



**T.C.
YALOVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**OMURİLİK HASARLARININ DOKU MÜHENDİSLİĞİ YAKLAŞIMI İLE
TEDAVİSİ İÇİN BİYOBÖZÜNÜR ÜÇ BOYUTLU MATRİKS
GELİŞTİRİLMESİ**

**DOKTORA TEZİ
Zehra Betül AHİ
145301003**

Polimer Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı

Polimer Mühendisliği Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Kadriye TUZLAKOĞLU

İkinci Danışmanı: Dr. António SALGADO

TEMMUZ 2020



**T.C.
YALOVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**OMURİLİK HASARLARININ DOKU MÜHENDİSLİĞİ YAKLAŞIMI İLE
TEDAVİSİ İÇİN BİYOBÖZÜNÜR ÜÇ BOYUTLU MATRİKS
GELİŞTİRİLMESİ**

**DOKTORA TEZİ
Zehra Betül AHİ
145301003**

**Polimer Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı
Polimer Mühendisliği Programı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Kadriye TUZLAKOĞLU
İkinci Danışmanı: Dr. António SALGADO**

TEMMUZ 2020

Yalova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nün **145301003** numaralı Doktora Öğrencisi **Zehra Betül AHİ**, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı **“OMURİLİK HASARLARININ DOKU MÜHENDİSLİĞİ YAKLAŞIMI İLE TEDAVİSİ İÇİN BİYOBOZUNUR ÜÇ BOYUTLU MATRİKS GELİŞTİRİLMESİ”** başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuş ve oy birliği/oy çokluğu ile başarılı bulunmuştur.

İmza / Kanaati
(Kabul/Red)

Tez Danışmanı: **Prof. Dr.**/.....
..... Üniversitesi

Jüri Üyeleri: **Prof. Dr.**/.....
..... Üniversitesi

Doç. Dr./.....
..... Üniversitesi

Doç. Dr./.....
..... Üniversitesi

Doç. Dr./.....
..... Üniversitesi

Teslim Tarihi: 06 Temmuz 2020
Savunma Tarihi: 20 Temmuz 2020



Geniş Aileme,



ÖNSÖZ

Bu doktora tez çalışması, Yalova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Polimer Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Polimer Mühendisliği Programı 'nın desteği ile gerçekleştirilmiştir.

Bu tez çalışmasını, 2546-Portekiz Bilim ve Teknoloji Vakfı İkili İş birliği Programı kapsamında 215M019 numaralı proje ile ve 2214-A Yurtdışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı kapsamında doktora bursiyeri olarak destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'na,

Lisansüstü eğitim hayatımda bilgi, deneyim, destek, hoşgörüsünü esirgemeyen, güler yüzü, iyi niyeti ve tüm samimiyeti ile her zaman yanımda olan, yüksek lisans ve doktora sürecimi en verimli şekilde geçirmem için benden daha çok çaba sarfeden, maddi ve manevi olarak bu süreci sorunsuz ve başarı ile tamamlamamı sağlayan biricik ve değerli tez danışmanım Prof. Dr. Kadriye TUZLAKOĞLU'na,

Doktora tezimin in-vitro kısmını gerçekleştirebilmem için Portekiz'de bana imkan sağlayan ve çalışmalarına yardımcı olan tez eş danışmanım Dr. António SALGADO'ya,

Tezimi değerlendiren jüri üyeleri Prof. Dr. Sinan ŞEN, Doç. Dr. Bora GARİPCAN, Doç. Dr. Didem SALOĞLU DERTLİ ve Doç. Dr. Pınar YILGÖR HURİ'ye,

Portekiz'de yürüttüğüm çalışmalarda bana yardımcı olan Eduardo GOMES ve Rita ASSUNÇÃO-SILVA'ya,

Doktora sürecimde bana arkadaşlığıyla, güler yüzüyle, film tavsiyeleriyle destek olan, yardımını hiçbir zaman esirgemeyen, Portekiz' de kaldığım süre boyunca neredeyse hergün sabırla yakınmalarımı dinleyen tatlış Zeyzey, Zeynep RENKLER DEĞİRMENCİ'ye,

Yüksek lisanstan bu zamana yakasından düşmediğim, Yalova geçirdiğim zamanlarımı değerli kılan, maddi manevi her zaman destek ve yardımlarıyla yanımda olan kankeytom (ama o şimdi Hoca) Dr. Emre TEKAY'a,

Ve çoğu zaman bedenem yanımda olamasalar bile sevgilerini her zaman hissettiğim, maddi manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, canıma can katan herbirini ayrı ayrı çok sevdiğim BİRİCİK GENİŞ AİLEM'e,

Teker teker teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Temmuz 2020

Zehra Betül AHİ
(Kimya Mühendisi)

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	v
KISALTMALAR.....	xi
TABLO LİSTESİ.....	xv
ŞEKİL LİSTESİ	xvii
ÖZET	xxi
1. GİRİŞ....	1
1.1. Tezin Amacı.....	2
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Sinir Sistemi	5
2.1.1. Merkezi Sinir Sistemi	7
2.1.1.1. Omurilik	8
2.2. Sinir Sistemi Hasarları.....	9
2.2.1. Omurilik Hasarları.....	10
2.3. Omurilik Hasarlarının Tedavisi.....	11
2.3.1. Doku Mühendisliği Yaklaşımıyla Tedavisi	12
2.4. Doku Mühendisliği.....	14
2.4.1. Doku İskelesi Üretiminde Kullanılan Polimerler.....	14
2.4.1.1. Doğal polimerler.....	15
2.4.1.1.1. Kolajen	17
2.4.1.1.2. Laminin	20
2.4.1.2. Sentetik polimerler.....	24
2.4.1.2.1. Poli (L-laktik-ko-glikolik asit).....	26
2.4.2. Nöronal Büyüme Faktörleri	27
2.4.2.1. Nörotrofin-3.....	29
2.4.3. Kondrotinaz ABC	30
2.4.4. Doku Mühendisliğinde Kullanılan Hücreler	31
2.4.4.1. Adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücre.....	32
2.4.5. Doku İskelesi Üretim Yöntemleri	33
2.4.5.1. Elektroeğirme	36



2.4.5.2. Plastik sıkıştırma.....	38
3. MATERYAL VE METOT	41
3.1. Kullanılan Malzemeler	41
3.2. Kolajen İzolasyonu ve Saflaştırılması	41
3.3. Kolajenin Karakterizasyonu.....	42
3.4. Kolajen Alt Katmanın Hazırlanması	42
3.5. Kolajen/PLGA Nanofibröz Membran Hazırlanması.....	43
3.6. Membranların Karakterizasyonu.....	46
3.6.1. Morfolojik Karakterizasyon	46
3.6.2. Mekanik Testler	47
3.6.3. Büyüme Faktörü <i>in-vitro</i> Salım Analizi	47
3.6.4. Su Tutma Kapasitelerinin Belirlenmesi	48
3.7. Hücre Kültürü.....	49
3.7.1. Adipoz Kök Hücre Kültürü.....	49
3.7.2. Hücre Canlılık MTS Analizi	49
3.7.3. Phalloidin/DAPI Boyaması.....	50
3.7.4. Dorsal Kök Ganglionu Kültürü	51
3.8. Aksonal Büyümenin Değerlendirilmesi	52
3.9. İstatistiksel Analiz	53
4. SONUÇLAR.....	55
4.1. Kolajen İzolasyonu ve Karakterizasyonu	55
4.2. Yönlenmemiş Nanofibröz Membran Ön Deneme Sonuçları.....	57
4.3. Morfolojik Karakterizasyon.....	59
4.4. Mekanik Özellikler	65
4.5. Büyüme Faktörü <i>in-vitro</i> Salım Analizi	66
4.6. Su Tutma Analizi.....	67
4.7. Çift Katmanlı Matrislerin ASCs ile Etkileşimi	68
4.8. Aksonal Büyümenin İncelenmesi.....	73
5. SONUÇ	77
KAYNAKLAR.....	79
ÖZGEÇMİŞ	95

KISALTMALAR

ADMSCs	: Yağ Dokusu Mezenkimal Kök Hücreler
BM	: Bazal Membran
BOS	: Beyin-omurilik Sıvısı
BDNF	: Beyin Kökenli Büyüme Faktörü
ChABC	: Kondratina ABC
CNTF	: Siliary Nörotrofik Faktörü
CSPGs	: Kondroitin Sülfat Proteoglikanlar
CS-GAG	: Kondroitin Sülfat Glikozaminoglikan
ÇSS	: Çevresel Sinir Sistemi
DAPI	: 4',6-Diamidino-2-fenilindol dihidroklorid
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DRG	: Dorsal Kök Ganglionu
FBS	: Fetal Sığır Serum
FDA	: Amerikan İlaç ve Gıda Kurumu
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
FTIR	: Fourier Dönüşümlü Infrared Spektroskopisi
GDNF	: Glial Hücre Kökenli Büyüme Faktörü
Gly	: Glisin
HBSS	: Hank's Dengeli Tuz Çözeltisi
HFIP	: 1,1,1,3,3,3-Hegzafloro-2-propanol
MEM	: Minimum Essential Medium Eagle
MSCs	: Mezenkimal Kök Hücreler
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
MTT	: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
MTS	: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt
NBM	: Nörobazal Medyum
NGF	: Sinir Büyüme Faktörü
NMJs	: Nöromüsküler Birleşimler
NPCs	: Nöroprogenitör Hücreler
NT-3	: Nörotrofin-3
NT-4/5	: Nörotrofin-4/5
PBS	: Fosfat ile Tamponlanmış Tuz Solüsyonu
PCL	: Poli(ε-Kaprolakton)
PDLA	: Poli(D-Laktik Asit)
PDLLA	: Poli(D,L-Laktik Asit)
PFA	: Paraformaldehit
Ph	: Phalloidin
PGA	: Poli(Glikolik Asit)
PLLA	: Poli(L-Laktik Asit)
PLGA	: Poli(L-Laktik-ko-Glikolik Asit)



PNNs	: Perinöronal Ağ
PTFE	: Politetrafloroetilen
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Jel Elektroforezi
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskopi
Tg	: Camı Geçiş Sıcaklığı





TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 2.1 Sinir sistemi bölümleri.	5
Tablo 2.2 Kolajenin kullanıldığı medikal alanlar ve uygulamaları.	20
Tablo 2.3 Nörotrofik faktörler ve etki alanları.	28
Tablo 4.1 Yönlenmemiş nanofiber membranların mekanik özellikleri (Ort±SS, n=4).	58
Tablo 4.2 Çift katmanlı matrikslerin kuru ve ıslak haldeki mekanik özellikleri (Ort±SS, n=6).	65





ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 2.1 Sinir hücresi.	6
Şekil 2.2 Nöronlar arası impuls iletimi.	7
Şekil 2.3 Omurilik bölümleri.....	9
Şekil 2.4 (A)Hasar sonrası omurilikte gerçekleşen olayların özet diyagramı ve (B) biyomalzeme bazlı tedavilerin avantajları [36].....	13
Şekil 2.5 Kolajenin yapısı.	18
Şekil 2.6 Lamininin yapısal gösterimi.	22
Şekil 2.7 PLGA' nın kimyasal yapısı.	26
Şekil 2.8 Elektroeğirme düzeneği ve fiber oluşumu [149].....	37
Şekil 2.9 Plastik sıkıştırma prosesinin örnek gösterimi [156].....	38
Şekil 3.1 Tip I kolajenden hazırlanan alt katman a) Fibrilleşme sonrası kolajen jeller b) ve c) Plastik sıkıştırma sonrası elde edilen kolajen film.	43
Şekil 3.2 Elektroeğirme düzeneği.....	45
Şekil 3.3 Çift katmanlı yapının oluşturulduğu toplayıcı düzeneği.	46
Şekil 3.4 MTS tetrazolyum tuzunun dehidrojenaz enzimi ile formazana dönüşmesi[164].....	50
Şekil 4.1 Sünger yapısındaki katı kolajen.	55
Şekil 4.2 Kolajene ait FTIR spektrumu.	56
Şekil 4.3 SDS-PAGE diyagramı A) ticari kolajen B) saflaştırılmış kolajen.....	57
Şekil 4.4 Yönlenmemiş nanofiber membranların SEM görüntüleri A) Col50/PLGA B) Col70/PLGA.	58
Şekil 4.5 Yönlenmemiş nanofiber membranlar üzerine kültür edilmiş ASC'lerin 7. gün konfokal mikroskobu görüntüleri A) Col50/PLGA B) Col70/PLGA(kırmızı:hücre iskeleti(phalloidin), mavi:çekirdek(DAPI)).	59
Şekil 4.6 Farklı kolajen/PLGA oranlarındaki çözeltilerden üretilen nanofibröz üst katmanların SEM görüntüleri.....	60
Şekil 4.7 Col5/PLGA, Col7/PLGA ve Col8/PLGA nanofibröz membranlarına ait yönlenme histogramları.....	61
Şekil 4.8 Kolajen alt katmanın SEM görüntüsü A) 500x B) 5000x.	62
Şekil 4.9 Çift katmanlı membranın yan kesit SEM görüntüsü A) 1000x B) 5000x...63	



Şekil 4.10 Nanofiber üst katmanlarının tip-I kolajen antikor immün boyama konfokal mikroskobu görüntüleri; A) Col5/PLGA, B) Col7/PLGA, C) Col8/PLGA (Ölçek: 20µm).....	64
Şekil 4.11 Col5/PLGA nanofiber üst katmanın laminin antikorla immün boyama konfokal mikroskobu görüntüleri; A) kontrol, B) laminin içeren örnek (Ölçek: 20µm).....	64
Şekil 4.12 NT-3 içeren kolajen membranların PBS (pH=7.4) çözeltisi içerisinde 37°C’de <i>in vitro</i> salım grafiği (n=4).	67
Şekil 4.13 Çift katmanlı doku iskelelerinin su tutma kapasitesi (n=6).....	68
Şekil 4.14 Farklı polimer konsantrasyonlarına sahip çift katmanlı membranlar üzerine kültür edilmiş ASC’lerin immünfloresan boyamalarına ait konfokal mikroskobu görüntüleri (kırmızı:hücre iskeleti(phalloidin), mavi:çekirdek(DAPI)).....	70
Şekil 4.15 Kolajen alt katman üzerine kültür edilmiş ASC’lerin immünfloresan boyamalarına ait konfokal mikroskobu görüntüleri A) biyomolekül içeren örnek B) biyomolekül içermeyen örnek (kırmızı:hücre iskeleti(phalloidin), mavi:çekirdek(DAPI)).....	71
Şekil 4.16 Farklı günlerde farklı membranlar üzerine tutunmuş ve ImageJ analiz programı ile belirlenmiş ASC sayıları (n=4).....	72
Şekil 4.17 ASC’lerin farklı membranlar üzerinde metabolik aktivitelerinin incelenmesi, MTS absorpsiyon sonuçları (n=4).	73
Şekil 4.18 Çift katmanlı farklı membranlar üzerinde kültür edilmiş DRG’lerin nörofilament boyamasına ait konfokal mikroskop görüntüleri (yeşil: nörofilament, mavi; çekirdek).	74
Şekil 4.19 Çift katmanlı farklı membranlar üzerinde kültür edilmiş DRG’lerin aksonal uzatılarının membranlar üzerinde kapladıkları alan (µm ²) (n=4).75	



OMURİLİK HASARLARININ DOKU MÜHENDİSLİĞİ YAKLAŞIMI İLE TEDAVİSİ İÇİN BİYOBOZUNUR ÜÇ BOYUTLU MATRİKS GELİŞTİRİLMESİ

ÖZET

Trafik kazaları, spor yaralanmaları, iş kazaları gibi bir tramva veya tümör, enfeksiyon, yumuşak doku hastalıkları gibi tramvatik olmayan bir sebepten oluşan omurilik hasarları, hastada neden olduğu kısıtlılıklar nedeniyle sadece hastanın kendisini etkilemek ile kalmayıp hasta ailesini ve tüm toplumu ilgilendiren önemli bir sağlık sorunudur. Oluşan hasarların hızlı ve etkili çözümüne yönelik olarak, hücre bazlı tedaviler, biyomalzemeler ve nörotik rejenerasyonu arttırıcı çeşitli biyolojik faktörlerinin tek başına veya ilaç salım sistemleri kullanımları gibi değişik yöntemler önerilmiştir. Ancak, kompleks bir doku hasarının onarımında tek etkili bileşen içeren bu tedaviler yetersiz kalmaktadır. Bu dezavantajlar düşünüldüğünde, bu tez çalışması ile hem aksonal yönlenmeyi sağlayacak morfolojik ve biyokimyasal yapıya sahip hem de rejenerasyonu stimule edici biyomoleküllerin salımını gerçekleştirecek çift katmanlı bir matriks üretimi amaçlanmıştır.

Çalışmanın ilk aşamasında, plastik sıkıştırma yöntemi ile aksonal rejenerasyonu teşvik eden nöronal büyüme faktörü Nörotrofin-3 (NT-3) ve glial skarı degrade etme yeteneğine sahip Kondroitinaz ABC (ChABC) enzimi yüklenen kolajen alt katman hazırlanmıştır. Daha sonra hazırlanan kolajen katmanın içerdiği biyomoleküllerin *in vitro* salım profilleri incelenmiştir. NT-3'ün 35 günde %15'i ortama salınırken, chABC molekülünün salım profili farklı yöntemler denenmesine rağmen çıkartılamamıştır. Daha sonra, tasarlanan çift katmanlı matrisin üst katmanını oluşturan ve sinir hücrelerinin üzerinde gelişip yönlenmesi için laminin proteini içeren, üç farklı konsantrasyonda kolajen/poli(laktat-ko-glikolat) (PLGA) polimer çözeltisinden elektroegirme yöntemi ile yönlendirilmiş nanofiber yapısında bir membranlar hazırlanmıştır. Üretilen iki katman elektroegirme prosesi sırasında birleştirilmiştir. Nanofiber üst katman adipoz kökenli kök hücrelerin (ASCs) ve dorsal kök gangliyonlarının (DRGs) aksonal uzantılarını belli doğrultularda büyümesini sağlayan yönlenmiş nanofiber yapısına sahipken kolajen alt katman pürüzsüz ve patensiz bir yapıya sahiptir. Morfolojik analizleri yapılan nanofiber üst katmanların içerdikleri kolajen/PLGA içeriğine göre farklı yönlenme derecelerine ve fiber çaplarına sahip oldukları belirlenmiştir. Yine içerdikleri kolajen/PLGA miktarına göre ıslak ve kuru halde biyomekanik davranışlarında da farklılıklar gözlemlenmiştir. Hücre tutunması açısından önemli olan su tutma kapasiteleri ölçülmüş ve bütün membranların aynı kolajen alt katmana sahip olması nedeniyle neredeyse eşit miktarda su tutma yeteneğine sahip olduğu görülmüştür. Tüm matrisler hücre yapışması ve gelişmesini sağlarken, biyomolekül içeren matrikslerin içermeyenlere göre ASCs ve DRGs gelişimde daha etkili olduğu, aksonal dallanma ve gelişmeyi pozitif etkilediği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: biyomalzemeler; sinir doku mühendisliği; omurilik hasarları; kolajen; NT-3 büyüme faktörü; laminin.



DEVELOPMENT OF BIODEGRADABLE 3D MATRICES FOR THE REPAIR OF SPINAL CORD INJURY BY A TISSUE ENGINEERING APPROACH

SUMMARY

Spinal cord injury could occur after a trauma caused by a traffic accident, sports injuries, work accident or by a non-traumatic reason, such as tumor removal, infection, soft tissue disease. This kind of injury is a critical health problem which not only limits lives of the patients but also effects their family and even entire population. Various methods have been proposed for the quick and effective solution for the damage, such as cell-based treatments, biomaterials, and the usage of several biological factors that increase neurotic regeneration, alone or by drug delivery systems. However, mentioned treatments contain only one active ingredient in repairing a very complex tissue injury, thus they are insufficient. Considering these disadvantages, for this thesis, it is aimed to produce a bilayered matrix that consisting both the morphological and biochemical structure to provide axonal orientation and the release of biomolecules in order to stimulate regeneration.

In the first part of the study, a collagen layer that was loaded both the neuronal growth factor Neurotrophin-3 that promotes axonal regeneration and Chondroitinase ABC (ChABC) enzyme which is capable of degrading the glial scar, was prepared by the plastic compression method. Then, in vitro release profiles of the biomolecules, contained in the prepared collagen layer, were examined. While NT-3 had been released into the damaged area in certain amounts over time, the release profile of the chABC molecule could not be determined despite different methods. Then, the nanofibrous membrane that forms the top layer of the bilayered matrix was constructed from the polymer solution prepared from different concentrations of collagen/poly (lactate-co-glycollate (PLGA) with the electrospinning method. This top layer also contained laminin proteins that promote neuronal regeneration. While the nanofiber top layer had an aligned nanofiber structure that provides adipose-derived stem cells (ASCs) and axonal extensions of the dorsal root ganglia (DRGs) to grow in same directions, the collagen substrate had a smooth and patternless structure. It was determined that the nanofiber top layers, which were analyzed morphologically, had different orientation degrees and fiber diameters according to the collagen / PLGA content they contained. On top of that, according to the amount of collagen / PLGA they contained, for both wet and dry state biomechanical behavior differences were also observed. Water uptake capacities, which are important for cell adhesion, were measured and it was clear that all membranes had the ability to absorb almost equal amounts of water due to bearing same collagen bottom layer. While all matrices provided sufficient cell adhesion and development, it was seen that in comparison with control membranes, biomolecule-containing matrices were more effective in the development of ASCs and DRGs and had positive affect on axonal branching and development.

Keywords: biomaterials; neuronal tissue engineering; spinalcord injury; collagen; NT-3 growth factor; laminine.



1. GİRİŞ

Sinir sistemi, merkezi sinir sistemi (MSS) ve çevresel sinir sistemi (ÇSS) olmak üzere iki bölümden oluşan, motor ve duyuşal işlevleri yöneten insan vücudundaki en önemli sistemdir. Merkezi sinir sistemi vücudun en önemli iki yapısı olan beyin ve omurilikten oluşurken, çevresel sinir sistemi ise vücudun geneline yayılmış olan sinir ağlarından oluşmaktadır. Merkezi sinir sistemi hasarları dünya genelinde her yıl pek çok insanı etkileyen zorlu bir durumdur. Alınan darbe sonucu gerçekleşen travma ile astrositler aktive olur, çoğalır ve glial skar oluşumunu önlemeye çalışırlar. Bu proses hasarın çevre dokulara yayılmasını engellese de, hasarlı bölgede kalıcı hasarların oluşumunu önleyemez [1]. Travmatik beyin hasarlarının yanı sıra en çok görülen merkezi sinir sistemi hasarlarından biri de omurilik hasarlarıdır. 2017 rakamlarına göre sadece Amerika’da her yıl 17.500 yeni vakanın görüldüğü ve yaklaşık 353.000 Amerikalının omurilik hasarıyla yaşamını devam ettirdiği istatistiksel bilinen bir gerçektir [2]. Nöronal fonksiyonların tam olarak yeniden iyileştirilmesi için uygulanan tedavilerin başarısı MSS’nin kompleks yapısı ve hasarlı bölgenin koşulları göz önünde bulundurulduğunda çok düşük ve zordur [3]. Günümüzde sinir hasarını tamamen iyileştiren başarılı bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır ve alternatif, başarı oranı yüksek tedavi yöntemleri için her geçen gün yeni araştırmalar yapılmaktadır. Klasik yöntemlerin yanında diğer bir yaklaşım ise biyomalzemelerin, biyosinyal moleküllerinin ve hücrelerin bir arada kullanıldığı doku mühendisliği yaklaşımıdır. Doku mühendisliği yaklaşımının bir alt dalı olan sinir doku mühendisliği de bu konuda çalışmalar yapan ve yapay sinir doku iskeleleri kullanarak hasarların tedavisinde klasik yöntemlere göre daha başarılı sonuçlar elde etmeyi hedefleyen pek çok bilim dalını içinde barındıran kompleks bir bilim dalıdır.

Sinir doku mühendisliği yaklaşımı, hasarlı bölgeyi taklit edecek yapay doku iskeleleri kullanarak sinir fonksiyonunu yenilemeyi ve hasarı gidermeyi amaçlamaktadır. Son zamanlarda giderek popüler hale gelen doku mühendisliği yaklaşımında doku iskelelerini üretmeye yönelik pek çok farklı yöntem geliştirilmiş olup her geçen gün bu yöntemler daha da iyileştirilmekte ve farklı yöntemler bir arada kullanılmaktadır. Gelişmiş yöntemlerin kullanılması ile günümüzde hasarlı bölgenin taranmasının ardından direkt bölgenin şekline uygun yapılar bile elde edilebilmektedir. Doku iskelelerinin üretiminde üretim yönteminin yanında

kullanılan malzemeler de iskelelerin başarılı bir performans sergilemesinde çok önemli bir yere sahiptir. Doku mühendisliği yaklaşımında, hücre dışı matris molekülleri, doğal polimerler ve sentetik polimerler doku iskelelerinin üretilmesinde kullanılırlar. Sentetik ve doğal biyomalzemeler, doku iskelelerinin yapımında kullanılan en temel malzemelerdir. Özellikle kolajen, hiyaluronik asit, ipek fibroin, kitosan gibi doğal kaynaklı biyomalzemeler doğal insan dokusu ile benzer karakteristik özellikler gösterdiği için biyouyumlulukları çok yüksektir. Diğer yandan doku iskelelerinin üretiminde sıklıkla kullanılan poli(laktik asit) (PLLA), poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), poli(glikolik asit) (PGA), poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) gibi FDA (Food and Drug Administration) onaylı sentetik biyomalzemeler ise doğal biyomalzemelerle karşılaştırıldıklarında çok iyi mekanik ve kimyasal özelliklere sahiptirler. Biyomalzemelerin yanı sıra doku iskelesinde yüklenen biyosinyal molekülleri ve hücreler de oluşan hasarların daha çabuk giderilmesi ve hücrelerin gelişimin oluşmasında çok önemlidirler. Sinir hücrelerinin oluşumunda ve gelişiminde pek çok farklı hücre çeşidi kullanılırken mezenkimal kök hücreler (MSCs) ve nöral progenitör hücreler (NPCs) en çok kullanılan hücre tipleridir. Ayrıca hem doku iskelesi üzerine ekilen hem de hasarlı bölgedeki hücrelerin daha sağlıklı gelişimleri için çeşitli nörotik büyüme faktörleri de kullanılmaktadır.

Sinir doku gibi kompleks bir dokunun iyileşmesi için birden fazla ve birbirinden farklı malzemelerin çok çeşitli üretim yöntemleri ile işlenerek bir arada kullanıldığı doku iskelelerinin kullanımı ile doku mühendisliği yaklaşımı son zamanlarda umut vadeden yöntemlerden biridir. En ideal ve başarılı tedavi için doku iskelelerinin gelişimleri ise hala devam etmektedir.

1.1. Tezin Amacı

Omurilik hasarlarının tedavisi için kök veya primer hücre transplantasyonu, büyüme faktörü salımı veya biyomalzeme kullanımını temel alan değişik stratejiler mevcuttur. Ancak bu yöntemlerin tek başına kullanımı etkinliklerini azaltmaktadır. Bu sistemlerin kombinasyonundan oluşan doku mühendisliği yaklaşımı, bileşenlerin dezavantajlarını ortadan kaldırarak etkili ve hızlı bir çözüm sunması bakımından önemlidir. Bu tezde, doku mühendisliği yaklaşımından yola çıkılarak nörotik hücre büyümesini stimüle edici faktörlerin salımını sağlayacak ve aynı anda aksonal yönelme için gerekli özellikler taşıyan çift katmanlı bir matriks hazırlanması

planlanmaktadır. Bir sonraki aşamada bu matriksin, rejenerasyonda olumlu yönde bir rol oynadığı bilinen mezenkimal kök hücreler ile birleştirilerek *in vivo* implantasyon için hazır hale getirilecektir. Tez kapsamında üretilecek olan kolajen bazlı çift katmanlı matriks, çift fonksiyona sahip özgün bir tasarımıdır. Bilgimiz dahilinde literatürde bu tip bir çift katmanlı matriks omurilik hasarı tedavisi için önerilmemiştir.

Bu kapsamda hazırlanan doktora tezinin amacı, omurilikte oluşan travmatik hasarların giderimi için mezenkimal hücreler için taşıyıcı görevini üstelenecek ve aynı anda aksonal rejenerasyonu stimüle edici biyosinyal moleküllerinin salımını sağlayabilecek çift katmanlı 3 boyutlu bir matriks üretimi ve omurilik hasarlarının bu matris ile tedavi edilmesidir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sinir Sistemi

Sinir sistemi, konuşmak, yürümek, yazmak, ağlamak gibi irade dâhilinde olan ve vücut ısısı, kan basıncı ayarı, solunum, dengede durmak, uyanıklık gibi irade dışı olan tüm fonksiyonları yürüten canlı yapısının en önemli sistemidir. Merkezi sinir sistemi ve çevresel sinir sistemi olarak iki bölümde incelenmektedir. MSS vücudun en önemli iki organı olan beyin ve omurilikten oluşurken, ÇSS ise beyin ve omuriliğin vücudun diğer kısımlarıyla iletişimini sağlayan tüm vücuda yayılmış sinir hatlarından meydana gelmektedir. ÇSS'yi oluşturan sinir demetleri de kendi içinde iki parçaya bölünmüştür; doku ve organlardan MSS'ye sinyalleri taşıyan duyuşal nöronlar ve MSS'den verilen cevapları doku ve organlara ileten motor nöronları. Ayrıca sinir sistemi işlevsel bakımdan da somatik sinir sistemi ve otonom sinir sistemi olarak iki grupta incelenebilir. Somatik sinir sisteminde bilinçli olarak yapılan işlemleri kontrol ederken, otonom sinir sistemi ise bilinçsiz olarak beyin tarafından otomatik olarak kontrol edilen işlevleri kapsar. Solunum, kalp atışları, iç organların çalışması gibi sürekli aktif halde bulunan süreçleri otonom sinir sistemi kontrol eder ve yönetir [4]. Tablo 2.1'de sinir sistemi şematik olarak sunulmuştur.

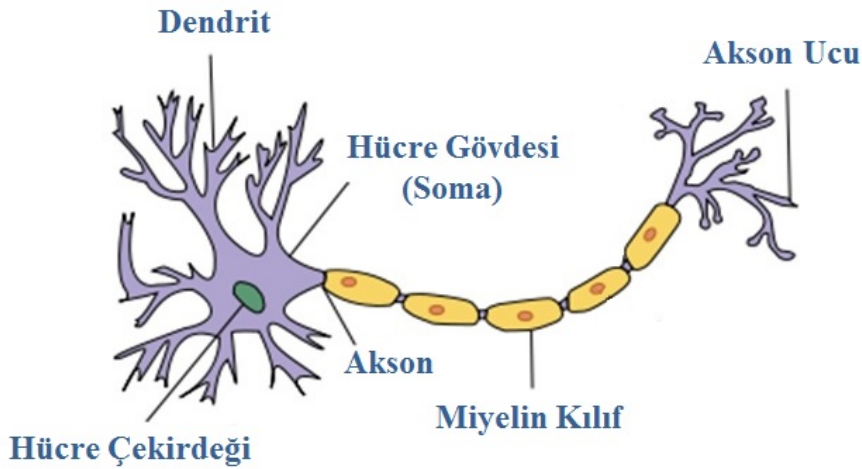
Tablo 2.1 Sinir sistemi bölümleri.

Sinir Sistemi

- I.** Merkezi Sinir Sistemi
 - A.** Beyin
 - B.** Omurilik
 - II.** Çevresel Sinir Sistemi
 - A.** Duyuşal Nöronlar
 - B.** Motor Nöronları
 - a.** Somatik Sinir Sistemi
 - b.** Otonom Sinir Sistemi
-

Sinir sistemi, temel yapıtaşı olan ve sinir sistemine özgü fonksiyonları yerine getiren sinir hücreleri ve impuls iletiminde katılmayan fakat destek, fagositoz, beslenme, tamir, miyelinleşme gibi fonksiyonları üstlenen sinir dokusuna özgü çeşitli özel hücrelerden oluşur. Sinir hücreleri, çevresel uyarıları alıp beyne ileten ve bu uyarıların cevabını beyinden de ilgili dokuya ileten, belli hücresel aktiviteleri başlatan,

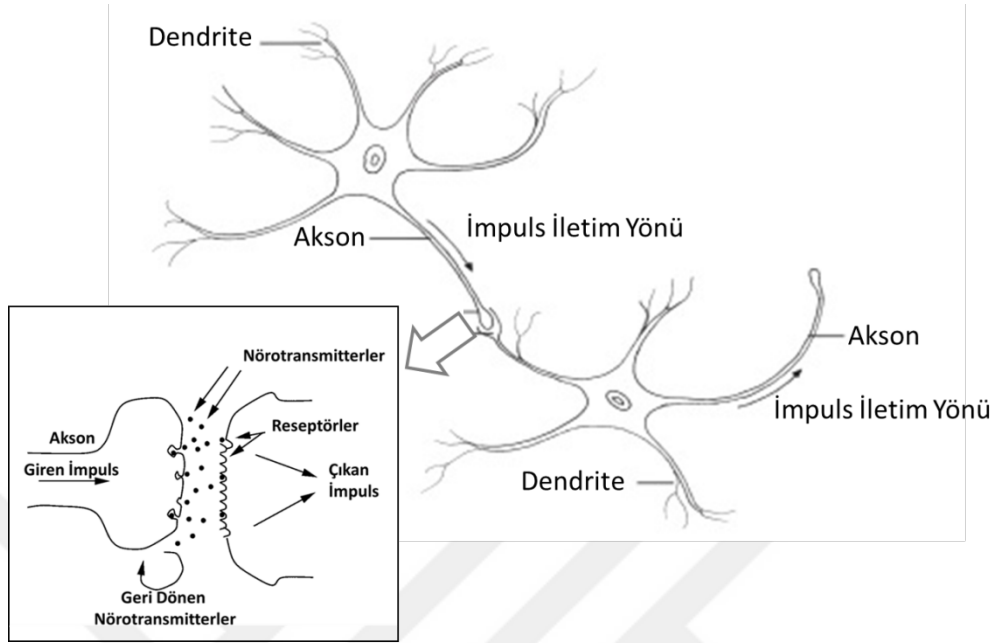
nörotransmitterleri ve diğer bilgi moleküllerini sentezleme ve salgılama gibi görevlerden sorumlu temel hücrelerdir. Glial hücreler ise astrosit, oligodendrosit, mikroglia ve ependimal hücreler olmak üzere farklı hücreler topluluğudur ve sinir hücrelerini destekleyen, koruyan, beslenmeleri, solunum ve metabolik faaliyetlerini düzenleyen özel sinir sistemi hücreleridir [5]. Sinir hücreleri yani nöronlar soma adı verilen hücre gövdesi, hücre gövdesinden uzanan çok sayıda minik dallanmış uzantılar olan dendritler ve bir adet uzun çıkıntı olan aksondan oluşur. Dendritler, çevreden duysal nöronlardan gelen sinyallerin beyine ve omuriliğe iletilmesini sağlarken, akson ise beyin ve omurilikten gelen cevapların motor nöronlar vasıtasıyla diğer sinir hücreleri veya kas hücrelerine iletilmesinde görevlidir. Nöronların uzun çıkıntıları olan aksonlar, hücre gövdesinden akson ucuna kadar uzanan yağ hücrelerinden oluşmuş miyelin kılıfla kaplıdır. Miyelin kılıf sinyal iletimini sağlayan aksonları bir yalıtım malzemesi gibi kaplayarak korur ve iletimin düzgün bir şekilde olmasını sağlar. Bu sayede MSS organları ile diğer doku ve organların arasındaki bilgiler, elektriksel ve kimyasal impuls şeklinde nöronlar arası sorunsuzca aktarılır [6].



Şekil 2.1 Sinir hücresi.

Dendritler vasıtasıyla alınan elektriksel impuls hücre gövdesinden geçip akson boyunca hareket ederek akson uçlarına ulaşır. Akson ucuna ulaşan impuls burada salgılanan nörotransmitter adı verilen bir madde ile kimyasal olarak diğer nörona iletilir. Nörotransmitter yardımıyla bir sinir hücresinin akson ucundaki impuls diğer

sinir hücresinin dendritine aktarılır ve bu olaya sinaps adı verilir [6]. Sinir hücreleri arası sürekli devam eden impuls iletimi Şekil 2.2’de gösterilmiştir.



Şekil 2.2 Nöronlar arası impuls iletimi.

2.1.1. Merkezi Sinir Sistemi

Merkezi sinir sistemi, vücudun en önemli iki yapısı olan beyin ve omurilikten oluşur. Baş bölgesinde bulunan beyin kemik yapıda kafatası ile korunurken, sırt bölgesinde enseden kuyruk sokumuna kadar uzanan omurilik ise birbiri ardına sıralanmış omurlar vasıtasıyla dışarıdan gelebilecek fiziksel darbelere karşı korunur. Ayrıca bu kemik korumasına ek olarak beyin ve omurilik, meninksler olarak bilinen duramater, arkanoid membran ve piamaterden oluşan üç katmanlı zar ile çevrelenmiştir. MSS ayrıca beyin ve omurilik arasında sürekli dolaşım halinde olan beyin-omurilik sıvısı (BOS) denilen renksiz bir sıvı tarafından mekanik ve immünolojik olarak korunmaktadır [7, 8]. Kimyasal olarak beyini koruyan bir membran da kan-beyin bariyeridir. Bu bariyerin seçici geçirgenlik özelliği sayesinde glukoz ve oksijen gibi beyinin beslenmesini sağlayan maddeler beyin içerisine geçerken, kandaki toksik veya zararlı maddeler beyin ortamına geçmeyi başaramaz.

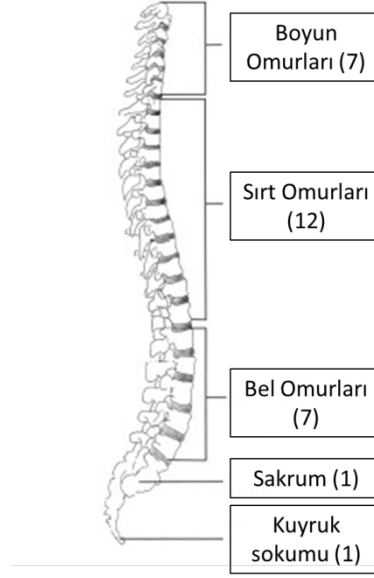
Merkezi sinir sistemi ak madde (white matter) ve boz madde (gray matter) denilen iki bölümden oluşur. Ak madde beyin iç, omuriliğin ise dış bölgesinde bulunur ve miyelin kılıf ile kaplanmış akson demetlerinden oluşur. Ak madde denilmesinin sebebi aksonları çevreleyen miyelin kılıfların yağ moleküllerinden oluştuğu için

beyaza yakın bir renkte olmalarıdır. Boz madde ise beynin dış tabakasını omuriliğin ise iç bölgesini oluşturan, hücre gövdeleri ve dendritlerden oluşan bölümdür. Beyinde bulunan boz madde sinir mesajını alır, sıralar ve işler, omurilikte bulunan boz madde ise uyarılara otomatik cevap verme gibi refleks eylemi için bir merkez görevi görür. Ayrıca MSS ve ÇSS’de hücre gövdelerinin bir küme olarak toplu halde bulundukları bölgelerin adları da farklıdır. MSS’de hücre gövdelerinin bir arada bulunduğu bölüm nükleus olarak adlandırılırken, ÇSS’de ise bu bölüme ganglion denir. Nükleuslar beynin orta bölgesinde bulunurken, spinal ganglionlar omuriliğin çevresinde her omur çevresinde iki adet bulunmak üzere sağ ve sol tarafında konumlanmıştır [9].

2.1.1.1. Omurilik

MSS’nin bir parçası olan omurilik, sırt bölgesinde bulunan omur denilen birbiri ardına sıralanmış kemik yapıların içinden geçerek beyinden kuyruk sokumuna kadar uzanan sinir hattının tamamıdır. Omurilik, deri, kaslar ve eklemler gibi vücudun pek çok bölgesinden gelen duyuşsal bilgileri toplar, elektriksel impuls olarak beyne iletir. Beyin, gelen impulslara karşılık motor komutları oluşturur ve omuriliğe iletir. Omurilikteki sinirlerde bu cevapları motor sinirler vasıtasıyla ilgili merkezlere ulaştırır [10].

Omuriliği oluşturan sinirler omur kolonu adı verilen bir yapı ile fiziksel darbelere karşı korunurlar. Şekil 2.3’te görüldüğü gibi omur kolonu, 7 boyun (cervical), 12 sırt (thoracic) ve 5 bel (lumbar) olmak üzere birbirlerinden bağımsız eklemlerle birleşmiş 24 omur, sakrum ve kuyruk sokumu kemiğinden oluşur. Sakrum ve kuyruk sokumunda bulunan omurlar ise kaynaşarak birer kemik haline gelmiştir.



Şekil 2.3 Omurilik bölümleri.

Doku ve organlardan beyne iletilen uyarılar ve beyinden bu uyarılara karşı verilen cevaplar omurilik yoluyla iletilirler. Omurilik, beyinle organlar arasındaki bilgi iletişimi sağlar ve refleks davranışları gerçekleştirir. Omurilik dışta ak madde ve içte H şeklinde bir boz maddeden oluşur. Dış bölgesine bulunan ak madde, miyelin kılıf ile kaplanmış akson demetlerinden oluşur ve duyu ve motor nöronların elektriksel impulslarının omurilik vasıtasıyla beyin ve ÇSS arasında iletimini sağlar. İç bölümdaki boz madde ise hücre gövdeleri ve dendritlerden oluşur ve istemli hareketleri ve vücudun doğal fonksiyonlarını yerine getiren refleks koordine merkezidir. Omuriliğin dorsal (arka) boynuzu duyu sinirleri alırken, ventral (ön) boynuzu ise motorik sinirleri alır. Bazı çevresel sinirler direkt beyindeki kranyal sinirlere bağlanırken, 31 çift çevresel sinir ise omurilik sinirleri ile birleşerek dokulardan gelen mesajların omuriliğe aktarılmasını sağlar [11]. Her sinir bölümü vücutta spesifik bir bölgeyi temsil eder ve sinyallerinin beyne iletiminde görev alır.

2.2. Sinir Sistemi Hasarları

Merkezi sinir sistemi, vücudun tüm fonksiyonlarını düzenleyen beyin ve dokular arasındaki iletişimi sağlayan omurilikten oluşan bir yapıdır. Travmatik beyin hasarı (TBI) ve omurilik hasarı (SCI), beyin ve omuriliğe alınan fiziksel darbeler sonucu oluşan hafiften şiddetliye kadar uzanan farklı şekillerde ortaya çıkar. MSS’de oluşan hasarlar, darbenin şekline, şiddetine ve uygulandığı bölgeye bağlıdır. Fakat darbenin ilk uygulandığı lokasyona bakmaksızın, hasar devam eden bir süreçtir ve birincil

hücre hasarı, hem hücre gövdesini hem de aksonal fonksiyonu etkileyebilecek zararlı olaylardan oluşan ardışık bir sürece yol açarak devam eden bir fonksiyon bozukluğuna ve dejenerasyona neden olur [12]. Yetişkin MSS yaralanması, merkezi nöronların doğru aksonal ve dendritik bağlantıları yeniden üretememesi nedeniyle yıkıcıdır. Alınan hasar, sadece sağlıklı nöronlar arasındaki iletişimde bir kesintiye sebep olmaz, nöronal dejenerasyon ve hücre ölümüne de sebep olan bir dizi olayı tetikler. Memeli canlıların periferik sinirlerinin aksine merkezi nöronlar hasardan sonra fonksiyonel aksonları yeniden oluşturmazlar [13].

Hastalık veya travma sonucu MSS’de oluşan dejenerasyonlar insanların yaşam kalitesini büyük oranda düşüren yıkıcı sonuçlar doğurur ve günümüzde MSS hasarları ile yaşayan insan sayısı azımsanmayacak ölçüdedir. Sadece Amerika Birleşik Devletleri’nde her yıl 1.7 milyon insana TBI tanısı konulurken, yaklaşık 17 bin yeni SCI tanısı ile sadece 2017 yılında ortalama 300 bin kişiye SCI tanısı konulmuştur [2, 14].

2.2.1. Omurilik Hasarları

Omuriliğe uygulanan fiziksel darbeler, omurların tek veya çoklu olarak hareket etmesine ve omurlar içinden geçen sinir hattının hasarına sebep olur. Bu hasarın kalıcılığı veya ortaya çıkaracağı sonuçlar, darbenin şiddetine bağlı olarak değişir. Omuriliğin zarar görüp kesintiye uğradığı yerden itibaren ayaklara kadar hareket ve algı fonksiyonları biter. Sırt ve bel omurlarına alınan darbeler sonucu kısmi felç (parapleji), boyun bölgesindeki omurlarda oluşan hasarlar sonucu ise tam felç (tetrapleji) meydana gelir [15].

Omurilik hasarlarında birincil hasar mekanik doku yıkımıdır. Sinir dokusunu çevreleyen kemik dokusunun, eklemlerin ve disklerin kırılması veya yerinden oynaması hem MSS’yi hem de ÇSS’yi etkiler. Bu süreçte kan damarları zarar görür, aksonlar ve sinir hücre membranları bozulur. Boz madde içinde mikro kanama başlar ve bu kanama zamanla omuriliğin şişmesine sebep olur. Kısa sürede, yaralanma seviyesinde kanalın tüm çapını işgal eder. Omuriliğin şişmesi, toplardamarın kan basıncını aştığında ikincil iskemi ortaya çıkar. Kan akışının otoregülasyonu sona erer ve spinal nörojenik şok sistemik hipotansiyona yol açar, böylece iskemiyi şiddetlendirir. İskemi, parçalanmış nöral membranlardan zehirli kimyasalların

salınması ve elektrolit kaymalarıyla komşu hücrelere zarar vererek veya onları öldürerek esas mekanik hasarı büyük ölçüde oluşturan ikincil hasarı tetikler [16].

Yaralanma sonrasında, boz maddede gelişen hipoperfüzyon, çevredeki ak maddeye ulaşır. Bu hipoperfüzyon, aksonlar boyunca aksiyon potansiyellerinin yavaşlamasına ve durmasına sebep olur ve spinal şoku tetikler. Hasarlı hücreler, aksonlar ve kan damarları, sağlam çevre hücrelere saldıran toksik kimyasallar salgılar. Bunlardan glutamat, eksitotoksisite olarak bilinen oldukça yıkıcı bir süreçte önemli rol oynar. Hasar görmüş spinal nöronları, aksonları ve astrositlerinden aşırı salgılanan glutamat, çevre hücreleri uyarır. Aşırı uyarılmış hücreler, serbest radikallerin üretimi de dâhil olmak üzere bir dizi yıkıcı olayı tetikleyen kalsiyum iyonlarının dalgalarına izin verirler. Bu yüksek derecede reaktif moleküller, sağlıklı nöronları öldürerek, hücre membranlarına ve diğer hücre bileşenlerine saldırır. İlk etapta eksitotoksitenin sadece nöronları etkilediği düşünülmüştür, ancak yapılan çalışmalar sinir sisteminde miyelinizasyonu sağlayan hücreler olan oligodendrositleri de öldürdüğünü göstermektedir [16, 17].

2.3. Omurilik Hasarlarının Tedavisi

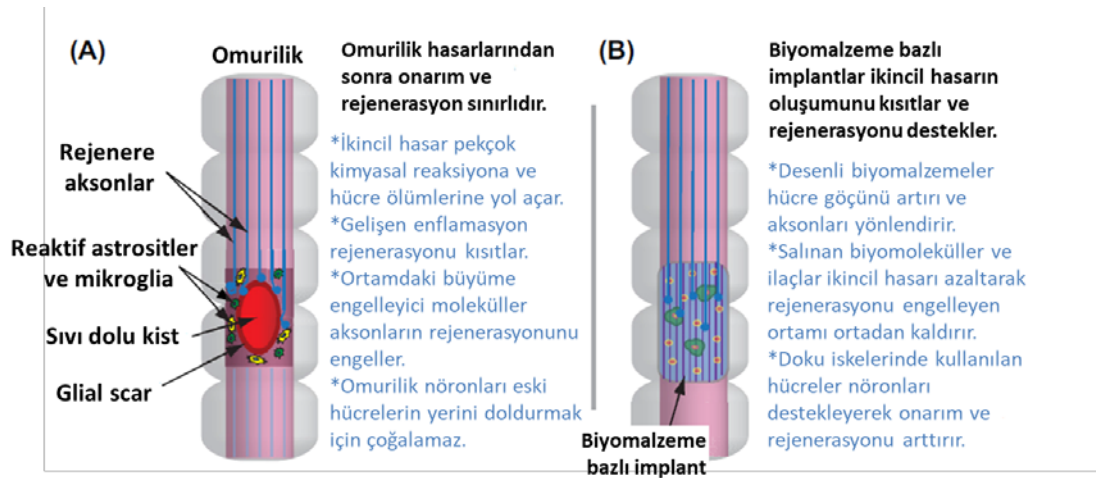
Hasar görmüş bir omuriliğe uygulanacak ilk terapötik yaklaşım omuriliğe daha fazla zarar verilmesinin engellenmesidir. Omurilik üzerindeki baskı azaltılır, stabil olmayan lezyon stabilize edilir ve kaynaştırılır, ardından oluşabilecek ikincil komplikasyonlar ele alınarak bunların engellenmesi veya en aza indirgenmesi için çeşitli tedaviler başlatılır [18]. Omurilik hasarlarını onarmak için günümüzde dört temel strateji vardır: (i) sinir büyümesi uyarıcı faktörler veya nöronal uzantıların inhibitörlerini baskılayan moleküller kullanılarak kesilen sinir lifi yollarının yeniden büyümesini teşvik etmek; (ii) akson büyümesini destekleyen ve yara dokusunun neden olduğu bariyeri azaltan doku iskeleleri ile omurilik lezyonlarını köprülemek; (iii) hasarlı miyelin kılıfların onarımı ve lezyon bölgesinde sinir lifi impuls iletimini geri kazandırmak ve (iv) lezyonlu bölgenin çevresindeki hasar görmemiş sinir hücrelerinin büyümesini teşvik ederek MSS plastisitesini arttırmak [10]. Böylece hücre ölümleri azaltılıp, hasarın boyutunu en aza indirilerek hasarlı dokuyu onarmak için nörodejenerasyon süreci kolaylaştırılır [19]. Bu amaç doğrultusunda SCI sonrasında hücre ölümünü azaltmak ve hasarı en aza indirmek için nöroprotektif ajanların kullanımını test eden ve devam eden klinik çalışmalar vardır [20, 21]. Fakat

çeşitli sinir koruyucu ajanların kullanılması rejenerasyon ve doku onarımında etkili değildir. Yapılan bazı çalışmalar sonucu omurilik hasarlarının tedavisinde nöropatik faktörlerin çeşitli aksonal cevaplara neden olduğu görülmüştür [22]. Sinir sistemi ile ilgili büyüme faktörlerinin (FGF-2, NGF, BDNF veya NT-3) direkt veya enkapsüle edilmiş formda hasarlı bölgeye verilmesi şeklinde uygulanan tedaviler mevcuttur [23-25]. Bunların sonucunun da hücre temelli tedavilere benzer şekilde miyelinizasyonu ve aksonal migrasyonu arttırdığı gözlenmiştir. Ancak, büyüme faktörlerinin tek başına kullanıldığı durumlarda, omurilik ya da MSS'nin endojen rejenerasyon potansiyelini stimule edemediği görülmüştür. SCI tedavisinde uygulanan diğer bir yöntem olan kök hücre temelli stratejilerin, sinir hücrelerinin onarımı ve yenilenebilmesi için etkili oldukları düşünülmektedir [18, 26]. Bu yaklaşımda amaç, zarar görmüş omurilik hücrelerini bunlara dönüşecek kök hücreler ile yeniden oluşturmak veya dolaylı olarak iyileşmeyi teşvik etmeye dayanır [27]. Schwann hücreleri, olfactory ensheathing hücreleri (OECs), mezenkimal kök hücreler (MSCs) ve nöral kök hücrelerin kullanıldığı birçok çalışma mevcuttur [28-31]. Bununla beraber kullanılan kök hücrelerin hayatta kalım oranlarını artıracak ve işlevlerini geliştirecek stratejilere ihtiyaç vardır. Bu ihtiyaç sonucunda kullanılan terapötik stratejilerin optimize edilmesi çeşitli biyomalzemelerin kök hücre ve büyüme faktörleri ile birlikte kullanımları gibi yöntemler geliştirilmiştir [32, 33].

2.3.1. Doku Mühendisliği Yaklaşımıyla Tedavisi

Sinir dokunun tedavisinde alternatif olarak kullanılan ve günümüzde daha da yaygınlaşan sinir doku mühendisliği, tedavide kullanılan mevcut yöntemlerde karşılaşılan sınırlandırmaların üstesinden gelmek için *in vitro* ortamda sinir iskeleleri geliştirmek amacı taşır. Sinir doku mühendisliği yaklaşımında üretilen doku iskelelerinin görevi, hasarlı bölgelerin yerini almak ve burada sinir fonksiyonunu geri kazanmaktır [34]. Akut yaralanma olayları ilk hasardan sonra çok hızlı bir şekilde meydana geldiğinden, mevcut tedaviler genellikle yüksek doz steroidlerin uygulanmasıyla ikincil hasarın derecesini sınırlamak için tasarlanmıştır [35]. Bu amaçla bile, klinik müdahale için çok az seçenek vardır. Doku mühendisliği yaklaşımı, omuriliğin yaralanmasıyla oluşan ikincil hasarın daha etkin bir şekilde yönetilip tedavi amacı sunar. Son yıllarda, dokuya özel birçok sinir iskelesi tasarımı ve üretim tekniği araştırılmıştır. Orijinal dokuyu taklit yeteneği yüksek ve üretim kolaylığı sağlayan elektroegirme ve 3 boyutlu (3B) baskı teknikleri doku iskelesi

üretim yöntemleri arasında en yaygın olan yöntemlerdir. Doğal polimerlerden üretilmiş materyaller, sinir doku mühendisliği uygulamaları için yüksek biyoyumluluğa ve insan doğal dokusuna benzer özelliklere sahiptir. Bununla birlikte, birçok doğal polimerin zayıf mekanik özellikleri, kolayca ayarlanabilen kimyasal ve mekanik özelliklere sahip sentetik polimerler vasıtasıyla gerekli özellikleri karşılamak üzere ayarlanabilir. Sentetik biyomalzemelerin en büyük dezavantajı ise zayıf hücre yapışma özellikleridir. Bu nedenle, benzersiz özelliklere sahip kombine edilmiş sentetik ve doğal polimerlerin kullanılması, hasarlı sinir dokularını onarmak için uygun bir çözüm olabilir [34]. Ayrıca üretilen biyomalzemeler, ikincil hasar sonrası ortaya çıkan olayları kontrol altına alabilecek biyomoleküller ve ilaçlar için gelişmiş salım sistemleri amacıyla da kullanılabilir. Bu tip sistemler, geleneksel yaklaşımlarla elde edilemeyen düzeyde kontrol ve hassasiyetle biyokimyasal faktörlerin hasarlı bölgede etkin kullanılmasını sağlayabilir. Biyomalzeme bazlı tedavinin diğer bir avantajı yaralanma bölgesi boyunca aksonal rejenerasyonu kolaylaştırmaktır. Eski ve uzun süredir bilinenin aksine, MSS'deki aksonların da rejenere olma kapasiteleri vardır fakat yaralanma sonrası oluşan ortamın büyümeyi inhibe edici doğasından dolayı rejenerasyonun meydana gelmesi önlenir. Aksonal rejenerasyonu teşvik etmek için iki ana strateji: (1) hasar gören ortamının aksonal büyümeye daha az engelleyici hale getirilmesi ve (2) rejenerasyon için alternatif bir yol olarak tasarlanmış ÇSS tedavi yaklaşımına benzer bir sinir köprüsünün sağlanmasıdır. Böylece bölgedeki fiziksel ve kimyasal ortamını kontrol edilerek aksonal rejenerasyon teşvik edilebilir [36].



Şekil 2.4 (A)Hasar sonrası omurilikte gerçekleşen olayların özet diyagramı ve (B) biyomalzeme bazlı tedavilerin avantajları [36].

2.4. Doku Mühendisliği

Doku mühendisliği, kısmen veya tamamen fonksiyonunu yitirmiş doku ve organların fonksiyonlarını yeniden devam ettirebilmek, yenilemek veya geliştirmek için mühendislik, temel bilimler ve sağlık bilimleri gibi farklı disiplinlerin bir araya gelerek beraber çalıştığı multidisipliner bir alandır. Doku mühendisliğinde temel düşünce, organ nakli ve biyomalzeme implantasyona dayanan sınırlı geleneksel tedavilerin sınırlarını aşmaktır [37]. Klasik transplantasyonlar sonucu oluşan şiddetli immünolojik cevaplara karşın, hasta ile birlikte gelişip büyüyen immünolojik olarak toleranslı "yapay" organ ve doku ikamesi geliştirme potansiyeline sahip olan doku mühendisliği yaklaşımı, ek tedaviye ihtiyaç duymadan hasarlı organ veya dokunun kalıcı olarak ve uzun vadede maliyet etkin bir şekilde tedavini amaçlar [38].

Doku mühendisliği yaklaşımında üç önemli nokta vardır: biyomalzeme, hücre ve biyosinyal molekülleri. Bu yaklaşım, doğal veya sentetik biyobozunur malzemelerden elde edilmiş doku iskelesi, tedavi edilecek dokuya özgü veya o dokuya farklılaşabilecek kök hücreler, biyokimyasal ve fiziksel indükleyici faktörlerin bir arada kullanıldığı çok işlevli bir yapıdadır [39].

Doku mühendisliği yaklaşımının ardındaki temellerden biri 3B büyüme kabiliyetine sahip olmayan hücrelerin *in vitro* ortamda 3B organ veya dokuya gelişimidir. Hücrelerin 3B bir düzende büyüüp gelişmeleri, doku iskelesi olarak bilinen gözenekli matrisler üzerine hücrelerin tohumlanması ve bu yapı üzerine tutunarak burada gelişim göstermesi ile elde edilir [37]. Bu nedenle, doku iskelesi doku mühendisliği için çok önemli bir bileşendir. İdeal bir doku iskelesinde olması gereken pek çok özellik sayılabilir ama yüksek biyoyumluluk ve doku entegrasyonu, immün reaksiyonlara sebep olmaması, ideal degradasyon hızı ve degradasyon sonucu açığa çıkan ürünlerin toksik olmaması, istenilen mekanik özelliklere sahip olması, hücre yapışması, farklılaşması ve çoğalması için uygun yüzeylere sahip olması ve vaskülarizasyonunu desteklemek için uygun ölçekte birbirine bağlı gözeneklere sahip olması en temel gereksinimlerdir [40].

2.4.1. Doku İskelesi Üretiminde Kullanılan Polimerler

Doku iskelesi üretilirken en önemli unsurlardan biri üretilecek malzeme seçimidir. Doku iskelesinin işlevine ve kullanım bölgesine göre istenilen özellikleri sağlamak

için biyomalzeme olarak doğal ve sentetik polimerler kullanılır. Biyobozunur veya bozunmaz olabilen bu malzemelerin kendi içinde değişen pek çok özellikleri, avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır [41, 42]. Doğal polimerler doğal kaynaklardan kolaylıkla elde edilebilirler ve elde edildikten sonra bir takım kontrollü sentezden geçtikleri ve bunun sonucunda düzenli yapılara sahip oldukları için, fiziksel, mekanik ve biyolojik olarak öngörülebilir özelliklere sahiptirler. Biyobozunur olan doğal polimerler, yapılarında bulunan bazı sinyal molekülleri sayesinde hücrelerin tutunmaları için daha elverişli bir ortam hazırlar. Fakat bunun yanında steril edilmeleri zordur ve kontaminasyona sebep olabilecek moleküller de içerebilirler. Diğer dezavantajları ise bozunma hızlarının yüksek olması ve düşük mekanik dayanımlarıdır. Bu dezavantajların önüne geçebilmek ve istenilen sonuçları elde edebilmek için çeşitli çapraz bağlama tekniklerinin uygulanması gerekir [43]. Sentetik polimerler ise daha kolay steril edilebilirler ve uygulamada istenilen özelliklere göre poroziteleri, yapıları, bozunma hızları, sertlikleri kontrol edilebilir ve ayarlanabilir. Hücreler için tanınma biyosinyal moleküllerinden yoksun olmaları ve biyolojik olarak uyumsuzluğa sahip olmalarına rağmen, biyolojik olarak çeşitli işlemler sonucu fonksiyonelleşmeleri bu tür sorunların ortadan kaldırır [41, 44].

2.4.1.1. Doğal polimerler

Doğal kaynaklardan elde edilen polimerler, hücre dışı matrise (ECM) olan benzerlikleri ve yüksek biyolojik uyumlulukları sebebiyle doku iskelesi üretiminde sıklıkla kullanılan malzemelerdir. Aljinat, kolajen, jelâtin, fibrinojen, ipek fibroin, hyalüronik asit, selüloz, nişasta, kitosan, pektin (pektinik asit), gellan, dekstran, pullulan, doku mühendisliğinde yaygın kullanılan doğal polimerlerdir.

Canlıların deri, tendon ve bağırsak gibi dokularından elde edilen kolajen yüksek biyoyuumluluğu ve iyileşme sürecindeki katkılarından dolayı doku mühendisliği alanında en yaygın olarak kullanılan doğal polimerdir. Ayrıca yüksek gerilme direnci, düşük uzama, düşük antijenite, zayıf immünojenite, yara iyileşmesi ve pıhtılaşma destekleyici yapıya sahiptir. Kolajen ve kolajen bazlı ürünlerin FDA tarafından onaylanmış ve insanlar üzerinde kullanılmasına izin verilmiş olması da kullanımını artırmıştır [45].

İpek böcekleri ve örümcekler tarafından üretilen ipeğin yapısında doğal proteinler olan serisin ve fibroin bulunmaktadır. Lifli bir yapıda olan fibrin ipeğin temel yapısını oluştururken serisin ise lif yapısını çevreler ve yapışkan bir özellik katar. İpek fibroinin sahip olduğu mükemmel mekanik özellikler, diğer doğal polimerlerle karşılaştırıldığında ona büyük bir avantajı sağlar. Buna ek olarak yüksek biyouyumluluk, su bazlı işleme, biyobozunurluk ve fonksiyonel değişiklikler için kolay erişilebilir kimyasal grupların varlığının bulunması da diğer önemli avantajlarıdır [46].

Deniz kabuklularının ve mantarların yapısında bulunan ve doğada sıkça rastlanan doğal proteinlerden biri olan kitinin yüksek alkali ortamda kısmi deastilasyonu ile kitosan elde edilir. Kristalin yapıda amino-polisakkarit olan polimerin molekül ağırlığı ürünün kaynağına ve üretim şekline bağlı olarak değişir. Çözünürlük özelliği ise çözücü pH'sına bağlı olup, pH=7 ve üzerinde suda çözünmezken, pH≤6 olan seyreltik asitlerde çözünür. Yapısı bağ dokusunda bulunan glukozaminoglikana benzeyen kitosan, sahip olduğu antibakteriyel ve antifungal özellikler ile yara iyileşmesi sırasında dokuyu destekler [47]. Ayrıca molekül ağırlığı gibi çeşitli faktörlerle bozunma hızının kontrol edilebilir olması kitosanın biyomalzeme olarak kullanımını artırmıştır [48].

Bitki, alg ve bazı türde mantar ve bakterilerden elde edilen selüloz, doğada en çok bulunan polisakaritlerden biridir. Mükemmel biyouyumluluk, biyobozunurluk, termal ve mekanik özelliklere sahip selüloz, doku mühendisliği uygulamalarında sıklıkla kullanılmaktadır [49]. Bununla birlikte yüksek kristalinite ve molekül ağırlığı ve yoğun hidrojen bağlarına sahip olduğu için çeşitli çözeltilerde çözünürlüğü düşüktür. Bakteriyel kaynaklı ve çeşitli kimyasal muamele görmüş selüloz son zamanlarda yara ve yanık örtü materyallerinde, kas ve damar doku mühendisliği uygulamalarında sıklıkla kullanılmaktadır [50, 51].

Toksik olmayan, hidrofilik, homopolisakkarit yapıda bakteriyel kaynaklı bir biyopolimer olan dekstran, sakkaroz/dekstransükroz ya da maltodekstrin/dekstrinaz bileşenlerinden sentezlenebilir [52]. Vücut içerisinde bulunan dekstrinaz enzimi vasıtasıyla enzimatik degradasyona uğrar. Su ve organik çözücülerde çözünebilen, biyobozunur ve biyouyumlu bir materyal olan dekstran, üzerinde bulunan aktif

hidroksil grupları sayesinde kolaylıkla modifiye edilebilir ve çeşitli özellikleri değiştirilebilir [53].

Aljinat doğal olarak kahverengi deniz yosunu ve bakterilerden elde edilen anyonik, hidrofilik bir polisakkarittir. Çok farklı uygulamalarda kullanılan, mükemmel biyoyumluluk ve biyobozunurluğa sahip aljinatlar, organik çözücülerde çözünmezler ve Ca^{+2} gibi iki değerli katyonların mevcudiyetinde kuvvetli bir jel ağı oluştururlar. pH duyarlı olan aljinat jeller katyonların uzaklaştırılması durumunda çözünür duruma geçerler. Bu özelliğinden dolayı pH değişimine bağlı olarak ilaç ve büyüme faktörü salım mekanizmalarında sıklıkla kullanılırlar [54].

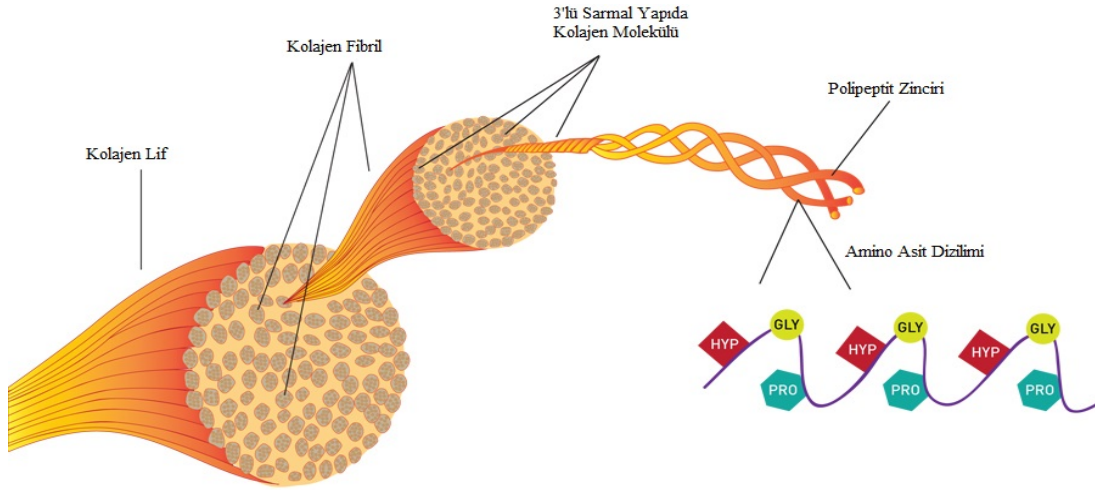
Hyalüronik asit (HA), vücutta ekstraselüler matriks dokusunda bulunan glikozaminoglikan yapıda doğrusal bir polisakkarittir. Vücutta bulunduğu bölgeye göre yapısı değişen HA'nın molekül ağırlığı 100 kDa'dan 8000 kDa'ya kadar değişir. HA, ECM'nin temel bileşeni olduğu için yapısal ve biyolojik özellikleri, hücresel sinyalizasyon, yara onarımı, morfojenez ve matris organizasyonuna aracılık eder [55]. Son yıllarda hücresel tedavilerde, 3B hücre kültüründe ve doku mühendisliğinde kullanılmak üzere yeni biyomalzemelerin oluşturulması için önemli bir yapı taşı olarak kabul edilmiştir [56].

2.4.1.1.1. Kolajen

Omurgalı canlıların temel yapısal maddesi olan kolajen, memeli hayvanların vücut proteinlerinin yaklaşık %30'unu oluşturan temel yapısal proteindir. Kıkırdak, deri ve kornea başta olmak üzere bütün canlı dokularının yapısında yüksek miktarda kolajen bulunmaktadır. Hücre dışı matriste yapısal ve fonksiyonel bir rol oynayan kolajenin günümüze kadar belirlenmiş farklı yapısal özelliklere sahip 25 türü bulunmaktadır. Bulunduğu dokuya özel farklı fiziksel özellikler gösteren kolajen benzersiz α -heliks yapısı ile dikkat çeken bir proteindir.

Canlı dokusunda pluripotent kök hücre ve retikulum hücresi kaynaklı fibroblastlar tarafından sentezlen kolajen, benzersiz bir yapıya, boyuta ve amino asit dizisine sahiptir. Kolajen molekülü, her biri farklı yönde bükülü birbirlerine sarılmış üç polipeptid zincirden oluşur. Bütün kolajen türleri tekrarlayan Gly-X-Y amino asit diziliminin neden olduğu üçlü sarmal yapı ile karakterizedir. Glisin (Gly) amino asidinin büyüklüğü sarmal yapıdaki diğer amino asitlere göre çok küçüktür ve

polipeptid zincirinin kıvrılmasını kolaylaştırır. Tekrarlayan tripeptit yapısı Gly-X-Prolin veya Gly-X-Hidroksiprolin şeklinde gösterilebilir. Bu yapıda X yerine herhangi bir amino asit gelebilir. Her bir zincir -CO ve -NH₃ grupları arasındaki hidrojen bağlarıyla ve aynı zamanda kovalent bağlarla bir araya gelir. Temel kolajen molekülü, yaklaşık 3000 Å uzunluğunda ve 15 Å genişliğinde bir çubuk şeklindedir ve yaklaşık 300 kDa'lık bir moleküler ağırlığa sahiptir.



Şekil 2.5 Kolajenin yapısı.

Vücutta kornea, deri ve kemik gibi pek çok doku ve organın yapısında bulunan kolajen, bulunduğu dokunun fiziksel özelliklerine ve işlevine bağlı olarak farklı düzenlenmelere sahiptir. Özellikle deri, tendon ve kemik gibi dokularda bulunan Tip-I kolajen vücuttaki en yaygın kolajen çeşididir. Değişik aminoasit içeriklerine sahip α_1 , α_2 , α_3 olarak adlandırılan üç farklı zincirden oluşur. En yaygın kolajen türlerinden ikincisi olan Tip-II kolajen ise özellikle hiyalin kıkırdak bileşiminde bulunur ve birbirinin aynısı iki α zincirinin farklı bir polipeptid zincirle kondenzasyonu sonucu oluşur. Tip-III kolajen, Tip-I kolajene bağlı olarak sınırlı miktarlarda bulunurken en fazla olarak kan damarlarının yapısında bulunur [57]. Vücutta en yaygın bulunan bu ilk üç kolajen tipinin yanı sıra çeşitli organlarda farklı tipteki diğer kolajen proteinleri de yer alır. Örneğin tendonunu yapısında yer alan Tip-I ve Tip-XII kolajen fibriller paralel sıralar halinde uzanarak tendona mekanik olarak dayanıklılık sağlamakta ve esneme yeteneğini azaltmaktadır. Deride Tip-I, III, VII, VIII, XII, XIV, XVI gibi çok çeşitli yapıdaki kolajen tipleri bulunur. Bu farklı kolajen tiplerinin bir kısmı ise tamamen dağınık bir şekilde düzenlenmiş ağ yapıyı oluşturur. Deride esnekliği sağlayan fibriller arasındaki kovalent bağlar da yapıyı

kuvvetlendirmektedir. Gözün yapısında kornea, retina ve vitröz sıvı içerisinde bol miktarda Tip-II, V, VI, IX, XIII, XX, XXIII, XXIV kolajen proteini bulunmaktadır [58].

Kolajen, dokunun yapısal desteği gibi çeşitli işlevsel fonksiyonlarda yer alırken doku ve organların oluşumunda ve rejenerasyonunda da önemli bir rol oynamaktadır. Biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılan protein yapılı doğal polimerik biyomalzeme olan kolajenin karakteristik özelliklerinden kaynaklı olarak vücutla olan etkileşimi çok iyidir ve ayrıca vücut içerisinde bulunması düşük immünojeniteye sahip olmasını sağlamaktadır [59, 60]. Albümin ve jelatin gibi diğer doğal polimerlere kıyasla biyobozunurluk, zayıf antijenite ve üstün biyoyumluluk gibi özelliklere sahiptir [61]. Kolajenaz enzimi ve fagositozlar yoluyla dokularda parçalanmış kolajenin bu özelliği kullanılacağı uygulama alanına göre çapraz bağlayıcılar sayesinde azaltılabilir veya tamamen bozunmaz hale getirilebilir. Mükemmel biyoyumluluk özelliği ve güvenli kullanımının yanı sıra mekanik özelliklerinin sentetik polimerlere göre düşük olması kolajen için bir dezavantajdır. Fakat kolajen liflerin çapraz bağlanması yoluyla güç ve stabiliteye sahip lifler oluşturulabilmektedir. Glutaraldehit, krom tabaklama, formaldehit, poliepoksi bileşikler, asil azid, karbodiimidler ve heksametilendiizosiyanat gibi çapraz bağlayıcı maddelerin kullanımı ile çapraz bağlı kolajen yapısı elde edilir. Ayrıca ultraviyole/gama ışını ışınlaması ve dehidrotermal işlem gibi fiziksel işlemler de kolajen matrisinde çapraz bağların oluşması için etkili bir şekilde kullanılmaktadır. Bu kimyasal ve fiziksel modifikasyonlar sonucu mekanik özellikleri geliştirilebildiği gibi kolajenin biyolojik stabilitesi de geliştirilebilir. Kolajenin modifikasyonu ile kullanıldığı biyomalzemenin hücrelerle etkileşiminin artırılması, hücrelerin büyüme, farklılaşma, göç etme ve metabolik faaliyetlerinin düzenlenmesi gibi birçok biyolojik olay yeniden düzenlenebilir.

Kolajen esaslı biyomalzemeler, doku mühendisliği ve rejeneratif tıp için son derece önemlidir. Üstün biyoyumluluk ve düşük immünojenisitesi nedeniyle, kolajen biyomalzemelerin kullanımı sıklıkla tercih edilir [62]. Günümüzde kolajen, biyomühendislik uygulamalarında önemli bir malzeme olup, çok çeşitli uygulamalarda başarıyla kullanılmaktadır [63]. Bu alanlar ve uygulamaları Tablo 2.2’de özet olarak verilmiştir.

Tablo 2.2 Kolajenin kullanıldığı medikal alanlar ve uygulamaları.

Medikal alan	Uygulama
Kardiyovasküler cerrahi	Yapay damarlar, kalp kapakçıkları
Dental	Periyodontal doku yenilenmesi
Dermatoloji	Doku büyütülmesi
Yara Örtü	Yanık örtü malzemeleri, yara dokusu yenilenmesi, ülser tedavisi
Genel cerrahi	Fıtık tedavisi, adhezif bariyerler, kanama durdurucular
Nörocerrahi	Sinir iletimi, sinir doku yenilenmesi, dura mater yenilenmesi
Oftalmoloji	Korneal greftler, vitröz yenilenmesi, retinal bağlantılar
Ortopedi	Kemik onarımı, kırık oluşturma, ligament onarımı
Otoloji	Kulak zarı yenilenmesi
Üroloji	Üreter protezler, böbrek onarımı, idrar kesesi onarımı ve protezi

Kolajenin kullanıldığı alanlardan biri de sinir doku mühendisliği uygulamalarıdır. Periferik sinir rejenerasyonu rejeneratif tıpta çok önemli bir konudur ve kolajen temelli biyomalzemeler, bu alanda umut verici bir malzeme olarak kapsamlı bir şekilde incelenmekte ve kullanılmaktadır [64]. Yakın geçmişte klinik olarak kullanılan otogreftlere kıyasla çoklu kompozisyonlardaki kolajen esaslı sinir kanalları test edilmiş ve pozitif sonuçlar elde edilmiştir. Aselüler doku iskelelerinin bu alanda iyi sonuçlar vermelerine rağmen çapraz bağlı kolajenden elde edilen tübular yapıdaki kolajen sinir greftleri daha başarılı olmuştur [65]. Ayrıca doku iskelesinin gözenek oryantasyonunun düzenlenmesi, nörotrofik faktörlerin eklenmesi ve hücre ekimi sinir dokusunun yeniden oluşumunu artıracak etkili klinik gelişmelerdir [66-68]. Kolajen kaynaklı biyomalzemeler, bağ dokusu yoluyla Schwann hücreleri tarafından duyu ve motor nöronların üç boyutlu aksonal göçünü ve miyelinasyonunu teşvik etmek için yenilikçi 3B sinir doku mühendisliği sistemi modelleri geliştirmek için de kullanılabilir [69, 70].

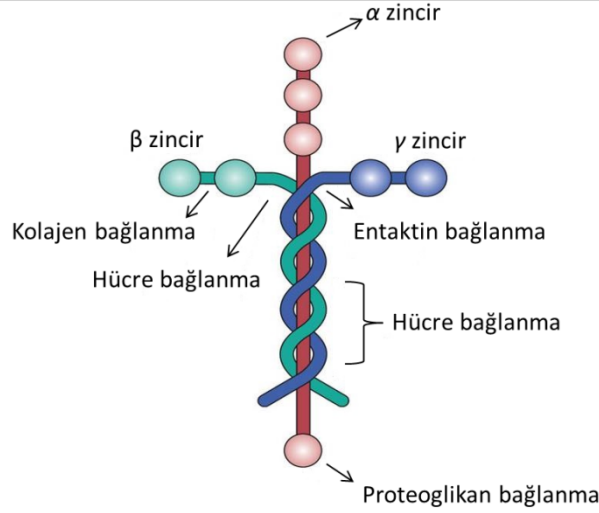
2.4.1.1.2. Laminin

Bazal membran (BM), tüm epitel ve endotelin bazal kısmını kaplayan ve kas, yağ ve periferik sinir hücrelerini çevreleyen, hücre ile ilişkili tabakasal hücre dışı matris benzeri bir yapıdır. BM'lar tüm hayvanlarda doku oluşumu için gereklidir. Farklı

hücre tipleri arasında mekanik stabiliteyi sağlayan bir bariyer görevi görürler ve hücre farklılaşması, yaşamasını ve göçünü düzenlerler [71].

Lamininler, epitel ve endotel hücrelerinin altında yer alan ve kas hücrelerini, Schwann hücrelerini ve yağ hücrelerini çevreleyen hücre dışı matrisin ince tabakalarından oluşan bazal membranda bulunan glikoprotein ailesi içeren hücre adezyon molekülleridir. Bazal membran ağırlıklı olarak laminin, Tip-IV kolajen, perlekan, agrin ve nidojenler gibi yüksek derecede korunmuş proteinler içerir [72]. Bu proteinler, erken embriyoda görünen ilk hücre dışı matris proteinleridir. Erken gelişim döneminde bazal membranda az miktarda kolajen varken laminin miktarı daha fazladır. Tip-IV kolajenler ve lamininler, hücrelerin bazal membranlarında hem yapısal bir role sahip hem de davranış ve özelliklerini etkileyen çözünmez ağlar oluştururlar [53]. Çoğu lamininler, hücre yüzey reseptörleri ile etkileşimler sayesinde hücrelerle yakın ilişki içerisinde olan ağlar oluşturmak için birleşirler. Lamininler pek çok fizyolojik işlev için hayati önem taşımaktadır ve genellikle hücre tipine özgü adezyon, farklılaşma, migrasyon ve fenotip bakımı gibi çok sayıda fonksiyonu yerine getirirler [73]. Lamininler, hücre zar reseptörleri vasıtasıyla çeşitli sinyaller göndererek hücrenin işlevini etkiler. Erken embriyonik gelişme ve organogenez için gereklidirler ve kas, sinir, deri, böbrek, akciğer ve vasküler doku gibi çeşitli dokularda çok önemli işlevlere sahiptirler [74].

Lamininler bazal membranın başlıca bileşenleridir. Bir α , bir β ve bir γ zincirinden oluşan çapraz veya T şeklindeki heterotrimer yapıda bulunurlar. Omurgalılarda, farklı gen ürünlerini temsil eden beş α , üç β ve üç γ zinciri tanımlanmıştır. Bu üçlü polipeptid zinciri disülfid bağları sayesinde bir arada durmaktadır. Trimerler α , β ve γ zincirlerinin zincir bileşimine göre adlandırılırlar. Örneğin, laminin-423, α_4 , β_2 ve γ_3 zincirlerinden oluşur [74].



Şekil 2.6 Lamininin yapısal gösterimi.

Laminin altbirimleri 45 farklı laminin izoformunu oluşturabilir. Bununla birlikte, bu izoformlardan bazılarının varlığı halen tam olarak bilinmezken 18 tanesi tam olarak bilinmektedir. Lamininlerin bulunduğu dokuya özgü spesifik bir dağılımı vardır ve bu farklılık çoğunlukla α zincirlerinin ekspresyonundaki varyasyonlarla belirlenmektedir. Laminin α zincir genlerinin düzenleyici mekanizmaları büyük oranda tanımlanamamıştır. Fakat, α_1 zincirinin transkripsiyonel düzenlenmesi belli bir dereceye kadar analiz edilmiştir. Reichert membranı olarak bilinen kalın ekstra-embriyonik bazal membran büyük miktarlarda laminin-111 sentezler. Reichert membranına ek olarak, laminin α_1 zinciri de embriyonik bazal membranda erken embriyonik gelişim sırasında eksprese edilir. Ayrıca, α_1 zinciri, organogenez sırasında epitel hücreleri tarafından oluşturulur ve yetişkinlerde de epitel bazal membranda eksprese edilir. Laminin α_2 zinciri esas olarak nöromusküler sistemde çizgili kas ve Schwann hücrelerinin bazal membranları ve diğer bazı dokularda ekspres edilir. Laminin α_3 zinciri baskın olarak epidermiste bulunurken, laminin α_4 zinciri endotel, düz kas, yağ hücreleri, Schwann hücreleri, nöromusküler birleşimler ve kemik iliği ile ilişkilidir. Laminin α_5 zinciri ise yaygın olarak embriyonik bazal membran, gelişmekte olan ve olgun epitel, olgun endotel, düz kas, nöromusküler birleşimlerde eksprese edilmektedir [75-78].

MSS, kan dolaşımı ve bağışıklık sisteminden bir kısmı kılcal endotel hücreleri etrafında çift BM olan kan-beyin bariyeri ile korunmaktadır. Lamininler merkezi

sinir sisteminin pek çok yerinde bulunmaz, ancak bulundukları yerde önemli roller üstlenirler. Merkezi sinir sistemindeki lamininlerin sinapsis fonksiyonu, oligodendrosit olgunlaşması, kortikal devrasyon gelişimi ve hipokampal nöronların korunması gibi pek çok farklı görevi vardır [73].

Lamininlerin, sinir sisteminin gelişiminde, işlevinde ve rejenerasyonunda birden fazla rolü vardır. Hücrenin yaşamasını ve göçünü, nörit büyümesini sağlarken sinaps oluşumunu teşvik ederek sinirsel gelişim için de kritik öneme sahiptir [79]. Erken embriyonik nöralasyon sırasında nöral tüp, α_5 laminin bağımlı bir şekilde, retina, beyin olmurilik iç zarı ve otik vesiküllerin bazal membranlarının oluşumu da dahil olmak üzere MSS içinde gelişen ilk yapılara dönüştürülür. Lamininler akson oluşumunu da desteklerler. Aksonlar β_1 lamininleri ile kaplıdır, buna karşın nöromüsküler birleşimler (NMJs) sadece β_2 lamininleri içerir. Ayrıca, kalın sinir zarı ile çevrelenmiş sinir demetleri sadece β_2 lamininleri içerir. Hem α_2 hem de α_4 zincir lamininleri, Schwann hücresi olgunlaşması ve akson miyelinasyonu için gereklidir. Örneğin, tekinin yokluğu kısmi demiyelinizasyona neden olurken, ikisinin birden yapıda bulunmaması neredeyse komple amiyelinizasyona ve ciddi nöropatiye neden olur [80].

Lamininler, tam işlevli nöromüsküler birleşimlerin gelişimi için özellikle önemlidir. NMJ'lerin oluşumunda, akson ucundaki aktif bölgeler, kas uç plakasının bağlantı katlanmalarına uymalıdır. α_4 lamininlerin yokluğunda, akson ucundaki aktif bölgeler kasın bağlantı katlanmalarıyla uyuşmamaktadır [81]. β_2 zincir lamininleri, fonksiyonel NMJ'lerin gelişimi için önemlidir. Embriyonik NMJ'lerin hem β_1 hem de β_2 lamininleri bulunurken, yetişkin NMJ'lerde yalnızca β_2 lamininler bulunur. Bu, NMJ için β_2 zincirinin önemini vurgular. β_2 lamininleri içeren ince bir bazal membran, β_1 laminin içeren akson ve kas ara yüzeylerini ayırmak çok önemlidir. β_2 zinciri yoksa, NMJ kendiliğinden organize olmaz ve Schwann hücreleri yarık içine göç ederek nöropati oluşur, bu da kısa sinir iletimini engeller. Ayrıca β_2 zinciri, β_1 'in aksine, sinir iletimi için gerekli olan kalsiyum kanallarının düzenlenmesinde yer alır ve postsinaptik membran olgunlaşması için α_5 ve α_4 gereklidir [81].

2.4.1.2. Sentetik polimerler

Sentetik polimerler, üretim safhaları kontrol edilebilen ve değiştirilebilen malzemeler oldukları için doğal polimerlerin aksine istenilen molekül ağırlığı, molekül konformasyonu veya konfigürasyonu, fonksiyonel yüzey gruplarının varlığı gibi özellikler üzerine üretilebilirler. Ayrıca farklı yöntemlerle işlenebilirlikleri daha kolaydır ve biyouyumluluk özellikleri de çeşitli yüzey modifikasyonlarıyla artırılabilir. Bu özellikleri sayesinde istenilen fiziksel, kimyasal ve mekanik özelliklere sahip olan sentetik polimerler pek çok doku mühendisliği uygulamasında kullanılırlar.

Poli- α -hidroksi ester grubundan olan polilaktik asit (PLA), poliglikolik asit (PGA) ve bunların kopolimerleri olan poli-laktik-ko-glikolit (PLGA), poli(aminoasitler), poliortoesterler, polisiyanoakrilatlar, polifosfazenler, polifumaratlar, poli(hidroksialkanoatlar) (PHA), poli(hidroksibütirat) (PHB), polikaprolakton (PCL), polidioksanon (PDS) ve poliüretan (PU) doku iskelesi üretiminde kullanılan sentetik polimerlerdir. Sıklıkla kullanılan PLA, PGA ve PLGA kopolimeri, Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (FDA) tarafından onaylı sentetik polimerlerdir [82].

Poli- α -hidroksi asitler, çeşitli yöntemler kullanılarak kolaylıkla şekillendirilebilen termoplastik poli- α -esterlerdir. Glikolik asit ve laktik asit monomerleri kullanılarak çeşitli yapılarda homopolimer ve kopolimerler yapıda polimerler elde edilebilir. Glikolik ve laktik asit biyobozunur implantlarda, doku mühendisliği uygulamalarında, ilaç salım sistemlerinde en yaygın kullanılan lineer alifatik poliesterlerdir. Biyoyumlu ve biyobozunur olan poli- α -hidroksi asitlerin zincir yapıları, homopolimer veya kopolimer olmaları, molekül ağırlıkları, yüzey alanları, kristallik dereceleri, maruz kaldıkları stres ve implantasyon edildikleri bölgeler bozunma hızlarını etkileyen temel faktörlerdir [83].

Poliglikolit olarak da bilinen poliglikolik asit yüksek kristalin yapıda, yüksek çekme modülüne sahip, düşük çözünürlükte bir polimerdir. Diğer polimerlerle karşılaştırıldığında mükemmel mekanik özelliklere sahiptir. Poli(laktik asit) yapısında PGA'ya göre bir metil grubu fazladır ve bunun sonucunda daha yüksek hidrofobik özellik gösterir. L-laktik ve D-laktik olmak üzere iki stereoizomer yapısı bulunan PLA bu sayede D-PLA, L-PLA, D-L-PLA ve mezo-PLA olmak üzere 4

farklı morfolojik yapıda bulunabilir. PLA morfolojik yapısına göre değişen yüksek biyouyumluluk, biyobozunurluk, yüksek mekanik ve termal özellikleri ile yaygın olarak kullanılan sentetik biyopolimerdir. Ayrıca bozunma sonucu açığa çıkan ürünlerin toksik madde içermemesi gibi çeşitli özelliklerinden dolayı doku yenilenmesine yardımcı olan materyallerin üretilmesinde en çok kullanılan polimerdir [82, 84].

Hidrofobik ve yarıkristalin bir polimer olan PCL, siklik monomer ϵ -kaprolaktonun halka açılma polimerizasyonu ile elde edilir. Sentezi sırasında kontrol edilebilir molekül ağırlığı sebebiyle çeşitli özellikleri molekül ağırlığına göre değişir. Biyouyumlu ve biyobozunur PCL vücut içinde hidrolize uğrayarak veya bazı spesifik durumlarda enzimatik olarak bozunmaya uğrar. Bozunma süresi molekül ağırlığına bağlı olarak 2-4 yıl arasına değişmektedir. PLA ile karşılaştırıldığında daha düşük bir bozunma hızına sahip olması sebebiyle uzun süreli dayanım gerektiren doku mühendisliği ve ilaç salım sistemi uygulamalarında kullanılır [82].

p-dioksanın halka açılma polimerizasyonu sonucu elde edilen PDS, biyobozunur sentetik polimerdir ve bozunma ürünleri toksik değildir. Poli(hidroksi asit)'lerle karşılaştırıldığında daha elastik bir yapısı vardır. PDS, çeşitli uygulamalarda genellikle diğer polimerlerle beraber blend ya da kopolimer şeklinde kullanılır [82].

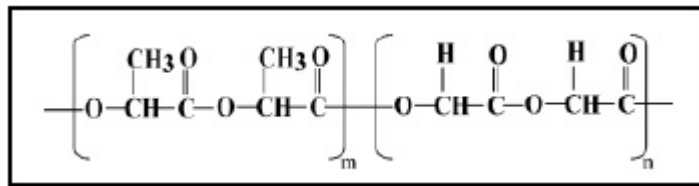
Termoset bir polimer olan PU, yüksek mekanik özellikleri ve biyouyumluluğu ile uzun dönem dayanım gerektiren uygulamalarda kullanılan bir diğer sentetik polimer poliüretandır. Çeşitli kimyasal bağlarla biyobozunur hale getirilebilen PU'nun degradasyonu sonrası açığa çıkan ürünler ise vücutta toksik etkiye sebebiyet vermektedir. Bu sebeple çeşitli araştırmalar yapılmakta ve bu sorunu degradasyon sonrası ürünleri toksik olmayan lizin-diizosiyanat ve hekzametilen diizosiyanat gibi diizosiyanatlar kullanılarak biyobozunur PU'lar geliştirilmiştir [82].

Poli(orto-ester) hidroliz sonucu yüzey bozunmasına uğrayan sentetik polimerdir ve bu özelliğinden dolayı ilaç salım sistemlerinde sıklıkla tercih edilmektedir. Degradasyonu sonucu açığa çıkan karboksilik asit katalizör görevi görür ve degradasyonun giderek hızlanmasını sağlar [85]. Ayrıca yapılan çalışmalar sonucu POE kemik dokunun gelişimi ve büyümesine katkıda bulunmaktadır bu sebeple

sıklıkla kemik doku mühendisliği uygulamaları ve implantlarında kullanılmaktadır [86].

2.4.1.2.1. Poli (L-laktik-ko-glikolik asit)

Poli (laktik-ko-glikolik) asit (PLGA), poliglikolik asit ve polilaktik asitin (hem L- hem de D, L-laktit) rastgele kopolimerleştirilmesi ile elde edilen alifatik polyester grubunda yer alan sentetik bir biyopolimerdir. Kullanılan glikolid ve laktid oranına bağlı olarak, farklı özelliklere ve özel bozunma hızlarına sahip PLGA elde edilebilir [87]. Mekanik güç, şişme davranışı, hidrolize uğrama kapasitesi ve biyobozunma hızı PLGA kopolimerinin zincirindeki monomer bileşenlerinin tipine ve molar oranına bağlı olarak doğrudan etkilenir [88]. Yüzde elli (50:50) oranında laktik ve glikolik asit taşıyan PLGA kopolimerleri daha yüksek oranda laktik asit taşıyan PLGA polimerlerine göre daha hızlı parçalanır. L-PLA ve PGA'dan sentezlenen PLGA polimerleri kristal yapıda bulunurken, D, L-PLA ve PGA'dan hazırlanan polimerleri doğada amorf yapıda bulunur. Ayrıca %70'in altında PGA taşıyan PLGA polimerlerinin doğada amorf yapıda bulunduğu bilinmektedir. Polimerin kristalinite derecesi ve erime noktası molekül ağırlığı ile doğrudan ilişkilidir. PLGA kopolimerlerinin camsı geçiş sıcaklıkları (T_g) molekül ağırlığına bağlı olarak fizyolojik sıcaklığın (37°C) üzerinde olduğundan katı yapıda bulunur. Bu nedenle sahip oldukları katı zincir yapısı, bu polimerlere biyobozunur bir sistem olarak tasarlanabilmelerini sağlayan yüksek mekanik dayanıklılık kazandırır [89]. Kopolimer bileşimindeki laktid içeriğinin ve molekül ağırlığının azalmasıyla PLGA polimerlerinin T_g değerlerinin azaldığı bilinmektedir [90].



Şekil 2.7 PLGA' nın kimyasal yapısı.

Sentetik bir polimer materyalin *in vivo* kullanılması durumunda olası doku-implant etkileşimleri göz önüne alınmalıdır. Biyolojik olarak parçalanabilir matrislerde, polimerin olası toksisitesinin değerlendirilmesinin yanı sıra bozunma ürünlerinin potansiyel toksikliği de değerlendirilmelidir. Biyobozunur bir polimer olan PLGA'nın bozunma sonrası ürünleri insan sağlığına zararlı değildir. PLGA'nın

bozunma ürünü L-laktik ve glikolik asit vücudun doğal bir metabolitleridir. Fakat PLGA'nın yüksek miktarda kullanıldığı bazı uygulamalarda bölgesel olarak artan asit miktarı, polimer implant çevresinde iritasyona neden olabilir [91]. Bu durumu önlemek için Agrawal ve Athanasiou, PLGA implantının yerel çevresindeki pH'yı kontrol etmek için bazik tuzların kullanıldığı bir teknik geliştirmiştir [22].

PLGA'nın sütürler, ilaç salım sistemleri, implantlar, protez cihazları ve doku mühendisliği iskeleleri gibi sayısız biyomedikal uygulamaları günümüzde başarıyla kullanılmaktadır. PLGA, PLA ve PGA ile karşılaştırıldığında daha hızlı parçalanabilirliği için ilaç salım sistemlerinde kullanımı çok yaygındır. Amerikan İlaç ve Gıda Kurumu onaylı olması ve kolaylıkla ilaç taşıyıcı sistem olarak tasarlanabilmeleri nedeniyle PLGA bu alanda sıklıkla kullanılmıştır Kapsüllenmiş proteinlerin, aşıların, kemoterapötiklerin, antibiyotiklerin, analjeziklerin ve anti-inflamatuar ilaçların kontrollü salımını kolaylaştırmak için çoğunlukla mikroküreleri, mikrokapsülleri, nanosferleri veya nanofiberleri kullanılır [87].

PLGA ayrıca doku mühendisliği uygulamaları için iyi hücre adezyonu ve proliferasyon özelliklerine sahip çekici bir malzemedir. Genellikle 3B baskı, sıkıştırarak kalıplama, porojen uzaklaştırma, elektroegirme, gaz köpürme gibi farklı teknikler kullanarak doku iskeleleri imal edilir. PLGA tabanlı iskele, kemik, kıkırdak, tendon, deri ve sinir dokularının yenilenmesinde kullanılmaktadır [91].

2.4.2. Nöronal Büyüme Faktörleri

Nöronal büyüme faktörleri, motor ve duyuşal sinirlerin sağkalımı ve büyümesi, omurilik ve periferik sinir rejenerasyonu ve MSS-ÇSS bağlantı bölgesi boyunca duyuşal sinir büyümesi gibi çeşitli nöral tepkileri düzenler ve destekler. Nöronal rejenerasyonda büyüme faktörlerinin rolü pek çok çalışmada odak noktası olmuştur [22, 92]. Vücut tarafından salgılanan bu faktörler, embriyonik dönemden başlayarak nöronal gelişim, sağkalım, büyüme ve dallanmadaki etkisi, moleküler etkileşimlerden makroskobik doku yanıtlarına kadar çeşitli düzeylerde araştırılmıştır. Sinir rejenerasyon çalışmalarında, nöronal büyüme faktörlerinin bir kolu olan nörotrofinler yoğun olarak araştırılmıştır. Bu nörotrofinler arasında sinir büyüme faktörü (NGF), beyin kökenli nörotrofik faktör (BDNF), nörotrofin-3 (NT-3) ve nörotrofin-4/5 (NT-4/5) yer alır. Ayrıca nörotrofin ailesinin dışında, siliyer nörotrofik

faktör (CNTF), glial hücre kökenli büyüme faktörü (GDNF) ve asidik/bazik fibroblast büyüme faktörleri de (aFGF, bFGF) nöronal gelişimde çok önemli konuma sahiptirler. Nörotrofinler belli bölgelerde bir dizi nöral yanıtı desteklemektedir ve bu kısaca Tablo 2.3’de özetlenmiştir [93].

Tablo 2.3 Nörotrofik faktörler ve etki alanları.

Nöronal Etki Alanı	Nörotrofik Faktörler
Motor nöron sağkalımı	BDNF, NT-3, NT-4/5, CNTF, GDNF
Motor nöron büyümesi	BDNF, NT-3, NT-4/5, CNTF, GDNF
Duyusal nöron sağkalımı	NGF, NT-4/5, GDNF
Duyusal nöron büyümesi	NGF, BDNF, NT-3
Omurilik rejenerasyonu	NGF, NT-3, CNTF, FGFs
Çevresel sinir rejenerasyonu	NGF, NT-3, NT-4/5, CNTF, GDNF, FGFs
MSS-ÇSS bağlantı bölgesinde duysal nöron büyümesi	NGF, NT-3, GDNF, FGFs

Sinir sisteminin gelişmesi ve yenilenmesi için hayati öneme sahip NGF, sağlıklı çevresel sinir sisteminde düşük seviyelerde eksprese edilirken, yaralanmayla birlikte merkezden uzak bölgelerde daha yüksek düzeylerde eksprese edilmeye başlanır [94]. Benzer şekilde omurilik transeksiyonunu takiben NGF, hasara hem uzak hem de yakın bölgelerde birikir [95]. Hücresel seviyede, NGF duysal nöronlarda sağkalım, büyüme ve dallanma sağlar, ancak motor nöronlarının rejenerasyonuna yardımcı olmaz [96].

BDNF, motor nöronların sağkalımı ve büyümesini ayrıca duysal nöronların aksonal büyümesini destekler [97-99]. Fakat bununla birlikte yapılan araştırmalar sonucu hem ÇSS’de hem de omurilikte sinir rejenerasyonu üzerindeki etkili olmadığı anlaşılmıştır [99, 100].

CNTF ise motor nöronların sağkalımı, büyümesi ve filizlenmesini destekler. Ayrıca lezyonlu bölgede yüksek seviyelerde CNTF mRNA’sının bulunması nedeniyle, CNTF’nin omurilik hasarına karşı rol oynadığı düşünülmektedir [101-103]. Yapılan başka çalışmalarda da dış kaynaklı CNTF uygulanması hem omurilikte hem de

periferik sinirlerde yaralanmayı takiben rejenerasyon seviyesinde artış ile ilişkilendirilmiştir[104, 105].

GDNF, motor, duysal ve otonom nöronların hayatta kalmasını teşvik eder ve buna ek olarak, MSS'deki motor nöronların büyümesini teşvik ettiği ve periferik sinir rejenerasyonu yükselttiği belirtilmiştir [106-110]. GDNF'nin, MSS-ÇSS bağlantı bölgesi boyunca ve omuriliğin içine kadar dorsal kök ganglionlarından duysal nöronların daha etkili bir şekilde büyümesini teşvik ettiği de yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [111].

aFGF ve bFGF ise çevresel sinirler ve omurilikte oluşan yaralanmalar sonucunda etkili olarak rejenerasyonu artırdığı belirtilmiştir [112, 113]. Fibroblast büyüme faktörleri, anjiyogenezin güçlü destekleyicileridir ve bu nedenle, doğrudan ve dolaylı olarak yaralanmış sinirlerin iyileşmesine yardımcı olabilirler [114].

2.4.2.1. Nörotrofin-3

Nörotrofik faktörler, nöronal sağkalımı, aksonal büyümeyi, sinaptik plastisiteyi ve nörotransmisyonu düzenleyen en temel sinir sistemi düzenleyici proteinlerdir. Farklı hücre tipleri tarafından salgılanan bu proteinler embriyonik gelişim sırasında sinir liflerinin büyümesini artırır [10]. Son yıllarda yapılan çalışmaların sonuçları, omurilik hasarından sonra aksonal büyümenin yeniden sağlanmasında da nörotrofik faktörlerin etkili olduğunu göstermektedir [67]. Nörotrofik faktör aracılı aksonal cevaplar, hasarların boyutuna göre değişkenlik göstermektedir ve aksonal fenotip, büyüme faktörlerine göre üretilen reseptörlere, lezyonun tipine ve yerel ortama göre belirlenmektedir. Oluşan lezyonun nöronal hücre gövdelerinden uzaklığı ve boyutu, hücre sağkalımı, hasara karşı üretilen hücresel cevabın derecesi ve yenilenmiş aksonal büyümede kritiktir [115].

BDNF gibi NT-3 de motor nöron sağkalımı ve büyümesini ve duysal akson büyümesini destekler, *in vivo* olarak, periferik sinirlerin ve omuriliğin yenilenmesine yardım etmede hayati bir rol oynar [101, 108, 116-118]. NT-3, aynı zamanda, duysal aksonların, MSS-ÇSS bağlantı bölgesi boyunca ve omurilikte dorsal kök gangliyonlarından gelişmeleri için teşvik eder [118]. NT-3 gibi nörotrofik faktörlerin omuriliğin lezyonlu bölgesine lokal olarak uygulanması, aksonal filizlenmeyi doğrudan teşvik eder ve bazı durumlarda hasar görmüş akson liflerinin uzun vadede

rejenerasyonunu indükleyebilir [13, 119]. Nörotrofik faktörlerin hasarlı bölgeye direkt enjeksiyonu ve pompalar rejenerasyonunu tetiklemek için kullanılabilir. Bununla birlikte, bu faktörleri doğrudan lezyon bölgesinde salgılamak için tasarlanmış implant hücreleri veya ihtiyaç duyulan faktörleri yerel olarak üretmek için nörotrofik faktör genleri içeren viral yapılar ile gen terapisi kullanmak gibi başka stratejiler de denenmiştir [120].

2.4.3. Kondrotinaz ABC

MSS’de meydana gelen hasarlar sonucu hasar gören bölgenin kendini yenilemesi çok zordur. Hasar sonucu bazı hücreler tarafından salgılanan zararlı kimyasallar hem çevredeki sağlıklı hücrelere zarar verirken hem de iyileşme sürecini negatif yönde etkiler. Rejenerasyona büyük bir engel, yaralanma bölgesinde astroglial skar oluşumudur. MSS zarar gördükten sonra, hücresel ve moleküler cevaplar lezyon bölgesinde yoğun bir astroglial skar oluşumuyla sonuçlanır [119, 121]. Makrofajlar, mikrogliya, oligodendrosit öncüleri, meningeal hücreler ve astrositler hasar görmüş bölgeye göç eder ve miyelinleşme ile ilgili glikoproteinler ve kondroitin sülfat proteoglikanlar (CSPGs) gibi inhibitör moleküller üretirler. Oluşan bu olaylar dizisi sonucunda, CSPGs çoğalması ve reaktif astrositleri içeren ve lezyon bölgesini çevreleyen glial skar meydana gelir.

Bölgedeki iyileşme prosesinin başlayabilmesi için öncelikle glial skar oluşumunu önlemek gerekir. Bakteriyel bir enzim olan kondrotinaz ABC (chABC), CSPGs’ın kondroitin sülfat glikozaminoglikanlarını (CS-GAG) ortadan kaldırmak için kullanılır. Ayrıca çeşitli hayvan modellerinde aksonal filizlenme ve fonksiyonel iyileşmeyi desteklediği yapılan çalışmalar sonucu görülmüştür [122]. ChABC hem sağlıklı hem de yaralanmış omurilikte ve görsel kortekste astroglial skar içinde bulunan CSPG’leri sindirdiği ve bunun sonucunda perinöronal ağlarda (PNNs) plastisiteyi artırarak aksonal filizlenmeyi desteklediği bilinmektedir [123, 124]. ChABC, termal olarak hassas bir malzemedir ve enzimatik aktivitesi 37°C’de 3-4 gün içinde kaybolur [125]. Buna karşılık, CSPGs yaralanmadan sonra en az 2 hafta boyunca hasarlı bölgede birikir [126]. Bu nedenle, chABC’nin hasarlı bölgede etkisinin devamlılığı için bölgeye belirli zaman aralıklarında chABC yüklemesi yapılmalıdır. Günümüzde bu yükleme, intratekal enjeksiyon yoluyla, infüzyon sıklığına bağlı olarak sürdürülmektedir [127, 128]. Fakat yapılan chABC

enjeksiyonun derin bölgelere etkisi istenilen düzeyde olmamaktadır. Sonuç olarak, chABC'nin hasarlı bölgeye kontrollü bir şekilde uygulanması için yeni yöntemler geliştirilmiştir. Çeşitli hidrojel ve mikrotüp malzemelere chABC yüklemesi yapılarak hasarın olduğu bölgeye implante edilip, bu bölgede kontrollü bir şekilde salınım yapması üzerine çeşitli çalışmalar yapılmış ve umut verici sonuçlara ulaşılmıştır [120, 129].

2.4.4. Doku Mühendisliğinde Kullanılan Hücreler

Doku mühendisliği için kullanılabilecek üç tip hücre kaynağı vardır: otolog, allojenik ve ksenojenik. Otolog hücreler hastadan toplanır, *ex vivo* kültürlenir ve daha sonra hastanın hasarlı bölgesine yeniden implante edilir. Kişinin kendi vücudundan kullanılan hücreler herhangi bir bağışıklık tepkisi üretmediği için, immünolojik açıdan ideal bir seçimdir. Bununla birlikte, bu yaklaşımın da kendi içinde sınırlamaları vardır, çünkü hasarlı bölgenin iyileşmesi için gereken miktar hastanın derilerinin büyük bir kısmının rezeksiyonunu gerektirebilir, bu da hem ikincil bir yara oluşumuna hem de hastada ağrı ve çeşitli problemlere sebep olur. Hasat edilebilen otolog hücrelerin azlığı en büyük sınırlamadır. İkinci hücre kaynağı olan allojenik hücreler, başka bir insandan karşılandığı için immün cevap oluşur ve bu immünojenikliğini azaltmak için immün baskılayıcı ilaçların kullanılması gerekir ki bu da hastanın her türlü enfeksiyona karşı korumasız duruma gelmesine sebep olur. Klinik çalışmalarda allojenik hücre hatları ile yapılmış başarılı çalışmalar mevcuttur. Üçüncü kullanılabilecek hücre kaynağı, türler arası transplantasyonun yapıldığı ksenojenik hücrelerdir. Yine, immün cevap olasılığının üstesinden gelmek ve türler arası patojen geçişi ihtimali olması bu hücrelerin kullanımında büyük bir engel oluşturmaktadır. Bununla birlikte, diyabet tedavisinde için domuzdan insana nakledilmiş hücrelerin kullanıldığı başarılı çalışma örnekleri de mevcuttur [130].

Hücrenin izole edildiği kaynak dışında ayrıca doku iskelesinin kullanılacağı alana göre iskeleye ekilen hücre tipleri de farklılık göstermektedir. Özellikle sinir doku rejenerasyonunda ise Schwann hücreleri, olfaktör hücreler, mezenkimal kök hücreler, embriyonik kök hücreler, nöral progenitor hücreler (NPCs) ve indüklenmiş pluripotent kök hücreler gibi hücre kaynakları bulunur [131]. Nöral progenitör hücrelerin ve kök hücrelerin kullanımı daha yaygın bir tekniktir. NPC'ler nöral hücre tiplerine dönüşebilme potansiyeline sahip hücrelerken, kök hücreler daha fazla

farklılaşma yeteneklerine sahip pluripotent hücrelerdir. Bu hücre tipleri, kayıp veya hasarlı hücrelerin yerine farklılaşma potansiyeline sahiptir fakat bununla birlikte, bu hücre tiplerinin hayatta kalmasını, çoğalmasını ve uygun şekilde farklılaşmasını sağlamakla ilgili birtakım zorluklar vardır. Bu nedenle, hücrenin ekileceği doku iskelesi, hücre büyümesine ve yaşayabilirliğine katkıda bulunurken aynı zamanda hücrelerin uygun hücre tiplerine farklılaşmalarını indüklemek için hassas bir şekilde tasarlanmalıdır. Örnek olarak, nöral progenitör hücreler glial büyüme faktörüne maruz kalmasıyla ÇSS'deki Schwann hücrelerine farklılaşırken, siliyer nörotrofik faktöre maruz kalması, MSS'deki astrositlere farklılaşmasını sağlar. EGF ve FGF gibi diğer büyüme faktörlerinin varlığı ayrıca bu hücrelerin çoğalmasına ve hayatta kalmasına yardımcı olur. Bu biyokimyasal faktörlerin hepsi, uygun farklılaşma ve uzun ömürlülüğü teşvik etmek için hücreler ile birlikte kullanımı biyomalzemelerin etkinliği ve başarısını artırır [36].

2.4.4.1. Adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücre

Doku mühendisliği alanında kullanılan hücre tipleri karşılaştırıldığında, mezenkimal kök hücreler (MSCs) daha kolay erişilebilir ve miktar olarak daha fazla olması bakımından doku mühendisliği uygulamalarında sıklıkla kullanılan ve her geçen gün kullanımı artan bir hücre tipidir. Özellikle kemik iliği, MSCs için zengin bir kaynak olsada fetal dokular, kordon kanı ve adipoz (yağ) dokularda günümüzde MSCs eldesinde kullanılan ideal kaynaklardır [132, 133]. Bu çok çeşitli kaynaklardan elde edilen mezenkimal kök hücreler, ektodermal (nöral), endodermal (hepatosit) ve mezenkimal (adipositler, kondrositler) kökenli çok katlı dokulara farklılaşma potansiyeli olan hematopoietik olmayan progenitör hücrelerdir.

Adipoz dokusundan türetilen mezenkimal kök hücreler (ASCs), bol ve erişilebilir bir kaynak olan yağ dokusundan türetilen ve etik sorunları bulunmayan bir MSC türüdür. Ayrıca, ASC'lerin nörotrofik olarak etikili ve farklı hücrelerin ve dokuların korunması, hayatta kalması ve farklılaşmasını sağlayan özelliklerine ek olarak bir immünomodülatör profile sahip olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [134-136]. Tüm bu etkiler ASC'lerin hücre dışı ortama salgıladığı moleküllerle yani sekretomuyla, ilgili olduğu da çalışmalarla kanıtlanmıştır [135, 137]. Ayrıca SCI hayvan modellerinde tedavi metodu olarak geliştirilen ve uygulanan ASC'ler umut verici sonuçlar elde edilmesini sağlamıştır. Servikal SCI modelinde, hasarlı bölgeye

nakledilen ASC'ler glial skarın yapısını modüle etmiş ve aksonal filizlenmeyi uyarmıştır. Yapılan farklı bir çalışmada da sıçan torasik kompresyon yaralanması modelinde, ASC'ler doku korunmasına ve aksonal rejenerasyona ek olarak fonksiyonel iyileşmeyi destekleyebilmiştir [138, 139].

2.4.5. Doku İskelesi Üretim Yöntemleri

Doku mühendisliğinin gelişiminden ve ilerlemesinden sonra günümüzde dokuların farklı yapı özelliklerini taklit etmek, doku iskelelerinin dokuya özgü tasarımları ve çeşitli üretim yöntemleri ile büyük ölçüde sağlanmıştır. Etkili bir doku iskelesinin oluşturulması için kullanılacak polimer kadar seçtiğimiz materyal için uygun ve geliştirilebilir üretim yöntemin seçimi de çok önemlidir. Üretim yönteminin taklit edilecek dokunun karakteristik özelliklerine uyumlu olması ve bazı kriterleri sağlaması gerekir. Örneğin üretilen malzeme gözenekli bir membran ise, kullanılan üretim yöntemi gözenek boyutu, gözenek dağılımı ve gözenekler arası bağlantı özelliklerini sağlamalıdır [140].

İstenilen doku iskelesinin özelliklerine göre geliştirilmiş pek çok üretim yöntemi bulunmaktadır. Bunlardan biri olan çözücü döküm yöntemi ince film yapısında membranlar üretmek için kullanılan kolay ve sık kullanılan bir tekniktir. Basit bir yöntem olması ve fazla bir donanım gerektirmemesi yöntemin avantajlarından. Ayrıca partikül uzaklaştırma gibi başka yöntemlerle birleştirilip kullanılabilme imkânı sağlaması da yöntemin kullanımını artırmaktadır. Fakat bu yöntem için kullanılan uçucu çözeltilerin genellikle toksik özelliklere sahip olması ve membran üretiminde belli kalınlıklar dışına çıkılamaması da yöntemin dezavantajlarıdır [141, 142]. Partikül uzaklaştırma tekniğinde ise kullanılan porojen maddenin miktarına, geometrisine ve boyutlarına göre istenilen özelliklerde gözenekli doku iskeleleri elde edilebilir.

Dondurarak kurutma tekniği, gözenekli membran ve sünger yapısında doku iskeleleri elde etmek için çok kullanılan yöntemlerden bir başkasıdır. Mikro ve makro boyutta gözeneklere sahip olan yapıların elde edilmesi uygundur [143]. Yüksek sıcaklıklar gerektirmemesi ve yıkama filtreleme gibi ekstra basamaklar içermemesi gibi avantajları varken bunun yanında kurutma işlemi için uzun süreler gerektirmesi ve gözenek boyutlarının tam olarak ayarlanamaması gibi dezavantajları da vardır [144].

Pek çok üretim tekniği organik çözücüler ve yüksek sıcaklıklar gerektirirken gaz köpüklendirme yöntemi yüksek basınçlı CO₂ gazı kullanılarak yüksek gözenek miktarlarına ulaşıldığı bir yöntemdir. Gözenek yapıları ve miktarı kullanılan gazın miktarı ve basıncına bağılıdır. Ayrıca gaz köpüklendirme yöntemi partikül uzaklaştırma yöntemi ile bir arada kullanılıp birbiri ile bağlantılı gözenek yapısına sahip doku iskeleleri üretiminde de kullanılan bir yöntemdir [145].

Faz ayrımı tekniğinde ise polimer çözeltisi sıcaklık değişiminin etkisi ile düşük polimer konsantrasyonuna sahip polimer zayıf faz ve yüksek polimer konsantrasyonlu polimer zengin faz olarak iki faza ayrılır. Daha sonra ortamdaki çözücünün uzaklaştırılması ile düşük polimer konsantrasyonuna sahip fazda gözenekli bir yapı oluşur. Ayrıca uygun koşullar altında, sıvı-sıvı faz ayrımı yöntemi, kolajen Tip-I'e benzer nano ölçekte üç boyutlu lifli yapı üretiminde ve çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanılır. Bu yöntem ile nanofiberlerin hazırlanması tüm solventlerde meydana gelmez; bu nedenle, nanofiberlerin oluşumu için solvent seçimi ve faz ayırma sıcaklığı çok önemlidir. Kontrollü gözenek morfolojisi ile üç boyutlu yapıları tasarlanmasında diğer yöntemler ile kolayca birleştirilebilmesi faz ayırma yönteminin bir avantajıdır. Buna ek olarak doku mühendisliği uygulamaları için nanolifli yapılar oluşturmak için hızlı prototipleme yöntemiyle de birleştirilebilirler [145].

Katı serbest form imalat (Solid free fabrication, SFF) olarak da bilinen hızlı prototipleme (rapid prototyping, RP) teknolojileri, bir nesnenin bilgisayar destekli tasarım (CAD) modellerinden doğrudan üretebilmesini sağlayan bir dizi üretim işlemidir. Hızlı prototipleme ile, bilgisayar tarafından üretilen bir modelden ince yatay kesitler kullanarak ahşap, seramik, plastik ve metal nesneler katman katman üretilir. RP yöntemi, geleneksel üretim yöntemlerindeki bazı dezavantajları giderebilmek için polimer yapısı üzerinde hassas mekansal kontrole sahip tasarımların üretilmesini sağlar. Birkaç tekniği içine alan RP tekniklerinin temel yararı, söz konusu dokular ve organlar için uygun ve kişiye özel iskelelerin üretimini sağlamalarıdır. Temel RP teknikleri 3B baskı (3BP), kaynaşmış biriktirme modelleme (fused deposition modeling, FDM), seçici lazer sinterleme (selective laser sintering, SLS) ve stereolitografiyi içerir [146].

Stereolitografi yöntemi temel olarak katman katman ve ultraviyole (UV) kürlenebilen ince bir malzeme tabakası basmak suretiyle katı, üç boyutlu nesneler oluşturmak için kullanılır. Bir stereolitografi sistemi, UV ışığa duyarlı bir sıvı reçineye sahip bir tank, hareketli bir platform, UV lazer ve dinamik bir ayna sistemine sahiptir. Sıvı reçine tabakası üzerine uygulanan UV ışının ile ilk katmanın katılmasından sonra, platform dikey olarak indirilir. Daha sonra birinci katman üzerine ikinci bir katman yerleştirilir ve 3B iskele oluşturuluncaya kadar işlem tekrarlanır. Son olarak, kürlenmemiş reçine temizlenir ve iskele UV ışığı altında tamamen kürlenir [146].

FDM tekniğinde, katı bir polimer eritilerek bilgisayar kontrollü bir ekstrüzyonun iğne ucundan çıkarak biriktirme işleminin olacağı platform üzerine dökülür. Üretilemek istenen iskelenin tasarımına göre ekstrüzyon sisteminin kafasından akan polimer mikrofilamentlerinin çoklu katmanlarının bir araya gelmesi ile 3B yapı oluşur. FDM, termoplastik biyopolimerleri işlemek için kullanılan bir yöntemdir [146].

SLS tekniğinde, toz halindeki malzemeyi ince katmanlar halinde sinterlemek için güç kaynağı olarak lazer kullanır ve toz malzeme katman katman kürlenerek 3B yapıda iskeleler üretilir. Bu teknik polimer, seramik ve metal gibi farklı malzemeler ile kullanılabilir. SLS, istenilen iskele özelliklerini elde etmek için kullanılacak polimer/kompozit toz karışımlarının yüzde bileşimleri gibi çeşitli işlem parametrelerinin kontrol edilebilirliği ve bu sayede üretilen iskelenin mikro yapıları üzerinde mükemmel kullanıcı kontrolü sağladığı için avantajlı bir tekniktir. SLS'nin temel dezavantajı ise faz tamamlandıktan sonra enjekte edilen tozun yüksek çalışma sıcaklığında uzaklaştırılması için ek prosedürün gerekmesidir [146].

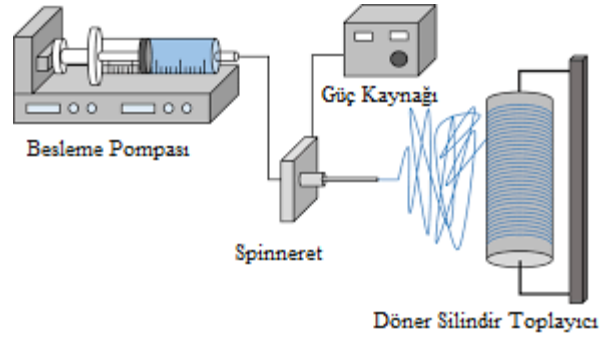
3B baskı, doğrudan bilgisayar modellerinden araçlar ve fonksiyonel prototipler yaratma işlemidir. 3B baskı tekniği, toz halindeki malzemenin katmanlar halinde uygulanması ve tozun, yapışkanın bulunduğu "inkjet" ile seçici füzyonu ile gerçekleştirilir. Katmanların sürekli biriktirilmesinden sonra, bağlanmamış toz çıkarılır ve karmaşık bir 3B nesne elde edilir. Bu işlem polimer, seramik, metal ve metal/seramik kompozit parça yapmak için kullanılabilir. 3B baskı işlemi gerçek parçanın veya bir kalıbın basılmasında doğrudan veya dolaylı olarak işlev görebilir. 3B baskı, doku mühendisliğinde kullanılan iskele yapısının mikron seviyesinde

hassas kontrolü için kullanılabilen yeni ve gelecek vadeden başarılı bir imalat yöntemidir. Doğal dokunun yapısını ve iskenin mekanik özelliklerini neredeyse birebir şekilde oluşturabilme yeteneğini 3B baskı yönteminin en önemli avantajıdır [146].

2.4.5.1. Elektroğirme

Vücudumuzda bulunan tüm dokular ve organlar organize olmuş 3 boyutlu yapılardır. Doku mühendisliği yöntemi ile bu çok fonksiyonlu doku ve organların bir kısmının yenilenmesi veya tamamının yeniden oluşturulmasında çeşitli yapı ve özelliklere sahip doku iskelelerinden faydalanılır. Bu doku iskelelerinin oluşturulmasında pek çok teknik kullanılırken bu teknikler içinde basit, etkili ve yaygın olarak kullanılan elektroğirme prosesidir.

İlk olarak Formhals tarafından kullanılan elektroğirme prosesi ile nanometreden (nm) mikrometreye (μm) kadar geniş bir aralıkta fiber çapına sahip fiber yapıları membranlar elde edilir [147, 148]. En basit haliyle bir elektroğirme düzeneğinde bir besleme ünitesi (pompa), bir yüksek voltaj güç kaynağı ve bir de toplayıcı hedef bulunur. Elektriksel iletkenliğe sahip polimer çözeltisi şırınga içerisine aktarılır ve pompa sayesinde şırınga ucundaki iğnenin ucuna doğru harekete geçer. Bu sırada polimer çözeltisine yüksek voltaj uyguladığımızda elektrostatik kuvvetler polimer çözeltisinin yüzey gerilim kuvvetine eşitlendiği anda iğne ucunda Taylor konisi oluşur. Voltaj kritik düzeyin üzerine çıktığı zaman elektrostatik kuvvetler yüzey gerilim kuvvetlerini yenerek oluşan Taylor konisinin ucundan elektrik yüklü sıvı jet uzar ve hedefle şırınga arasında oluşan manyetik alanın etkisiyle hedefe doğru harekete geçer. Bu sırada uzayıp incelerek toplayıcı yüzeye varana kadar çözücüsü buharlaşan polimer fiberler hedef üzerinde dokusuz bir membran oluştururlar. Elde etmek istediğimiz ürüne göre proses düzeneğinde çeşitli değişiklikler yapabiliriz. Örneğin kullanılan toplayıcı düz bir plaka olabileceği gibi yönlendirilmiş fiberlerin istenildiği uygulamalarda çeşitli döner silindirler de kullanılabilir.



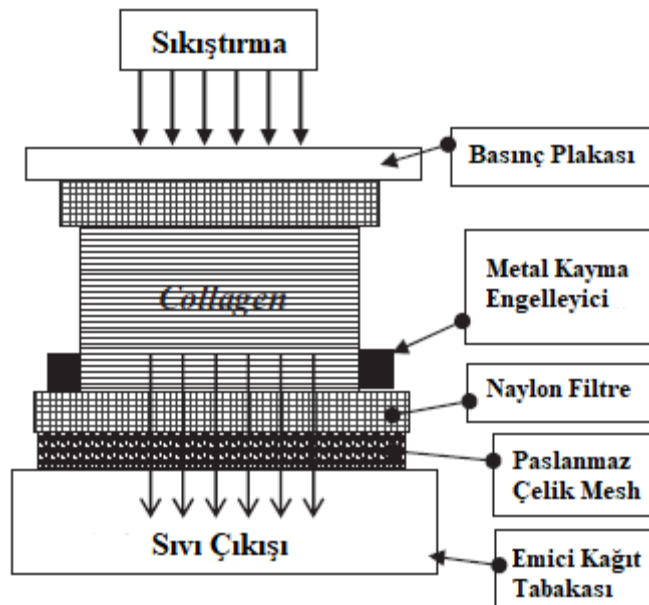
Şekil 2.8 Elektroğirme düzeneği ve fiber oluşumu [149].

Elektroğirme prosesi her ne kadar basit bir proses olarak görülsede fiberlerin oluşumu sırasında prosesi etkileyen pek çok parametre mevcuttur. Bu parametreleri kendi içinde çözelti özellikleri, proses değişkenleri ve çevresel faktörler olarak üç ana grupta inceleyebiliriz [150]. Çözeltiden kaynaklı parametreler konsantrasyon, viskozite, elektriksel iletkenlik, yüzey gerilimi, polimerin molekül ağırlığı gibi özelliklerdir ve bunların her biri de birbiri ile bağlantılıdır. Örneğin, polimerin molekül ağırlığı çözelti konsantrasyonunu etkilerken, konsantrasyon da viskoziteyi ve yüzey gerilimini doğrudan etkileyen bir faktördür. Kontrol edilebilir proses değişkenleri ise akış hızı, uygulanan voltaj, iğne ucu-toplayıcı mesafesi ve iğne ucu ve toplayıcının tipidir. Uygulanan voltaj fiberlerin oluşumunu ve çaplarını etkilerken, iğne ucu ve toplayıcı arası mesafe çözeltinin buharlaşmasını etkiler. Ayrıca iğne ucu ve toplayıcının tipide elektroğirme prosesinde önemli faktörlerden biridir. Toplayıcı tipi olarak düz bir plaka kullanıldığında düzensiz fiber yapısında bir membran elde edilirken, döner silindir bir toplayıcı kullanıldığında ise aynı yönde yönlendirilmiş düzenli fiberlerden oluşmuş daha kararlı bir membran elde edilir. Bunların yanı sıra nem, sıcaklık ve ortamdaki hava akışı gibi çevresel koşullarda fiberlerin oluşmasını ve yapısını büyük ölçüde etkilemektedir [151].

Elektroğirme yöntemi ile hazırlanmış nanofibröz membranların, yüksek yüzey alanı/hacim oranı, nanoboyutta fiber çapları ve yüksek porozite gibi özellikleri, hücrelerin büyümesi, çoğalması ve farklılaşmasında çok önemlidir [152]. Ayrıca elde edilen fiberlerin tek bir yönde yönlendirilmesi ile oluşturulan yönlendirilmiş yapıli membranlar daha homojen ve düzenli bir yapıya sahip oldukları için hücrelerin çoğalmasında ve farklılaşmasında etkili rol oynamaktadır [153].

2.4.5.2. Plastik sıkıştırma

Doku mühendisliğinde, orijinal dokuyu taklit ederek doku benzeri yapıyı oluşturabilmek için kullanılan malzemenin özellikleri ve uygulanan yöntem çok önemlidir. Fakat bunların hepsinin optimum şartlar altında bir arada sağlanabilmesi beklenilir. Sentetik biyopolimerler, doğal biyopolimerlerle karşılaştırıldığında kolay şekillendirilebilme, yüksek mekanik özellikler gibi özelliklere sahip olsalar da biyouyumluluk ve olası immün reaksiyon oluşturmama gibi özelliklerinden dolayı doğal biyopolimerlerin kullanımı da çok yaygındır. Doğal polimerler arasında kolay bulunan, hücre yapışması ve çoğalmasını destekleyen protein yapısında en sık kullanılan polimer olan kolajenin kısıtlı mekanik özellikleri, çeşitli kimyasal ajanlar kullanılarak çapraz bağ oluşturma ile arttırılmaya çalışılsa bile bu aşamalar sonucu yeterli yükselme görülmemiş ve kullanılan kimyasalların toksik yapıda olmaları sebebiyle başka yöntemlerin arayışına başlanılmıştır [154, 155]. Kolajenin biyouyumluluk özelliğini bozmadan ve hızlı bir şekilde mekanik özelliklerinin artırılması için plastik sıkıştırma yöntemi ilk olarak Brown ve ark. tarafından geliştirilmiştir [156]. Yapılan bir çalışmada Neel ve ark., plastik sıkıştırma yöntemi ile hazırlanmış kolajen jellerin çekme özelliklerinin yerli dokularla benzerlik gösterdiğini belirtmiştir [157].



Şekil 2.9 Plastik sıkıştırma prosesinin örnek gösterimi [156].

Bu yöntemle, uygulanan yükün etkisiyle jelimsi yapıdaki kolajenin içinde bulunan sıvının hızlı bir şekilde çıkarılması yoluyla yüksek porozite ve gözenekler arası bağlantılar bulunan kolajen yapı elde edilir. Plastik sıkıştırma öncesinde % 99 akışkanla dolu bir fibriler gevşek kafes yapısındaki kolajen jel birkaç dakikalık sıkıştırma sonrasında nispeten yoğun, hücrel ve mekanik olarak güçlü kontrol edilebilir mezo ölçekli bir yapıya dönüşür [158].





3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kullanılan Malzemeler

Bu çalışmada doku iskleinin elde edilmesi aşamasında kullanılan kolajen Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi (GÜDAM)' nden temin edilen sıçan kuyruklarından izole edilerek elde edilmiştir. Diğer araştırmalarda sağlıklı kontrol grubu olarak kullanılan ve sakrifiye edilen Wistar sıçanların kuyrukları kesilerek -80°C'de saklanmıştır. (15 Şubat 2014 tarihli Resmi Gazete'de yayınlanan "Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik" in 8. Maddenin k fıkrası 2. Bendi gereği etik kurul izni alınması gerek duyulmamıştır.) Diğer malzemeler Poli(L-laktat-ko-glikolat), (85/15), (Purasorb, PLG 8523, Hollanda), laminin (Millipore, Merck, Almanya), nörotrofin-3 (NT-3, Sigma-Aldrich, Almanya), kondrotinaz ABC (ChABC, Sigma-Aldrich, Almanya), 1,1,1,3,3,3-Hegzafloro-2-propanol (HFIP, Sigma-Aldrich, Almanya) satın alma yolu ile temin edilmiştir. Ayrıca hücre kültürü analizlerinde kullanılan α -MEM (Invitrogen, ABD), fetal sığır serumu (fetal bovine serum, FBS) (Biochrom AG, Almanya), serumsuz medium (DMEM, Invitrogen, ABD), phalloidin (Sigma, ABD), DAPI (Invitrogen, ABD), nörobazal besiyeri (neurobasal medium, NBM) (Invitrogen, ABD), anti-nörofilament antikor (Millipore, Almanya), Alexa fluor 488 goat anti-mouse IgG (Invitrogen, ABD), mouse monoklonal anti-Collagen I antikor (Abcam, UK), anti-laminin primer antikor (anti-rabbit Laminin-B, CST-12586) ve sekonder antikor (Alexa Fluor 488, CST-4408S) satın alma yoluyla elde edilmiştir.

3.2. Kolajen İzolasyonu ve Saflaştırılması

Tezin ilk aşaması üretilecek doku iskelelerinde kullanılacak olan kolajen eldesidir. Sıçan kuyrukları, dondurucudan çıkartıldıktan sonra çözülmesi beklenmeden önceden hazırlanmış 500 ml % 70'lik etanol çözeltisinde ve ardından PBS çözeltisinde bekletilmiştir. Çözeltiden alınan kuyruğun uç kısmı bistüri yardımı ile kesilerek deri kısmı kuyruktan ayrılmıştır. Deri kuyruktan tamamen uzaklaştırıldıktan sonra ince uçlu bir pens yardımıyla kuyruğun etrafında bulunan tendonlar çıkarılmıştır. Toplanan tendonlar, buz banyosu içerisine konulmuş 0,5 M asetik asit çözeltisi içinde çözülmüştür. Tam olarak safsızlıkları ayırmak amacıyla viskoz kolajen çözeltisi birkaç kat gazlı bez yardımı ile filtre edilmiştir. Bu işlemin

ardından elde edilen kolajen çözeltisi diyaliz tüplerine alınarak pH değeri=3'e ayarlanmış distile suya karşı dört gün boyunca diyaliz edilmiştir. Diyaliz sonrası çözelti -20°C'de dondurularak, kurutma amacıyla liyofilizasyon işlemine tabii tutulmuştur. Elde edilen sünger yapısındaki katı kolajen kullanımına kadar +4°C'de saklanmıştır.

3.3. Kolajenin Karakterizasyonu

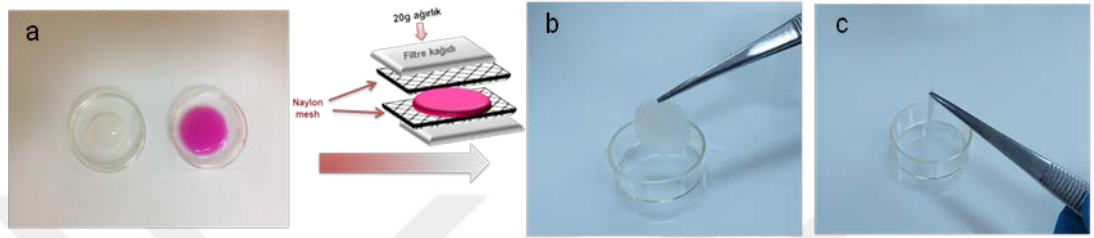
Saflaştırma işleminden sonra elde edilen kolajenin kimyasal yapı tayini Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR, Perkin Elmer, Spectrum 100, USA) analizi ile yapılmıştır.

Ayrıca elde edilen Tip-I kolajenin protein analizi ve molekül ağırlığı sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) yöntemi ile belirlenmiştir. Bunun için öncelikle kolajen 0,5 M asetik asit içerisinde çözölmüştür. Bradford yöntemi ile protein miktarının belirlenmesinin ardından örneğe 1X jel yükleme tamponu eklenerek 100°C'ta 5 dakika denatürasyon uygulanmıştır. Hazırlanan %12'lik poliakrilamid jelde denatürleyici ortamda gerçekleştirilen jel elektroforezinin sonrasında Coomassie Blue solüsyonu ile boyanarak görüntölenmiştir.

3.4. Kolajen Alt Katmanın Hazırlanması

Bu bölümde çift katmanlı matrisin alt katmanını oluşturacak olan kolajen film, plastik sıkıştırma tekniği kullanılarak hazırlanmıştır. Büyüme faktörü ve enzim yükleme yapmadan önce alt katmanın stabil bir şekilde elde edilmesi için literatürdeki benzer çalışmalar da göz önüne alınarak bir seri ön deneme gerçekleştirilmiştir [159, 160]. Şekil 3.1'de kolajen alt katmanın plastik sıkıştırma yöntemi ile üretilmesi sürecine ait görüntüler yer almaktadır. Filmlerin hazırlanmasında Tip-I kolajen, seyreltilmiş asetik asit çözeltisi, 10X konsantrasyona sahip MEM ile PBS çözeltisi kullanılmıştır. Ön deneme aşamasında, 1 mg/ml ile 10 mg/ml aralığında farklı konsantrasyonlara sahip kolajen çözeltileri 0.02M asetik asit kullanılarak hazırlanmıştır ve optimum konsantrasyon 5 mg/ml olarak seçilmiştir. Çözölmenin tam olarak gerçekleşmesi sonrasında kolajen çözeltileri buz banyosu içerisine konularak içerisine 10X MEM ilave edilmiştir. Homojenizasyon amacı ile bir süre karıştırılan çözeltilerin 0.5M NaOH kullanılarak nötrale edilmiştir. pH

ayarlamasının hemen ardından polimer çözeltileri 3,2 cm çapında petri kaplarına aktarılmış ve 1 sa süresince 37°C'deki etüvde bekletilmiştir. Süre sonunda jelleşen kolajen çözeltileri iç yüzeylerinde naylon mesh bulunan filtre kâğıtları arasına yerleştirilerek üzerlerine 20 g ağırlıklar konulup 30 dk boyunca jel içerisindeki fazla sıvının dışarı çıkması sağlanmıştır. Elde edilen ince kolajen filmler 37°C'de 1 sa boyunca kurutulmuş ve kullanımına kadar +4°C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.1 Tip I kolajenden hazırlanan alt katman a) Fibrilleşme sonrası kolajen jeller b) ve c) Plastik sıkıştırma sonrası elde edilen kolajen film.

Büyüme faktörü ve enzim yüklemesi yapılmamış alt katmanın, uygun konsantrasyon koşulları sağlandıktan sonra elde edilmesinin ardından ikinci basamak olarak büyüme faktörü ve enzim yüklemeleri üzerinde çalışılmıştır. Tez kapsamında kullanılması gereken NT-3 büyüme faktörü ve ChABC enziminin yüklemeleri yapılmıştır. 10 µl 10X MEM içerisinde ayrı ayrı çözülen 0,5 µg NT-3 ve 0,025 UN ChABC, hazırlanan kolajen çözeltilerine pH ayarlamasından hemen önce ilave edilmiştir. pH ayarlamasının ardından çözeltiler jelleşmesi için 37°C'deki etüvde 1 saat bekletilmiş ve sırasıyla diğer prosedürler uygulanarak biyomolekül içeren kolajen membranlar elde edilmiştir.

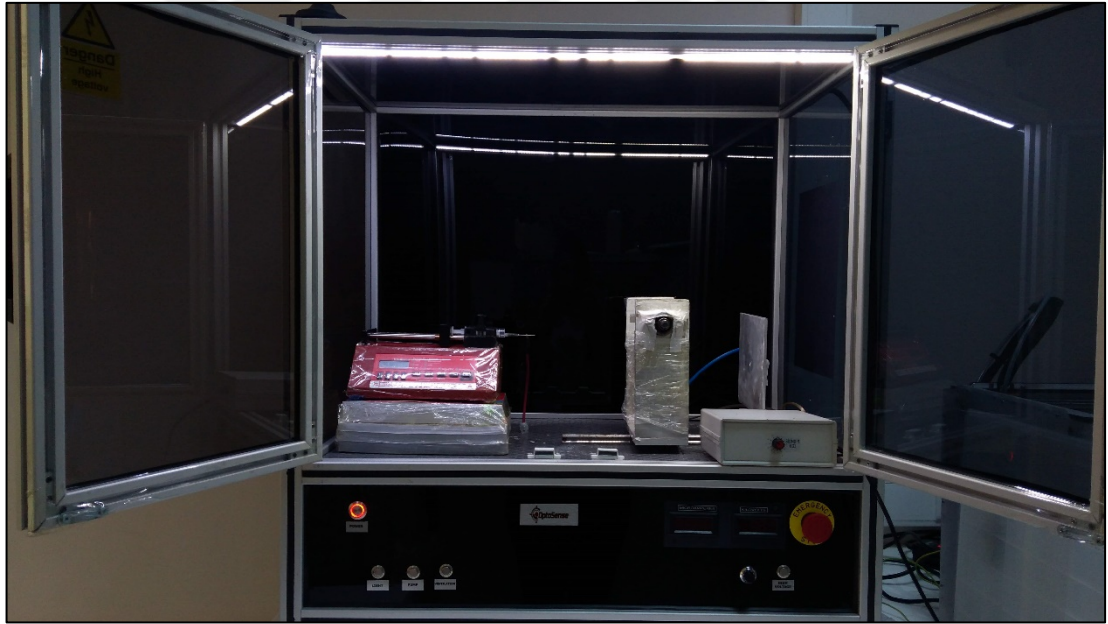
3.5. Kolajen/PLGA Nanofibröz Membran Hazırlanması

Bu bölümde, nanofibröz katmanın hazırlanması için seçilen kolajen ve PLGA'nın birlikte proses edilme yeteneklerinin belirlenmesi ve hücre cevaplarının araştırılması için öncelikle ön deneme olarak herhangi bir yönlenmeye sahip olmayan membranlar hazırlanmıştır. Kolajen/PLGA nanofibröz membranın hazırlanmasında çözücü olarak HFIP seçilerek hazırlanan farklı konsantrasyonlarda polimer çözeltileri elektroegirme yöntemi ile şekillendirilmiştir. Yapılan ön deneme çalışmalarında %8,5-20 aralığında ağırlıkça toplam çözelti konsantrasyonları denenerek optimum toplam çözelti konsantrasyonu %8,5 (g/ml) olarak belirlenmiştir. Ardından kolajen içeriğinin

yüksek olması hedefi gözetilerek çözeltideki kolajen/PLGA oranı, sırasıyla ağırlıkça 70/30 ve 50/50 olarak belirlenmiştir. Kolajen ve PLGA polimerleri HFIP içerisinde öncelikle ayrı ayrı çözüldükten sonra çözeltiler biraraya getirilip 150 rpm'de 3 sa boyunca karıştırılmışlardır. Nano yapıdaki fiberlerin oluşmasında çözelti konsantrasyonunun yanı sıra, pompa akış hızı, iğne ucu-toplayıcı mesafesi, oluşturulan voltaj farkı gibi parametrelerin etkili olduğu bilinmektedir. Bu nedenle proses koşulları; uygulanan voltaj 15-21 kV, çözelti akış hızı 0,5-2 ml/sa ve iğne ucu toplayıcı mesafesi 13-20 cm aralığında değiştirilerek yapılan pek çok deneme sonucunda optimize edilmiştir. Bu denemeler sonucunda voltaj 20 kV, çözelti akış hızı 1ml/sa ve iğne ucu toplayıcı mesafesi olarak 18 cm belirlenmiştir. Prosesin optimizasyonu aşamasında toplayıcı olarak düz plaka kullanılmıştır. Hazırlanan iki farklı yönlendirilmiş nanofiber membran, kolajen içeriğine bağlı kalarak Col5/PLGA-R ve Col7/PLGA-R olarak andlandırılmıştır. Tüm elektroegirme çalışmaları oda koşullarında sürekli sıcaklık ve nem ölçümü yapılarak gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan yönlendirilmiş membranların morfolojik analizleri SEM ile belirlenirken, yapılan çekme-uzama testleri ile mekanik özellikleri tespit edilmiştir. Hücre kültürü çalışmaları için ASC hücreleri kullanılmıştır. 7 gün süre ile membranlar üzerinde kültür edilen hücrelerin morfolojik yapısı immunokimyasal olarak belirlenmiştir. Olumlu sonuçlar elde edilmesi üzerine yönlendirilmiş nanofibröz yapıdaki membranların üretilmesi çalışmalarına başlanmıştır. Yapılan tüm karakterizasyon çalışmalarında kullanılan yöntemler ve ayrıntıları yönlendirilmiş membranlar için Bölüm 3.5 ve 3.6'da verilenler ile aynıdır.

Yönlendirilmiş yapıda fiberlere sahip nanofibröz membranların elde edilmesinde toplayıcı olarak üzerine birbirine paralel olan iki metal plaka yerleştirilerek döner silindir kullanılmıştır. HFIP kullanılarak hazırlanan %8-20 aralığında ağırlıkça toplam çözelti konsantrasyona sahip çözeltiler ile bir seri ön deneme gerçekleştirilmiştir. Denemeler sonucu toplam çözelti konsantrasyonu %10 (g/ml) olarak belirlenmiştir ve çözeltideki kolajen/PLGA oranı sırasıyla ağırlıkça 80/20, 70/30 ve 50/50 olarak seçilmiştir. Bileşenler gece boyu ayrı ayrı çözüldükten sonra birleştirilmiş ve 150 rpm'de 3 sa boyunca karıştırıldıktan sonra hazırlanan çözelti 5 ml'lik bir plastik enjektöre konularak elektroegirme prosesine geçilmiştir. Proses koşullarını belirlemek amacı ile, 15-21 kV aralığındaki voltaj, 0,5-2 ml/sa aralığındaki çözelti akış hızı ve 13-20 cm aralığındaki iğne ucu toplayıcı mesafesi

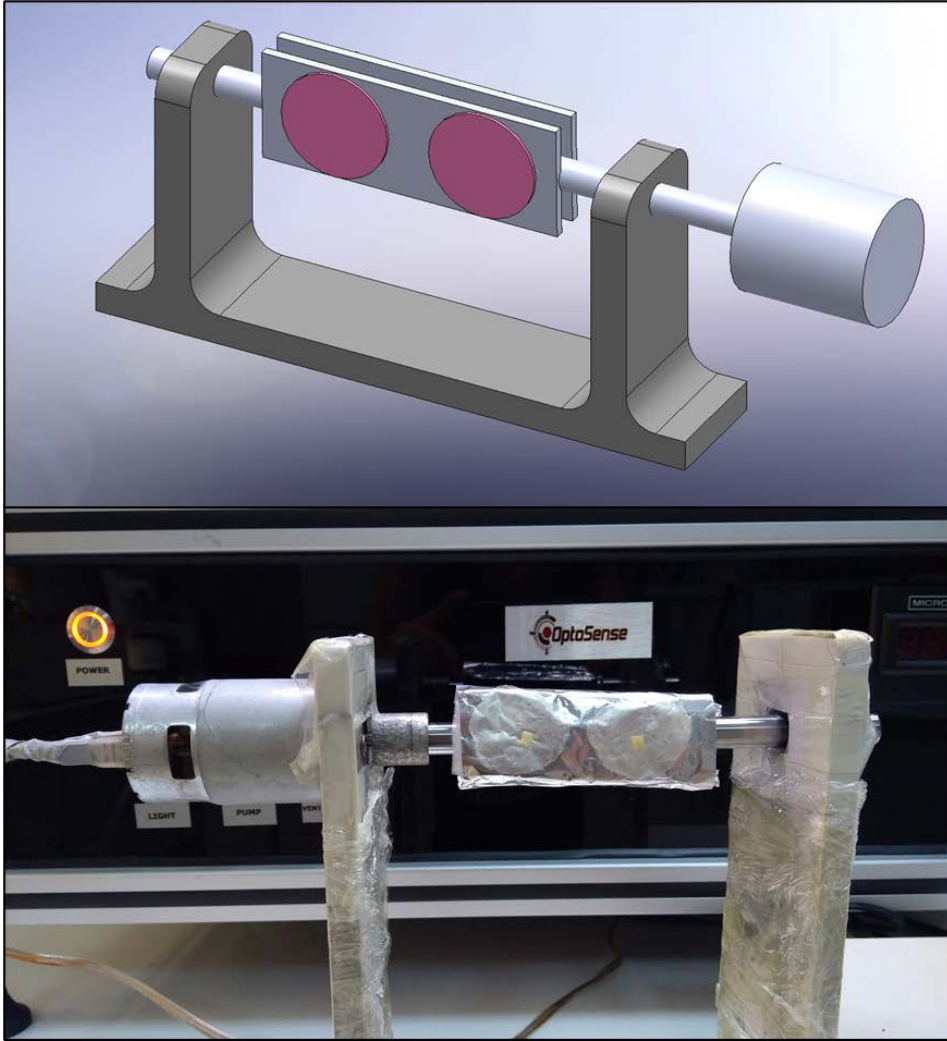
değerleri denenmiştir. Denemeler sonucunda, voltaj 19 kV, çözelti akış hızı 1 ml/sa ve iğne ucu toplayıcı mesafesi 15 cm olarak seçilmiştir. Ayrıca yönlenmiş nanofiber elde etmek için kullanılan döner silindir toplayıcının dönüş hızı 1200 rpm/sa olarak belirlenmiştir. Elektroegirme prosesi esnasında fiberlerin yapıları yönlenmeleri, belirli süre aralıklarında cam lameller üzerine alınan örneklerin optik mikroskop ile incelenmesiyle sürekli olarak kontrol edilmiştir. Bu ön denemeler sonucu, Şekil 3.2’de görülen elektroegirme düzeneği kullanılarak damlacık içermeyen düzgün fiber yapısında yönlenmiş kolajen/PLGA’dan oluşan nanofibröz membranlar elde edilmiştir. İstenilen morfolojik özelliklere sahip kolajen/PLGA nanofibröz membranların üretimi optimize edildikten sonra laminin içeren örneklerde aynı prosedür takip edilerek hazırlanmıştır. Kolajen ve PLGA’nın HFIP içerisinde homojen olarak çözünüp karıştırılmasından sonra çözelti içerisine kütlece %0,8 toz laminin proteini eklenmiş ve homojen bir şekilde çözünmesi için 1 sa 150 rpm’de karıştırılmış ve ardından elektroegirme işlemi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.2 Elektroegirme düzeneği.

Çift katmanlı yapının eldesi elektroegirme prosesi sırasında yapılmıştır. Bu amaçla Şekil 3.3’de görüldüğü gibi döner silindir üzerinde bulunan plakalar üzerine daha önceden hazırlanmış kolajen alt katmanlar sabitlenerek üst yüzeyleri yapışmanın etkili olabilmesi için çok seyreltik asetik asit ile ıslatılmıştır. Hemen ardından membran yüzeyleri kurumadan elektroegirme prosesi başlatılmıştır. Elektroegirme sonrası elde edilen çift katmanlı matrisler vakum altında tutularak kalan eser

miktarda çözücü ve asetik asidin uzaklaşması sağlandıktan sonra, örnekler kullanılabilecek kadar +4°C’de saklanmıştır. Hazırlanan çift katmanlı matriksler, nanofibröz üst katmanda içerdikleri 50/50, 70/30 ve 80/20 kolajen/PLGA oranına göre sırasıyla Col5/PLGA, Col7/PLGA ve Col8/PLGA olarak adlandırılmışlardır. Örneklerin adlandırılmasında “W” sembolü biyomolekül içeren membranları göstermektedir



Şekil 3.3 Çift katmanlı yapının oluşturulduğu toplayıcı düzeneği.

3.6. Membranların Karakterizasyonu

3.6.1. Morfolojik Karakterizasyon

Elde edilen membranların hem ayrı ayrı hem de birleştirilmiş halde morfolojik karakterizasyonu, yüzey özellikleri, fiber çapları ve yönelimleri Taramalı elektron Mikroskobu (SEM, XL30 ESEM-FEG, FEI-Philips, Hollanda) ile belirlenmiştir. Bu

amaçla 0,5x0,5 cm boyutlarında kesilmiş membranlar, ince altın film ile kaplandıktan sonra yüzey, fiber yapıları ve genel morfolojileri 20 kV ivmelendirilmiş elektron demeti yardımı ile altında incelenmiştir. Ayrıca elde edilen çift katmanlı yapının birbirine ile entegrasyonunun incelenmesi için çift katmanlı yapıların ara kesit görüntüleri alınmıştır. Fiberlerin ortalama çaplarının belirlenmesinde ImageJ analiz programının DiameterJ eklentisi kullanılmıştır.

Nanofibröz üst katman yüzeyindeki kolajen ve laminin dağılımının belirlenmesi amacıyla immünoboyama yapılan örnekler lazer taramalı konfokal mikroskobu altında incelenmiştir. Kolajen ve laminin boyaması için ayrı örnekler kullanılmıştır. Kolajenin immün boyaması için örnekler PBS ile 3 kez yıkandıktan sonra primer antikor mouse monoclonal anti kolajen (1:500; Abcam, UK) ile oda sıcaklığında 1 sa boyunca inkübe edildikten sonra sekonder antikor goat anti-mouse Alexa Flour 488 (Invitrogen, US) (1:500) ile 1 sa daha oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Son olarak PBS ile yıkanan örnekler konfokal mikroskobu (Olympus FV1200) altında analiz edilmiştir. Aynı protokol laminin boyaması için anti-laminin primer antikor (anti-rabbit Laminin-B, CST-12586) ve sekonder antikor (Alexa Fluor 488, CST-4408S) kullanılarak farklı membran üzerinde tekrar edilmiştir.

3.6.2. Mekanik Testler

Hazırlanan çift katmanlı matrikslerin kuru ve ıslak haldeki mekanik özellikleri, bir Universal Test Cihazı (1.000 N ve 20.000 N, Zwick/Roell, Almanya) ile 1kN yük hücresi kullanılarak belirlenmiştir. Bu amaçla, filmler 3,5x0,5cm boyutlarında kesilerek cihazın çeneleri arasına yerleştirildikten sonra oda sıcaklığında 10 mm/dk sabit çekme hızıyla çekilerek test edilmiştir. Örnekler ıslak haldeki özelliklerini belirlemek amacıyla, çekme işleminden hemen önce PBS çözeltisi içine daldırılan örnekler bir filtre kâğıdı yardımıyla üzerlerindeki fazla su alındıktan sonra teste tabii tutulmuşlardır. Her bir film için en az 6 örnek hazırlanıp (n=6), test boyunca çekme gerilimine karşı % uzama değerleri kaydedilerek sonuçlar ortalama değerler ve standart sapmaları olarak sunulmuştur.

3.6.3. Büyüme Faktörü *in-vitro* Salım Analizi

Kolajen alt katmana yüklenen biyomoleküller NT-3 ve ChABC'nin *in vitro* ortamda salım profilleri PBS (pH=7.4) çözeltisi içerisinde 37°C'de belirlenmiştir. Örneklerin

içerisine konulduğu 3 ml tampon çözelti, belirenen zaman aralıklarında santrifüjlenerek supernatant toplanmıştır. Uzaklaştırılan PBS'in yerine aynı miktarda taze çözelti eklenmiştir. Kolajen ve lamininin salımından kaynaklanabilecek olası hataların önüne geçmek amacıyla, aynı salım deneyleri büyüme faktörü içermeyen doku iskeleleri için de gerçekleştirilerek düzeltilmiş salım profili oluşturulmuştur. NT-3 konsantrasyonunun belirlenmesinde NT-3 ELISA kiti (NT-3 ELISA Kit, Sigma-Aldrich, USA) kullanılmıştır. Ardından NT-3'ün (%) kümülatif değerleri hesaplanarak, ortalama değer±standart sapma olarak grafiğe aktarılmıştır.

ChABC'nin salım grafiğinin belirlenmesinde dekarinin ChABC tarafından parçalanmasına dayalı olan enzimatik aktivite protokolü uygulanmıştır. Fakat düşük ChABC konsantrasyonu sebebiyle salım miktarı belirlenememiştir. Aynı sorun başka çalışmalarda da rapor edilmiştir [161]. Alternatif metot olarak, Clemons ve ark. tarafından sunulan ChABC aktivitesinin kantitatif olarak ölçülmesi için geliştirilen spektrofotometrik yöntem denenmiştir [162]. Fakat bu yöntem ile de ChABC' nin salım miktarı belirlenememiştir.

3.6.4. Su Tutma Kapasitelerinin Belirlenmesi

Hazırlanan çift katmanlı yapıların su tutma kapasitelerinin belirlenmesi için şişme testi uygulanmıştır. Bu amaçla hazırlanan matrisler 1x1 cm ölçülerinde kesilerek her matris grubu için 4 örnek hazırlanmıştır. Deneye başlamadan önce her bir örnek tartılarak kuru ağırlıkları not edilmiştir. Daha sonra örnekler PBS çözeltisi (pH=7.4) içeren falkon tüplere daldırılıp 37°C'de etüvde bekletilmiştir. Belli zaman aralıklarında üzerlerindeki fazla su filtre kağıdı ile alınarak tekrar tartım yapılmıştır. Bu işleme üç ölü boyuncaya ağırlık değişimi olmayana kadar devam edilmiştir.

Örneklerin su tutma kapasiteleri;

$$(\%) \text{ şişme} = \frac{(W_1 - W_0)}{W_0} \times 100$$

formülü kullanılarak hesaplanmıştır. Formülde W_0 ile örneklerin kuru ağırlığı ve W_1 ile ise ıslak ağırlıkları ifade edilmektedir. Hesaplanan sonuçlar şişme oranı-zaman grafiğinde verilmiştir.

3.7. Hücre Kültürü

3.7.1. Adipoz Kök Hücre Kültürü

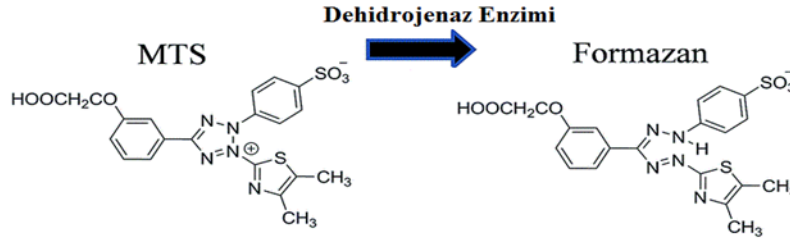
Hücre canlılık ve farklılaşma analizlerinde adipoz kökenli mezenkimal kök hücreler (Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells, ADMSCs) kullanılmıştır. İnsan yağ dokusundan Dubois ve ark. tarafından rapor edilen protokole göre önceden izole edilip, -80°C’ de sıvı azot içerisinde muhafaza edilen hücreler deneylere başlamadan önce azot ortamından alınıp, su banyosunda sürekli kontrol edilerek çözünmüştür [163]. Daha sonra üzerine α -MEM besi ortamı ilave edilen hücre süspansiyonu 15 ml’lik falkon tüp içerisinde 1200 rpm dönüş hızında, 4°C’de, 5 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Supernatantın uzaklaştırılmasının ardından hücre pelleti α -MEM besi ortamı içerisinde dağıtılarak flaska aktarılmış ve 37°C, %5 CO₂ koşullarındaki inkübe edilmiştir. Hazırlanan yeni hücrelerden istenilen miktarda hücre elde edilene iki günde bir besi ortamı değiştirilmek suretiyle pasajlanmıştır.

Hazırlanan nanofibröz membranlar her iki tarafı, üzerlerine hücre ekilmeden önce UV ışığı (30W, 254nm) altında 30 dk süresince steril edilmiştir. Sterilizasyon işleminden hemen sonra 6. pasaj ASC’ler 5×10^3 hücre/membran olacak şekilde membranlar üzerine ekilerek ve 37°C’de nemli ortamda %5 CO₂ varlığında kültür edilmiştir. İnkübe edilen hücrelerin besi yerleri her iki günde bir değiştirilmiştir. Hücre besi yeri olarak 10% fetal sığır serumu (Fetal Bovine Serum, FBS) (Biochrom AG, Germany) ve 1% penisilin-streptomisin antibiyotik (pen/strep) (Invitrogen, US) katkılı α -MEM (Invitrogen, US) kullanılmıştır.

3.7.2. Hücre Canlılık MTS Analizi

MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt) analizi, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)’ nin analogu olan MTS tetrazolyum tuzu kullanılarak in-vitro hücre gelişiminin gözlenmesinde ve hücre canlılığının, metabolik aktivitenin belirlenmesi için yapılan temel analizlerden biridir. Bu analiz sırasında canlı hücrelerin mitokondrileri tarafından salgılanan enzimlerin substratı olan tetrazolyum tuzu kullanılarak spektrofotometrik ölçüm yapılır. Canlı hücrelerin mitokondrilerinden salgılanan dehidrojenaz enzimleri analiz için kullanılan tetrazolyum tuzlarını indirgeyerek formazona dönüştürürler ve bunun sonucunda

renk değişimi ortaya çıkarken l hücrelerin mitokondri enzimleri aktivitelerini kaybettikleri için bu işlemi gerçekleştirip renk değişimine sebep olmazlar. Ortaya çıkan bu renk değişimi spektrofotometrik olarak mikroparka okuyucusunda ölçülür [164].



şekil 3.4 MTS tetrazolyum tuzunun dehidrojenaz enzimi ile formazana dönüşmesi[164].

Hücrelerin metabolik aktivitelerinin daha iyi gözlenebilmesi için MTS analizi 7 gün sonunda uygulanmıştır. Hücrelerin metabolik aktivitelerinin belirlenmesi için 48 well plate içine bulunan örneklerin üzerlerindeki hücre ortamı çekilerek membranlar, hücre besi ortamında bulunan FBS'den arındırılması için PBS ile yıkanmıştır. Boyama için membranların zerine MTS (Cell Titer 96® Aqueous One Solution) içeren serumsuz hücre besi ortamı (DMEM, Invitrogen, USA) (1:5) eklendi ve 3 saat inkübe edilmiştir. 3 saat sonunda herbir örnekten 100 l (n=3) alınarak 96 well plate aktarılarak 490 nm'de mikroparka okuyucuda (NanoQuant Plate, Infinite M200, Tecan) absorbans ölçümleri yapılmıştır. Yapılan ölçümlerin sonucunu karşılaştırabilmek amacıyla pozitif kontrol olarak sadece besi yerinin absorbans ölçümleri yapılmıştır.

3.7.3. Phalloidin/DAPI Boyaması

Hücre yoğunluğu ve morfolojisini tespit etmek için en sık kullanılan yöntemlerden biri phalloidin/DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) boyamasıdır. Phalloidin, zehirli mantar Amanita phalloides tarafından üretilen, polimerize aktin filamentlerine sıkı ve spesifik olarak bağlanan bir heptapeptit toksindir. Bu nedenle, sabit ve geçirgen doku kesitleri, hücre kültürleri veya serbest hücre deneylerinde F-aktini işaretlemek, tanımlamak, ölçmek ve stabilize etmek için floresan phalloidin kullanılır. Bu yöntem ile boyanmış hücre iskeleti mikroskop altında bakıldığında yeşil renkli görünür ve hücrenin morfolojisi belirlenmiş olur [165].

DAPI ise çok renkli floresan tekniklerinde kullanılan popüler bir çekirdek karşıt-boyadır. Hücrelerin çekirdeklerindeki DNA'yı boyayarak görünür hale gelmesini ve mikroskop altında mavi renkli olarak görünmesini sağlar. Bu sayede ortamdaki hücrelerin çekirdek sayısı ve çekirdek morfolojileri belirlenir [166].

Phalloidin/DAPI boyaması içinde MTS analizinde olduğu gibi 48 well plate içinde 4 tekrar olacak şekilde hazırlanan 1, 3 ve 7 günlük örnekler üzerlerinde bulunan hücre besisi ortamı çekilerek örnekler PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra membranların üzerinde hücreleri sabitlemek için üzerlerine %4 PFA (paraformaldehit) içeren PBS koyulmuş ve 45 dakika oda koşullarında inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda PFA içeren PBS membranların üzerinden çekilerek membranlar 3 kez daha PBS ile yıkanmış ve boyama için hazır hale getirilmiştir. Hazırlanan phalloidin/DAPI (Phalloidin (1:500, Sigma, USA), DAPI (1:1000, Invitrogen, USA) çözeltisi uygun miktarlarda membranların üzerine konularak oda koşullarında karanlık ortamda boyanın çekirdek içine tam olarak nüfuz edebilmesi için 45 dk inkübe edilmiştir. Süre sonunda çözelti ortamdan uzaklaştırılarak örnekler tekrar 3 kez PBS ile yıkanarak mikroskop görüntülemesi için hazır hale getirilmiştir. DAPI ışığa duyarlı bir malzeme olduğu ve floresans yoğunluğunu koruması için çekirdek boyaması yapıldıktan sonra örnekler hep karanlık ortamda saklanmıştır. İnkübasyon sonunda örnekler konfokal mikroskop (Olympus FV1200) altında incelenmiş ve her membran için farklı bölgelerinden (n=5) görüntüleri kaydedilmiştir. Membranlar üzerinde tutunup gelişen hücreler, CounterJ hücre sayım eklentisine sahip ImageJ analiz programı ile sayılmıştır.

3.7.4. Dorsal Kök Ganglionu Kültürü

Aksonal büyümenin belirlenmesi amacıyla kullanılan dorsal kök ganglionları (DRG) 5-7 günlük postnatal dönemdeki Wistar sıçanlardan (Charles River, Fransa) izole edilmiştir. Deneyler için Minho Üniversitesi ve ICVS etik komitelerinden onay alınmıştır. Tüm prosedürler, “2010/63/EC sayılı Bilimsel Amaçlarla Kullanılan Hayvanların Korunmasına Dair Avrupa Birliği Direktifi”ne (Guiding Principles for Research Involving Animals and Human Beings) uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Anestezi ve etanol sterilizasyonu sonrası sıçanlar, steril kabin içerisine yerleştirilen Nikon SMZ800 stereo mikroskop altında oluşturulan platform üzerine iğnelerle sabitlenerek sırt bölgeleri boyuna bir kesit ile dikkatlice açılmıştır. Omuriliğin üzeri

temizlenerek tamamen meydana çıkarılmıştır. Daha sonra omurilik etrafında, her omurun sağ ve sol taraflarında birer adet olmak üzere yerleşmiş dorsal kök ganglionları servikal bölgeden başlanarak mikroskop altında dikkatli bir şekilde çeşitli mikro cerrahi aletler kullanılarak izole edilmiştir. İzole edilen DRG'ler yine mikroskop altında etraflarındaki sinir hücrelerinden arındırıldıktan sonra Hank's dengeli tuz çözeltisi (HBSS) içerisine aktarılmıştır. Hazırlanan DRG'ler bekletilmeden her matriks için bir adet DRG olacak şekilde sterilize çift katmanlı matriksler üzerine ekilmiştir. Pozitif kontrol olarak kolajen film üzerine yerleştirilmiş DRG'ler kullanılmıştır. DRG'lerin ekiminde besi yeri olarak %2 B₂₇ (Gibco, US), %1 L-glutamin (Gibco, US), %2 glukoz (Gibco, US) ve %1 penisilin-streptomisin (Invitrogen, US) ilave edilmiş nörobazal medium (NBM, Gibco, US) kullanılmıştır.

3.8. Aksonal Büyümenin Değerlendirilmesi

Aksonal büyümenin değerlendirilmesinde hücre tipi olarak arka kök ganglionlar (Dorsal Root Ganglion, DRG) seçilmiştir. Aksonal büyümeyi indüklemesi için kullanılan NT-3 ve ChABC'nin etkilerinin incelenmesinde NT-3/ChABC içeren membranlar kullanılırken kontrol grubu olarak bu biyomolekülleri içermeyen membranlar kullanılmıştır. DRG'ler 5-7 günlük anestezi altındaki Wistar şıçanlarından izole edilmiştir. İzole edilen DRG'ler hemen Hank's tamponlanmış tuz çözeltisi (Hank's buffered saline solution, HBSS, Invitrogen, USA) içine alınarak vakit geçirilmeden membranlar üzerine ekilmiştir. 48 well plate içine yerleştirilmiş steril membranlar öncelikle DRG'lerin daha iyi bir tutunma göstermeleri için 100µl NBM ile ıslatılmış ve ardından her membranın tam orta noktasına bir adet ekilen DRG'ler 7 gün boyunca B₂₇, L-glutamin, glutamat ve penisilin/streptomisin ilave edilmiş nörobazal besi yeri (Neurobasal Medium, NBM, Invitrogen, USA) içinde inkübe edilmiştir. DRG ekiminden sonra üzerlerine 100 µl daha NBM ilave edilerek tekrar 37°C, %5 CO₂ koşullarındaki inkübatör içerisine yerleştirilmiştir. 24 saat sonra ilk kez besi yeri değiştirildikten sonra her iki günde bir besi yeri değiştirilmeye devam edilmiştir.

7 günün sonunda DRG'lerin hem çekirdek görüntülenmesi hem de akson uzamasını tespit edilmesi amacıyla örneklerin immünofloresan boyamaları yapılmıştır. Bu amaçla hücrelerin üzerindeki besi yeri uzaklaştırılarak 1XPBS ile yıkanmış ve DRG'lerin fiksasyonu için %4 PFA çözeltisi ilave edilerek 1 saat boyunca oda

koşullarında inkübe edilmiştir. 1 saat sonunda PFA' da aspire edilerek membranlar 3 kez PBS'le yıkanmıştır. DRG'lerin görüntülenmesi için fiksasyon işlemi sonrası hücre zarının geçirgenliğini artırmak için örnekler %0,3 Triton-X100/PBS çözeltisi içinde 10 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda boyama işlemi öncesi istenmeyen boyamalara engel olmak amacıyla 10% FBS içeren PBS çözeltisi bloklama çözeltisi olarak kullanılmış ve bloklama işleminden sonra hücreler primer antikor olan anti-neurofilament (200 kDa, Millipore) ile 48 sa boyunca 4°C'de inkübe edilmiştir. Sonrasında %0,5 FBS içeren PBS çözeltisi ile yıkanan örnekler sekonder antikor olan Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (Invitrogen, USA) ile gece boyu 4°C' de inkübe edilmiştir. Bu işlemin sonunda da tüm örnekler %0,5 FBS/PBS ile yıkanarak hücre çekirdeklerinin görselleştirilmesi amacıyla DAPI boyaması yapılmış ve konfokal mikroskobu ile incelenmiştir.

DRG'lerin aksonal gelişimi, aksonların membranlar üzerinde kapladıkları alan hesaplanarak belirlenmiştir. Her bir örnek için 3 farklı görüntü alınarak bu görüntüler ImageJ analiz programının ilgili eklentisi NeuriteJ kullanılarak hesaplanmıştır.

3.9. İstatistiksel Analiz

Hücre deneylerinde elde edilen bütün sayısal sonuçların istatistiksel analizi GraphPad Prism versiyon 8 (GraphPad Software, USA) yazılımı ile yapılmıştır. Bütün kantitatif sonuçlar one-way Anova varyans analizi ve ardından farklı gruplar arasındaki farkın önemini belirlemek için Tukey testi ile istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Anlamlı değeri seviyesi $p < 0.05$ olarak tanımlanmıştır.



4. SONUÇLAR

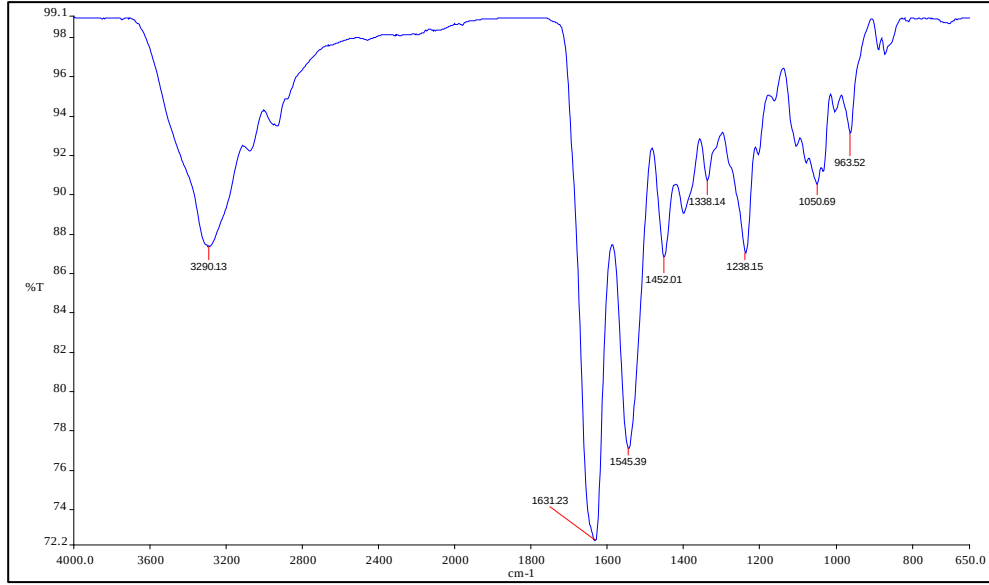
4.1. Kolajen İzolasyonu ve Karakterizasyonu

Tez kapsamında elde edilen çift katmanlı doku iskelelerinin her iki katmanında da bulunan kolajen Wistar tipi sıçan kuyruklarından izole edilmiştir. Liyofilizasyon işlemi sonucunda elde edilen katı kolajen Şekil 4.1’de verilmiştir. İzole edildiği kaynağa göre lif yapısı, organizasyonu, biyomekanik ve biyokimyasal özellikleri değişen kolajen, membran yüzeyine ekilen hücrelerin hücre zarı reseptörlerinin membran yüzeyine bağlanması için gerekli olan biyokimyasal özellikleri sağladığından hücre davranışları açısından birincil öneme sahiptir [167].



Şekil 4.1 Sünger yapısındaki katı kolajen.

Saflaştırma işleminden sonra elde edilen kolajenin kimyasal yapı tayini Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR, Perkin Elmer, Spectrum 100, USA) analizi ile yapılmıştır. Şekil 4.2’de verilen FTIR spektrumunda protein yapısındaki kolajene ait karakteristik bandlar; $1631,23\text{ cm}^{-1}$ ’de gözlenen C=O gerilme titreşimi yani Amid I bandı, $1545,30\text{ cm}^{-1}$ ’da görülen N-H bükülme titreşimi olarak tanımlanan Amid II bandı ve $1238,15\text{ cm}^{-1}$ ’de N-H bükülme titreşimi olan Amid III bandıdır. Ayrıca Amid A olarak bilinen karakteristik bandı $3290,13\text{ cm}^{-1}$ ’de görülmektedir. Kolajenin literatürde verilen FTIR spekturumları ile izole edilen kolajenin karakteristik protein grupları karşılaştırıldığında, elde edilen kolajenin tüm safsızlıklardan arındırıldığı görülmüştür [167].

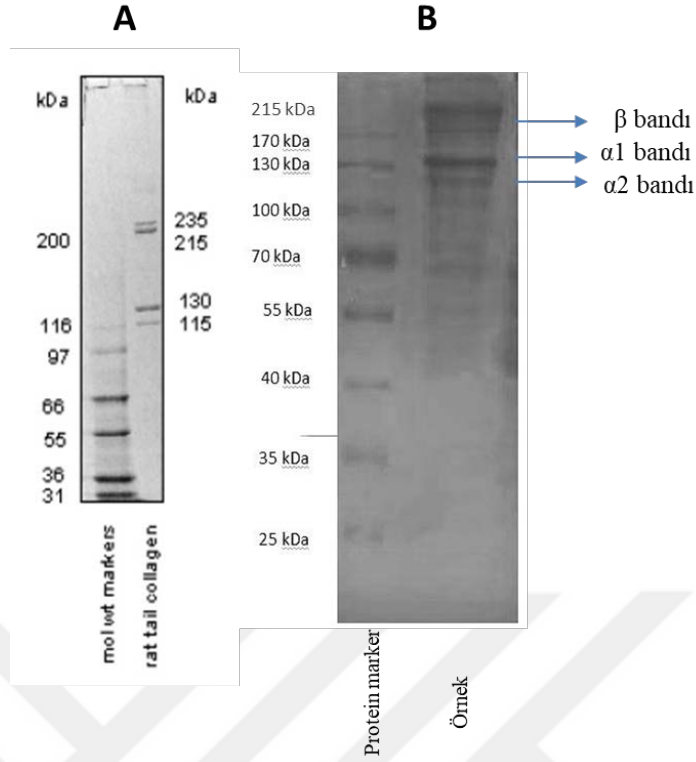


Şekil 4.2 Kolajene ait FTIR spektrumu.

Prensip olarak suda çözülmeyenler dahil tüm proteinlerin ayırımı için kullanılan SDS poliakrilamit jel elektroforezi, protein analizi açısından etkili bir yöntemdir. Hücre zarı ve iskeletinin protein bileşenleri ve daha büyük hücre parçalarının bileşenlerini oluşturan proteinlerin hepsi bu yöntem kullanılarak analiz edilebilir. Yöntem polipeptitleri büyüklüklerine göre ayırdığından molekül ağırlıkları ve protein kompleksindeki alt birimlerin bileşimi hakkında bilgi verir [168].

Saf bir protein SDS-PAGE’de tek bir bant verirken, protein alt birimlerinin farklı moleküler kütlede ve iyonda olması durumunda birden fazla bant görmek de mümkündür [169].

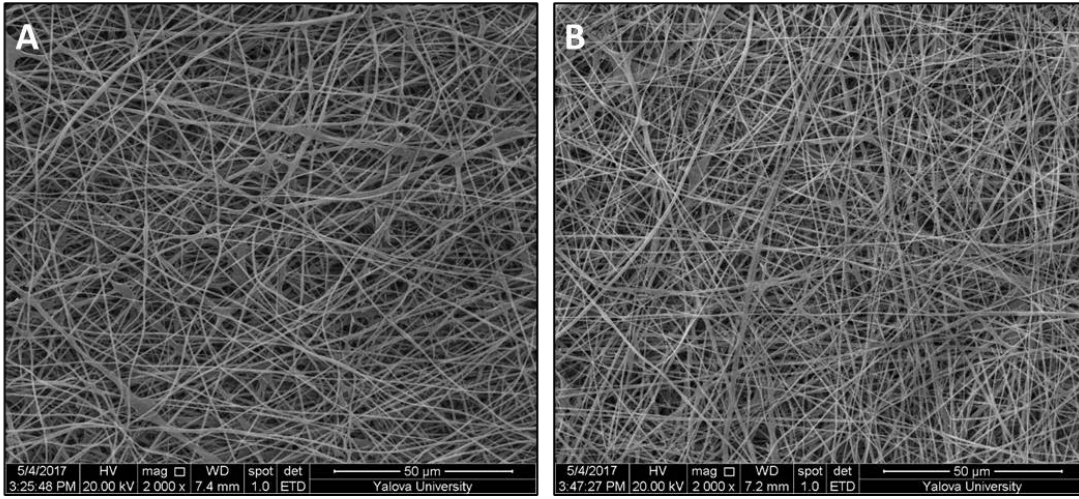
Tip-I kolajen temel olarak, ortalama 215 kDa’da β , 130 kDa’da α_1 ve 115 kDa’da α_2 zincirlerinden oluşur [170]. Tez kapsamında şıçan kuyruklarından izole edilen kolajenin yapılan SDS-PAGE analizi sonucu Sigma-Aldrich ticari Tip-I kolajenin sonucu ile karşılaştırmalı olarak Şekil 4.3’de verilmiştir. Sonuç incelendiğinde Tip-I kollajen için tipik paternin oluştuğu ve ticari kolajen örneği ile karşılaştırıldığında benzer bantlar verdiği görülmüştür.



Şekil 4.3 SDS-PAGE diyagramı A) ticari kolajen B) saflaştırılmış kolajen.

4.2. Yönlenmemiş Nanofibröz Membran Ön Deneme Sonuçları

Tez kapsamında, sıçan kuyruklarından izole edilen Tip-I kolajenin yapısal analizlerinin ardından proses edilebilme yeteneğinin incelenmesi ve hazırlanacak çift katmanlı membranların ön çalışması olarak elektroegirme prosesi kullanılarak yönlenmemiş nanofiber membranlar hazırlanmıştır. Hazırlanan kolajen/PLGA membranlarının fiber morfolojilerinin incelenmesi için çekilen SEM görüntüleri Şekil 4.4'te verilmiştir. Görüntülerden de açıkça anlaşıldığı üzere boncuksuz nanofiber yapılar düzgün bir şekilde elde edilirken fiberlerin plaka üzerinde birikiminde herhangi bir yönlenme bulunmamaktadır. Col5/PLGA-R membranına ait fiber çapları 400-1000 nm aralığında ölçülürken, daha yüksek oranda kolajen içeren Col7/PLGA-R membranına ait fiberlerin çapları ise 480-1300 nm arasında ölçülmüştür.



Şekil 4.4 Yönlenmemiş nanofiber membranların SEM görüntüleri A) Col50/PLGA B) Col70/PLGA.

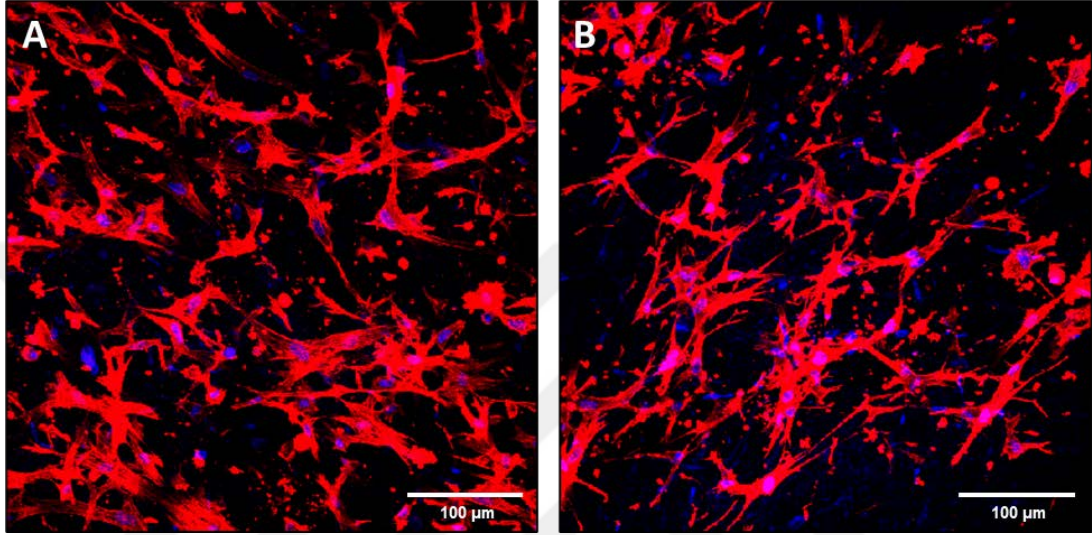
Membranların sahip oldukları fiberlerin morfolojileri ve oryantasyonları, kullanım amaçlarına göre sahip olması gereken mekanik özellikleri doğrudan etkiledikleri için mekanik karakterizasyon da önemlidir. Birbirine yakın açılar ile yönlenmiş fiberlerden oluşan membranların fiber yönünde çekme dayanımları yönlenmemiş nanofibröz membranlara göre daha yüksektir. Yapılan çekme testi sonrasında elde edilen, membranlara ait elastik modül ve uzama değerleri Tablo 4.1’de verilmiştir. Ölçülen değerlere bakılarak iki membran arası bir karşılaştırma yapıldığında polimer çözeltisi içerisinde daha yüksek PLGA oranına sahip olan Col5/PLGA-R membranı daha yüksek elastik modüle sahiptir. Polimer karışımında kolajen miktarının artmasıyla ise kolajenin zayıf mekanik özelliklerinden dolayı Col7/PLGA-R membranların elastik modülü düşerken buna karşılık olarak uzama miktarları artmıştır.

Tablo 4.1 Yönlenmemiş nanofiber membranların mekanik özellikleri (Ort±SS, n=4).

Örnek	Durum	Elastik Modül (MPa)	Uzama (%)
Col5/PLGA-R	Kuru	23.07±1.89	3.74±0.47
Col7/PLGA-R	Kuru	19.14±2.75	4.97±0.49

Nano boyutta fiberlerden oluşan membranlar ECM’ye benzer morfoloji gösterdiği için hücre davranışları ve cevabı açısından önemlidir. Elde edilen yönlenmemiş fiber membranların üst yüzeyinde 7 gün boyunca kültür edilen ASC’lerin hücre iskeletinde bulunan aktin filamentleri ile hücre çekirdeğinin immüno Floresan

boyamaları sonrası konfokal mikroskopu ile alınmış görüntüleri Şekil 4.5'te verilmiştir. Kolajen/PLGA membranların üzerine ekilen hücrelerin 7 gün sonunda membranları oluşturan fiberler üzerinde uniform biçimde yayılarak çoğaldıkları ve iğ benzeri (“spindle-like”) morfolojiye sahip oldukları gözlemlenmiştir [171]. Kolajen içeriğinin artmasının hücre büyüme ve morfolojisinde belirgin bir etki göstermediği de tespit edilmiştir.

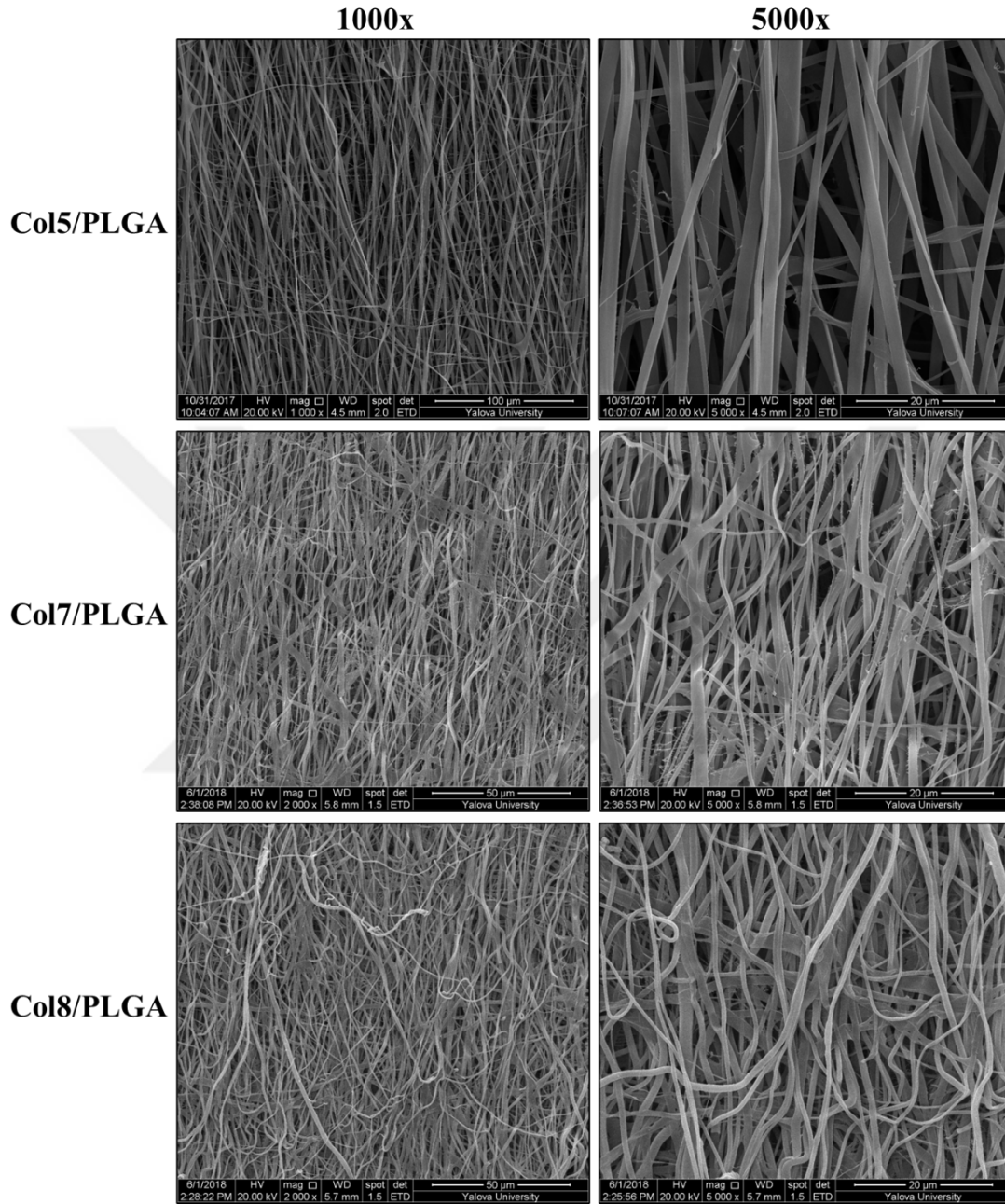


Şekil 4.5 Yönlenmemiş nanofiber membranlar üzerine kültür edilmiş ASC’lerin 7. gün konfokal mikroskopu görüntüleri A) Col50/PLGA B) Col70/PLGA(kırmızı:hücre iskeleti(phalloidin), mavi:çekirdek(DAPI)).

4.3. Morfolojik Karakterizasyon

İnsan dokularının doğal ECM’si, proteoglikanlar ve glikozaminoglikanlardan oluşan hidratlı amorf gel benzeri bir yapı içerisine gömülmüş kolajen, elastin, fibronektin, laminin gibi fibriler proteinlerden oluşan karmaşık bir mimariye sahiptir [172]. Dokuların yenilenmesi, hücreler ve ECM’leri arasındaki etkileşim ile doğrudan ilişkilidir. ECM, hücrelere fiziki bir destek sağlamanın yanı sıra canlılık, çoğalma, polarite, farklılaşma, yapışma ve göç etme de dahil olmak üzere birçok hücre davranışında rol alır [173]. Dolayısıyla, hücresel davranışı kontrol etmek için doğal ECM’in fibriler ve gözenekli yapısını taklit etmek en iyi yaklaşımlardan biridir. Elektroğirme yöntemi, birçok malzemeye kolay uygulanabilirliği ve ucuz olması nedeniyle doğal ECMin yapay benzerlerini üretmek ve özellikle fibriler mimarisini oluşturmak için kullanılan teknolojilerden en popüler olanıdır [174]. Bu tez kapsamında da kolajen ve PLGA polimerleri kullanılarak bir katmanı elektroğirme

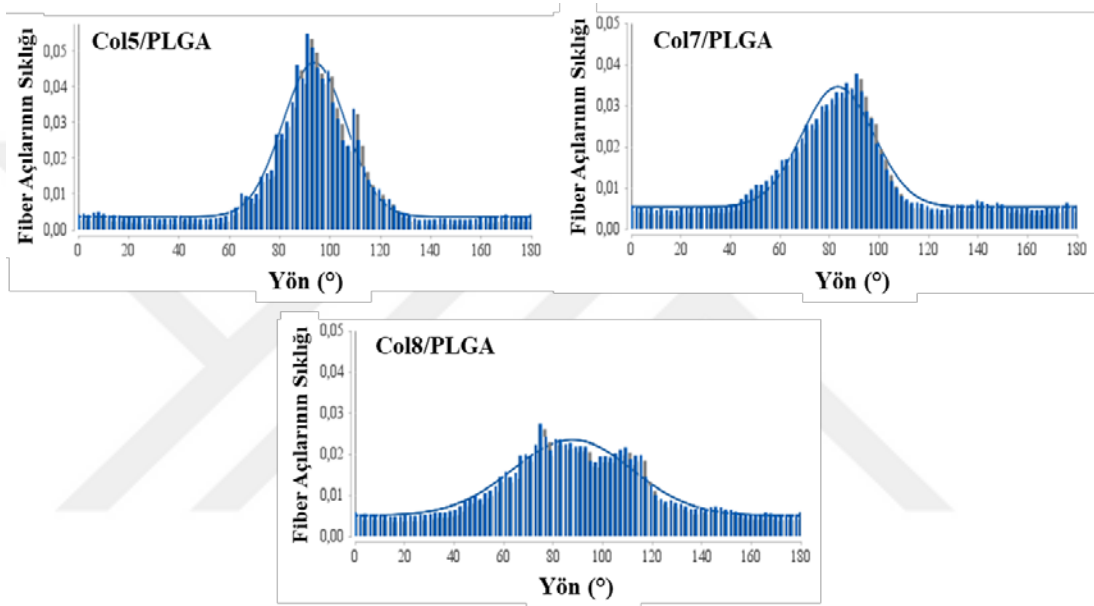
diğer katmanı plastik sıkıştırma tekniği ile üretilen yeni tasarlanmış iki katmanlı membranlar elde edilmiştir.



Şekil 4.6 Farklı kolajen/PLGA oranlarındaki çözeltilerden üretilen nanofibröz üst katmanların SEM görüntüleri

Elektroeğirme tekniği ile hazırlanan nanofibröz üst katmanın morfolojik özellikleri ve fiber yapılarına ait SEM görüntüleri Şekil 4.6'da verilmiştir. Membranların nanofibröz üst katmanlarının içerdiği farklı kolajen/PLGA oranlarının, fiberlerin oryantasyonu ve çapını etkilediği görülmüştür. Buna göre, Col5/PLGA, Col7/PLGA ve Col8/PLGA membranları için nanofiberlerin ortalama çapları sırasıyla 150-560

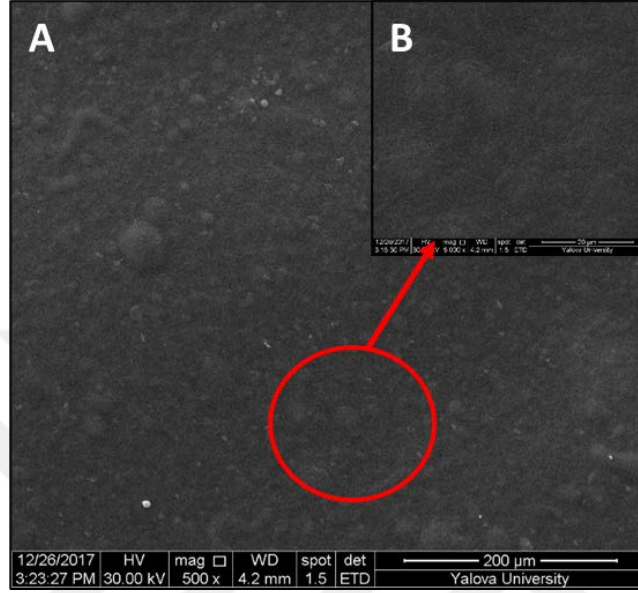
nm, 250-610 nm ve 400-720 nm arasında ölçülmüştür. Ayrıca, Col5/PLGA membranını oluşturan nanofiberlerin, Col7/PLGA ve Col8/PLGA membranlarındakiler ile karşılaştırıldığında daha iyi oryantasyon sergilediği gözlemlenmiştir. SEM görüntüleri üzerinde yapılan ve Şekil 4.7’de verilen orantasyon analizi sonuçları, Col5/PLGA, Col7/PLGA ve Col8/PLGA fiberleri için sırasıyla 80°-100°, 60°-110° ve 50°-120° arasında tercihli bir eksenel hizalanmayı doğrulamıştır. Bu bilgiler ışığında fiber çaplarının dağılımının ve oryantasyonunun, polimer çözeltisi içindeki kolajen oranı ile ilişkili olduğu söylenebilir.



Şekil 4.7 Col5/PLGA, Col7/PLGA ve Col8/PLGA nanofibröz membranlarına ait yönlenme histogramları.

Sabit çözelti konsantrasyonunda kolajen oranındaki artışın çözeltinin iletkenliğini ve viskoelastik özelliklerini etkilenmesi, iki polimer arasındaki etkileşimin değişmesine ve dolayısıyla daha büyük çaplı nanofiberlerin oluşmasına sebep olmuştur. Literatürde yer alan çalışmalarda da daha yüksek kolajen konsantrasyonuna sahip polimer çözeltilerinin, yüksek düzeyde yönlenmiş fiber morfolojisi elde etmek için çok uygun olmadığı rapor edilmiştir [175]. Bunun yanı sıra yapılan çalışmalarda nanofibröz matrislerin kalınlığı fiberlerin yönelimi ile ters orantılı olduğu gösterilmiştir [176, 177]. Bu durum membranın kalınlaşması ile membran üzerinde biriken kalıntı yüklerin elektriksel alanının bozulmasına yol açması ve buna bağlı olarak fiber yönlenmesinin derecesini azaltması ile açıklanmıştır. Fiber yönlenmesinin nöronal uzama, aksonal büyüme ve yönelim üzerinde etkili olduğu

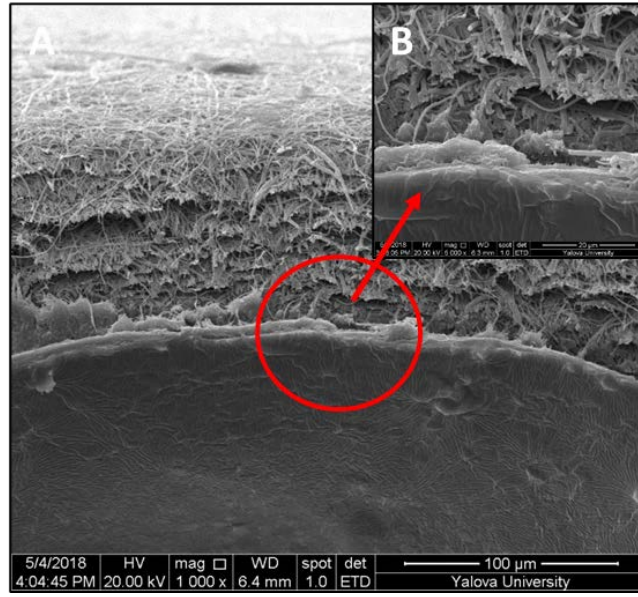
birçok çalışmada sunulmuştur [153, 178]. Yönlenmeye ek olarak membranların geniş yüzey alanı-hacim oranları, hücre-yüzey etkileşimlerini artırarak hücrelerin her yöne çoğalarak büyümesi için daha fazla alan sağlar [179]. Bu nedenle, ECM'yi taklit edebilecek yönlenmiş nanofiber matrisleri üretmek için bütün bu avantajlara sahip elektroğirme tekniği uygun bir seçim olarak değerlendirilir.



Şekil 4.8 Kolajen alt katmanın SEM görüntüsü A) 500x B) 5000x.

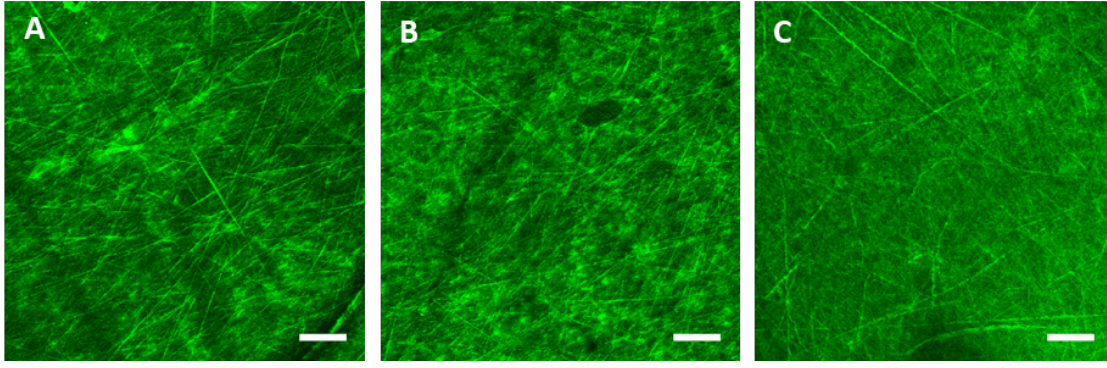
Çift katmanlı membranın biyomolekülleri salım sistemi görevi gören kolajen alt katmanı ise plastik sıkıştırma yöntemi ile hazırlanmış ve Şekil 4.8’de gösterildiği gibi pürüzsüz bir yüzey morfolojisi sergilemiştir. Bu yöntemle kullanılarak, amaçlanan uygulama için kolayca elde edilebilen ve şekillendirilebilen 145 µm kalınlığında kolajen filmler elde etmek mümkün olmuştur.

Elektroğirme prosesi sırasında birleştirilen iki katmana sahip matrikslerin yanal görüntüleri Şekil 4.9’da verilmiştir. Bu görüntülerden katmanlar arası yapışmanın sağlanması için uygulanan yöntemin başarılı olduğu ve iki katman arasında iyi bir entegrasyon olduğu gözlemlenmiştir. Her iki katmanın da kolajen içerikli olması ve asetik asidin kolajen için iyi bir çözücü olması, eser miktardaki seyreltik asetik asit çözeltisinin etkin bir yapıştırıcı olarak kullanılabilmesine olanak sağlamıştır. Bu metot daha önceki çalışmalarımızda da kullanılarak etkinliği kanıtlanan bir yapıştırma yöntemidir [180, 181].



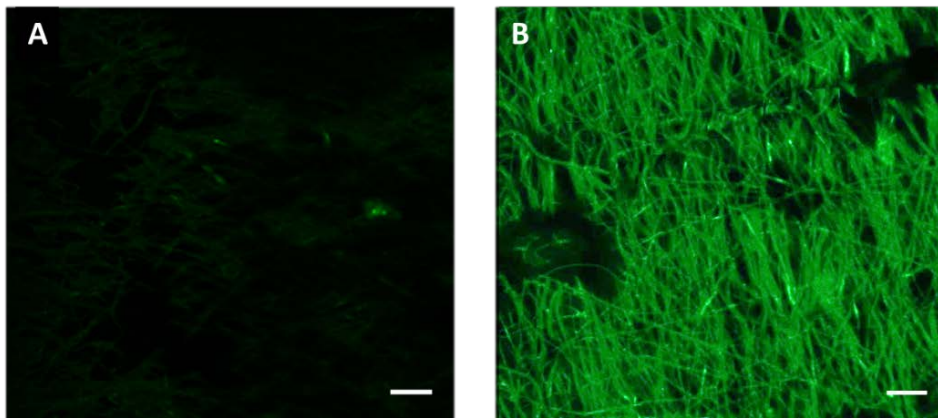
Şekil 4.9 Çift katmanlı membranın yan kesit SEM görüntüsü A) 1000x B) 5000x.

Hücre yapışması, çoğalması ve gelişmesinde etkili olan kolajen ve laminin proteinlerinin nanofibröz üst katmanda homojen dağılması istenilen hücre cevabını alabilmek açısından kritik öneme sahiptir. Bu sebeple belirtilen moleküllerin membranlar üzerindeki dağılımı immünfloresan işaretleme yapılarak belirlenmiştir. İçerdikleri kolajen oranları farklı olduğu için kolajen işaretleme üç farklı membrana yapılırken, laminin miktarı aynı olduğu için laminin işaretleme sadece bir membran üzerinde yapılmıştır. Şekil 4.10'da verilen konfokal mikroskobu görüntüleri nanofibröz üst katman içindeki kolajen dağılımını göstermektedir. Görüntülerden de açıkça anlaşıldığı üzere kolajen, nanofibröz yüzeyin eldesinde kullanılan kolajen/PLGA polimer çözeltisi içerisinde tamamen dağılarak elektroeğirme prosesi sonucunda oluşturulan tüm membranların her bölgesine homojen bir şekilde dağılmıştır. Bu polimerik dağılımın bütün membranlar da homojen olması hem yüzeyin hücre cevabı hem de vücut içerisinde zamanla oluşacak bozunma profili açısından önemlidir. Homojen kolajen dağılımı sayesinde hücrelerin malzeme yüzeyinin tamamında eşit miktarda tutulumu ve yapışmasının sağlanma olasılığı artacaktır. Ayrıca malzeme bozunurken bütün bölgelerinde eşit bozunurluk profili göstereceği için, biyomalzemenin bir görevi olan biyomekanik desteği tüm bölgelerde eşit ve kademeli olarak azalacaktır.



Şekil 4.10 Nanofiber üst katmanlarının tip-I kolajen antikor immün boyama konfokal mikroskobu görüntüleri; A) Col5/PLGA, B) Col7/PLGA, C) Col8/PLGA (Ölçek: 20µm).

Doku iskelesi ile hücre etkileşimlerini arttırmanın bir diğer yolu da üretilen ECM-benzeri yapay matrikslerin biyoaktif moleküller ile yüklenmesi veya modifikasyonudur. Dokuya spesifik seçilen biyomoleküller hücre yapışmasını, çoğalmasını ve farklılaşmasını daha da arttırarak hücrelerin kendi ECM'lerini üreterek dokuyu oluşturmasını hızlandırır [182]. Sinir hücrelerinin gelişimini ve aksonal uzantıların büyümesini teşvik eden bir ECM proteini olan lamininin nanofiberlere dahil edilmesi, biyomimetik bir iskele oluşturmak ve sinir dokusunun biyokimyasal özelliklerini taklit etmek için alternatif ve popüler bir yöntemdir [183, 184]. Bu tez kapsamında da axonal büyümesin desteklenmesi amacı ile laminin kullanılmıştır. Proses öncesi Col5/PLGA çözeltisine eklenen lamininin elektroegirme sonrası membran içerisindeki dağılımı Şekil 4.11'de görülmektedir. Alınan konfokal görüntüsünden laminin moleküllerinin de nanofibröz membran içerisinde etkin şekilde dağıldığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.11 Col5/PLGA nanofiber üst katmanın laminin antikorla immün boyama konfokal mikroskobu görüntüleri; A) kontrol, B) laminin içeren örnek (Ölçek: 20µm).

4.4. Mekanik Özellikler

Özel bir fonksiyona sahip ve belirli bir amaç için tasarlanan ve üretilen doku iskeleleri cerrahi prosedür sırasında uygulanabilecek gerilme ve yükleri kaldırabilecek dayanıma sahip olmalı ve *in vivo* rejenerasyon sürecinde de hasarlı dokuya ve hücrelere mekanik anlamda destek olarak fiziksel stabilitesini iyileşme süresi boyunca korumalıdır [185]. Bu nedenle tez kapsamında geliştirilen doku iskelelerinin mekanik mukavemetlerini belirlemek amacıyla hem kuru hem de ıslak halde çekme testi uygulanmıştır. Çift katmanlı matrislerin çekme testi sonucu elastik modülleri ve uzama yüzdeleri Tablo 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4.2 Çift katmanlı matrikslerin kuru ve ıslak haldeki mekanik özellikleri (Ort±SS, n=6).

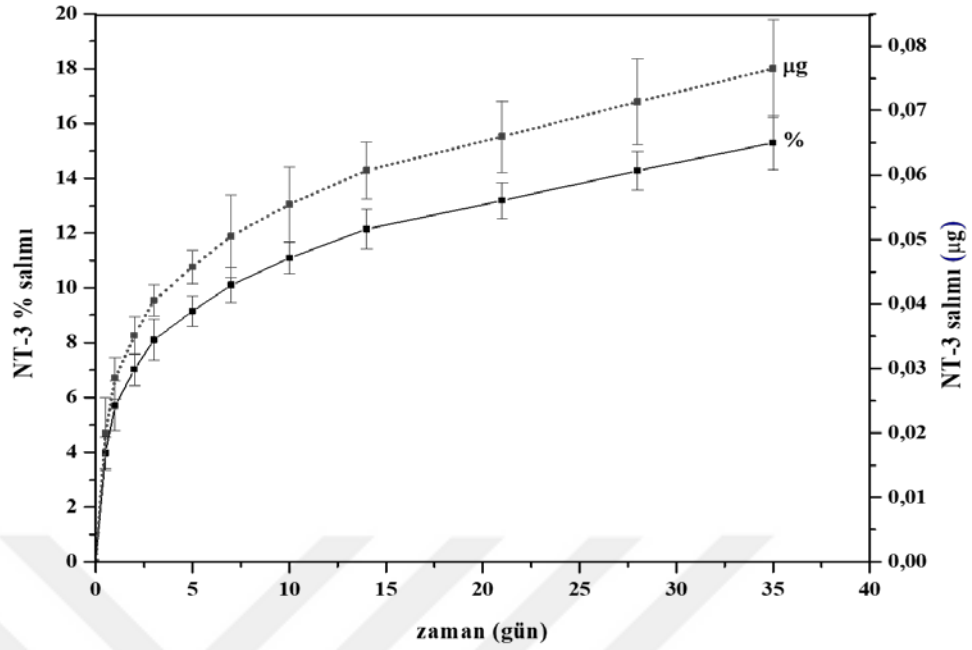
Örnek	Durum	Elastik Modül (MPa)	Uzama (%)
Col5/PLGA	Kuru	219.5±88.6	20.1±1.4
Col7/PLGA	Kuru	43.3±17.3	32.9±11.2
Col8/PLGA	Kuru	28.6±3.9	34.5±5.1
Col5/PLGA	Islak	21.1±5.7	70.6±7.1
Col7/PLGA	Islak	2.2±0.06	61.2±5.7
Col8/PLGA	Islak	0.87±0.2	66.4±16.7

Çift katmanlı matrikslerin kuru hallerine göre ıslak halde elastik modüllerinde büyük bir düşüş gözlenmiştir. Örneklerin kuru ve ıslak haldeki uzamaları karşılaştırıldığında ise ıslak haldeki matrikslerin uzama miktarlarında artış meydana geldiği tespit edilmiştir. Kuru hallerinde nispeten sert bir yapıya sahip olan matriksler ıslatıldıkları zaman kolajen alt katmanın hızlı ve yüksek su tutma özelliği nedeniyle yapıda yumuşamaya sebep olmaktadır. Bu durum elastik modülün düşmesine, buna bağlı olarak da uzamanın artmasına sebep olur. Tüm çift katmanlı matrisler kendi aralarında karşılaştırıldığında ise, Col5/PLGA üst tabakalı çift katmanlı matristeki düşük kolajen kütle oranı daha yüksek elastik modülüs sergilemiştir. Elastik modüldeki bu artış kolajenin zayıf fiziksel özelliklerinden dolayı mekanik mukavemette azalmaya neden olduğunu göstermiştir. Ayrıca bu sonuçlara üst katmandaki nanofiberlerin yönlendirilmesinin de etkisi büyüktür.

Col5/PLGA üst tabakalı çift katmanlı matris içindeki daha yüksek PLGA içeriği ile SEM analizi görüntülerinde verilen nanofiberlerdeki yönlenmesinde mekanik mukavemete katkı sağladığı düşünülmektedir. Matrislerin üst katmanlarındaki fiberlerin düzenli ve yönlenmiş yapıları arttıkça tüm yapının mekanik özelliklerinde bir iyileşmeye yol açtığı görülmüştür.

4.5. Büyüme Faktörü *in-vitro* Salım Analizi

Doku mühendisliği yaklaşımının üç temel bileşeninden biri olan biyosinyal molekülleri ve büyüme faktörleri, hasar görmüş dokuların onarılmasında ve yenilenmesinde önemli görevler üstlenirler. Bu bağlamda tez kapsamında geliştirilen çift katmanlı doku iskelesinin alt katmanı olan kolajen film tabakasına, sinir dokusunda oluşan hasarın giderilmesinde etkili olduğu literatürde yer alan çalışmalarda gösterilen NT-3 ve ChABC molekülleri yüklenerek *in vivo* rejenerasyon sırasında moleküllerin hasarlı bölgeye salınması ve iyileşme sürecini indüklemeleri planlanmıştır. Hazırlanan matrislere yüklenmiş olan NT-3 molekülünün salım profili zamana karşı μg olarak miktarı ve salım yüzdesi olarak Şekil 4.12’de yer alan grafikte verilmiştir. Salımın 35. gününde yapılan analiz sonucu NT-3’ün toplam miktarın %15’ine karşılık gelen yaklaşık $0.075 \mu\text{g}$ ’nın ortama salındığı görülmüştür. Bu bulgular yapılan başka çalışmalarda bildirilen sonuçlarla uyumludur [161]. NT-3 de dahil olmak üzere nörotrofin familyasındaki proteinler zamanla kümeleşme eğilimi gösterir ve birikirler. Bu durum difüzyon hızının azalmasına ve düşük protein salımına sebep gösterilebilir [186, 187].

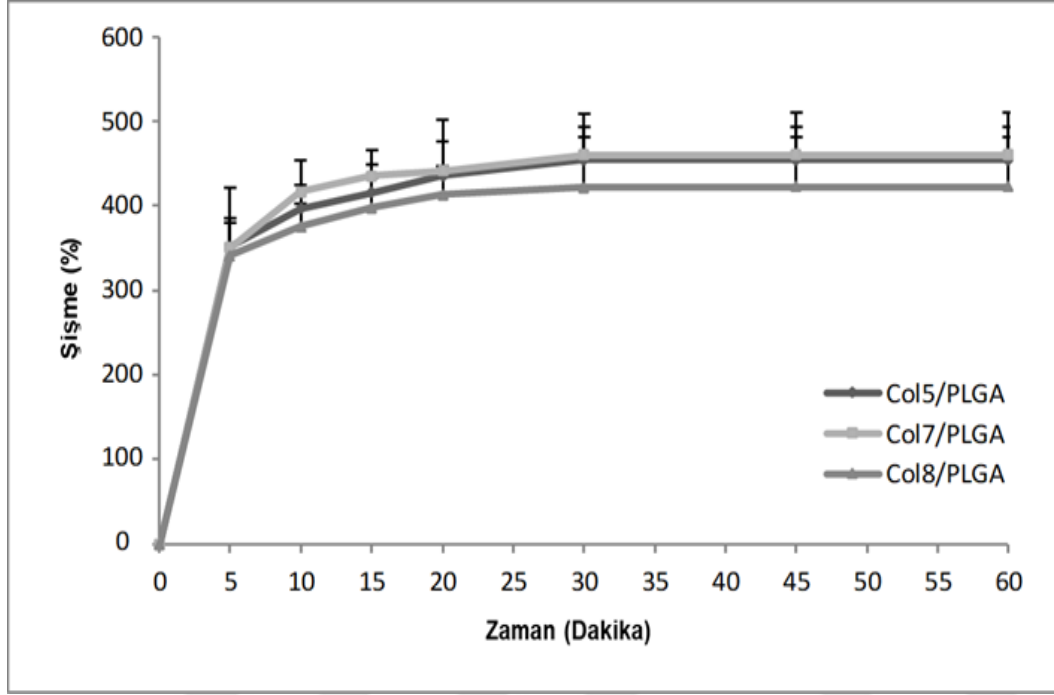


Şekil 4.12 NT-3 içeren kolajen membranların PBS (pH=7.4) çözeltisi içerisinde 37°C'de *in vitro* salım grafiği (n=4).

4.6. Su Tutma Analizi

Malzemelerin su tutma kapasitesi, malzemenin sulu ortamdan suyu ne kadar absorblayabildiği yani doğrudan hidrofilisitesi ile ilişkilidir. Gözenekli bir malzeme söz konusu ise malzemenin gözenek yapısının yanı sıra yüzeyinde bulunan su miktarı da önemlidir. Dolayısıyla, yüzey ıslatılabilirliği malzemenin su tutma kapasitesi ile doğru orantılıdır [188]. Yüzey ıslatılabilirliği protein adsorpsiyonunu, trombosit yapışmasını/aktivasyonunu, kan pıhtılaşmasını ve hücre ve bakteriyel yapışmayı etkileyen önemli bir biyomalzeme özelliğidir [189]. Tez kapsamında elde edilen çift katmanlı matrislerin su tutma kapasiteleri, şişme testi ile analiz edilmiştir. Şekil 4.13'te verilen grafikteki değerler incelendiğinde farklı matrislerin su tutma kapasiteleri arasında belirgin bir değişim olmadığı görülmektedir. Oda sıcaklığında PBS içerisine daldırılıp yüzey suları filtre kâğıdı ile alınan örneklerin belli zaman aralıklarında yapılan ölçümlerinde ilk beş dakika içerisinde çift katmanlı matrislerin tutabilecekleri maksimum suyu absorbe ettikleri, ilk beş dakika sonrası yapılan ölçümlerde çok büyük bir değişim gözlenmediği belirlenmiştir. Kolajenin hidrofilik yapısı ve PLGA'nın göreceli hidrofobik olduğu düşünülürse, matrislerde asıl su tutan

bileşenin kolajen alt katman olma olasılığı yüksektir. Membranların hepsinin aynı alt katman yapısına sahip olduğu göz önüne alındığında farklı membranlar arası su tutma kapasitelerinde çok büyük bir değişim olmaması beklenen bir durumdur [190, 191].

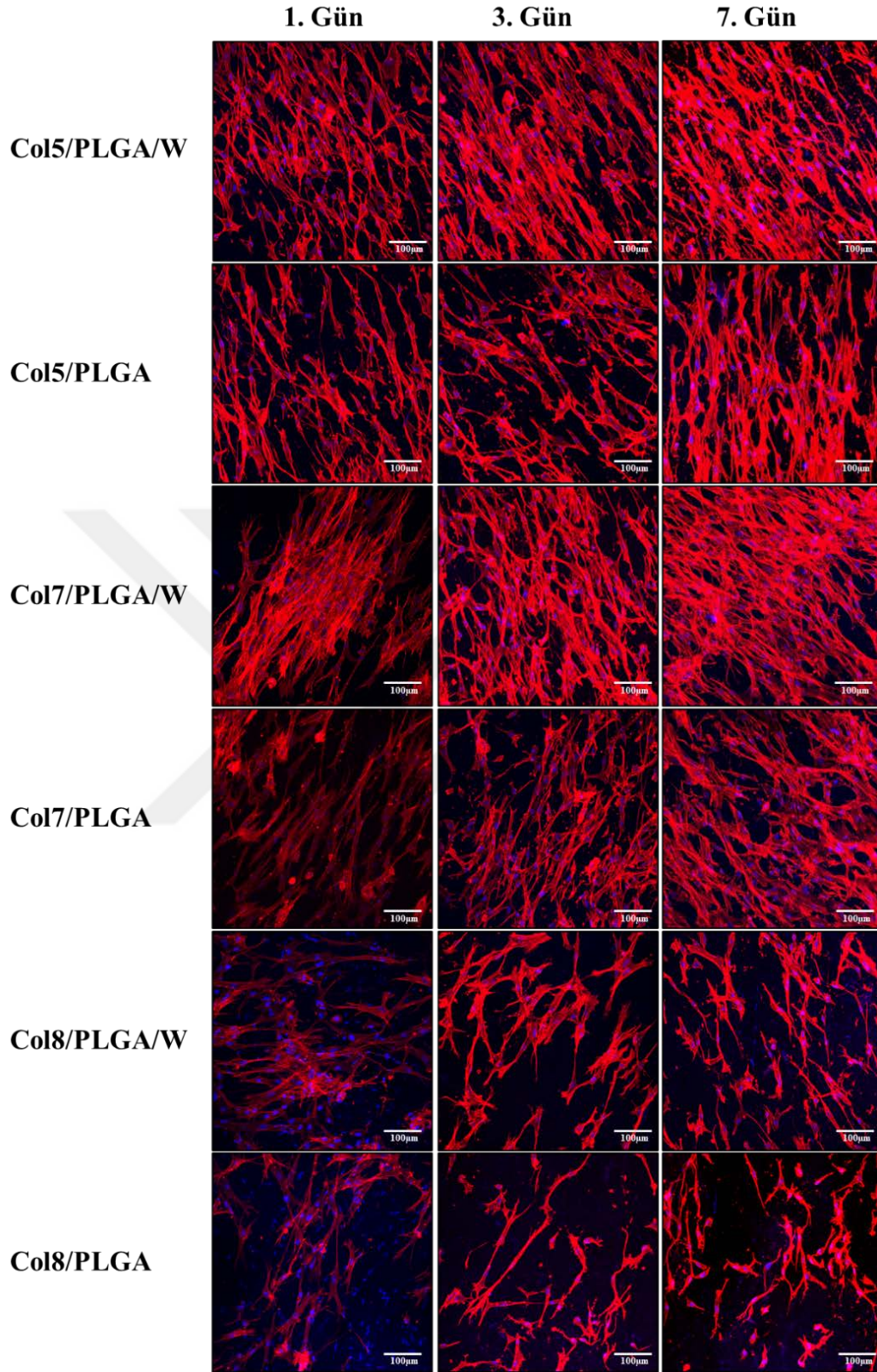


Şekil 4.13 Çift katmanlı doku iskelelerinin su tutma kapasitesi (n=6).

4.7.Çift Katmanlı Matrislerin ASCs ile Etkileşimi

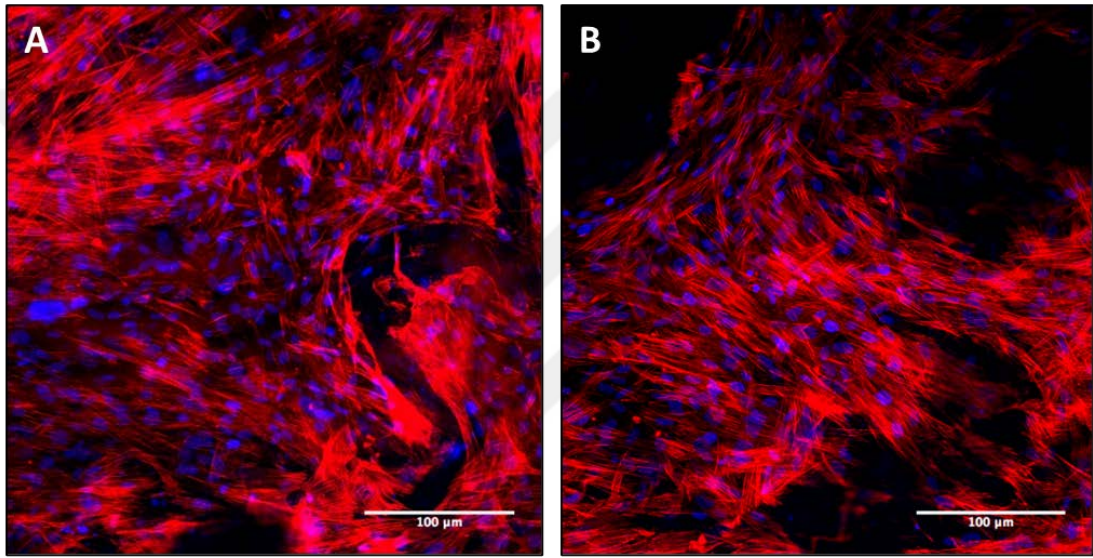
Tez kapsamında tasarlanan ve nihai biçimde üretilen çift katmanlı matrislerin hücreler üzerindeki potansiyelinin test edilmesi için, ASC'ler matrislerin nanofiber yüzeylerinde ekilerek 7 gün boyunca kültür edilmişlerdir. Literatürde daha önce yapılan çalışmalarda, bu hücrelerin kullanımına bağlı olarak omurilik hasarlarının tedavisinde farklı hayvan modellerinde önemli motor ve histolojik kazanımlar elde edildiği rapor edilmiştir [192, 193]. Nanofibröz üst katmanı, hücrelerin ekim yapılacak yüzeyi olarak işlev görmesine rağmen, ASC'ler, tüm yapının biyouyumluluğunu değerlendirmek amacıyla membranların her iki katmanına da ekilmiştir. Önceden belirlenmiş zaman noktalarında hücre iskeleti düzenlemesini görselleştirmek için aktin filamentleri phalloidin/DAPI ile boyanmış ve konfokal mikroskopu ile alınan görüntüleri Şekil 4.14'te verilmiştir. Membranların yönlendirilmiş nanofiber tabakaları üzerindeki ASC'lerin, fiber doğrultusu boyunca yönlendirilerek mezenkimal kök hücrelere ait “spindle” formlarını korudukları gözlenmiştir.

Nanofiber katmanlara yapılan yönlülük analizi sonuçları ile hücrelerin yapışma ve gelişme doğrultuları birbiri ile uyuşmaktadır. Yapılan yönlülük analizi sonucu örnekler arasında fiberleri en iyi yönlenmiş olan Col5/PLGA nanofiber üst katman üzerine ekilen hücrelerin diğer örnekler üzerine ekilen hücrelerle karşılaştırıldığında fiberler doğrultusunda daha iyi bir yönelim sağladıklarını gözlemlenmiştir. Fakat, Col8/PLGA'nın hücre kültür ortamında uzun süre kaldıktan sonra fiziksel formunu koruyamaması sebebiyle üzerinde kültürlen hücrelerin, membrandaki biyomoleküllerin varlığında bile iyi bir hücresel morfoloji sergileyemediği tespit edilmiştir. Buna neden olarak nanofibröz tabaka içindeki kolajen oranının diğer membranlar ile karşılaştırıldığında daha yüksek olması ve membranın gerekli fiziksel dayanımı gösterecek kadar sert olmaması gösterilebilir [194].



Şekil 4.14 Farklı polimer konsantrasyonlarına sahip çift katmanlı membranlar üzerine kültür edilmiş ASC'lerin immünfloresan boyamalarına ait konfokal mikroskopi görüntüleri (kırmızı:hücre iskeleti(phalloidin), mavi:çekirdek(DAPI)).

Şekil 4.15'te pürüzsüz kolajen alt katman üzerine ekilen hücrelerin 7.gün sonundaki morfolojileri görülmektedir. Hücrelerin tipik “spindle-like” morfoloji sergiledikleri ancak yüzeyde herhangi bir yönelim göstermeden yayıldıkları gözlemlenmiştir. SEM görüntülerinde de verildiği üzere bu katmanın yapısında hücreleri yönlendirecek herhangi bir paternin olmaması hücrelerin düzensiz şekilde büyüyüp çoğalmasının temel sebebidir. Ayrıca, kolajen alt katmanın NT-3 ve ChABC içeriğine bakılmaksızın, her iki membran üzerinde de hücreler tutunarak ve hayatta kalabilmiştir. Bu da ECM'in temel proteini olan kolajenin hücre tutunması ve gelişimindeki etkisini açıkça göstermiştir.

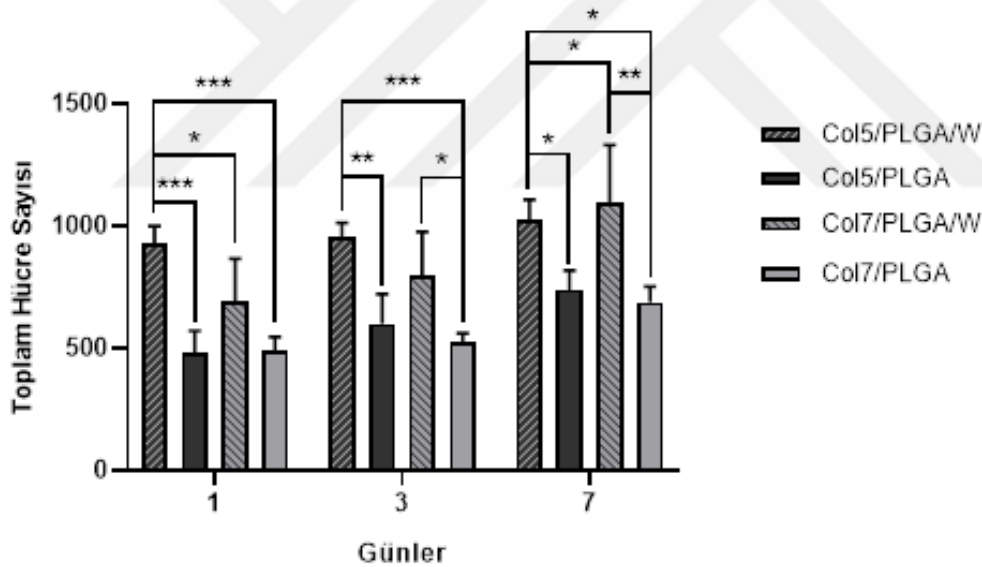


Şekil 4.15 Kolajen alt katman üzerine kültür edilmiş ASC'lerin immünfloresan boyamalarına ait konfokal mikroskopu görüntüleri A) biyomolekül içeren örnek B) biyomolekül içermeyen örnek (kırmızı:hücre iskeleti(phalloidin), mavi:çekirdek(DAPI)).

Matrikslerin ve salınan biyomoleküllerin ASC'lerin yapışması ve büyümesi üzerindeki etkisini nicel olarak değerlendirmek için, matriks/hücre komplekslerinin konfokal görüntüleri üzerinden ImageJ programının CounterJ eklentisi yardımı ile hücre sayımı ve ayrıca MTS hücre canlılık analizleri yapılmıştır. Şekil 4.16'da sunulduğu üzere laminin/NT-3/ChABC biyomoleküllerini içeren matrisler üzerindeki hücre yoğunlukları, membranların kolajen içeriğinden bağımsız olarak, biyomolekül içermeyen örneklerden daha yüksektir. Canlı hücrelerin sayısı, matrislerin kolajen içeriğinden önemli ölçüde etkilenmeden kültür süresi boyunca tüm örnekler için kademeli olarak artmıştır. Biyomolekül içeren kolajen alt katman her iki membran için aynı olmasına rağmen, kültür süresine bağlı olarak sayılan canlı hücre sayısı

arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark mevcuttur. Daha az kolajen içeriğine sahip Col5/PLGA/W örneği 1. günde hücre sayısı daha yüksekken, 3. günde Col5/PLGA/W ile Col7/PLGA/W arasında önemli bir fark bulunmamaktadır. Fakat 7 günlük kültür sonunda hücre canlılığı ters yöne dönmüş ve hücre sayıları yüksek kolajen içeren Col7/PLGA/W örneğinde daha yüksek ölçülmüştür. Yapılan analiz, Col7/PLGA/W membranlarına ekilen ASC'lerin 7 gün sonunda Col5/PLGA/W'dekinden daha iyi çoğalabildiğini göstermiştir. Bu fark, artan süre içerisinde kolajen/PLGA matrisindeki yüksek kolajen içeriği sebebiyle laminin salımının daha kolay olacağına ve böylelikle yüksek laminin konsantrasyonunun hücreler üzerindeki olumlu etkisine atfedilebilir.

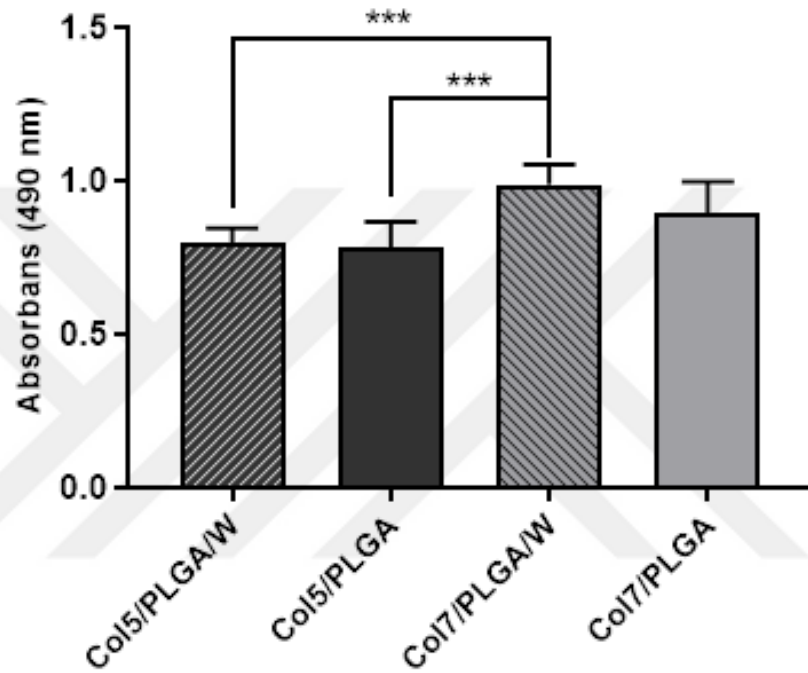
Daha önce de bahsedildiği üzere yapısal deformasyon ve şekil bozuklukları nedeniyle Col8/PLGA matrislerinde kültürlenen hücreleri saymak mümkün olamamıştır.



Şekil 4.16 Farklı günlerde farklı membranlar üzerine tutunmuş ve ImageJ analiz programı ile belirlenmiş ASC sayıları (n=4).

Hücre sayımının yanı sıra hücrelerin canlılıklarının belirlenmesi için 7 günlük kültür sonunda hücrelerin metabolik aktiviteleri ölçülmüştür. Şekil 4.17’de farklı matrisler üzerine ekilen hücrelerin metabolik aktivitelerini gösteren absorbans değerleri grafiği verilmiştir. Col8/PLGA örneğine ait absorbans ölçüleri verilerin yetersiz olması ve destekleyecek hücre sayım analizinin olmaması sebebiyle sunulmamıştır. Diğer örneklerin absorbans değerleri incelendiğinde hücrelerin bütün membranlar üzerinde

metabolik aktivitelerini devam ettirdikleri tespit edilmiş, dolayısıyla membranların hücreler için uygun birer matriks olduğu sonucuna varılmıştır. Col5/PLGA ve Col7/PLGA örnekleri karşılaştırıldığında biyomolekül içeriklerine bakılmaksızın hücrelerin ekili olduğu nanofibröz katmanda kolajen oranı fazla olan Col7/PLGA örneklerinin daha yüksek metabolik aktivite gösterdikleri görülmüştür. 7 günlük kültür sonunda sayılan hücre sayılarının sonuçları ile MTS testinin sonuçları da birbirini destekler niteliktedir.

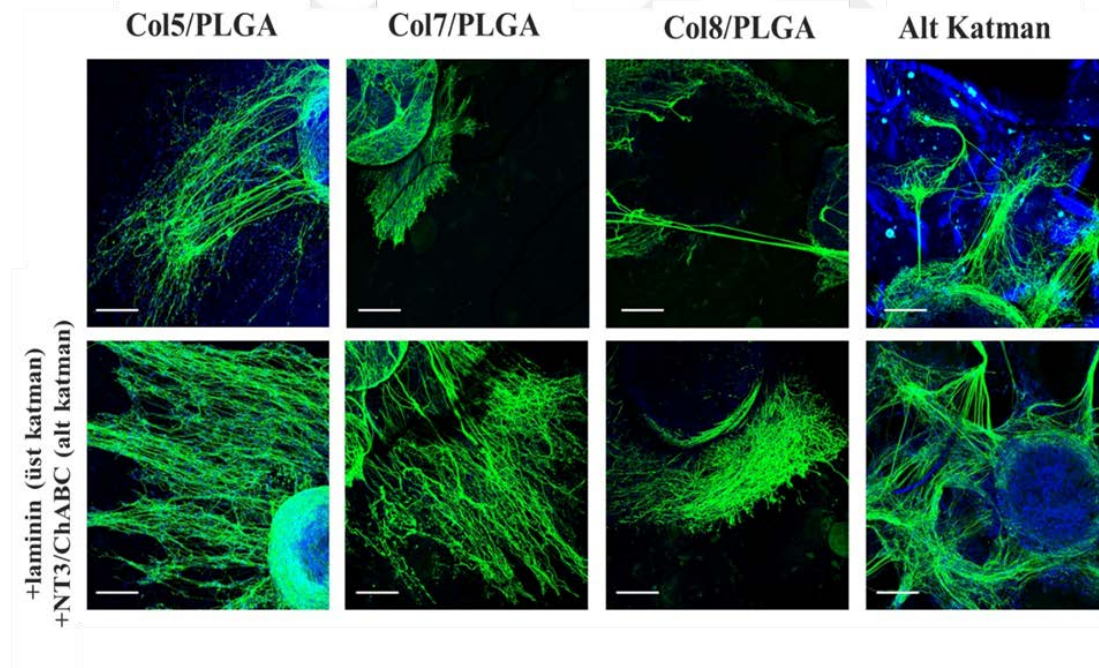


Şekil 4.17 ASC'lerin farklı membranlar üzerinde metabolik aktivitelerinin incelenmesi, MTS absorbans sonuçları (n=4).

4.8. Aksonal Büyümenin İncelenmesi

Çift katmanlı matrislerin hem nanofiber üst katmanları hem de kolajen alt katmanı üzerine kültür edilmiş DRG'lerin konfokal mikroskopu ile çekilmiş görüntüleri Şekil 4.18'de verilmiştir. DRG'den çıkan aksonal uzantıların fiberler doğrultusunda yönlendirilerek büyüdüğü ve geliştiği açıkça görülebilmektedir. Ayrıca biyosinyal moleküllü içeren ve içermeyen örnekler karşılaştırıldığında biyomoleküllerin aksonal gelişime, çoğalmaya ve dallanmaya olan etkisini gözlemlemek mümkündür. Yapılan farklı çalışmalarda da lamininin hücre yaşamasını, göçünü artırdığı, aksonal uzantıların büyümesini sağlarken sinaps oluşumunu teşvik ederek sinirsel gelişimi desteklediği bilinmektedir [79, 195]. DRG'ler bulundukları bölge itibari ile merkezi

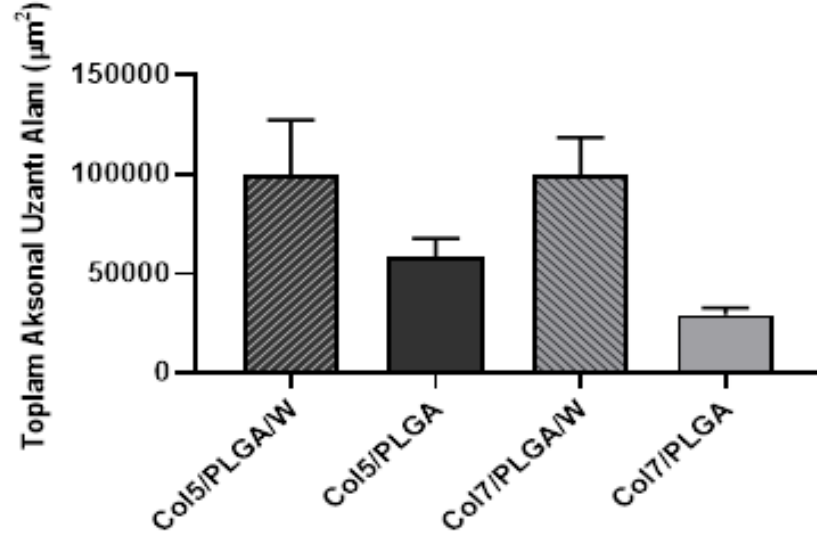
sinir sistemi yani omuriliği çevresel sinir sistemine bağladıkları için pseudounipolar yapıdadır yani birbirinin zıt yönlerinde iki adet aksonal uzantıya sahiptirler [196]. Şekil 4.18’de verilen konfokal görüntülerinde, nanofiber membranların üzerinde gelişen DRG’lerin bu özelliklerini devam ettirirken kolajen alt katman üzerinde gelişen DRG’lerin ikiden fazla sayıda ve farklı yönlerde dallandığı görülmektedir. NT3 içeren kolajen alt katmanlar üzerine kültür edilmiş DRG’lerin aksonal uzantıları miktar olarak laminin içeren örnek üzerindeki DRG’nin uzantılarından azdır. Fakat aksonal uzantıların uzunlukları karşılaştırıldığında NT-3 içeren alt katman üzerinde büyüyen DRG’lerin aksonal uzantılarının çok daha uzun olduğu görülmüştür. NT-3’ün motor nöron canlılığı ve büyümesini ve duysal akson büyümesini desteklediği, periferik sinirlerin ve omuriliğin yenilenmesine hayati bir rol oynadığı bilinmektedir [98, 104, 116-118] . Aynı zamanda, duysal aksonların, MSS-ÇSS bağlantı bölgesi boyunca ve omurilikte dorsal kök gangliyonlarından gelişmeleri için teşvik ettiği de daha önceden yapılan çalışmalarla belirlenmiştir [118].



Şekil 4.18 Çift katmanlı farklı membranlar üzerinde kültür edilmiş DRG’lerin nörofilament boyamasına ait konfokal mikroskop görüntüleri (yeşil: nörofilament, mavi; çekirdek).

Aksonal büyümenin değerlendirilmesi için yapılan bütün deneyler 4 tekrar olacak şekilde yapılmış ve daha sonra aksonların kapladıkları toplam alan (μm^2) ImageJ programı ile ölçülmüştür. Col8/PLGA örneğini içerdiği yüksek kolajen nedeniyle yapısal stabilitesini koruyamadığı ve ıslanan membranda katlanma kıvrımlar

oluştugu için DRG örneklerinden sadece 1 tanesi tutunabilmiş ve bu da aksonal alanın hesaplanması için yeterli olmamıştır. Şekil 4.19'da verilen grafikte görüldüğü üzere biyomolekül içeren çift katmanlı matriksler aksonal büyümeyi indükleyerek ve daha fazla aksonal uzantı alanına sahiptirler. Bu durum biyomoleküllerin aksonal büyüme üzerindeki pozitif etkisini bir kez daha göstermektedir.



Şekil 4.19 Çift katmanlı farklı membranlar üzerinde kültür edilmiş DRG'lerin aksonal uzatılarının membranlar üzerinde kapladıkları alan (µm²) (n=4).



5. SONUÇ

Sunulan tezde, kaza ve spor yaralanmaları gibi çeşitli sebepler sonucu oluşan omurilik hasarlarının tedavisinde kullanılmak üzere çift katmanlı farklı etki gösteren biyomoleküller yüklü 3 boyutlu matrikslerin tasarımı ve üretimi gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen matriksleri oluşturan iki katmandan nanofiber üst katman hücreleri destekleyici ve aksonal uzama/yönlenmeyi indükleyici bir yapı görevi görürken, kolajen alt katman ise içerisinde bulunan biyomoleküllerin salımı ile hücreSEL büyüme ve gelişmeyi artırıcı ayrıca glial skar oluşumunu engelleyici bir salım sistemi oluşturacak şekilde üretilmiştir. Membranların hazırlanmasında doğal hücre dışı matriksin temel bileşenlerinden olan kolajen ile biyobozunur ve biyoyumlu sentetik PLGA tercih edilmiştir. Kullanılan kolajen sıçan kuyruklarından izole edilmiş ve FT-IR spektrumunda karakteristik C = O gerilme yani Amid I bandı, N-H bükülme titreşimi olarak tanımlanan Amid II bandı ve N-H bükülme titreşimi olan Amid III bantları gözlemlenmiştir. İzole edilen kolajenin SDS-PAGE analizinde tip I kolajene ait 130 kDa ve üzerinde görülen bantların ticari örneğin değerleri ile uyumlu olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar izole edilen kolajenin Tip-I kolajen olduğunu doğrulamıştır.

Hazırlanan membranların SEM görüntüleri ve yönlenme grafikleri, fiberlerinin damlacıksız olarak elde edildiğini ve belirli bir yönlenmeye sahip olduklarını göstermiştir. Kolajen ve PLGA oranlarına göre fiberlerin çapları ve yönlenme dereceleri değişmiş, bütün membranlar karşılaştırıldığında düşük kolajen yüksek PLGA içeren Col5/PLGA nanofibröz membranı en düşük fiber çapına ve en yüksek fiber yönlenmesine sahip olmuştur. Oluşturulan nihai çift katmanlı membranların yanal görüntüleri incelendiğinde ise iki katmanın birbiri arasındaki entegrasyonunun yüksek olduğu gözlemlenmiştir.

Üretilen 3 boyutlu çift katmanlı membranların biyomekanik özellikleri çekme testi ile ıslak ve kuru halde karakterize edilmiştir. Elde edilen sonuç ışığında hem nanofiber katmandaki PLGA oranının hem de fiber yönlenmelerinin, her iki koşulda da elastik modülü artırdığı bulunmuştur. Ayrıca, kolajenin hidrofilik özelliği nedeniyle matrikslerin ıslak haldeki uzama değerlerinde kuru membranlara kıyasla bir artış olduğu gözlenmiştir.

Bununla birlikte, membranların su tutma kapasiteleri incelendiğinde bütün membranların su tutma oranlarının hemen hemen aynı oluğu ve maksimum su miktarına aynı zamanlarda ulaştıkları görölmüştür. Buradan bütün membranların kolajen alt tabakasının aynı olması dolayısıyla kolajenin hidrofilik özelliğinden kaynaklandığı sonucu çıkarılmıştır.

Kolajen alt katman içeriğindeki NT-3'nin 35 güne kadar bakılan salım analizinde ise membrana yüklenen toplam miktarının %15'inin zamanla ortama salımının gerçekleştiğı yapılan ELİSA analizi ile belirlenmiştir.

Yapılan *in-vitro* hücre testlerinde, üretilen membranların her iki yüzeyinin de hücre büyümesini desteklediğı ve biyomoleküllerin hücre sayılarını arttırdığı tespit edildi. Ayrıca nanofibröz katmandaki fiber yönlenmelerinin hücrelerin yönlenmesini olumlu yönde etkilediğı görölmüştür. DRG'ler ile yapılan aksonal gelişim çalışmalarında ise, yönlenmiş fiber yapıdaki nanofibröz yüzeyin aksonların yönlenmesinde etkili olduğı ve yine biyomoleküllerin de aksonal gelişimi ve dallanmasını desteklediğı gözlemlenmiştir.

Tüm bu sonuçlardan yola çıkarak, bu tez çalışmasından elde edilen çift katmanlı doku iskelelerinin omurilik hasarlarının tedavisinde ve aksonal rejenerasyonun sağlanmasında kullanılmak üzere sinir doku mühendisliğı alanında potansiyele sahip olduğı düşünülmektedir. Elde edilen sonuçların ileriki çalışmalarda hayvan deneyleri ile de desteklenmesi halinde klinik olarak denenebilir hale gelmesi olasılıklar dahilindedir.

Destekleyen Kişi ve Kurum Bilgisi

Bu tez çalışması, 2546-Portekiz Bilim ve Teknoloji Vakfı İkili İş birliğı Programı kapsamında 215M019 numaralı proje ile ve 2214-A Yurtdışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı kapsamında doktora bursiyeri olarak Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] J. Kiernan, R. Rajakumar, Barr's the human nervous system: an anatomical viewpoint, Lippincott Williams & Wilkins2013.
- [2] S.C. Team, 2017 Spinal Cord Injury Statistics You Ought to Know
06.01.2018. <https://www.spinalcord.com/blog/2017-spinal-cord-injury-statistics-you-ought-to-know>.
- [3] R.Y. Tam, T. Fuehrmann, N. Mitrousis, M.S. Shoichet, Regenerative therapies for central nervous system diseases: a biomaterials approach, Neuropsychopharmacology 39(1) (2014) 169-88.
- [4] G.J. Tortora, B.H. Derrickson, Principles of anatomy and physiology, John Wiley & Sons2018.
- [5] W. Pawlina, M.H. Ross, Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology, Lippincott Williams & Wilkins2018.
- [6] H. Raff, M. Falk-Steinmetz, M. Medhora, K. De Roo, P.J.U. Holt, h.m.j.o.t. Undersea, I. Hyperbaric Medical Society, In Vander's Human Physiology: The Mechanisms of Body Function, 41(4) (2014) 331-5.
- [7] A.J. Vander, J.H. Sherman, D.S. Luciano, Human physiology: the mechanisms of body function, New York, US: McGraw-Hill, 19901998.
- [8] R. van den Brand, J. Heutschi, Q. Barraud, J. DiGiovanna, K. Bartholdi, M. Huerlimann, L. Friedli, I. Vollenweider, E.M. Moraud, S. Duis, N. Dominici, S. Micera, P. Musienko, G. Courtine, Restoring voluntary control of locomotion after paralyzing spinal cord injury, Science 336(6085) (2012) 1182-5.
- [9] E.E. Hower, G.M. Sandes, An Introduction to the Study of the Nervous System, Elsevier2013.
- [10] M.E. Schwab, Repairing the injured spinal cord, Science 295(5557) (2002) 1029-31.
- [11] N.A. Silva, N. Sousa, R.L. Reis, A.J. Salgado, From basics to clinical: a comprehensive review on spinal cord injury, Prog Neurobiol 114 (2014) 25-57.
- [12] M.S. Shoichet, C.C. Tate, M.D. Baumann, M.C. LaPlaca, Strategies for Regeneration and Repair in the Injured Central Nervous System, in: W.M. Reichert (Ed.), Indwelling Neural Implants: Strategies for Contending with the In Vivo Environment, Boca Raton (FL), 2008.
- [13] P.J. Horner, F.H. Gage, Regenerating the damaged central nervous system, Nature 407(6807) (2000) 963-70.

- [14] J.D. Corrigan, A.W. Selassie, J.A.L.J.T.J.o.h.t.r. Orman, The epidemiology of traumatic brain injury, 25(2) (2010) 72-80.
- [15] A.K. Varma, A. Das, G.t. Wallace, J. Barry, A.A. Vertegel, S.K. Ray, N.L. Banik, Spinal cord injury: a review of current therapy, future treatments, and basic science frontiers, *Neurochem Res* 38(5) (2013) 895-905.
- [16] J.W. McDonald, C. Sadowsky, Spinal-cord injury, *Lancet* 359(9304) (2002) 417-25.
- [17] C. Matute, M.V. Sanchez-Gomez, L. Martinez-Millan, R. Miledi, Glutamate receptor-mediated toxicity in optic nerve oligodendrocytes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(16) (1997) 8830-5.
- [18] J.R. Wilson, N. Forgiione, M.G. Fehlings, Emerging therapies for acute traumatic spinal cord injury, *CMAJ* 185(6) (2013) 485-92.
- [19] J.T. Wilcox, D. Cadotte, M.G. Fehlings, Spinal cord clinical trials and the role for bioengineering, *Neurosci Lett* 519(2) (2012) 93-102.
- [20] B.K. Kwon, E. Okon, J. Hillyer, C. Mann, D. Baptiste, L.C. Weaver, M.G. Fehlings, W. Tetzlaff, A systematic review of non-invasive pharmacologic neuroprotective treatments for acute spinal cord injury, *J Neurotrauma* 28(8) (2011) 1545-88.
- [21] C.H. Tator, R. Hashimoto, A. Raich, D. Norvell, M.G. Fehlings, J.S. Harrop, J. Guest, B. Aarabi, R.G. Grossman, Translational potential of preclinical trials of neuroprotection through pharmacotherapy for spinal cord injury, *J Neurosurg-Spine* 17 (2012) 157-229.
- [22] L.L. Jones, M. Oudega, M.B. Bunge, M.H. Tuszynski, Neurotrophic factors, cellular bridges and gene therapy for spinal cord injury, *J Physiol-London* 533(1) (2001) 83-89.
- [23] H. Cheng, K.K. Liao, S.F. Liao, T.Y. Chuang, Y.H. Shih, Spinal cord repair with acidic fibroblast growth factor as a treatment for a patient with chronic paraplegia, *Spine* 29(14) (2004) E284-E288.
- [24] X.M. Lam, E.T. Duenas, J.L. Cleland, Encapsulation and stabilization of nerve growth factor into poly(lactic-co-glycolic) acid microspheres, *J Pharm Sci* 90(9) (2001) 1356-65.
- [25] A.C. Lee, V.M. Yu, J.B. Lowe, 3rd, M.J. Brenner, D.A. Hunter, S.E. Mackinnon, S.E. Sakiyama-Elbert, Controlled release of nerve growth factor enhances sciatic nerve regeneration, *Exp Neurol* 184(1) (2003) 295-303.
- [26] A.J. Mothe, C.H. Tator, Advances in stem cell therapy for spinal cord injury, *J Clin Invest* 122(11) (2012) 3824-34.

- [27] J.F. Talbott, Q. Cao, G.U. Enzmann, R.L. Benton, V. Achim, X.X. Cheng, M.D. Mills, M.S. Rao, S.R. Whittemore, Schwann cell-like differentiation by adult oligodendrocyte precursor cells following engraftment into the demyelinated spinal cord is BMP-dependent, *Glia* 54(3) (2006) 147-59.
- [28] I. Kohama, K.L. Lankford, J. Preiningerova, F.A. White, T.L. Vollmer, J.D. Kocsis, Transplantation of cryopreserved adult human Schwann cells enhances axonal conduction in demyelinated spinal cord, *J Neurosci* 21(3) (2001) 944-50.
- [29] J. Blumenthal, S.I. Cohen-Matsliah, S. Levenberg, Olfactory bulb-derived cells seeded on 3D scaffolds exhibit neurotrophic factor expression and pro-angiogenic properties, *Tissue Eng Part A* 19(19-20) (2013) 2284-91.
- [30] A.B. Spejo, J.L. Carvalho, A.M. Goes, A.L. Oliveira, Neuroprotective effects of mesenchymal stem cells on spinal motoneurons following ventral root axotomy: synapse stability and axonal regeneration, *Neuroscience* 250 (2013) 715-32.
- [31] F. Doetsch, I. Caille, D.A. Lim, J.M. García-Verdugo, A.J.C. Alvarez-Buylla, Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain, *Neuron* 97(6) (1999) 703-716.
- [32] M. Tsintou, K. Dalamagkas, A.M. Seifalian, Advances in regenerative therapies for spinal cord injury: a biomaterials approach, *Neural Regen Res* 10(5) (2015) 726-42.
- [33] J. Guest, F. Benavides, K. Padgett, E. Mendez, D. Tovar, Technical aspects of spinal cord injections for cell transplantation. Clinical and translational considerations, *Brain Res Bull* 84(4-5) (2011) 267-79.
- [34] S.-J. Lee, W. Zhu, N. Castro, L.G. Zhang, Biomaterials and 3D printing techniques for neural tissue regeneration, *Neural Engineering*, Springer 2016, pp. 1-24.
- [35] M.B. Bracken, M.J. Shepard, W.F. Collins, T.R. Holford, W. Young, D.S. Baskin, H.M. Eisenberg, E. Flamm, L. Leo-Summers, J. Maroon, et al., A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal-cord injury. Results of the Second National Acute Spinal Cord Injury Study, *N Engl J Med* 322(20) (1990) 1405-11.
- [36] I.P. Clements, J.M. Munson, R.V. Bellamkonda, *Neuronal Tissue Engineering, Biomaterials science*, Elsevier 2013, pp. 1291-1306.
- [37] R. Langer, J.P. Vacanti, Tissue engineering, *Science* 260(5110) (1993) 920-6.
- [38] M.M. Tunney, S. Patrick, S.P. Gorman, J.R. Nixon, N. Anderson, R.I. Davis, D. Hanna, G. Ramage, Improved detection of infection in hip replacements. A currently underestimated problem, *J Bone Joint Surg Br* 80(4) (1998) 568-72.

- [39] F. Berthiaume, T.J. Maguire, M.L. Yarmush, Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges, *Annu Rev Chem Biomol Eng* 2 (2011) 403-30.
- [40] D.W.J.J.o.B.S. Hutmacher, Polymer Edition, Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues—state of the art and future perspectives, 12(1) (2001) 107-124.
- [41] S. Kubinova, E. Sykova, Biomaterials combined with cell therapy for treatment of spinal cord injury, *Regen Med* 7(2) (2012) 207-24.
- [42] T. Liu, J.D. Houle, J. Xu, B.P. Chan, S.Y. Chew, Nanofibrous collagen nerve conduits for spinal cord repair, *Tissue Eng Part A* 18(9-10) (2012) 1057-66.
- [43] T. Mitra, G. Sailakshmi, A. Gnanamani, A.J.M.R. Mandal, Studies on cross-linking of succinic acid with chitosan/collagen, 16(4) (2013) 755-765.
- [44] G.A. Saracino, D. Cigognini, D. Silva, A. Caprini, F. Gelain, Nanomaterials design and tests for neural tissue engineering, *Chem Soc Rev* 42(1) (2013) 225-62.
- [45] A.K. Schlegel, H. Mohler, F. Busch, A. Mehl, Preclinical and clinical studies of a collagen membrane (Bio-Gide), *Biomaterials* 18(7) (1997) 535-8.
- [46] B. Kundu, R. Rajkhowa, S.C. Kundu, X. Wang, Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations, *Adv Drug Deliv Rev* 65(4) (2013) 457-70.
- [47] R. Muzzarelli, V. Baldassarre, F. Conti, P. Ferrara, G. Biagini, G. Gazzanelli, V. Vasi, Biological activity of chitosan: ultrastructural study, *Biomaterials* 9(3) (1988) 247-52.
- [48] A. Di Martino, M. Sittinger, M.V. Risbud, Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering, *Biomaterials* 26(30) (2005) 5983-90.
- [49] N. Petersen, P. Gatenholm, Bacterial cellulose-based materials and medical devices: current state and perspectives, *Appl Microbiol Biotechnol* 91(5) (2011) 1277-86.
- [50] H. Zahedmanesh, J.N. Mackle, A. Sellborn, K. Drotz, A. Bodin, P. Gatenholm, C. Lally, Bacterial cellulose as a potential vascular graft: Mechanical characterization and constitutive model development, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 97(1) (2011) 105-13.
- [51] K. Kolářová, V. Vosmanská, S. Rimpelová, V.J.C. Švorčík, Effect of plasma treatment on cellulose fiber, 20(2) (2013) 953-961.
- [52] M. Naessens, A. Cerdobbel, W. Soetaert, E.J.J.J.o.C.T. Vandamme, E. Biotechnology: International Research in Process, C. Technology, Leuconostoc dextranucrase and dextran: production, properties and applications, 80(8) (2005) 845-860.

- [53] G. Sun, J.J. Mao, Engineering dextran-based scaffolds for drug delivery and tissue repair, *Nanomedicine (Lond)* 7(11) (2012) 1771-84.
- [54] J. Sun, H. Tan, Alginate-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Applications, *Materials (Basel)* 6(4) (2013) 1285-1309.
- [55] B.P. Toole, Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue, *Nat Rev Cancer* 4(7) (2004) 528-39.
- [56] G.D. Prestwich, Hyaluronic acid-based clinical biomaterials derived for cell and molecule delivery in regenerative medicine, *J Control Release* 155(2) (2011) 193-9.
- [57] J.A. Ramshaw, Y.Y. Peng, V. Glattauer, J.A.J.J.o.M.S.M.i.M. Werkmeister, Collagens as biomaterials, 20(1) (2009) 3.
- [58] M.D. Shoulders, R.T. Raines, Collagen structure and stability, *Annu Rev Biochem* 78 (2009) 929-58.
- [59] M. Chvapil, L. Kronenthal, W. Van Winkle, Jr., Medical and surgical applications of collagen, *Int Rev Connect Tissue Res* 6 (1973) 1-61.
- [60] P. Macpherson, E. Teasdale, S. Dhaker, G. Allerdycce, S. Galbraith, The significance of traumatic haematoma in the region of the basal ganglia, *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 49(1) (1986) 29-34.
- [61] M. Maeda, S. Tani, A. Sano, K. Fujioka, Microstructure and release characteristics of the minipellet, a collagen-based drug delivery system for controlled release of protein drugs, *J Control Release* 62(3) (1999) 313-24.
- [62] R. Parenteau-Bareil, R. Gauvin, F.J.M. Berthod, Collagen-based biomaterials for tissue engineering applications, 3(3) (2010) 1863-1887.
- [63] J.A. Ramshaw, J.A. Werkmeister, V. Glattauer, Collagen-based biomaterials, *Biotechnol Genet Eng Rev* 13 (1996) 335-82.
- [64] W. Colin, R.J.J.o.D.R. Donoff, Nerve regeneration through collagen tubes, 63(7) (1984) 987-993.
- [65] T.W. Hudson, S. Zawko, C. Deister, S. Lundy, C.Y. Hu, K. Lee, C.E. Schmidt, Optimized acellular nerve graft is immunologically tolerated and supports regeneration, *Tissue Eng* 10(11-12) (2004) 1641-51.
- [66] M. Madaghiele, A. Sannino, I.V. Yannas, M. Spector, Collagen-based matrices with axially oriented pores, *J Biomed Mater Res A* 85(3) (2008) 757-67.
- [67] W. Sun, H. Lin, B. Chen, W. Zhao, Y. Zhao, J. Dai, Promotion of peripheral nerve growth by collagen scaffolds loaded with collagen-targeting human nerve growth factor-beta, *J Biomed Mater Res A* 83(4) (2007) 1054-61.
- [68] C. Marchesi, M. Pluderi, F. Colleoni, M. Belicchi, M. Meregalli, A. Farini, D. Parolini, L. Draghi, M.E. Fruguglietti, M. Gavina, L. Porretti, A. Cattaneo, M.

Battistelli, A. Prella, M. Moggio, S. Borsa, L. Bello, D. Spagnoli, S.M. Gaini, M.C. Tanzi, N. Bresolin, N. Grimoldi, Y. Torrente, Skin-derived stem cells transplanted into resorbable guides provide functional nerve regeneration after sciatic nerve resection, *Glia* 55(4) (2007) 425-38.

[69] M. Gingras, M.M. Beaulieu, V. Gagnon, H.D. Durham, F. Berthod, In vitro study of axonal migration and myelination of motor neurons in a three-dimensional tissue-engineered model, *Glia* 56(3) (2008) 354-64.

[70] M. Blais, M. Grenier, F. Berthod, Improvement of nerve regeneration in tissue-engineered skin enriched with schwann cells, *J Invest Dermatol* 129(12) (2009) 2895-900.

[71] T. Sasaki, R. Fassler, E. Hohenester, Laminin: the crux of basement membrane assembly, *J Cell Biol* 164(7) (2004) 959-63.

[72] J.H. Miner, P.D. Yurchenco, Laminin functions in tissue morphogenesis, *Annu Rev Cell Dev Biol* 20 (2004) 255-84.

[73] A. Domogatskaya, S. Rodin, K. Tryggvason, Functional diversity of laminins, *Annu Rev Cell Dev Biol* 28 (2012) 523-53.

[74] M. Durbeej, Laminins, *Cell Tissue Res* 339(1) (2010) 259-68.

[75] R. Hallmann, N. Horn, M. Selg, O. Wendler, F. Pausch, L.M. Sorokin, Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature, *Physiol Rev* 85(3) (2005) 979-1000.

[76] S. Scheele, A. Nystrom, M. Durbeej, J.F. Talts, M. Ekblom, P. Ekblom, Laminin isoforms in development and disease, *J Mol Med (Berl)* 85(8) (2007) 825-36.

[77] J.H. Miner, Laminins and their roles in mammals, *Microsc Res Tech* 71(5) (2008) 349-56.

[78] J. Tzu, M.P. Marinkovich, Bridging structure with function: structural, regulatory, and developmental role of laminins, *Int J Biochem Cell Biol* 40(2) (2008) 199-214.

[79] C.C. Tate, D.A. Shear, M.C. Tate, D.R. Archer, D.G. Stein, M.C. LaPlaca, Laminin and fibronectin scaffolds enhance neural stem cell transplantation into the injured brain, *J Tissue Eng Regen Med* 3(3) (2009) 208-17.

[80] W. Wallquist, S. Plantman, S. Thams, J. Thyboll, J. Kortessmaa, J. Lannergren, A. Domogatskaya, S.O. Ogren, M. Risling, H. Hammarberg, K. Tryggvason, S. Cullheim, Impeded interaction between Schwann cells and axons in the absence of laminin alpha4, *J Neurosci* 25(14) (2005) 3692-700.

[81] B.L. Patton, J.M. Cunningham, J. Thyboll, J. Kortessmaa, H. Westerblad, L. Edstrom, K. Tryggvason, J.R. Sanes, Properly formed but improperly localized

synaptic specializations in the absence of laminin alpha4, *Nat Neurosci* 4(6) (2001) 597-604.

[82] P.A. Gunatillake, R. Adhikari, Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering, *Eur Cell Mater* 5 (2003) 1-16; discussion 16.

[83] M. Vert, S. Li, G. Spenlehauer, P.J.J.o.m.s.M.i.m. Guérin, Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters, 3(6) (1992) 432-446.

[84] N.Y. Yu, A. Schindeler, D.G. Little, A.J. Ruys, Biodegradable poly(alpha-hydroxy acid) polymer scaffolds for bone tissue engineering, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 93(1) (2010) 285-95.

[85] S. Ng, T. Vandamme, M. Taylor, J.J.M. Heller, Synthesis and erosion studies of self-catalyzed poly (ortho ester) s, 30(4) (1997) 770-772.

[86] K.P. Andriano, Y. Tabata, Y. Ikada, J. Heller, In vitro and in vivo comparison of bulk and surface hydrolysis in absorbable polymer scaffolds for tissue engineering, *J Biomed Mater Res* 48(5) (1999) 602-12.

[87] B.D. Ulery, L.S. Nair, C.T. Laurencin, Biomedical Applications of Biodegradable Polymers, *J Polym Sci B Polym Phys* 49(12) (2011) 832-864.

[88] O. Pillai, R. Panchagnula, Polymers in drug delivery, *Curr Opin Chem Biol* 5(4) (2001) 447-51.

[89] X. Wu, Synthesis and properties of biodegradable lactic/glycolic acid polymers *Encyclopedic Handbook Of Biomaterials and Bioengineering Part A: Materials* vol 2 ed DL Wise, DJ Trantolo, DE Altobelli, MJ Yaszemski, JD Gresser and ER Schwartz, New York: Dekker, 1995.

[90] K. Jamshidi, S.-H. Hyon, Y.J.P. Ikada, Thermal characterization of polylactides, 29(12) (1988) 2229-2234.

[91] K.R. Kunduru, A. Basu, A.J.J.E.o.p.s. Domb, technology, Biodegradable polymers: medical applications, (2002) 1-22.

[92] D.A. Houweling, P.R. Bar, W.H. Gispen, E.A. Joosten, Spinal cord injury: bridging the lesion and the role of neurotrophic factors in repair, *Prog Brain Res* 117 (1998) 455-71.

[93] C.E. Schmidt, J.B. Leach, Neural tissue engineering: strategies for repair and regeneration, *Annu Rev Biomed Eng* 5 (2003) 293-347.

[94] Q. Yin, G.J. Kemp, S.P. Frostick, Neurotrophins, neurones and peripheral nerve regeneration, *J Hand Surg Br* 23(4) (1998) 433-7.

[95] Y. Murakami, S. Furukawa, A. Nitta, Y. Furukawa, Accumulation of nerve growth factor protein at both rostral and caudal stumps in the transected rat spinal cord, *J Neurol Sci* 198(1-2) (2002) 63-9.

- [96] M.H. Tuszynski, K. Gabriel, F.H. Gage, S. Suhr, S. Meyer, A. Rosetti, Nerve growth factor delivery by gene transfer induces differential outgrowth of sensory, motor, and noradrenergic neurites after adult spinal cord injury, *Exp Neurol* 137(1) (1996) 157-73.
- [97] M. Sendtner, B. Holtmann, R. Kolbeck, H. Thoenen, Y.A. Barde, Brain-derived neurotrophic factor prevents the death of motoneurons in newborn rats after nerve section, *Nature* 360(6406) (1992) 757-9.
- [98] S. Braun, B. Croizat, M.C. Lagrange, J.M. Warter, P. Poindron, Neurotrophins increase motoneurons' ability to innervate skeletal muscle fibers in rat spinal cord--human muscle cocultures, *J Neurol Sci* 136(1-2) (1996) 17-23.
- [99] M. Oudega, T. Hagg, Neurotrophins promote regeneration of sensory axons in the adult rat spinal cord, *Brain Res* 818(2) (1999) 431-8.
- [100] J. Bloch, E.G. Fine, N. Bouche, A.D. Zurn, P. Aebischer, Nerve growth factor- and neurotrophin-3-releasing guidance channels promote regeneration of the transected rat dorsal root, *Exp Neurol* 172(2) (2001) 425-32.
- [101] C. Gravel, R. Gotz, A. Lorrain, M. Sendtner, Adenoviral gene transfer of ciliary neurotrophic factor and brain-derived neurotrophic factor leads to long-term survival of axotomized motor neurons, *Nat Med* 3(7) (1997) 765-70.
- [102] S.G. Siegel, B. Patton, A.W. English, Ciliary neurotrophic factor is required for motoneuron sprouting, *Exp Neurol* 166(2) (2000) 205-12.
- [103] N.M. Oyesiku, J.N. Wilcox, D.J. Wigston, Changes in expression of ciliary neurotrophic factor (CNTF) and CNTF-receptor alpha after spinal cord injury, *J Neurobiol* 32(3) (1997) 251-61.
- [104] J.H. Ye, J.D. Houle, Treatment of the chronically injured spinal cord with neurotrophic factors can promote axonal regeneration from supraspinal neurons, *Exp Neurol* 143(1) (1997) 70-81.
- [105] J.P. Newman, A.N. Verity, S. Hawatmeh, W.E. Fee, Jr., D.J. Terris, Ciliary neurotrophic factors enhances peripheral nerve regeneration, *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 122(4) (1996) 399-403.
- [106] C.E. Henderson, H.S. Phillips, R.A. Pollock, A.M. Davies, C. Lemeulle, M. Armanini, L. Simmons, B. Moffet, R.A. Vandlen, L.C.c.t.S.L. Simpson, V.E. Koliatsos, A. Rosenthal, et al., GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle, *Science* 266(5187) (1994) 1062-4.
- [107] S.W. Levison, M.H. Ducceschi, G.M. Young, T.L. Wood, Acute exposure to CNTF in vivo induces multiple components of reactive gliosis, *Exp Neurol* 141(2) (1996) 256-68.

- [108] A. Buj-Bello, V.L. Buchman, A. Horton, A. Rosenthal, A.M. Davies, GDNF is an age-specific survival factor for sensory and autonomic neurons, *Neuron* 15(4) (1995) 821-8.
- [109] A. Blesch, M.H. Tuszynski, GDNF gene delivery to injured adult CNS motor neurons promotes axonal growth, expression of the trophic neuropeptide CGRP, and cellular protection, *J Comp Neurol* 436(4) (2001) 399-410.
- [110] E.G. Fine, I. Decosterd, M. Papaloizos, A.D. Zurn, P. Aebischer, GDNF and NGF released by synthetic guidance channels support sciatic nerve regeneration across a long gap, *Eur J Neurosci* 15(4) (2002) 589-601.
- [111] J.V. Priestley, M.S. Ramer, V.R. King, S.B. McMahon, R.A. Brown, Stimulating regeneration in the damaged spinal cord, *J Physiol Paris* 96(1-2) (2002) 123-33.
- [112] P.G. Cordeiro, B.R. Seckel, S.A. Lipton, P.A. D'Amore, J. Wagner, R. Madison, Acidic fibroblast growth factor enhances peripheral nerve regeneration in vivo, *Plast Reconstr Surg* 83(6) (1989) 1013-9; discussion 1020-1.
- [113] Y. Nakahara, F.H. Gage, M.H. Tuszynski, Grafts of fibroblasts genetically modified to secrete NGF, BDNF, NT-3, or basic FGF elicit differential responses in the adult spinal cord, *Cell Transplant* 5(2) (1996) 191-204.
- [114] R.E. Friesel, T. Maciag, Molecular mechanisms of angiogenesis: fibroblast growth factor signal transduction, *FASEB J* 9(10) (1995) 919-25.
- [115] J.D. Steeves, W. Tetzlaff, Engines, accelerators, and brakes on functional spinal cord repair, *Ann N Y Acad Sci* 860 (1998) 412-24.
- [116] C.E. Henderson, W. Camu, C. Mettling, A. Gouin, K. Poulsen, M. Karihaloo, J. Rullamas, T. Evans, S.B. McMahon, M.P. Armanini, et al., Neurotrophins promote motor neuron survival and are present in embryonic limb bud, *Nature* 363(6426) (1993) 266-70.
- [117] P.A. Dijkhuizen, W.T. Hermens, M.A. Teunis, J. Verhaagen, Adenoviral vector-directed expression of neurotrophin-3 in rat dorsal root ganglion explants results in a robust neurite outgrowth response, *J Neurobiol* 33(2) (1997) 172-84.
- [118] E.J. Bradbury, S. Khemani, R. Von, King, J.V. Priestley, S.B. McMahon, NT-3 promotes growth of lesioned adult rat sensory axons ascending in the dorsal columns of the spinal cord, *Eur J Neurosci* 11(11) (1999) 3873-83.
- [119] R.J. McKeon, R.C. Schreiber, J.S. Rudge, J. Silver, Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes, *J Neurosci* 11(11) (1991) 3398-411.

- [120] H. Lee, R.J. McKeon, R.V. Bellamkonda, Sustained delivery of thermostabilized chABC enhances axonal sprouting and functional recovery after spinal cord injury, *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(8) (2010) 3340-5.
- [121] J.W. Fawcett, R.A. Asher, The glial scar and central nervous system repair, *Brain Res Bull* 49(6) (1999) 377-91.
- [122] E.J. Bradbury, L.D. Moon, R.J. Popat, V.R. King, G.S. Bennett, P.N. Patel, J.W. Fawcett, S.B. McMahon, Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury, *Nature* 416(6881) (2002) 636-40.
- [123] A.W. Barritt, M. Davies, F. Marchand, R. Hartley, J. Grist, P. Yip, S.B. McMahon, E.J. Bradbury, Chondroitinase ABC promotes sprouting of intact and injured spinal systems after spinal cord injury, *J Neurosci* 26(42) (2006) 10856-67.
- [124] T. Pizzorusso, P. Medini, N. Berardi, S. Chierzi, J.W. Fawcett, L. Maffei, Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex, *Science* 298(5596) (2002) 1248-51.
- [125] N.J. Tester, A.H. Plaas, D.R. Howland, Effect of body temperature on chondroitinase ABC's ability to cleave chondroitin sulfate glycosaminoglycans, *J Neurosci Res* 85(5) (2007) 1110-8.
- [126] L.L. Jones, R.U. Margolis, M.H. Tuszynski, The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan, brevican, phosphacan, and versican are differentially regulated following spinal cord injury, *Exp Neurol* 182(2) (2003) 399-411.
- [127] C.H. Chau, D.K. Shum, H. Li, J. Pei, Y.Y. Lui, L. Wirthlin, Y.S. Chan, X.M. Xu, Chondroitinase ABC enhances axonal regrowth through Schwann cell-seeded guidance channels after spinal cord injury, *FASEB J* 18(1) (2004) 194-6.
- [128] W.C. Huang, W.C. Kuo, J.H. Cherng, S.H. Hsu, P.R. Chen, S.H. Huang, M.C. Huang, J.C. Liu, H. Cheng, Chondroitinase ABC promotes axonal re-growth and behavior recovery in spinal cord injury, *Biochem Biophys Res Commun* 349(3) (2006) 963-8.
- [129] T. Liu, J. Xu, B.P. Chan, S.Y. Chew, Sustained release of neurotrophin-3 and chondroitinase ABC from electrospun collagen nanofiber scaffold for spinal cord injury repair, *J Biomed Mater Res A* 100(1) (2012) 236-42.
- [130] W.L. Fodor, Tissue engineering and cell based therapies, from the bench to the clinic: the potential to replace, repair and regenerate, *Reprod Biol Endocrinol* 1 (2003) 102.
- [131] P. Sensharma, G. Madhumathi, R.D. Jayant, A.K. Jaiswal, Biomaterials and cells for neural tissue engineering: Current choices, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 77 (2017) 1302-1315.

- [132] C.P. McGuckin, N. Forraz, Q. Allouard, R. Pettengell, Umbilical cord blood stem cells can expand hematopoietic and neuroglial progenitors in vitro, *Exp Cell Res* 295(2) (2004) 350-9.
- [133] H.N. Hao, J. Zhao, R.L. Thomas, G.C. Parker, W.D. Lyman, Fetal human hematopoietic stem cells can differentiate sequentially into neural stem cells and then astrocytes in vitro, *J Hematother Stem Cell Res* 12(1) (2003) 23-32.
- [134] S. Lu, C. Lu, Q. Han, J. Li, Z. Du, L. Liao, R.C. Zhao, Adipose-derived mesenchymal stem cells protect PC12 cells from glutamate excitotoxicity-induced apoptosis by upregulation of XIAP through PI3-K/Akt activation, *Toxicology* 279(1-3) (2011) 189-95.
- [135] A.J. Salgado, R.L. Reis, N.J. Sousa, J.M. Gimble, Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine, *Curr Stem Cell Res Ther* 5(2) (2010) 103-10.
- [136] M. Lopez-Santalla, P. Mancheno-Corvo, R. Menta, J. Lopez-Belmonte, O. DelaRosa, J.A. Bueren, W. Dalemans, E. Lombardo, M.I. Garin, Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Modulate Experimental Autoimmune Arthritis by Modifying Early Adaptive T Cell Responses, *Stem Cells* 33(12) (2015) 3493-503.
- [137] C.A. Ribeiro, J.S. Fraga, M. Graos, N.M. Neves, R.L. Reis, J.M. Gimble, N. Sousa, A.J. Salgado, The secretome of stem cells isolated from the adipose tissue and Wharton jelly acts differently on central nervous system derived cell populations, *Stem Cell Res Ther* 3(3) (2012) 18.
- [138] K. Menezes, M.A. Nascimento, J.P. Goncalves, A.S. Cruz, D.V. Lopes, B. Curzio, M. Bonamino, J.R. de Menezes, R. Borojevic, M.I. Rossi, T. Coelho-Sampaio, Human mesenchymal cells from adipose tissue deposit laminin and promote regeneration of injured spinal cord in rats, *PLoS One* 9(5) (2014) e96020.
- [139] M.K. Kolar, P.J. Kingham, L.N. Novikova, M. Wiberg, L.N. Novikov, The therapeutic effects of human adipose-derived stem cells in a rat cervical spinal cord injury model, *Stem Cells Dev* 23(14) (2014) 1659-74.
- [140] A.J. Salgado, O.P. Coutinho, R.L. Reis, Bone tissue engineering: state of the art and future trends, *Macromol Biosci* 4(8) (2004) 743-65.
- [141] L. Lu, J. Temenoff, J. Teßmar, A.G. Mikos, Synthetic Bioresorbable Polymer Scaffold, (2004).
- [142] A.G. Mikos, J.S.J.E.J.o.B. Temenoff, Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering, 3(2) (2000) 23-24.
- [143] R.C. Thomson, A.K. Shung, M.J. Yaszemski, A.G.J.P.o.t.e. Mikos, Polymer scaffold processing, 2 (2000) 251-62.

- [144] E. Boland, P. Espy, G.J.W.G. Bowlin, Bowlin, GL Richmong, Verginia, USA, Tissue engineering scaffolds: In Encyclopaedia of Biomaterials and biomedical engineering, (2004) 1633-1635.
- [145] B. Subia, J. Kundu, S.J.T.e. Kundu, Biomaterial scaffold fabrication techniques for potential tissue engineering applications, 141 (2010).
- [146] J.W. Lee, J.Y. Kim, D.-W.J.I.j.o.s.c. Cho, Solid free-form fabrication technology and its application to bone tissue engineering, 3(2) (2010) 85.
- [147] A.L. Andradý, Science and technology of polymer nanofibers, John Wiley & Sons 2008.
- [148] T. Subbiah, G.S. Bhat, R.W. Tock, S. Parameswaran, S.S. Ramkumar, Electrospinning of nanofibers, 96(2) (2005) 557-569.
- [149] M.T.M. Bizarria, M.A. d'Ávila, L.H.I. Mei, Non-woven nanofiber chitosan/peo membranes obtained by electrospinning %J Brazilian Journal of Chemical Engineering, 31 (2014) 57-68.
- [150] J. Doshi, D.H. Reneker, Electrospinning process and applications of electrospun fibers, Conference Record of the 1993 IEEE Industry Applications Conference Twenty-Eighth IAS Annual Meeting, IEEE, 1993, pp. 1698-1703.
- [151] Q.P. Pham, U. Sharma, A.G. Mikos, Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review, Tissue Eng 12(5) (2006) 1197-211.
- [152] M.P. Prabhakaran, J.R. Venugopal, S. Ramakrishna, Mesenchymal stem cell differentiation to neuronal cells on electrospun nanofibrous substrates for nerve tissue engineering, Biomaterials 30(28) (2009) 4996-5003.
- [153] F. Yang, R. Murugan, S. Wang, S. Ramakrishna, Electrospinning of nano/micro scale poly(L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering, Biomaterials 26(15) (2005) 2603-10.
- [154] B.S. Kim, C.E. Baez, A. Atala, Biomaterials for tissue engineering, World J Urol 18(1) (2000) 2-9.
- [155] V. Charulatha, A. Rajaram, Influence of different crosslinking treatments on the physical properties of collagen membranes, Biomaterials 24(5) (2003) 759-67.
- [156] R.A. Brown, M. Wiseman, C.B. Chuo, U. Cheema, S.N.J.A.F.M. Nazhat, Ultrarapid engineering of biomimetic materials and tissues: Fabrication of nano-and microstructures by plastic compression, 15(11) (2005) 1762-1770.
- [157] E.A. Abou Neel, U. Cheema, J.C. Knowles, R.A. Brown, S.N.J.S.m. Nazhat, Use of multiple unconfined compression for control of collagen gel scaffold density and mechanical properties, 2(11) (2006) 986-992.

- [158] K. Hu, H. Shi, J. Zhu, D. Deng, G. Zhou, W. Zhang, Y. Cao, W. Liu, Compressed collagen gel as the scaffold for skin engineering, *Biomed Microdevices* 12(4) (2010) 627-35.
- [159] E.M. Engelhardt, E. Stegberg, R.A. Brown, J.A. Hubbell, F.M. Wurm, M. Adam, P. Frey, Compressed collagen gel: a novel scaffold for human bladder cells, *J Tissue Eng Regen Med* 4(2) (2010) 123-30.
- [160] H.J. Levis, G.S. Peh, K.P. Toh, R. Poh, A.J. Shortt, R.A. Drake, J.S. Mehta, J.T. Daniels, Plastic compressed collagen as a novel carrier for expanded human corneal endothelial cells for transplantation, *PLoS One* 7(11) (2012) e50993.
- [161] N.L. Francis, P.M. Hunger, A.E. Donius, U.G. Wegst, M.A. Wheatley, Strategies for neurotrophin-3 and chondroitinase ABC release from freeze-cast chitosan-alginate nerve-guidance scaffolds, *J Tissue Eng Regen Med* 11(1) (2017) 285-294.
- [162] T.D. Clemons, M. Fitzgerald, S.A. Dunlop, A.R. Harvey, K.S. Iyer, K.A.J.N.J.o.C. Stubbs, An improved assay for the spectrophotometric determination of chondroitinase ABC activity, 37(7) (2013) 1944-1949.
- [163] S.G. Dubois, E.Z. Floyd, S. Zvonic, G. Kilroy, X. Wu, S. Carling, Y.D. Halvorsen, E. Ravussin, J.M. Gimble, Isolation of human adipose-derived stem cells from biopsies and liposuction specimens, *Methods Mol Biol* 449 (2008) 69-79.
- [164] T. Riss, R. Moravec, A. Niles, S. Duellman, H. Benink, T. Worzella, L.J.b.S.G. Minor, Coussens NP, Nelson H., Eli Lilly, Company, B. the National Center for Advancing Translational Sciences, MD, Assay guidance manual [Internet], (2004).
- [165] J.A. Cooper, Effects of cytochalasin and phalloidin on actin, *J Cell Biol* 105(4) (1987) 1473-8.
- [166] B.I. Tarnowski, F.G. Spinale, J.H. Nicholson, DAPI as a useful stain for nuclear quantitation, *Biotech Histochem* 66(6) (1991) 297-302.
- [167] C. Vidal Bde, M.L. Mello, Collagen type I amide I band infrared spectroscopy, *Micron* 42(3) (2011) 283-9.
- [168] Z. Deyl, Gel electrophoresis of proteins: edited by MJ Dunn, Wright, Bristol, 1986, xiii+ 407 pp. price£ 45.00, ISBN 0-7236-0882-2, Elsevier, 1987.
- [169] B.D. Hames, Gel electrophoresis of proteins: a practical approach, OUP Oxford 1998.
- [170] S. Inanc, D. Keles, G. Oktay, An improved collagen zymography approach for evaluating the collagenases MMP-1, MMP-8, and MMP-13, *Biotechniques* 63(4) (2017) 174-180.

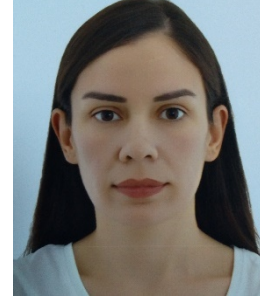
- [171] E. Oliveira, R. Assunção-Silva, O. Ziv-Polat, E. Gomes, F. Teixeira, N. Silva, A. Shahar, A.J.S.c.i. Salgado, Influence of different ECM-like hydrogels on neurite outgrowth induced by adipose tissue-derived stem cells, 2017 (2017).
- [172] C. Frantz, K.M. Stewart, V.M. Weaver, The extracellular matrix at a glance, *J Cell Sci* 123(Pt 24) (2010) 4195-200.
- [173] D.L. Kusindarta, H.J.T.R. Wihadmadyatami, The role of extracellular matrix in tissue regeneration, (2018) 65.
- [174] S. Khorshidi, A. Solouk, H. Mirzadeh, S. Mazinani, J.M. Lagaron, S. Sharifi, S. Ramakrishna, A review of key challenges of electrospun scaffolds for tissue-engineering applications, *J Tissue Eng Regen Med* 10(9) (2016) 715-38.
- [175] E. Schnell, K. Klinkhammer, S. Balzer, G. Brook, D. Klee, P. Dalton, J. Mey, Guidance of glial cell migration and axonal growth on electrospun nanofibers of poly-epsilon-caprolactone and a collagen/poly-epsilon-caprolactone blend, *Biomaterials* 28(19) (2007) 3012-25.
- [176] P. Katta, M. Alessandro, R. Ramsier, G.J.N.I. Chase, Continuous electrospinning of aligned polymer nanofibers onto a wire drum collector, 4(11) (2004) 2215-2218.
- [177] W.E. Teo, S. Ramakrishna, A review on electrospinning design and nanofibre assemblies, *Nanotechnology* 17(14) (2006) R89-R106.
- [178] J.M. Corey, D.Y. Lin, K.B. Mycek, Q. Chen, S. Samuel, E.L. Feldman, D.C. Martin, Aligned electrospun nanofibers specify the direction of dorsal root ganglia neurite growth, *J Biomed Mater Res A* 83(3) (2007) 636-45.
- [179] B. Vigani, S. Rossi, G. Sandri, M.C. Bonferoni, F. Ferrari, Design and criteria of electrospun fibrous scaffolds for the treatment of spinal cord injury, *Neural Regen Res* 12(11) (2017) 1786-1790.
- [180] M. Kaya, Z.B. Ahi, E. Ergene, P. Yilgor Huri, K. Tuzlakoglu, Design of a new dual mesh with an absorbable nanofiber layer as a potential implant for abdominal hernia treatment, *J Tissue Eng Regen Med* 14(2) (2020) 347-354.
- [181] C.O. Çakır, M. Ozturk, K.J.M.T. Tuzlakoglu, Design of antibacterial bilayered silk fibroin-based scaffolds for healing of severe skin damages, 33(10) (2018) 651-658.
- [182] A.J. Garcia, Interfaces to control cell-biomaterial adhesive interactions, *Polymers for regenerative medicine*, Springer 2006, pp. 171-190.
- [183] N. Rangappa, A. Romero, K.D. Nelson, R.C. Eberhart, G.M.J.J.o.b.m.r. Smith, Laminin-coated poly (L-lactide) filaments induce robust neurite growth while providing directional orientation, 51(4) (2000) 625-634.

- [184] H.S. Koh, T. Yong, C.K. Chan, S. Ramakrishna, Enhancement of neurite outgrowth using nano-structured scaffolds coupled with laminin, *Biomaterials* 29(26) (2008) 3574-82.
- [185] J. Ai, A. Kiasat-Dolatabadi, S. Ebrahimi-Barough, A. Ai, N. Lotfibakhshaiesh, A. Norouzi-Javidan, H. Saberi, B. Arjmand, H.R. Aghayan, Polymeric Scaffolds in Neural Tissue Engineering: A Review, 1(1) (2014) 15-20.
- [186] L.A. Pfister, E. Alther, M. Papaloizos, H.P. Merkle, B. Gander, Controlled nerve growth factor release from multi-ply alginate/chitosan-based nerve conduits, *Eur J Pharm Biopharm* 69(2) (2008) 563-72.
- [187] M. Eng, V. Ling, J.A. Briggs, K. Souza, E. Canova-Davis, M.F. Powell, L.R. De Young, Formulation development and primary degradation pathways for recombinant human nerve growth factor, *Anal Chem* 69(20) (1997) 4184-90.
- [188] N. Sultana, T.H.J.J.o.N. Khan, Water absorption and diffusion characteristics of nanohydroxyapatite (nHA) and poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate-) based composite tissue engineering scaffolds and nonporous thin films, 2013 (2013).
- [189] L.C. Xu, C.A. Siedlecki, Effects of surface wettability and contact time on protein adhesion to biomaterial surfaces, *Biomaterials* 28(22) (2007) 3273-83.
- [190] H.K. Makadia, S.J.J.P. Siegel, Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier, 3(3) (2011) 1377-1397.
- [191] G.W. Kwon, K.C. Gupta, K.H. Jung, I.K. Kang, Lamination of microfibrinous PLGA fabric by electrospinning a layer of collagen-hydroxyapatite composite nanofibers for bone tissue engineering, *Biomater Res* 21 (2017) 11.
- [192] E.D. Gomes, S.S. Mendes, R.C. Assuncao-Silva, F.G. Teixeira, A.O. Pires, S.I. Anjo, B. Manadas, H. Leite-Almeida, J.M. Gimble, N. Sousa, A.C. Lepore, N.A. Silva, A.J. Salgado, Co-Transplantation of Adipose Tissue-Derived Stromal Cells and Olfactory Ensheathing Cells for Spinal Cord Injury Repair, *Stem Cells* 36(5) (2018) 696-708.
- [193] E.D. Gomes, S.S. Mendes, H. Leite-Almeida, J.M. Gimble, R.Y. Tam, M.S. Shoichet, N. Sousa, N.A. Silva, A.J. Salgado, Combination of a peptide-modified gellan gum hydrogel with cell therapy in a lumbar spinal cord injury animal model, *Biomaterials* 105 (2016) 38-51.
- [194] G.J. Her, H.C. Wu, M.H. Chen, M.Y. Chen, S.C. Chang, T.W. Wang, Control of three-dimensional substrate stiffness to manipulate mesenchymal stem cell fate toward neuronal or glial lineages, *Acta Biomater* 9(2) (2013) 5170-80.
- [195] S. Plantman, M. Patarroyo, K. Fried, A. Domogatskaya, K. Tryggvason, H. Hammarberg, S. Cullheim, Integrin-laminin interactions controlling neurite outgrowth from adult DRG neurons in vitro, *Mol Cell Neurosci* 39(1) (2008) 50-62.

[196] D. Sapunar, S. Kostic, A. Banozic, L. Puljak, Dorsal root ganglion - a potential new therapeutic target for neuropathic pain, J Pain Res 5 (2012) 31-8.



ÖZGEÇMİŞ



Ad Soyad: Zehra Betül AHİ

Doğum Yeri ve Tarihi: Balıkesir / 16.06.1990

E-Posta: zehrabetulahi@gmail.com

Lisans: İnönü Üniversitesi / Kimya Mühendisliği / 2008-2012

Yüksek Lisans: Yalova Üniversitesi / Polimer Mühendisliği / 2012-2015

Doktora: Yalova Üniversitesi / Polimer Mühendisliği / 2015-2020

TEZDEN TÜRETİLEN YAYINLAR / SUNUMLAR

1. **Zehra Betül Ahi**, R. Assunção-Silva, S. C. Serra, António Salgado, Kadriye Tuzlakoglu “A combinatorial approach for spinal cord injury repair using multifunctional collagen-based matrices: development, characterization and impact on cell adhesion and axonal growth”, *Biomedical Materials*, Mayıs 2020, DOI:10.1088/1748-605X/ab924d.
2. **Zehra Betül Ahi**, “A New Combinatorial Therapy for the Treatment of Spinal Cord Injury”, 24th Biomedical Science and Technology Symposium, İzmir, Türkiye, 2019. (Sözlü Sunum)
3. **Zehra Betül Ahi**, R. Assunção-Silva, S. C. Serra, António Salgado, Kadriye Tuzlakoğlu, “Nanofibrous 3D Matrices For Spinal Cord Injury Repair” Scandinavian Society for Biomaterials, Fiskebäckskil, İsveç, 2018. (Poster Sunumu)
4. Kadriye Tuzlakoğlu, **Zehra Betül Ahi**, “Fabrication and Characterization of Bilayered Collagen-Based Scaffolds for Spinal Cord Injury” 28th European Conference on Biomaterials, Atina, Yunanistan, 2017. (Poster Sunumu)
5. **Zehra Betül Ahi**, Nergis Zeynep Renkler, Kadriye Tuzlakoğlu. “Omurilik Hasarlarının Tedavisi için Çift Katmanlı Kolajen Bazlı Matriks Geliştirilmesi ve Karakterizasyonu”, 4.Biyomalzeme Günleri, Yalova, Türkiye, 2017. (Poster Sunumu)