

**Nanolifli Yapıda, Sinir Büyüme Faktörü Yüklü Mikro  
Küreleri İçeren Jelatin Bazlı Doku İskelelerinin  
Hazırlanması Ve Karakterizasyonu**

**Proje No: 112M568**

Prof.Dr. Sacide ALTINKAYA

Doç.Dr. Esra ERDAL

Melda BÜYÜKÖZ

ŞUBAT 2014

İZMİR

## ÖNSÖZ

Bu rapor "Nanolifli Yapıda, Sinir Büyüme Faktörü Yüklü Mikro Küreleri İçeren Jelatin Bazlı Doku İskelelerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu" başlıklı TÜBİTAK-MAG-112M568 No'lu araştırma projesinin sonuçlarını içermektedir. Çalışma içerisinde büyüme faktörü yüklü mikrokürecikleri içeren nanolifli doku iskelesi hazırlanması ve bu küreciklerden salınan büyüme faktörünün doku iskelelerine tutunmuş PC-12 hücreleri farklılaşmasını sağlamak amacıyla önerilmiştir. 01 Ocak 2013 tarihinde, telif bedeli hariç 29800 TL'lik bütçe ile İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Kimya Mühendisliği Bölümü'nde yürütölmek üzere desteklenmeye başlanan proje 01 Ocak 2014'de tamamlanmıştır.

Bu proje kapsamında bir doktora çalışmasının bir bölümü tamamlanmıştır. Projenin yönlendirilmiş doku iskelesi üretimi ile ilgili kısmı 23-25 Ekim 2013 tarihleri arasında Almanya'da düzenlenen Dünya Rejeneratif Tıp Konferansında sözlü sunum ve poster olarak sunulmuştur.

Projede yüksek gözeneklilik ve nanolifli yapıda jelatin doku iskeleleri ile çevresel sinir sistemi hasarlarında kullanılmak üzere yönlendirilmiş doku iskeleleri hazırlanmıştır. Mekanik özelliklerinin sinir doku mekanik özellikleri ile benzer olduğu belirlenen doku iskelesi üzerine alginat tanecikler tutturulmuştur. PC-12 hücrelerinin nanolifli doku iskelesine tutundukları gözlenmiş, alginat mikro kürecikler içerisinde yüklenen NGF proteininin aktivitesini koruduğu belirlenmiştir.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET	8
ABSTRACT	9
1. GİRİŞ	10–11
2. GENEL BİLGİLER	12–14
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER	15
3.1. Malzemeler	15
3.2. Kalıp Üretimi	15
3.3. Gözenek Oluşturucu Ajan Üretimi	16
3.4. Jelatin Doku İskelesi Hazırlanması	16
3.4.1. Nano Lifli Doku İskelesi Hazırlanması	16
3.4.2. Katı Duvarlı Doku İskelesi Hazırlanması	16–17
3.4.3. Yönlendirilmiş Doku İskelesi Hazırlanması	17
3.5. 3D Nano Lifli Doku İskelesinin Kimyasal Olarak Çapraz Bağlanması	17
3.6. Büyüme Faktörü Taşıyan Mikro Kürelerin Hazırlanması	17
3.6.1. Kitosan Mikro Kürelerin Üretimi	17–18
3.6.2. Alginat Mikro Kürelerin Üretimi	18
3.7. Protein Yükleme Kapasitesinin Belirlenmesi	18–19
3.8. Jelatin Doku İskelesine Protein Yüklü Alginat Mikro Kürelerin Sabitlemesi	19
3.9. Mikro Küreciklerden Protein Salım Kinetiğinin Belirlenmesi	19
3.10. Doku İskelesi Karakterizasyonu	20
3.11. Doku İskelesi Bozunma Oranlarının Belirlenmesi	20
3.12. Hücre Kültürü	20
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	22
4.1. Gözenek Oluşturucu Ajan Üretimi	22–23
4.2. Jelatin Doku İskelelerinin Hazırlanması	23–24
4.2.1. Nanolifli ve Katı Duvarlı Doku İskelelerinin Hazırlanması	24–25
4.2.2. Yönlendirilmiş Doku İskelelerini Hazırlanması	25–28

4.3. Nanolifli Jelatin Doku İskelesini Kimyasal Olarak Çapraz Bağlama	28–29
4.4. Büyüme Faktörü Taşıyan Mikrokürelerin Hazırlanması	30
4.4.1. Kitosan Mikrokürelerin Üretimi	30–31
4.4.1.1. Kitosan mikrokürelere protein yüklenmesi	31–32
4.4.2. Alginat Mikrokürelerin Üretimi	33–35
4.5. Doku İskelesinin Karakterizasyonu	36–40
4.6. Doku İskelelerinin Bozunma Oranlarının Belirlenmesi	40
4.7. Alginat Mikro Küreciklerin Jelatin Doku İskelesine Sabitlenmesi	41
4.8. Hücre Kültürü ve NT-3 Biyoaktivitesinin Belirlenmesi	42-43
4.9. Alginat Mikro Kürelere Yüklenen NGF Biyoaktivitesinin Belirlenmesi	43-44
5. SONUÇLAR	45
KAYNAKLAR	46-47

## TABLO LİSTESİ

**Tablo 1.** Dispersiyon yöntemi ile parafin kürecik hazırlama koşulları ve buna bağlı olarak elde edilen ürün karakterleri

**Tablo 2.** 3 Farklı sette hazırlanan kürelerin ortalaması

**Tablo 3.** Nanolifli matrislerin lif uzunluğu ve çapı

**Tablo 4.** Nanolifli matrislerin gözenekliliği

**Tablo 5.** Etanol su karışımlarının donma noktaları

**Tablo 6.** Farklı konsantrasyonlarda kitosan ve TPP kullanılarak üretilen nano/mikro kitosan parçacıkların ortalama boyutları

**Tablo 7.**  $\alpha$ -Kemotripsin ve büyüme faktörü NT-3 ve NGF' in özellikleri

**Tablo 8.** Farklı alginat konsantrasyonları ile elde edilen tanecik boyutları

**Tablo 9.** %0.1 ve % 1 alginat konsantrasyonlarındaki taşıyıcıya yüklenen BSA proteininin kapsülleme etkinlikleri

**Tablo 10.** Doku iskeleleri hazırlamak için kullanılan akış şeması (KD; Katı Duvarlı, NL; Nanolifli)

**Tablo 11.** Nano lifli doku iskelelerinin sıkıştırılma katsayısı sonuçları (kPa)

**Tablo 12.** Doku iskelelerinin gözeneklilik, lif uzunluğu ve lif çapı

## ŞEKİL LİSTESİ

**Şekil 1.** Polimerik doku iskelesinin farklı formları

**Şekil 2.** 20 kuyucuklu teflon kalıp

**Şekil 3.** Cam kapiler kalıp

**Şekil 4.** Jelatinin EDC ve NHS ile çapraz bağlanma reaksiyonu I; jelatin, II; EDC, III; NHS

**Şekil 5.** Alginat ve RGD (jelatin) in EDC varlığında çapraz bağlanması

**Şekil 6.** 600 ml PVA çözeltisi ve 578 rpm karıştırma hızında hazırlanan küreciklerin taramalı elektron mikroskobu görüntüleri

**Şekil 7.** 3 farklı sette hazırlanan parafin kürelerin dağılımları

**Şekil 8.** 37°C ısıya farklı sürelerde tutulan parafin kürelerle hazırlanmış doku iskeleleri A-20 dakika, B- 50 dakika, C- 200 dakika, D- 400 dakika

**Şekil 9.** %5 jelatin konsantrasyonu ile hazırlanan nanolifli (solda) ve katı duvarlı (sağda) doku iskelelerinin genel görünüşü

**Şekil 10.** %5 jelatin konsantrasyonu ile hazırlanan yönlendirilmiş doku iskelesi genel görünüşü

**Şekil 11.** Katı-sıvı faz ayrımı sonucu oluşan katı duvarlı doku iskelesi a; dikey kesit, b; yatay kesit, c; düz yüzey ve mikro kanal yapısı

**Şekil 12.** Sıvı-sıvı faz ayrımı ve farklı konsantrasyonlarda hazırlanan nano lifli matrisler

**Şekil 13.** % 5 jelatin konsantrasyonu ve farklı etanol su karışımları kullanılarak hazırlanan nano lifli doku iskeleleri

**Şekil 14.** Çapraz bağlanma öncesi ve sonrası nanolifli doku iskelesi

**Şekil 15.** Çapraz bağlama reaksiyonu öncesi sonrası doku iskelelerinin hacimsel değişimi.

NL: Nanolifli; KD: Katı duvarlı doku iskelesi

**Şekil 16.** A;  $\alpha$ -Kemotripsinin kromatogramı, B-E; Kitosan nano parçacıklardan salım profili B; birinci saat, C; 72. saat, D; 6. gün, E; 15. gün

**Şekil 17.** %1 alginat çözeltisi ile hazırlanan alginat mikro kürecikler

**Şekil 18.** Protein yüklenmiş ve yüklenmemiş alginat mikrokürelerin boyutları

**Şekil 19.** Farklı konsantrasyonlarda alginat içerisine yüklenen BSA proteinin zamana bağlı salımı  
Yükleme esnasında kullanılan alginat ve BSA miktarları sırasıyla A) Alginat: 0.1 % BSA:0.1 mg B) Alginat: 0.1 % BSA:0.5 mg A) Alginat: 0.1 % BSA:0.1 mg C) Alginat: 1 % BSA:0.1 mg

**Şekil 20.** A; Katı duvarlı ve B; nanolifli doku iskelelerinin gerilim-gerinim grafiği

**Şekil 21.** Katı duvarlı doku iskelelerinin sıkıştırılma katsayısı sonuçları (kPa)

**Şekil 22.** Nanolifli doku iskelelerinin sıkıştırılma katsayısı sonuçları (kPa)

**Şekil 23.** Doku iskelelerinin zamana bağlı olarak ağırlıklarında meydana gelen değişim

**Şekil 24.** A- Jelatin doku iskelesine tutturulmuş alginat mikro küreciklerin toluidin mavisi ile boyanmış hali, B- Jelatin doku iskelesine tutturulmuş alginat mikro küreciklerin SEM görüntüleri C- Alginat mikro kürecik eklenmemiş doku iskelesinin toluidin mavisi ile boyanmış hali, D- Alginat mikro kürecik içermeyen jelatin doku iskelesi SEM görüntüsü

**Şekil 25.** PC-12 hücrelerinin farklı kültür ortamlarındaki büyüme eğrileri CM; normal ortam, SM; açlık ortamı, SM+NGF ortamı

**Şekil 26.** 2500 hücre/ml konsantrasyondaki PC-12 hücrelerinin 7. gün sonundaki görünümü ve nörit oluşumu A; 50 ng/mL, B; 100 ng/mL NGF

**Şekil 27.** PC12 hücrelerinin A; Katı Duvarlı, B; Nano lifli doku iskelelerinde büyütüldüğünde gösterdiği morfolojisi

**Şekil 28.** PC-12 hücrelerinin 5. gün sonunda görünümü A; NGF içermeyen açlık ortamı, B; Mikro küreciklerin parçalanması sonucu elde edilen çözelti eklenen açlık ortamı ve nörit oluşumu

## ÖZET

Canlılarda pek çok doku, kendini yenileyebilme özelliğine sahiptir. Ancak memelilerde, yetişkin sinir hücreleri bölünebilme yeteneklerini kaybettikleri için bu durum farklılık gösterir. Özellikle merkezi sinir sistemi çevresel sinir sistemine göre daha kısıtlı yenilenme yeteneğine sahiptir. Bunun sonucu olarak travma, felç ve nöropatolojik durumlar ortaya çıkmaktadır. Sinir sisteminin yenilenmesini hedefleyen araştırmalar ilk olarak otolog sinir grefti ismi verilen kişinin vücudundaki başka bir bölgeden alınan sağlıklı bir sinir dokusunun hasarlı bölgeye aktarımı ile başlamıştır. Bu yöntemde yeterli hücre sayısına ulaşılamaması en önemli sınırlamadır. Diğer bir yaklaşım kadavralardan alınan hücrelerin hasarlı bölgeye aktarımı şeklinde olmuştur. Ancak bu uygulamada aktarım yapılan kişilerde immun yanıt oluşturmuştur. Sinir sisteminin yenilenmesini hedefleyen araştırmalar da umut verici bir yaklaşım biyomalzemeler ve doku mühendisliği çalışmalarıdır. Bu projede, mikrokürecikler içerisine yüklenmiş sinir büyüme faktörünün kontrollü bir şekilde salımını sağlayan, nanolif yapıda yeni bir doku iskelesi geliştirilmesi hedeflenmiştir. Doku iskeleleri ısı etkili faz ayırma, gözenek oluşturma ve kalıplama teknikleri birarada kullanılarak jelatinden, mikroküreler ise su yağ emülsiyonu içerisinde alginatın kalsiyum iyonu ile retikülasyonu sonucu üretilmiştir. Mikrokürelerden ortama salınan büyüme faktörünün biyoaktivitesini belirlemede fare adrenal medullasından köken alan ve ortama nöral büyüme faktörleri verildiğinde sinir hücresi benzeri uzantılar (nörit) oluşturan PC12 hücre hattı kullanılmıştır. Yüksek gözeneklilikte (>90 %) gözenekleri birbiri ile bağlantılı, hücre dışı matrisi boyut olarak taklit eden ve mekanik özellikleri doğal beyin dokusuna benzer doku iskeleleri üretilmiştir. Katı duvarlı doku iskelesine kıyasla nanolifli yapıdaki doku iskeleleri hücrelerin morfolojisinin değişimine sebep olmaksızın tutunmalarını sağlamıştır. Model protein olarak kullanılan  $\alpha$ -Kemotripsin ve sinir büyüme faktörü NGF'in aktivitesini korumak için kullanılan sığır serum albümini proteinleri alginat kürelere 100 % oranında yüklenebilmiştir. Mikro kürecikler içerisine yüklenen NGF' in aktivitesini koruduğu hatta serbest halde kültür ortamına eklenen NGF' e kıyasla daha kısa sürede PC-12 hücre farklılaşmasını sağladığı belirlenmiştir.



## ABSTRACT

In living organisms most of the tissues have the capability of regeneration; on the other hand, this situation is different in mammalian adult neural cells since they lose their ability of proliferation. Compared to peripheral nervous system, central nervous system has restricted regeneration capability which results in trauma, stroke and neuropathology etc. The first studies for the regeneration of nervous system concentrated on the use of autographs, tissue transplanted from one part of the body to another in the same individual, but it has limitations including short-age. Another type of investigation was allograft, which is transplantation of cells isolated from cadavers to the patient, but this approach is also not suitable because of host immune rejection. A new hope to cure neurodegenerative diseases appeared with biomaterials and tissue engineering studies. In this study, it is aimed to develop a novel, nanofibrous scaffolds with the capability of controlled releasing neural growth factor loaded in microspheres. Nanofibrous and oriented scaffolds were prepared from gelatin by a combination of thermally induced phase separation (TIPS), porogen-leaching and molding techniques while alginate microspheres were produced in oil in water emulsion through cross linking of alginate with calcium ions. The bioactivity of the growth factor released from microspheres was determined using PC12 cell line, derived from rat adrenal medulla and differentiate when treated with nerve growth factor. The scaffolds including connected pores with a high porosity, nanofibrous structure which mimic the extracellular matrix and properties similar to natural brain tissue were produced. Compared to solid walled scaffolds, nanofibrous scaffolds allow attachment of cells without any change in their morphologies. Model protein  $\alpha$ -chemotripsin and bovin serum albumin used for protecting the activity of nerve growth factor were loaded in alginate microspheres with an encapsulation efficiency of 100 %. It was found that NGF loaded into microspheres can maintain its activity and it can even differentiate PC-12 cells in a shorter time compared to NGF directly added into cell culture medium.

Keywords: Natural polymer, scaffolds, microspheres, growth factors, neural tissue engineering

## 1.GİRİŞ

Hasar görmüş veya bir hastalık sonucu kullanılamaz hale gelmiş doku ve organların yenilenmesi eski çağlardan beri önemini yitirmeyen bir konudur. Aslında canlılarda pek çok doku, kendini yenileyebilme özelliğine sahiptir. Ancak dokunun kendini yenileyebilmesi belli sınırlar içerisinde mümkündür. Örneğin çevresel sinir dokuda meydana gelen bir hasar sonucu oluşan boşluk eğer 1 mm' den daha kısa ise doğal yenilenme mekanizması ile hasar onarılabilir. Canlıda oluşan hasarın doğal yenilenme mekanizması ile tamir edilemediği durumlarda tarihsel süreçte pek çok yöntem denenmiştir. Hasarlı bölgenin onarımı için günümüzde kullanılan yaklaşımları iki genel başlık altında toplamak mümkündür.

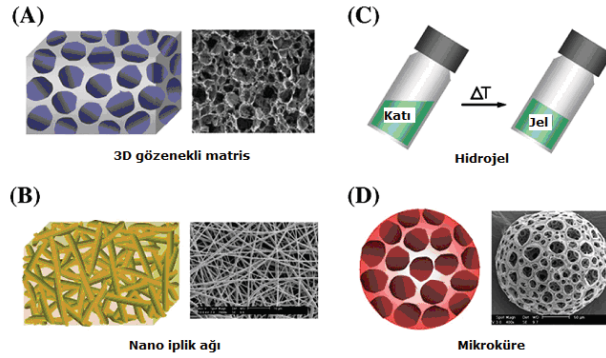
1- Doku grefti ve organ nakli

2- Doğal ve/veya sentetik malzemelerin kullanımı ile doku mühendisliği uygulamaları

Doku ve organ yenilenmesini hedefleyen araştırmalar ilk olarak otolog greft ismi verilen kişinin vücudundaki başka bir bölgeden alınan sağlıklı dokunun hasarlı bölgeye aktarımı ile başlamıştır. Bu yöntemde en önemli kısıtlama kişinin vücudunda ikinci bir hasarlı bölge oluşturulmasıdır. Diğer bir yaklaşım kadavradan alınan hücrelerin hasarın olduğu bölgeye aktarımı şeklindedir. Ancak bu uygulama aktarım yapılan kişide immun yanıt oluşumuna neden olabilmektedir. Organ nakli ile hasarlı organın yerine sağlıklı bir organın kullanılması konusu gerek uygun verici bulmada yaşanan kısıtlamalar, gerekse immun yanıt oluşumu açısından sınırlı bir tedavi yöntemidir. Konu ile ilgili olarak umut verici bir yaklaşım doku mühendisliği çalışmalarıdır. Doku mühendisliğinin en önemli hedeflerinden bir tanesi biyolojik ortamı taklit edebilen üç boyutlu doku iskelelerinin hazırlanmasıdır. İdeal bir doku iskelesi üç boyutlu yapının yanında yüksek gözenekliliğe ve uygun mekanik özelliklere sahip olmalı, doku iskelesinin kendisi veya parçalanması sonucu açığa çıkan ürünler vücutta bağışık yanıt oluşturmamalıdır. Oluşturulan doku iskelelerinde yüksek gözeneklilik hücreler için gerekli olan oksijen ve besinin taşınması için önemlidir. Uygun mekanik özellikler yenilenme aşamasında dokuyu taklit ederek çevre dokulara destek sağlamak ve yenilenme ile uyumlu şekilde parçalanabilmek açısından önemlidir. Doku iskelesi ve parçalanma ürünlerinin immun yanıt oluşturmaması iyileşme mekanizmasının etkili bir şekilde gerçekleşmesi için önemlidir. Çünkü immun yanıt hasarlı dokunun yenilenmesini yavaşlatan veya durduran etkilere neden olabilmektedir. Son yıllarda yapılan araştırmalar doku iskelesinin nanolifli yapıda olmasının hücre dışı matrisi boyut olarak taklit edebilmesi sebebi ile hücre tutunması ve çoğalması için daha uygun bir ortam sağladığını göstermiştir. Ayrıca, kemik ve kıkırdak mühendisliği alanında yapılan bazı çalışmalarda nano lifli yapıdaki doku iskelesi ile büyüme faktörü yüklü nano/mikrokürelerin bir araya getirilmesinin ve bu faktörün kontrollü salımının sağlanabilmesinin hücrelerin çoğalması ve farklılaşması üzerinde önemli etkileri olduğu belirlenmiştir.

Fonksiyonunu yitirmiş doku ve organların yenilenmesini amaçlayan rejeneratif tıp uygulamalarında biyomalzemelerin önemi büyüktür. Kemik, kıkırdak gibi sert doku mühendisliği uygulamalarında genellikle metal, seramik ve kompozit malzemeler, iskelet kasları kardiyovasküler sistem gibi yumuşak doku mühendisliği uygulamalarında ise polimerler kullanılmaktadır. Gözenek oluşturucu ajanı uzaklaştırma, faz ayırımı, gaz enjeksiyonu ile köpürtme ve elektro dokuma gibi yöntemler kullanılarak

üç boyutlu, gözenekli matris, nano iplik ağı, hidrojel ve mikroküre gibi farklı şekillerde doku iskeleleri üretilebilmektedir (Şekil 1).



**Şekil 1.** Polimerik doku iskelesinin farklı formları (CHUNG ve grubu, 2007)

Doku iskelesi uygulamalarında avantajlı yapısı bilinen nanolifli yapıdaki doku iskeleleri yanında bu yapılara ekilmiş hücrelerin farklılaşmasını sağlamak için kültür ortamına ilave edilen büyüme faktörlerinin bir mikro veya nano taşıyıcı içerisine hapsedilmesi ve doku iskelesine tutturulmasının da pek çok açıdan yararlı olduğu gözlenmiştir. Bu yararlar şöyle özetlenebilir;

1. Küreler içinde bulunan büyüme faktörü salımının kontrol edilebilmesi
2. Hücre kültürü ortamında kısa sürede parçalanıp (bozulan) protein yapıdaki bu bileşiklerin küre içinde aktif formda kalabilmesi

Yapılan çalışmalar ve elde edilen bulguların ışığında bu projenin amacı sinir doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere, sinir hücresi büyüme faktörünün kontrollü bir şekilde salımını ve nanolifli yapı, mikron boyuttaki kanalları vasıtasıyla hücrelerin belli bir doğrultuda gelişimini sağlayabilecek üç boyutlu hücre taşıyıcı sistemi geliştirmektir. Hücre dışı matrisin bir bileşeni olan ve aynı zamanda doğal bir polimer olan kollajen pek çok uygulama için doku iskelesi üretiminde kullanılmış olmakla birlikte, vücutta immun yanıt oluşturmaması ve patojen geçişine neden olması önemli bir dezavantajdır. Bu çalışmada doku iskelesinin hazırlanmasında kimyasal kompozisyonu kollajene çok benzeyen ve onun asidik veya bazik hidrolizi sonucu oluşan doğal bir polimer olan jelatin kullanılmıştır.

Nanolifli yapıdaki doku iskelesi ısı etkili faz ayırma tekniği, gözenek oluşturma tekniği ve kalıplama tekniği bir arada kullanılarak elde edilmiştir. Sinir sistemi büyüme faktörü Nörotrofin 3 (NT-3) ile benzer izoelektrik noktası ve ağırlığa sahip model protein  $\alpha$ -Kemotripsin doğal bir polimer olan alginat mikrokürelere yüklenmiştir. Alginat mikroküreler yağ içinde su emülsiyonu ve iyonik jelleşme metodu ile hazırlanmıştır. Protein yüklenmiş mikroküreler, jelatin doku iskelesi üzerine sonradan ekme (post-seeding) metodu ve kimyasal olarak çapraz bağlama yöntemi ile sabitlenmiştir. Elde edilen mikrokürelerin boyut ve yüzey morfolojileri belirlenmiştir. Diğer taraftan, üretilen doku iskelelerinin yüzey morfolojisi, lif çapı ile uzunluğu ve gözenekliliği belirlenmiş, mekanik özellikleri mekanik test cihazı ile ölçülmüştür. Ayrıca doku iskelelerinin *in vitro* koşullarda biyobozunurluğu incelenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

Doku iskelesi çalışmalarında hedef, hücrelerin içinde bulunduğu doğal ortamı yapısal ve fonksiyonel olarak taklit eden yapıların geliştirilmesidir. Hücre dışı matris boyutları 50–500 nm arasında değişen fibrillerden oluşur. Osteoblast, fibroblast, düz kas hücresi, sinir kök hücresi ve embriyonik kök hücre gibi pek çok hücre hattı ile yapılan çalışmalarda hücrelerin geleneksel (katı duvarlı) doku iskelesi ile karşılaştırıldığında nano lifli yapıda olan doku iskelesine daha fazla oranda tutunduğu ve çoğaldığı belirlenmiştir (SMITH ve grubu, 2009). SHIN ve grubu (2004) kemik doku mühendisliği üzerine yaptıkları bir çalışmada, nano lifli doku iskelelerinin damarlanma, mineralizasyon ve osteosit benzeri yapıların gelişiminde daha organize yapı oluşumunu sağladığını göstermişlerdir. Gözenek oluşturucu ajanı uzaklaştırma, faz ayırımı, gaz enjeksiyonu ile köpürtme ve elektro dokuma gibi yöntemler üç boyutlu doku iskelesi hazırlamada en fazla kullanılan yöntemlerdir. Bu yöntemlerin her birinin kendine özgü avantajları bulunmaktadır. Gözenek oluşturucu ajanı uzaklaştırma yöntemi kullanılarak makro-gözenekli doku iskeleleri hazırlanırken nano lifli yapı oluşturmada en fazla kullanılan yöntem elektro dokuma yöntemidir. Bu nedenle ideal bir doku iskelesinin özellikleri olan üç boyutlu, makro-gözenekli ve nanolifli yapıya sahip doku iskelelerinin üretimi için yukarıda bahsedilen yöntemlerin kombinasyonlarının kullanımının daha etkili olacağı açıktır. Bu amaçla LIU ve MA (2009) ısı etkili faz ayırımı ve gözenek oluşturucu ajanı uzaklaştırma yöntemlerini birlikte kullanarak jelatin polimerinden üç boyutlu makro-gözenekli ve nano lifli doku iskeleleri üretmişlerdir.

Doku mühendisliğinde yapısal olarak biyolojik ortamı taklit etmesi hedeflenen doku iskeleleri yanında öne çıkan bir diğer konu da büyüme faktörleridir. Protein yapıda olan bu bileşikler doku gelişimi ve yenilenmesi esnasında hücre tutunması, çoğalması ve farklılaşması gibi önemli fonksiyonlarda sinyal molekül olarak görev alırlar. Bugüne kadar anjiyogenez, kemik ve kırık doku yenilenmesi, yara iyileşmesi, karaciğer yenilenmesi ve sinir doku yenilenmesi gibi alanlarda büyüme faktörleri ve doku iskelelerinin bir arada kullanımı araştırılmıştır.

Nanolifli yapıda, büyüme faktörü içeren doku iskeleleri hazırlanmasına yönelik yapılan çalışmalar daha çok kemik ve kırık doku mühendisliği alanındadır. Örneğin WEI ve grubu (2006) platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) hapsedilmiş poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) mikroküreciklerini poli (L-laktik asit) (PLLA) sentetik polimeri kullanarak elde ettikleri nanolifli doku iskelelerinin üzerine tutturmuşlardır. Böylelikle büyüme faktörünün bir anda ve çok hızlı salımının engellendiği, daha uzun süreli ve kontrollü bir şekilde salımının gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Salımı gerçekleşen büyüme faktörünün biyolojik aktivitesini koruduğu, yapı üzerine ekilen insan gingival fibroblast hücrelerinde DNA sentezinin uyarılması ile saptanmıştır. Yine aynı grup kemik doku büyüme faktörü olan BMP'yi (kemik morfogenetik proteini) PLGA mikrokürecikler içerisine yüklemiş ve bu yapıyı da nanolifli poli(L-laktik asit) (PLLA) doku iskelesi üzerine tutturmuştur. Araştırma sonucunda PLGA' nın küreciklerden sürekli ve kontrollü bir şekilde salımı ve yeni kemik dokusu oluşumu gözlenmiştir (WEI ve grubu, 2007). Wei ve grubu yaptıkları bu çalışmalarda mikroküreciklerin doku iskelesine tutunmasıyla makro gözenekliliğin de bozulmadığını belirlemişlerdir. NIU ve grubu (2009) sentetik ve doğal polimerlerin karışımından oluşan hidroksiapatit/kollajen/PLLA doku iskelesi üretmiş,

kitosan mikroküreler içine hapsedilen BMP'yi doku iskelesi üzerine tutturmuşlardır. Kontrollü bir şekilde BMP salımının gözlemlendiği bu yapı üzerine tavşan kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücreler ekilmiş ve bu hücrelerde alkalın fosfat ifadesindeki artış ile salınan proteinin aktif formda olduğu gösterilmiştir.

Sinir doku mühendisliği alanında bugüne kadar yapılan çalışmalarda, nanolifli yapı ve büyüme faktörlerinin kullanımı konuları ayrı ayrı ele alınmıştır. Örneğin XU ve grubu (2010) biyobozunur ve toksik olmayan poli(hidroksialkanoat) (PHA) polimerini kullanarak sinir hücrelerinin büyüme ve farklılaşması üzerine nanolifli yapının etkisini araştırmak amacıyla film ve nanolifli yapıda doku iskeleleri üretmişlerdir. Ürettikleri nanolifli doku iskelesinin yapısal olarak hücre dışı matrise benzer olduğunu, sinir hücresi büyümesini desteklediğini ve film ile karşılaştırıldığında daha güçlü hücre tutunmasını sağladığını ve daha yüksek canlılık oranları gösterdiğini belirlemişlerdir. ALVAREZ-PEREZ ve grubu (2010) elektro dokuma yöntemiyle sentetik polimer poli ( $\epsilon$ -kaprolakton) (PCL) ile doğal polimer jelatini kullanarak nanolifli yapıda kompozit doku iskelesi oluşturmuşlardır. Doku iskelesi üzerine PC-12 hücreleri ekilmiş, jelatinin yapıya eklenmesiyle hücre tutunması, çoğalması ve farklılaşmasında artış olduğu gözlenmiştir.

Sinir doku mühendisliğinde *in vitro* koşullarda sinir hücresi canlılığı ve farklılaşmasını sağlamak amacıyla sinir büyüme faktörü (NGF), beyin kökenli nörotrofik faktör (BDNF), nörotrofin-3 (NT-3), glial büyüme faktörü (GGF) ve fibroblast büyüme faktörü (FGF) kullanılmıştır. TAYLOR ve grubu (2004) omurilik incinmelerinde kullanılmak üzere bir sinir hücresi büyüme faktörü olan NT-3'ü heparin temelli bir salım sistemi aracılığıyla fibrinden elde edilen jele tutturmuşlardır. *In vitro* salım çalışmaları sunucunda, NT-3 yapıya direk olarak eklendiğinde ilk salımın çok hızlı olduğu ve yapıya yüklenen NT-3'ün %95 'inin ilk 3 gün içerisinde salındığı belirlenmiştir. Diğer taraftan, büyüme faktörü heparin vasıtası ile fibril jele tutturulduğunda ve NT-3'ün heparine oranı belli bir aralıkta tutulduğunda, yavaş ve kontrollü bir şekilde salınabileceği gösterilmiştir. Ayrıca araştırma sonucunda sadece fibrin içeren doku iskelesine oranla üzerine NT-3 tutturulmuş yapının çok daha fazla sinir hücresi büyümesi sağladığı gözlenmiştir.

LI ve grubu (2009) NT-3'ü kitosandan elde ettikleri doku iskelesi benzeri yapı üzerine tutturmuş ve fare omuriliğinden elde ettikleri sinir kök hücrelerini bu yapı üzerine ekmişlerdir. Sonuçlar bir taşıyıcı üzerine yüklenen NT-3'ün, sadece kitosan taşıyıcı veya günlük olarak kültür ortamına eklenen NT-3'e oranla, sinir kök hücrelerinin canlılığını arttırdığını göstermiştir. Spinal kök hücrelerin sinir hücresine farklılaşmasında sadece kitosan taşıyıcı sistemin %30, ortama günlük olarak eklenen NT-3'ün %50, üzerine NT-3 yüklenmiş kitosan taşıyıcının ise %70 düzeyinde etkili olduğu saptanmıştır. Yine aynı grup sinir kök hücrelerinin çoğalması ve sinir hücrelerine farklılaşması için aynı taşıyıcıdan salınması gereken en uygun NT-3 konsantrasyonunu 25 ng/gün olarak belirlemiştir (YANG ve grubu 2010). WITTMER ve grubu (2011) ipek solüsyonu içerisine BDNF ve silier nörotrofik faktör (CNTF) eklemiş ve elektro dokuma yöntemini kullanarak nano fibriller hazırlamışlardır. Araştırma sonucunda BDNF ve CNTF' nin nano liflerden az oranda ve sürekli olarak salındığını belirlemişlerdir. Daha sonra bu yapıların üzerine fare retinal gangliyon hücrelerini ekmişler ve sadece

ipek proteini içeren nanoliflerle karşılaştırıldığında BDNF içeren nano liflerin 2 kat, CNTF içeren nanoliflerin 2,5 kat, BDNF ve CNTF' nin her ikisini de içeren nanoliflerin ise 3 kat daha fazla sinir hücresi uzantısı sağladığını gözlemişlerdir.

Çevresel sinir sistemi hasarlarında, hasar gören kısımda iki sinir doku arasındaki boşluğu doldurarak bu bölgede hücre yenilenmesini sağlamak önemli sorunların başında gelmektedir. Sinir doku mühendisliğinin bu alandaki en önemli yaklaşımı iki sinir doku arasında kalan boşluğa yerleştirilen ve hücrelerin seçici olarak bir yöne doğru ilerlemesini sağlayan yönlendirilmiş doku iskeleleridir. Konuyla ilgili olarak WANG ve grubu (2011) elektro-dokuma yöntemi ile poli(propilen karbonat) polimerinden yönlendirilmiş ve rastgele nanoliflere sahip doku iskeleleri hazırlamışlar ve bu yapıların üzerine fare dorsal ganglia hücrelerini ve Schwann hücrelerini ekmişlerdir. Araştırma sonucunda hücre canlılığı açısından yönlendirilmiş ve rastgele nanolifli doku iskeleleri arasında anlamlı bir fark bulunmamış ancak yönlendirilmiş yapının nöritlerin uzaması ve Schwann hücrelerinin göçü açısından daha avantajlı olduğu belirlenmiştir. Yine bu konuda yapılan bir diğer çalışmada, (GUPTA ve grubu, 2009) yönlendirilmiş nanolifli yapı ve rastgele nanolifli yapının sinir hücrelerinin büyümesi üzerine etkileri araştırılmış, bu amaçla polikaprolakton/jelatin polimerlerinden elektrodokuma yöntemi ile doku iskeleleri üretilmiştir. Yapılan MTS analizi ve taramalı elektron mikroskobu görüntülerinde yönlendirilmiş ve rastgele nanolifli yapının her ikisinde Schwann hücrelerinin büyümesinde etkili olduğu gözlenmiştir. Elektro-dokuma yöntemi yanında SUN ve grubu (2012) faz ayırma ve kalıplama yöntemi ile sinir ve tendon rejenerasyonu çalışmalarında kullanılmak üzere poli(laktik asit) polimerinden nanolifli yapıda ve mikron boyutta kanallara sahip doku iskeleleri üretmişlerdir. Oluşturulan bu nanolifli doku iskelelerinin tekli ve çoklu kanalları ile hücre büyümesinde oryantasyonu sağlaması hedeflenmiştir. Memelilerde periferik sinir sisteminde hücreler hızlı ve doğru sinyal iletimini sağlamak amacıyla fasiküller içerisinde sıkıca paketlenmiş bir şekilde bulunurlar. Kanal yapısına sahip olarak üretilen doku iskelelerinin bu tüpsü yapıları taklit ettikleri ve aksonların belli bir doğrultuda uzamalarına, böylece yönlendirilmiş yeniden sinirlendirme (re-innervasyon) sağladıkları belirlenmiştir (MOORE ve grubu, 2006).

Yukarıdaki kısımda özetlendiği gibi literatürde nanolifli yapının farklı hücrelerin büyümesi üzerine olan etkisini inceleyen çalışmalar mevcuttur. Diğer taraftan NT-3'ün mikroküre içine hapsedilmeden, direk olarak doku iskelesine veya nano liflere tutturulduğu çalışma da vardır. Ancak, nanolifli yapıda ve büyüme faktörü NT-3 yüklü mikro kürecikleri taşıyan doku iskelelerinin hazırlanması ve karakterize edilmesine yönelik herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Mevcut çalışmalar doku iskelesinin yapısal ve mekanik özelliklerini incelemekten ziyade, iskele üzerine ekilen hücrelerin çoğalması ve farklılaşmasını incelemeye yöneliktir.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

#### 3.1. Malzemeler

Parafin (erime noktası 53–37°C), poli(vinil alkol)(molekül ağırlığı 31,000–50,000), Tip B jelatin, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimide (EDAC), N-hidroksi-süksinimid (NHS, 2-N-morfolino-etansulfonik asit hidrat (MES Hidrat), sodyum alginat, Tween 80 ve Span 80, Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide Sigma Aldrich' den n-Hekzan, sikloheksan, 1,4-dioksan, etanol, aseton, kalsiyum klorür, izo-oktan Merck'ten temin edilmiştir. Tüm deneylerde deiyonize su kullanılmıştır.

#### 3.2.Kalıp üretimi

Doku iskelelerinin hazırlanması için teflon bir plaka kalıp oluşturacak şekilde tasarlanmıştır. Hazırlanan kalıp çapları 1.7 cm ve derinlikleri 1.5 cm olan 20 kuyucuktan oluşmaktadır (Şekil 2). İki plakanın birleştirilmesi sonucu oluşan bu kalıbın üst plakası deliklerden oluşurken, alt plaka bu deliklere tam oturan yükselticiler içerir. Böylece montajı yapıldığında sıvı geçirgenliği olmayan demonte olduğunda ise oluşturulan malzemenin kolayca çıkarılabildiği bir kalıp yapısı üretilmiştir.



Şekil 2. 20 kuyucuklu teflon kalıp

Bu çalışmada hazırlanması hedeflenen yönlendirilmiş doku iskelesi üretiminde ise 300 µm çapa sahip olan akupunktur iğneleri kullanılmıştır. Mikron boyutta kanal oluşumunu sağlamak amacıyla iğnelerin her birinin etraflarına parafin sarılarak bir araya getirilmiş ve cam kapiler içerisine sokularak kalıp üretimi sağlanmıştır (Şekil 3).



Şekil 3. Cam kapiler kalıp

### 3.3. Gözenek oluşturuca ajan üretimi

Doku iskelesi üretiminde gözenek oluşturuca ajan olarak parafin küreler kullanılmıştır. Parafin kürelerin hazırlanması için parafin önceden 80°C' ye ısıtılmış %1.0' lik polivinil alkol (PVA) çözeltisinde emülsifiye edilmiştir. Bu çalışma süresince çeşitli hacimlerde PVA solüsyonu, çeşitli miktarlarda parafin ve çeşitli karıştırma hızları hedeflenen boyut ve dağılımda parafin kürecik üretimi için denenmiştir. Isıtıcı tabla üzerinde 55 °C' ye kadar ısıtılmış parafin, PVA çözeltisi üzerine eklenmiş ve mekanik karıştırıcı (IKA) ile 578rpm' de karıştırılmıştır. Daha sonra bu karışımın içerisine soğuk su ilave edilerek parafin küreciklerin katılması sağlanmıştır. Oluşturulan kürecikler 150 µm açıklığa sahip elek yardımıyla süzölmüş, elde edilen kürecikler PVA çözeltisini uzaklaştırmak amacı ile birkaç kez distile su ile yıkanmış ve havada kurumaya bırakılmıştır. Değişik koşullarda üretilen parçacıkların morfolojileri taramalı elektron mikroskobunda incelenmiştir. Daha sonra elde edilen kürecikler 150 µm, 250 µm, 425 µm ve 600 µm' lik eleklerde elenmiş boyutlarına göre ayrılarak desikatör içerisinde saklanmıştır.

### 3.4. Jelatin doku iskelelerinin hazırlanması

0.4 g parafin kürecik teflon kalıba aktarılmış ve eklenen kürelerin yüzeyi düz bir metal yardımıyla hizalanmış, birbirleriyle bağlantılı bir yapı oluşumunu sağlamaları için 37°C' de 20, 50, 200 ve 400 dakika bekletilmişlerdir.

#### 3.4.1. Nanolifli doku iskelelerinin hazırlanması

Bu çalışmada doku iskelesi hazırlanırken ısı etkili faz ayırma tekniği, gözenek oluşturma tekniği ve kalıplama tekniği birarada kullanılmıştır. Doku iskelesi matriksini oluşturacak olan jelatin çözeltisi 1:1 oranında etanol su karışımı ile hazırlanmış ve 45 °C' ye ısıtılmıştır. Daha sonra bu çözelti parafin küreciklerin içinde bulunduğu teflon kalıba eklenerek, faz ayırımı için -80 °C' de 5 saat bekletilmiştir. Daha sonra içerisinde jelatin/parafin kompozitleri bulunduran kalıp 24 saat süresince -20°C' de tutulmuştur. Bu süre sonunda jelatin/parafin kompozitler teflon kalıptan çıkarılmış ve çözücü değişimi için 1,4-dioksan içerisinde 24 saat bekletilmiştir. Ardından, 1,4-dioksanın uzaklaştırılması için 1 saat azot enjeksiyonlu evaporasyon gerçekleştirilmiştir. Kompozitler 4 gün boyunca dondurularak kurutulmuş ve parafin kürelerin uzaklaştırılması için jelatin/parafin kompleksi hekzan içerisine daldırılmıştır. Parafin küreciklerin çözünürlüğünü arttırmak için bu işlem 37°C' de gerçekleşmiştir. Doku iskelesinden hekzanı uzaklaştırmak için siklohekzan kullanılmıştır. Doku iskelesi daha sonra 4–5 gün boyunca dondurularak kurutulmuştur (Liu ve Ma, 2009). Doku iskelesi üretimi esnasında jelatin konsantrasyonu % 5 ve % 10, parafin kürelerin boyutları ise 250–420 µm ve 420–600 µm arasında değiştirilmiştir.

#### 3.4.2. Katı duvarlı doku iskelelerinin hazırlanması

Katı duvarlı doku iskelelerinin hazırlanmasında ısı etkili faz ayırımı hariç olacak şekilde benzer bir yöntem izlenmiştir. Jelatin solüsyonu parafin kürelerin üzerine eklendikten sonra oluşan jelatin



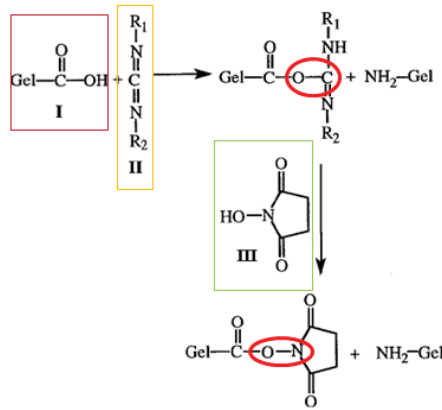
parafin kompozit yapı bir hafta süresince havada kurumaya bırakılmıştır. Yapıdan parafin kürecikleri uzaklaştırmak için üretilen kompozitler hekzan içerisinde tutulmuş ve katı duvarlı doku iskelesi direk havada kurutulmuş elde edilmiştir.

### 3.4.3. Yönlendirilmiş doku iskelelerini hazırlanması

Kalıp üretiminin ardından jelatin çözeltisi kalıp içerisine enjekte edilmiştir. Cam kalıpta ısı etkili faz ayrımı için çeşitli sıcaklık (-80°C, -20°C ve +4°C) ve etanol su karışımları denenmiştir. Faz ayrımından sonra kalıp çözünen değişimi için 24 saat boyunca etanol içerisinde ve -20°C' de tutulmuştur. Bu süre içerisinde oluşan matriks iğnelerden ve cam kalıptan ayrılmıştır. Daha sonra elde edilen doku iskelesi yapının stabilitesi için 2 gün 1,4-dioksan içerisinde bırakılmış fazla dioksan kurutma kağıdı ile alınmış, 2 gün boyunca dondurularak kurutulmuştur.

### 3.5. 3D nanolifli jelatin doku iskelesini kimyasal olarak çapraz bağlama

Bu çalışmada çapraz bağ ajanı olarak suda çözünebilir ve toksik olmayan 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimide (EDAC) ile N-hidroksi-süksinimid (NHS) kullanılmıştır (Şekil 4). Reaksiyon 0.05 M 2-N-morfolino- etansulfonik asit hidrat (MES Hidrat) içerisinde gerçekleştirilmiştir. MES Hidrat çözeltisi hazırlanırken su yerine 90/10 (v/v) oranında aseton-su karışımı kullanılmıştır. Doku iskelesi bu kimyasallarla +4°C' de 24 saat muhafaza edildikten sonra distile suyla yıkanmış ve -20 °C' de 12 saat dondurulduktan sonra 2 gün dondurarak kurutma işlemine maruz bırakılmıştır.



Şekil 4. Jelatinin EDC ve NHS ile çapraz bağlanma reaksiyonu I; jelatin, II; EDC, III; NHS.

### 3.6. Büyüme faktörü taşıyan mikrokürelerin hazırlanması

#### 3.6.1. Kitosan mikrokürelerin üretimi

Kitosan mikrokürelerin hazırlanmasında tripolifosfatla (TPP) iyonik jelleşmesi yöntemi kullanılmıştır. Kitosan polimeri tanecik üretiminden önce 1M NaOH çözeltisi ile 2 saat 70 °C bir öncü işleme tabi tutulmuştur. Daha sonra süzülen kitosanlar 40 °C' de 12 saat kurumaya bırakılmıştır. NaOH ile muamele edilen kitosanlar 0.1 M asetik asit içerisinde çözülmüş ve çözülmemiş partiküller

filtrelenerek uzaklaştırılmıştır. Bu çözeltinin pH sı 1M NaOH kullanılarak pH 8.0 'a ayarlanmış ve çöken beyaz kitosan parçacıklar deiyonize su ile yıkandıktan sonra 3 gün boyunca vakumlu etüvde kurutulmuştur.

Mikroküre hazırlamak için öncü işleme tabi tutulan kitosanın %1 (v/v) asetik asit solüsyonunda 0.50, 0.75, 1.00, 1.25 (mg/ml) lık solüsyonları hazırlanmıştır. Partikül agregasyonunu engellemek için çözeltiliye 0.5% (v/v) surfactant Tween 80 eklenmiştir. Hazırlanan çözeltinin pH'ı 4.8' e ayarlanmıştır. Farklı konsantrasyonlarda TPP çözeltileri hazırlanmıştır (0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 2.50 ve 5.00 (mg/ml)). Hazırlanan TPP çözeltileri 2.5:1(v/v) (kitosan: TPP) olacak şekilde karıştırılmıştır. Saydam çözeltinin renginin opaklaşması partikül oluşumu göstergesi olarak kabul edilmiştir. Hazırlanan partiküllerin boyutları dinamik ışık saçılım spektrometresi ile ölçülmüştür.

### 3.6.2. Alginat mikro kürelerin üretimi

Alginat mikropartikül üretimi su yağ emülsiyonu içerisinde alginatın kalsiyum iyonu ile retikülasyonu ile gerçekleşmiştir (CIOFANI ve grubu, 2008). Yağ fazı olarak izooktan kullanılmış ve bu faz lipofilik ve hidrofilik emülsifiye edici ajan olan Span 80 ve Tween 80 ile karıştırılmıştır. Partikül üretiminde 20 mL izooktan içerisine 550 µL Span 80 ve 450 µL Tween 80 eklenmiştir. 4 mL alginat çözeltisi bu karışıma eklendikten sonra 15,000 rpm de homojenizasyon başlatılmış ve 2 mL 100% (w/v) CaCl<sub>2</sub> bu esnada eklenmiştir. Homojenizasyon artı 30 saniye daha devam ettirildikten sonra elde edilen emülsiyon yağ, su ve tanecik fazının ayırımı için bir süre bekletilmiştir. Yağ fazı uzaklaştırıldıktan sonra tanecikler 20 mL deiyonize su ve 2 mL asetonla yıkanmış ve 9500 rpm' de 5 dakika santrifüjlenip toplanmıştır. Daha sonra tanecikler bir kez daha su ile yıkanarak aseton tamamen uzaklaştırılmıştır. Alginat mikrokürelere protein yüklenmesi katı haldeki proteinin alginat solüsyonu içerisine eklenmesi ile gerçekleşmiştir.

### 3.7. Protein yüklenme kapasitesinin belirlenmesi

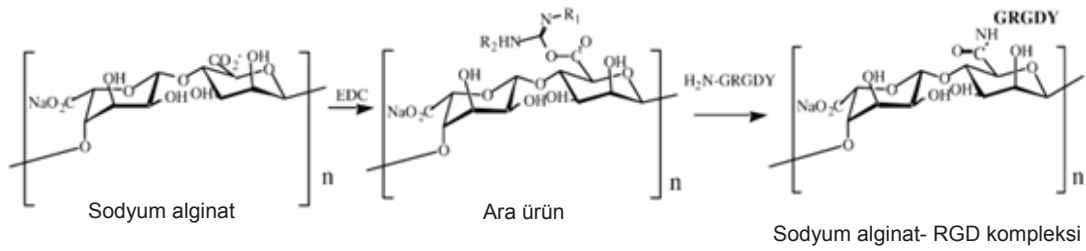
Mikroküreler içerisine yüklenen protein miktarı BCA (bicinchonacid) metodu ile tayin edilmiştir. Bir seferde elde edilen partiküllerin üzerine 10 mL 2M NaOH eklenmiş ve bir gece 140 rpm' de sodyum iyonu ile kalsiyum iyonunun yer değiştirmesi ve parçacıkların parçalanıp içerisindeki proteini salması için inkübe edilmiştir. BCA analizi öncesi nötralizasyon reaksiyonu için 10 mL 2M HCl eklenmiş ve 8000 rpm' de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Daha sonra bu çözeltiliden 150 µL 96 kuyulu plaka içerisine aktarılmış ve üzerine 150 µL BCA çözeltisi eklenmiştir. Plaka 37 °C' de 2 saat tutulmuş ve oda sıcaklığına soğutulmuş 562 nm' de absorbans değeri okunmuştur. Kalibrasyon eğrisi α-kemotripsinin bilinen konsantrasyonları kullanılarak hazırlanmıştır. α-kemotripsin yüklü kitosan mikrokürelerin yüklenme kapasitesi ve kapsülleme etkinliği aşağıdaki eşitlikler kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Yüklenme kapasitesi(\%)} = 100 \times \frac{\text{Yüklenen } \alpha\text{-kemotripsinin miktarı}}{\text{Mikrokürelerin ağırlığı}}$$

**Kapsülleme etkinliği(%)** = 100 x Yüklenen  $\alpha$ -kemotripsinin miktarı / Toplam  $\alpha$ -kemotripsinin miktarı

### 3.8. Nanolifli jelatin doku iskelesine protein yüklenmiş alginat mikrokürelerin sabitlemesi

Alginat polimer zinciri RGD dizisi gibi hücre adhezyon molekülleri ile modifiye edilebilecek fonksiyonel karboksilik grupları içerir (Rowley ve grubu 1999). Jelatin polimeri kollajenin bir derivatı olduğundan yapısında RGD aminoasit dizilerini içerir. Jelatin doku iskelesi üzerine alginat mikrokürecikleri tutturma işlemi için alginat polimer zincirindeki karboksilik asit gruplarını aktive edici ajan olarak EDC kullanımı oldukça yaygındır (Şekil 5). Bu çalışmada EDC aynı zamanda jelatin doku iskelelerini çapraz bağlamada da kullanıldığı için hazırlanan doku iskeleleri çapraz bağlanırken aynı reaksiyonla alginat taneciklerinde doku iskelesi üzerine kovalent bağ ile bağlanması gerçekleştirilmiştir.



**Şekil 5.** Alginat ve RGD (jelatin) in EDC varlığında çapraz bağlanması

Katyonik bir boya olan toluidin mavisi polisakaritleri mor renge boyar (LEE ve grubu, 1997). Bizim çalışmamızda protein yapıda olan jelatin doku iskelesi üzerine polisakarit yapıda olan alginatın tutturulduğunun belirlenmesinde bu boya kullanılmıştır. EDC çözeltisi içerisinde bulunan çapraz bağlanmış doku iskeleleri üzerine alginat mikrokürecikler bırakılmış 24 saat +4° C de inkübasyondan sonra doku iskeleleri su ile yıkanmış ve üzerlerine 500  $\mu$ L toluidin mavisi eklenmiştir. 3 dakika sonra doku iskeleleri 3 kez su ile yıkanmıştır.

### 3.9. Mikro taşıyıcılardan protein salım kinetiğinin belirlenmesi

Protein yüklü küreciklerden protein salımı için 3 mg kurutulmuş kürecik 1 mL PBS (pH=7.4) içerisinde 37°C de inkübe edilmiştir. Belli zamanlarda ortam 8000 rpm' de 10 dakika santrifüjenmiş, süpernatant başka bir tüpe aktarılmış ve tanecikler üzerine 1 mL PBS eklenmiştir. Örnekler analize kadar -20°C' de saklanmıştır. Salınan protein miktarı BCA analizi ile belirlenmiştir.

### 3.10. Doku iskelesinin karakterizasyonu

Farklı boyutlarda parafin küreler kullanılarak üretilen nanolifli doku iskelelerinin yüzey morfolojisi, lif çapı ile uzunluğu taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile belirlenmiştir. Mekanik özellikler örnekler 24 saat PBS içerisinde ıslatıldıktan sonra ölçülmüştür. Oluşturulan doku iskelesinin gözenekliliği ( $\epsilon$ ) aşağıdaki eşitlik yardımıyla belirlenmiştir.

$$\epsilon = 1 - D_p / D_0$$

Burada  $D_p$  oluşturulan jelatin iskelenin yoğunluğudur ve  $D_p = 4m / (\pi d^2 h)$  ifadesiyle hesaplanır. Bu ifadedeki  $m$ ; kütleyi,  $d$ ; çapı,  $h$ ; iskelenin kalınlığını ifade eder.  $D_0$  ise jelatinin yoğunluğudur ve tip B jelatin için bu değer  $1.35 \text{ g/cm}^3$  tür.

### 3.11. Doku iskelelerinin bozunma oranlarının belirlenmesi

Doku iskelelerinin bozunma oranlarını belirlemek için başlangıçtaki kuru ağırlıkları tartılacak ve W1 olarak kaydedilecektir. Daha sonra örnekler *in vitro* olarak PBS ve zamana bağlı bozunma hızı takip etmek amacıyla örnekler belli sürelerde çözeltiden alınacak ve distile su ile çalkalanıp dondurarak kurutulacaktır. Kurutma sonunda elde edilen iskelelerin ağırlıkları tartılacak ve W2 olarak kaydedilecektir. Doku iskelelerinin parçalanma yüzdeleri aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanacaktır.

$$\text{Parçalanma ağırlığı (\%)} = (W1 - W2) / W1 \times 100$$

### 3.12. Hücre kültürü

PC-12 hücre kültürü için hücre kültür kapları  $0.1 \text{ mg/mL}$  poli-L-lizin ile kaplanmıştır. Hücre hattı  $37^\circ\text{C}$ ' de  $\%5 \text{ CO}_2$  inkübatöründe uygun konsantrasyonlarda L-Glutamin, penicilin( $50 \text{ U/ml}$ ) ve streptomycin ( $50 \text{ U/ml}$ ) içeren  $\%10$  at serumu ve  $\%5$  fetal calf serum ilaveli RPMI 1640 besiyerlerinde inkübe edilmiştir. 2-3 gün arayla hücrelerin besiyerleri tazelenmiş ve hücreler  $\% 70-80$  konfluensiye ulaştığında pasajlanmıştır. Hücreler büyüme faktörü uygulanmadan önce bir gece starvasyona maruz bırakılmıştır. Hücrelerin farklılaşması için besiyeri ortamı olarak L-Glutamin, penicilin( $50 \text{ U/ml}$ ) ve streptomycin ( $50 \text{ U/ml}$ ) içeren  $\%1$  at serumu ilaveli RPMI 1640 kullanılmıştır.

PC-12 hücrelerinin büyüme eğrilerini hazırlamak için Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide ile MTT yöntemi kullanılmıştır. Hücreler 96 kuyucuklu plakaya ekilmiş belli inkübasyon süresi sonunda kuyucuklara  $5 \text{ mg/ml}$  Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide çözeltisinden  $15 \mu\text{l}$  eklenmiştir. 4 saat  $37^\circ\text{C}$  de inkübe edildikten sonra ortam çekilmiş ve kuyucuklara  $100 \mu\text{l}$  DMSO ilave edilerek oluşan formazan tuzlarının çözülmesi sağlanmış,  $540 \text{ nm}$ ' de absorbans değerleri okunmuştur.

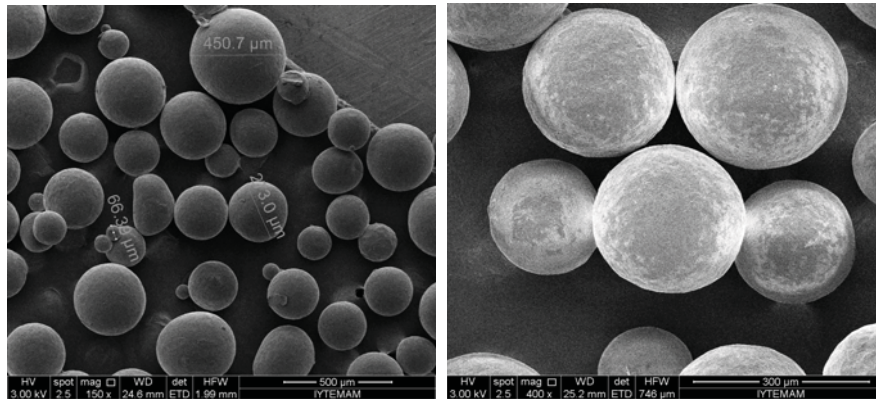
## 4.BULGULAR ve TARTIŞMA

### 4.1.Gözenek Oluşturucu Ajan Üretimi

Bu çalışmada gözenek oluşturucu ajan olan parafin küreleri üretmek için dispersiyon yöntemi kullanılmıştır. Parafin kürelerin hazırlanması için parafin önceden ısıtılmış polivinil alkol (PVA) çözeltisi içerisinde emülsifiye edilmiştir. Ma ve grubu (2000) yaptıkları çalışmada PVA konsantrasyonu ve çözelti karıştırma hızının kürecik boyut dağılımı ve şekli üzerinde önemli bir etkisi olduğunu belirlemiştir.Yüksek karıştırma hızı ve yüksek PVA konsantrasyonunun küçük ve dar dağılıma sahip kürecik üretimini sağladığı, düşük karıştırma hızı ve PVA konsantrasyonunun ise kürecik boyutunu artırıp küreselliği bozduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada uygulanan kürecik hazırlama koşulları ve buna bağlı olarak elde edilen ürünlerin özellikleri Tablo 1' de özetlenmiştir. İyi bir dağılıma sahip küresel parçacık hazırlamak için çözelti hacminin önemli olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Ayrıca karıştırma hızı arttıkça daha küçük boyutlu tanecikler elde edildiği gözlenmiştir. Parafin küre üretiminde PVA çözeltisi hacmi 600 ml ve karıştırma hızı da 578 rpm olarak seçilmiştir. Bu karıştırma hızında 12 g kadar parafin tanecik halinde elde edilebilmiştir (Şekil 6).

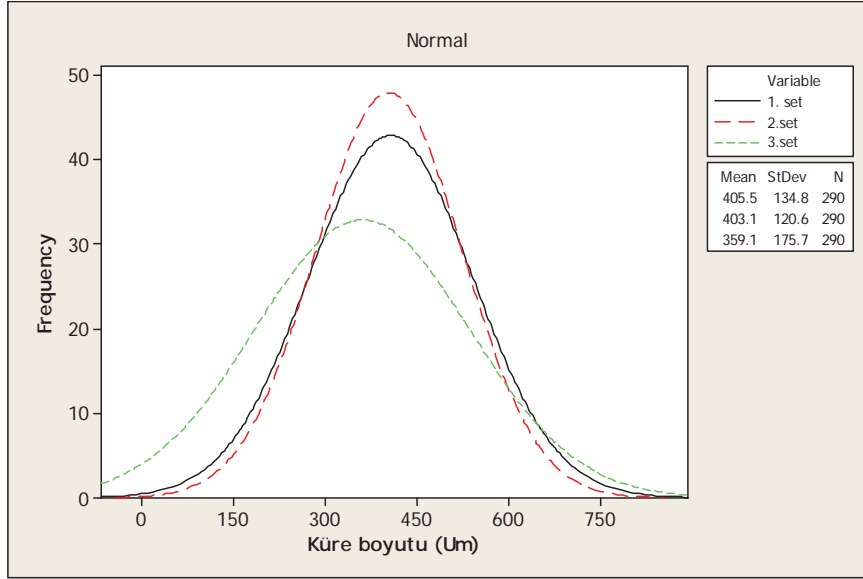
**Tablo 1.** Dispersiyon yöntemi ile parafin kürecik hazırlama koşulları ve buna bağlı olarak elde edilen ürün karakterleri

%1 PVA çözeltisi hacmi (ml)	Parafin miktarı (g)	Karıştırma hızı (rpm)	Oluşan son ürün
100	5	320	Şaft etrafında kümelenmiş ipliksi yapı oluşumu
200	5	400	Şaft etrafında kümelenmiş ipliksi yapı oluşumu ve sferik olmayan parafin tanecikler
400	5	400	Şaft etrafında kümelenmiş ipliksi yapı oluşumu, paraffin kürecikler
600	12	500	Farklı boyutlarda parafin kürecikler
600	12	578	Boyut dağılımı benzer parafin kürecikler



**Şekil 6.** 600 ml PVA çözeltisi ve 578 rpm karıştırma hızında hazırlanan küreciklerin taramalı elektron mikroskobu görüntüleri

Parafin küre hazırlama koşulları optimize edildikten sonra deneyin tekrarlanabilirliğini belirlemek için 3 farklı sette hazırlanan parçacıklar çift taraflı bantla lam üzerine yapıştırılmış ve faz kontrast mikroskop altında boyutları ölçülmüştür (Şekil 7). Her bir set için yaklaşık 300 ölçüm alınmış ve parçacıkların dağılımı ile ortalamaları Şekil 7 ve Tablo 2 de özetlenmiştir. Sonuçlardan da anlaşıldığı üzere üretilen küreciklerin boyutu 100-800  $\mu\text{m}$  arasındadır ve 400  $\mu\text{m}$  boyutundaki kürecikler dağılım olarak baskındır.



Şekil 7. 3 farklı sette hazırlanan parafin kürelerin dağılımları

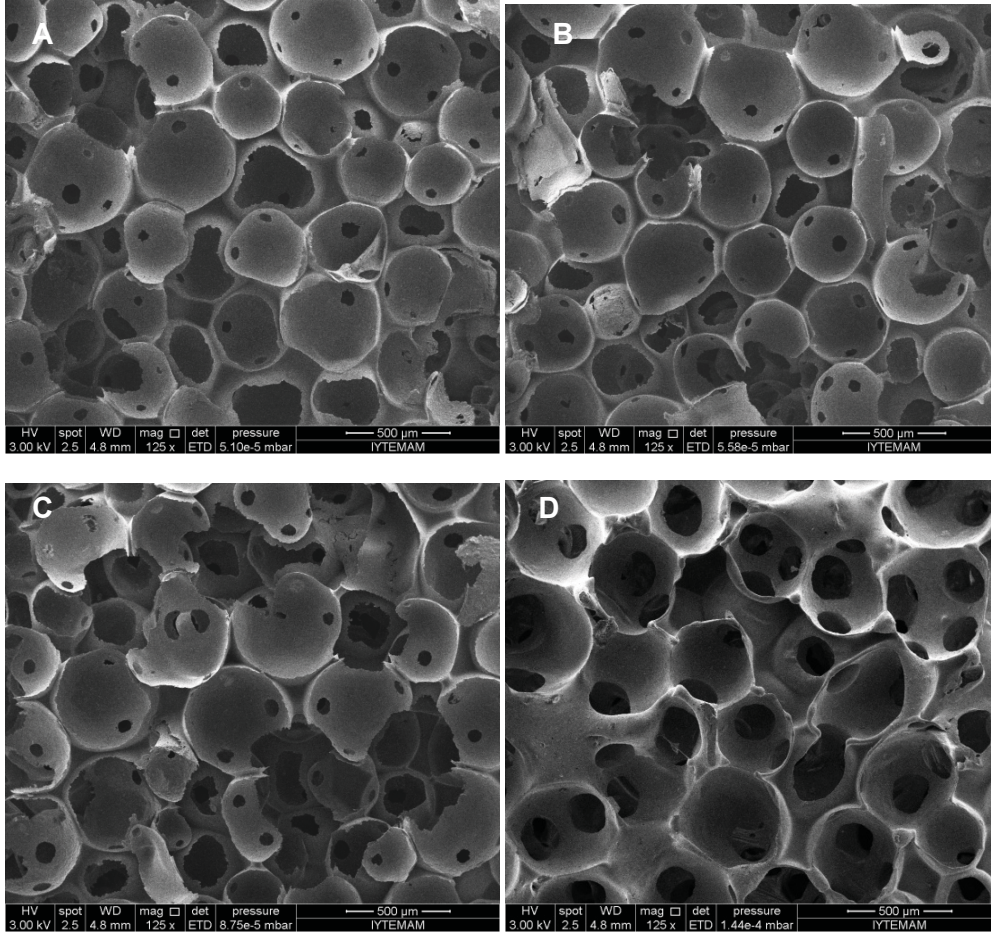
Tablo 2.3 Farklı sette hazırlanan kürelerin ortalaması

	Maksimum boyut ( $\mu\text{m}$ )	Minimum boyut ( $\mu\text{m}$ )	Ortalama ( $\mu\text{m}$ )	Standart Sapma ( $\mu\text{m}$ )
1	836,3	119,5	406,7	134,0
2	829,5	128,0	402,5	121,3
3	865,3	101,6	359,1	175,7

#### 4.2. Jelatin Doku İskelelerinin Hazırlanması

Jelatin doku iskelesi hazırlanması için 0.4 g parafin kürecik teflon kalıba aktarılmış ve eklene kürelerin yüzeyi düz bir metal yardımıyla hizalanmıştır. Parafin küreler birbirleriyle bağlantılı bir yapı oluşumunu sağlamaları için 37°C' de 20, 50, 200 ve 400 dakika bekletilmiştir. Şekil 8' de farklı sürelerde ısı inkübasyonuna maruz bırakılan parafin kürelerle hazırlanmış doku iskeleleri görülmektedir. Parafin küreler hekzanla uzaklaştırıldıktan sonra oluşan gözeneklerin bağlantıları 20, 50 ve 200. dakikalarda çok farklı değildir. Oysa 400 dakika 37°C de inkübe edilen küreciklerin birbirleriyle bağlantılı gözenek yapısını sağladığı görülmektedir. Bu nedenle doku iskeleleri

hazırlanırken bağlantılı gözenek yapısının doku iskelesi karakterizasyonu üzerine etkisini araştırmak için 200 ve 400 dakika inkübasyon süresi kullanılmıştır.



**Şekil 8.** 37°C ısıya farklı sürelerde tutulan parafin kürelerle hazırlanmış doku iskeleleri A-20 dakika, B-50 dakika, C- 200 dakika, D- 400 dakika.

#### 4.2.1. Nanolifli ve Katı Duvarlı Doku İskelelerinin Hazırlanması

Jelatinin erime noktası 37°C olduğu için hazırlandıktan sonra belli bir süre oda sıcaklığında tutulup damla damla kalıba eklendiğinde kalıbın tabanına ulaşmadan donmuş, bu durum doku iskelesinin bütünlüğüne zarar vermiştir. Bu nedenle jelatin çözeltisi kalıba aktarılırken 40 °C' lik su banyosu içerisinde tutulmuştur. Şekil 9'da hazırlanan nanolifli ve düz duvarlı doku iskeleleri görülmektedir.



**Şekil 9.** %5 jelatin konsantrasyonu ile hazırlanan nanolifli (solda) ve katı duvarlı (sağda) doku iskelelerinin genel görünüşü.

#### 4.2.2. Yönlendirilmiş Doku İskelelerinin Hazırlanması

Makro gözenekli ve gözenekleri birbirleriyle bağlantılı doku iskelelerinin hazırlanmasından sonra sinir doku mühendisliğinde özellikle çevresel sinir sistemi yenilenmesinde avantajı bilinen yönlendirilmiş doku iskelelerinin hazırlanması hedeflenmiştir. Böyle bir yapının üretimi için SUN ve grubunun (2012) kullandığı kalıplama ve ısı etkili faz ayrımı tekniği kullanılmıştır. Bu yapıda kalıplama yöntemi kanallı yapı ile hücreleri yönlendirmek için ısı etkili faz ayrımı ise hücre dışı matrisi nano boyutta taklit etmesi nedeniyle kullanılmıştır.

Doku iskelesinde kanallı yapı oluşturmak için akupunktur iğneleri cam kapiler içerisine yerleştirilmiştir. İğneler kalıba yerleştirilmeden önce kalıp içerisinde sabit durmaları için uç kısımları parafilm ile sarılarak bir araya getirilmiştir. Bu şekilde cam kapiler içerisine 1 tane, 4 tane ve 7 tane iğne yerleştirilmiştir.

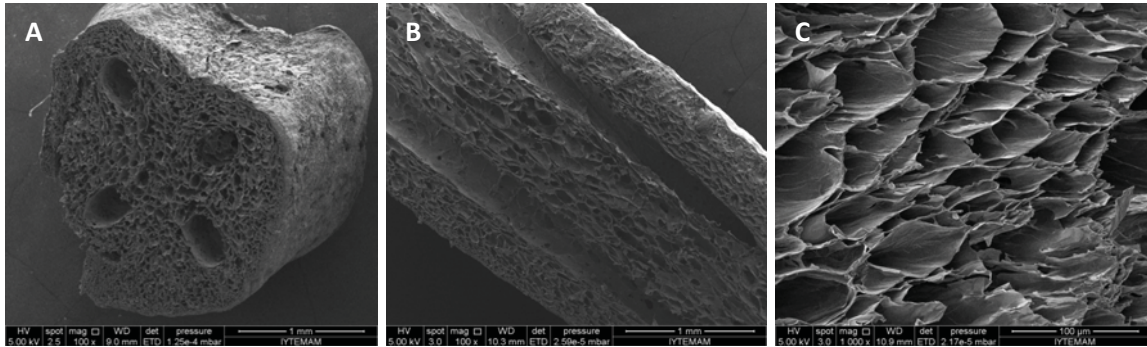
Kalıp hazırlanma işleminden sonra ısı etkili faz ayrımı ile nano lifli doku iskelesi üretimine başlanmıştır. 1:1 (v/v) etanol su karışımı içerisinde hazırlanan %5 jelatin çözeltisi hazırlanan kalıba enjekte edilmiş ve standart prosedürde olduğu gibi faz ayrımı için  $-80^{\circ}\text{C}$ ' de 5 saat tutulduktan sonra kalıp soğuk etanole alınmıştır. Etanol içerisinde 24 saatlik inkübasyon süresi içerisinde oluşan matris kalıptan çıkarılmaya çalışıldığında jelatinin solüsyon fazından jel fazına geçmediği gözlenmiştir. Bu durum cama etki eden ısının jelatinin faz ayrımına geçmesi için yeterli olmadığını göstermiştir. Faz ayrımı yönteminde homojen olarak hazırlanan polimer solüsyonu termodinamik olarak polimerce zengin ve polimerce fakir fazlara ayrılır. Bu ayrım genellikle polimer çözeltisi soğutulmuş veya polimerin çözücüsü olmayan başka bir çözügenin içerisine eklenmesiyle sağlanır (SHAO ve grubu 2012). Etanol jelatinin çözücüsü değil iken su çözücüdür. Bu nedenle tam bir faz geçişi ve jel oluşumunu görebilmek için sadece jelatinin çözücüsü olan su ile denemeler yapılmıştır.  $-80^{\circ}\text{C}$  de 5 saatlik faz ayrımı ve 24 saatlik etanol inkübasyonundan sonra doku iskelesi üretimi gerçekleştirilmiştir (Şekil 10).





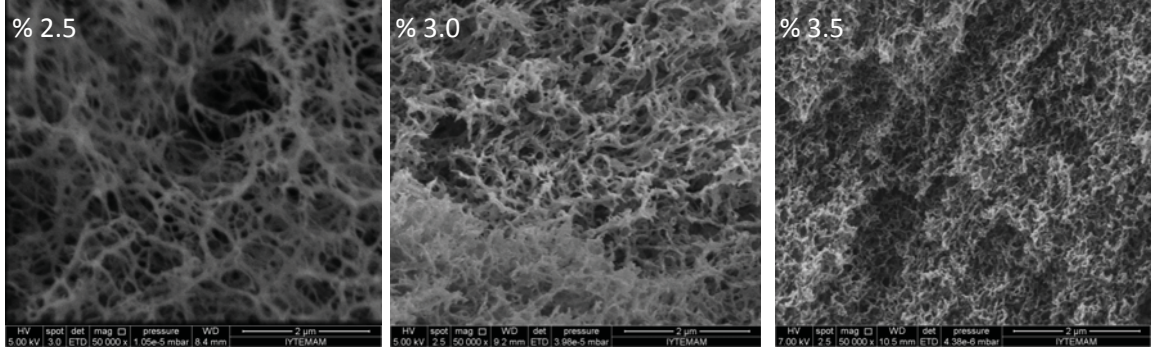
**Şekil 10.** %5 jelatin konsantrasyonu ile hazırlanan yönlendirilmiş doku iskelesi genel görünüşü

Elde edilen doku iskelesi taramalı elektron mikroskopunda incelendiğinde yapının nano lifli olmadığı düz duvarlı ve kendiliğinden mikro kanallara sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 11 A-C). Literatür araştırması sonucu bu tür yapıların ısı etkili faz ayrımının bir türü olan katı-sıvı faz ayrımı ile polimer çözeltisinin sıcaklığının çözücünün donma (kristalizasyon) noktasının çok altına düştüğü koşullarda elde edildiği bilgisine ulaşılmıştır (ZHANG ve grubu, 1999). Kristalizasyondan sonra çözücü uzaklaştırıldığında kristallerin olduğu yerlerde ısı transferi doğrultusunda kanal benzeri yapılar oluştuğu belirlenmiştir. Bu bilgiler ışığında katı-sıvı faz ayrımı yerine sıvı-sıvı faz ayrımı sonucu nanolifli yapı elde edebilmek için suyun donma noktasına yakın sıcaklıklarda çalışılmasına karar verilmiştir. Yapılan pek çok deneme sonunda + 4°C' de gerçekleşen faz ayrımı ve % 2-3 jelatin konsantrasyonunda nanolifli yapı elde edilmiştir (Şekil 12).



**Şekil 11.** Katı-sıvı faz ayrımı sonucu oluşan katı duvarlı doku iskelesi A; dikey kesit, B; düz yüzey ve mikro kanal yapısı C; yatay kesiti

Nano lifli matrislerin lif çapı ve uzunluğunun polimer konsantrasyonu ile değişimi incelenmiştir (Tablo 3). Hazırlanan matrislerin lif çapı uzunluklarının doğal hücre dışı matrisin çapı (50-500 nm) ile uyumlu olduğu görülmüştür. Ayrıca, matrislerin % 90 ve üzeri gözenekliliğe sahip olduğu ve polimer konsantrasyonu arttıkça lif çapı artarken lif uzunluğunun azaldığı belirlenmiştir.



**Şekil 12.** Sıvı-sıvı faz ayrımı ve farklı konsantrasyonlarda hazırlanan nano lifli matrisler

**Tablo 3.** Nanolifli matrislerin lif uzunluğu ve çapı

% Jelatin Konsantrasyonu (w/v)	Lif Uzunluğu (nm)	Lif Çapı (nm)
2.5	218.5	39.2
3.0	204.7	44.7
3.5	190.8	50.6

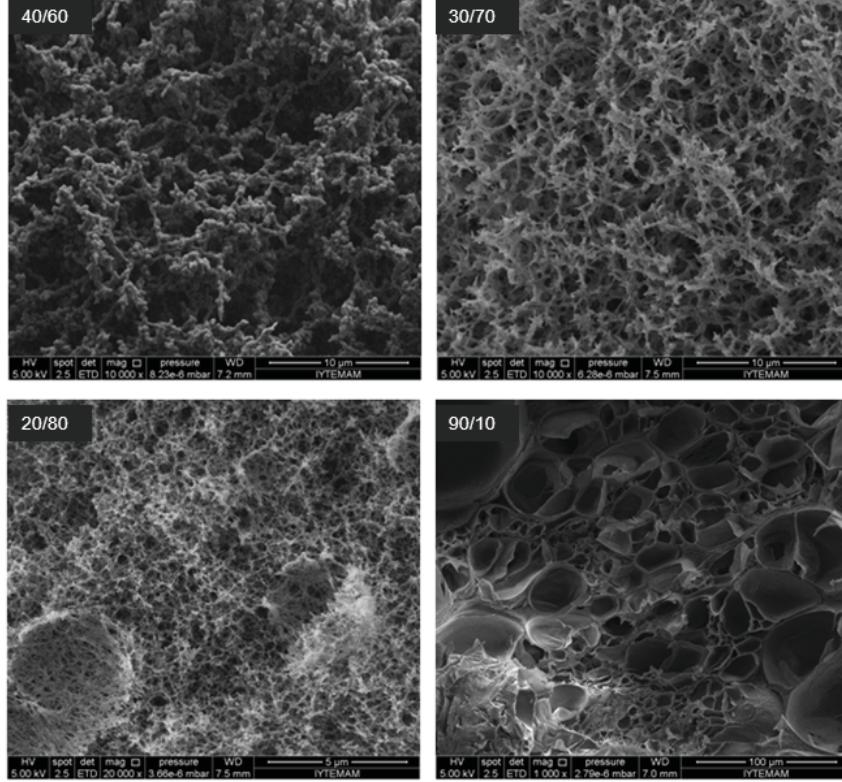
**Tablo 4.** Nanolifli matrislerin gözenekliliği

% Jelatin Konsantrasyonu (w/v)	Gözeneklilik (%)
2.0	93.5
2.5	92.8
3.0	92.3
3.5	91.4
4.0	90.0

+4 °C de hazırlanan doku iskeleleri nanolifli bir yapıyı sağlamakla birlikte cam kalıptan çıkarma esnasında yaşanan zorluk problem oluşturmuştur. Hem nanolifli yapıyı korumak hem de kalıptan kolay çıkan bir doku iskelesi üretimi için alkol su karışımlarının (40/60, 30/70, 20/80, 10/90 (v/v)) donma noktaları baz alınarak faz ayrımı – 20° C' de gerçekleştirilmiştir (Tablo 5). Şekil 13' da görüldüğü gibi 10/90 (v/v) etanol/su sistemi hariç diğer çözücü karışımlarında nanolifli yapı elde edilmiştir. Hazırlanan çözücü karışımındaki etanol oranı azaldıkça oluşan liflerin karakteri değişmiştir. 40/60 (v/v) etanol/su sisteminde kürecik benzeri yapılar, etanol oranı 30'a düşürüldüğünde ise nanoliflerin üzerinde yıldız benzeri yapılar gözlenmiştir. 20/80 (v/v) etanol/su sisteminde nanolifler çok belirgin ve düzgündür ancak su kristallerinden kaynaklanan çukur yapılar oluşmaya başlamıştır. Bu nedenle daha sonraki çalışmalar için 25/75 (v/v) etanol/su sistemi kullanılmasına karar verilmiştir.

**Tablo 5.** Etanol su karışımlarının donma noktaları (WEB\_1)

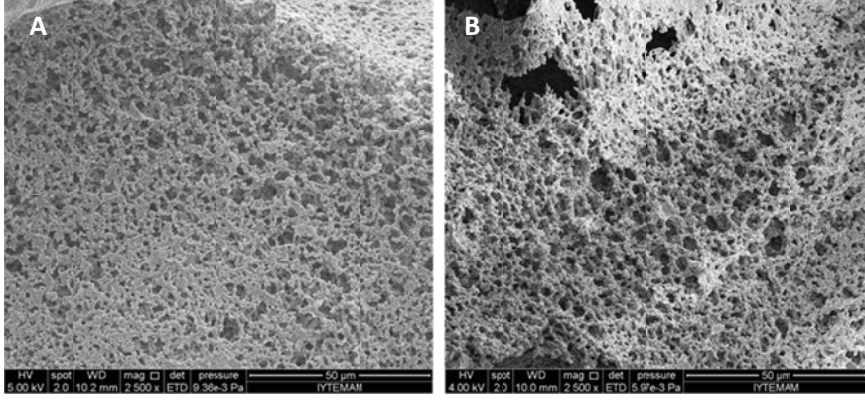
Etanol konsantrasyonu(% Hacim)	10	20	30	40	50
Donma noktası (°C)	- 4	- 9	- 15	- 23	- 32



**Şekil 13.** % 5 jelatin konsantrasyonu ve farklı etanol su karışımları kullanılarak hazırlanan nano lifli doku iskeleleri (Faz ayrımı -20° C'de gerçekleşmiştir).

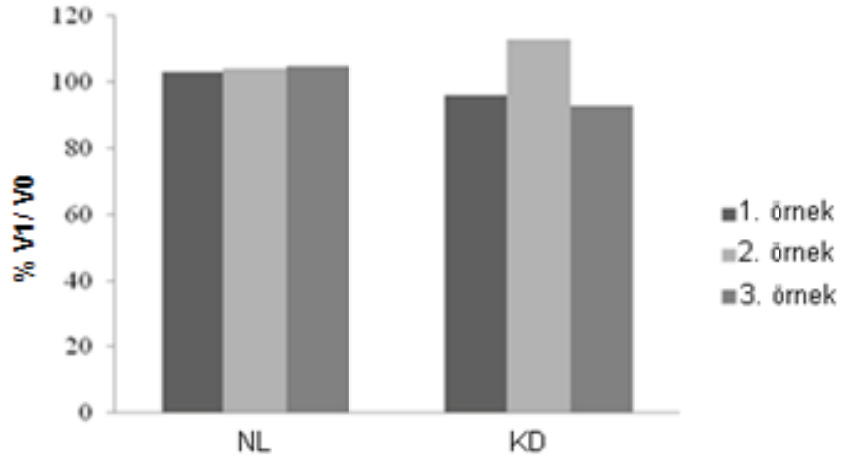
#### 4.3. Nanolifli Jelatin Doku İskelesini Kimyasal Olarak Çapraz Bağlama

Hücre kültürü uygulamalarından önce nanolifli jelatin doku iskelesinin termal ve mekanik stabilitesini sağlamak için çapraz bağlanması gereklidir (LIU ve grubu, 2009). Bu çalışmada jelatinin çapraz bağlanması için 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimide (EDC) ile N-hidroksi-süksinimid (NHS) kullanılmıştır. KUIJPERS ve grubu (2000) tarafından etkin bir çapraz bağlama için en uygun EDC: NHS (mol/mol) oranı (5: 1) olarak belirlenmiştir. Yine aynı çalışmada çapraz bağlama ajanı EDC'nin jelatine oranı yerine EDC'nin jelatindeki karboksilik asite molar oranı kullanılmıştır. Bu oran ile çapraz bağlama reaksiyonu sonucu elde edilen doku iskelelerinin taramalı elektron mikroskobu görüntüleri reaksiyonun nano lifli yapıya zarar vermediğini göstermiştir (Şekil 14).



**Şekil 14.** Çapraz bağlanma öncesi (A) ve sonrası (B) nanolifli doku iskelesi

Çapraz bağlama reaksiyonunun etkinliğini belirlemek için doku iskelelerinin hacmi ölçülmüş, 24 saat su içerisinde tutularak hacimlerinde meydana gelen değişimler belirlenmiştir (Şekil15). Doku iskelelerinin inkübasyon öncesi ve sonrası hacimlerinde değişim olmadığı gözlenmiş bu da çapraz bağlama reaksiyonunun etkin olduğunu göstermiştir.



**Şekil 15.** Çapraz bağlama reaksiyonu öncesi sonrası doku iskelelerinin hacimsel değişimi.

NL:Nanolifli; KD: Katı duvarlı doku iskelesi

#### 4.4. Büyüme Faktörü Taşıyan Mikrokürelerin Hazırlanması

##### 4.4.1. Kitosan Mikrokürelerin Üretimi

Bu çalışmada kitosan nano parçacıkları üretmek için iyonik jelleşme yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem bir polianyon olan tripolifosfatın (TPP) kitosanın pozitif yüklü  $\text{NH}_3^+$  gruplarına elektrostatik olarak bağlanması prensibine dayanır. Yapılan deneyler sonucu kitosan nano parçacıkların oluşumunda kitosan ve TPP çözeltilerinin konsantrasyonlarının kritik olduğu belirlenmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda kitosan çözeltisine TPP çözeltisi eklenme aşamasında kitosan çözeltisinin renginin opaklaşmasının nano parçacık üretiminin bir belirtici olduğu belirlenmiştir (XU ve grubu, 2003). PAN ve grubu (2002) TPP'nin kitosana eklenmesi sonucu çözelti, süspansiyon ve agregat olmak üzere 3 farklı faz gözlemlendiğini belirtmiştir. Tablo 6'da özetlendiği gibi bu çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Opak çözeltilerden agregata geçiş sınırı kitosan : TPP oranı 2.5:1 (w/w)' den az olduğu durumlarda gözlemlenmiştir. Bu oranın üzerindeki koşullarda hazırlanan parçacıklar herhangi bir çökme ve agregat oluşmadan uzun süre stabilitelelerini korumuşlardır.

**Tablo 6.** Farklı konsantrasyonlarda kitosan ve TPP kullanılarak üretilen nano/mikro kitosan parçacıklarının ortalama boyutları

	Kitosan (mg/ml)	TPP (mg/ml)	Kitosan: TPP oranı (w/w)	Ortalama tane boyutu (nm)	Görsel tanımlama
1	0.50	0.50	2.5: 1	66.93	Solüsyon
2	0.50	0.75	1.66: 1	-	Agregat
3	0.50	1.0	1.25: 1	-	Agregat
4	0.50	1.25	1: 1	-	Agregat
5	0.75	0.50	3.75: 1	93.75	Opak solüsyon
6	0.75	0.75	2.5: 1	129.7	Opak solüsyon
7	0.75	1.0	1.875: 1	-	Agregat
8	0.75	1.25	1.5:1	-	Agregat
9	1.0	0.50	5: 1	101.40	Solüsyon
10	1.0	0.75	3.33: 1	147.50	Opak solüsyon
11	1.0	1.0	2.5: 1	804.70	Opak solüsyon
12	1.0	1.25	2:1	-	Agregat
13	1.25	0.50	6.25: 1	86.66	Solüsyon
14	1.25	0.75	4.16: 1	120.90	Opak solüsyon
15	1.25	1.0	3.125: 1	124.40	Opak solüsyon
16	1.25	1.25	2.5:1	3,796.30	Opak solüsyon
17	1.25	2.5	1.25: 1	-	Agregat
18	1.25	5.0	0.625: 1	-	Agregat

#### 4.4.1.1 Kitosan mikrokürelere protein yüklenmesi

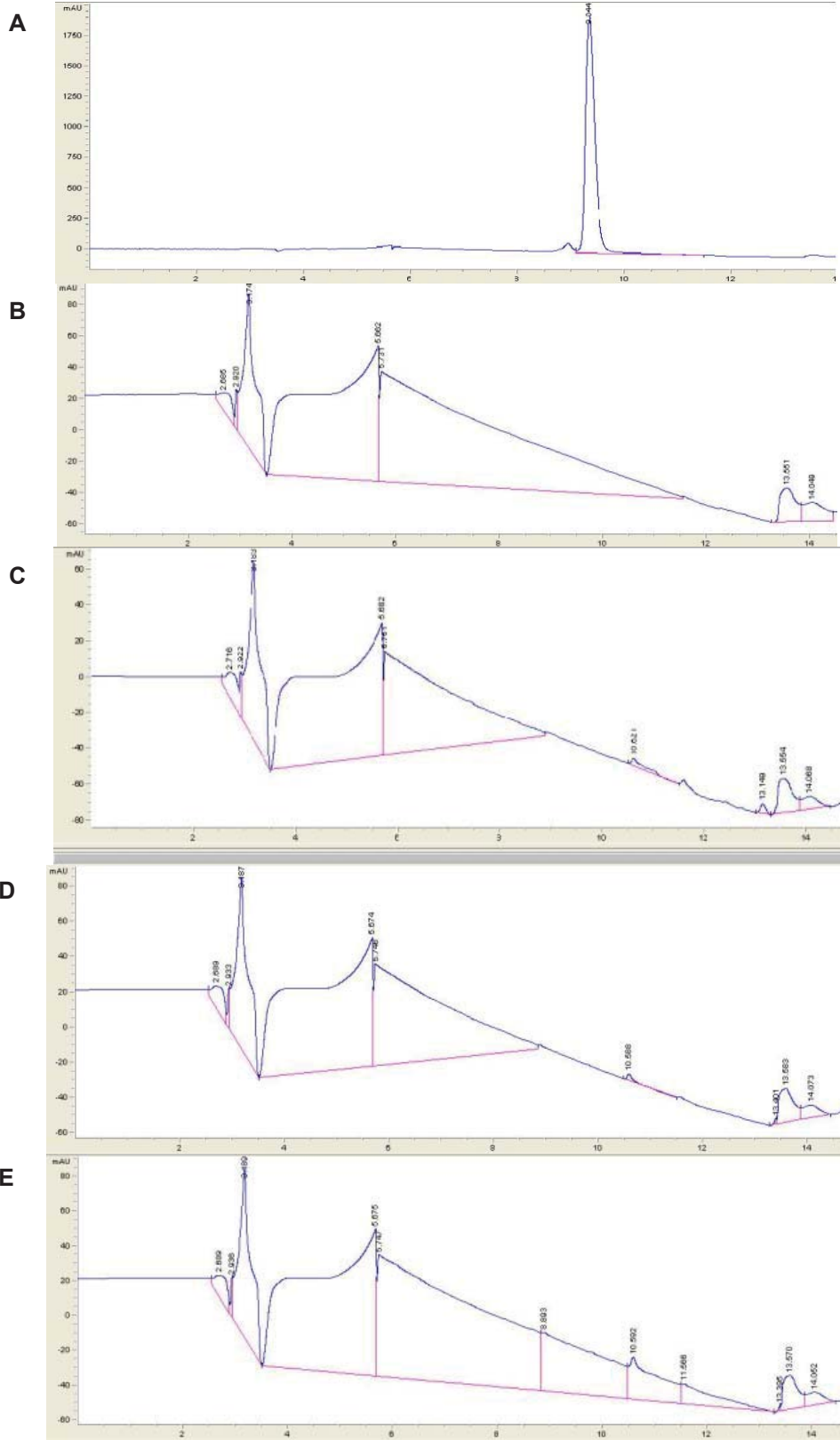
Büyüme faktörleri oldukça pahalı oldukları için protein yükleme ve salım çalışmalarında model protein kullanılmıştır. Lizozimin kitosanın parçalanmasına neden olan bir enzim olduğu belirlenmiş, bunun sonucu model protein olarak lizozimin yerine  $\alpha$ -Kemotripsin kullanılmıştır. Tablo 7’de görüldüğü üzere  $\alpha$ -Kemotripsin büyüme faktörleri NT-3 ve NGF ile benzer molekül ağırlığı ve isoelektrik noktasına sahip bir proteindir.

**Tablo 7.**  $\alpha$ -Kemotripsin ve büyüme faktörü NT-3 ve NGF’ in özellikleri

Protein	PK <sub>a</sub>	Molekül Ağırlığı (kDa)
$\alpha$ -Kemotripsin	8.8	25
NT-3	9.4	29
NGF	9.3	26

Yükleme çalışmalarında  $\alpha$ -Kemotripsin çözeltisi kitosan çözeltisine eklenmiş, ardından TPP bu karışıma ilave edilmiştir. Kitosan parçacıklar asetik asit çözeltisi ile parçalandıktan sonra içerisine yüklenen protein miktarı HPLC yöntemi ile belirlenmiştir. Yapılan analizler sonucu  $\alpha$ -Kemotripsinin yüklenme etkinliği %33.17 olarak belirlenmiştir.

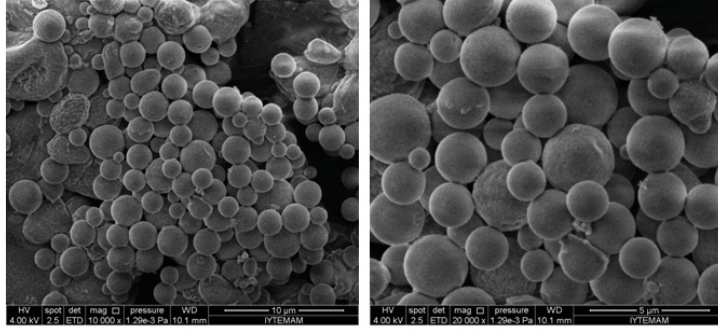
$\alpha$ -Kemotripsinin salım profilini belirlemek için yapılan çalışmalarda kurutulmuş tanecikler kullanılmıştır. Şekil 16’da görüldüğü üzere 15. günün sonuna kadar hazırlanan partiküllerden  $\alpha$ -Kemotripsin salımı belirlenememiştir. Salım çalışmaları pH=7.4 de gerçekleştirilmiştir ve bu pH değerinde kitosan net negatif yüke sahipken  $\alpha$ -Kemotripsin pozitif yüklüdür. İki molekül arasında oluşan iyonik etkileşimden dolayı kitosanın proteini salamamış olabileceği düşünülmüş ve bu sonuçlara dayanarak büyüme faktörünün yükleneceği polimerin değiştirilmesine karar verilmiştir.



**Şekil 16. A;**  $\alpha$ -Kemotripsinin kromatogramı, B-E; Kitosan nano parçacıklardan salım profili B; birinci saat, C; 72. saat, D; 6. gün, E; 15. gün.

#### 4.4.2. Alginat Mikrokürelerin Üretimi

Bu çalışmada büyüme faktörü yüklü mikro kürelerin hazırlanması aşamasında kitosana alternatif olarak NGF, NT-3,  $\alpha$ -Kemotripsin gibi izoelektrik noktası yüksek olan proteinlerle yüksek etkileşimi belirlenmiş olan alginat polimeri seçilmiştir (WELLS ve grubu, 2007). Alginat tanecik üretimi için yağ içerisinde su emülsiyonu yöntemi kullanılmıştır. Şekil 17' de %1 alginat çözeltisi kullanılarak su yağ emülsiyonu yöntemiyle hazırlanmış alginat mikro kürecikler görülmektedir. %1 alginat ve % 0.5 alginat çözeltisi ile hazırlanan taneciklerin boyutları arasında önemli bir fark olmadığı gözlenmiştir. Ancak polimer konsantrasyonu % 0.1 olduğunda parçacık çapı 1.5  $\mu\text{m}$ ' den 0.46  $\mu\text{m}$ ' ye düşmüştür (Tablo 8).



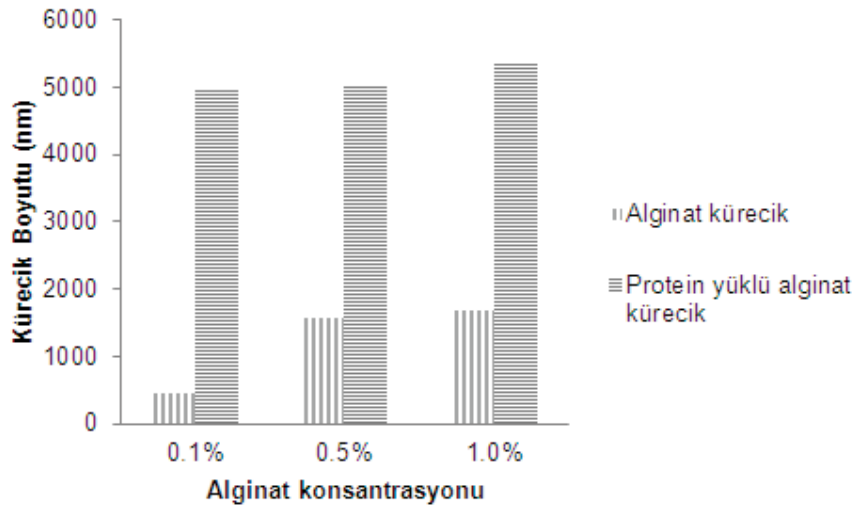
Şekil 17. %1 alginat çözeltisi ile hazırlanan alginat mikro kürecikler

Tablo 8. Farklı alginat konsantrasyonları ile elde edilen tanecik boyutları

Alginat konsantrasyonu (w/v)	Boyut (nm)
0.1 %	462
0.5 %	1578
1.0 %	1680

Alginat polimeri ile protein yükleme çalışmalarında model protein olarak yüksek isoelektrik noktasına sahip proteinlerle etkileşiminin yüksek olduğu bilinen  $\alpha$ -Kemotripsin kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarda %1 alginat konsantrasyonunda hazırlanan taneciklere 500  $\mu\text{g}$   $\alpha$ -Kemotripsinin % 100' ünün yüklendiği belirlenmiştir. Literatürde yapılan çalışmalarda NGF'in aktivitesini koruduğu bilinen sığır serum albumin (BSA) ile birlikte taneciklere yüklendiği dikkat çekmiştir. Bu nedenle yükleme çalışmalarında  $\alpha$ -Kemotripsin BSA ile beraber kullanılmış ve BSA'nın  $\alpha$ -Kemotripsine oranı 500:1 (w/w) olarak seçilmiştir. Protein yüklenmesi sonucu alginat kürelerin boyutlarının önemli ölçüde arttığı belirlenmiştir (Şekil 18).





**Şekil 18.** Protein yüklenmiş ve yüklenmemiş alginat mikrokürelerin boyutları

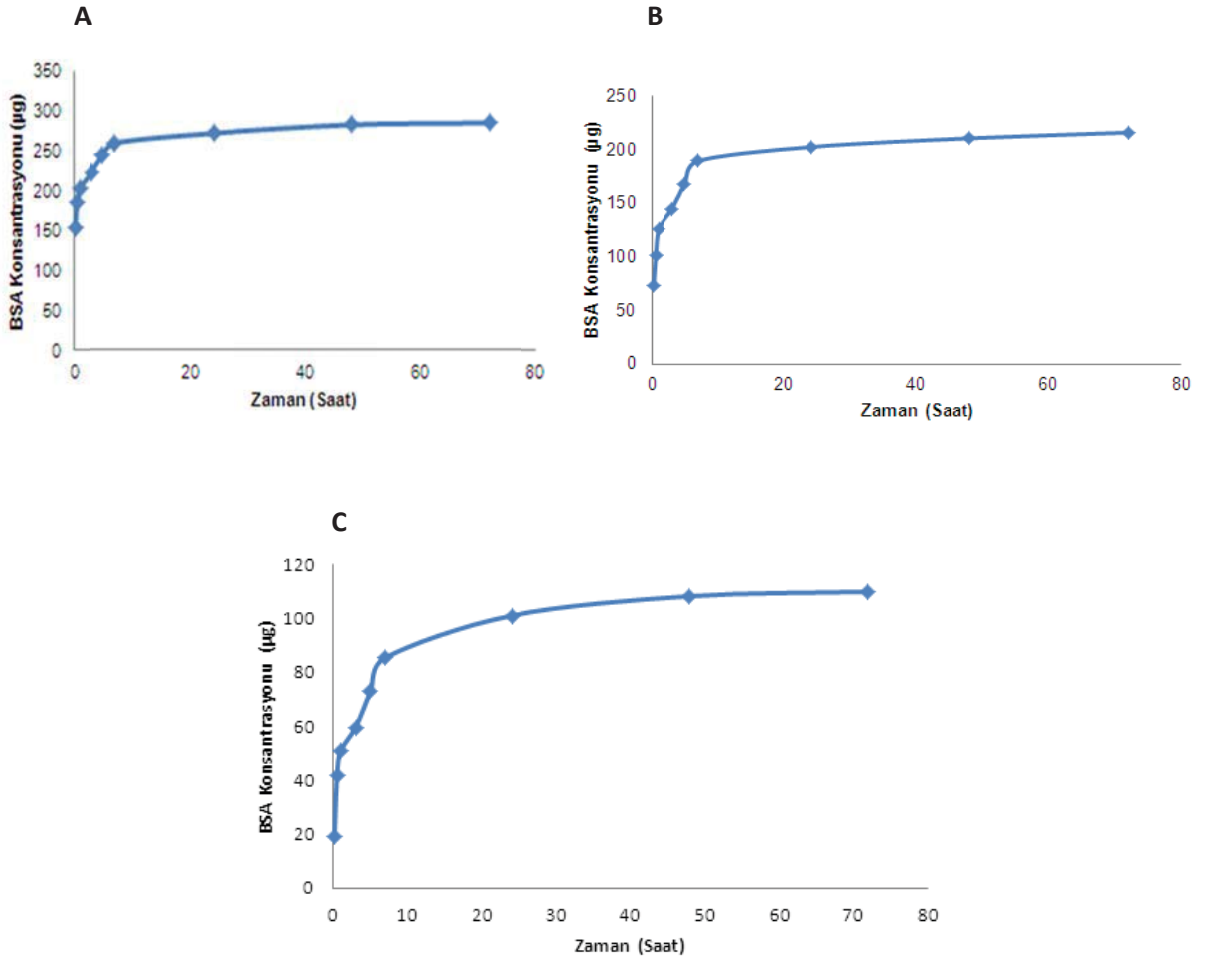
BSA'nın alginat taneciklere kapsülleme etkinliğinin alginat konsantrasyonu ile değişimi Tablo 9' da özetlenmiştir. Sonuçlardan da görüldüğü üzere BSA proteini konsantrasyonu 0.1 mg iken her iki alginat konsantrasyonu için yaklaşık % 100 kapsülleme etkinliği belirlenmiştir. Bu nedenle salım çalışmalarına bu konsantrasyonlar ile devam edilmiştir.

**Tablo 9.** %0.1 ve % 1 alginat konsantrasyonlarındaki taşıyıcıya yüklenen BSA proteinin kapsülleme etkinlikleri

Formülasyon	% Kapsülleme etkinliği
% 0.1 alginat + 1.0 mg BSA	37.43
% 0.1 alginat + 0.5 mg BSA	59.8
% 0.1 alginat + 0.1 mg BSA	101.28
% 1.0 alginat + 0.1 mg BSA	112.00

Alginat taneciklere yüklenen BSA proteininin hemen hemen tamamının ilk 24 saatte PBS (pH=7.4) içerisine salındığı belirlenmiştir (Şekil 19). Daha önce alginatla yapılan protein yükleme çalışmalarında BSA'nın salımını yavaşlatmak için alginat kürelerin etrafının poli-L-lisin, poli-etilen imin, kitosan gibi pozitif yüklü polimerlerle kaplanması önerilmiştir (KHANNA ve grubu, 2010). Bu nedenle ilerleyen çalışmalarda daha yavaş ve kontrollü bir salım için üretilen taneciklerin etrafının pozitif yüklü polimerlerle kaplanmasına karar verilmiştir.

Şekil 19-C' de görüldüğü üzere %0.1'lik alginat solüsyonu kullanılarak hazırlanan ve içerisine 0.1 mg BSA eklenen taneciklerden salınan protein miktarı BCA analizi sonucu yaklaşık 0.3 mg olarak belirlenmiştir. Her ne kadar BCA analizinde yan etkileri azaltmak için koşullar optimize edilmeye çalışıldıysa da bu değerde bir değişim sağlanamamıştır.



**Şekil 19.** Farklı konsantrasyonlarda alginat içerisinde yüklenen BSA proteinin zamana bağlı salımı. Yükleme esnasında kullanılan alginat ve BSA miktarları sırasıyla A) Alginat: 0.1 % BSA:0.1 mg B) Alginat: 0.1 % BSA:0.5 mg C) Alginat: 1 % BSA:0.1 mg

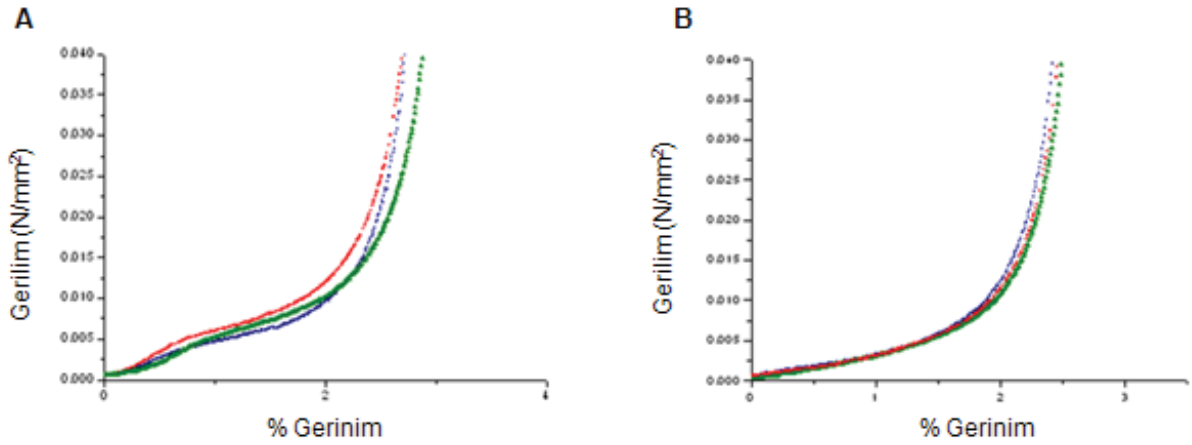
Protein yükleme çalışmalarının devamında büyüme faktörü NT-3 kullanımından önce ilk çalışmalara NGF' le başlanmıştır. Çünkü PC-12 hücrelerinin büyüme ortamlarında NGF olduğunda nörit uzantıları oluşumu daha önce çok iyi karakterize edilmiştir. Tablo 7' den de anlaşılacağı gibi bu iki proteinin gerek büyüklüğü gerekse isoelektrik noktası birbirine çok benzerdir. Bu nedenle NGF' in alginat taneciğe yüklenme ve salımı ile PC-12 hücre morfolojisindeki değişim belirlendikten sonra NT-3 ile olan çalışmalara geçilmesi planlanmıştır.

#### 4.5. Doku İskelesinin Karakterizasyonu

Çalışma boyunca parametrik bir akış planı ile 24 farklı doku iskelesi hazırlanmış ve hazırlama koşullarının mekanik özellikler, gözeneklilik, lif çapı ve lif uzunlukları üzerine olan etkileri incelenmiştir. Bu parametrik çalışmada jelatin konsantrasyonu %5 ve %10, parafin küreciklerin boyutları 250-425

$\mu\text{m}$  ve 425–600  $\mu\text{m}$  ve küreciklerde bağlantılı bir yapı oluşturmak için de inkübasyon süreleri 100, 200 ve 400 dakika olarak belirlenmiştir (Tablo 9).

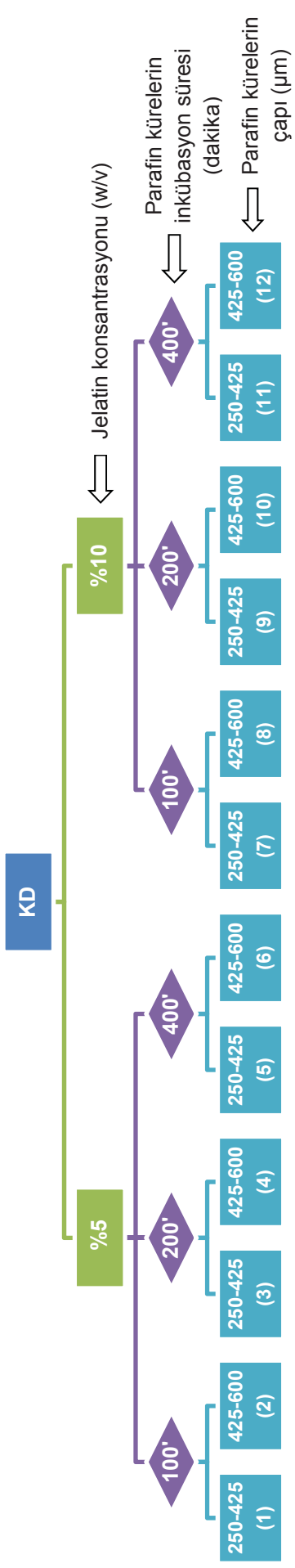
Doku iskelelerinin mekanik testleri önceden ıslatılmış örnekler kullanılarak sıkıştırma testi ile yapılmıştır. Tüm doku iskelelerinin açık hücreli süngerimsi yapılar için tipik olan bir gerilim gerinim özelliğine sahip oldukları gözlenmiştir (Şekil 20). Bu tür yapılar genellikle gerilim-gerinim grafiğinde doğrusal elastik bir bölgenin ardından sıkışma bölgesi ve yoğunlaşma bölgesi içerir (WANG ve grubu 2009).Yapılan testlerde elastik bölgeden sıkışma bölgesine geçiş % 0.5 gerinimde gerçekleşmiştir (Şekil 20).



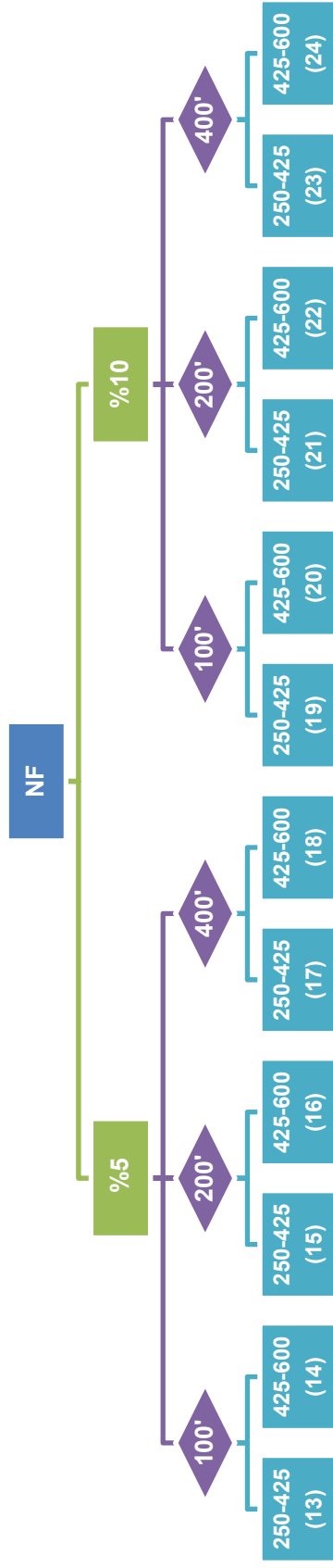
**Şekil 20.** A; Katı duvarlı ve B; nanolifli doku iskelelerinin gerilim-gerinim grafiği

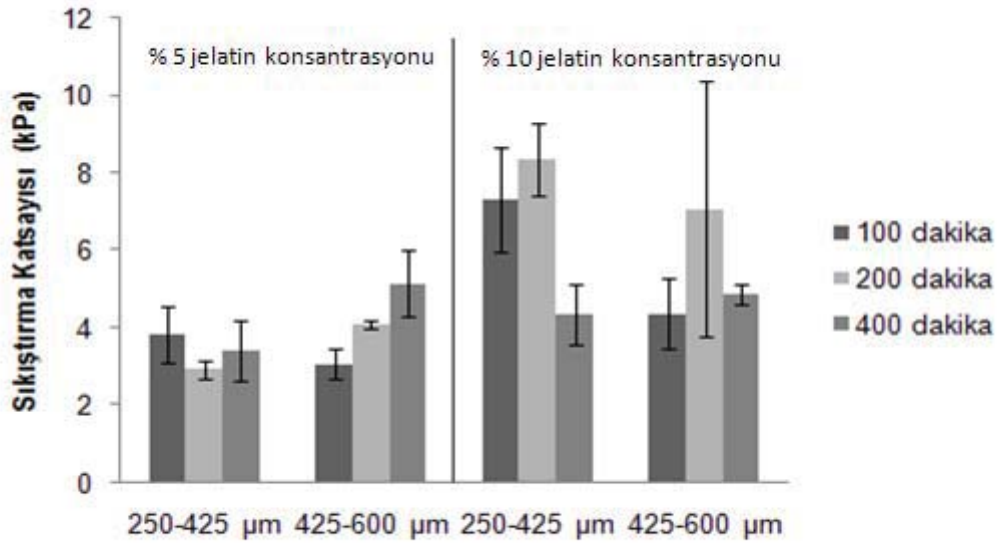
Katı duvarlı doku iskelelerinin sıkıştırma katsayıları jelatin konsantrasyonu % 5'den % 10'a çıkınca artış göstermiştir (Şekil 21). İnkübasyon süresinin 100 dakikadan 400 dakikaya artırılması yada parafin kürelerin boyutunun 250-425  $\mu\text{m}$ 'den 425-600  $\mu\text{m}$ 'ye değiştirilmesi sıkıştırma katsayılarında önemli bir değişikliğe yol açmamıştır. Nanolifli doku iskelelerinde jelatin konsantrasyonunun artışı 250-425  $\mu\text{m}$  parafin küreler kullanılması durumunda beklenenin tersine sıkıştırma katsayısında azalmaya sebep olmuştur (Şekil 22). 250-425  $\mu\text{m}$  parafin küreler ve % 5 jelatinle hazırlanan nanolifli doku iskelelerinde inkübasyon süresi 100 dakikadan 200 dakikaya çıkarıldığında sıkıştırma katsayılarında istatistiksel açıdan önemli bir artış olmuştur. %10 jelatin ile hazırlanan nanolifli doku iskelelerinde ise sıkıştırma katsayısı inkübasyon süresinden sadece 425–600 $\mu\text{m}$  parafin küreler kullanıldığı durumda etkilenmiştir. Sonuçların tümü değerlendirildiğinde nanolifli doku iskelelerinin sıkıştırma katsayısı değerlerinin beklenildiği gibi katı duvarlı olanlardan daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar doğal beyin dokusunun sıkıştırma katsayısına (1-5 kPa) uygun doku iskeleleri üretildiğini göstermektedir.

**Tablo 10.** Doku iskeleleri hazırlamak için kullanılan akış şeması (KD; Katı Duvarlı, NL; Nanolifli)

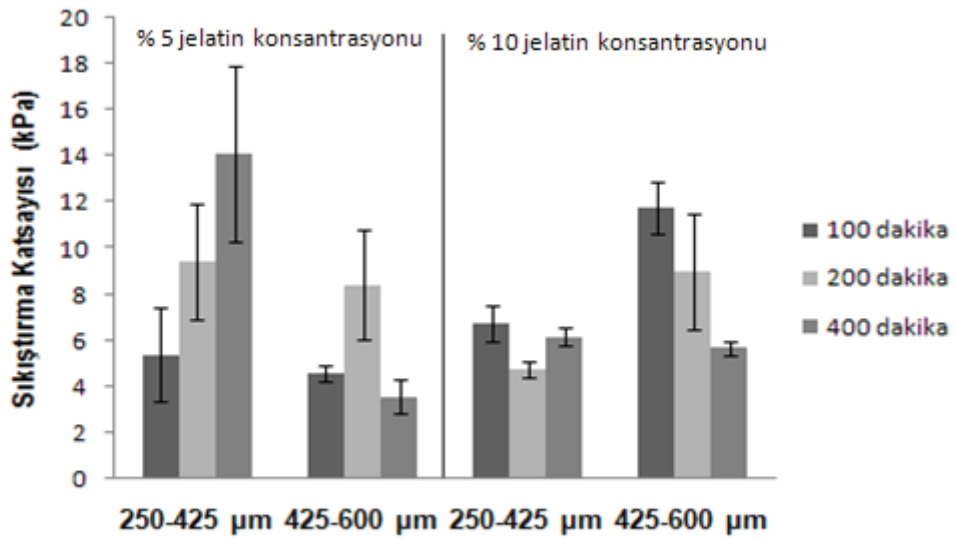


**Tablo 11.** Nano lifli doku iskelelerinin sıkıştırılma katsayısı sonuçları (kPa)





Şekil 21. Katı duvarlı doku iskelelerinin sıkıştırılma katsayısı sonuçları (kPa)



Şekil 22. Nano lifli doku iskelelerinin sıkıştırılma katsayısı sonuçları (kPa)

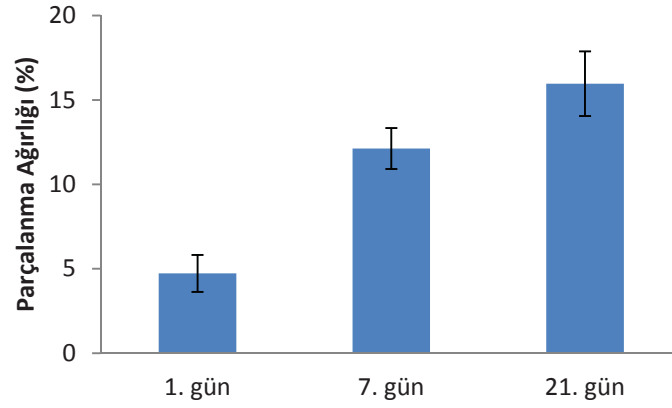
Hazırlanan doku iskelelerinin tümünün % 90 ve üzeri gözenekliliğe sahip olduğu, polimer konsantrasyonu arttığında gözenekliliğin yanısıra hem lif çapı, hem de lif uzunluğunun azaldığı belirlenmiştir (Tablo 12). Elde edilen doku iskelelerinin lif çapı değerlerinin hücre dışı matris fiber çapı ile benzer boyutlarda olduğu (50–500 nm) sonucuna varılmıştır.

**Tablo 12.** Doku iskelelerinin gözeneklilik, lif uzunluğu ve lif çapı

Jelatin konsantrasyonu (w/v)	Doku iskelesi Kodu (Tablo)	% Gözeneklilik	Lif uzunluğu (nm)	Lif çapı (nm)
5	13	97.9	3782.96	795.09
	14	97.7	3739.35	857.81
	15	97.8	5438.05	741.00
	16	97.4	406.62	109.74
	17	97.56	2113.40	429.58
	18	97.9	2816.62	550.00
10	19	96.4	451.76	70.72
	20	96	852.83	335.87
	21	96.1	1153.25	352.33
	22	95.9	207.18	63.53
	23	96.1	609.54	138.76
	24	96.5	784.56	114.36

#### 4.6. Doku iskelelerinin bozunma oranlarının belirlenmesi

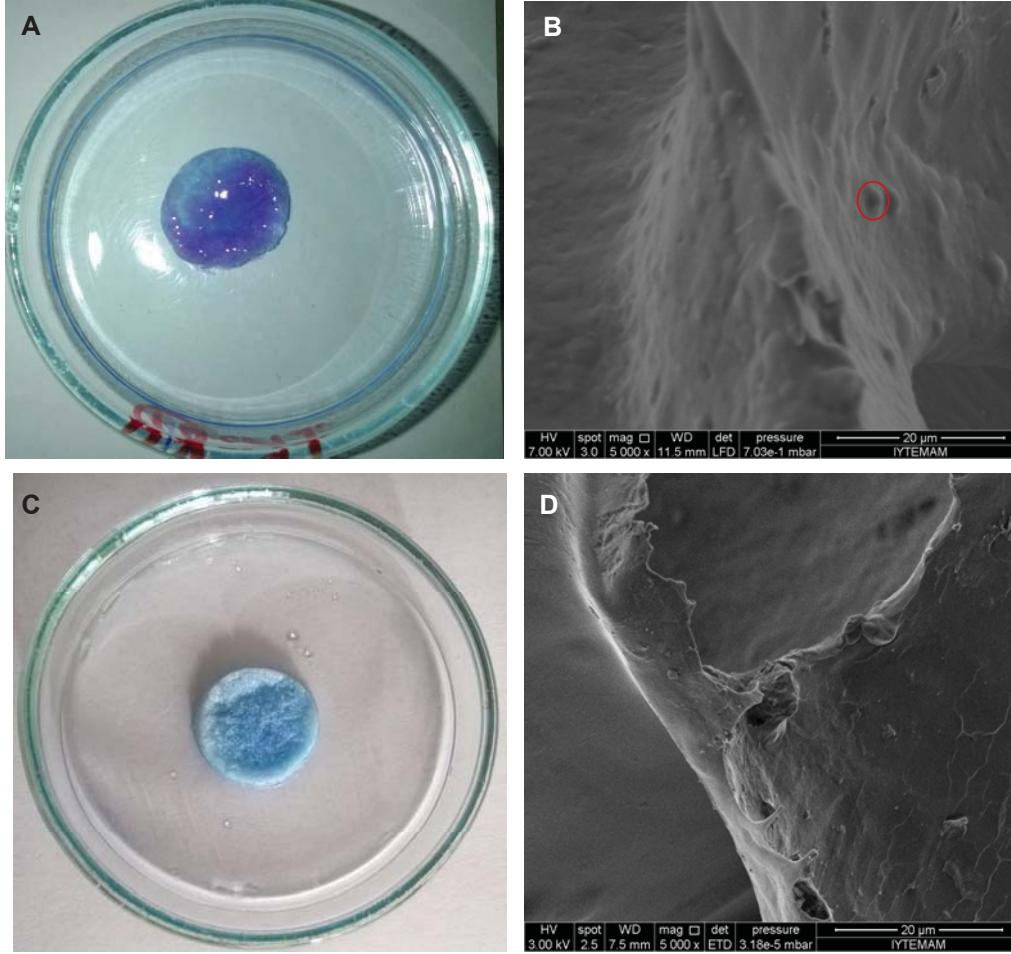
Hazırlanan nano lifli doku iskelelerinin *in vitro* parçalanma deneyleri 37° C'de PBS içerisinde gerçekleştirilmiştir. Zamana bağlı olarak yapılan ölçümler sonucunda 21. günün sonunda doku iskelesinin başlangıç ağırlığının % 16' sını kaybettiği belirlenmiştir (Şekil 23). Bundan sonraki adımda bozunma çalışmalarına PC-12 hücreleri ekilmiş doku iskeleleri ile devam edilmesi planlanmaktadır.



**Şekil 23.** Doku iskelelerinin zamana bağlı olarak ağırlıklarında meydana gelen değişim

#### **4.7. Alginat mikro küreciklerin jelatin doku iskelesine sabitlenmesi**

Jelatin doku iskelesi kolajen proteininin hidrolizi sonucu elde edilen bir polimer olduğu için kolajenin özelliklerini kalıtsal olarak taşır. Jelatinin yapısında integrin bağlanma bölgesi olan arginil-glisil-aspartik asit (RGD) dizisi içermesi doku iskelesi uygulamalarında bu polimerihücre tutunması açısından avantajlı yapar. Jelatin polimerinin yapısında yer alan RGD dizisi bu özelliği yanında şeker yapıda olan alginat polimerinin karboksilik asit gruplarına EDC varlığında kovalent olarak bağlanabilir. Bu bilgiden yola çıkarak doku iskelesine mikrokürecikleri sabitlemek için EDC ile bağ oluşturma yöntemi kullanılmıştır. Doku iskelesine küreciklerin tutunumu iskelelerin toluidin mavisi ile boyası ile boyanmasıyla kontrol edilmiştir. Alginat içeren doku iskelelerinin renginin boyama sonucu mora (Şekil 24 A), kürecik içermeyenlerin ise mavi renge (Şekil 24 C) dönüştüğü gözlenmiştir. Mor renge dönüşüm alginat küreciklerin doku iskelesine başarılı bir şekilde tutunduğunu göstermiştir. Küreciklerin iskeleye sabitlendiği taramalı elektron mikroskobu ile de kanıtlanmıştır (Şekil 24 B).

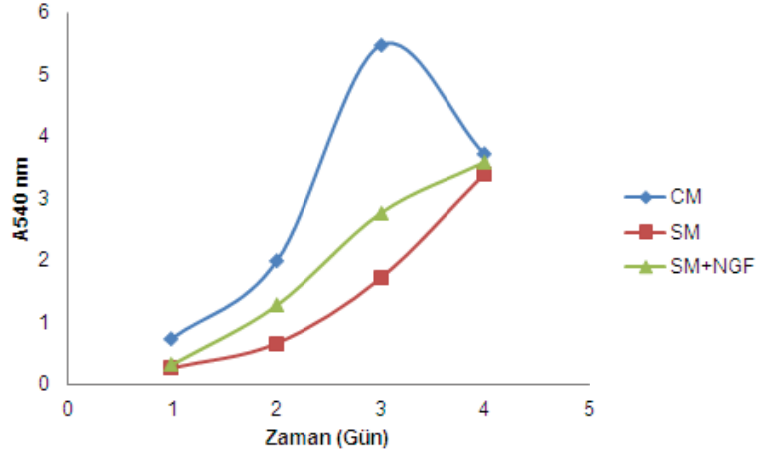


**Şekil 24.** A- Jelatin doku iskelesine tutturulmuş alginat mikroküreciklerin toluidin mavisi ile boyanmış hali, B- Jelatin doku iskelesine tutturulmuş alginat mikroküreciklerin SEM görüntüleri C- Alginat mikrokürecik eklenmemiş doku iskelesinin toluidin mavisi ile boyanmış hali, D- Alginat mikrokürecik içermeyen jelatin doku iskelesi SEM görüntüsü.

#### 4.8. Hücre kültürü ve PC-12 NGF biyoaktivitesinin belirlenmesi

PC-12 hücreleri kültür ortamında uygun konsantrasyonlarda NGF bulunduğu zaman çoğalan kromafin benzeri hücre tipinden, çoğalmayan sempatik sinir hücresi benzeri akson uzantıları taşıyan ve elektriksel olarak uyarılabilen hücrelere dönüşür (ALETTA 1996). Alginat mikroküreciklerden salınan proteinin aktif formda olduğunu göstermek amacıyla PC-12 hücre morfolojisi değişimini belirlemeden önce PC-12 hücrelerinin kültürü yapılmıştır. Bu amaçla öncü çalışma olarak PC-12 hücrelerinin büyüme eğrileri 3 farklı ortamda MTT yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (Şekil 25). Bu 3 farklı ortam % 10 at serumu ve % 5 sığır serumu içeren normal ortamı (CM), % 1 at serumu içeren açlık ortamı (SM) ve NGF içeren açlık ortamıdır. Deneylere 1000 hücre/kuyucuk ile başlanmış ve 2., 4., 6. ve 8.günde MTT analizi ile absorbans değerleri ölçülmüş ve büyüme eğrileri çıkartılmıştır.

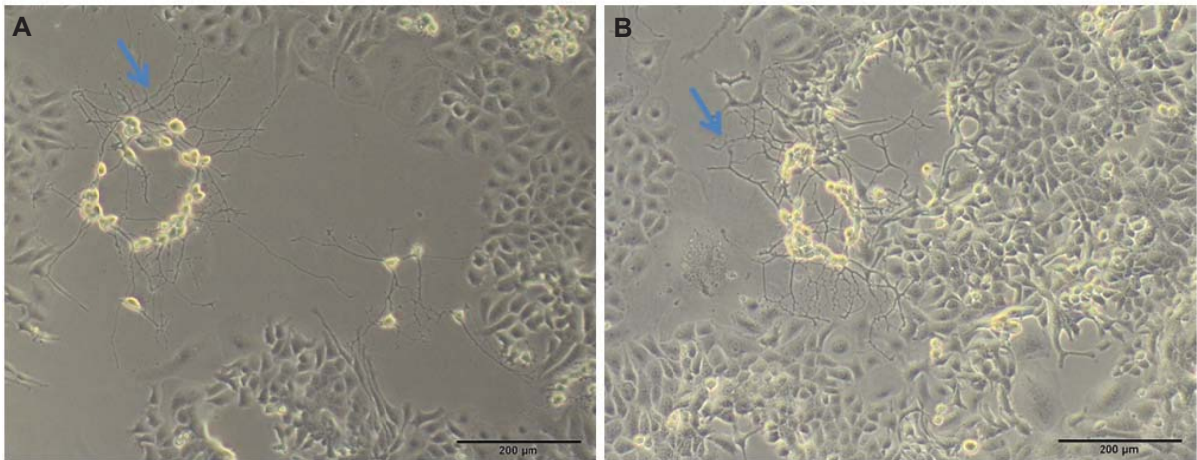




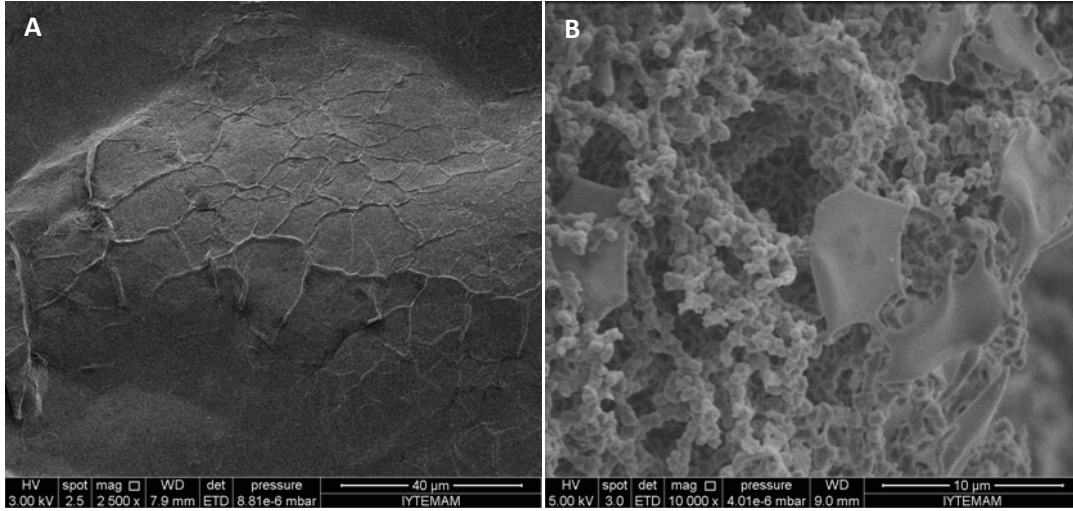
**Şekil 25.** PC-12 hücrelerinin farklı kültür ortamlarındaki büyüme eğrileri CM; normal ortam, SM; açlık ortamı, SM+NGF ortamı

PC-12 hücrelerinin farklılaşması için gerekli olan serbest haldeki NGF miktarını belirlemek için 2 farklı NGF konsantrasyonu (50 ve 100 ng/ml) ve iki farklı hücre konsantrasyonu (2500 ve 5000 hücre/mL) denenmiştir. Hücreler faz kontrast mikroskopunda incelenmiş ve 7. günden itibaren nörit oluşumu gözlemlenmiştir (Şekil 26). Bu çalışmanın sonucunda serbest haldeki 50 ng/ml NGF' in 2500 hücre/ml PC-12 hücresi farklılaşmasını 7. günde sağladığı belirlenmiştir.

PC-12 hücrelerinin hazırlanan katı duvarlı ve nanolifli doku iskelelerine tutunma eğilimleri de araştırılmıştır. Bu amaçla doku iskelesi üzerine ekilen hücreler 24 saat inkübasyondan sonra % 2.5 gluteraldehit ile fikse edilmiştir. Şekil 27 A ve B' de üzerine PC-12 hücreleri ekilen doku iskeleleri ve hücrelerin morfolojik farklılıkları net bir şekilde görülmektedir. Nanolifli yapıdaki doku iskeleleri üç boyutlu hücre dışı matrisi daha iyi taklit ettiği için bu iskeleye tutunan hücrelerin, katı duvarlı iskeleye tutunanlara kıyasla morfolojisinin doğal ortamına yakın bir formda olduğu gözlenmiştir.



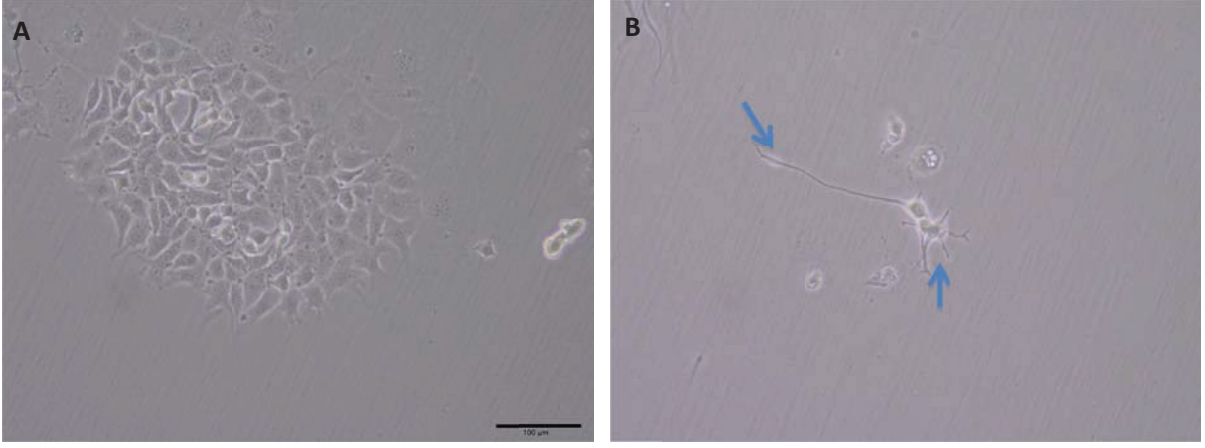
**Şekil 26.** 2500 hücre/ml konsantrasyondaki PC-12 hücrelerinin 7. gün sonundaki görünümü ve nörit oluşumu A; 50 ng/mL, B; 100 ng/mL NGF.



**Şekil 27.** PC–12 hücrelerinin A; Katı Duvarlı, B; Nano lifli doku iskelelerinde büyütüldüğünde gösterdiği morfoloji

#### 4.9. Alginat Mikro Kürelere Yüklenen NGF Biyoaktivitesinin Belirlenmesi

Alginat kürelere yüklenen NGF'in biyoaktivitesi PC-12 hücre farklılaşması ile belirlenmiştir. Bu amaçla 100 µg/ml BSA solüsyonu ile 1 µg/ml NGF karıştırılarak hazırlanan alginat küreciklerin parçalanması sonucu elde edilen çözelti PC–12 hücrelerinin bulunduğu hücre kültür ortamına ekilmiştir. Yapılan mikroskopik incelemeler sonucu 5. günün sonunda mikro kürelerin parçalanması sonucu elde edilen çözelti ortamında büyüyen hücrelerde nörit yapıları gözlenmiştir (Şekil 28). Hücre kültür ortamına gün aşırı eklenen 50 ng/ml konsantrasyondaki serbest NGF ile nörit oluşumu 7. günden itibaren gözlenirken mikro küreciklere yüklenen ve parçalanması sonucu elde edilen çözelti eklenen hücrelerde nörit oluşumu 5. günden itibaren gözlenmiştir. Bu sonuç bir taşıyıcı içerisine yüklenen büyüme faktörü yapısındaki proteinlerin aktivitelerini daha iyi koruduklarını ve böylesi sistemlerin doku iskeleleriyle birleştirildiğinde hücre farklılaşmasını çok daha hızlı sağlayacaklarının göstergesidir.



**Şekil 28.** PC-12 hücrelerinin 5. gün sonunda görünümü A; NGF içermeyen açlık ortamı, B; Mikro küreciklerin parçalanması sonucu elde edilen çözelti eklenen açlık ortamı ve nörit oluşumu

## 5. SONUÇLAR

Bu çalışmada, sinir doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere nanolifli yapıda ve yönlendirilmiş jelatin bazlı doku iskeleleri üretilmiş, üretilen iskelelere içerisinde sinir büyüme faktörü içeren alginat mikroküreler tutturulmuştur: Farklı parametreler göz önüne alınarak doğal beyin dokusunun sıkıştırma katsayısına uygun doku iskeleleri üretilmiş, hazırlanan doku iskeleleri hedeflenen gözenekli ve gözenekleri birbirleriyle bağlantılı yapıyı sağlamıştır. Nano lifli doku iskelelerinin katı duvarlı olanlarla kıyaslandığında sıkıştırma katsayısı değerlerinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Kullanılan polimer konsantrasyonuna bağlı olarak lif çapı ve lif uzunluğu değişen doku iskelelerinin üretimi gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin bir doğrultuda büyümesine yardımcı olmak amacıyla yönlendirilmiş doku iskelelerinin hazırlanması için ısı etkili faz ayrımı yönteminin koşulları optimize edilmiş ve bu yöntemle ilk defa jelatin bazlı nano lifli ve kanallı doku iskelelerinin üretimi başarılmıştır. Mikrokürecik üretiminde kitosan polimeriyle başlayan çalışmalara etkili bir salım gözlenemediği için alginat polimeriyle devam edilmiştir. Alginat kürelere model protein  $\alpha$ -Kemotripsinin ve sinir büyüme faktörü (NGF)'nün aktivitesini korumak için kullanılan sığır serum albüminin 100 % oranında yüklenmesi sağlanabilmiştir. Hazırlanan alginat mikrokürelerin jelatin doku iskelesine tutturulması aşamasında hem jelatini çapraz bağlayan, hem de jelatin ile alginat arasında kovalent bağ oluşturan EDC kullanılmış ve alginatın doku iskelelerine tutturulduğu toluidin mavi boyaması ve taramalı elektron mikroskobu ile gösterilmiştir. Çalışmada ortama salınan proteinin biyoaktivitesini belirlemede fare adrenal medullasından köken alan ve ortama nöral büyüme faktörleri verildiğinde sinir hücresi benzeri uzantılar (nörit) oluşturan PC12 hücre hattı kullanılmıştır. PC-12 hücrelerinin büyüme eğrisi çıkarıldıktan sonra hücrelerin farklılaşmasını gözlemek için en uygun hücre ve NGF konsantrasyonları 2500 cell/ml ve 50 ng/ml olarak belirlenmiştir. Mekanik özellikler açısından avantajını belirlediğimiz nano lifli doku iskelelerinin, hücre tutunmasında da avantajlı olduğu katı duvarlı ve nano lifli iskelelere ekilen hücrelerin morfolojileri incelendiğinde açıkça görülmüştür. Mikro kürecikler içerisine yüklenen NGF' in aktivitesini koruduğu hatta serbest halde kültür ortamına eklenen NGF'e kıyasla daha kısa sürede PC-12 hücre farklılaşmasını sağladığı belirlenmiştir. Hazırlanan doku iskelelerinin gerek sinir kök hücreleri gerekse diğer kök hücre uygulamaları ve rejeneratif tıp alanında oldukça yüksek bir potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir. Hazırlanan yönlendirilmiş doku iskelelerinin *in vivo* performansları Dokuz Eylül Üniversitesi Estetik Cerrahi Ana Bilim Dalı ile yakında başlatacağımız ortak bir projede değerlendirilecektir.

## KAYNAKLAR

- ALETTA J.M., Phosphorylation of type III beta-tubulin PC12 cell neurites during NGF-induced process outgrowth, *J Neurobiol.* (1996) 4, 61-75.
- ALVAREZ-PEREZ M.A., Guarino V., Cirillo V., Ambrosio L., Influence of gelatin cues in PCL electrospun membranes on nerve outgrowth, *Biomacromolecules*, 11, 2238-46, (2010).
- CHUNG H.J. and Park T. G., Surface engineered and drug releasing pre-fabricated scaffolds for tissue engineering, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 249–262, (2007).
- CIOFANI G, Raffa V, Menciacchi A, Dario P. Alginate and chitosan particles as drug delivery system for cell therapy. *Biomed Microdevices*. 2008, Vo. 10, p. 131-40.
- GUPTA D., Venugopal J., Prabhakaran M.P., Dev V.R., Low S., Choon A.T., Ramakrishna S., Aligned and random nanofibrous substrate for the in vitro culture of Schwann cells for neural tissue engineering. *Acta Biomater.*, 5, 2560-9, (2009).
- LEE J.H., Kim W.G., Kim S.S., Lee J.H., Lee H.B., Development and characterization of an alginate-impregnated polyester vascular graft. *J Biomed Mater Res*. 36, 200-8, 1997.
- LI X., Yang Z., Zhang A., The effect of neurotrophin-3/chitosan carriers on the proliferation and differentiation of neural stem cells, *Biomaterials*, 30, 4978-4985, (2009).
- LIU X. and Ma P.X., Phase separation, pore structure, and properties of nanofibrous gelatin scaffolds, *Biomaterials*, 30, 4094–4103, (2009).
- MA P.X. and Choi J-W. 2001. "Biodegradable polymer scaffolds with well-defined interconnected spherical pore network", *Tissue Engineering*, Vol.7, p. 23-33.
- MOORE M.J., Friedman J.A., Lewellyn E.B., Mantila S.M., Krych A.J., Ameenuddin S., Knight A.M., Lu L., Currier B.L., Spinner R.J., Marsh R.W., Windebank A.J., Yaszemski M.J., Multiple-channel scaffolds to promote spinal cord axon regeneration, *Biomaterials*, 27, 419-29, (2006).
- NIU X., Feng Q., Wang M., Guo X., Zheng Q., Porous nano-HA/collagen/PLLA scaffold containing chitosan microspheres for controlled delivery of synthetic peptide derived from BMP-2, *J. Control Release.*, 134, 111-7, (2009).
- PAN Y., Li Y., Zhao H., Zheng J., Xu H., Wei G., Hao J., Cui F. 2002. "Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo" *International Journal of Pharmaceutics*, Vol. 249, p. 139-147.
- ROWLEY J.A., Madlambayan G., Mooney D.J., "Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials" *Biomaterials* 20, 45-53, (1999).
- SUN C., Jin X., Holzwarth J.M., Liu X., Hu J., Gupte M.J., Zhao Y., Ma P.X., Development of channeled nanofibrous scaffolds for oriented tissue engineering, *Macromol Biosci.*, 12, 761-9, (2012).
- TAYLOR S.J., McDonald J.W., Sakiyama-Elbert S.E., Controlled release of neurotrophin-3 from fibrin gels for spinal cord injury, *Journal of Controlled Release*, 98, 281– 294, 2004.
- SHAO J., Chen C., Wang Y., Chen X., Du C., Early stage evolution of structure and nanoscale property of nanofibers in thermally induced phase separation process, *Reactive and Functional Polymers*, 72, 765–772, 2012.
- SMITH I.O., Liu X.H., Smith L.A., Ma P.X., Nanostructured polymer scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine, *Wiley Interdisciplinary Reviews-Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 1, 226-236, (2009).

SHIN M, Yoshimoto H, Vacanti JP. In Vivo bone tissue engineering using mesenchymal stem cells on a novel electrospun nanofibrous scaffold. *Tissue Eng*2004, 10(1/2):33–41.

KHANNA O, Moya ML, Opara EC, Brey EM. Synthesis of multilayered alginate microcapsules for the sustained release of fibroblast growth factor-1, *J Biomed Mater Res A*. 95, 632-40, (2010).

WANG Y., Deng H., Zu Z-H., Shen, X-C., Liang H., Cui F-Z., Xu Q-Y., Lee I-S., Interactions between neural stem cells and biomaterials combined with biomolecules, *Front. Mater. Sci. China*, 4, 325–33, (2010).

WANG Y., Zhao Z., Zhao B., Qi H.X., Peng J., Zhang L., Xu W.J., Hu P., Lu S.B., Biocompatibility evaluation of electrospun aligned poly (propylene carbonate) nanofibrous scaffolds with peripheral nerve tissues and cells in vitro, *Chin Med J (Engl)*., 124, 2361-6, (2011).

WEB\_1. [http://www.engineeringtoolbox.com/ethanol-water-d\\_989.html](http://www.engineeringtoolbox.com/ethanol-water-d_989.html).

WEI G., Qiming Jin, Q., William V. Giannobile, W.V., Ma P.X., Nano-fibrous scaffold for controlled delivery of recombinant human PDGF-BB, *J Control Release*, 112, 103–110, (2006).

WEI G., Jin Q, Giannobile W.V., Ma P.X., The enhancement of osteogenesis by nano-fibrous scaffolds incorporating rhBMP-7 nanospheres, *Biomaterials*, 28, 2087-2096, (2007).

WELLS, L.A., Sheardown, H., Extended release of high pl proteins from alginate microspheres via a novel encapsulation technique, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 65 (2007) 329–335.

WITTMER C.R., Claudepierre T., Reber M., Wiedemann P., Garlick J.A., Kaplan D., Egles C., Multifunctionalized electrospun silk fibers promote axon regeneration in the central nervous system, *Adv. Funct. Mater.*, 21, 4232–4242, 2011.

XU X.-Y., Li X.-T., Peng S.-W., Xiao J.-F., Liu C., Fang G., Chen K.C., Chen G.-Q., The behaviour of neural stem cells on polyhydroxyalkanoate nanofiber scaffolds, *Biomaterials*, 31, 3967–3975, (2010).

YANG Z., Duan H., Mo L., Qiao H., Li X., The effect of the dosage of NT-3/chitosan carriers on the proliferation of neural stem cells, *Biomaterials*, 31, 4846-54, (2010).

ZHANG R., Ma P.X., Poly(a-hydroxyl acids)/hydroxyapatite porous composites for bone-tissue engineering. I. Preparation and morphology, *J Biomed Mater Res.*, 1, 446-55, 1999.

**TÜBİTAK**  
**PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

<b>Proje No:</b> 112M568
<b>Proje Başlığı:</b> Nanolifli Yapıda, Sinir Büyüme Faktörü Yüklü Mikro Küreleri İçeren Jelatin Bazlı Doku İskelelerinin Hazırlanması Ve Karakterizasyonu
<b>Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar:</b> Prof. Dr. Sacide ALSOY ALTINKAYA, Doç. Dr. Esra ERDAL
<b>Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:</b> İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Bölümü, Urla, 35430, İzmir
<b>Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:</b>
<b>Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:</b> 01.01.2013–01.01.2014
<b>Öz (en çok 70 kelime)</b> Bu çalışmada yüksek gözeneklilikte (>% 90) ve uygun mekanik özelliklerde, nanolifli yapıda ve yönlendirilmiş jelatin bazlı doku iskeleleri üretilmiştir. Üretilen iskelelere 100 % oranında model protein yüklenmiş alginat mikroküreler tutturulmuştur. Mikro kürecikler içerisine yüklenen NGF' in aktivitesini koruduğu hatta serbest halde kültür ortamına eklenen NGF' e kıyasla daha kısa sürede PC-12 hücre farklılaşmasını sağladığı belirlenmiştir.
<b>Anahtar Kelimeler:</b> Doğal polimer, doku iskelesi, mikrokürecikler, büyüme faktörü, sinir doku mühendisliği
<b>Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu mu?</b> Evet <input type="checkbox"/> Gerekli Değil <input checked="" type="checkbox"/> Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.
<b>Projeden Yapılan Yayınlar:</b> Melda Büyüköz, Esra Erdal, Sacide Alsoy Altinkaya, "Nano-fibrous and oriented gelatin scaffolds for nerve tissue engineering" World Conferance on Regenerative Medicine, Almanya, Leipzig , Ekim 2013 (Sözlü sunum ve poster sunumu).
<b>Ekte Bulunan "ARDEB Başarı Öyküsü Formu", "Kazanımlar" Bölümünde Belirtilen Kriterlere Göre Proje Çıktılarınızın Başarı Öyküsü Niteliği Taşındığını Düşünüyorsanız "ARDEB Başarı Öyküsü Formu"nu doldurunuz.</b>