdığı dokular için iskele olarak ya da hücrelerin tutunup elektriksel uyarı etkisi oluşturabileceği substrat yüzeyleri geliştirmek gibi pek çok alanda kullanılabilir. Ayrıca bu kompozitler ile biyosensör ya da iletken kablolar oluşturulabilir (MacDonald vd. 2008).

Yaptığımız çalışmada neonatal sıçan siyatik sinir hücrelerinin *in vitro* ortamda farklı polimer membran yüzeyleri üzerindeki davranışları incelenerek sinir hücrelerinin yaşayabilirliğini arttıran ortamlar geliştirmeye çalışılmıştır. Döner kaplama yöntemiyle hazırlanmış kollajen, kitosan, kollajen/ kitosan, alginat, elastin, kollajen/elastin, PCL, PCL-C60 ve PCL-TDKNT film yüzeylerinde 3 haftalık süreçte sinir hücresi canlılık değerleri giderek azalmıştır. Buna karşın elektroğirme yöntemi kullanılarak hazırlanmış PCL, PCL-C60 ve PCL-TDKNT nanolifli yapıdaki membran yüzeylerinin diğer polimer yüzeylere göre sinir hücresi çoğalmasında daha fazla desteklediği görülmüştür. Elektroğirme yöntemindeki üç polimer yüzey içinde de en iyi sonuç PCL-TDKNT yüzeyde elde edilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre elektroğirme yöntemi ile hazırlanan geniş yüzey alanı ve yönlenmiş tutunma bölgeleri olan nanolifli yapıların sinir hücrelerinin çoğalması için uygun ortamın oluşturulmasına katkı sağladığı savunulabilir. Ayrıca TDKNT ilaveli yapının diğer yapılara göre daha iyi sonuç vermesi sinir hücrelerinin uzanım şekline daha uygun nanotüp yapının oluşturulması ve polimere iletkenlik özelliği kazandırması ile açıklanabilir.

Bu çalışma ile sinir doku mühendisliğine yaklaşımda iletken ve nanolifli yapıların kullanımının sinir dokusunu daha iyi taklit edecek yapılar oluşturmak açısından uygun bir yöntem olduğu söylenebilir. Hazırlanan bu yüzeyler *in vivo* denemelerle de desteklendiğinde farklı uygulamalar açısından önemli bir adım atılmış olacaktır.

KAYNAKLAR

- Agarwal, S., Wendorff, J.H. and Greiner, A. 2008. Use of electrospinning technique for biomedical applications. *Polymer*, 49; 5603-5621
- Bhardwaj, N. and Kundu, S.C. 2010. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*, 28; 325-347
- Campbell, W.W. 2009. Evaluation of peripheral nerve injury. *European Journal of Pain Supplements*, 3; 37-40
- Cao, H., Liu, T. and Chew, S.Y. 2009. The application of nanofibrous scaffolds in neural tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61; 1055-1064
- Chronakis, I.S. 2005. Novel nanocomposites and nanoceramics based on polymer nanofibers using electrospinning process. *Journal of Materials Processing Technology*, 167; 283-293
- Daamen, W.F., Veerkamp, J.H., Van Hest, J.C.M. and Van Kuppevelt, T.H. 2007. Elastin as a biomaterial for tissue engineering. *Biomaterials*, 28; 4378-4398
- Daamen, W.F., Nillesen, S.T.M., Hafmans, T., Veerkamp, J.H., Van Luyn, M.J.A. and Van Kuppevelt, T.H. 2005. Tissue response of defined collagen-elastin scaffolds in young and adult rats with special attention to calcification. *Biomaterials*, 26; 81-92
- Elçin, Y.M., Dixit, V. and Gitnick, G. 1998. Hepatocyte attachment on biodegradable modified chitosan membranes: In vitro evaluation for the development of liver organoids. *Artificial Organs*, 22(10); 837-846

- Freimoser, F.M., Jakob, C.A., Aebi, M. and Tuor, U. 1999. The MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide] assay is a fast and reliable method for colorimetric determination of fungal cell densities. *Applied and Environmental Microbiology*, 65/8; 3727-3729
- Hashimoto, T., Suzuki, Y., Kitada, M., Kataoka, K., Wu, S., Suzuki, K., Endo, K., Nishimura, Y. and Ide, C. 2002. Peripheral nerve regeneration through alginate gel: analysis of early outgrowth and late increase in diameter of regenerating axons. *Experimental Brain Research*, 146; 356-368
- Huang, Y.C. and Huang, Y.Y. 2006a. Biomaterials and strategies for nerve regeneration. *Artificial Organs*, 30(7); 514-522
- Huang, Y.C. and Huang, Y.Y. 2006b. Tissue engineering for nerve repair. *Biomedical Engineering-Applications, Basis & Communications*, 18; 100-110
- Inanç, B., Arslan, Y.E., Şeker, Ş., Elçin, A.E. and Elçin, Y.M. 2009. Periodontal ligament cellular structures engineered with electrospun poly(DL-lactide-co-glycolide) nanofibrous membrane scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 90A(1); 186-195
- Kaladhar, K. and Sharma, C.P. 2007. Surface passivation and controlled ligand supplementation of cellular activation processes – strategies for bottom up synthesis of bioactive surfaces. *Trends in Biomaterials and Artificial Organs*, 21(1); 29-62
- Kemp, S.W., Syed, S., Walsh, S.K., Zochodne, D.W. and Midha, R. 2009. Collagen nerve conduits promote enhanced axonal regeneration, schwann cell association and neovascularization compare to silicone conduits. *Tissue Engineering Part A*, 15; 1975-1988

- Kern, J.M. 2008. The microstructure of peripheral nerves. *Techniques in Regional Anesthesia and Pain Management*, 12;127-133
- Kim, I.Y., Seo, S.J., Moon, H.S., Yoo, M.K., Park, I.Y., Kim, B.C. and Cho, C.S. 2008. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnology Advances*, 26; 1-21
- Luurtsema, G.A. 1997. Spin-coating for rectangular substrates.
(<http://bcam.berkeley.edu/ARCHIVE/theses/gluurtsMS.pdf>, 26.05.2010)
- MacDonald, R.A., Voge, C.M., Kariolis, M. and Stegemann, J.P. 2008. Carbon nanotubes increase the electrical conductivity of fibroblast-seeded collagen hydrogels. *Acta Biomaterialia*, 4; 1583-1592
- Navarro, X., Vivo, M. and Valore, A. 2007. Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. *Progress in Neurobiology*, 82; 163-201
- Panseri, S., Cunha, C., Lowery, J., Del Carro, U., Taraballi, F., Amadio, S., Vescovi, A. and Gelain, F. 2008. Electrospun micro- and nanofiber tubes for functional nervous regeneration in sciatic nerve transections. *BMC Biotechnology*, 8; 39
- Pietrucha, K. and Marzec, E. 2005. Dielectric properties of the collagen-glycosaminoglycans scaffolds in the temperature range of thermal decomposition. *Biophysical Chemistry*, 118; 51-56
- Sayes, C.M., Gobin, A.M., Ausman, K.D., Mendez, J., West, J.L. and Colvin, V.L. 2005. Nano-C60 cytotoxicity is due to lipid peroxidation. *Biomaterials*, 26; 7587-7595

- Schnell, E., Klinkhammer, K., Balzer, S., Brook, G., Klee, D., Dalton, P. and Mey, J. 2007. Guidance of glial cell migration and axonal growth on electrospun nanofibers of poly- ϵ -caprolactone and a collagen/poly- ϵ -caprolactone blend. *Biomaterials*, 28; 3012-3025
- Seal, B.L., Otero, T.C. and Panitch, A. 2001. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. *Materials Science and Engineering*, 34; 147-230
- Sell, S.A., McClure, M.J., Garg, K., Wolfe, P.S. and Bowlin, G.L. 2009. Electrospinning of collagen/biopolymers for regenerative medicine and cardiovascular tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61; 1007-1019
- Stang, F., Keilhoff, G. and Fansa, H. 2009. Biocompatibility of different nerve tubes. *Materials*, 2; 1480-1507
- Straley, K.S. and Heilshorn, S.C. 2009. Design and adsorption of modular engineered proteins to prepare customized, neuron-compatible coatings. *Frontiers in Neuroengineering*, 2; Art. 9
- Tabesh, H., Amoabediny, G., Nik, N.S., Heydari, M., Yosefifard, M., Siadat S.O.R. and Mottagy, K. 2009. The role of biodegradable engineered scaffold seeded with schwann cells for spinal cord regeneration. *Neurochemistry International*, 54(2); 73-83
- Yuan, Y., Zhang, P., Yang, Y., Wang, X. and Gu, X. 2004. The interaction of schwann cells with chitosan membranes and fibers in vitro. *Biomaterials*, 25; 4273-4278

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Neslihan ÇELİK
Doğum Yeri: Ankara
Doğum Tarihi: 28/07/1984
Medeni Hali: Bekar
Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise: Ankara Cumhuriyet Anadolu Lisesi (2002)
Lisans: Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü (2008)
Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı
(2011)

Çalıştığı Kurum/ Kurumlar ve Yıl

Refik Saydam Hıfzıssıhha İlaç Kozmetik Laboratuvarı-Staj (2006)
Türk Standartları Enstitüsü Kimya, Sağlık, Temizlik Laboratuvarı-Staj (2006)
Türk Henkel Firması-Staj (2007)

Poster Sunumu (Yeri ve Yılı)

16. Uluslararası BIOMED İstanbul (2010)