

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GRAFEN OKSİT FİLM ÜZERİNDE SH-SY5Y HÜCRELERİNE HİPOKSİNİN
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Sinirbilim Anabilim Dalı Programı

Yüksek Lisans Tezi

Biyolog

Pelin İLHAN

DANIŞMANLAR

Prof. Dr. Gülgün ŞENGÜL

Yard. Doç. Dr. Aylin ŞENDEMİR ÜRKMEZ

İZMİR

(2016)

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GRAFEN OKSİT FİLM ÜZERİNDE SH-SY5Y HÜCRELERİNE HİPOKSİNİN
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Sinir Bilim Anabilim Dalı Programı

Yüksek Lisans Tezi

Biyolog

Pelin İLHAN

DANIŞMANLAR

Prof. Dr. Gülgün ŞENGÜL

Yard. Doç. Dr. Aylin ŞENDEMİR ÜRKMEZ

İZMİR

(2016)

TEZ DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan: Prof. Dr.

(Danışman)

Üye: Prof. Dr.

Üye: Prof. Dr.

Üye: Prof. Dr.

Üye: Prof. Dr.

Yüksek Lisans Tezinin Kabul Edildiği Tarih:

ÖNSÖZ

Çalışmalarım sırasında engin bilgi ve tecrübeleriyle çalışmalarımın yönlendirilmesi ve yürütülmesi için gerekli desteği hiçbir zaman esirgemeyen, her aşamada bana güvenen, hayatım boyunca örnek alacağım çok değerli danışmanım Prof. Dr. Gülgün ŞENGÜL'e, ihtiyacım olan her anda, bilgisi ve deneyimiyle yardımlarını hiç esirgemeyen sevgili hocam Yrd. Doç. Dr. Aylin ŞENDEMİR ÜRKMEZ'e yardımları ve değerli katkıları için teşekkür ederim.

Yüksek lisans dönemim boyunca beraber çalıştığım Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Sinirbilim Anabilim Dalı yüksek lisans öğrencisi olan değerli arkadaşım Buse KAYHAN'a desteği ve arkadaşlığı için teşekkür ederim. Yüzeylerimi hazırlamakta bana yardım eden, her türlü tecrübesini benimle paylaşmaktan çekinmeyen Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü araştırma görevlisi Şeyma TAŞDEMİR'e, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomedikal Teknolojiler doktora öğrencisi Cansu GÖRGÜN'e, Fen bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik yüksek lisans öğrencisi Aslı Aybüke DOĞAN'a ve tüm laboratuvar çalışanlarına yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

İyi ve kötü bütün anılarımı paylaşan, sevgilerini ve desteklerini esirgemeyen, her biri birbirinden değerli sevgili arkadaşlarım Raziye, Gizem ve Ceren'e teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, attığım her adımda bana güvenen, sevgili anneme ve eşsiz babama, biricik ablama ve lisans ve lisansüstü eğitimim boyunca bana her zaman güvenen ve maddi manevi desteğini esirgemeyen, bana her zaman cesaret veren eşime çok teşekkür ederim.

114S405 nolu 1001 projesinde yüksek lisans bursiyeri olduğum TÜBİTAK'a destekleri için teşekkürlerimi sunuyorum.

Bornova/İZMİR

Pelin İlhan

27/06/2016

ÖZET

GRAFEN OKSİT FİLM ÜZERİNDE SH-SY5Y HÜCRELERİNE HİPOKSİNİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Merkezi sinir sistemi (MSS)'nde nöronlar oksijene oldukça duyarlıdır. Oksijen azaldığında, nöronlar dejenere olur. Nöronlarda dejenerasyon, hasar ve ölüme neden olur. Hipoksi felç, kafa travması, neoplazi, vasküler malformasyonlar ve nörodejeneratif hastalıklar gibi MSS patolojileriyle ilişkilidir. Grafen şu ana kadar çalışılmış en dikkat çekici nano yapılı malzemelerdendir. Daha önceki bir çalışmamızda L-glutaminle oluşturulan stresin nöronlar üzerindeki etkisini grafen oksit (GO) ve cam yüzeyler üzerine B35 hücrelerini ekerek incelemiştik. Özgün elektriksel özellikleri nedeniyle GO'nun MSS dejenerasyonlarında nöral hücre davranışını düzenlemede kullanılabilir potansiyel bir malzeme olabileceğini düşündük.

Bu çalışmada, hipoksi stresinin SH-SY5Y hücreleri üzerine etkilerini GO yüzeylerde göstermek amacıyla GO tozu ve kitosanla cam yüzeyler üzerinde ince bir film tabakası elde edildi. Kültüre edilen SH-SY5Y hücre hattı GO filmler üzerine ekildi, sadece cam yüzeylere ekilen hücreler ise kontrol grubu olarak kullanıldı. Nöronal farklılaşma için 10 µM retinoik asit kullanıldı. Hücreler hipoksik (3% O₂) ortamda hipoksi haznesinde ve normoksik (21% O₂) ortamda normal inkübatörde beş gün süreyle inkübe edildi. Hücre canlılığı için MTT testi yapıldı. Hücre morfolojileri taramalı elektron mikroskopisi (SEM) ve aktin boyama ile incelendi. MTT sonuçlarına göre hücreler GO filmler üzerinde hipoksi stresine karşı daha fazla direnç gösterdi. Aktin boyama ve SEM görüntülerinin de bu sonucu desteklediği gözlemlendi.

Bu çalışmanın sonuçları GO'nun hipoksi stresine karşı potansiyel bir tedavi yöntemi olarak kullanılabilirliğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: grafen oksit, hipoksi, SHSY5Y hücre hattı

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF HYPOXIA ON SH-SY5Y CELLS ON GRAPHENE OXIDE SHEETS

In the central nervous system (CNS), neurons are highly sensitive to the availability of oxygen. If oxygen availability is decreased, neurons can degenerate. Degeneration in neurons leads to injury and cell death. Hypoxia is involved in several CNS pathologies, including stroke, head trauma, neoplasia, vascular malformations and neurodegenerative diseases. Graphene is one of the remarkable nano structured materials studied so far. In our earlier study, we investigated the effects of L-glutamine stress on B35 cells seeded on GO and glass surfaces. Due to its unique electrical properties, we hypothesized that GO might be used in potential treatments for regulating neural cell behavior in CNS degeneration.

In this study, to demonstrate the effects of hypoxia on SH-SY5Y cells seeded on GO surfaces, GO powder was coated onto glass slides as a thin film. SHSY5Y neuroblastoma cell line was seeded on GO sheets, Seeded cells on only glass slides were used as the control group. 10 μ M retinoic acid was used for neuronal differentiation. Cells were incubated at hypoxic (3% O₂) conditions in a hypoxia chamber and in normoxic (21% O₂) condition in a normal incubator for five days. Cell viability was shown by MTT test. Morphologies of cells were examined by scanning electron microscopy (SEM) and actin staining. According to MTT results, neurons were more resistant to hypoxia on GO sheets; actin staining and SEM images confirmed the MTT results.

The results of this study demonstrated that GO may have a potential use for treatment in hypoxia stress.

Keywords: graphene oxide, hypoxia, SHSY5Y cell line

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	IV
ÖZET	V
ABSTRACT.....	VI
İÇİNDEKİLER	VII
TABLolar ŞEKİLLER GRAFİKLER DİZİNİ	IX
KISALTMALAR LİSTESİ.....	XI
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Hipoksi ve merkezi sinir sistemi üzerine etkileri.....	2
2.2. SH-SY5Y hücre hattı	5
2.2.1. Farklaşmamış ve farklılaşmış SH-SY5Y hücreleri	8
2.2.2. SH-SY5Y hücrelerini farklılaştırma yöntemleri	9
2.3. Grafen ve türevleri.....	10
2.4. Grafenin biyomedikal alanlarda kullanımı	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM	17
3.1. SH-SY5Y hücrelerinin çözündürülmesi	18
3.2. SH-SY5Y hücrelerinin pasajlanması	19
3.3. SH-SY5Y hücrelerinin dondurulması.....	19
3.4. SH-SY5Y hücrelerinin büyüme kinetiği eğrisinin çıkarılması	20
3.5. SH-SY5Y hücrelerine RA uygulaması	21
3.6. Grafen Oksit Filmlerin Hazırlanması	22
3.7. Hücrelerin yüzeylere ekimi	23
3.8. Hipoksi uygulaması.....	23
3.9. Hücre canlılığı testi	23
3.10. Hücre morfolojisinin incelenmesi	24

3.11.	Aktin sito-iskeleti boyaması	25
3.12.	İstatistiksel Analiz.....	27
4.	BULGULAR.....	27
4.1.	SH-SY5Y hücrelerinin morfolojik görüntüleri	27
4.2.	SH-SY5Y hücrelerinin Büyüme Kinetiği Eğrisi.....	28
4.3.	RA uygulaması	30
4.4.	Hipoksi stresi sonrası analizler	31
5.	TARTIŞMA	42
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	51
6.1.	Sonuçlar	51
6.2.	Öneriler.....	52
7.	KAYNAKLAR	53

TABLolar ŞEKİLLER GRAFİKLER DİZİNİ

Şekil 1. Hipoksi koşulu yaratma yöntemleri.....	4
Şekil 2. Hipoksi haznesi.....	4
Şekil 3. Büyüme kinetiği eğrileri, lag, log ve plato fazları.....	6
Şekil 4. Sp2 hibritleşmesi yapan karbon nanomalzemeler.....	11
Şekil 5. Grafitten grafen oksit elde edilmesinin şematik diagramı	12
Şekil 6. Grafen nanomalzeme ailesinin şematik diyagramı ve biyolojik etkileşimiyle ilgili özellikleri	13
Şekil 7. Tez çalışması deney planı.....	18
Şekil 8. Büyüme kinetiği için MTT test şablonu	21
Şekil 9. GO filmlerin hazırlanması.....	22
Şekil 10. Nemli odacık. Antikor ile boyama sırasında yüzeyin kurummasını engellemek için tasarlanan nemli alan.	26
Şekil 11. SH-SY5Y hücrelerinin faz-kontrast mikroskopu görüntüleri	27
Şekil 12. SH-SY5Y hücrelerinin büyüme kinetiği eğrisi	28
Şekil 13. 5x10 ⁴ hücre konsantrasyonu için büyüme kinetiği eğrisi	29
Şekil 14. SH-SY5Y hücreleri üzerine RA uygulaması	30
Şekil 15. Kontrol gruplarının (RA uygulanmamış) MTT absorbans değerleri grafiği	31
Şekil 16. RA uygulanmış grupların MTT absorbans değerleri grafiği	32
Şekil 17. Hipoksi stresi öncesi ışık mikroskopu görüntüleri	33
Şekil 18. Polistren ve cam yüzeylerde hipoksi ve normoksi koşulları.....	34
Şekil 19. RA uygulanmamış kontrol grubunun ışık mikroskopu görüntüleri	35
Şekil 20. Hipoksi ve normoksi ortamlarında RA uygulanmış hücrelerin cam yüzeylerdeki floresans görüntüleri.	36
Şekil 21. Hipoksi ve normoksi ortamlarında RA uygulanmamış hücrelerin cam yüzeylerdeki floresans mikroskobu görüntüleri.	37
Şekil 22. Hipoksi ve normoksi ortamlarında RA uygulanmış hücrelerin GO yüzeylerdeki floresans mikroskobu görüntüleri.	38
Şekil 23. Hipoksi ve normoksi ortamlarında RA uygulanmamış hücrelerin GO yüzeylerdeki floresans mikroskobu görüntüleri	39
Şekil 24. Hücre ekilmemiş GO yüzeyin floresan mikroskobu görüntüsü	40

<i>Şekil 25. GO yüzeylerdeki hücrelerin hipoksi ve normoksi ortamlarındaki 500X büyütmadaki SEM görüntüleri.....</i>	<i>41</i>
<i>Şekil 26. PubMed'de "graphene oxide" araması (26.06.2016 tarihi itibarıyla)</i>	<i>43</i>
<i>Şekil 27.GO-Cam RA'li ve RA'siz grupların karşılaştırılması</i>	<i>49</i>



KISALTMALAR LİSTESİ

MSS	Merkezi sinir sistemi
GO	Grafen oksit
MTT	3-(4,5-dimethyliazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazodium bromide
SEM	Taramalı elektron mikroskopisi
HIF	Hypoxia inducible factor
PHD	Pirolil 4 hidroksilazlar
TH	Tirozin hidroksilaz
RA	Retinoik asit
6 -OHDA	6 - hidroksidopamin
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6- tetrahidropridin
MPP +	1-metil-4-fenilpiridinyum iyonu
ChAT	Kolin-asetil transferaz
VMAT	Veziküler monoamin taşıyıcıları
TPA	12- O -tetradecanoyl-phorbol-13 acetate
dbcAMP	Dibütiril siklik AMP
LTP	Uzun süreli potansiyasyon
cAMP	Siklik AMP
GAP-43	Growth associated protein 43
PKC	Fosfokinaz C
NGF	Sinir büyüme faktörü
BDNF	Beyin türevli nörotrofik faktör
iGO	İndirgenmiş grafen oksit
PEG	Polietilenglikol
FBS	Fötal sığır serumu
PBS	Fosfat bufer salin
DMSO	dimetilsülfoksit
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
HDMS	hekzametildisilazan
PFA	Paraformaldehit
NH ₄ Cl	Amonyum klorid

BSA	Sığır serum albumin
PMDS	Polidimetilsiloksan
PET	Polietilen tereftalat
ROS	Reaktif oksijen türleri
β A	β amiloid peptid



1. GİRİŞ

Nörolojik hastalıklar hastalıktan etkilenmiş dokulara ulaşılmasının zorluğu nedeniyle insanda araştırılması en zor konulardan biridir. Bu nedenle patolojik mekanizmalarının aydınlatılması ve ilaç geliştirmesi için modelleme yapılması çok önemlidir. *In vivo* modellerin yanı sıra *in vitro* modeller de hastalık patogenezi ve potansiyel farmakolojik ajanların görüntülenmesi için ilginç yaklaşımlar ve önemli bakış açıları kazandırır. Hastalıkların olası patolojik mekanizmalarının çalışılması için biyoteknolojik yaklaşımlardan yararlanmak son derece önemlidir. Sinir sistemindeki biyoteknolojik yaklaşımlar nöral doku mühendisliğine dayanır. Biyomateryaller sinir rejenarasyonu ve beyin hasarlarının tamirinde kullanılır.

Nöral doku mühendisliği hücre davranışı ve doku gelişiminin ekstrasellüler matriksi taklit eden üç boyutlu sentetik yapı iskeleleri ile desteklenerek düzenlenmesine dayanır. Doğal ekstrasellüler matriksler topografik olarak, elektriksel ve kimyasal olarak nöral hücrelerin tutunması ve çoğalması için en uygun çevreyi sağlar. Doğal matriksler gibi sentetik yapı iskelelerinin de biyoyumlu, immünolojik olarak inert, iletken, biyobozunur ve enfeksiyona dirençli biyomalzemelerle yapılmış olması ve nörit oluşumunu desteklemesi gerekir (1).

MSS'de nöronlar oksijene oldukça duyarlıdır. Ortamdaki oksijen miktarı azaldığında hücreler dejenere olur, hasara uğrar ve ölürlür. Hipoksi felç, kafa travması ve nörodejeneratif hastalıklar gibi pek çok MSS patolojisinde rol oynar. Bu çalışmada hipoksi durumunun nöronlar üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla hipoksi koşullarının *in vitro* modellemesi insan nöroblastoma hücre hattı SH-SY5Y hücreleri üzerinde çalışılmıştır.

Hücre şekli, morfolojisi, tutunması, çoğalması ve migrasyonunun hücre - malzeme bağlantıları ile kontrol edilebildiği pek çok çalışma ile göstermiştir (2-5). Ekstrasellüler matriksin taklidi amacıyla son zamanlarda çok çalışılan bir çeşit karbon türevi olan GO malzemesi kullanılmıştır. *In vitro* kültür ortamlarında hücreler büyüme ya da komşu hücrelerle etkileşim amacıyla çeşitli maddeler salgılar. Bu maddeler grafen yüzeyi tarafından emilir ve hücre çoğalması ve farklılaşmasını etkiler (6). Grafen ve türevleri fiziksel, kimyasal ve elektriksel özellikleri nedeniyle nöral doku mühendisliğinde son on yılda çok çalışılan malzemelerdendir. Grafen tek

atom kalınlığında bir tabakadır ve sp² hibritleşmesi yapan karbon atomlarından oluşmuştur. Balpeteği görünümüne iki boyutlu yapısı karbonun üç boyutlu bir diğer yapısı olan grafitten elde edilir (7). GO grafitin kimyasal oksidasyonu ve eksfoliasyonu ile türetilir (8). Oksijenlenmiş grupların varlığı nedeniyle hidrofilik GO, serum proteinlerine elektrostatik bağlarla bağlanabilir (9). Son dönemlerde yapılan çalışmalarla grafen ve türevlerinin çeşitli kök hücrelerde büyümeyi ve kendiliğinden farklılaşmayı destekleyen biyouyumlu yüzeyler olduğu gösterilmiştir (9).

Bu çalışmanın amacı GO filmler hazırlanması, SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattının GO filmler ve cam yüzeylere ekilmesi, hücrelerin hipoksi koşulları altındaki davranışlarının GO yüzeyler üzerinde incelenmesidir.

Hücreler stres koşullarına GO yüzeyler üzerinde cam yüzeylerdekine göre daha fazla direnç gösterdi. GO yüzeyler üzerinde daha fazla hücre tutunması ve çoğalması gözlemlendi, ayrıca daha fazla nörit oluşumu ve daha uzun nörit yapıları immünohistokimyasal boyama ve SEM görüntüleri ile gösterildi.

Sonuç olarak GO hipoksi stresine karşı potansiyel bir tedavi yöntemi olarak kullanılabilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hipoksi ve merkezi sinir sistemi üzerine etkileri

MSS'de nöronlar oksijene oldukça duyarlıdır. Ortamdaki oksijen miktarı azaldığında hücreler dejenere olur, hasara uğrar ve ölürlür. Hipoksi felç, kafa travması ve nörodejeneratif hastalıklar gibi pek çok MSS patolojisinde rol oynar.

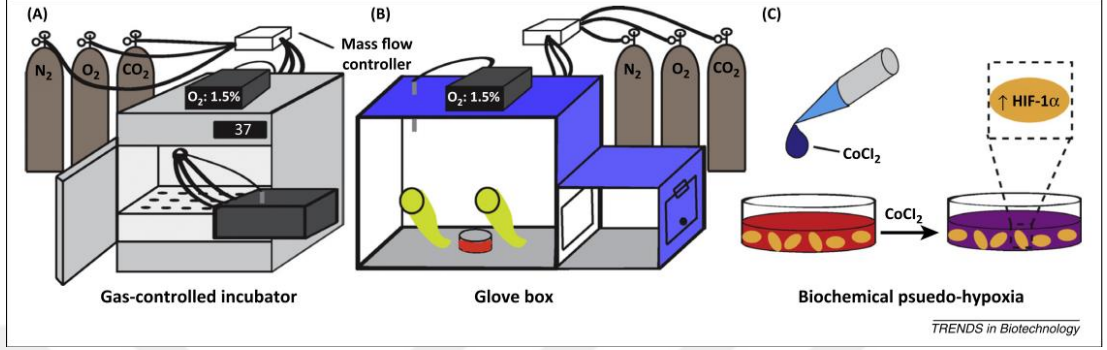
Hipoksi atmosferde kısmi oksijen basıncının azaldığı yüksek irtifa gibi ortamlarda ya da oklüzyon, kan damarlarının daralması gibi vasküler sistemde O₂ taşınmasının bozulmasıyla ortaya çıkabilir (10). Sistemik hipoksi, hiperkapni (CO₂ fazlalığı) ve kan pH'ı değişiklikleri karotis cisimciği (glomus caroticum) ve aort cisimciği (glomus aorticum)'daki kemoreseptörler tarafından saptanır (11). Hipoksi sırasında, kemoreseptörler afferent liflere nörotransmitterler salgılar, bu lifler bulbus'daki solunum merkezi olan nucleus tractus solitarius'a projekte olurlar. Bulbus'dan başlayan eferent nöronlar hipoksik koşulları ortadan kaldırmak için

solunumu ve kan basıncını düzenler. Normal koşullarda %1-5 O₂ (7,6-38 mm Hg) basıncı sistemik organlar için düşük kabul edilir, ancak memeli beyin dokusunun metabolik ihtiyaçlarını karşılaması için yeterlidir. Bu nedenle, MSS'deki hücreler düşük oksijen koşullarına adapte olmuştur ve O₂ miktarı ancak %1'in altına düştüğünde etkilenirler. Hipoksi stresine karşı yanıt oksijen alımını ve taşınmasını arttırmak için kalp atım hızının ve solunumun artırılmasıdır (10).

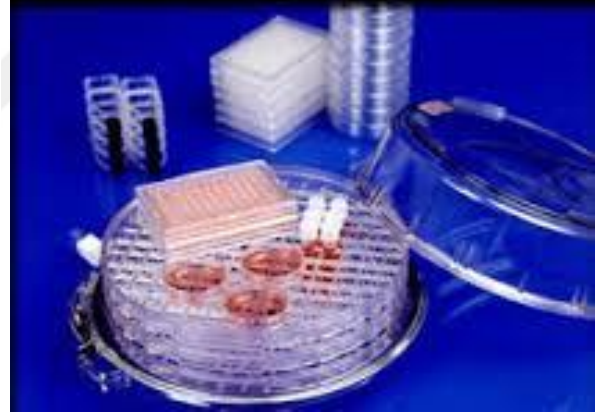
Hipoksiye karşı hücreyel yanıt primer olarak sinaptik iletide membranlardan iyon geçişinin değişmesi, adenozinin pre-sinaptik etkileri ve glutamaterjik reseptörlerdeki diğer aktiviteler ile düzenlenir. Nöronların hipoksiye karşı daha uzun dönemli yanıtı hipoksi uyarılabilir faktör (hypoxia-inducible factor, HIF) gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu olarak ortaya çıkar. HIF aktivasyonu HIF pirozil 4 hidroksilazlar (PHD) olarak adlandırılan dioksijenazlar ailesi tarafından kazanılır. Hipoksik koşullar altında, PHD aktivitesi inhibe edilir. PHD inhibisyon aktivitesi HIF'i ve diğer proteinleri stabilize ederek nöroprotektif bir ajan gibi davranır (10). Hipoksi sırasında sinaptik iletimin baskılanması primer olarak adenozinlerle kontrol edilir, serebral iskemi sırasında konsantrasyonu önemli derecede artar (10). Adenozin MSS'deki bütün hücrelerden salınabilir ve etkisini hem presinaptik hem de postsinaptik A1 reseptörlerinde gösterir. Presinaptik A1 reseptörlerinin aktivasyonu voltaj kapılı kalsiyum kanallarının inhibisyonuna neden olur, sinapslardan kalsiyumun geri alınımını etkiler. Azalan kalsiyum nörotransmitter taşıyan veziküllerin taşınmasını azaltır ve bunun sonucunda sinaptik iletim azalır. Postsinaptik A1 reseptörlerinin aktivasyonu potasyum kanallarında içeriye sızıntı olmasına, bu da postsinaptik nöronda hiperpolarizasyona neden olur (10,12,13).

Standart bir hipoksi uygulamasında, örneğin hücrelerin besiyerinin değiştirilmesinde, flaskın gaz-kontrollü inkübatör içinden alınması ve aynı oksijen koşuluna sahip hazne içine yerleştirilmesi gerekir. Taze besiyeri aynı oksijen koşullarına eşitlenmelidir. Besiyerinde çözülmüş oksijen konsantrasyonu her eklemede ölçülmelidir. Bu nedenle, oksijen konsantrasyonunu kontrol etmek amacıyla basit yöntemler geliştirilmiştir. Hipoksi koşulunda yapılacak *in vitro* deneyler için en sık kullanılan iki yöntem:1) sıkıca kapatılmış bir haznenin belli bir gaz konsantrasyonu ile doldurulması, ya da 2) hücrelerde biyokimyasal olarak yalancı hipoksi durumunun yaratılmasıdır. Her iki yöntemin de kendine özgü avantaj ve sınırlamaları vardır. Oksijen konsantrasyonunu kontrol etmede en yaygın yol inkübatörün gaz konsantrasyonunu ayarlamaktır. Bu yöntemde hücreler

inkübatördeki oksijen konsantrasyonunda büyürler (14). Ayrıca bu gaz kontrollü inkübatörler vakum odası (glove box) ya da hipoksi haznesi gibi ek sistemler gerektirir (15). Yalancı hipoksi ortamını yaratmak için kullanılan kimyasallar pirolil hidroksilaz inhibitörleri, nikel klorid ve en sık olarak da CoCl_2 'dir. (16).



Şekil 1. Hipoksi koşulu yaratma yöntemleri



Şekil 2. Hipoksi haznesi

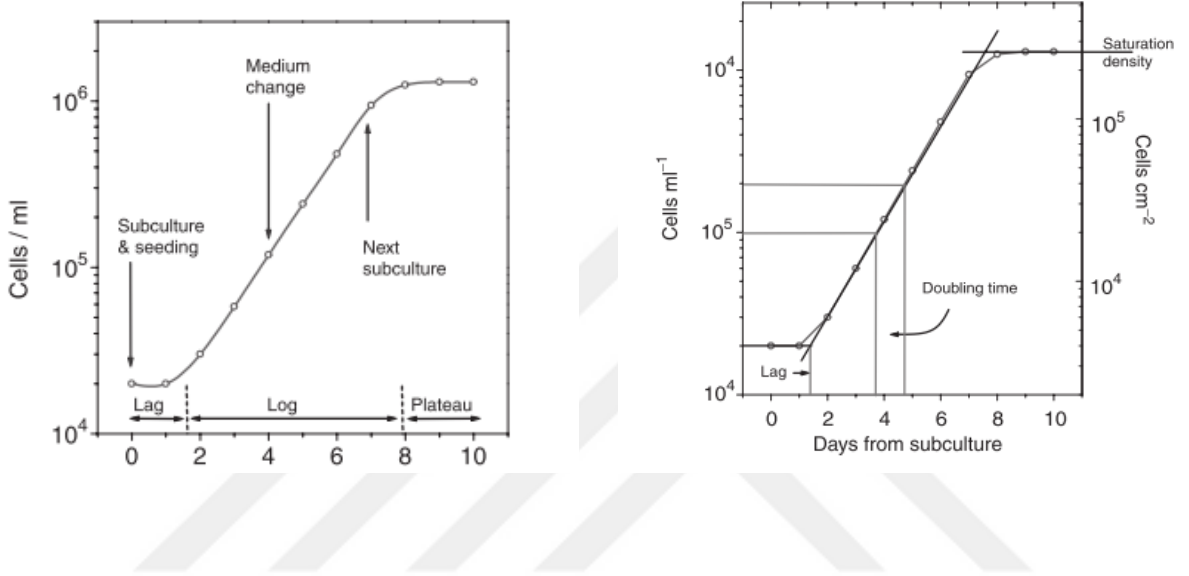
2.2. SH-SY5Y hücre hattı

Nöron benzeri hücre hatlarından olan SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattı son zamanlarda MSS'nin *in vitro* modellenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Köken olarak kemik tümör biyopsisinden elde edilen SH-SY5Y (ATCC-®-CRL-2266™) hücreleri SK-N-SH (ATCC-®-HTB-11™) hücrelerinin alt hattıdır. SK-N-SH ilki SH-SY, ikincisi SH-SY5 ve en son olarak da SH-SY5Y olmak üzere toplam 3 kez alt kültüre alınır. SH-SY5Y patent hakları 1970'de June L. Biedler tarafından ATCC-®'ye devredilmiştir (17).

SH-SY5Y hücre kültüründe tutunan ve yüzen hücreler olmak üzere iki tip hücre bulunur. Yapılan çalışmalar yüzen hücrelerin besiyeri değişimi sırasında ayrıldığını göstermektedir. Biedler ve grubunun SK-N-SH hücreleri ile yaptığı çalışmalarda kültürde "nöroblast benzeri hücreler" ve "epitel benzeri hücreler" olmak üzere iki ayrı morfolojide hücre bulunduğunu gösterilmiştir (18). Bu iki fenotip daha sonra Encinas vd. SH-SY5Y "N" ve "S" tipleri olarak tanımladığı fenotiplerle uyumludur (19). Nöroblast benzeri morfolojileri olan hücreler kateşolaminerjik nöronların karakteristiği olan tirozin hidroksilaz (TH) ve dopamin- β - hidroksilaz pozitifdir, epiteliyal benzeri hücreler ise bu enzimatik aktiviteleri göstermezler (18). SH-SY5Y hücreleri nöronal belirteçlerle karakterize edilebilen daha olgun nöron benzeri fenotipe farklılaşabilir. SH-SY5Y hücrelerini farklılaştırmanın birkaç yolu vardır. Retinoik asit farklılaştırmak için en sık kullanılan kimyasaldır (17).

SH-SY5Y hücreleri için orijinal kültür koşulları 1978'de Biedler vd. tarafından gösterilmiştir (20). Her hücrenin kendine ait büyüme kinetiği olur. Tipik bir büyüme kinetiğinde Lag, log ve plato fazı olmak üzere 3 faz bulunur. Lag faz (latent dönem) büyümenin olmadığı, hücre ekiminden hemen sonraki dönemdir. Bu dönem ekimin ardından ilk birkaç saatten 48 saate kadar sürer fakat sıklıkla 12 saattir. Bu süreçte hücreler tripsinizasyon işlemi sonrası kendini toparlar, hücre iskeleti yeniden düzenlenir. Tutunmaya yardımcı olmak için matriks salgılanır, hücreler yüzeye yayılır. Bu aşamadan sonra üstel büyüme fazı (exponential growth) olarak adlandırılan logaritmik faz yani log fazına girer. Bu aşamada hücrelerin sayısı hücre tipine göre değişen belirli sürede iki katına çıkar ve doubling time (iki katına çıkma süresi) olarak adlandırılır. Hücre popülasyonu yeterince kalabalıklaştığında yani tüm

yüzey hücrelerle kaplandığında hücreler plato fazı (durağan faz)'na girerler. Hücre sayısı bir süreliğine en yüksek seviyededir ancak bu fazda hücreler pasajlanmazsa ortamdaki besinin azalması ve metabolik artıkların çoğalması nedeniyle hücreler ölmeye başlar bu aşama ise ölüm fazı olarak adlandırılır. Bu büyüme kinetiğine göre hücreler için en uygun çalışma konsantrasyonu ve pasaj süresi belirlenir. Hücre karakteri hakkında fikir edinilir (21).



Şekil 3. Büyüme kinetiği eğrileri, lag, log ve plato fazları

Sağdaki grafik hücrenin lag, log ve plato fazlarını ve ayrıca besiyeri değişim zamanı ve pasaj zamanını göstermektedir. Soldaki grafik ise iki katına çıkma süresi ve satürasyon yoğunluğunu göstermektedir (21).

SK-N-SH hücreleri ve bundan klonlanmış olan SH-SY5Y hücreleri bir kültür kabında 2×10^5 ya da 4×10^6 hücre/60mm yoğunlukta olacak şekilde non-esansiyel amino asit, %15 fetal sığır serumu (fetal bovine serum, FBS), penisilin (100 IU/ml) ve streptomisin (100 μ g/ml) eklenmiş Eagle'ın minimum temel besiyerinde kültüre edilir. Bu hücre yoğunlukları iki katına çıkma süresi (doubling time) ve satürasyon yoğunluklarını ortaya çıkarmak için kullanılır. SH-SY5Y'nin iki katına çıkma süresi özel olarak belirtilmemiştir, ancak SK-N-SH nöroblast benzeri popülasyonların iki katına çıkma süresi yaklaşık 27 saattir, alt-klonlarının da benzer sürelerde olduğu bildirilmiştir. SH-SY5Y hücreleri için büyüme satürasyon yoğunluğu $> 1 \times 10^6$

hücre/cm²'dir. Bu sayı hem tutunan ve hem de yüzen hücreler pasaja alındığında geçerlidir. Çalışmada yüzen hücreler kültür besiyerinden uzaklaştırılmış, tutunan hücreler ise tripsinle kaldırılmıştır. İki hücre popülasyonu birlikte santrifüj edilerek uygun yoğunluklarda tekrar kültüre edilmiştir. Hücreler 37°C'de, %5 CO₂'de, nemli ortamda büyümektedirler (20).



2.2.1. Farklılaşmamış ve farklılaşmış SH-SY5Y hücreleri

Araştırmacıların SH-SY5Y hücrelerini olgunlaştırabilmesi ve nöron benzeri fenotipe farklılaştırabilmeleri sinirbilim çalışmalarına pek çok yarar sağlamıştır. Bu hücre hattının avantajı primer kültüre göre daha ucuz olması ve farklılaşmadan önce büyük ölçeklerde yayılabiliyor olmasıdır. Ayrıca bir insan nöroblastoma hücre hattı olması nedeniyle insan primer nöronal kültürüyle ilgili yaşanan etik sorunlar bulunmaz. Buna ek olarak, SH-SY5Y hücreleri insandan elde edildiğinden rodent primer kültürlerinde bulunmayan bir takım insana özgü proteinleri ve protein izoformlarını eksprese edebilmesi de önemli bir avantajdır (17).

Nöron benzeri hücrelerin ihtiyaç duyduğu koşullar farklılaşmış ve farklılaşmamış SH-SY5Y hücreleri için *in vitro* deneylerle belirlenmiştir. Nöronal farklılaşma nörit oluşumu, şekillenmesi ve uzaması, plazma membranının elektriksel uyarılabilirliğinin artışı, synaptophysin pozitif fonksiyonel sinapsların oluşumu ve nörona özel enzimlerin, nörotransmitterlerin ve nörotransmitter reseptörlerinin ortaya çıkması gibi bazı özel durumlar gerektirir (22,23). Bu nedenle farklılaşmış ya da farklılaşmamış hücrelerle yapılan deneyler sırasında tüm bu özelliklerin göz önünde bulundurulması gerekir (17).

SH-SY5Y hücrelerinin farklılaşmamış formu nöroblast benzeri, biraz tepesi kesik (trunkuat) şekilli polarize olmayan hücre gövdesi ile karakterize edilir. Bu hücreler küme şeklinde büyümeye meyillidir ve yığın şeklinde görülebilirler, birbirlerinin hücre gövdeleri üzerinde bulunacak şekilde kümelenebilirler. Farklılaşmamış SH-SY5Y hücreleri sürekli çoğalır, olgunlaşmamış nöronal belirteçleri eksprese eder, olgun nöronal belirteçlerden ise yoksundur (17). Farklılaşmamış hücreler en çok kateşolaminerjik nöronları andırırlar (22,23). Farklılaştırmak için ajan kullanımını takiben SH-SY5Y hücreleri uzun, güzel nöritleriyle morfolojik olarak primer nöronlara daha çok benzer hale gelirler. Olgun hücreler farklılaşma yöntemine göre farklı bir biçimde polarize hale gelirler, çok sayıda ve rastgele dağılan nöritler sergileyebilirler. SH-SY5Y hücrelerinin farklılaşması için birçok yöntem vardır. SH-SY5Y hücreleri besiyeri koşullarına göre çeşitli olgun nöronal fenotiplere, kolinerjik, adrenerjik ya da dopaminerjik nöronlara

dönüşebilir. *In vitro* çalışmalar için farklılaşma yöntemi istenilen fenotipe göre seçilmelidir (17).

2.2.2. SH-SY5Y hücrelerini farklılaştırma yöntemleri

Retinoik asit

Retinoik asit (RA) SH-SY5Y hücrelerini farklılaştırmak için en çok kullanılan ajanlardan biridir ve en iyi karakterize edilmiş yöntemdir. RA bir A vitamini metabolitidir, güçlü büyüme önleyici ve farklılaşmayı arttırıcı özelliği vardır (24). Genel olarak minimum 3-5 gün 10 µM konsantrasyonda serumsuz ya da düşük serumlu mediumda farklılaşmayı arttırmak için kullanılır (25). SH-SY5Y hücrelerinin sağ kalımını arttırır. Bu etkiyi fosfotidilinositol 3-kinaz/Act sinyal yolağının aktivasyonu ve anti-apoptotik Bcl-2 proteininin upregülasyonu ile yapar (26). Bazı çalışmalar, RA ile farklılaştırılmış hücrelerin 6-hidroksidopamin (6-OHDA), 1-metil-4-fenil-1,2,3,6- tetrahidropridin (MPTP) ya da metabolitleri, 1-metil-4-fenilpiridinyum iyonu (MPP +) gibi toksik maddelere farklılaşmamış hücrelere oranla daha dayanıklı olduklarını göstermiştir (25). SHSY5Y hücreleri RA ile farklılaştıklarında önce kolinerjik nöronlara dönüşürler, kolin-asetil transferaz (ChAT) aktivitesinde ve veziküler monoamin taşıyıcıları (VMAT) ekspresyonunda artış olur (22). Dopaminerjik nöronlara da dönüşebilirler, ancak bunun için forbol esterler gibi başka ajanların da uygulanmasını gerekir (27).

Forbol esterler

RA'dan farklı olarak 12- O -tetradecanoyl-phorbol-13 acetate (TPA) gibi forbol esterlerle de farklılaştırma yapılabilir. 1981 yılında Pählman vd. dört gün 1,6x10⁻⁸ M TPA uygulanmasıyla SH-SY5Y hücrelerinde morfolojik farklılaşma meydana geldiğini göstermişlerdir. Elektron mikroskopisiyle de sitoplazmik nörosekratuvar granüller görülmüştür (28). TPA ile RA uygulaması arasındaki fark TPA'nın hücrel noradrenalin içeriğini 200 kat arttırırken, RA'nın yaklaşık 4 kat arttırmasıdır. Bu nedenle, adrenerjik fenotip istendiğinde TPA uygulaması daha uygundur (17).

Dibütiril siklik AMP (Dibutyryl cyclic AMP, dbcAMP)

Nöral hücrelerde, hormonlar ve nörotransmitterler farklılaşma ve uzun süreli potansiyasyon (LTP, long term potentiation) oluşumu için hücre içi siklik AMP

(cAMP) seviyesini arttırlar. SH- SY5Y hücrelerine dbcAMP uygulaması nörit uzaması ve GAP-43 (growth associated protein 43) olgun nöron markerı ifadesinde artışa neden olur (29,30). Çalışmalar, 1 mM dbcAMP üç gün uygulandığında farklılaşmamış kültürlerde hücre agregasyonunu azalttığını, nörit uzamasını ve dallanmasını arttırdığını, TH immunoreaktivitesini arttırdığını ve bir protein kinaz A bağımlı yolda hücrel noradrenalin içeriğinde artışa neden olduğunu göstermektedir. TPA ve RA Bcl-2 ekspresyonunu arttırırken, dbcAMP azaltmaktadır (29). SH-SY5Y hücrelerinin dbcAMP ile farklılaştırılması, RA ve TPA ile farklılaştırılmış hücrelerle benzer bir morfolojik fenotip gösterir. Farklılaşmış kültür primer adrenerjik nöron benzeri hücrelerden oluşur (17).

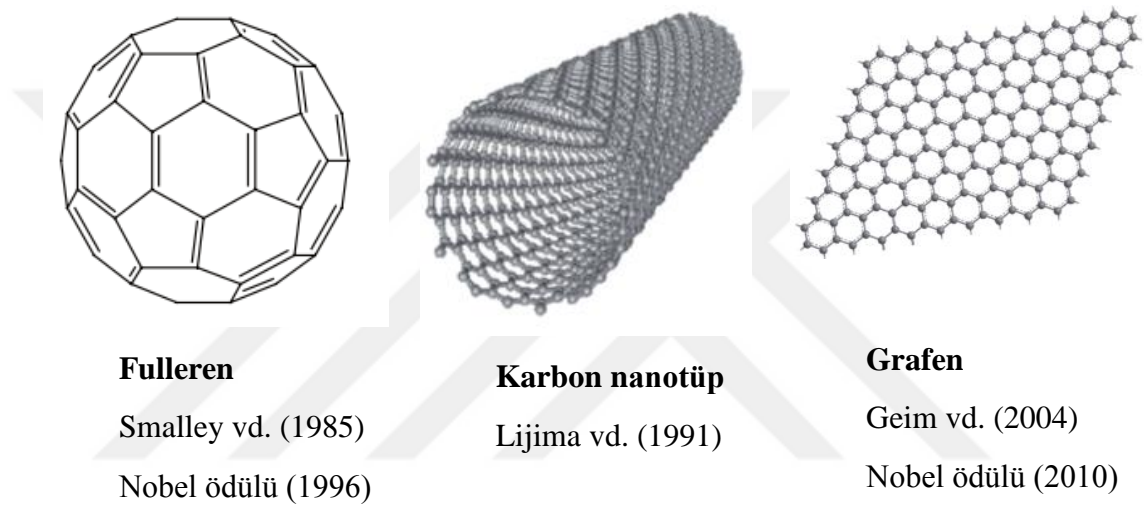
Farklılaşmada diğer yöntemler

Staurosporine bir PKC inhibitörüdür, nörit oluşumunu tetikler ve SH-SY5Y hücrelerinde hücre döngüsünü durdurur. RA ile farklılaştırmadan farklı olarak staurosporine uygulanmış hücreler cisplatin, 5-fluorourasil, 6-OHDA ve γ radyasyonu gibi toksik etkilere daha açık hale gelir ve Bcl-2 ekspresyonunda azalma görülür (31). Sonuç olarak bu hücreler doza bağılı olarak apoptozise uğrar. Yapılan çalışmalar, RA ve TPA kombinasyonu ile büyüme faktörlerinin (NGF, BDNF) birlikte uygulanmasının olgun nöral fenotip oluşumunu desteklediğini göstermektedir (19,32,33). Nöronal mediumun primer nöron kültüründe kullanılan B27 içermesi farklılaşmayı arttırır. Farklılaştırma için kullanılan diğer yöntemler kolesterol, vitamin D, insülin ya da nöronal farklılaşmayı destekleyen substratlarla birlikte kültüre etmektir (17).

2.3. Grafen ve türevleri

Grafit yaklaşık 500 yıldır bilinen ve geniş kullanım alanı olan bir malzemedir. Bu kadar iyi bilinmesine rağmen grafitten elde edilen grafen bugünkü ününü 2004 yılında Geim ve arkadaşlarının Manchester Üniversitesi'nde yaptığı bir çalışmayla kazanmıştır. Bu çalışmada grafen ilk kez grafitten izole edilmiş ve bu gruba 2010 yılında Nobel Ödülü'nü kazandırmıştır (8). Elektriksel özellikleri, elastisitesi, protein absorpsiyonu ve düşük moleküler ağırlığı nedeniyle grafen ve türevleri (grafen oksit (GO) ve indirgenmiş grafen oksit (iGO)) doku mühendisliği ve biyomedikal uygulama alanlarında kullanılmaktadır (9).

Grafen tek ya da birkaç tabakalı olup sp^2 hibritleşmesi yapan karbon atomlarından oluşur. Sp^2 hibritleşmesi yapan karbon nanomalzemeleri genellikle boyutsuz formdaki fulleren, tek boyutlu karbon nanotüpler ve iki boyutlu grafendir (7). Bal peteği görünümüne sahip iki boyutlu yapısı karbonun üç boyutlu bir diğer yapısı olan grafitten elde edilir. Grafen nanomalzemeler birkaç tabakalı grafen (few layer graphene), ultra ince grafit, grafen oksit (GO) (tek tabakadan birkaç katlı tabakaya kadar), indirgenmiş grafen oksit (iGO) ve grafen nanotabakalarıdır (graphene nanosheets) (34).



Şekil 4. Sp^2 hibritleşmesi yapan karbon nanomalzemeler

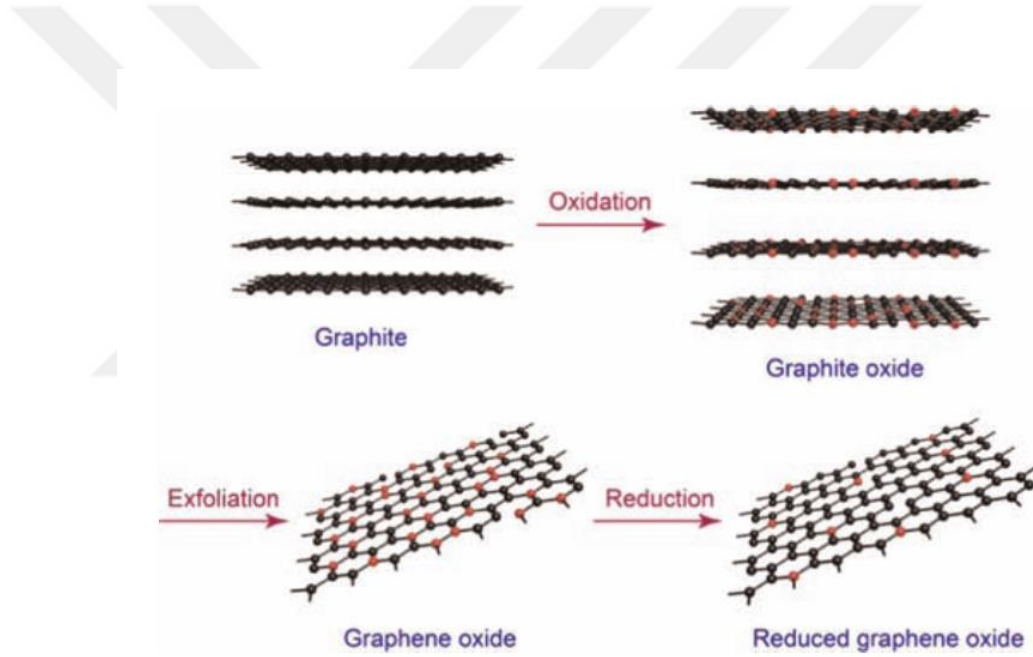
Sp² hibritleşmesi yapan karbon nano üyeleri- fulleren (0), karbon nanotüp (1B) ve grafen (2B) – Feng vd. 2011 Graphene in biomedicine: opportunities and challenges (7)

Grafen fiziksel ve kimyasal özellikleri nedeniyle son zamanların en dikkat çeken malzemelerinden biridir (8). Yüksek elektriksel iletkenliğe (35), geniş yüzey alanına (36), yüksek dayanıklılığa (37), iyi elastik özelliklere (38), iyi bir termal iletkenliğe (39), fonksiyonelliğe, kimyasal inertliğe (40) ve gaz geçirmezliğe (41) sahiptir (42).

GO grafitin kimyasal oksidasyonu ve eksfoliasyonu ile türetilir. GO'nun tarihi 1859'lara dayanır. Bordie GO sentezini ilk kez nitrik oksit buharında grafit sulu harcına bir miktar potasyum klorid ekleyerek 1859'da gerçekleştirmiştir (43). 1898'de, Staudenmaier bu protokolü yoğunlaştırılmış sülfürik asit kullanarak yine

nitrik asit buharında ve reaksiyon boyunca çeşitli alikotlar içinde kloratlar ekleyerek geliştirmiştir. Prosedürdeki bu ufak değişiklik tek bir reaksiyon kabında bol oksitlenmiş GO ortaya çıkarır ve daha pratiktir (44). 1958’de Hummer bugün en çok kullanılan yöntemi yayınlamıştır: grafit $KMnO_4$ ve $NaNO_3$ uygulaması ile oksidize edilir, konsantre H_2SO_4 içinde olmasına dikkat edilmelidir (42,45).

Günümüzde grafen ve türevlerinin sentezi için mekanik eksfoliasyon (8), epitaksiyel büyüme (46), kimyasal buhar çöktürme (47, 48), karbon nanotüplerin açılması (49), GO’in eksfoliasyonu (50), grafitin likit faz eksfoliasyonu (51), iyon ekleme ve eksfoliasyon (52), hidro/solvo termal sentez (53), kimyasal yollar (54), fotokataliz (55), fotodegradasyon (56) ve elektrokimyasal eksfoliasyon’ u (57) içeren yöntemler kullanılabilir (42, 58).

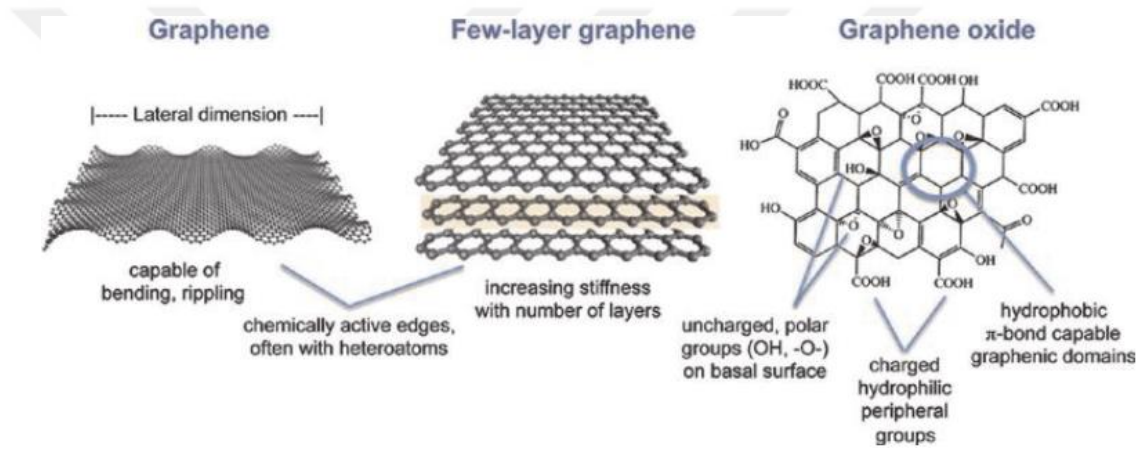


Şekil 5. Grafitten grafen oksit elde edilmesinin şematik diagramı

Grafitten grafen oksit elde etmek için kullanılan kimyasal oksidasyon, eksfoliasyon yöntemleri. Gao ve Duan 2014. 2D and 3D graphene materials: Preparation and bioelectrochemical applications (58).

GO'nun yapısında periferde karboksil grubu bulunur. Bu kolloidal stabilite ve pH bağımlı negatif yüzey yükü sağlar (59). Bazal yüzeyde, hidroksil grubu (-OH) ve epoksit (-O-) fonksiyonel grupları bulunur. Yüksüz, ancak polardır. Alt yüzeyde ayrıca modifiye olmayan grafenik etki alanı bulunur. Bu alan hidrofobiktir ve boya molekülleri ve bazı ilaçlarla π - π bağları yapabilir (60). Özellikle grafen türevleri

diğer karbon malzemelerle kıyaslandığında geniş özel yüzey alanı ($2630 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) (61), üstün elektriksel iletkenlik (230 S m^{-1}) (54,62), $601 \text{ }^\circ\text{C}$ ' ye çıkan oksidasyon direnç sıcaklığıyla mükemmel termal stabilitesi (63), 3080 ile $5150 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$ arasındaki yüksek termal iletkenlik (64), Young modülü'nde yaklaşık 1.0 Tpa ile dikkat çekici mekaniksel dayanıklılık (38) ve %97,7 ile üstün optikal iletkenlik (36) gibi özgün fiziksel ve kimyasal özellikleri nedeniyle elektrokimyada çok çalışılan malzemelerdir (58). Epoksit, karboksil ve hidroksil grupları alt düzlemde ve kenarlarda yerleşim gösterir ve proteinlerle kovalent, elektrostatik ve hidrojen bağları kurmaya olanak verir (6).



Şekil 6. Grafen nanomalzeme ailesinin şematik diyagramı ve biyolojik etkileşimiyle ilgili özellikleri

GO' nun alt yüzeyinde yüksüz, polar gruplar (OH, -O-), periferinde yüklü hidrofilik karboksil grupları bulunur. Alt yüzeyde ayrıca π bağları kurabilen hidrofobik grafenik domain bulunur. Sanchez vd. 2011 Biological Interactions of Graphene-Family Nanomaterials: An Interdisciplinary Review (65).

Grafen özgün fiziksel ve kimyasal özellikleri örneğin geniş yüzey alanı, olağanüstü elektriksel ve termal iletkenliği, güçlü mekanik dayanımı, biyofonksiyonelliği ve seri üretilebilir olması nedeniyle biyosensörler/biyogörüntüleme (optik algılama, floresans görüntüleme problemleri, elektro-kimyasal algılama), elektronik cihazlar (transistörler, solar hücreler, kütle spektrumu için matrisler),

hastalık teşhisi, gen ve ilaç taşıyıcıları, kanser terapisi, fototermal terapi, bakteriyel inhibisyon, antibakteriyel kağıtlar, antiviral malzemeler ve doku mühendisliği alanlarında kullanılır (7, 34, 60, 66). Günümüzde yapısal kopolitler (67), iletken polimerler (67), pil elektrodları (68, 69), grafen süper kapasitörleri (70), taşıyıcı bariyerler (71, 72), yazıcı mürekkepleri (73), antibakteriyel yapısal kâğıtlar (70), ve biyomedikal teknolojiler (67, 74, 75) gibi diğer mühendislik alanlarında da grafen üzerine çalışmalar artmıştır. Atomik incelikte grafen ve GO tabakaları biyoyumlu platformlardır ve doku rejenerasyonu için kök hücre soylarının özelleştirilmesini düzenleme potansiyelleri vardır (76).

2.4. Grafenin biyomedikal alanlarda kullanımı

Biyolojik uygulama alanlarında karbon türevleri çalışmaları diğer alanlara kıyasla daha sınırlıdır. Grafen özgün elektriksel, kimyasal ve fiziksel özellikleri nedeniyle biyomedikal alanlarda ilaç taşıyıcıları, biyosensörler ve doku mühendisliği alanlarında kullanılmaktadır.

2010 yılından başlayarak grafen temelli biyosensörler için önemli makaleler yayınlanmıştır. Bu çalışmalarda temel olarak grafenin kimyasal, optik, elektriksel ve elektrokimyasal özelliklerinden yararlanılmıştır. Pek çok araştırmacı grubu farklı mekanizmalar kullanarak grafen temelli biyosensörler üzerinde çalışmaktadır (68, 77–80). 2008 yılında Mohanty vd. bakteri, DNA ve proteinlerin saptanmasında kullanılabilecek grafen elektronik aygıtını ilk kez başarılı bir şekilde üretmişlerdir (68). Bundan sonra, grafenin elektronik aygıtlarda kullanımını çalışmaları birbirini takip etmiştir (7, 79–83).

Çok geniş yüzey alanı ve mükemmel elektron hareketliliğinden dolayı grafen ya da grafen temelli kompozit malzemelerden glikoz, DNA ve proteinler gibi çeşitli biyomoleküllerin yüksek hassaslıkta ölçümü için kullanılan çeşitli elektrodlar geliştirilmiştir (7, 84, 85). Yüksek hassaslığa sahip elektrokimyasal biyosensörlerin klinik tanı, çevre görüntüleme ve endüstriyel besin ve tarımsal üretimlerin kalite kontrolü gibi geniş kullanım alanları bulunmaktadır (58, 86).

2008’de California (ABD) Stanford Üniversitesi’nden Hongjie ve grubu fonksiyonelleştirilmiş nano GO’yu polietilenglikol (PEG) ile birleştirerek biyoyumlu bir ilaç taşıyıcısı olarak kullanılabileceğini göstermişlerdir (87).

Aromatik anti-kanser ilaçları grafen yüzeyine hücre içi ilaç taşıma için π - π bağları ile etkili bir şekilde yüklenebilir (7). Kitosanın, folik asidin ve PEG GO'ya kovalent bağlanması anti-inflamatuvarların, ve suda çözünen antikanser ilaçların taşınması için potansiyel bir platform oluşturmaktadır (65).

Grafen düz ya da pürüzlü yüzeylere uygulanabilmesi, bükülebilirliği ve yüksek elastisite gibi mekanik özellikleri nedeniyle biyoyumlu filmler, hidrojeller ve diğer yapı iskelesi türleri gibi doku mühendisliğinde sıklıkla kullanılan malzemelerde yer alabilir (65).

In vitro kültür ortamlarında hücreler büyüme ya da komşu hücrelerle etkileşim amacıyla çeşitli maddeler salgılar. Bu maddeler grafen yüzeyi tarafından emilir ve hücre çoğalması ve farklılaşmasını etkiler (6). Oksijenlenmiş grupların varlığı nedeniyle hidrofilik GO, serum proteinlerine elektrostatik bağlarla bağlanabilir (9). Son dönemlerde yapılan çalışmalarla grafen ve türevlerinin insan mezenkimal kök hücreleri, indüklenmiş pluripotent kök hücreleri, insan nöral kök hücreleri gibi çeşitli kök hücreleri için büyümeyi ve kendiliğinden farklılaşmayı destekleyen biyoyumlu substratlar olduğu gösterilmiştir (9).

Pek çok araştırmacı hücre morfolojisi, tutunması, çoğalması ve migrasyonunun hücre-malzeme bağlantıları ile kontrol edilebildiğini göstermiştir (2–5). Hücre davranışını düzenlemede sadece biyomalzemelerin topografisi, pürüzlülüğü ya da sertliği etkili değildir; ek olarak hücre yoğunluğu ve adeziv ligandların dağılımı ve kimyası, substrat elastisitesi de önemlidir ve insan mezenkimal kök hücrelerinde nörojenik, myojenik ve osteojenik markerların upregülasyonunu arttırabilir (88).

Doku mühendisliği ve hücre farklılaşmasında kullanılan karbon nanomalzemeler hücre kültüründe süspanse halde ya da *in vitro* kök hücre kültürlerinde nanomalzemelerle kaplama şeklinde kullanılmaktadır. İkinci yöntem kök hücre davranışını düzenlemede daha çok kabul edilen bir yöntemdir, çünkü nanomalzeme kaplı yüzeyler doğal ekstrasellüler matriksle karşılaştırıldığında kök hücreler için daha özgün bir fiziksel yapı sağlar (7, 9).

GO substratı ile yapılan çeşitli çalışmalarda insan mezenkimal kök hücrelerini adipositlere farklılaşmasını desteklediği, üç boyutlu porlu yapılarda nöral kök hücrelerin nöronlara farklılaşmasını arttırdığı ve pluripotent kök hücrelerin endodermal soylara farklılaşmasını arttırdığı gösterilmiştir (6, 89–91). Özellikle grafenin biyoyumlu ve düşük toksisiteye sahip olması onu terapötik proteinlerin

taşınmasında potansiyel bir malzeme yapar (92). Yumuşak dokulara benzerliği nedeniyle hidrojel kompozitler deri, bez, kıkırdak ve kemik gibi dokuları oluşturmak ya da tamir etmek için geliştirilen yapı iskeleleri olarak yoğun olarak çalışılmaktadır (65).

İnsan nöral kök hücrelerinin nöronlara farklılaştırılması önemli bir biyomedikal gelişmedir, çünkü nöral rejenerasyon için terapötik yöntemler geliştirilmesine olanak sağlar (2). Kimyasal olarak stabil nanoyapılı grafen nöral hücre adezyonu için uygundur. Çünkü nöral hücreler elektroaktiftir ve fonksiyonları elektriksel aktivitelere dayalıdır, yüksek elektriksel iletkenliği grafeni nöral modeller için uygun hale getirir (9).

Park vd. yaptıkları çalışmada immünofloresans görüntüleri GO substratı üzerinde hücre tutunmasının ve hücrelerin nöronlara farklılaşma oranının daha iyi olduğunu, ancak cam yüzeylerde nöronlardan çok glial hücrelere farklılaşma olduğunu göstermişlerdir (91).

Diğer çalışmalar grafen temelli substratların nöral farklılaşmayı desteklediğini göstermektedir. Hong vd. yaptıkları çalışmada PC12 hücrelerinin grafen kaplı ve grafen kaplı olmayan cam yüzeylere ekildiğinde, grafen kaplı yüzeylerde daha çok hücre çoğalması ve nöral farklılaşma olduğunu ve hücre tutunmasının daha iyi olduğunu göstermişlerdir (93).

Wang vd. mezenkimal kök hücreleri florinlenmiş grafen tabakaları üzerinde çalışmış, grafene ekilen hücreler ile karşılaştırıldığında florinlenmiş grafende nöral farklılaşmanın daha çok desteklendiğini gözlemişlerdir (94).

Li vd. üç boyutlu grafen temelli bir yapı iskelesi olan grafen köpük kullanmış, köpüğün fareden alınan nöral kök hücrelerini aktif proliferasyon basamağında tuttuğu gözlemişlerdir (95). Grafen köpüğün porlu yapısı sayesinde nöral kök hücrelerin adezyonu için iyi bir substrat olduğunu, düzensiz yüzeyin mekanik adezyonu arttırdığını saptamışlardır. Ayrıca, yapı iskelesi biyoyumlu; sitotoksikite gözlenmemiş ve hücre canlılığı da etkilenmemiştir. İki boyutlu grafen yapısına kıyasla üç boyutlu yapının daha iyi elektriksel performans gösterdiği ve elektriksel uyarının nöronal farklılaşmayı desteklediği de gözlenmiştir (96).

Tang vd, 2013'de grafen substratlarına nörosferler ekildiğinde 14 günlük kültür sonunda hücrelerin ağsı biçim aldıklarını beta tubulin immünohistokimyasal boyaması ile göstermişlerdir (97). Yeni oluşan nöritler sinaps yapmaya

başlamışlardır. Bu sonuç grafenin nöral aktiviteyi desteklemede kullanılabilecek bir substrat olduğunu doğrulamaktadır.

Shah vd. hazırladıkları grafen temelli bir nanomalzeme ile nöral kök hücrelerin oligodendrositlere farklılaşabildiklerini göstermişlerdir (98). Song vd. üç boyutlu grafen köpüğünün mikroglia hücreleri ile çalışarak anti-enflamatuvar etkisini araştırmışlardır. Sonuç olarak iki boyutlu ve üç boyutlu grafen yüzeyler polistren kültür kaplarıyla karşılaştırıldığında nöroinflamasyonu uyarmadığını hatta üç boyutlu grafenin nöroinflamasyondan koruma özelliğinin olduğunu gözlemlemişlerdir (99).

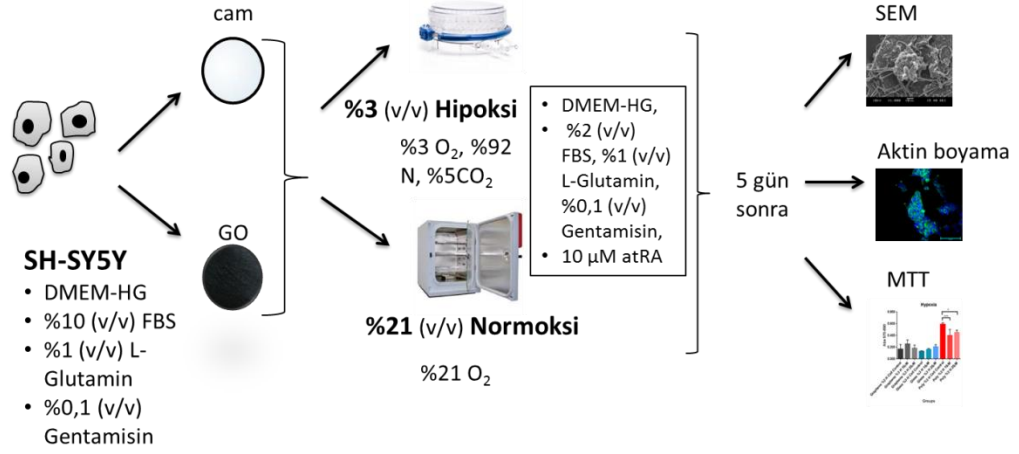
Nanomalzemelerin medikal tanı ve tedavide kullanımı özgün mekanik, optik, elektriksel ve manyetik özellikleri nedeniyle her geçen gün artmaktadır. Li vd. 2011'de grafenin nöral arayüz olarak iyi bir potansiyele sahip olabileceğini göstermişlerdir. Çalışmalarında grafenin hippocampal nöronların primer kültüründe nörit filizlenmesi ve uzamasını desteklediği, nöral ağdaki nöronal performansı arttırdığı ve kök hücre farklılaşmasını sağladığı saptanmıştır (100).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasında kullanılan yöntem özetle:

- GO filmler hazırlanması,
- SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattının Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü, Hayvan Hücre kültürü ve Doku Mühendisliği Laboratuvarı'ndan alınarak GO filmler ve cam yüzeylere ekilmesi,
- Hücrelerin 5 gün hipoksi ve normoksi ortamlarında inkübe edilmesi,
- Hipoksinin etkilerini görmek amacıyla MTT canlılık testi yapılması, SEM görüntülerinin alınması ve aktin sitoiskeleti boyaması yapılması şeklinde planlanmıştır.

Bütün çalışmalar Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Hayvan Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği Grubu Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.



Şekil 7. Tez çalışması deney planı

3.1. SH-SY5Y hücrelerinin çözündürülmesi

1. -196°C (Air Liquide DMC-Cryopal TP 60-60 L)'de stoklanmış olan dondurulmuş (kriyo) tüp çıkartıldı.
2. 37°C'deki su banyosunda bekletildi.
3. Tüp içeriği %10 FBS (Fötal sığır serumu, S0115; BioChrom AG, Berlin, Almanya), % 0.1 gentamisin (BioChrom AG, A2710; Berlin, Almanya), 1% L-glutamin (K0282; BioChrom AG, Berlin, Almanya) ve besi ortamı Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose (D5796-500ML; Sigma, İngiltere) ile bir santrifüj tüpüne (Isolab, Wertheim, Almanya) toplandı.
4. Toplanan hücreler 1000 rpm' de 4°C' de 5 dakika santrifüjlendi (5810 R, Eppendorf, Hamburg, Almanya).
5. Süpernatant döküldü.
6. Hücre pelleti hafifçe tüpün dibine vurularak yüzeyden kaldırıldı ve besi ortamı ile süspanse edildi.
7. Süspanse haldeki hücreler uygun ölçüdeki flaska (SPL Lifesciences Co. Ltd, Gyeonggi, Korea) alındı.

8. Uygun etiketleme yapıldıktan sonra flask 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde (HERA Cell, Heraeus, Almanya) inkübasyona bırakıldı.

3.2. SH-SY5Y hücrelerinin pasajlanması

1. Hücrelerin üzerinde bulunan kullanılmış besi ortamı çekildi.
2. Hücrelerin yüzeyi 37°C'deki Ca⁺² ve Mg⁺², içermeyen PBS (Phosphate Buffer Saline) ile yıkandı.
3. Hücrelerin üzerine tripsin-EDTA solüsyonu (T4D49-Sigma, Saint Louis, Missouri, ABD) eklendi, yüzeye yayıldı ve 4-5 dakika 37°C'deki inkübatörde bekletildi.
4. Tüm hücrelerin yüzeyden kalktığı mikroskop ile gözleendiğinde %10 FBS içeren besi ortamı ile hücreler bir santrifüj tüpüne toplandı.
5. Hücreler 1000 rpm, 4°C'de 5 dakika santrifüjlendi.
6. Santrifüj sonrası, süpernatant döküldü.
7. Santrifüj tüpünün dibindeki hücreler hafifçe vurarak yüzeyden kaldırıldı ve vasat ile süspanse edildi.
8. Hücre süspansiyonu 1:3 oranında yeni bir flaska alındı ve üzerine taze besi ortamı koyularak kültüre devam edildi.

3.3. SH-SY5Y hücrelerinin dondurulması

1. Hücrelerin üzerinde bulunan kullanılmış ortam çekildi.
2. Hücrelerin yüzeyi 37°C'deki Ca⁺², Mg⁺², içermeyen PBS ile yıkandı.
3. PBS ile yıkama yapıldıktan sonra hücrelerin üzerine tripsin-EDTA solüsyonu eklendi, yüzeye yayıldı ve 4-5 dakika 37°C'deki inkübatörde bekletildi.
4. Mikroskop ile tüm hücrelerin yüzeyden kalktığı gözleendiğinde serumlu vasat ile hücreler bir santrifüj tüpüne toplandı.
5. Hücreler 1000 rpm, 4°C'de 5 dakika santrifüjlendi.
6. Süpernatant döküldü.
7. Santrifüj tüpünün dibindeki hücreler hafifçe vurarak yüzeyden kaldırıldı ve dondurma ortamı (%90 FBS + %10 dimetilsülfoksit (DMSO) (1.1-33-30215,

CryoSure-DMSO, Wak-Chemie Mesdical GmbH, Steinbach/Ts, Almanya) ile homojenize edildikten sonra dondurma tüpüne (kriyo t p) (123278, Greiner Bio-one, Almanya) aktarıldı.

8. Kriyo t p -86 C'de köpük kutu içerisine kaldırıldı.

9. -86 C derin dondurucuda bir gece bekletilen kriyo t p, -196 C'deki sıvı azot içeren tanka kaldırıldı.

3.4. SH-SY5Y hücrelerinin büyüme kinetiği eğrisinin çıkarılması

1.Hücreler 96-g zli pleytlere farklı konsantrasyonlarda (5000, 10000, 50000, 100000 ve 500000 hücre/ml) ekildikten sonra düzenli olarak 10 gün boyunca her gün MTT (3-(4,5-dimetilthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid, sarı tetrazolyum tuzu, (Sigma M5655; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Almanya) ile canlılık testi yapıldı.

2. MTT için, pleytteki kullanılmış besı ortamı çekildi.

3. Hücrelerin  zerine %10 MTT (5 mg/ml konsantrasyonda) içeren besı ortamı eklendi.

4. Hücreler karanlıkta 37  C'de, %5 CO₂'li inkübatörde 3 saat süre ile inkübe edildi.

5. 3 saat inkübasyonun sonunda MTT içeren ortam çekildi.

6. Hücrelerin  zerine DMSO (Sigma 41640; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Almanya) eklenerek oluşan formazan kristallerinin üzülmesi saĐlandı.

7. Hücreler 10 dakika boyunca 300 rpm'de çalkalayıcıda çalkalanarak kristallerin iyice  z nmesi sağlandı.

8. UV spektrofotometrede (MDS Molecular Devices, Versa Max, Sunnyvale, CA, USA) 570-690 nm dalga boyunda okutularak absorbans değerleri kaydedildi.

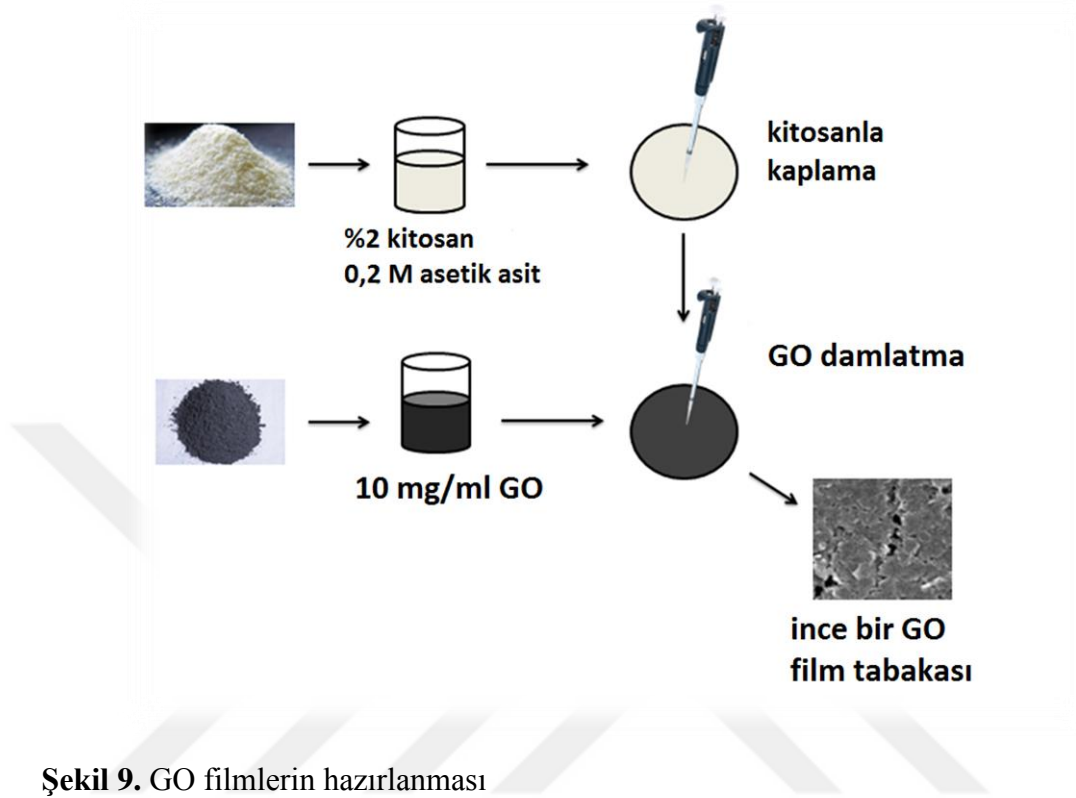
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1												
2		5000 hücre/ml	10000 hücre/ml	50000 hücre/ml	100000 hücre/ml	500000 hücre/ml						
3												
4												
5												
6												
7												
8												

Şekil 8. Büyüme kinetiği için MTT test şablonu

3.5. SH-SY5Y hücrelerine RA uygulaması

Hücrelere farklılaştırma amacıyla 10µM RA (R2625, Sigma, St. Luis, Missouri, ABD) uygulandı. Hücre morfolojilerini gözlemek için 5×10^4 hücre/ml konsantrasyonda 6'lık well plate'e ekim yapıldı ve hücrelerin ters açılı ışık mikroskobu (Olympus CK 40; Olympus, Tokyo, Japan) görüntüleri 1, 3 ve 5. günler için çekildi. Hipoksi stresi sırasında hücrelere besiyeri değişimi gibi herhangi bir müdahale yapılmadığı için hücrelerin besiyeri değişimi yapılmadı.

3.6. Grafen Oksit Filmlerin Hazırlanması



Şekil 9. GO filmlerin hazırlanması

1.GO (Graphene Chemical Industries Co.) firmasından satın alındı. 10 mg/mL GO süspansiyonu distile suda hazırlandı ve homojen bir dağılım sağlamak için manyetik karıştırıcıda 1 gece karıştırıldı.

2.GO'nun yüzeye yapışması için kitosan solüsyonu kullanıldı. 2% (w/v) kitosan (Sigma C3646; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) 0.2 M asetik asit içinde 1 gün manyetik karıştırıcıda çözüldü.

3.Homojen bir dağılım sağlandıktan sonra kitosan solüsyonu cam lamellere lamelin yüzeyini kaplayacak şekilde 100 µl damlatıldı.

4.Ardından GO süspansiyonundan 100 µl yavaşça kitosan filmlerin üzerine damlatıldı.

5.Yüzeyler çeker ocağın altında bir gece kurumaya bırakıldı.

6.Her bir GO kaplı lamel UV ile 2 saat sterilize edildi.

3.7. Hücrelerin yüzeylere ekimi

SH-SY5Y hücreleri Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose (D5796-500ML; Sigma İngiltere) büyüme mediumuna 1% L-glutamine (K0282; BioChrom AG, Berlin, Almanya), 0.1% gentamisin (A2710, BioChrom AG, Berlin, Almanya) ve 10% fötal sığır serumu (FBS) (S0115; BioChrom AG, Berlin, Almanya) içeren besiyerinde 37 °C'da 5% CO₂'li inkübatörde kültür edildi. Deney setleri için hücreler GO filmlere ve cam lamellere 5x10⁴ hücre/ml olacak şekilde ekildi. Ekimden bir gün sonra besiyeri DMEM- High Glucose, 2% FBS, 1% L-glutamine, 0,1% Gentamisin ve 10µM all-trans-retinoik asit (atRA) ile besiyerine değiştirildi. RA hem 10 µM hem de 20 µM konsantrasyonda denendi.

3.8. Hipoksi uygulaması

Hücreler 2 farklı ortamda 5 gün inkübe edildi.

- 1) Hipoksi ortamı: düşük oksijen koşullarını yaratmak amacıyla hipoksi haznesi (27310; Stem Cell Technologies Inc, Vancouver, Kanada) kullanıldı. Gaz oranları 3% O₂, 92% N₂, 5% CO₂ idi. Ortam bir çıkış borusu ile boşaltıldı ve haznenin içindeki havanın istenen O₂ basıncına gelmesi için 5 dakika beklendi. Hipoksi haznesi sıkıca kapatıldıktan sonra 5 gün inkübatöre konuldu.
- 2) Kontrol grubu olan normoksi koşulu (21% O₂) normal inkübatörde yapıldı. Deneyler iki farklı deneme ve her denemede 6 tekrarlı olarak yapıldı.

3.9. Hücre canlılığı testi

Kolorimetrik 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5- diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma M5655; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) testi hücrel metabolik aktiviteyi canlı hücrelerde mitokondrial suksinat-tetrazolium redüktaz'ı sarı tetrazol boyası (MTT)'nı mor renkli formazana dönüştürmesiyle değerlendirilir. Metabolik aktivite arttıkça renk yoğunluğu artar.

Çalışmamızda özetle,

- 1) SH-SY5Y hücreleri inkübasyonu takiben kültür ortamı çekilerek serumsuz DMEM high glucose'a %10 (v/v) MTT stok solüsyonu (PBS içinde çözünmüş 5mg/mL MTT) içeren besiyeri her göze eklendi
- 2) 37 °C' da 5% CO₂'li inkübatörde 3 saat bekletildi.
- 3) Supernatant atıldı.
- 4) Formazan kristalleri dimetilsülfoksit (DMSO, Sigma 41640; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Almanya) içinde çözüldü (101).
- 5) Absorbans değerleri 570 ve 690 nm'de mikropleyt okuyucu VersaMax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, ABD)' da okutuldu.

3.10. Hücre morfolojisinin incelenmesi

Hipoksi stresinden sonra hücrelerin morfolojilerini incelemek için ışık ve SEM fotoğrafları kullanıldı. Faz kontrast görüntüleri inverted ışık mikroskobu (Olympus CK 40; Olympus, Tokyo, Japan) kullanılarak hipoksi stresi öncesi ve 5 günlük hipoksi stresi sonrası görüntüleri çekildi.

Örnekleri SEM'e hazırlamak için

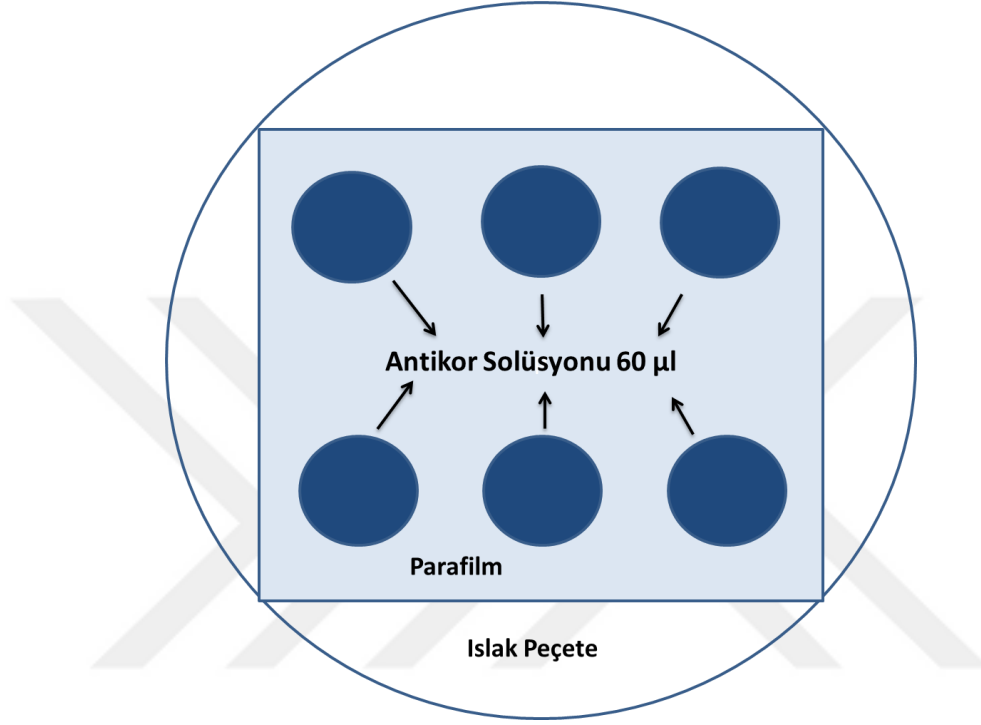
- 1) Örnekler serum fizyolojik ile 30 saniye yıkandı
- 2) 0.1 M sodium cacodylate (Sigma CO250; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Almanya) içinde %5 (v/v) glutraldehit (25%, Merck, 8.20603.1000; Merck, Darmstadt, Almanya) ile 30 dk +4°C 'de bekletildi.
- 3) Glutraldehit aspire edildi ve 0,1 M sodyum kakodilat içinde %7 sukroz 15 dk +4°C'de 2 kere uygulandı.
- 4) Örnekler 0,1 M sodyum kakodilat içinde %2 osmiyum tetraoksit ile 30 dk buz üzerinde post fiksasyona alındı.
- 5) 3 kere distile su ile 5'er dk yıkama yapıldı.
- 6) Etanol serisiyle (35%, 50%, 70%, 85%, 95% ve 100%) ile dehidrasyon yapıldı
- 7) Hekzametildisilazan (HMDS) solüsyonunda 5 dk bekletildi
- 8) 30 dk oda sıcaklığında kurutuldu.

- 9) Kuruma tamamlandıktan sonra SEM incelemesine kadar örnekler desikatör içerisinde bekletildi.
- 10) SEM inceleme öncesi, örnekler pirinç taşıyıcılar üzerine yerleştirildi.
- 11) 200°A kalınlığında altın ile kaplanarak JEOL (JSM-6060; JEOL, Tokyo, Japonya) taramalı elektron mikroskopunda (SEM) incelendi.

3.11. Aktin sito-iskeleti boyaması

- 1) Hücrelerin üzerindeki kullanılmış besi ortamı çekildi ve hücreler Ca^{+2} , Mg^{+2} içeren PBS ile iki kez yıkandı.
- 2) +4 °C'de bulunan soğuk paraformaldehit (PFA) çözeltisi (%4) (USB 19943; USB, Cleveland, OH, ABD) yüzeyler üzerine eklendi ve 300 rpm'deki çalkalayıcıda çalkalanarak, oda sıcaklığında 15 dakika fiksasyon yapıldı.
- 3) Fiksasyon basamağının ardından PFA çekildi ve yüzeyler tekrar Ca^{+2} , Mg^{+2} içeren PBS ile iki kez yıkandı.
- 4) Yüzeyler üzerine 50 mM NH_4Cl (A9434; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Almanya) solüsyonu eklendi ve 300 rpm'deki çalkalayıcıda, oda sıcaklığında, 7 dakika inkübe edildi. Bu basamak ile paraformaldehitten gelen aldehitler uzaklaştırıldı.
- 5) Yüzeyler %0.2 PBS-Triton X-100 (% 0.2) (A1388; AppliChem, Darmstadt, Almanya) ile iki kez 5'er dakika, 300 rpm'deki çalkalayıcıda çalkalanarak, oda sıcaklığında yıkandı. Bu basamak permeabilizasyon basamağı olarak adlandırılır.
- 6) Yüzeyler Ca^{+2} , Mg^{+2} içermeyen PBS ile bir kez yıkandı.
- 7) %0.2 PBS-Triton X-100 içerisinde hazırlanan %3 BSA (Bovine serum albumin, A9647, Sigma, St. Luis, Missouri, ABD) içerisinde oda sıcaklığında 1 saat çalkalayıcıda 300 rpm'de inkübasyon yapıldı. Bu aşama "blocking" olarak adlandırılır.
- 8) Ca^{+2} , Mg^{+2} içermeyen PBS ile bir kez yıkandı.
- 9) Nemli odacık hazırlandı (ıslak peçete, parafilm, petri). Parafilm ıslak peçete üzerine düzgün bir şekilde yayıldı. Boyamanın ilerleyen aşamalarında,

hücreleri ve antikorları karıştırmamak için parafilm üzerine, planlanan boyama şablonuna uygun şekilde numaralandırma yapıldı.



Şekil 10. Nemli odacık. Antikor ile boyama sırasında yüzeyin kurumasını engellemek için tasarlanan nemli alan.

10) Antikor solüsyonları

- 1:1000 DAPI
- 1:100 Alexa Fluor 488 Phalloidin (Invitrogen A12379; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD)
- %1 BSA içeren Ca^{+2} , Mg^{+2} içermeyen PBS içinde hazırlandı.

11) Örnekler 40 dk karanlıkta oda sıcaklığında inkübe edildi.

12) Ca^{+2} , Mg^{+2} içermeyen PBS ile yıkandı.

13) Lameller ters çevrilerek 10 µl Mowiol 4-88 (Calbiochem, Merck 475904; Merck Millipore, Darmstadt, Almanya) mediumuyla kapatıldı.

14) 1 gece 4°C'de kurutmak için bekletildi ve floresans mikroskop (AXIO; Zeiss, Oberkochen, Almanya) ile görüntüledi.

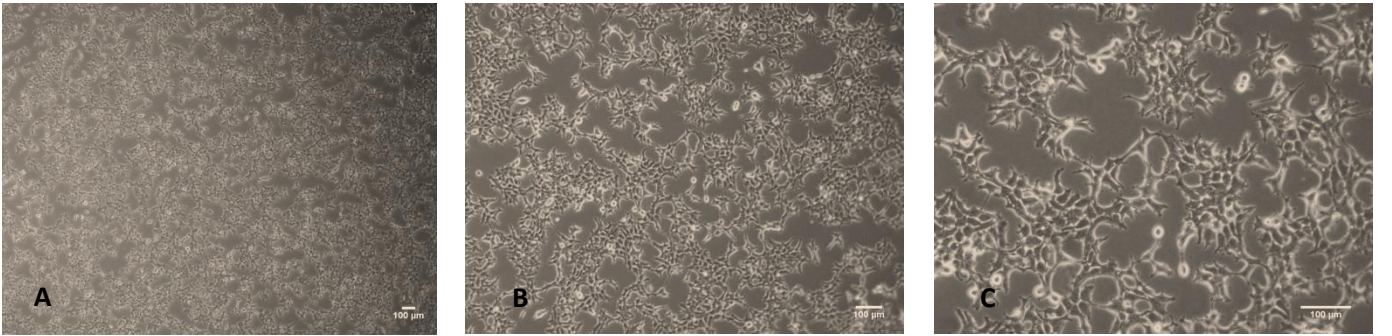
3.12. İstatistiksel Analiz

Hücre canlılığı analizleri için, 2 deney 6 tekrarlı olarak çalışıldı ve ortalama±standart sapma değerlerine göre analiz edildi. İstatistiksel anlamlılık varyansın tek-yönlü analizi (ANOVA) ile ardından Dunnett çoklu karşılaştırması testi ile saptanmıştır. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlılığı gösterdi. Tüm analizler Prism yazılımı (GraphPad Software, La Jolla, CA, ABD) kullanılarak yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. SH-SY5Y hücrelerinin morfolojik görüntüleri

Stoktan çözdürülen SH-SY5Y'lerin hücre morfolojilerinde ve canlılıklarında her hangi bir sorun olmadığı gözlemlendi.

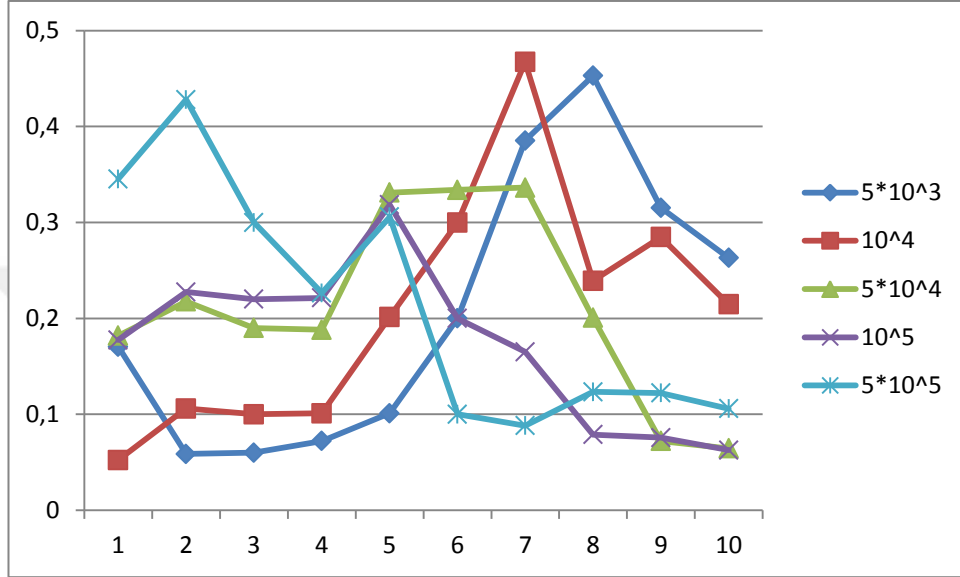


Şekil 11. SH-SY5Y hücrelerinin faz-kontrast mikroskobu görüntüleri

Üç günlük kültürde SH-SY5Y hücrelerinin ters açı ışık mikroskobu görüntüleri (Olympus CK 40; Olympus, Tokyo, Japonya) . A. 5X büyütme, B. 10X büyütme, C. 20X büyütme

4.2. SH-SY5Y hücrelerinin Büyüme Kinetiği Eğrisi

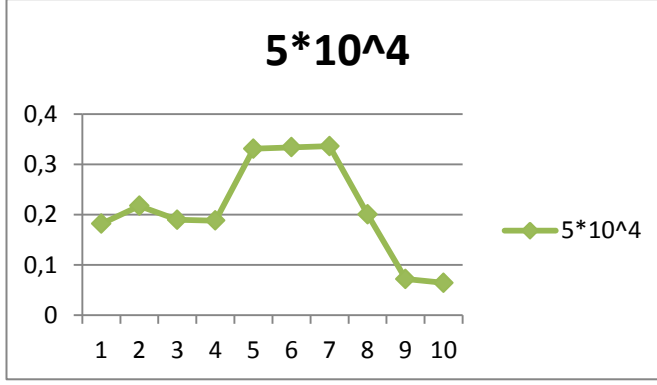
Bu çalışma için en uygun hücre konsantrasyonuna karar vermek amacıyla 5×10^3 , 10^4 , 5×10^4 , 10^5 ve 5×10^5 hücre/ml konsantrasyonlarda ekilip, 10 gün boyunca kültürü yapılan SH-SY5Y hücrelerinin büyüme kinetiği eğrisi çıkarıldı.



Şekil 12. SH-SY5Y hücrelerinin büyüme kinetiği eğrisi

Grafikte farklı konsantrasyonlar için büyüme kinetiği eğrileri bir arada verilmiştir. Y düzleminde bulunan değerler MTT testinden elde edilen absorbans değerleridir (570-690 nm). X eksenini günleri belirtmektedir.

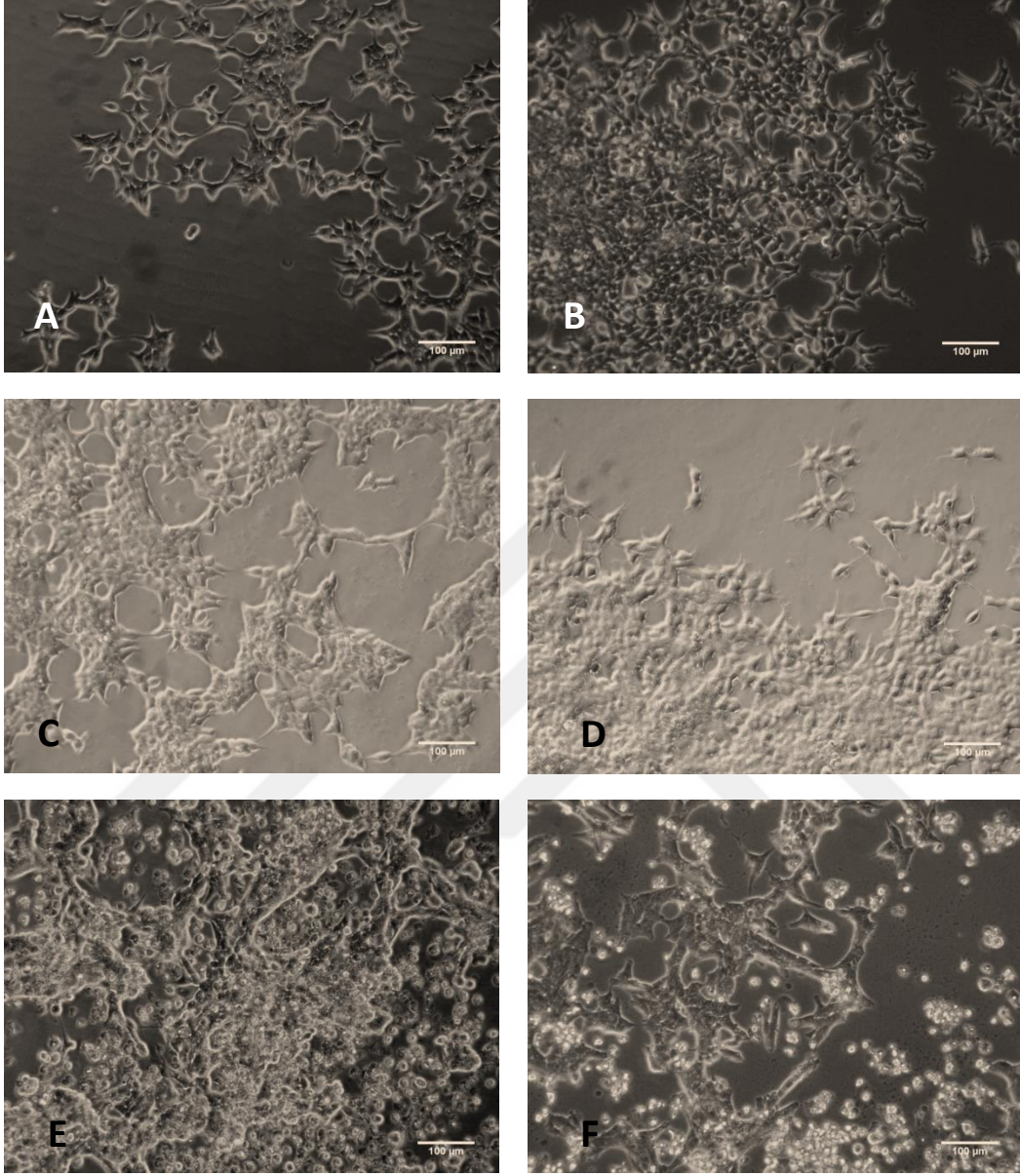
Bizim kullandığımız hücre konsantrasyonu için büyüme kinetiği grafiği **Şekil 13**'de gösterilmiştir.



Şekil 13. 5x10⁴ hücre konsantrasyonu için büyüme kinetiği eğrisi

Büyüme kinetiği eğrilerine göre (**Şekil 12**) uygun konsantrasyon belirlendi ve hipoksi deneyi için 5x10⁴ hücre/ml konsantrasyon seçildi. Bu konsantrasyonda 10 günlük büyüme kinetiği sonrasında çıkan grafiğe göre (**Şekil 13**) hücrelerin her hücrenin karakterine göre değişebilen lag, log plato ve ölüm fazlarını gösterdiği gözlemlendi. Bu grafiğe göre hücrelerin ekimden yaklaşık 1 gün sonra lag fazına girdikleri 4. ve 5. günler arası besiyeri değişikliği yapılması gerektiği ve 5 ve 6. günler arasında da pasajlanması gerektiği görülmektedir. Hücrelerin yaklaşık 5 ve 7. günler arasında plato fazında olduğu ve 7. günün sonunda ölüm fazına girdikleri gözlenmektedir. Bu sonuçlara göre hipoksi süresi 5 gün olarak belirlenmiştir.

4.3. RA uygulaması



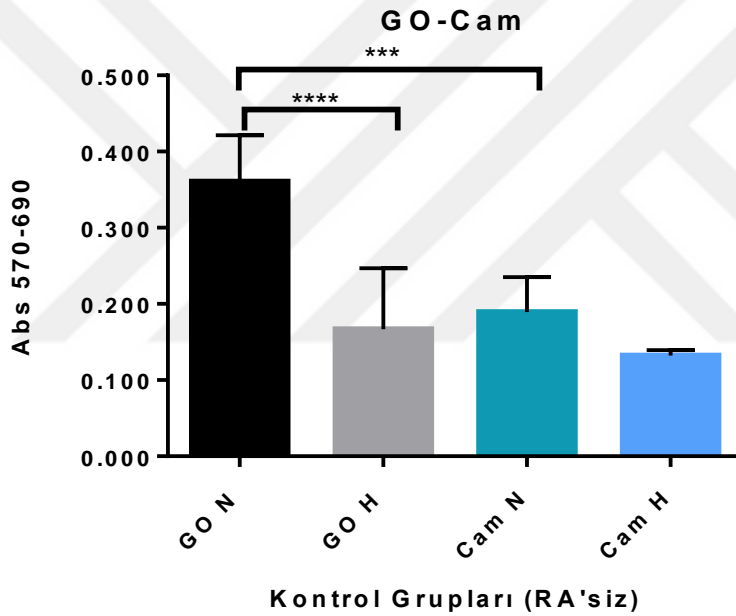
Şekil 14. SH-SY5Y hücreleri üzerine RA uygulaması

SH-SY5Y hücrelerinin 20x büyütmedeki ters açılı ışık mikroskobu görüntüleri (Olympus CK 40; Olympus, Tokyo, Japonya). A. RA uygulaması sonrası 1. gün, B. RA uygulanmamış (kontrol) 1. gün, C. RA uygulaması sonrası 3. gün, D. RA kontrol 3. gün, E. RA uygulaması sonrası 5. gün, F. Kontrol 5. Gün.

RA'nı SH-SY5Y hücreleri üzerine etkisini görmek amacıyla 10^5 hücre/ml konsantrasyonda ekilen hücelere RA uygulaması yapıldı. Hücreleri hipoksi haznesine aldıktan sonra besiyeri değişimi yapılamayacağı için bu denemede de besiyeri değişimi yapılmadı. Nörit uzamasında belirgin bir artış gözlenmedi. 5. günün sonunda hücrelerin çok yoğunlaştığı ve yüzeyden kalktığı gözlemlendi.

4.4. Hipoksi stresi sonrası analizler

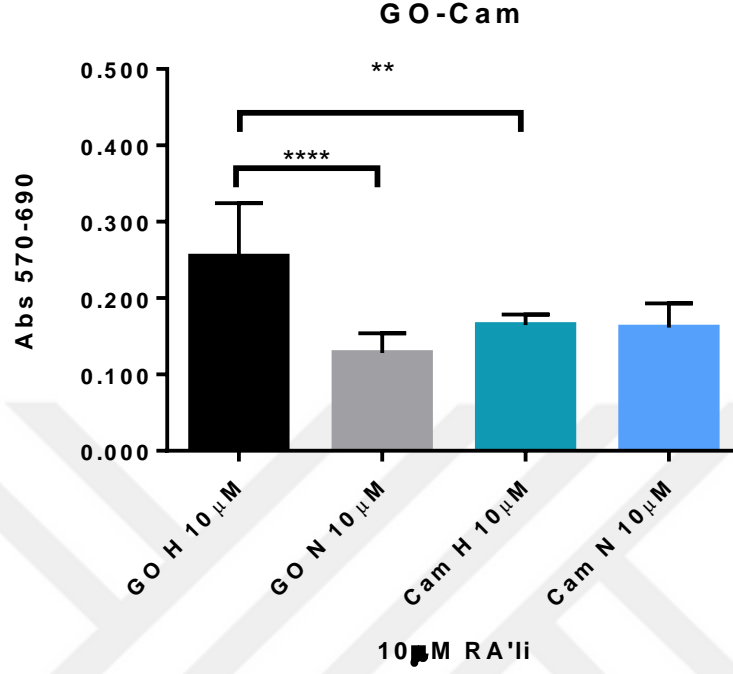
Hücre canlılığı testi- MTT



Şekil 15. Kontrol gruplarının (RA uygulanmamış) MTT absorbans değerleri grafiği

*RA uygulanmamış olan kontrol gruplarının kendi aralarında karşılaştırılması. Grafik MTT testi sonucunda elde edilen absorbans değerlerini vermektedir. *** : $p < 0,0001$,
*** : $p < 0,001$*

Bu grafiğe göre yapılan tek yönlü ANOVA testine göre normoksi ortamında GO ve cam yüzeyler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur. Hipoksi ortamında ise yüzeyler arasında anlamlı bir fark görülmemiştir.



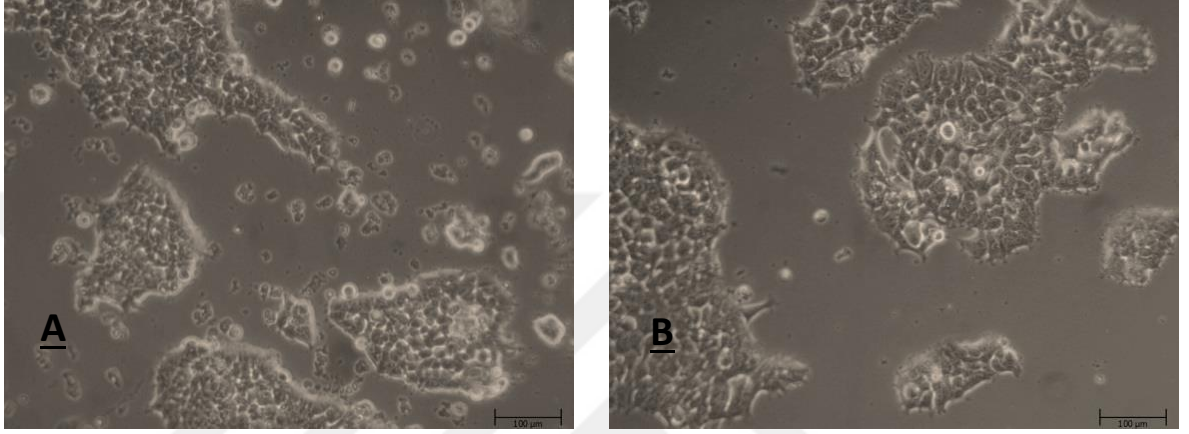
Şekil 16. RA uygulanmış grupların MTT absorbans değerleri grafiği

*RA uygulanmış gruplar kendi aralarında karşılaştırılması. Grafik MTT testi sonucunda elde edilen absorbans değerlerini vermektedir. ****: $p < 0,0001$ ve **: $p < 0,01$*

Bu grafiğe göre yapılan tek yönlü ANOVA testine göre hipoksi ortamında GO ve cam yüzeyler arasında ve GO yüzeyde hipoksi ve normoksi ortamlarındaki absorbans değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bir bulunmuştur.

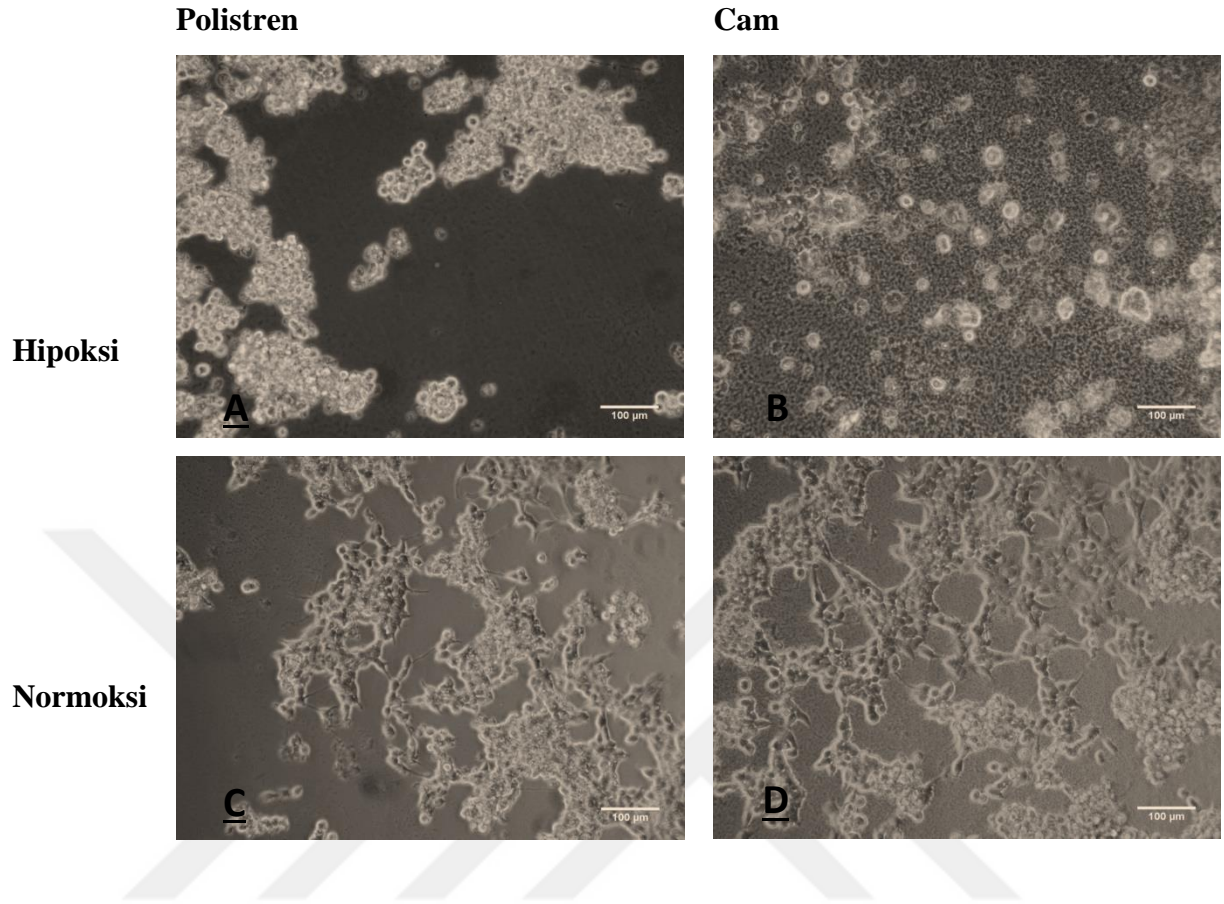
Işık mikroskobu görüntüleri

Yapılan GO filmler ışığa geçirgen olmadığı için ışık mikroskobu görüntüleri alınamadı. Cam ve polistren yüzeylere ekilen SH-SY5Y hücrelerinin hipoksi stresi sonrası ışık mikroskobu görüntüleri incelendi.



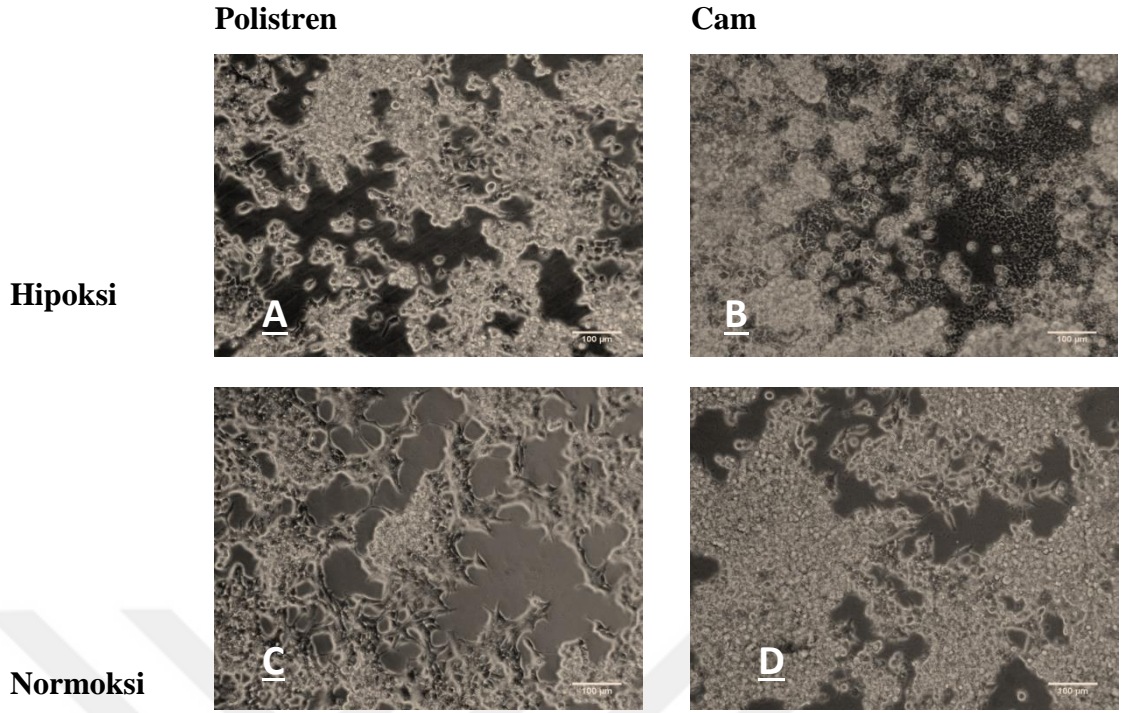
Şekil 17. Hipoksi stresi öncesi ışık mikroskobu görüntüleri

SH-SY5Y hücrelerinin hipoksi stresi öncesi ters açılı ışık mikroskobu görüntüleri (Olympus CK 40; Olympus, Tokyo, Japonya). 20x büyütme. A. Cam yüzey, B. Polistren yüzey



Şekil 18. Polistren ve cam yüzeylerde hipoksi ve normoksi koşulları

Polistren ve cam yüzeylerde hipoksi ve normoksi koşullarında SH-SY5Y hücrelerinin 20x büyütmedeki ters açılı ışık mikroskobu görüntüleri (Olympus CK 40; Olympus, Tokyo, Japonya). A. Polistren yüzey hipoksi koşulu, B. Cam yüzey hipoksi koşulu, C. Polistren yüzey normoksi koşulu, D. Cam yüzey normoksi koşulu



Şekil 19. RA uygulanmamış kontrol grubunun ışık mikroskobu görüntüleri

Polistren ve cam yüzeylerde hipoksi ve normoksi koşullarında RA uygulanmamış SH-SY5Y hücrelerinin 20x büyütmedeki ters açı ışık mikroskobu görüntüleri. A. Hipoksi polistren, B. Hipoksi cam, C. Normoksi polistren ve D. Normoksi cam.

Bu deney düzeneğinde hipoksi ortamının kontrolü olarak normoksi ortamı kullanıldı. RA etkisinin olup olmadığını değerlendirmek amacıyla RA uygulanmamış gruplar RA uygulanmış olan grubun kontrolü olarak kullanıldı.

Sonuçlarımızda,

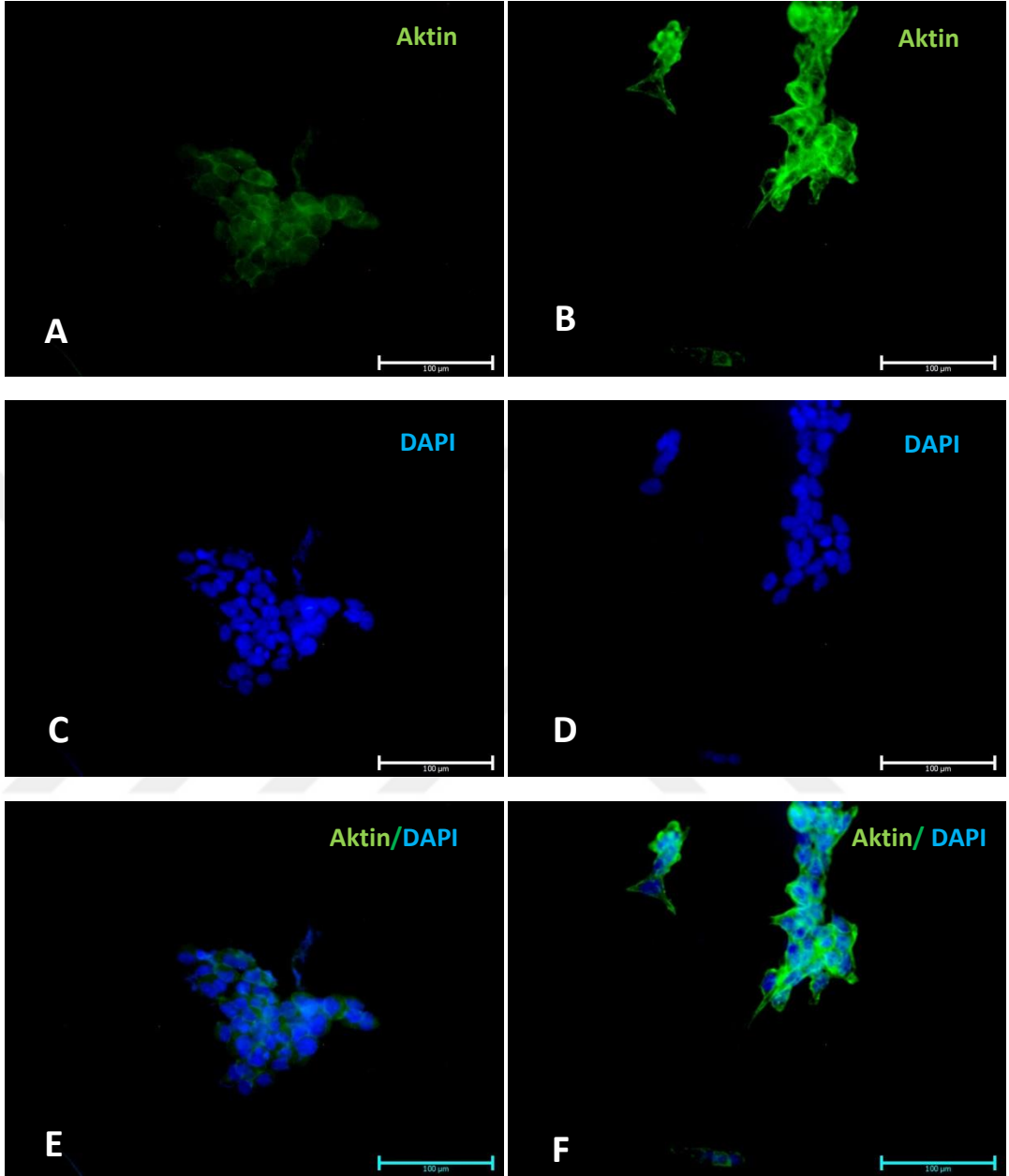
Işık mikroskobu görüntülerine göre hipoksi ortamında RA uygulanmış gruplarda polistren ve cam yüzeylerde hücrelerin morfolojilerinin değiştiği, nöritik oluşumlarını çekip yuvarlaklaştıkları gözlemlendi. Normoksi ortamında ise hala nöritik oluşumlarının bulunduğu ve morfolojilerinde belirgin bir değişiklik olmadığı gözlemlendi.

RA uygulaması yapılmamış gruplarda yine hipoksi ortamında her iki yüzeyde de morfolojilerinin değiştiği, normoksi ortamında ise belirgin bir değişiklik olmadığı gözlemlendi.

Aktin sitoiskeleti boyaması

Hipoksi

Normoksi

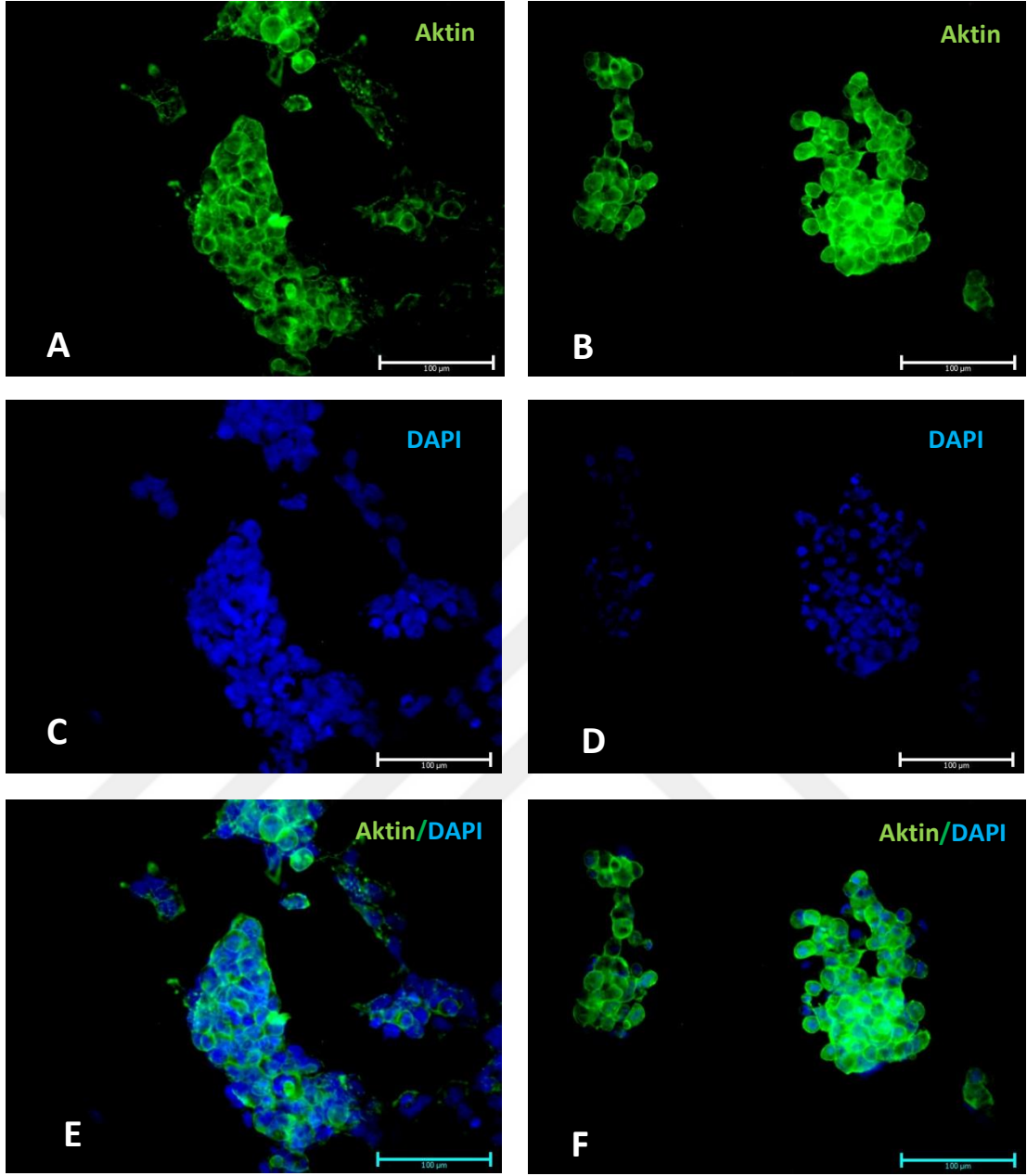


Şekil 20. Hipoksi ve normoksi ortamlarında RA uygulanmış hücrelerin cam yüzeylerdeki floresans görüntüleri.

Şekil cam yüzeyler üzerine ekilmiş ve RA uygulanmış hücrelerin hipoksi ve normoksi ortamlarındaki floresans mikroskobu görüntülerini 40X büyütmede göstermektedir (AXIO; Zeiss, Oberkochen, Germany). A, C ve E. Hipoksi ortamındaki hücrelerin aktin boyaması, B, D ve F normoksi ortamındaki hücrelerin aktin boyaması.

Hipoksi

Normoksi

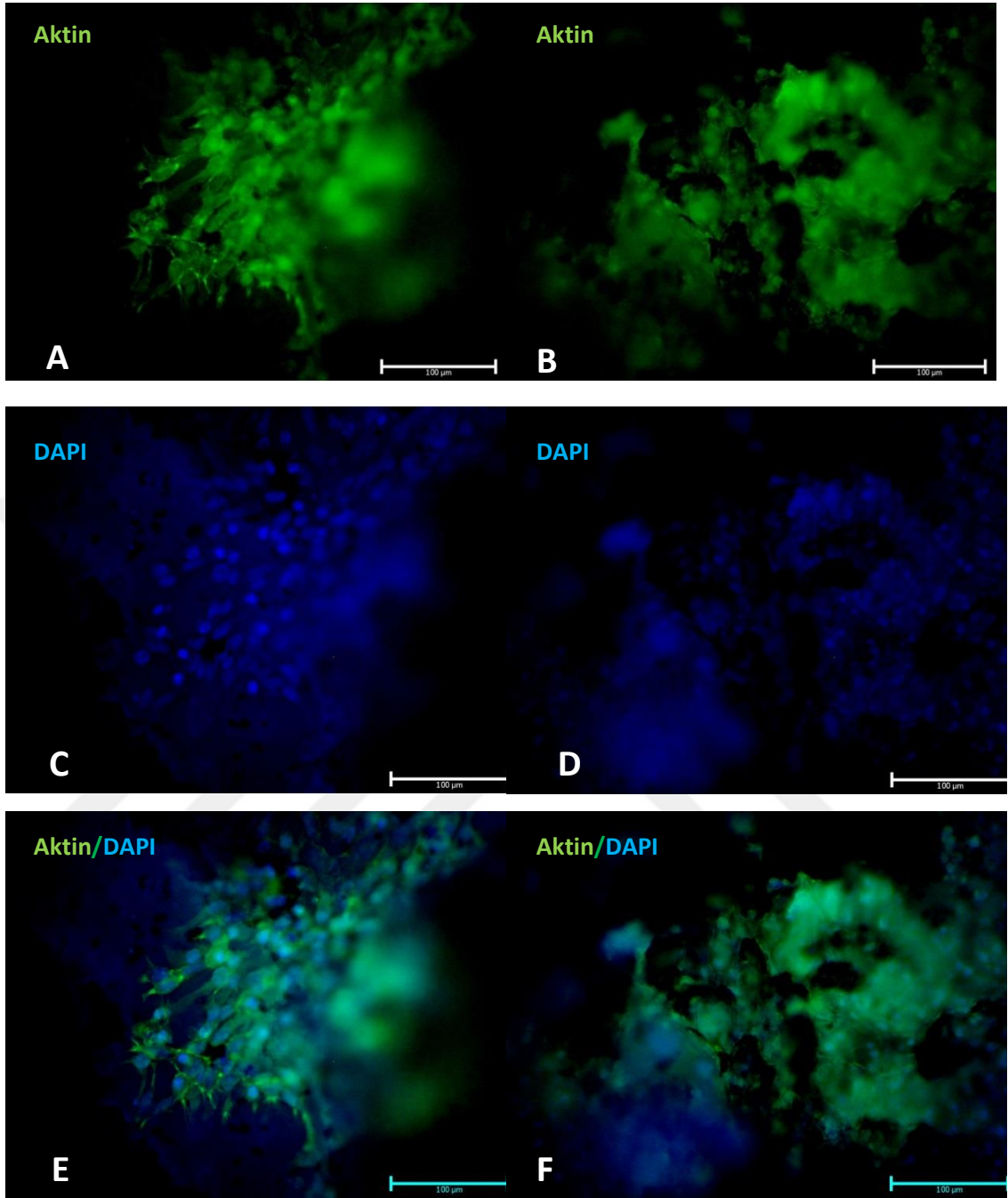


Şekil 21. Hipoksi ve normoksi ortamlarında RA uygulanmamış hücrelerin cam yüzeylerdeki floresans mikroskopi görüntüleri.

Şekil cam yüzeyler üzerine ekilmiş ve RA uygulanmamış hücrelerin hipoksi ve normoksi ortamlarındaki floresans mikroskopi görüntülerini göstermektedir (AXIO; Zeiss, Oberkochen, Germany). A, C ve E. Hipoksi ortamındaki hücrelerin aktin boyaması, B, D ve F normoksi ortamındaki hücrelerin aktin boyaması.

Hipoksi

Normoksi

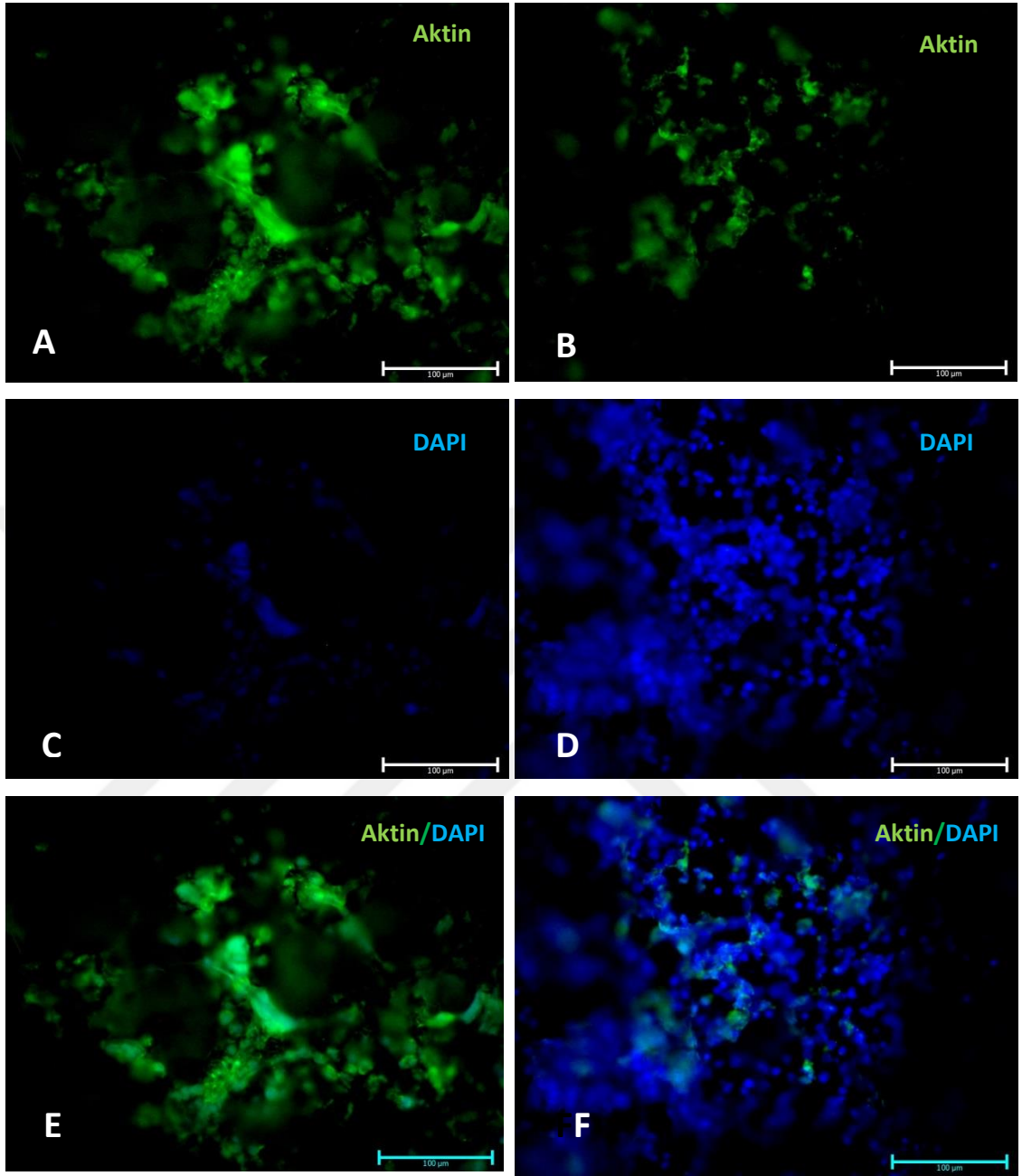


Şekil 22. Hipoksi ve normoksi ortamlarında RA uygulanmış hücrelerin GO yüzeylerdeki floresans mikroskopi görüntüleri.

Şekil GO yüzeyler üzerine ekilmiş ve RA uygulanmış hücrelerin hipoksi ve normoksi ortamlarındaki floresans mikroskopi (AXI0; Zeiss, Oberkochen, Germany) görüntülerini göstermektedir. A, C ve E. Hipoksi ortamındaki hücrelerin aktin boyaması, B, D ve F normoksi ortamındaki hücrelerin aktin boyaması.

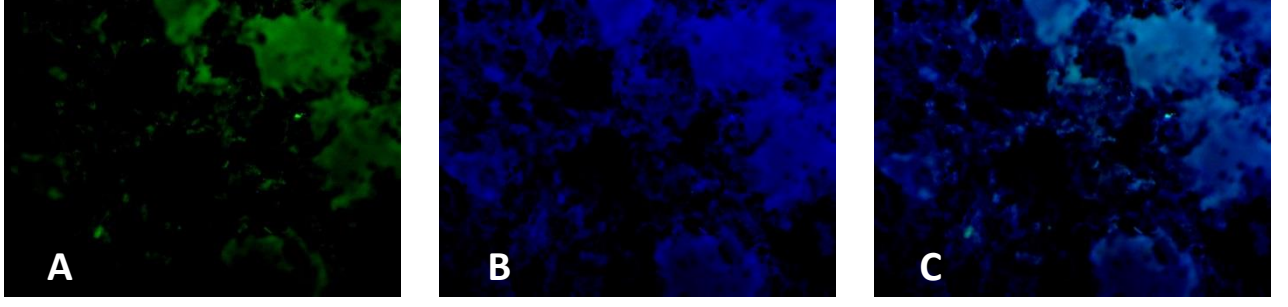
Hipoksi

Normoksi



Şekil 23. Hipoksi ve normoksi ortamlarında RA uygulanmamış hücrelerin GO yüzeylerdeki floresans mikroskop görüntüleri

Şekil GO yüzeyler üzerine ekilmiş ve RA uygulanmamış hücrelerin hipoksi ve normoksi ortamlarındaki 40X floresans görüntülerini göstermektedir (AX10; Zeiss, Oberkochen, Germany). A, C ve E. Hipoksi ortamındaki hücrelerin aktin boyaması, B, D ve F normoksi ortamındaki hücrelerin aktin boyaması.



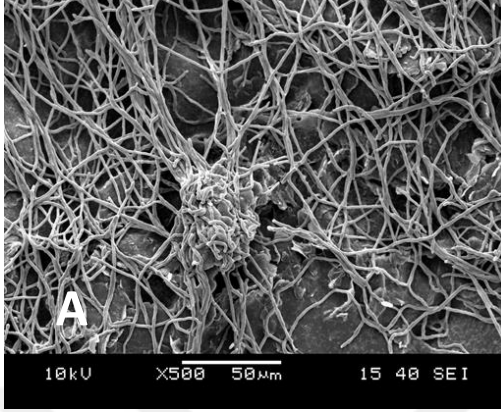
Şekil 24. Hücre ekilmemiş GO yüzeyin floresan mikroskopi görüntüsü

Hücre ekilmemiş GO yüzeyin 40X floresan mikroskopi görüntüsü (AXIO; Zeiss, Oberkochen, Germany). A. FITC, B. DAPI, C. Birleştirilmiş imaj(Merge).

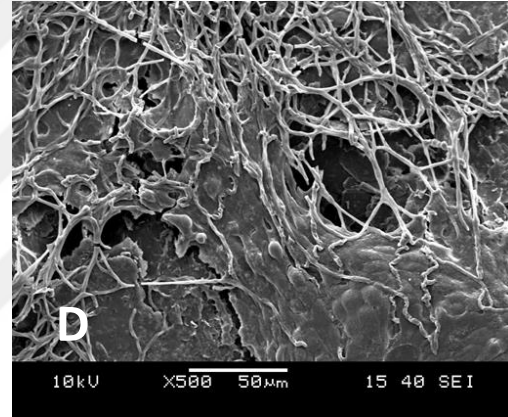
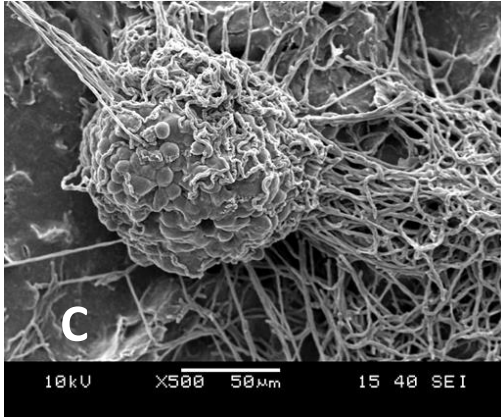
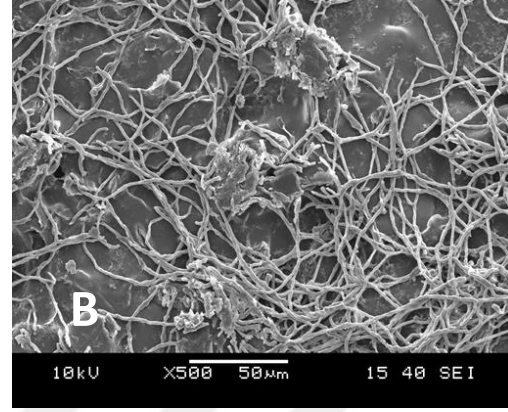
Cam yüzeylerdeki floresans mikroskop görüntülerine göre (Şekil 20 ve 21), RA uygulanmamış grupta (Şekil 20) hücrelerin normoksi ortamında daha iyi sitoskeletal özellik gösterdikleri ve nörin benzeri oluşumlarının bulunduğu gözlenmektedir. Hipoksi ortamında ise hücrelerde nörin benzeri oluşumlar gözlenmemektedir. RA uygulanmamış grupta (Şekil 21) ise hem hipoksi hem de normoksi ortamlarında nörin benzeri oluşumlar gözlenmemektedir. GO yüzeylerdeki floresans mikroskop görüntülerine göre (Şekil 22 ve 23) ise RA uygulanmış grupta (Şekil 22) hipoksi ortamında daha iyi bir sitoskeletal yapı gözlenmektedir, ancak RA uygulanmamış grupta (Şekil 23) her iki ortamda da nörin benzeri oluşum gözlenmemektedir. GO yüzeylerin yapımında kitosan malzemesi kullanılmıştır. Kitosan oto-floresans özelliğe sahiptir; bu nedenle hücre ekilmemiş grafen yüzeylerin de FITC ve DAPI görüntüleri alınmıştır (Şekil 24).

SEM görüntüleri

Hipoksi



Normoksi



Şekil 25. GO yüzeylerdeki hücrelerin hipoksi ve normoksi ortamlarındaki 500X büyütmedeki SEM görüntüleri

A ve B. RA uygulanmış hücreler, C ve D RA uygulanmamış hücreler. (JSM-6060; JEOL, Tokyo, Japonya)

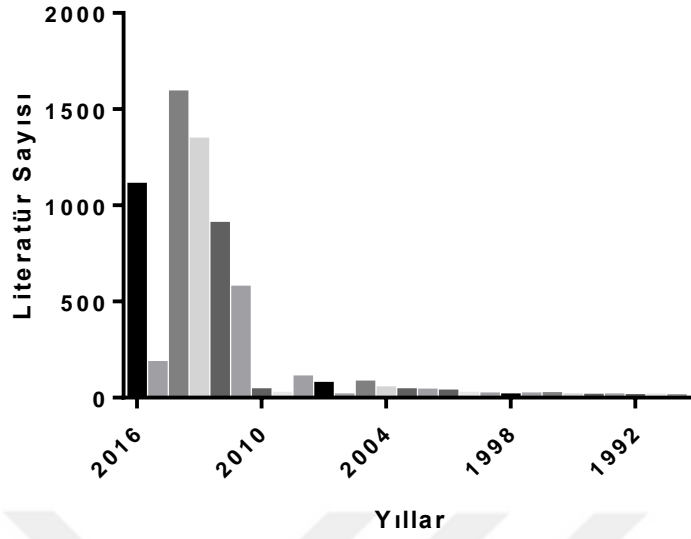
GO yüzeylerde hücrelerin 500X büyütmede SEM görüntüleri alındı (**Şekil 25**). Görüntülere göre RA uygulanmış gruplarda (**A ve B**) her iki ortamda da hücrelerin nörüt uzattıkları gözlemlendi. RA uygulanmamış gruplarda ise (**C ve D**) daha az nörüt gözlemlendi. Hipoksi ortamında bulunan RA uygulanmamış gruplarda (**C**) hücrelerin küresel yapılar oluşturdukları görülürken normoksi ortamında küresel yapılar görülmedi.

5. TARTIŞMA

Merkezi sinir sistemini etkileyen hastalıklarda hasardan etkilenmiş dokulara ulaşım zordur ve bu nedenle sıkça hastalık modellerine başvurulur. Bu hastalıkların patolojik mekanizmalarının aydınlatılması, ilaç geliştirilmesi ve teşhis yöntemlerinin geliştirilebilmesi için çeşitli *in vivo* ve *in vitro* modeller oluşturulmaktadır. *In vitro* modeller *in vivo* modellerden farklı olarak hastalık patogenezinin kültür ortamında ayrıntılı bir şekilde çalışmasını sağlar. Bu modellerde ilaçların olası farmakolojik etkileri çalışılabilir. Sinir sistemindeki biyoteknolojik yaklaşımlar nöral doku mühendisliğine dayanır. Bu alan son zamanların en dikkat çekici konularından biridir. Nöral doku mühendisliği hücre davranışı ve doku gelişiminin üç boyutlu sentetik yapı iskeleleri ile ekstraselüler matriksi taklit edip destekleyerek düzenlenmesine dayanır. Doğal ekstraselüler matriksler topografik, elektriksel ve kimyasal olarak nöral hücrelerin adezyonu ve çoğalması için en uygun ortamı sağlar. Sentetik yapı iskelelerinin de, doğal matriksler gibi biyouyumlu, immünolojik olarak inert, iletken, biyobozunur ve enfeksiyona dirençli biyomalzemelerle yapılmış olması ve nörit oluşumunu desteklemesi gerekir (1).

Grafen ve türevleri fiziksel, kimyasal ve elektriksel özellikleri nedeniyle nöral doku mühendisliğinde son on yılda çok çalışılan malzemelerdendir. Pubmed’de “graphene oxide” anahtar kelimesi ile arama yapıldığında GO’nun son on yıl içinde popülaritesinin oldukça arttığı gözlenmektedir. Bu çalışmaların çok az bir kısmı doku mühendisliği yaklaşımları ve biyomedikal uygulama alanları ile ilgilidir, ancak bu konu üzerine çalışmalar her geçen gün katlanarak artmaktadır. GO anahtar kelimesiyle ilgili yıllara göre literatür sayısı **Şekil 26**’da gösterilmiştir.

PubMed GO



Şekil 26. PubMed'de "graphene oxide" araması (26.06.2016 tarihi itibarıyla)

Bizim çalışmamızda grafenin oksidize edilmiş hali olan GO *in vitro* kültür ortamında nöral hücreleri destekleyebilecek ve ekstrasellüler matriksleri taklit edebilecek bir yapı iskelesi şeklinde üretildi. GO'nun yüzeye tutunmasını sağlamak amacıyla cam yüzeyler önce doğal bir polimer olan kitosan ile kaplandıktan sonra GO damlatılarak ince bir film tabakası elde edildi. Doğada en çok bulunan ikinci biyopolimer olan kitinin deasetilasyonu ile elde edilen kitosan, biyoyumlu ve biyobozunur bir polikasyonik polimerdir. Yapısal olarak glikozaminglikanlara benzer ve kemiğin ekstrasellüler matriksinin temel bileşenidir. Tek başına jelleşebilir ya da biyolojik adesif olarak kullanılabilir (60). Daha önceki yapılan çalışmalarda genellikle GO ve kitosanın belirli oranlarda karıştırılmasıyla elde edilmiş filmler üzerinde çalışılmıştır. Örneğin Zuo vd. 2013' de yaptıkları çalışmada bir GO-kitosan nanokompozit film üretmişlerdir. Yaptıkları kompozitin biyoyumluluğunu C3H10T1/2 hücreleri ile *in vitro* ortamda test etmişler ve GO-kitosan kompozit filmlerin fonksiyonel bir biyomateryal olarak kullanılabilceği sonucuna varmışlardır. GO'nun karboksil grubu ile kitosanın amin grubu kovalent bağlar oluşturur. GO-kitosan termal olarak kitosandan daha stabildir. GO-kitosan film biyoyumlu ve biyobozunurdur. Hücre çoğalması ve hücre canlılığı testlerinde GO-

kitosan filmlerin hücre çoğalması için uygun olduğunu göstermektedir ve (102). Başka bir çalışmada, GO suda disperse edildikten sonra asetik asit içinde çözünmüş kitosan solüsyonuyla karıştırılarak bir kitosan/GO nanokompoziti üretilmiştir. Ancak Bu çalışmada yalnızca malzeme özellikleri çalışılmıştır (103). Pan vd. 2011’de yaptıkları çalışmada GO/kitosan nanokompozit filmler üretmişler, ürettikleri nanokompozitin mekanik özelliklerini çalışmışlardır (104).

Kitosan yapı iskelesindeki negatif yüklü grafen oksit hücre-yapı iskelesi davranışını etkileyen önemli bir faktördür; ayrıca, yapı iskelesinin biyouyumluluğunu ve degradasyon ürünlerini etkileyerek avantaj sağlar. GO yapı iskelesinin kitosanın porlu yapısıyla olan bağlantısı, su tutması ve hidrofilik yapısı ile hücre tutunması ve çoğalması kolaylaşır. Ürettikleri malzeme porlu yapısı ile hücre - hücre bağlantılarına izin verir. Ayrıca, besiyerinin yapı iskelesi boyunca yayılmasını sağlar; bu da hücre adezyonuna izin verir. Malzeme bu özellikleriyle kemik doku mühendisliğinde de kullanılabilir (105).

Fan vd. yaptıkları çalışmada grafeni asetik asit içinde disperse hale getirip kitosanı bu solüsyon içinde çözerek bir grafen-kitosan kompozit film elde etmişlerdir. Bu kompoziti L929 hücreleri ile denemişler ve MTT testine göre bu yüzeylerin biyouyumlu olduğunu göstermişlerdir (106).

Bizim çalışmamızda hazırlanan GO filmler üzerine insan nöroblastoma hücre hattı olan SH-SY5Y hücreleri ekildi. Cam yüzeylerle karşılaştırıldığında GO filmlerde hücrelerin çoğalması ve tutunmasının GO film üzerinde daha fazla olduğu gözlemlendi. Hücreler stres koşullarına GO yüzeyler üzerinde cam yüzeylerdekine göre daha fazla direnç gösterdi. GO yüzeyler üzerinde daha fazla nörit oluşumu ve daha uzun nörit yapıları gözlemlendi.

Lv vd. yaptıkları çalışmada SH-SY5Y hücreleri ile GO nanotabakalarının sitotoksitesisi çalışılmıştır. Hücre canlılığı yüksek konsantrasyonlarda ($\geq 80 \mu\text{g/mL}$) doza ve zamana bağlı olarak azalmıştır ancak GO kaynaklı apoptoz gözlenmemiştir. Farklılaştırma için sadece RA uygulanmış gruplarla kıyaslandığında RA-GO uygulanmış gruplarda nörit uzunluğu ve MAP2 ekspresyonunda anlamlı derecede artmıştır (107). Dolayısıyla bu çalışma bizim sonuçlarımızı desteklemektedir. **Şekil 25**’deki SEM görüntülerine göre RA uygulanmış gruplarda daha fazla ve daha uzun nörit gözlenmektedir.

Grafen daha önce de bahsedilen özellikleri- elektriksel iletkenliği, elastisitesi, protein emebilmesi ve düşük moleküler ağırlıktaki bileşenleri- nedeniyle kök hücre farklılaşması ve çoğalmasında etkili bir malzemedir. Hücreler komşu hücrelerle iletişim kurabilmek ve büyümek için çeşitli maddeler salgılar. Bu maddeler grafen yüzeyince emilir ve hücre çoğalması ve farklılaşmasına etki eder (6). Li vd. nöritlerin saf grafenden nasıl etkilendiğinin mekanizmasını araştırmış ve grafenin nöral hücrelerle son derece biyouyumlu bir malzeme olduğunu göstermişlerdir. Nöral hücrelerin canlılığı ve grafen yüzeyinde nörit uzunluğu polistren doku kültür kaplarıyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha uzundur bu da grafenin nöron uyumlu bir yüzey olduğunu gösterir. Diğer analizler, grafenin growth-associate protein-43 (GAP43) ekspresyonunu arttırdığını göstermektedir (100). Sinir sistemi gelişimini gösteren önemli işaretlerden biri olan GAP-43 ekspresyonunun artışı nörit oluşumu ve nörit uzamasını artırır. Bu durum Ryu ve Kim tarafından 2013’ de yayınlanan bir makalede kimyasal buhar çöktürme ile elde edilen grafen substratının topografik olarak nöronları çevreleyen matriksi taklit ettiği ve nöron gelişimini desteklediği, ayrıca grafenin yüksek elektriksel iletkenliğinin nöronların nörit gelişimini desteklediği şeklinde açıklanmıştır (9).

Grafenle yapılan başka bir çalışmada insan mezenkimal kök hücrelerinin osteojenik farklılaşmayı desteklediği ve kontrol ettiği gösterilmiştir. Nayak vd. yaptıkları çalışmada osteojenik besiyerinde grafenin kemik hücrelerine farklılaşmayı arttırdığını göstermişlerdir. Bu çalışmada grafen substratının etkisini araştırmak üzere 4 farklı yüzey kullanılmıştır. Kullanılan yüzeyler polidimetilsiloksan (PMDS), polietilen tereftalat (PET), cam yüzeyler ve Si/SiO₂ yüzeyleridir ve çeşitli sertlik ve yüzey pürüzlülüğüne sahiptir. Çalışma grafenin kemik hücre formasyonunu desteklediğini göstermiştir. GO ve PMDS’nin de insan mezenkimal kök hücrelerinin adipojenik ve osteojenik farklılaşması üzerine etkili olduğu gösterilmiştir (4). Mezenkimal kök hücrelerin grafen, GO ve sadece PMDS üzerindeki şekilleri her yüzeyde birbirinden farklıdır. PMDS üzerindeki hücreler daha yuvarlak şekilli ve filopod uzantılarından yoksundur. Ancak, grafen ve GO üzerindeki hücreler hücresel uzantılara sahiptir. Grafen film üzerindeki hücreler homojen olarak dağılmış ve iğ şeklinde görünüme sahipken GO film üzerindeki hücreler daha yaygın ve daha büyüktür. Yüzeylerin serum proteini absorpsiyonları da çalışılmıştır. Grafenin serum proteinlerinin %8’ ini ve GO’ nun ise %25’ini absorbe ettiği gözlenmiştir. Serum globulin, albümin ve fibronektin gibi pek çok ekstrasellüler matriks glikoproteinini

içerir (108). Grafende bulunan π -elektron bulutu proteinlerin daha içerdeki hidrofobik çekirdeği ile etkileşir. Oksijenlenmiş gruplarının bulunması nedeniyle hidrofilik GO serum proteinlerine elektrostatik bağlarla bağlanır. GO'nun serum proteinlerini daha çok absorbe etmesi demek hücrelerin tutunması ve büyümesi için ortamda daha yoğun adezyon moleküllerinin bulunması demektir (9).

Chen vd. uyarılmış pluripotent kök hücrelerin farklılaşmasını grafen, GO ve cam yüzeylerde çalışmışlardır. Grafen ve GO, uyarılmış pluripotent kök hücrelerle biyouyumludur ve bu hücrelerin tutunması ve çoğalmasını destekler (90). Nöral kök hücrelerin beyin dokusu tamiri ve nöral rejenerasyonda kullanılabilmesi için insan nöral kök hücrelerinin glialardan çok nöronlara farklılaşmasının sağlanması gereklidir. Park vd. yaptıkları çalışmada insan nöral kök hücrelerini grafen kaplı cam yüzeylerde nöronlara farklılaştırmışlardır. İnsan nöral kök hücreleri cam yüzeylerdeki kontrol grubu ile karşılaştırıldığında grafen yüzeylere daha çabuk tutunurlar. Farklılaştırmadan 3 hafta sonra grafen ve cam yüzeylerdeki hücreler arasında morfolojik açıdan belirgin bir farklılık olduğu görülmüştür. Bir ay sonra cam ve grafen yüzeyler farklılaşma açısından benzer özellik gösterirler, ancak grafen yüzeyindeki farklılaşma daha stabildir. Sonuçlar grafen substratında nörona farklılaşmanın daha çok olduğunu göstermiştir (91).

Hong vd. 2014' de PC12 ile yaptıkları çalışmada grafen kaplı olan ve olmayan cam yüzeylerle çalışmışlar ve grafen kaplı yüzeylerde daha yüksek hücre çoğalması ve farklılaşmasıyla birlikte daha çok hücrenin yüzeye tutunduğunu göstermişlerdir (93). Li vd. yaptıkları çalışmada üç boyutlu yapı iskelesi olarak yeni bir grafen köpük geliştirmişlerdir. Bu köpüğün fareden alınan nöral kök hücrelerin çoğalma ve büyümelerini düzenlediğini gözlemlemişlerdir (95). Köpük porlu yapısı ve düzensiz yüzeyi ile mekaniksel adezyonu desteklemiş ve nöral kök hücrelerin tutunması için çok uygun bir yüzey olmuştur. Bu yapı iskelesi biyouyumludur, çünkü toksisite göstermemiş ve hücre canlılığı etkilenmemiştir. Ek olarak, bu üç boyutlu yapı iki boyutlu yapılar ile kıyaslandığında daha iyi bir elektriksel uyarı performansı göstermiştir ve bu elektriksel özelliği nöral farklılaşmayı desteklemiştir (109). Shah vd. grafen temelli nanomateryalle hibrit bir yapı iskelesi geliştirmişlerdir. Bu hibrit nanofibröz malzeme nöral kök hücreleri oligodendrositlere farklılaştırmıştır. GO'nun elektrospin yöntemiyle uygulanmasıyla iyi bir yüzey kaplama malzemesi ortaya çıktığı ve bu malzemenin nöral kök hücrelerin oligodendrositlere farklılaşmasını desteklediği gösterilmiştir (98).

Yang vd.'nin çalışmasında grafen ve karbon nanotüpler fare embriyonik kök hücrelerinin dopaminerjik nöronlara farklılaşmasını arttırmıştır. Embriyonik kök hücreler 3 farklı yüzeye ekilmiştir ve stromal hücreye farklılaşmayı destekleyen bir metod kullanılmıştır. Farklılaşmadan 14 gün sonra, GO yüzey hücrelerin dopaminerjik nöronlara farklılaşmasını önemli derecede arttırmış, ancak grafen ve karbon nanotüplerin dopaminerjik farklılaşma üzerine önemli bir etki ya da desteği olmamıştır (110). Tang vd. nörosferleri grafen yüzey üzerine ekmişler ve kültürde 14 gün sonra nöronlar arasında ağ oluşmaya başladığı ve yeni oluşan nöritlerin sinaps oluşturmaya başladığı beta tubulin immunoboyaması ile gösterilmiştir. Bu sonuçlar grafenin nöral aktiviteyi destekleyen bir yüzey olduğunu bir kez daha göstermiştir (97).

Bu tez çalışmasında hipoksi stres koşulları GO ve cam yüzeyler üzerine ekilmiş SH-SY5Y hücreleri üzerinde araştırılmıştır. Memeli sinir sisteminin embriyonik aşamasının gelişiminde, nöral kök hücrelerin farklılaşmasının ve büyümesinin düzenlenmesinde oksijen önemli bir rol oynar (111). Hipoksi embriyogenez ve kök hücre modülasyonu (farklılaşma/çoğalma) ya da iskemik felç ve kanser gibi fizyolojik ve patolojik durumlarda yer alır. Hipoksi *in vivo* ortamda embriyolarda, yeni doğanda ve yetişkinlerde nörogenezi tetikler. Diğer yandan, oksijen ve ROS (reactive oxygen species) *in vitro* ortamda nöronal farklılaşmada da rol oynar. Ayrıca, nöroblastoma gibi tümörlerin gelişimine, hücre çoğalması ve farklılaşmasına etki eder. Bu nedenle, nörogenezi ve nöronal farklılaşmayı arttırmak ya da düzenlemek gerekirse hipoksi ortamı ve ROS üretimini baskılamak yararlı bir terapötik araç olabilir (112).

HIF-1 α aktivitesi tüm beyin iskemisi, fokal iskemi ve yenidoğan hipoksi/iskemi hayvan modellerinde çalışılmıştır (113). İskemi ve oksidatif strese karşı HIF'le düzenlenen hayatta kalma ya da proapoptotik süreçler multiple skleroz gibi bazı nörodejeneratif hastalıklar ile patofizyolojik bileşenlere sahiptir (114).

Alzheimer Hastalığı, frontotemporal demans, prion hastalıkları, Parkinson hastalığı, Huntington hastalığı ve amiyotrofik lateral skleroz gibi nörodejeneratif hastalıklar yanlış katlanmış proteinlerin agregasyonu ile ilişkilidir. Bu proteinler nöronlarda hücresel ve nöroinflamatuvar stres yanıtlarını tetikler. Örneğin, β -amiloid peptid (β A) birikimi Alzheimer hastalığı ile ilişkilidir ve hücre ölümünden sorumlu primer toksik ajan olarak kabul edilir. Bu hastalığın patolojisinde HIF bir feedback

(geribesleme) mekanizması olabilir. β A HIF-1 α aktivitesini artırır. β A ile artan oksidatif stresle mücadele için yardımcı antioksidan mekanizmalar upregüle edilir. ROS' un HIF aktivitesini düzenlemesi ile β A-aracılı HIF aktivitesi ile ROS üretimi düzenlenir. β A gibi nörotoksik peptidlerle sürekli strese maruz kalma durumunda hücre ölümü tetiklenir (113).

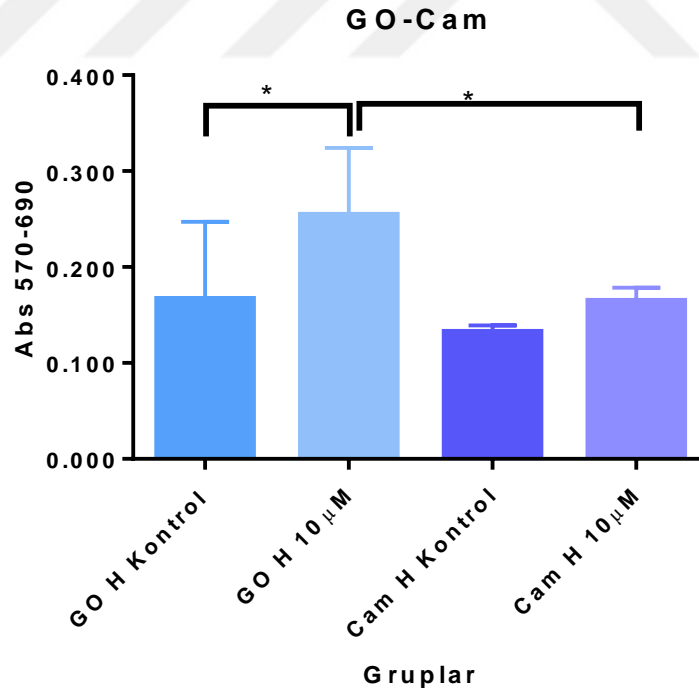
Smith vd. 2011'de kronik hipoksi durumunun SH-SY5Y hücrelerinin Ca⁺² depoları ve hücre içi Ca⁺² üzerine etkilerini araştırmışlardır. Hipoksi %2,5 olarak 48 sa uygulanmıştır. Kronik hipoksi uygulamasını takiben hücre içi Ca⁺² artmıştır. Bu *in vitro* model kronik hipoksi durumunda hücre fonksiyonlarının modellenmesi ve nöronal farklılaşma bozukluğu veya ölümünün uzun dönemli hipoksi ya da iskemi durumunun modellenmesinde kullanılabilir (115).

Nöral kök hücre nişinde, nörogenezin olduğu yerde, oksijen konsantrasyonu %2,5–3'tür (116). Bu oksijen basıncı nöral kök hücrelerin çoğalması ve farklılaşması için çevresel ipuçları verir (116). Çeşitli *in vitro* yaklaşımlarda nöral kök hücre çoğalması ve nöronal farklılaşmasının düşük oksijen konsantrasyonlarında arttığı gösterilmiştir (117). Binh vd. 2014'de yaptıkları çalışmada hipoksinin nöronal farklılaşma için gerekli olduğu belirtilmiştir, ancak nöral gelişimin farklı aşamalarında farklı yanıtlar oluşur. Örneğin erken safhada hipoksi nöral farklılaşmayı inhibe ederken, ileri safhalarda nöral farklılaşmayı artırır (111). Kök hücre ya da progenitör hücrelerin düşük oksijen konsantrasyonları altında büyütülmesinin kullanılan hücre modeline göre hem hücre çoğalmasını hem de nöronal farklılaşmayı arttırdığı görülmektedir. MSS'i etkileyen çoğu kanser, kök hücre popülasyonlarının varlığından kaynaklanır ve kanser kök hücreleri olarak da bilinirler (117). Kanser kök hücrelerin çoğalması ve farklılaşmasının düzenlenmesi tümör büyüklüğünü kontrol altında tutmada önemlidir. Hücreler doğal olarak hipoksik ortamdadırlar (116). Hipoksi nöroblastoma hücrelerini nöral krista hücrelerine farklılaşmaya iter ve bunu HIF-1a ve HIF-2a'yı dengede tutarak yapar (117, 118).

Bhaskara vd. tekrarlayan hipoksi ya da aralıklı hipoksi olarak bilinen durumun nöroblastoma hücreleri üzerindeki etkisini incelemişlerdir. 24sa'lik hipoksi ve normoksi koşullarını 10 döngü olarak uygulamışlar ve tekrarlayan hipoksinin nöroblastoma hücrelerini baskıladığını ve kök hücre karakterini desteklediğini göstermişlerdir (119). Poomthavorn vd. 2009'da yaptıkları çalışmada SH-SY5Y ve

SK-N-MC nöroblastoma hücrelerine CoCl_2 ile 48 sa hipoksi uygulamışlar ve hücre sayıları etkilenmemiş olsa da mitokondriyel aktivitenin SH-SY5Y'lerde $\sim\%50$ 'ye, SK-N-MC hücrelerinde ise $\sim\%70$ 'e düştüğünü saptamışlardır (120).

GO yüzeylerde RA uygulanmış grupta hipoksi stresi sonrasında cam yüzeylere göre MTT canlılık testine göre daha fazla absorbans değeri alınmıştır (**Şekil 16** ve **27**), GO ile cam yüzeyler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır. RA uygulanmamış gruplarda ise GO ile cam yüzeyler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur (**Şekil 27**). Bu durum RA'nın koruyucu etkisinden kaynaklanıyor olabilir. Cheung vd. 2009'da yaptıkları çalışmada her iki RA ile farklılaştırılmış ve farklılaştırılmamış hücrelere 6-OHDA uygulaması yapılmış, RA ile farklılaştırılan grubun toksisiteye toleransının daha yüksek olduğu bulunmuştur. Araştırmacılar sonuçta RA ile farklılaştırılmış grupta gerçek bir toksisite yaratılmadığını belirtmişlerdir (25). **Şekil 27** GO ve cam yüzeylerde RA uygulanmış ve uygulanmamış grupların hipoksi stresi sonrası absorbans değerlerini vermektedir. GO yüzeylerde RA kullanılmış ve kullanılmamış gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır, ancak cam yüzeylerde anlamlı farklılık yoktur.



Şekil 27.GO-Cam RA'li ve RA'siz grupların karşılaştırılması

Bu çalışmada hipoksi stresinin çalışılmasına ek olarak GO'nun farklılaşmada etkisinin olup olmadığının anlaşılması amacıyla SH-SY5Y hücrelerinin farklılaştırılması için yaygın olarak kullanılan RA de hücreler üzerine uygulanmıştır. RA uygulanmamış kontrol gruplarında normoksi yani %21 oksijen ortamında 5 gün inkübe edilen hücrelerde GO yüzey üzerinde yaygın bir hücre popülasyonu gözlenirken hipoksi ortamında (%3 oksijen) hücrelerin birleşerek küresel yapılar oluşturdukları gözlenmiştir (**Şekil 23**). SH-SY5Y hücreleri insan nöroblastoma hücreleridir ve nöroblastoma hücreleri hipoksik ortamda gelişirler. Hipoksi nöroblastoma hücrelerinin proliferasyonunu arttırarak kök hücre fenotipine döndürür (10, 121). GO da proliferasyonu arttırıcı etkisi nedeniyle hipoksi ortamında nöroblastoma hücrelerini küresel yapılar oluşturmaya itmiş olabilir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında özetle GO filmler hazırlandı. SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattı Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü, Hayvan Hücre kültürü ve Doku Mühendisliği Laboratuvarı'ndan alınarak GO filmler ve cam yüzeylere ekildi. Hücreler 5 gün hipoksi ve normoksi ortamlarında inkübe edildi. Hipoksinin etkilerini görmek amacıyla MTT canlılık testi yapıldı, SEM görüntüleri alındı ve aktin sitoskeleti boyaması yapıldı. Bütün çalışmalar Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Hayvan Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği Grubu Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

Bu deney düzeneğinde hipoksi ortamının kontrolü olarak normoksi ortamı kullanıldı. RA etkisinin olup olmadığını değerlendirmek amacı ile RA uygulanmamış gruplar RA uygulanmış olan grubun kontrolü olarak kullanıldı.

6.1. Sonuçlar

Bu çalışma, cam yüzeylerle karşılaştırıldığında GO filmlerde hücrelerin çoğalması ve tutunmasının daha fazla olduğunu göstermektedir. Hücrelerin stres koşullarına GO yüzeyler üzerinde cam yüzeylerdekine göre daha fazla direnç gösterdiği, GO yüzeyler üzerinde daha fazla nörit oluşumu ve daha uzun nörit yapıları bulunduğu immunohistokimyasal boyama ve SEM görüntüleri ile gösterildi.

Hipoksi stresinin çalışılmasına ek olarak GO' nun farklılaşmada etkisinin olup olmadığının araştırılması amacıyla SH-SY5Y hücrelerinin farklılaştırılması için yaygın olarak kullanılan RA hücreler üzerine uygulandı. RA uygulanmamış kontrol gruplarında normoksi yani %21 oksijen ortamında 5 gün inkübe edilen hücrelerde GO yüzey üzerinde yaygın hücre popülasyonu gözlenirken hipoksi ortamında (%3 oksijen) hücrelerin birleşerek küresel yapılar oluşturdukları gözlemlendi (**Şekil 25**). SH-SY5Y hücrelerinin nöroblastoma hücreleri olduğu göz önünde bulundurulduğunda hipoksi ortamının nöroblastoma hücrelerini küresel yapılar oluşturmaya itmiş olabileceği düşünülebilir.

6.2. Öneriler

Bundan sonraki grafen çalışmaları için bu çalışmanın ardından yapılmasının önemli olduğunu düşündüğümüz çalışmalar aşağıda özetlenmiştir:

1. RA'nın SH-SY5Y hücreleri üzerine etkisini görmek amacıyla 10^5 hücre/ml konsantrasyonda ekilen hücrelere RA uygulaması yapıldı. Hücreleri hipoksi haznesine aldıktan sonra besiyeri değişimi yapılamayacağı için bu denemede de besiyeri değişimi yapılmadı. Nörit uzamasında belirgin bir artış gözlenmedi. 5. günün sonunda hücrelerin çok yoğunlaştığı ve yüzeyden kalktığı gözlemlendi. RA'nın yarılanma ömrünün 45 dakika olduğu göz önünde bulundurulduğunda böyle kapalı bir sistemde hücreleri farklılaştırma amacıyla RA uygulaması beklenen sonucu vermeyebilir. Bu nedenle farklılaştırılmış SH-SY5Y hücreleri ile çalışılacaksa stres uygulamadan önce farklılaştırma yapıp sonra stres uygulanması üzerinde çalışılabilir.
2. GO yüzeylerin yapımında kitosan malzemesi kullanılmıştır. Kitosan otofloresans özelliğe sahiptir. Bu nedenle hücre ekilmemiş grafen yüzeylerin de FITC ve DAPI görüntüleri alınmıştır (Şekil 19). GO ile film yapılırken grafenin yüzeye tutunması için başka bir polimer kullanılabilir.
3. GO filmler için atomik kuvvet mikroskobu ile yüzey özellikleri çalışılabilir, GO filmlerin karakterizasyonu yapılabilir. X-ray fotoelektron spektroskopisi (XPS) ile filmlerdeki elementler çalışılabilir.
4. GO filmler üzerinde RA uygulanmamış grupta hipoksi ortamındaki küresel yapılar dikkat çekicidir (Şekil 23). Bu yapıların üzerine yeni çalışmalar yapılabilir.
5. Hipoksi stresinin hücreler üzerindeki etkini araştırmak için HIF ekspresyonlarına bakılarak hipoksinin etkilerine daha ayrıntılı olarak bakılabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Subramanian A, Krishnan UM, Sethuraman S. Development of biomaterial scaffold for nerve tissue engineering: Biomaterial mediated neural regeneration. *J Biomed Sci* [Internet]. 2009;16:108. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2790452&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
2. Bressan E, Ferroni L, Gardin C, Sbricoli L, Gobbato L, Ludovichetti F, et al. Graphene based scaffolds effects on stem cells commitment. *J Transl Med* [Internet]. 2014;12(1):296. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4219126&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
3. McMurray RJ, Gadegaard N, Tsimbouri PM, Burgess K V, McNamara LE, Tare R, et al. Nanoscale surfaces for the long-term maintenance of mesenchymal stem cell phenotype and multipotency. *Nat Mater* [Internet]. Nature Publishing Group; 2011;10(8):637–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21765399>
4. Nayak TR, Andersen H, Makam VS, Khaw C, Bae S, Xu X, et al. Graphene for Controlled and Accelerated Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *ACS Nano* [Internet]. 2011;5(6):4670–8. Available from: <http://arxiv.org/abs/1104.5120>
5. Reilly GC, Engler AJ. Intrinsic extracellular matrix properties regulate stem cell differentiation. *J Biomech* [Internet]. Elsevier; 2010;43(1):55–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiomech.2009.09.009>
6. Lee WC, Lim CHYX, Shi H, Tang LAL, Wang Y, Lim CT, et al. Origin of enhanced stem cell growth and differentiation on graphene and graphene oxide. *ACS Nano* [Internet]. American Chemical Society; 2011 Sep 27 [cited 2016 Jun 5];5(9):7334–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/nn202190c>
7. Feng L, Liu Z. Graphene in biomedicine: opportunities and challenges. *Nanomedicine (Lond)*. 2011;6(2):317–24.
8. Novoselov KS, Raimond JM, Brune M, Computation Q, Martini F De, Monroe C, et al. Electric field effect in atomically thin carbon films. *Science*

- (80-) [Internet]. 2004;306(5696):666–9. Available from:
<http://www.sciencemag.org/cgi/content/abstract/306/5696/666>
9. Ryu S, Kim B-S. Culture of neural cells and stem cells on graphene. *Tissue Eng Regen Med* [Internet]. 2013;10(2):39–46. Available from:
<http://link.springer.com/10.1007/s13770-013-0384-6>
 10. Corcoran a., O'Connor JJ. Hypoxia-inducible factor signalling mechanisms in the central nervous system. *Acta Physiol*. 2013;208(4):298–310.
 11. Prabhakar NR. Oxygen sensing by the carotid body chemoreceptors. *J Appl Physiol*. 2000;88(19):2287–95.
 12. Lüscher C, Jan LY, Stoffel M, Malenka RC, Nicoll RA. G protein-coupled inwardly rectifying K⁺ channels (GIRKs) mediate postsynaptic but not presynaptic transmitter actions in hippocampal neurons. *Neuron*. 1997;19(3):687–95.
 13. Gerber BU, Greene RW, Haas HL, Stevens DR. CHARACTERIZATION OF INHIBITION MEDIATED BY ADENOSINE IN THE HIPPOCAMPUS OF THE RAT IN VITRO. *J Physiol*. 1989;417:567–78.
 14. Wu D, Yotnda P. Induction and testing of hypoxia in cell culture. *J Vis Exp* [Internet]. 2011;(54):e2899. Available from:
<http://www.jove.com/video/2899/induction-and-testing-of-hypoxia-in-cell-culture>
 15. Allen CB, Schneider BK, White CW. Limitations to oxygen diffusion and equilibration in in vitro cell exposure systems in hyperoxia and hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001;281(4):L1021–7.
 16. Byrne MB, Leslie MT, Gaskins HR, Kenis PJA. Methods to study the tumor microenvironment under controlled oxygen conditions. *Trends Biotechnol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;32(11):556–63. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.09.006>
 17. Kovalevich J, Langford D, Datta PK, Bonner JF, Haas CJ, Fischer I. Considerations for the Use of SH - SY5Y Neuroblastoma Cells in Neurobiology. In: Amini S, White MK, editors. *Neuronal Cell Culture: Methods and Protocols* [Internet]. New York: Springer Science+ Business Media; 2013. p. 9–21. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-62703-640-5>

18. Ross RA, Spengler BA, Biedler JL. Coordinate Morphological and Biochemical Interconversion of Human Neuroblastoma Cells. *J Natl Cancer Inst.* 1983;71(4):741–7.
19. Encinas M, Iglesias M, Liu Y, Wang H, Muhaisen A, Ceña V, et al. Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *J Neurochem.* 2000;75(3):991–1003.
20. Biedler J, Roffler-Tarlov S, Schachner M, Freedman L. Multiple Neurotransmitter Synthesis by Human Neuroblastoma Cell Lines and Clones. *Cancer Res [Internet].* 1978;38(June 1972):3751–7. Available from: http://cancerres.aacrjournals.org/content/38/11_Part_1/3751.long
21. Freshney RI. Culture of Cells for Tissue Engineering. In: Vunjak-Novakovic G, Fresh, editors. *Culture of Cells for Tissue Engineering.* John Wiley and Sons, Inc; 2006. p. 1–22.
22. Lopes FM, Schröder R, Júnior MLC da F, Zanotto-Filho A, Müller CB, Pires AS, et al. Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies. *Brain Res [Internet].* Elsevier B.V.; 2010;1337:85–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2010.03.102>
23. Tosetti P, Taglietti V, Toselli M. Functional Changes in Potassium Conductances of the Human Neuroblastoma Cell Line SH-SY5Y During In Vitro Differentiation. *J Neurophysiol.* 1998;79(2):648–58.
24. Melino G, Thiele CJ, Knight RA, Piacentini M. Retinoids and the control of growth/death decisions in human neuroblastoma cell lines. *J Neurooncol.* 1997;31(1-2):65–83.
25. Cheung YT, Lau WKW, Yu MS, Lai CSW, Yeung SC, So KF, et al. Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research. *Neurotoxicology.* 2009;30(1):127–35.
26. Lopez-Carballo G, Moreno L, Masia S, Perez P, Baretino D. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway by retinoic acid is required for neural differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J Biol Chem.* 2002;277(28):25297–304.
27. Presgraves SP, Ahmed T, Borwege S, Joyce JN. Terminally differentiated SH-

- SY5Y cells provide a model system for studying neuroprotective effects of dopamine agonists. *Neurotox Res.* 2004;5(8):579–98.
28. Pålman S, Odelstad L, Larsson E, Grotte G, Nilsson K. Phenotypic changes of human neuroblastoma cells in culture induced by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate. *Int J Cancer [Internet]*. 1981 Nov 15 [cited 2016 Jun 13];28(5):583–9. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7309295>
 29. Kume T, Kawato Y, Osakada F, Izumi Y, Katsuki H, Nakagawa T, et al. Dibutyryl cyclic AMP induces differentiation of human neuroblastoma SH-SY5Y cells into a noradrenergic phenotype. *Neurosci Lett.* 2008;443(3):199–203.
 30. Sánchez S, Jiménez C, Carrera AC, Diaz-Nido J, Avila J, Wandosell F. A cAMP-activated pathway, including PKA and PI3K, regulates neuronal differentiation. *Neurochem Int.* 2004;44(4):231–42.
 31. Tieu K, Zuo DM, Yu PH. Differential effects of staurosporine and retinoic acid on the vulnerability of the SH-SY5Y neuroblastoma cells: Involvement of Bcl-2 and p53 proteins. *J Neurosci Res.* 1999;58(3):426–35.
 32. Simpson PB, Bacha JI, Palfreyman EL, Woollacott a J, McKernan RM, Kerby J. Retinoic acid evoked-differentiation of neuroblastoma cells predominates over growth factor stimulation: an automated image capture and quantitation approach to neuritogenesis. *Anal Biochem.* 2001;298:163–9.
 33. Chen J, Chattopadhyay B, Ross AH, Lines C, Venkatakrishnan G. Nerve Growth Neuroblastoma Factor-induced Differentiation of Human and Neuroepithelioma. *Cell.* :79–85.
 34. Chatterjee N, Eom HJ, Choi J. A systems toxicology approach to the surface functionality control of graphene-cell interactions. *Biomaterials [Internet]*. Elsevier Ltd; 2014;35(4):1109–27. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.09.108>
 35. Suk JW, Lee WH, Lee J, Chou H, Piner RD, Hao Y, et al. Enhancement of the electrical properties of graphene grown by chemical vapor deposition via controlling the effects of polymer residue. *Nano Lett [Internet]*. 2013;13:1462–7. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23510359>

36. Nair RR, Blake P, Grigorenko a. N, Novoselov KS, Booth TJ, Stauber T, et al. Fine Structure Constant Defines Visual Transparency of Graphene. *Science* (80-). 2008;320(June):2008.
37. Liu F, Ming P, Li J. Ab initio calculation of ideal strength and phonon instability of graphene under tension. *Phys Rev B - Condens Matter Mater Phys.* 2007;76(6):1–7.
38. Lee C, Wei X, Kysar JW, Hone J. Measurement of the Elastic Properties and Intrinsic Strength of Monolayer Graphene. *Science* (80-). 2008;321(July):385–8.
39. Balandin AA. Thermal properties of graphene and nanostructured carbon materials. *Nat Mater* [Internet]. Nature Publishing Group; 2011;10(8):569. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21778997>
40. Loh KP, Bao Q, Ang PK, Yang J. The chemistry of graphene. *J Mater Chem* [Internet]. 2010;20(12):2277. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b920539j>
41. Bunch JS, Verbridge SS, Alden JS, Van Der Zande AM, Parpia JM, Craighead HG, et al. Impermeable atomic membranes from graphene sheets. *Nano Lett.* 2008;8(8):2458–62.
42. Gurunathan S, Kim J-H. Synthesis, toxicity, biocompatibility, and biomedical applications of graphene and graphene-related materials. *Int J Nanomedicine.* 2016;11:1927–45.
43. Brodie BC. On the Atomic Weight of Graphite. *Philos Trans R Soc London* [Internet]. 1859;149(9):249–59. Available from: <http://rstl.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rstl.1859.0013>
44. Staudenmaier L. Verfahren zur Darstellung der Graphitsäure. *Berichte der Dtsch Chem Gesellschaft* [Internet]. WILEY-VCH Verlag; 1898 May [cited 2016 Jun 11];31(2):1481–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cber.18980310237>
45. Marcano DC, Kosynkin D V, Berlin JM, Sinitskii A, Sun Z, Slesarev A, et al. Improved synthesis of graphene oxide. *ACS Nano.* 2010;4(8):4806–14.
46. Sutter PW, Flege J-I, Sutter EA. Epitaxial graphene on ruthenium. *Nat Mater* [Internet]. Nature Publishing Group; 2008 May 6 [cited 2016 Jun 11];7(5):406–11. Available from:

<http://www.nature.com/doi/10.1038/nmat2166>

47. Kim WK, Kim D, Cui J, Jang HH, Kim KS, Lee HJ, et al. Secretome Analysis of Human Oligodendrocytes Derived from Neural Stem Cells. 2014;9(1).
48. Kim Y-S, Kumar K, Fisher FT, Yang E-H. Out-of-plane growth of CNTs on graphene for supercapacitor applications. *Nanotechnology*. 2011;23(1):015301.
49. Kosynkin D V, Higginbotham AL, Sinitskii A, Lomeda JR, Dimiev A, Price BK, et al. Longitudinal unzipping of carbon nanotubes to form graphene nanoribbons. *Nature* [Internet]. Nature Publishing Group; 2009;458(7240):872–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature07872>
50. Schniepp HC, Li JL, McAllister MJ, Sai H, Herrera-Alonson M, Adamson DH, et al. Functionalized single graphene sheets derived from splitting graphite oxide. *J Phys Chem B*. 2006;110(17):8535–9.
51. Hernandez Y, Nicolosi V, Lotya M, Blighe F, Sun Z, De S, et al. High yield production of graphene by liquid phase exfoliation of graphite. *Nat Nanotechnol* [Internet]. 2008;3(9):563–8. Available from: <http://arxiv.org/abs/0805.2850>
52. Zeng Z, Sun T, Zhu J, Huang X, Yin Z, Lu G, et al. An effective method for the fabrication of few-layer-thick inorganic nanosheets. *Angew Chemie - Int Ed*. 2012;51(36):9052–6.
53. Ramakrishna Matte HSS, Gomathi A, Manna AK, Late DJ, Datta R, Pati SK, et al. MoS₂ and WS₂ analogues of graphene. *Angew Chemie - Int Ed*. 2010;49(24):4059–62.
54. Stankovich S, Dikin DA, Dommett GHB, Kohlhaas KM, Zimney EJ, Stach EA, et al. Graphene-based composite materials. *Nature* [Internet]. 2006;442(7100):282–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature04969>
55. Akhavan O, Ghaderi E. Photocatalytic Reduction of Graphene Oxide Nanosheets on TiO₂ Thin Film for Photoinactivation of Bacteria in Solar Light Irradiation. *J Phys Chem C* [Internet]. 2009;113(47):20214–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/jp906325q>
56. Akhavan O, Abdolahad M, Esfandiari a, Mohatashamifar M.

- Photodegradation of Graphene Oxide Sheets by TiO₂ Nanoparticles after a Photocatalytic Reduction. *Society* [Internet]. 2010;114(30):12955–9. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp103472c>
57. Su CY, Lu AY, Xu Y, Chen FR, Khlobystov AN, Li LJ. High-quality thin graphene films from fast electrochemical exfoliation. *ACS Nano*. 2011;5(3):2332–9.
 58. Gao H, Duan H. Biosensors and Bioelectronics 2D and 3D graphene materials : Preparation and bioelectrochemical applications. *Biosens Bioelectron*. 2015;65:404–19.
 59. Guo Y, Jia X, Zhang S. DNA cycle amplification device on magnetic microbeads for determination of thrombin based on graphene oxide enhancing signal-on electrochemiluminescence. *Chem Commun*. 2011;47(2):725–7.
 60. Sanchez VC, Jachak a, Hurt RH, Kane a B. Biological Interactions of Graphene-Family Nanomaterials—An Interdisciplinary Review. *Chem Res Toxicol*. 2012;15–34.
 61. Stoller MD, Park S, Yanwu Z, An J, Ruoff RS. Graphene-Based ultracapacitors. *Nano Lett*. 2008;8(10):3498–502.
 62. Yoo,J.J.; Balakrishnan, K.; Huang, J.; Meunier, V.; Sumpter, B.G.; Strivastava a. Ultrathin Planar Graphene Supercapacitors. *Nano Lett*. 2011;11(4):1423–7.
 63. Wu ZS, Ren W, Gao L, Zhao J, Chen Z, Liu B, et al. Synthesis of graphene sheets with high electrical conductivity and good thermal stability by hydrogen arc discharge exfoliation. *ACS Nano*. 2009;3(2):411–7.
 64. Ghosh S, Calizo I, Teweldebrhan D, Pokatilov EP, Nika DL, Balandin AA, et al. Extremely high thermal conductivity of graphene: Prospects for thermal management applications in nanoelectronic circuits. *Appl Phys Lett*. 2008;92(15):19–22.
 65. Sanchez VC, Jachak A, Hurt RH, Kane AB. Biological interactions of graphene-family nanomaterials: an interdisciplinary review. *Chem Res Toxicol* [Internet]. 2012 Jan 13 [cited 2016 May 21];25(1):15–34. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3259226&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 66. Akhavan O, Ghaderi E, Akhavan A. Size-dependent genotoxicity of graphene

- nanoplatelets in human stem cells. *Biomaterials* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012;33(32):8017–25. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.07.040>
67. Sun X, Liu Z, Welsher K, Robinson JT, Goodwin A, Zaric S, et al. Nano-Graphene Oxide for Cellular Imaging and Drug Delivery. *Nano Res* [Internet]. 2008;1(3):203–12. Available from:
<http://arxiv.org/abs/0808.3396> \n <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20216934>
 68. Mohanty N, Berry V. Graphene-based single-bacterium resolution biodevice and DNA transistor: Interfacing graphene derivatives with nanoscale and microscale biocomponents. *Nano Lett.* 2008;8(12):4469–76.
 69. Zhang L, Xia J, Zhao Q, Liu L, Zhang Z. Functional graphene oxide as a nanocarrier for controlled loading and targeted delivery of mixed anticancer drugs. *Small.* 2010;6(4):537–44.
 70. Yang X, Zhang X, Liu Z, Ma Y, Huang Y, Chen Y. High-efficiency loading and controlled release of doxorubicin hydrochloride on graphene oxide. *J Phys Chem C.* 2008;112(45):17554–8.
 71. Yang X, Wang Y, Huang X, Ma Y, Huang Y, Yang R, et al. Multi-functionalized graphene oxide based anticancer drug-carrier with dual-targeting function and pH-sensitivity. *J Mater Chem.* 2011;21(10):3448.
 72. Yang K, Zhang S, Zhang G, Sun X, Lee ST, Liu Z. Graphene in mice: Ultrahigh in vivo tumor uptake and efficient photothermal therapy. *Nano Lett.* 2010;10(9):3318–23.
 73. Zhou M, Zhai Y, Dong S. Electrochemical Sensing and Biosensing Platform Based on Chemically Reduced Graphene Oxide Supporting Information (SI). *Anal Chem* [Internet]. 2009;81(14):5603–13. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19522529>
 74. Shan C, Yang H, Song J, Han D, Ivaska A, Niu L. Direct Electrochemistry of Glucose Oxidase and Biosensing for Glucose Based on Graphene Direct Electrochemistry of Glucose Oxidase and Biosensing for Glucose Based on Graphene. *Anal Chem* [Internet]. 2009;81(6):2378–82. Available from:
<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac802193c>
 75. Song Y, Qu K, Zhao C, Ren J, Qu X. Graphene oxide: Intrinsic peroxidase

- catalytic activity and its application to glucose detection. *Adv Mater.* 2010;22(19):2206–10.
76. Liao K, Lin Y, Macosko CW, Haynes CL. Cytotoxicity of graphene oxide and graphene in human erythrocytes and skin fibroblasts. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2011;3:2607–15.
77. Chen D, Tang L, Li J. Graphene-based materials in electrochemistry. *Chem Soc Rev* [Internet]. 2010;39(8):3157–80. Available from: <http://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2010/cs/b923596e>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20589275>
78. Chen X, Ye H, Wang W, Qiu B, Lin Z, Chen G. Electrochemiluminescence biosensor for glucose based on Graphene/Nafion/GOD film modified glassy carbon electrode. *Electroanalysis.* 2010;22(20):2347–52.
79. Cohen-Karni T, Quing Q, Li Q, Fang Y, Lieber CM. Graphene and Nanowire Transistors for Cellular Interfaces and Electrical Recording Tzahi. *Nano Lett.* 2011;10(3):1098–102.
80. Dong X, Shi Y, Huang W, Chen P, Li LJ. Electrical detection of DNA hybridization with single-base specificity using transistors based on CVD-grown graphene sheets. *Adv Mater.* 2010;22(14):1649–53.
81. Nelson T, Zhang B, Prezhdov O V. Detection of nucleic acids with graphene nanopores: Ab initio characterization of a novel sequencing device. *Nano Lett.* 2010;10(9):3237–42.
82. Ohno Y, Maehashi K, Yamashiro Y, Matsumoto K. Electrolyte-Gated Graphene Field-Effect Transistors for Detecting pH and Protein Adsorption. *Nano Lett.* 2009;9(9):3318–22.
83. Stine R, Robinson JT, Sheehan PE, Tamanaha CR. Real-time DNA detection using reduced graphene oxide field effect transistors. *Adv Mater* [Internet]. 2010;22(46):5297–300. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/adma.201002121/full>
84. Lu CH, Yang HH, Zhu CL, Chen X, Chen GN. A graphene platform for sensing biomolecules. *Angew Chemie - Int Ed.* 2009;48(26):4785–7.
85. Liu Y, Yu D, Zeng C, Miao Z, Dai L. Biocompatible graphene oxide-based glucose biosensors. *Langmuir.* 2010;26(9):6158–60.
86. Ronkainen NJ, Halsall HB, Heineman WR. Electrochemical biosensors. *Chem*

- Soc Rev [Internet]. 2010;39(5):1747–63. Available from: <Go to ISI>://WOS:000277035200021
87. Liu Z, Robinson JT, Sun X, Dai H. PEGylated Nano-Graphene Oxide for Delivery of Water Insoluble Cancer Drugs. *J Am Chem Soc*. 2008;130(33):10876–7.
 88. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell*. 2006;126(4):677–89.
 89. Ku SH, Park CB. Myoblast differentiation on graphene oxide. *Biomaterials* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;34(8):2017–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.11.052>
 90. Chen GY, Pang DWP, Hwang SM, Tuan HY, Hu YC. A graphene-based platform for induced pluripotent stem cells culture and differentiation. *Biomaterials*. 2012;33(2):418–27.
 91. Park SY, Park J, Sim SH, Sung MG, Kim KS. Enhanced Differentiation of Human Neural Stem Cells into Neurons on Graphene. 2011;263–7.
 92. La WG, Park S, Yoon HH, Jeong GJ, Lee TJ, Bhang SH, et al. Delivery of a therapeutic protein for bone regeneration from a substrate coated with graphene oxide. *Small*. 2013;9(23):4051–60.
 93. Hong SW, Lee JH, Kang SH, Hwang EY, Hwang YS, Lee MH, et al. Enhanced neural cell adhesion and neurite outgrowth on graphene-based biomimetic substrates. *Biomed Res Int*. 2014;2014.
 94. Wang Y, Lee WC, Manga KK, Ang PK, Lu J, Liu YP, et al. Fluorinated graphene for promoting neuro-induction of stem cells. *Adv Mater*. 2012;24(31):4285–90.
 95. Li N, Zhang Q, Gao S, Song Q, Huang R, Wang L, et al. Three-dimensional graphene foam as a biocompatible and conductive scaffold for neural stem cells. *Sci Rep* [Internet]. 2013;3:1604. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3615386&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> \n<http://www.nature.com/articles/srep01604>
 96. Li X, Macewan MR, Xie J, Siewe D, Yuan X, Xia Y. Fabrication of Density Gradients of Biodegradable Polymer Microparticles and Their Use in Guiding Neurite Outgrowth** Xiaoran. *Adv Funct Mater*. 2010;20(10):1632–7.
 97. Tang M, Song Q, Li N, Jiang Z, Huang R, Cheng G. Enhancement of

- electrical signaling in neural networks on graphene films. *Biomaterials* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;34(27):6402–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.05.024>
98. Shah S, Yin PT, Uehara TM, Chueng S-TD, Yang L, Lee K-B. Guiding Stem Cell Differentiation into Oligodendrocytes Using Graphene-Nanofiber Scaffolds. *Adv Mater.* 2014;26(22):3673–80.
 99. Song Q, Jiang Z, Li N, Liu P, Liu L, Tang M, et al. Anti-inflammatory effects of three-dimensional graphene foams cultured with microglial cells. *Biomaterials* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;35(25):6930–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.05.002>
 100. Li N, Zhang X, Song Q, Su R, Zhang Q, Kong T, et al. The promotion of neurite sprouting and outgrowth of mouse hippocampal cells in culture by graphene substrates. *Biomaterials* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;32(35):9374–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.08.065>
 101. Croslan DR, Schoell MC, Ford GD, Pulliam J V, Gates A, Clement CM, et al. Neuroprotective effects of neuregulin-1 on B35 neuronal cells following ischemia. *Brain Res* [Internet]. 2008;1210(July 2015):39–47. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2442468&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 102. Zuo P-P, Feng H-F, Xu Z-Z, Zhang L-F, Zhang Y-L, Xia W, et al. Fabrication of biocompatible and mechanically reinforced graphene oxide-chitosan nanocomposite films. *Chem Cent J* [Internet]. 2013;7(1):39. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3626848&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 103. Yang X, Tu Y, Li L, Shang S, Tao XM. Well-dispersed chitosan/graphene oxide nanocomposites. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2010;2(6):1707–13.
 104. Pan Y, Wu T, Bao H, Li L. Green fabrication of chitosan films reinforced with parallel aligned graphene oxide. *Carbohydr Polym* [Internet]. Elsevier Ltd.; 2011;83(4):1908–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.10.054>
 105. Depan D, Girase B, Shah JS, Misra RDK. Structure-process-property relationship of the polar graphene oxide-mediated cellular response and stimulated growth of osteoblasts on hybrid chitosan network structure

- nanocomposite scaffolds. *Acta Biomater* [Internet]. Acta Materialia Inc.; 2011;7(9):3432–45. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2011.05.019>
106. Fan H, Wang L, Zhao K, Li N, Shi Z, Ge Z, et al. Fabrication, mechanical properties, and biocompatibility of graphene-reinforced chitosan composites. *Biomacromolecules*. 2010;11(9):2345–51.
 107. Lv M, Zhang Y, Liang L, Wei M, Hu W, Li X, et al. Effect of graphene oxide on undifferentiated and retinoic acid-differentiated SH-SY5Y cells line. *Nanoscale*. 2012;4(13):3861.
 108. Oh S, Brammer KS, Li YS, Teng D, Engler AJ, Chien S, et al. Stem cell fate dictated solely by altered nanotube dimension. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2009;106(7):2130–5. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19179282>
 109. Chang K, Kim JW, Kim JA, Lee SE, Lee S, Kim S, et al. Biphasic electrical currents stimulation promotes both proliferation and differentiation of fetal neural stem cells. *PLoS One* [Internet]. 2011;6(4):e18738. Available from:
<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0018738>
 110. Yang D, Li T, Xu M, Gao F, Yang J, Yang Z, et al. Graphene oxide promotes the differentiation of mouse embryonic stem cells to dopamine neurons. *Nanomedicine (Lond)* [Internet]. 2014 Nov [cited 2016 Jun 23];9(16):2445–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24564300>
 111. Binh NH, Aoki H, Takamatsu M, Hatano Y, Hirata A, Tomita H, et al. Time-sensitive effects of hypoxia on differentiation of neural stem cells derived from mouse embryonic stem cells in vitro. *Neurol Res* [Internet]. 2014;36(9):804–13. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24620986>
 112. Simon MC, Keith B. The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2008;9(4):285–96. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2876333&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 113. Acker T, Acker H. Cellular oxygen sensing need in CNS function: physiological and pathological implications. *J Exp Biol*. 2004;207(September

- 2004):3171–88.
114. Aboul-Enein F, Rauschka H, Kornek B, Stadelmann C, Stefferl A, Bruck W, et al. Preferential Loss of Myelin-Associated Glycoprotein Reflects Hypoxia-Like White Matter Damage in Stroke and Inflammatory Brain Diseases. *J Neuropathol* [Internet]. 2003;62(1):25–33. Available from: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=ovftf&AN=00005072-200301000-00003\ninternal-pdf://3000312662/Aboul-Enein et al. 2003. Preferential loss of .pdf>
 115. Smith IF, Boyle JP, Vaughan PFT, Ha P, Peers C. Effects of chronic hypoxia on Ca (2+) stores and capacitative Ca (2+) entry in human neuroblastoma (SH-SY5Y) cells. *J Neurochem*. 2001;79:877–84.
 116. Panchision DM. The role of oxygen in regulating neural stem cells in development and disease. *J Cell Physiol*. 2009;220(3):562–8.
 117. Vieira HLA, Alves PM, Vercelli A. Modulation of neuronal stem cell differentiation by hypoxia and reactive oxygen species. *Prog Neurobiol*. 2011;93(3):444–55.
 118. Jögi A, Øra I, Nilsson H, Lindeheim A, Makino Y, Poellinger L, et al. Hypoxia alters gene expression in human neuroblastoma cells toward an immature and neural crest-like phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2002;99(10):7021–6. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=124521&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 119. Bhaskara VK, Mohanam I, Rao JS, Mohanam S. Intermittent hypoxia regulates stem-like characteristics and differentiation of neuroblastoma cells. *PLoS One*. 2012;7(2):1–10.
 120. Poomthavorn P, Wong SHX, Higgins S, Werther GA, Russo VC. Activation of a prometastatic gene expression program in hypoxic neuroblastoma cells. *Endocr Relat Cancer*. 2009;16(3):991–1004.
 121. Santilli G, Lamorte G, Carlessi L, Ferrari D, Nodari LR, Binda E, et al. Mild hypoxia enhances proliferation and multipotency of human neural stem cells. *PLoS One*. 2010;5(1).