

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**MEKANİK GERME ALTINDA MERKEZİ SİNİR
SİSTEMİ NÖRONLARININ İNCELENMESİ VE *in vitro*
BİR TRAVMATİK BEYİN HASARI MODELİ**

Osman Mert Duman

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Aylin ŞENDEMİR ÜRKMEZ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 612.01.00

Sunuş Tarihi : 27.06.2014

Bornova-İZMİR

2014

Osman Mert DUMAN tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “Mekanik Germe Altında Merkezi Sinir Sistemi Nöronlarının İncelenmesi ve *in vitro* Bir travmatik Beyin Hasarı Modeli” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 27.06.2014 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Yrd. Doç. Dr. Aylin Şendemir Ürkmez

Raportör Üye : Prof. Dr. S. İsmet Deliloğlu Gürhan

Üye : Yrd. Doç. Dr. Mehmet Sarıkanat

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi / Doktora Tezi olarak sunduğum “Mekanik Germe Altında Merkezi Sinir Sistemi Nöronlarının İncelenmesi ve *in vitro* Bir travmatik Beyin Hasarı Modeli” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışım olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

27 / 06 / 2014

İmzası

Adı-Soyadı

ÖZET**Mekanik Germe Altında Merkezi Sinir Sistemi Nöronlarının İncelenmesi ve *in vitro* Bir Travmatik Beyin Hasarı Modeli**

Duman, Osman Mert

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Aylin ŞENDEMİR ÜRKMEZ,

Haziran 2014, 65 sayfa

Çok yakın zamanda mekanik yüklerin merkezi sinir sistemi (MSS) hücrelerinin gelişimi ve nörit uzaması üzerinde etkileri dikkat çekmeye başlamıştır. Gelişim sürecinde mekanik gerilmenin akson uzamasını tetiklediği bulunmuş, ancak gerilmenin hangi düzeye kadar olumlu, hangi düzeyden sonra dejeneratif ve/veya apoptotik etki yarattığı bilinmemektedir. Olayı daha da kompleks hale getiren, MSS'nin çok değişik tip hücrelerden oluşması ve tüm bu hücre tiplerinin mekanik uyarılara dayanıklılık ve yanıtlarının farklı olmasıdır. Dolayısıyla MSS rahatsızlıklarının tedavisine yönelik terapötik araştırmalarda kullanılmak üzere, MSS hücrelerinin mekanik uyarı ve yüklere karşı tepkilerini ayrı ayrı inceleyebilen, bu sayede hem hücre gelişimi ve nörit uzamasının, hem de farklı gerilme düzeylerinin hücrede yaratacağı dejeneratif etkilerin kontrollü olarak incelenebileceği *in vitro* bir modele şiddetle ihtiyaç vardır.

Bu tez çalışması kapsamında doku iskelesi olarak elektroğirme ile üretilmiş PCL iskeleler ve MSS B35 hücre hattı kullanılmıştır. Hücreler üzerinde farklı düzeylerde mekanik gerilmenin hücre morfolojisi, nörit uzaması ve sito-iskelet üzerinde etkileri incelenerek, dejeneratif etkilerin görülmeye başladığı eşik yük düzeyi tespit edilmiş ve eşik düzeyden sonra artan gerilme miktarlarının hücre içinde oluşturduğu apoptotik etkiler morfolojik ve moleküler düzeyde incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: mekanik yük, merkezi sinir sistemi, B35, apoptoz

ABSTRACT**INVESTIGATION OF CENTRAL NERVOUS SYSTEM NEURONS
UNDER MECHANICAL STRAIN: AN *in vitro* TRAUMATIC BRAIN
INJURY MODEL**

Duman, Osman Mert

MSc in Bioengineering

Supervisor: Yrd. Doç. Dr. Aylin ŞENDEMİR ÜRKMEZ,

June 2014, 65 pages

Effects of mechanical loading on development of central nervous system (CNS) cells and neurite extension have been recognized recently. Effects of loading are very complicated since until a threshold, tension plays a positive role while after the threshold value, it is degenerative. The situation gets more complicated since CNS is made up of several different cell types that respond to various loads differently. There are some mechanical trauma models in the literature, but they usually employ hard and two dimensional culture substrates, which fail to mimic the natural niche of the cells. The aim of this project is to create an experimental model that can mimic the physiological habitat and normal loading conditions on CNS cells.

Electrospun PCL scaffolds and B35 central nervous system neuron cell line were used as tissue engineering scaffolds. Effects of mechanical strain on cell morphology, neurite extension and cytoskeleton, and after the threshold value, on apoptosis have been examined in molecular level.

Keywords: Mechanical strain, central nervous system, B35, apoptosis

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesi görevinin bana verilmesini sağlayan, çalışmanın başından sonuna kadar hiçbir yardımını esirgemeyen, manevi olarak da her zaman yanımda olan değerli danışmanım Yrd. Doç. Dr. Aylin ŞENDEMİR ÜRKMEZ'e, bilgisi ve deneyimiyle yardımlarını hiç esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Mehmet SARIKANAT'a, ihtiyacım olan her anda, bilgisi ve deneyimiyle yardımlarını hiç esirgemeyen sevgili hocam Prof. Dr. S. İsmet DELİLOĞLU GÜRHAN'a tüm katkıları için çok teşekkür ederim.

Hiç bir zaman beni yalnız bırakmayan ve her koşulda bana destek olan, iyi kötü bir çok anıyı paylaştığım Cansu GÖRGÜN, Begüm ZEYBEK, Şeyma ÇOĞAN, Şükrü ÖZTÜRK, Serdar ÇAKAN, Emre AKTAŞ, Eyüp BİLGİ, Ece BAYIR, Zalıke KESKİN, Ozan KARAMAN, Duygu AYYILDIZ TAMİŞ ve Mehmet ÖZGÜN ÖZEN'e teşekkür ederim.

Maddi ve manevi desteklerini hiç bir zaman esirgemeyen sevgili annem, babam ve kardeşime çok teşekkür ederim.

111 M 605 nolu proje ile çalışmama destek veren TÜBİTAK'a destekleri için teşekkür ediyorum.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xviii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xix
1 .GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	2
3. MATERYAL VE METOT	20
3.1 Elektroegirme Cihazının Kurulması ve Çalışma Prensibi	20
3.2 Mekanik Germe Cihazı Üretimi	20
3.3 Doku İskelesi Üretimi	21
3.4 Stok B35 MSS Hücrelerinin Çözdürülmesi	22
3.5 Stok B35 MSS Hücrelerinin Pasajlanması	23
3.6 Stok B35 MSS Hücrelerinin Dondurulması	23
3.7 Fiber İskelelerin Sterilizasyonu ve Hücre Kültivasyonu	24
3.8 Taramalı Elektron Mikroskopisi	24

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.9 Hücrelerin İmmünohistokimyasal İşaretlenmesi	25
3.10 Hücrelerin Üzerine Germe Uygulanması.....	27
3.11 MTT Testi	28
3.12 Hücre Apoptozisinin Belirlenmesi.....	28
3.13 İstatistiksel Analiz.....	29
4. Bulgular.....	31
4.1 Doku İskelesi Karakterizasyonu	31
4.2 Doku İskelesi Üretim Optimizasyonu	31
4.3 Doku İskelesi SEM Analizleri	31
4.4 PCL Doku İskeleleri Yüzey Temas Açısı Ölçümü	34
4.5 Hücre Kültürü Çalışmaları	34
4.6 Hücreli İskelelerin SEM Analizleri.....	35
4.7 Floresan Mikroskop Analizleri	36
4.8 Hücre Canlılık Testleri.....	36
4.9 Caspase-3 Analizi	39
5. Tartışma	42

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
6. Sonuçlar	47
7. Öneriler	48
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	49
ÖZGEÇMİŞ	62

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Jelatin/PCL Elektroğirme fiber morfolojisi	10
2.2 Embriyonik kök hücrelerin sinir hücrelerine dönüşümü.....	12
2.3 Elektroğirme ile üretilmiş kitosan/poli-L-lizin nano fiberler ve bu fiberler üzerinde kültive edilmiş PC12 hücreleri	17
3.1 Elektroğirme sistemi	20
3.2 Mekanik germe sistemi.....	21
3.3 Nemli odacık hazırlama.....	26
3.4 Mekanik germe simülasyon gösterimi.....	28
4.1 Elektroğirme ile üretilmiş PCL doku iskelelerinin farklı büyütmelede SEM görüntüleri	32
4.2 Elektroğirme ile üretilmiş PCL doku iskelelerinin fiber çapı ölçümü..	33
4.3 SEM ve yüzey temas açısı ölçümü için hazırlanan PCL doku iskeleleri	33
4.4 PCL doku iskelesi yüzey temas açısı ölçümü.....	34
4.5 B35 merkezi sinir sistemi hücreleri optik mikroskop görüntüleri	35
4.6 PCL doku iskeleleri üzerindeki B35 hücrelerinin SEM görüntüleri	35
4.7 PCL doku iskeleleri-B35 hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri	36
4.8 %10 germe 1. ve 2. gün MTT sonuçları.....	37

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.9 %10 germe 1. ve 2. gün ve kontrol MTT sonuçları	37
4.10 %25 germe 1. ve 2. gün MTT sonuçları	38
4.11 %25 germe 1. ve 2. gün ve kontrol MTT sonuçları	38
4.12 %50 germe 1. ve 2. gün MTT sonuçları	39
4.13 %50 germe 1. ve 2. gün ve kontrol MTT sonuçları	39
4.14 %10 germe 1. ve 2. gün Caspase3 testi sonuçları	40
4.15 %25 germe 1. ve 2. gün Caspase3 testi sonuçları	40
4.16 %50 germe 1. ve 2. gün Caspase3 testi sonuçları	41
4.17 Staurosporin ile yapılan Caspase3 testi sonuçları	41

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.1 Elektroğirme optimizasyon değerleri.....	21

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
3-DP	Üç boyutlu baskı
AA	Akrilik asit
CO ₂	Karbondioksit
CS	Soğuk saklama
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DCM	Diklorometan
DMSO	Dimetilsülfoksit
DMF	Dimetilformamid
DC	Doğrusal akım
ECM	Hücre dışı matris
FBS	Fötal sığır serumu
GAG	Glikozaminoglikanlar
HMDS	Heksametildisilazan
KBB	Kan beyin bariyeri
MSS	Merkezi sinir sistemi

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
MTT	3-(4,5-dimetilthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyumbromid, sarı tetrazolyum tuzu
O ₂	Oksijen
PBS	Fosfat tampon solüsyonu
PCL	Polikaprolakton
PEO	Poliyetenoksit
PFA	Paraformaldehit
PLLA	Polilaktik asit
RP	Hızlı prototipleme
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SLS	Selective Laser sintering
TBH	Travmatik beyin hasarı
UV	Ultraviyole

1. GİRİŞ

Merkezi sinir sistemi (MSS) hasarları, özellikle gelişmiş ülkelerde beklenen insan ömrünün uzamasıyla artan Alzheimer, Parkinson, ALS gibi nörodejeneratif hastalıklar dolayısıyla en önemli sağlık sorunları arasına girmiştir. Çok yakın zamanda mekanik yüklerin MSS hücrelerinin gelişimi ve nörit uzaması üzerinde etkileri dikkat çekmeye başlamıştır. Gelişim sürecinde mekanik gerilmenin akson uzamasını tetiklediği bulunmuş, ancak gerilmenin hangi düzeye kadar olumlu, hangi düzeyden sonra dejeneratif ve/veya apoptotik etki yarattığı bilinmemektedir. Olayı daha da kompleks hale getiren, MSSnin çok değişik tip nöronlar (duysal, motor, ara, kolinerjik, dopaminerjik, ...) ve bu nöronlara destek olarak farklı tip glial hücreler (astrozit, oligodentrosit, mikroglia, ependimal, radyal, ...), ayrıca immün sistem ve vasküler sistem hücrelerinden meydana gelmesi ve tüm bu hücre tiplerinin mekanik uyarılara dayanıklılık ve yanıtlarının farklı olmasıdır. Dolayısıyla MSS rahatsızlıklarının tedavisine yönelik terapötik araştırmalarda kullanılmak üzere, MSS hücrelerinin mekanik uyarı ve yüklere karşı tepkilerini ayrı ayrı inceleyebilen, bu sayede hem hücre gelişimi ve nörit uzamasının, hem de farklı gerilme düzeylerinin hücrede yaratacağı dejeneratif etkilerin kontrollü olarak incelenebileceği *in vitro* bir modele şiddetle ihtiyaç vardır. Literatürde benzer yaklaşımlarda oluşturulmuş sınırlı sayıda model bulunmakla beraber, bu modellerin büyük çoğunluğunda hücre kültürasyonu için sert ve iki boyutlu kültür substratları kullanılmaktadır ve bu şartlar hücrelerin doğal nişlerini mimik etmekten çok uzaktır.

Bu tez çalışmasında, bu ihtiyaca yönelik *in vitro* bir hücre kültür düzeneği üretildi ve üç boyutlu, MSS hücrelerinin doğal nişlerini, fizyolojik olarak karşılaştıkları mekanik yükleri simüle eden bir model oluşturuldu. Tez kapsamında doku iskelesi olarak elektroegitime ile üretilmiş PCL ve MSS hücresi olarak B35 hücre hattı kullanıldı.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Sinir doku mühendisliği, son yıllarda çok hızlı gelişmelerin gerçekleştiği, biyoloji ve mühendislik bilimini birleştiren çok disiplinli bir bilim dalıdır. Bu alanda yapılan çalışmalar sinir sisteminin detaylı incelenmesi ve sinir sistemi rahatsızlıklarına karşı tedavilerin geliştirilmesi üzerinedir. Mühendislik ve biyolojinin birlikte çalışmasının sonucu olarak sayısal hesaplamalar, deneysel çalışmalar, klinik nöroloji çalışmaları, elektrik mühendisliği, sinir doku mühendisliği ve malzeme bilimleri sinir bilim kapsamına giren çalışmalardır. (Durand et al., 2007) Sinir doku mühendisliği kapsamında son yıllardaki en dikkat çeken çalışmalar merkezi sinir sistemi sinir hücrelerinin rejenerasyonu üzerine yapılan çalışmalardır. Çalışmalar genel olarak doku iskeleleri ve hücre transplantasyonları üzerine yoğunlaşmıştır. (Orive et al., 2009)

Doku iskeleleri, beyindeki hasarlı bölgeye implante edilerek çevresindeki dokuya yapısal destek sağlarlar ve bu sayede tekrarlaması muhtemel yeni hücreler dejenerasyonların da engellenmesini sağlarlar. Doku iskeleleri ile hastaya ait hücrelerin birlikte implante edilmesiyle de lokal rejenerasyonun olumlu yönde etkilendiği de bilinmektedir. (Reichert, 2008) Doku iskeleleri, hücre taşımının yanında ilaç taşınmasını da sağlayarak sinir rejenerasyonunu desteklemektedirler. Doku iskeleleri hücre dışı matrisi (ECM) taklit ederek üzerinde bulunan sinir hücrelerinin ortamla ve ortamda bulunan sinir hücreleriyle uyumlu bir şekilde bulunmasını sağlarlar. Bu açıdan bakıldığında zaman sinir doku mühendisliği iskelelerinin önemli bazı özelliklere sahip olması gerekmektedir. (Flanagan et al., 2002) Başlıca gerekli özellikler;

- Nöron hücrelerinin tutanabileceği yapıda olmalı,
- Nörit (sinir hücresinden çıkan uzantılar) gelişimine elverişli olmalı ve bu gelişimi desteklemeli,
- Gözenekli olmalı, kütle transferi ve hücre göçüne izin vermeli,
- Mekanik özellikleri uygulanacak bölgeyle uyumlu,
- Biyobozunurluk süresi dokunun rejenerasyon hızına uygun olmalı.

Doku mühendisliği çalışmalarında kullanılan doku iskeleleri bu alanın en önemli araştırma konularından biridir. Doku iskeleleri ECM'yi taklit edebilecek biçimde tasarlanan yapılardır. Yapay olarak ECM'yi taklit ederek hücrelere tutunabilecekleri ve çoğalabilecekleri bir yüzey oluştururlar. Bunun yanı sıra iskeleler her ne kadar tam olarak ECM görevini tamamen üstlenemese de hücrelere mekanik dayanım sağlar ve çevre ile iletişim sağlamalarını destekler.

Doku iskelesi üretirken malzeme seçimi çok önemlidir. Seçilen malzeme biyouyumlu ve biyobozunur olmalıdır. Malzeme bozunurken biyouyumluluğunu kaybetmeden bozunmalıdır. Aksi takdirde parçalanma sırasında ortaya çıkabilecek ve toksik etki yaratabilecek kimyasallar hücre çoğalmasını negatif yönde etkileyecektir. Doku iskelesi üretim yöntemleri iki ana başlık altında incelenebilir; makro/mikro fabrikasyon teknikleriyle üretilenler ve nanofabrikasyonla üretilenler olarak. (Gümüşderelioğlu et al., 2007)

Makro ve mikro fabrikasyon teknikleri eski, ama hala kullanılan yöntemlerdir. Faz ayrımı, çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma, gaz köpüklendirme, dondurarak kurutma (liyofilizasyon) yöntemleri klasik yöntemlerdir. Bu klasik yöntemlerde eksik kalan kısımlar genelde gözenek boyutunun ve dağılımının kontrollü yapılamamasıdır. Bu nedenle de hızlı prototipleme denilen (RP) bilgisayar destekli teknikler geliştirilmiştir. Hızlı prototipleme tekniğinde üretilmek istenen dokulara ait üç boyutlu yapı bilgisayar destekli tasarım programları kullanılarak sanal ortamda görüntülenir. Doku iskelesi için seçilen malzemeye birlikte bilgisayardan gelen bilgiler doğrultusunda iskele oluşturulmaya başlanır. Gözenek yapısı ve iskelenin üretimi sırasındaki tabakaların nerelerde birleşeceği bilgisayar aracılığıyla belirlenir. Bu teknik; üç-boyutlu baskı (3DP) tekniği, stereolitografi (SLA), eriterek birikim modellemesi (fused deposition modelling, FDM) ve lazerle kalıplama (selective laser sintering, SLS) tekniklerini içerir. (Hutmacher, 2001) Ama bu tekniklerin yüksek sıcaklık kullanarak çalışması büyük bir dezavantajdır. Bu dezavantajı kaldırmak için üretilen teknik de üç boyutlu baskı tekniği olarak adlandırılmaktadır. Başka bir teknik olan cell printing (hücre yazdırma) tekniğinde çok hücreli sistemleri oluşturmak üzere hücreler tabakalar halinde üst üste dizilir. Ancak, bu işlem henüz çok yeni olup optimizasyonu için çalışmalar her geçen gün literatürdeki yerini almaktadır. Makro ve mikro fabrikasyon

tekniklerinin yanı sıra nanofabrikasyonla da iskele üretimleri gerçekleştirilmektedir. Bu teknikte ECM'yi daha iyi taklit edebilecek nano yapılı iskelelerin üretimi yapılmaktadır. Bu üretim tekniklerinde yukarıdan aşağıya (top-down) ve aşağıdan yukarıya (bottom-up) olarak iki farklı yaklaşım bulunmaktadır. Bottom-up yaklaşımlarda kısa peptid molekülleri kendiliğinden düzenlenerek iskele oluştururlar. Hidrojel tarzı iskeleler bu yaklaşımla üretilen iskelelere örnek olarak gösterilmektedir. (Dillon et al., 1998; Koutsopoulos et al., 2009) Top-down yöntemlerde ise sentetik polimerlerden nanoboyutlu fiberler üretilmektedir. Bu konuda en çok çalışılan üretim yöntemi elektroğirme yöntemidir. Nano fabrikasyon tekniklerinin en önemli avantajı ECM'yi daha iyi taklit edebilecek nano yapılı doku iskelelerinin üretimine olanak sağlıyor olmalarıdır. Bu teknikle ECM'nin kollajen iplikçiklerine benzer yapılara sahip doku iskeleleri üretilmektedir. (Matthews et al., 2002; Boland et al., 2004; Rho et al., 2006) Elektrostatik eğirme (electrospinning) yöntemi, üzerinde en çok çalışılanıdır. (Duman, 2012)

Elektroğirme ilk olarak 1897'de Rayleigh tarafından bulunan ve daha sonra 1914'de Zeleyn tarafından elektro püskürtme denemeleri sırasında daha da geliştirilen eski bir yöntemdir. Tescillenmesi ise 1934 yılında Formhals tarafından yapılmıştır. Elektroğirme yöntemiyle birbiri ile bağlantılı gözenekli sentetik biyopolimer malzemeler üretilir. Bu yöntemde rastgele lifler yüksek oranda yüzey alanı oluşturarak hücre çoğalması ve tutunmasını destekler. (İnanç vd, 2009) Elektroğirme yönteminde çözelti kuvvetli bir elektrik alana maruz kalır ve çözelti molekülleri artı ve eksi olarak zıt yüklerle yüklenerek birbirlerini itmeye başlarlar. Kuruyan çözelti kesintisiz ipliksi fiberler halinde birikir. Yüksek performanslı bu metotla 20-400 nm çaplı porlara sahip nanofiber yapılar oluşturmak mümkündür. Oluşturulan nanofibröz yapı yük yoğunluğu, uygulanan voltaj gibi parametrelere bağlı olmakla beraber kullanılan polimerin tipi ve konsantrasyonu, elektrolit tipi ve konsantrasyonu, viskozite, yüzey gerilimi, polimerin çıkış noktasına olan uzaklık, polimer solüsyonunun akış hızı, iç çap gibi parametrelerle de değişiklik gösterir. Elektroğirme yöntemi; eğirmek istenen polimer çözeltisinin şırıngaya yüklenmesi ve bu şırınga ucuna yüksek voltaj uygulaması ile lif oluşumunu sağlayan bir yöntemdir. Şırınganın bağlı olduğu pompadan sisteme çözelti beslenir. İğneden çıkan damlacık yüksek voltaj

sayesinde karşıda bulunan toplayıcı üzerine toplanır. Çözelti toplayıcıya gidene kadar çözücü buharlaşır ve polimer toplayıcı üzerinde lifler halinde toplanmış olur. Bu sayede çapları farklı lifler oluşturulmuş olur. (Panseri et al., 2008) Elektroğirme yöntemi farklı yöntemlerle de birleştirilerek farklı yapılarda üretimler yapılmaktadır. Örneğin sol-jel teknolojisi ile kullanıldığında çözeltiden nanotüp ve dolgulu nanofiber üretimleri sağlanmaktadır. (Li et al., 2006)

Elektroğirme (electrospinning) yöntemi ile fiziksel değişkenler optimize edilerek farklı kalınlıklarda, çok homojen lif yapıları üretebilmektedir. (Chew et al., 2008) Memeli dokularındaki kolajen liflere benzeyen yapı ve kalınlıkta üretilmiş farklı polimer lifler üzerinde başarılı doku mühendisliği çalışmaları bulunmaktadır. (Demirci vd., 2009; Chew et al., 2008; Huang et al., 2003) Bu teknikte, kısaca, bir yüksek DC voltaj üretici ile yüksek viskoziteli bir polimer solüsyonunun sıvı jet oluşturması sağlanır. Bir enjektör pompa yardımıyla solüsyonun sabit hızla akması sağlanır. Yüzey yüklerinin birbirini itmesi ve solventin buharlaşması sonucu polimer solüsyonu sürekli gerilerek incilir. İncelen ve fiberler halinde kuruyan polimer iletken bir yüzey üzerinde toplanır. Sinir hücrelerinin sağlıklı büyümelerine katkı sağlayan düzenli yönlendirilmiş lifleri de bu teknikte yapılan bir modifikasyon ile üretmek mümkündür. (Xu et al., 2004; Li et al., 2004)

Doğal materyaller yumuşak dokuların özelliklerine benzerlik (mekanik kuvvet, fiziksel özellikler ve biyomoleküler özellikler, vb.) gösterdikleri için onların yerlerine kullanılabilirler. (Willerth et al., 2007). Kollajen, jelatin, laminin, kitosan ve aljinat gibi doğal materyaller sinir yapılanmasında en çok kullanılan doğal materyallere örnektir. (Matthews et al., 2002; Ohkawa et al., 2004)

Kitosan fiziksel olarak kolaylıkla manipüle edilerek farklı gözenek yapılarında iskele üretilen doğal bir malzemedir. Ayrıca içerdiği reaktif amino ve hidroksil gruplarının modifiye edilebilirliği de doku mühendisliği uygulamalarında kullanılması açısından yüksek potansiyele sahiptir. (Wang et al., 2003). Kitinin kısmi deasetilasyonu sonucu elde edilen kitosan lineer bir amino polisakarittir. (Suh et al., 2000; Wise et al., 2000). Kitosanla hazırlanan membran ve liflerin *in vitro* ortamda Schwann hücreleri ile yapılan çalışmada, MTT sonuçlarına göre kitosanın hücre büyümesine sitotoksik etkisinin olmadığı

görülmüştür. Kitosan lifler ve polilizin kaplı coverslipler karşılaştırıldığında, schwann hücrelerinin kitosan membranla uyumu nispeten daha yüksektir. Deneysel sonuçlara göre schwann hücreleri kitosan malzeme üzerinde küresel ve oval olmak üzere iki şekilde uzanırlar. Oval şeklindeki hücreler şekil itibariyle de lif yapısındaki kitosanı kuşatmaya daha eğilimlidirler. Buna göre hücrelerin kitosan lif yapısı üzerindeki göçü ve uzanımı membran yapısındakinden daha hızlıdır. (Yuan et al., 2004)

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

Elektroğirme tekniği kullanılarak üretilen PCL nanoliflerin, Schwann hücrelerinin bölünmesi ve birbirleri ile etkileşimleri için birçok fonksiyonel yüzey alanı oluşturduğu gösterilmiştir. Bu sebeple sinir dokusu onarımı için bu teknikle hazırlanan çapı 1µm'den küçük olan lifler diğer yöntemlerle hazırlanan malzemelere göre birçok avantaja sahiptir (Tabesh vd. 2008).

Yapılan bir çalışmada, farklı oranlarda kitosan-PEO (polietilen oksit) çözeltileri hazırlanmış ve bu çözeltiden elektroğirme yöntemi ile çapı birkaç mikrondan ~40 nm'ye kadar olan kitosan fiberler elde edilmiştir. (Bhattacharai et al., 2005) Elde edilen bu polimerik nanofiberler, özellikle ECM'yi yapı ve fonksiyon bakımından taklit etmeleri açısından oldukça önemlidir.

Kollajen büyük bir gerilim kuvvetine sahip olan doğal bir malzeme olduğu için toksik olmayan, yüksek biyoabsorblama kapasitesine sahip ve biyouyumlu mükemmel bir malzemedir. (Stang et al., 2009) Literatürde 28 tipten daha fazla kollajen türü tanımlanmıştır. Bunlardan tip I, II, III ve IV vücutta bulunan kollajenin %90'ını oluşturur. Tip I kollajen periferik sinir sistemindeki en baskın kollajen olmakla birlikte Tip III kollajenle beraber sinirleri oluşturan proteinlerin

%49'unu meydana getirirler. Kollajen hücre adhezyonu göz önüne alındığında, nöral hücre benzeri PC-12 hücrelerinin yönlendirilmesinde yaygın olarak kullanılır. Sentetik bir malzeme ile karşılaştırıldığında daha geçirgen ve doğal bir polimer olmasından kaynaklanan birçok avantaja sahiptir. 5 ve 10 mm'lik siyatik siniri hasarında kollajen ve silikon yapay sinir tüpleri ile yapılan çalışmada, kollajenin silikon ile karşılaştırıldığında aksonal yenilenme, Schwann hücresi ile uyumu ve dokuda damarlaşma gibi özellikleri göz önüne alındığında daha iyi bir malzeme olduğu görülmektedir. (Kemp et al., 2009)

Biyosentetik materyaller doğal ve sentetik polimerlerin bir araya getirilmesiyle oluşan malzemelerdir. Doğal polimerlerin biyouyumluluğu ve sentetik polimerlerin mekanik özelliklerinin birleştirilmesiyle kullanışlı malzemeler üretmektir amaç.

Ahmed ve arkadaşlarını yaptığı bir çalışmada, fibronektin tip III'ün, insan tenascin CD5 tekrarlı D grupları ile kovalent etkileşim ile yüzey modifiye poliamid nano fiber yapılar elde etmiş. Oluşan bu peptid yapılarının serebellar nöronların gelişim ve çoğalmasını teşvik etmektedir. Elektroğirme ile üretilmiş poliamid yapılar ile bu yapılar karşılaştırıldığında peptid yapı üzerine nöron tutunması, nörit oluşumu ve nörit uzamasında önemli derecede fark görülmüştür. (Ahmed I et al., 2006)

Aynı şekilde kollajen, metylmethacrylate (MMA) ve arylic asit (AA) kopolimeri ile konjuge edilerek kollajen elektroğirilmiş nanofiber yapılar oluşturulmuş ve etkileri incelenmiştir. (Ghasemi-Mobarakeh et al., 2008)

Elektroğirme ile üretilmiş fiberler ile kortikal nöral kök hücre denemeleri yapılmıştır. Denemelerde 2-4 günlük gözlem sonucu kollajen içerisine paralel olarak, nörit uzamalarında belirgin artış gözlemlenmiştir. Aynı zamanda kollajen miktarı arttırıldıkça hücrelerin sağ kalım oranının da belirgin bir şekilde arttığı gözlemlenmiştir. (Wensheng et al., 2008)

Sinir doku mühendisliğinde başarının sağlanması için en önemli noktalardan birisi de materyal seçimidir. Yapay malzemeler fiziksel ve kimyasal olarak çabuk şekillenebilmeli, biyouyumlu, biyobozunur ve gözenekli olmalıdır. Akson yenilenmesini yönlendirmedi ve gerekli destek dokunun sağlanmasında,

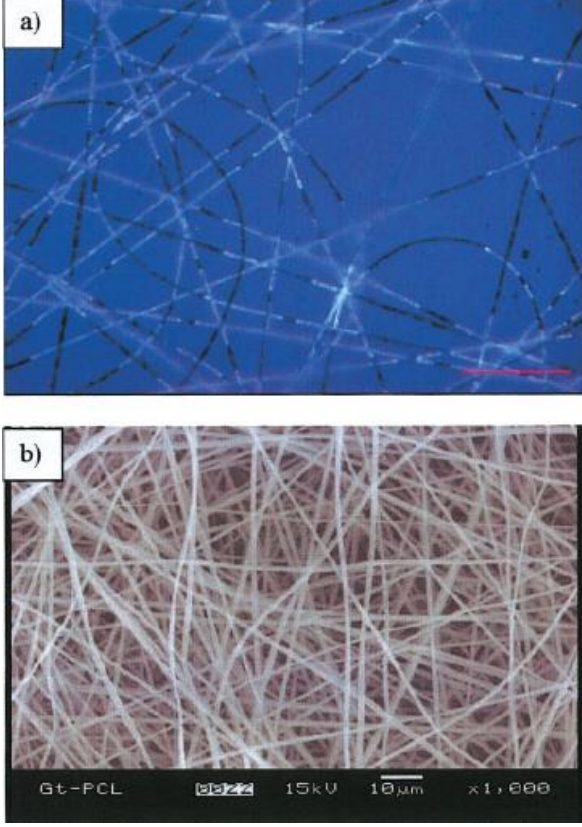
materyalin dokudaki yıkım hızı ve mekanik özellikleri önemli parametrelerdir. Bu malzeme özellikleri oluşabilecek immun-ret yanıtı en aza indirmede ve sinir sıkışmalarına engel olmada etkilidir. (Gunatillake et al., 2003) Sinir doku mühendisliği uygulamalarında mekanik özellikler ve biyobozunma hızı gibi özelliklerinin iyi olması ve ayrıca biyoyumlu olmaları bakımından sentetik materyallerin seçimi uygun gözükmektedir. Genellikle kullanılan polimerler; poly(glycolic acid) PGA, poly(L-lactic acid) PLLA, PCL, poly(3-hydroxybutyrate) PHB gibi poliesterler ve bunların kopolimerleridir. Özellikle bu poliesterler ester bağlarının hidrolizi ile yıkıma uğrarlar ve metabolik yol izinde kaybolarak en az seviyede toksisiteye neden olurlar. (Zeng, 2003)

PCL, genellikle farmasötik ürünler ve yara örtüleri yapımında kullanılan, biyoyumlu ve biyobozunur alifatik bir poliesterdir. Su, yağ, diğer kimyasal çözücüler ve kloro karşı iyi direnç gösterir. Fizyolojik şartlarda (insan vücudu gibi) ester bağlarının hidrolizi ile bozunur. Bu özellikleri ile nakillerde kullanılan biyomalzeme olarak da büyük ilgi görür. Schnell ve arkadaşlarının, elektroğirme ile yönlendirilmiş nanolifli sinir kanalı şeklindeki PCL ve PCL/kollajen yapılarını, dorsal kök ganglia'dan elde edilen sinir hücreleri ile kültüre ettikleri çalışmada her iki lifli yapının da sinir ilerlemesini ve glia hücrelerinin göçünü desteklediği gözlenmiştir. (Sangsanoh et al., 2007) Sinir doku mühendisliği çalışmalarda PCL hücre tutunması ve üremesini desteklediği için çok önemli bir yere sahiptir. (Prabhakaran et al., 2008) PCL nanofiber iskeleler sinir hücrelerindeki nöritlerin uzamasına ve bir diğer çalışmada da bu iskeleler üzerindeki sinir hücrelerine verilen elektriksel etkinin hücre büyüme oranı üzerinde %83 gibi yüksek bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. (Xie et al., 2009) PCL'nin kitosanla kompozit olarak kullanıldığı çalışmalarda da biyoyumluluğun, hücre adhesyonunun, yaşam süresinin ve aksonal uzamanın olumlu yönde etkilendiği görülmüştür. (Schnell et al., 2007; Cooper et al., 2011) Elektroğirme tekniği kullanılarak üretilen PCL nanoliflerin, Schwann hücrelerinin bölünmesi ve birbirleri ile etkileşimleri için birçok fonksiyonel yüzey alanı oluşturduğu gösterilmiştir. Bu sebeple sinir dokusu onarımı için bu teknikle hazırlanan çapı 1\m'den küçük olan lifler diğer yöntemlerle hazırlanan malzemelere göre birçok avantaja sahiptir. (Sangsanoh et al., 2007)

Biyosentetik materyallerin başka avantajları da vardır. Patel ve arkadaşlarının bir çalışmasında PLLA (polilaktik asit) fiberlerine laminin immobilizasyonu yapılmış ve bu fiberler üzerinde fare dorsal kök ganglia dokusu kültüve edilmiştir. 6 günlük *in vitro* kültür sonrasında laminin konjuge PLLA fiberler üzerindeki nöronlarda düz PLLA fiberlerin üzerindeki kadar fazla nörit uzaması olduğu görülmüştür. (Patel et al., 2008)

Biyosentetik materyal üretiminde bir başka teknik de doğal ve sentetik materyalin bir solvent içerisinde birlikte çözdürülerek çözelti hazırlanmasıdır. Bu çözeltilerden daha sonra elektroğirme ile fiber yapıda doku iskeleleri üretilir. Prabhakaran ve arkadaşlarının bir çalışmasında PCL (polikaprolakton) ve kitosan karışımından elektroğirme yöntemi ile iskeleler üretilmiştir. Bu iskelelerin düz PCL iskelelere oranla daha düşük fiber çaplarına sahip olduğu ve daha yüksek hidrofilik özellik gösterdiği gözlemlenmiştir. (Prabhakaran et al., 2008) Hidrofiliklik özelliği ile hücre adhezyonu ve yayılım daha etkin ve hızlı bir hale gelmiştir. (Van Wachem et al., 1985) Ayrıca, PCL/CS yapının çekme dayanımı ve gerilme oranının kitosan fiber yapıya oranla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Fare schwann hücreleriyle yapılan bir diğer çalışmada kullanılan PCL/CS fiberler, PCL fiberleriyle karşılaştırıldığında, hücrelerin proliferasyon hızı önemli ölçüde daha yüksektir.

Farklı oranlarda karıştırılan jelatin/PCL'den elektroğirme ile üretilen doku iskelelerinin jelatin oranı arttıkça PCL yapısının hidrofilikliğinin arttığı görülmüştür. (Ghasemi-Mobarakeh et al., 2008) Jelatin /PCL elektroğirme yöntemiyle üretilen fiberlerin mikroskop görüntüleri Şekil 2.1'de verilmiştir. (Zhang Y et al., 2004)



Şekil 2.1 Jelatin/PCL Elektroğirme fiber morfolojisi a: optik mikroskop, b:SEM. (Zhang Y et al., 2004)

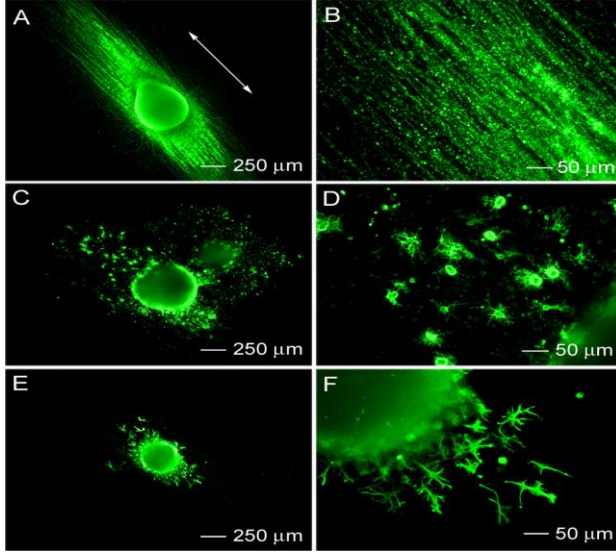
Schnell'e göre PCL ve PCL/kollajen fiberler arasında karşılaştırma yapıldığında aslında iki türde nörit uzamasına rastlanmıştır, malzemenin glial hücre göçleri için uygun olduğu ancak schwann hücrelerinin düzeninin, göçünün, nörit oryantasyonunun, fibroblastlar ve bunların yönelme duyularının PCL/kollajen fiberlerde daha gelişmiş olduğu sonucuna varılmıştır. (Schnell et al., 2007)

Koh'a göre asıl incelenmesi gereken kısımlardan birisi nöral hücre davranışlarının biyopolimerlerin kimyasından ziyade üretim yöntemine göre nasıl değişiklik göstereceğidir. Üç farklı üretim yöntemi kullanarak denemeler yapmıştır. Kovalent bağlama, fiziksel adsorpsiyon ve elektroğirme. Bu üç farklı yöntemle üretilmiş iskelelere PC12 hücrelerini ekerek çoğalma ve nörit uzamalarını incelemiştir. Diğer iki yöntemle göre elektroğirme yöntemi en etkili yöntem olarak tespit edildiğini bildirmiştir. (Koh et al., 2008)

Kalp kası ve sinir dokusu gibi dokular, hücreleri boyunca elektriksel potansiyel oluşturma konusunda özelleşmişlerdir. MacDonald ve arkadaşları kollajen hidrojel yapısını doğal yumuşak dokulardaki elektriksel iletkenliği örnek

alarak tasarlamışlardır. Sonuçlarına göre hücre matriksinde ve yapısındaki elektriksel özellikler beklenenden daha yüksek çıkmıştır. Elektriği ileten protein kompozitler kalp kası ve sinir dokusu gibi elektriksel iletimin önem taşıdığı dokular için iskele olarak ya da hücrelerin tutunup elektriksel uyarı etkisi oluşturabileceği substrat yüzeyleri geliştirmek gibi pek çok alanda kullanılabilir. (MacDonald et al., 2008)

Elektroegirme tekniğinin bir başka avantajı ise sinir tüplerinin yapımı aşamasında ısıtma ya da kimyasal tepkimeye ihtiyaç duyulmamasıdır. Böylece diğer yöntemlerin aksine elektroegirme tekniği ile mikro ya da nano lifli malzemeler kimyasal tepkimelerin ve ısıl işlemlerin kullanılmasına gerek kalmadan kararlı hale getirilebilir. Oluşturulan bu tüpler içerisine de kollajen, fibrin ve peptid kalıntıları gibi çeşitli dolgu malzemeleri rahatlıkla tutturularak tüplerin hücre çoğalmasını daha fazla desteklemesi sağlanabilir. Elektroegirme tekniği ile üretilen iskeleler lifli yapıdadırlar ve sahip oldukları avantajlar sinir doku mühendisliği alanında gelecek vaad etmektedir. Lifli yapıların beyin hücre dışı matrisine olan benzerlikleri bu avantajı getirmektedirler. Bu alanda yapılan, embriyonik kök hücrelerin fiber yapılu iskeleler üzerine ekilmesi ile bu hücrelerin sinir hücrelerine dönüştüğünün gözlemlenmesi bunu ispatıdır. Sadece hücre sel farklılaşmayı değil ayrıca nörit uzamasını da olumlu yönde etkilediği görülmüştür. Embriyonik kök hücrelerinin nanolif üzerine ekilmesi ile yapılan çalışmada ekilen hücrelerin, sinir hücrelerine değişim gösterdiği görülmüştür. Lifli yapının sadece hücre değişimini değil nörit büyümesini de etkilediği yine aynı çalışmada gözlenmiştir. (Xie et al., 2009) Şekil 2.2’de embriyonik kök hücrelerinin sinir hücrelerine dönüşümü görülmektedir.



Şekil 2.2 Embriyonik kök hücrelerin sinir hücresine dönüşüm (Xie et al., 2009)

İnsanlardan bakterilere tüm canlılar mekanosensitif özellik gösterirler. Fiziksel kuvvetler bazı fizyolojik proseslerin düzenlenmesinde rol alırlar. Fiziksel etkilerin canlıda biyokimyasal bazı etkilere yol açabilmektedir. Protein sentezinde artış, hücre göçü, hücre sağkalım ve apoptozu, hücre morfolojisinde değişiklikler gibi etkileri sıklıkla görülmektedir. Mekanotransdüksiyon sayesinde hücrelerin sitoskeletlerinde sağlamlaşma ve daha sıkı bir yapıya dönüşme görülür. Özellikle kalp yapısı düşünüldüğünde kanın pompalanmasının verdiği ve ayrıca bu pompalama sonucu oluşan kayma gerilmesi hücrelerin belirli bir şekilde kalabilmelerini sağlamaktadır. Aynı şekilde kemik düşünüldüğünde de üzerine binen yükün verdiği mekanik stres kemik hücrelerinin stabil olarak kalmalarına destek sağlamaktadır. (Orr et al., 2006; Duncan et al., 1995)

Vücudun pek çok organında olduğu gibi sinir sistemi de henüz embriyogenez sırasında mekanik uyarılara maruz kalmakta ve aldığı mekanik uyarılar doğrultusunda gelişimini sürdürmektedir. Kemik, kas gibi hücreler için mekanik uyarı altında *in vitro* kültürasyonun önemi uzun zamandır vurgulanmaktadır. (Tabesh et al., 2009; Weinbaum et al., 1994; Burger et al., 1998; Shimko et al., 2008; Mullender et al., 2004) Ancak sinir hücrelerinin *in vitro* kültürü, özellikle de akson uzaması üzerinde mekanik yüklerin etkisi yeni yeni dikkat çekmeye başlamıştır. (Sadoshima et al., 1997; Chetta et al., 2010) Özellikle yavaş ve kontrollü olarak gerilmeye maruz bırakılan aksonların 10 cm'ye kadar uzatılabildiğini gösteren ve bu yöntemin periferik sinir ve omurilik

yenilenmesi amaçlı kullanımı üzerine yapılan çalışmalar dikkat çekmektedir. (Bueno et al., 2008; Pfister et al., 2004; Pfister et al., 2007) Bu çalışmalarda 8 mm/gün hızına varan akson uzaması elde edilmiştir ki bu doğal akson uzamasından on kat daha hızlıdır. (Iwata et al., 2006) Ancak bu çalışmalar mekanik gerilmeyi sadece aksone uygulamakta, nöron somasının mekanik yük altında davranışı konusunda bilgi vermemektedir. Ayrıca merkezi sinir sistemi (MSS) nöronlarında aksonların çoğunlukla mikrometre ve milimetre boyutlarında olmasından dolayı benzer bir terapötik strateji olanağı bulunmamaktadır. Nörodejeneratif rahatsızlıkların tedavisini amaçlayan çalışmalarda, doku mühendisliği ve hücre replasman araştırmalarında mekanik yükün hücre gelişimini destekleyici bir etken olarak kullanılabilmesi için MSS nöronlarının doğrudan hücre bütünü üzerine uygulanacak gerilmelere moleküler düzeyde verdikleri tepkilerinin belirlenmesi gereklidir.

Nöronlar mekanik gerilmelere protein sentezini ve transportunu arttırarak cevap vermektedirler (Gordon, 2010; Hengst et al., 2009; Lin et al., 2008) Germe uygulaması ve uzama cevabı arasında henüz bilinmeyen bazı hücre içi sinyal yolları ile mekanotransdüksiyon meydana gelmektedir. (O'Toole et al., 2011; Janmey et al., 2011) Nöronlardaki mekanotransdüksiyonun mitokondriyal hareketle (Vogel et al., 2006), talin (Lamoureux et al., 2010) filamin (del Rio et al., 2009) ve bazı integrinlerle (Byfield et al., 2009; Friedland et al., 2009) ilgili olduğu bulunmuş olsa da mekanizmayı bütünüyle açıklayan bir model için henüz çok az çalışma mevcuttur. Ayrıca farklı nöronal hücre tiplerinin birbirlerinden çok değişik morfolojilere sahip olduğu ve sito-iskeletin gerilmeye yanıtının farklı nöronlarda zıt şekillerde olabileceği de gösterilmiştir. (Roca-Cusachs et al., 2009)

Sınırlı düzeylerde nöronlar üzerinde gelişimi tetikleyici olduğu düşünülen gerilme, daha yüksek dozlara çıktığında travmatik hasara sebebiyet vermektedir. Merkezi sinir sisteminde bulunan nöronlar ve diğer hücre tipleri kafatası ve omurga içinde, omurilik sıvısı ve menenj desteğiyle korumalı oldukları için mekanik yüklere karşı diğer hücre tiplerine göre daha hassastırlar. Dolayısıyla diğer hücrelerin dayanabilecekleri kadar düşük miktarda travma sonucu bile hasar görebilirler. Merkezi sinir sistemi hücrelerinde oluşan mekanik travma iki fazda incelenebilir. (Suter et al., 2011; Chen et al., 2009; LaPlaca et al., 2010; Cullen et al., 2007; Fujimoto et al., 2004; Poylishock et al., 2005)

a. Primer (Birincil) veya akut hasar; doğrudan mekanik yük altında kopma, yırtılma ve ezilmeler ve/veya hücre zarı hasarı sonucu hücre ölümü

b. İkincil veya kronik hasar; mekanik travma sonucu oluşan organel ve moleküler düzeyde stresleri takiben enflamasyon, hücre sinyalizasyonu ve gen ekspresyonları gibi hücresel metabolizmada oluşan bozukluklara bağlı olarak gecikmeli hücre ölümü ve/veya nörodejenerasyon sonucu uzun süreli veya tümünden duysal, motor ve/veya kognitif fonksiyonlarda kayıp.

Birincil tip hasarlar önüne geçilemez sonuçlara yol açarken ikincil tip hasarlar ilk anda tespit edilememek ve daha sonra ani ölümlere ya da nörolojik bozukluklara yol açmakla beraber, zamanında ve doğru müdahale sonucu tedavi edilebilme şansına sahiptirler. Ancak ikincil hasarlardaki kimyasal ve moleküler kaskadlar, hücrelerin hasara uğradıkları mekanik yük düzeyleri, hatta hangi tip hücrelerin hangi düzeyde etkilendikleri dahi bilinmediği için günümüzde ikincil tip travma hasarlarının tedavisinde henüz çok önemli yol kat edilememiştir. (Chen et al., 2009; LaPlaca et al., 2010; Cullen et al., 2007; Fujimoto et al., 2004; Graham et al., 1995) Sıçan duysal sinirlerinde %10 luk bir gerilmenin fonksiyonel hasara yol açtığı bulunmuşken (Sadoshima et al., 1997), gerçek hayatta mekanik travma sonucu beyin hücrelerinin %40'lara varan düzeyde gerilmelere maruz kaldığı belirtilmektedir. (Shi et al., 2006) İkincil hasarlara yol açması olası hücresel mekanizmalar arasında en güçlü görülen mekanizma hücre zarının farklı iyonlara, özellikle kalsiyuma olan geçirgenliğinde değişimler sonucu hücreler içine yüksek oranda kalsiyum akışının gerçekleşmesidir. (Engel et al., 2005; LaPlaca et al., 1997; Cargill et al., 1996) Fizyolojik şartlarda nöronların sitoplazmalarında beklenen Ca^{2+} konsantrasyonu ~50-150 nM arasında değişmektedir ve bu konsantrasyonun üstü hücre için toksik etkide bulunur. (Cargill et al., 1996; Gennerelli et al., 1998; Choi, 1988) Etkin olabilecek diğer mekanizmalar içinde enflamasyon, serbest radikaller sonucu oluşabilecek hücresel stres ve farklı reseptörlerde oluşabilecek fonksiyon bozuklukları (LaPlaca et al., 1998) ve bunlar sonucu sinaptik bağlantılarda oluşabilecek kopukluklar (Davis, 2000) olarak gösterilmiştir.

Sivil hayatta düşmeler, trafik kazaları gibi ani çarpmalarda, askeri alanda da patlamalar ve ateşli silahlar sonucu çok sık yaşanan travmatik beyin hasarlarının

tedavisine yönelik yeni yöntemler geliştirebilmek için doğru tip ve düzeyde mekanik yük ve şekil değiştirmeleri hücreler üzerinde mimik eden *in vitro* model sistemlere büyük gereksinim vardır.

Travmatik beyin hasarı (TBH) araştırmalarında *in vitro* bir modelin *in vivo* modellere göre en büyük avantajı, fizyolojik olarak çok kompleks olan beyin hasarında farklı değişkenleri izole ederek sistematik bir yaklaşımla tek tek hücre ve manipülasyon tiplerinin davranış ve etkilerini inceleme olanağı sağlamasıdır. Ayrıca *in vivo* modellerde vasküler ve immün sistem reaksiyonları sonucunda kanama ve ödem meydana gelecek, nöronlardan salınan hücrel metabolitler ortamdaki uzaklaştırılacak, kanama sonucu lipid peroksidasyonu oluşacaktır. Bütün bu doğal reaksiyonlar nöronlarda oluşan metabolik değişimleri incelemeyi güçleştirmektedir. MSS'nin önemli bir koruyucu özelliği olan kan beyin bariyeri (KBB) de terapötik çalışmalarda nöronlara biyoaktif ajanların ulaştırılabilmesine engel teşkil etmektedir. *In vitro* bir model *in vivo* ortama göre daha kontrollü bir mekanik uyarı verilebilmesine olanak tanıdığı için hücrel mekanizmaların çözümlenmesinde ve tahammül kriterlerinin belirlenmesinde güçlü bir yaklaşım getirebilir. (Suter et al., 2011; Chen et al., 2009; LaPlaca et al., 2010) Model çözümlendikçe hücre tiplerinin, dizilimlerinin ve uygulanan yüklerin kompleksliği artırılarak *in vivo* gelişen olaylara sistematik olarak yaklaşmak mümkün olacaktır.

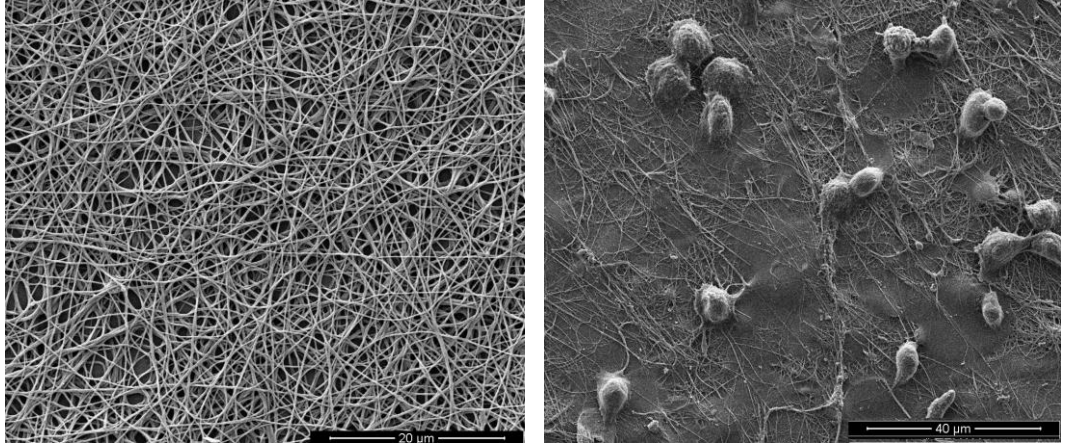
Hücrelerin üzerine mekanik yükler farklı yöntemlerle uygulanabilir. En sık başvurulan yöntem statik bir substrata tutunmuş hücreler üzerinden sıvı akışı sağlanarak, veya döner ya da perfüzyon tipi biyoreaktörler yardımıyla hücreler üzerinde kayma gerilmeleri yaratmaktır. (Poylishock et al., 1992; Cioffi et al., 2006; McCoy et al., 2010) Ancak ikincil tip MSS hasarları düşünüldüğünde nöronlar travmatik gerilmelere yüzeylerinden çok tutundukları ekstraselüler matris aracılığıyla maruz kalmaktadırlar. Dolayısıyla akışkan aracılığıyla uygulanan kayma gerilmeleri incelenmek istenen travma modelini doğru olarak karşılamamaktadır. Literatürde hidrostatik basınçla substratı şişirerek veya tek ya da çift eksenli gerilme uygulayan modeller de mevcuttur. (Sadoshima et al., 1997; Chetta et al., 2010; Bueno et al., 2008; Pfister et al., 2004; Pfister et al., 2007; Iwata et al., 2006; Gordon, 2010; Hengst et al., 2009; Lin et al., 2008; O'Toole et al., 2011; Janmey et al., 2011; Vogel et al., 2006; Lamoureux et al., 2010; del rio

et al., 2009; Byfield et al., 2009; Friedland et al., 2009; Roca-Cusachs et al., 2009; Suter et al., 2011) Bu modellerin en önemli dezavantajları ise substrat yüzeyinde gerilmenin homojen olarak dağılmamasıdır. Bu sebeple önerilen çalışmada benzer şekilde substratın gerilmesine dayanan, ancak gerilmeyi dairesel olarak bütün substrata eşit olarak dağıtacak bir germe düzeneğinin kullanılması düşünülmüştür. Benzer bir mekanik germe düzeneğini daha önceden de geliştirmiş ve esnek film substratlar üzerinde gerilmenin homojen olarak dağıldığını gösterilmiştir. (Blackman et al., 2000)

Sinir hücrelerinin *in vitro* kültür ortamında nano lifli yüzey morfolojileri üzerinde daha düzenli büyüdüğü, bu morfolojide üretilmiş farklı polimer yüzeyler ve doku mühendisliği iskeleleri üzerinde gösterilmiştir. (Demirci vd., 2009; Yang et al., 2005; Teng et al., 2002; Verdu et al., 2002) Bu tip yüzey morfolojilerinin nöronların doğal yapılarını taklit ederek bağlanmalarını ve elektrik aktivitelerini destekleyici rol oynadıkları düşünülmektedir. (Chew et al., 2008)

Bu çalışmada hücrelerin üzerinde kültüre edilecek liflerin üretileceği polimer olarak PCL seçilmiştir. PCL sentetik bir polimer olup çeşitli doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmaktadır. Aynı zamanda PCL nanofiber iskeleler elektroçirme yöntemiyle de üretilebilmektedir. Literatür incelendiğinde sinir hücreleriyle yapılan çalışmalara da rastlanmaktadır. Farklı sinir hücrelerinin büyümelerinde, göçlerinde ve birbirleriyle olan iletişimlerinde pozitif etkilere sahip olduğu saptanmıştır. (Tabesh, 2008 ;Tabesh et al., 2009; Prabhakaran et al., 2008; Xie et al., 2009)

Laboratuvarımızda da daha önce sinir hücrelerinin elektroçirme ile üretilmiş kitosan/poli-L-lizin iskeleler üzerinde büyüebildiği gösterilmiştir. (şekil2.3)



Şekil 2.3 Elektroğirme ile üretilmiş kitosan/poli-l-lizin nano fiberler (a) ve bu fiberler üzerinde kültive edilmiş PC12 hücreleri (b) (Nesil vd., 2011)

Hücreler üzerine uygulanabilecek mekanik gerilmelerin uygulanma şekli düşünüldüğünde üç tip gerilme kullanılabilir; statik, eylemsizlik (inertial) ve vurma (impact) sonucu oluşan gerilmeler. Statik gerilmeler hücre substratının devamlı olarak aynı miktarda gerilmesiyle elde edilebilir. Substrat üzerine güçlü bir şekilde tutunabilen bütün hücreler sito-iskelet organizasyonları gereği bu tip bir gerilmeye morfolojilerini adapte edecek ve adaptasyondan daha sonra devam eden gerilme hücre üzerinde herhangi bir strese sebep olmayacaktır. Ayrıca gerçek hayatta beyinde oluşacak ezilmelere karşılık olarak düşünülebileceğinden, travmatik beyin hasarlarını temsil etmemektedir ve bu çalışma kapsamında incelenmeyecektir. (Senses et al., 2010; Gennarelli, 1997) Eylemsizlik sonucu oluşan gerilmeler ise travmatik bir kaza sonrasında kafatası içinde oluşan yüksek momente ve ivmelenmeye bağlı olarak meydana gelen basınç farklarına ve deformasyonlara denk gelmektedir ki bu tip deformasyonlar genel olarak primer hasarlara yol açarak ani hücre ölümü ile sonuçlanırlar. (Senses et al., 2010; McIntosh et al., 1996) Bu çalışma kapsamında incelenmesi planlanan ikincil tip hasarlara yol açan gerilme tipi, beyin hücreleri ve ekstraselüler matrisinde kısa süreli ve az miktarlarda gerilmelere yol açan, vurma şeklindeki gerilmelerdir. Bu gerilmeler beyin dokusunda yaklaşık 50 milisaniyelik hareketlere yol açar. (Adams et al., 1989)

Ayrıca tezin çalışmaları sırasında hücre apoptozunun belirlenmesi amacıyla substratlara uygulanacak gerilme miktarları daha önce sonlu elemanlar tekniğiyle

ve hayvan modelleriyle belirlenmiş travmatik germe miktarları esas alınarak belirlenecektir. (LaPlaca et al., 1997; Stålhammar et al., 1990; Gennarelli et al., 1982; Margulies et al., 1990)

Travmatik beyin hasarı çeşitli nörokimyasal mekanizmalar ve hücre içi sinyal yollarının tetiklendiği kompleks nörodejeneratif bir süreçtir. Travmatik aksonal hasar, nöronal ve glial hücre ölümü ile oluşturulan deney modelleri travmatik beyin hasarına benzer patolojileri göstermektedir. Hasara bağlı olarak gelişen hücre ölümü; hücre içi kalsiyum düzeylerindeki artış, kalpainlerin ve caspaselerin aktivasyonu, proapoptotik ve antiapoptotik Bcl-2 proteinleri arasındaki dengenin bozulması, mitojenle aktive olan protein kinazların düzeylerindeki değişiklikler ve DNA hasarı gibi çeşitli mekanizmaları içermektedir. Kafa travması sonucu gelişen veya deneysel olarak oluşturulan beyin hasarı modellerinde nöronlarda gözlemlenen hücre ölümü apoptotik veya nekrotik bir form gösterir. (Galbraith et al., 1993)

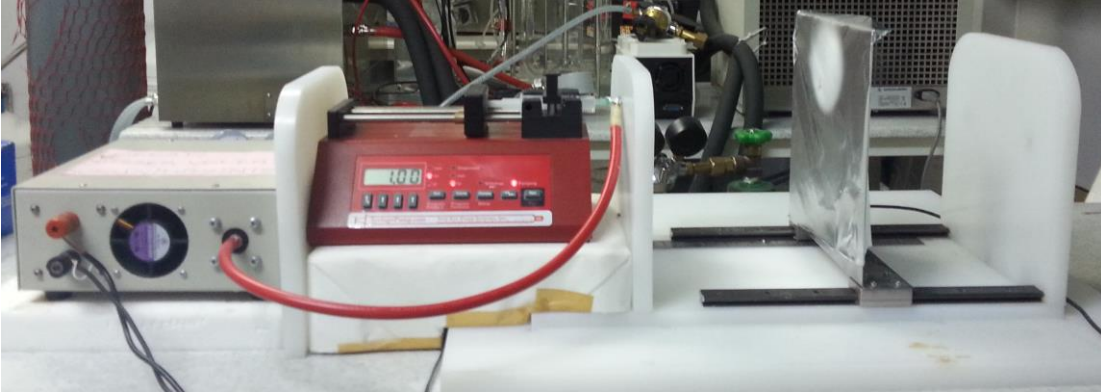
Nekrozun aksine apoptoz; RNA ve protein sentezi ile yeni enzimlerin aktivitelerini gerektiren aktif bir hücre ölüm şeklidir. Oksidatif stres, mitokondriden sitokrom c salınımı, caspaselerin ve endonükleazların aktivasyonu gibi moleküler olaylar ve dış uyaranlar apoptozu başlatabilmektedir. Caspaselar ve Bcl-2 protein ailesi hücrede apoptozun düzenlenmesinde önemli roller üstlenmektedir. (Pike et al., 2000) Sisteinil aspartat proteazlardan olan caspaselar; başlatıcılar ve efektörler olarak iki ana gruba ayrılırlar. Efektör caspaselardan olan caspase-3'ün aktivasyonu DNA tamir enzimleri ve hücre iskeleti proteinlerinin yıkımına yol açarak apoptozda gözlemlenen morfolojik değişimlere ve DNA hasarına neden olmaktadır. Deneysel beyin hasarı oluşturulmuş sıçanlarda serebral kortekste gelişen caspase-3 aktivasyonu hasarı takiben saatler içinde gözlenebilmekte ve sonraki günlerde dahi tespit edilebilmektedir. (Wennersten et al., 2003; Clark et al., 2000) Proapoptotik (Bid, Bad, Bak, Bax, Noxa, Puma) ve antiapoptotik (Bcl-2, Bcl-x1, Mcl1) proteinlerden oluşan Bcl-2 ailesi proteinleri caspase aktivasyonunu düzenleyerek apoptozu uyarmakta veya inhibe etmektedir. Mitokondri dış membranında bulunan Bcl-2; mitokondriden sitokrom c salınmasını ve buna bağlı olarak gelişen efektör caspaselerin aktivasyonunu önleyerek antiapoptotik etki gösterir. Sitozolda bulunan ve uygun bir uyarı sonrası yapısal değişikliğe uğrayarak mitokondri membranına giden Bax; sitokrom c

salınmasına neden olarak apoptozu uyarmaktadır. Nörotoksik ajan veya iskemi ile indüklenen nörodejeneratif modellerde Bax mRNA ve protein düzeylerinin artarken Bcl-2 ekspresyon düzeylerinin azalmasının hücreyi apoptotik hücre ölümüne götürdüğü gösterilmiştir. Deneysel beyin hasarı oluşturulmuş sıçanlarda canlılığını kaybetmemiş nöronların artmış Bcl-2 ekspresyonu gösterirken, apoptotik hücrelerde ise Bax'ın mitokondri membranına transloke olduğu gözlemlenmiştir. (Pike et al., 2000; Wang, 2000; Chen et al., 1995)

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Elektroğirme cihazının kurulması ve çalışma prensibi

Elektroğirme cihazı için yüksek gerilim sağlayan güç kaynağı alındı ve mevcut olan sisteme dahil edildi. Elektroğirme sisteminde doğrusal akım (DC) yüksek gerilim retci topraklandı ve gerilimin diğer ucu metal iğneli bir şıringaya bağlandı. şıringa bir enjektör pompaya monte edildi. İğne ucundan 30 cm'ye kadar çekilebilen iletken bir metal yerleştirildi. Eğirilen polimer bu iletken metal üzerinde toplanmaktadır. Voltaj farkının uygulanması sonucu polimer solüsyonu ince lifler halinde iletken yüzey üzerini doldurmaktadır. Ayrıca cihazın çalışma prensibinin iyice anlaşılması ve PCL polimer çözeltisinin eğirilme parametrelerinin optimizasyonu için bir seri denemeler yapıldı. Bu denemelerde iletken metalin şıringa ucuna uzaklığı, enjektör pompanın debisi, yüksek gerilim değeri ve tekrarlanabilirliği test edildi.



şekil 3.1 Elektroğirme sistemi

3.2 Mekanik Germe Cihazı retimi

Tasarlanan mekanik kültivasyon sistemi hareketli göz tutucusu ve sabit germe tabanı olmak üzere iki ana kısımdan oluşur. Mekanik kültivasyon sisteminin hareketli göz tutucusu ve sabit germe tabanı şekil 3.2'deki gibidir. Düzenek germe işlemlerinin tamamı kültür besiyerinin içerisinde kalacak şekilde hazneli pleksiglas bir alt tabaka içerisinde gerçekleştirildi. Ayrıca iskelelerin sabitleneceği ve 12 gzly hücre kültürü pleytlerinin içerisine tam oturabilen başka

bir pleksiglas tabaka daha tasarlandı ve üretildi. İskeleler bu tabakaya silikon o-ring'ler yardımıyla sabitlendi.



Şekil 3.2 Mekanik Germe sistemi

3.3 Doku İskelesi Üretimi

Dikolorometan (DCM) ve Dimetilformamid (DMF) (1:1) içerisinde %12 oranında polikaprolakton (wt/v) çözdürüldü. Elde edilen çözelti bir gece boyunca manyetik karıştırıcı üzerinde bırakıldı. Çözelti enjektör yardımıyla alınarak enjektör pompaya bağlandı ve enjektör pompa aracılığıyla da elektro-eğirme cihazına yüklendi. Elektro-eğirme yöntemi ile polimer lifler üç boyutlu olarak elde edildi. Bu yöntem ile iskele üretimine devam edildi. Çizelge 1'de optimizasyon için denenmiş değerler görülmektedir.

Voltaj (kV)	Uzaklık (cm)	Debi (ml/saat)
0,8	25	1
	20	1
	15	1
	10	1
1	25	1

	20	1
	15	1
	10	1
1,2	25	1
	20	1
	15	1
	10	1
1,5	25	1
	20	1
	15	1
	10	1
1,57	25	1
	20	1
	15	1
	10	1
1,7	25	1
	20	1
	15	1
	10	1

Çizelge 1 Elektroegirme optimizasyon değerleri

3.4 Stok B35 MSS Hücresinin Çözdürülmesi

1. -196°C' de stoklanmış olan kriyo tüp çıkartıldı.
2. 37°C' deki su banyosunda bekletildi.
3. Tüp içeriği %10 FBS (Fötal sığır serumu, S0115, Biochrom AG, Almanya), % 0.1 gentamisin (50 mg/ml) (SV30080, HyClone, USA) ve içeren α -DMEM (Gibco) besi ortamı ile bir santrifüj tüpüne (Grenier Bio-One, Almanya) toplandı.
4. Toplanan hücreler 1000 rpm' de 4°C' de 5 dakika santrifüjlendi (5810 R, Eppendorf, Almanya).
5. Süpernatant uzaklaştırıldı.
6. Hücre pelleti hafifçe tüpe vurularak yüzeyden kaldırıldı ve besi ortamı ile süspanse edildi.

7. Süspans haldeki hücreler uygun ölçüdeki flaska (Grenier Bio-One, Almanya) alındı.
8. Flask 37°C' de %5 CO₂ içeren inkübatörde (HERA Cell, Heraeus, Almanya) inkübasyona bırakıldı.

3.5 B35 MSS Hücrelerinin Pasajlanması

1. Hücrelerin üzerinde bulunan kullanılmış besi ortamı çekildi.
2. Hücrelerin yüzeyi 37°C'deki Ca⁺², Mg⁺² içermeyen PBS (L1825, Biochrom AG, Almanya) ile yıkandı.
3. Hücrelerin üzerine tripsin (% 0,05)-EDTA solüsyonu (SH30236.01, HyClone, USA) eklendi, yüzeye yayıldı ve 4-5 dakika 37°C' deki inkübatörde bekletildi.
4. Mikroskop ile tüm hücrelerin yüzeyden kalktığı gözlemlendiğinde %10 FBSiçeren besi ortamı ile hücreler bir santrifüj tüpüne toplandı.
5. Hücreler 1000 rpm 4°C'de 5 dakika santrifüjlendi.
6. Santrifügasyon sonrası, süpernatant döküldü.
7. Santrifüj tüpünün dibindeki hücreler hafifçe vurarak yüzeyden kaldırıldı ve vasat ile süspans edildi.
8. Hücre süspansiyonu 1:10 oranında yeni bir flaska alındı ve üzerine taze besi ortamı koyularak kültüre devam edildi.

3.6 B35 MSS Hücrelerinin Dondurulması

1. Hücrelerin üzerinde bulunan kullanılmış ortam çekildi.
2. Hücrelerin yüzeyi 37°C'deki Ca⁺², Mg⁺² içermeyen PBS ile yıkandı.
3. 3. PBS ile yıkama yapıldıktan sonra hücrelerin üzerine tripsin (% 0,05)-EDTA solüsyonu eklendi, yüzeye yayıldı ve 4-5 dakika 37°C' dekiinkübatörde bekletildi.
4. Mikroskop ile tüm hücrelerin yüzeyden kalktığı gözlemlendiğinde 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, Almanya) ile homojenize edildikten sonra dondurma tüpüne (kriyo tüp) (123278, Greiner Bio-one, Almanya) aktarıldı.
8. Kriyo tüp -86°C' de köpük kutu içerisine kaldırıldı.
9. -86°C derin dondurucuda bir gece bekletilen kriyo tüp, -196°C' deki sıvı azot içeren tanka kaldırıldı.

3.7 Fiber İskelelerin Sterilizasyonu ve Hücre Kültivasyonu

1. İskele yerleştirilmeden önce germe cihazının pleksiglas tabakaları otoklavda sterilize edildi
2. İskeleler germe verilmesi için pleksiglas yapılar üzerine yerleştirildi.
3. Tüm iskeleler 45 dakika boyunca ultraviyole (UV) ışık altında sterilizasyona bırakıldı.
4. Daha sonra iskeleler biyogüvenlik kabin içerisine alınıp 45 dakika boyunca %70 etanol içerisinde bekletildi.
5. Daha sonra iskeleler 12 gözlü pleytlere alınarak kurumaya bırakıldı.
6. Kuruyan yüzeyler 1 gece boyunca 37 °C' de, %5 CO₂' li inkübatörde yüzey şartlandırılması için besiyeri içinde bırakıldı.
7. Şartlandırma sonrası yüzeyler üzerindeki ortam çekildi ve 5000 hücre/cm² konsantrasyonda hücre, yavaş bir şekilde iskele yüzeyine damlatıldı.
8. Hücreler, 37 °C' de, %5 CO₂' li inkübatörde kültivasyona bırakıldı.

3.8 Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM)

Uygulamalar 1. basamaktan 4. basamağa kadar +4°C'de (buz üstünde), 5. basamaktan 11. basamağa kadar ise oda sıcaklığında yapıldı.

1. Örnekler 30 saniye serum fizyolojik ile yıkandı.
2. Serum fizyolojik ile yıkanan örnekler 30 dakika tampon A'da [0.1 M sodyumkaskodilat (C-0250, Sigma, USA) içerisinde hazırlanan gluteraldehit (%5) (8.20603.1000, Merck, Almanya) çözeltisinde] bekletildi.

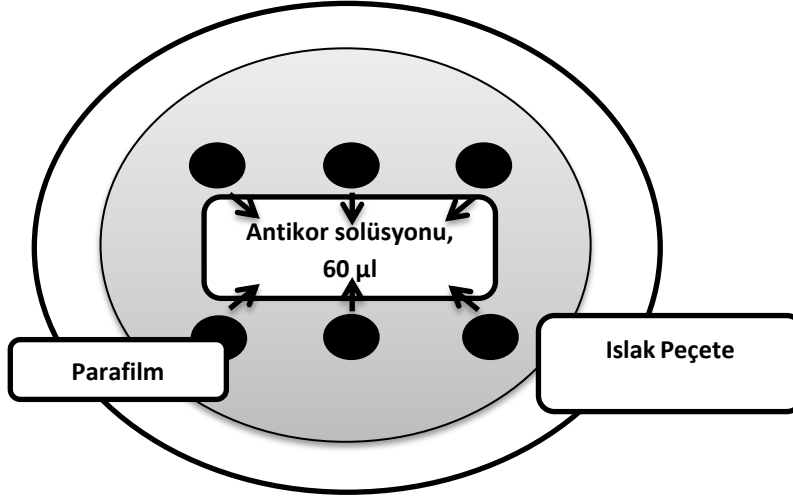
3. Başka bir solüsyon ile yıkama yapılmadan örnekler tampon B'ye [1 M sodyumkakodilat içerisinde hazırlanan sukroz (%7) (1.07651.1000, Merck, Almanya) çözeltisinde] alınarak 30 dakika bekletildi.
4. Başka bir solüsyon ile yıkama yapılmadan tampon C'ye [1 M sodyumkakodilat içinde % 2 ozmiyum tetroksit (19100, Electron Microscopy Sciences,)] alınarak 30 dakika bekletildi.
5. Tampon C aşamasından sonra örnekler 5 dakika distile suda yıkandı ve bu basamak 2 kez tekrarlandı.
6. Örnekler distile su ile yıkamadan sonra artan derecelerdeki alkol serilerinde 5'er dakika bekletilerek susuzlaştırıldı. Sırasıyla etanol (1.00983.2500, Merck, Almanya) serileri; %35, %50, %70, %85, %95, %100, %100 etanol şeklinde hazırlandı.
7. Alkol serileri tamamlanınca örnekler heksametildisilazan (HMDS, 8.4324.250, Merck, Almanya) solüsyonunda 5 dakika bekletildi.
8. Üzerlerinden HMDS çekildikten sonra, örnekler kurumaları için oda sıcaklığında 30 dakika tutuldu.
9. Kuruma tamamlandıktan sonra örnekler SEM incelemesine kadar desikatör içerisinde bekletildi.
10. SEM inceleme öncesi, örnekler pirinç taşıyıcılar üzerine yerleştirildi ve 200 Å kalınlığında altın ile kaplanarak taramalı elektron mikroskobunda incelendi.

Sabitlenen doku iskeleleri üzerinde hücre morfolojileri görüntülendi. Hücrelerin SEM görüntülemesi İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Malzeme Araştırma Merkezi SEM mikroskopu (FEI, Quanta 250FEG) ile yapıldı.

3.9 Fibröz Yüzeylerin İmmünohistokimyasal İşaretleme (Alexa Fluor 488 Phalloidin (A12379) Boyama)

1. Hücrelerin üzerindeki kullanılmış besi ortamı çekildi ve hücreler Ca, Mg içeren PBS ile iki kez yıkandı.
2. +4°C'de bulunan soğuk %4'lük PFA (paraformaldehit, USB 19943) 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, Mg içeren PBS ile iki kez yıkandı.
4. Yüzeyler üzerine 50 mM NH₄Cl solüsyonu eklendi ve 300 rpm' deki çalkalayıcıda çalkalanarak, oda sıcaklığında, 7 dakika inkübe edildi. Bu basamak ile paraformaldehitten gelen aldehyitler uzaklaştırıldı. (quenching).
5. Yüzeyler %0.2' lik PBS-Triton X-100 ile iki kez 5' er dakika, 300 rpm' deki çalkalayıcıda çalkalanarak oda sıcaklığında yıkandı. Bu basamak permeabilizasyon basamağı olarak adlandırılır.
6. Yüzeyler Ca, Mg içermeyen PBS ile bir kez yıkandı.
7. 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 3.3)



Şekil 3.3 Nemli odacık hazırlama

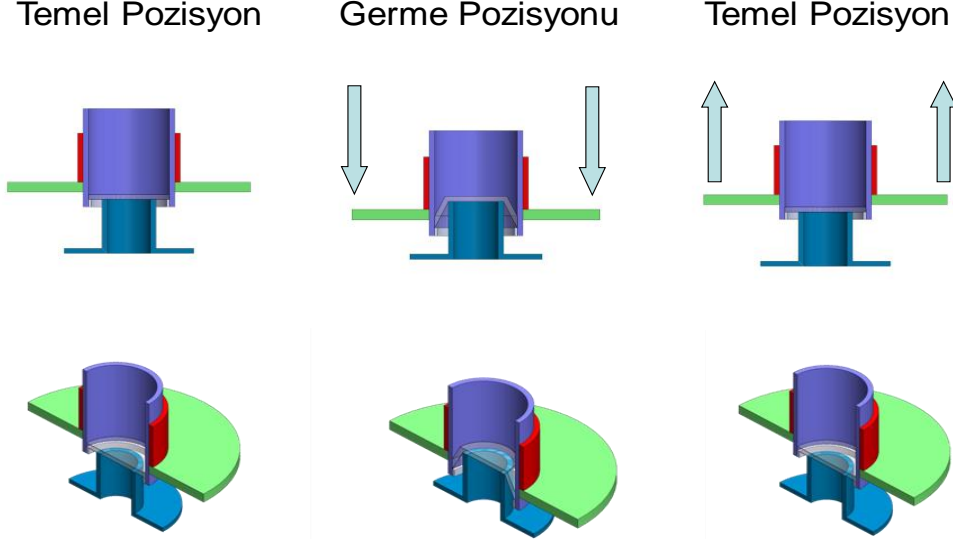
8. Kullanılacak olan antikör solüsyonu hazırlandı. Hazırlanacak antikör solüsyonu için aşağıdaki oranlar kullanıldı:
 - 1:1000 DAPI
 - 1:100 ve 1:200 Alexa Fluor 488 Phalloidin
 - %1 BSA içeren Ca, Mg içermeyen PBS
9. Parafilm üzerine her bir yüzey için antikör solüsyonundan 60 µl damlatıldı ve üzerlerine, ince bir pens yardımı ile PBS içerisinden alınan yüzeyler, önce

peçete üzerinde süzdürülerek hücreli taraf antikorla yüzleşecek şekilde yerleştirildi.

10. Yüzeyle hazırlanan nemli odacık içerisinde, karanlıkta ve oda sıcaklığında 40 dakika inkübe edildi.
11. Antikor solüsyonu ile inkübasyondan sonra, 48 gözlü pleytin her gözüne Ca, Mg içermeyen PBS eklendi. Yüzeyle nemli odacık içerisinde, ince uçlu pens yardımı ile dikkatlice alınıp, önce peçete üzerinde süzdürülerek, hücreli yüzey üste gelecek şekilde, içerisinde PBS bulunan pleyte yerleştirildi.
12. Pleyte yerleştirilen yüzeyler Ca, Mg içermeyen PBS ile 3 kez 10' ar dakika 300 rpm' deki çalkalayıcıda çalkalanarak, oda sıcaklığında yıkandı.
13. Üzerine 10 µl Mowiol 4-88 (Calbiochem, Merck; 475904) damlatılan lamlar üzerine yüzeyler, hücreli yüz Mowiol ile yüzleşecek şekilde kapatıldı. Preparatlar bir gece boyunca oda sıcaklığında kuruması için bekletildi. Preparatlar kuruduktan sonra 4°C'ye kaldırıldı.
14. Örnekler floresan mikroskopta incelendi.
15. Hücrelerde akson ve dentrit (nörit) oluşumu ve oluşan aksonların uzunlukları NIH Scion ImageJ görüntü analiz programı yardımıyla değerlendirildi.

3.10 Hücreler Üzerine Germe Uygulanması

1. Hücre kültüründe kullanılacak olan doku iskeleleri üst silindirin tabanına tutturuldu ve o-ring yardımıyla sabitlendi.
2. Göz tutucu, iki piston yardımı ile yüzeyine temas halindeki doku iskelelerini hareket ettirmektedir. Bu sayede doku iskeleleri germe tabanındaki silindirler yardımı ile gerilerek hücrelere germe yükleri uygulanmış oldu.
3. Bu hareketin yer değiştirme miktarı (deplasmanı) ve frekansı bilgisayar kontrollü yapıldı.
4. Germe işlemi bu iskeleler uygulama boyunca kültür besiyeri içinde kalacak şekilde bir hazne içinde gerçekleştirildi.
5. İskeleler üzerine % 0, 10, 25, 50 germe uygulamaları denendi.



Şekil 3.4 Mekanik germe simülasyon gösterimi

3.11 MTT Testi

MTT testi, malzemenin hücre canlılık ve üreme oranı hakkında bilgi edinmek amacıyla kullanılan, kolorimetrik esasa dayanan bir testtir. Ana maddesi olan MTT'nin (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid) formazana indirgenmesiyle sarıdan mora doğru renk değişikliği gözlenir. Bu renk değişikliği sadece canlı hücrelerde gözlemlendiği için spektrofotometre ile yapılan ölçüm hücre canlılık oranları hakkında bilgi verir. Bu çalışmada, MTT testi ile iskeleler üzerine ekilmiş hücrelerin metabolizması ve proliferasyonu değerlendirilmiştir.

1. İskele üzerindeki hücrelerin kullanılmış besiyerleri çekildi.
2. Hücreli yüzeyler üzerine %10 MTT (5 mg/ml konsantrasyonda) içeren besiyeri eklendi.
3. Hücreler karanlıkta kalacak şekilde 37°C'de, %5 CO²'li inkübatörde 3 saat boyunca inkübe edildi.
4. 3 saat sonunda MTT içeren ortam çekildi.
5. Yüzeyler üzerine DMSO eklenerek oluşan formazan kristallerinin çözülmesi sağlandı.
6. Hücreler 10 dakika boyunca 300 rpm'de çalkalayıcıda çalkalanarak kristallerin iyice çözülmesi sağlandı.

7. UV Spektrofotometrede (MDS Molecular Devices, Versa Max, USA) 570-690 nm dalga boyunda okutularak absorbans değerleri kaydedildi.

3.12 Hücre Apoptozisinin Belirlenmesi

Doku iskeleleri Caspase-3 kiti ile boyandı ve deney sonuçları spektrofotometre ile incelendi. Caspase-3 kiti apoptotik caspase yolağının aktive olup olmadığını test etmek için kullanılan kolorimetrik bir yöntemdir.

1. 5×10^3 konsantrasyonunda ekilmiş olan hücre iskeleleri üzerine %10, %25 ve %50 miktarlarında germe verildi.
2. Germe sonrası 6. ve 24. saat sonunda kit uygulandı.
3. Süspanse edilen hücreler 50 μ l Cell Lysis Buffer içinde 10 dakika boyunca buz içerisinde inkübe edildi. Hücrelerin süspanasyonu tripsin yardımıyla hücreler yüzeyden kaldırılarak yapıldı.
4. Örnekler 1 dakika boyunca microsentrifj içerisinde santrifüj edilir. (10,000x g)
5. Supernatant (cytosolic extract) yeni tüplere alındı ve diğer işleme kadar buz içerisinde bekletildi. (Eğer hemen teste başlanmayacaksa supernatant – 80°C’de saklanabilir)
6. Her bir assay için 50-200 μ g protein 50 μ l Cell Lysis Buffer uygulanır.
7. Her bir örneğe stok solüsyonundan (2X reaction buffer-10 mM DTT) 50 μ l eklendi.
8. 4 mM DEVD-pNA substratından (200 μ M final konsantrasyonu) 5 μ l eklenerek 37 °C’de 1-2 saat inkübe edildi.
9. Örnekler 405 nm’de okutuldu.
10. Kontrol grubu olarak iskeleler üzerinde, ama germe verilmemiş hücreler kullanıldı.
11. Cell lizatından ve bufferdan alınan absorbans değerleri apoptoza giren hücrelerden ve kontrol hücrelerinden çıkarılarak hesaplama yapıldı.

3.13 İstatistiksel Analiz

1. Bütün deney gruplarından en az üçer örnek test edildi. (n=3).

2. Deneylet en az iki tekrarlı yapıldı.
3. Sayısal değerlendirmelerde ortalama değerler ve standart sapmalar rapor edildi.
4. Deneylet grupları arasındaki istatistiksel farklar ANOVA (analysis of variance) yöntemi ile, %95 güven aralığında değerlendirilerek, gruplar arasında ikili ilişkiler Tukey's post-hoc yöntemiyle saptandı.

4. BULGULAR

4.1 Doku İskelesi Karakterizasyonu

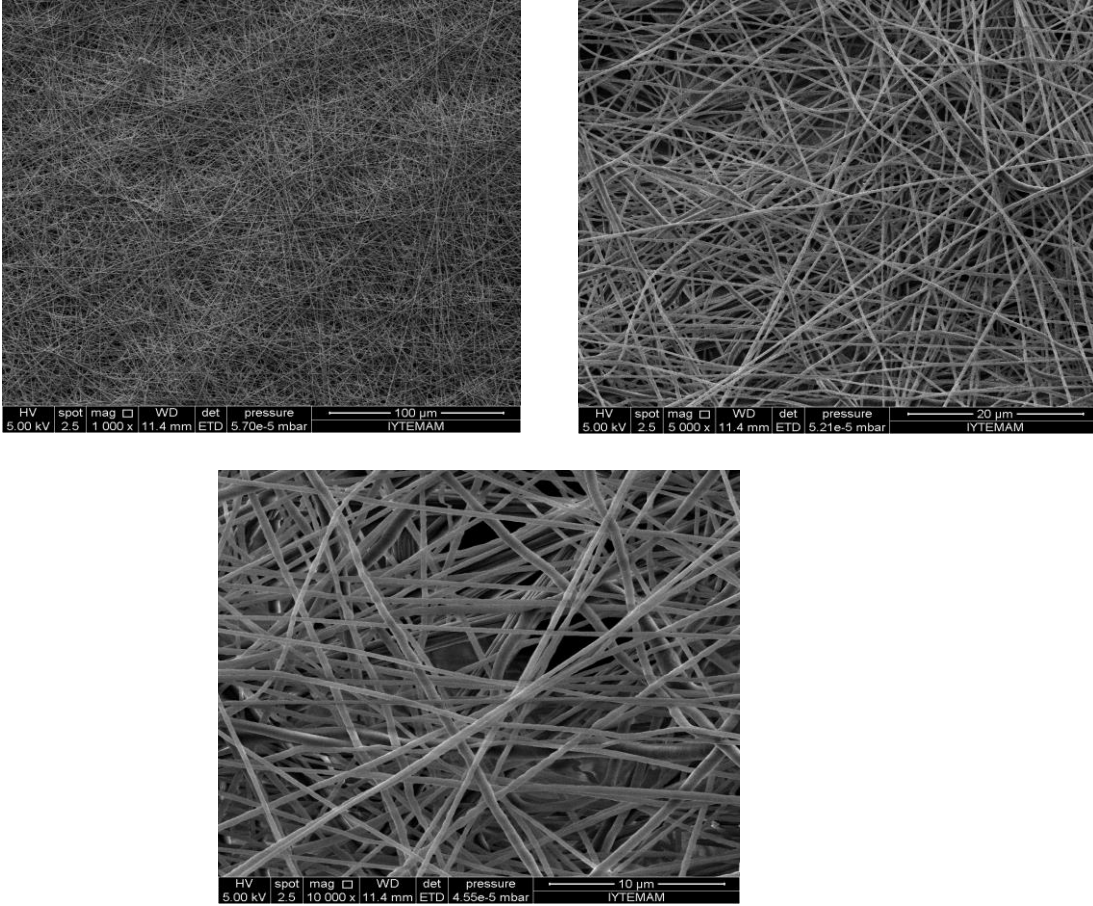
In vitro çalışmalara başlamadan önce hücre davranışlarını etkileyecek porozite, fiber çapı, yüzey teması açısı ve kimyasal iskele özelliklerinin karakterizasyonu yapılmıştır.

4.2 Doku İskelesi Üretim Optimizasyonu

Altı farklı kV değerinde dört farklı uzaklıkta denemeler yapılarak en iyi değere ulaşılmış ve bu değerler kalan tüm çalışmalarda kullanılmıştır. En iyi eğirme 1,57 kV, 15 cm ve 1 ml/saat debide elde edildi. Eğildikten sonra mekanik germe cihazında yapılacak testlere uyumluluklarının iyi olduğu mekanik germenin iskelelerde yırtılma, büzülme, vb hasarlara yol açmadığı görüldü. İskelelerin morfolojileri SEM (taramalı elektron mikroskop) tekniği kullanılarak incelendi. Doku iskelesi üretimi yapılan PCL çözeltisinin viskozitesi ayarlandıktan sonra eğirme işlemleri gerçekleştirildi. Altı farklı kV değerinde dört farklı uzaklıkta denemeler yapılarak en iyi değere ulaşılmıştır. Ve bu değerler tüm çalışmada kullanılmıştır.

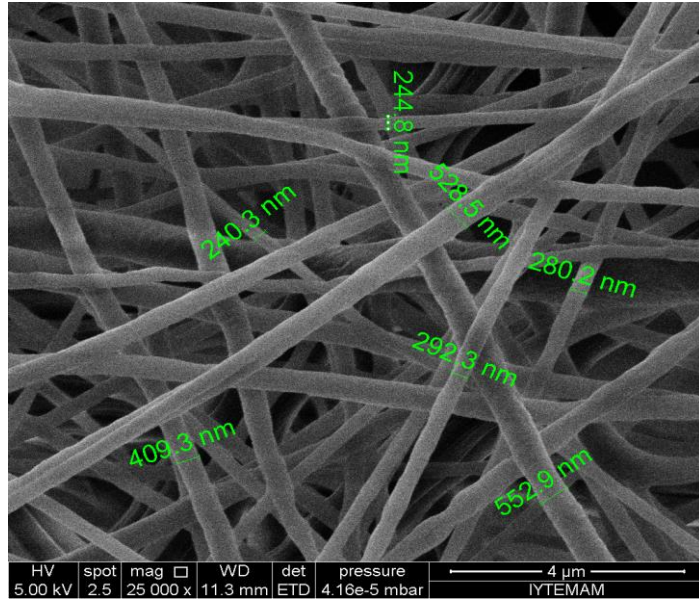
4.3 Doku İskelesi SEM Analizleri

Elektroeğirme yöntemi ile üretilen fiberlerin morfolojileri taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiştir. SEM görüntüleri incelendiğinde eğirme prosesinin optimize edilmiş olması nedeniyle boncuk yapı gözlemlenmemiştir. (Şekil 4.1)



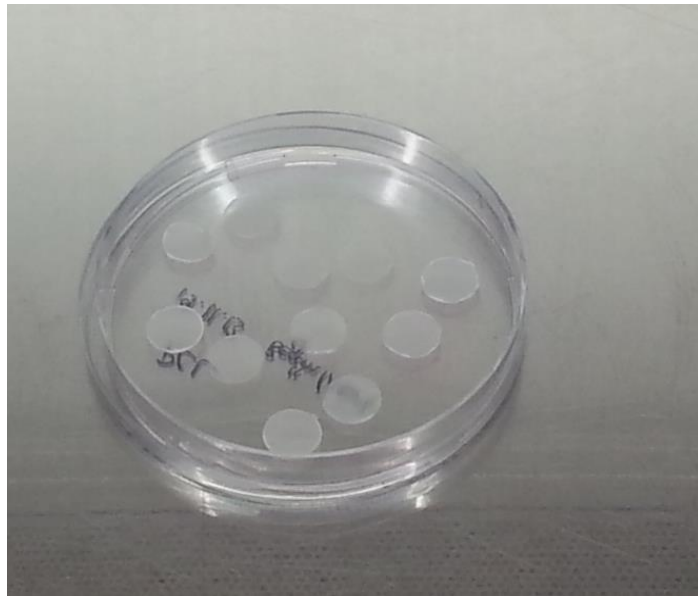
Şekil 4.1 Elektroğirme ile üretilmiş PCL doku iskelelerinin farklı büyütmelerde SEM görüntüleri

İskelelerin porozite ve fiber çapları ImageJ görüntü işleme programı kullanılarak hesaplandı. Elektroğirme ile üretilmiş PCL doku iskelelerinin porozitesi $84 \pm 4\%$ olarak bulundu. Fiber çapları ise 367 ± 115 nm olarak bulundu ve en küçük fiber çapı 252 nm en büyük fiber çapı ise 482 nm olarak ölçüldü. (Şekil 4.2)



Şekil 4.2 Elektroeğirme ile üretilmiş PCL doku iskelelerinin fiber çapı ölçümü

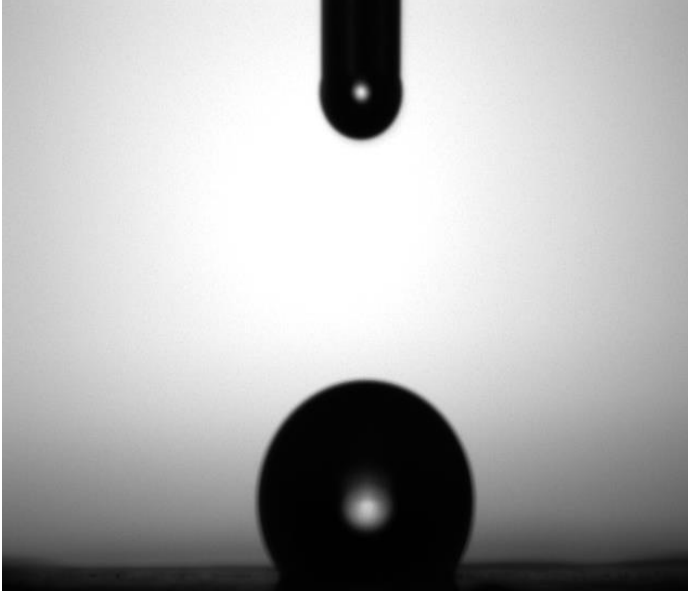
Elektroeğirme işlemi iskelelerin incelenmesini kolaylaştırmak açısından şekil 4.3'deki gibi cam lameller üzerine yapılmıştır.



Şekil 4.3 SEM ve yüzey temas açısı ölçümü için hazırlanan PCL doku iskeleleri

4.4 Yüzey Temas Açısı Ölçümü

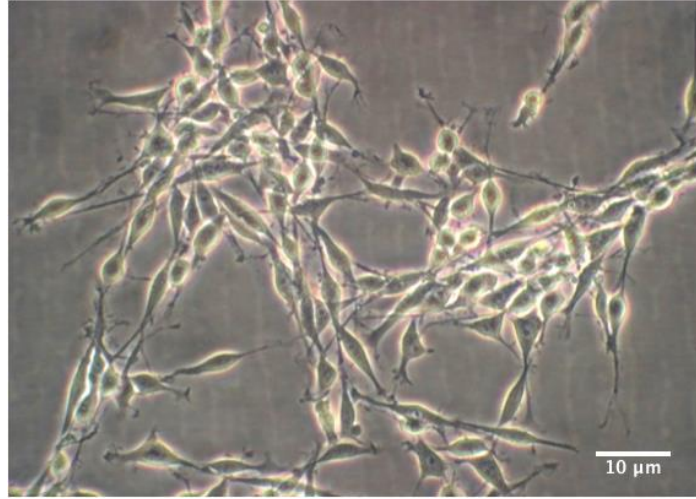
Üretilen yüzeylerin statik temas açıları Sessile drop yöntemi ile kullanılarak tespit edildi. Ölçümler sonrası ortalama yüzey temas açısı $136.32^{\circ} \pm 4$ olarak bulundu.



Şekil 4.4 PCL doku iskelesi yüzey temas açısı ölçümü

4.5 Hücre Kültürü Çalışmaları

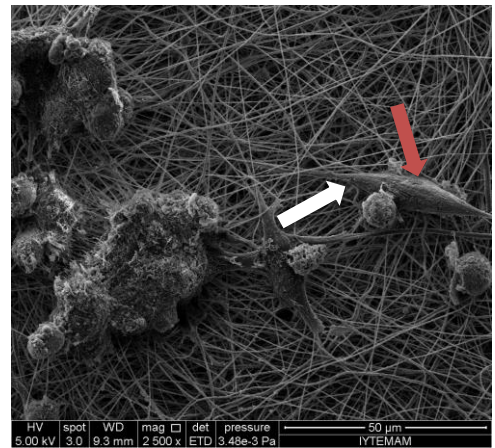
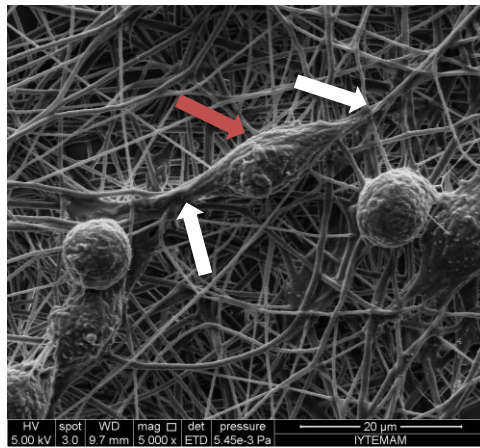
B35 hücre kültüründen alınan optik mikroskop görüntüleri şekil 4.5’de verilmiştir. Bu görüntülerden B35 hücrelerinin sinir hücre morfolojisi ve nörit uzantıları net olarak görülmektedir. Ayrıca hücrelerin sağlıklı oldukları da görülmektedir.



Şekil 4.5 B35 merkezi sinir sistemi hücreleri optik mikroskop görüntüleri

4.6 Hücreli İskelelerin SEM Analizleri

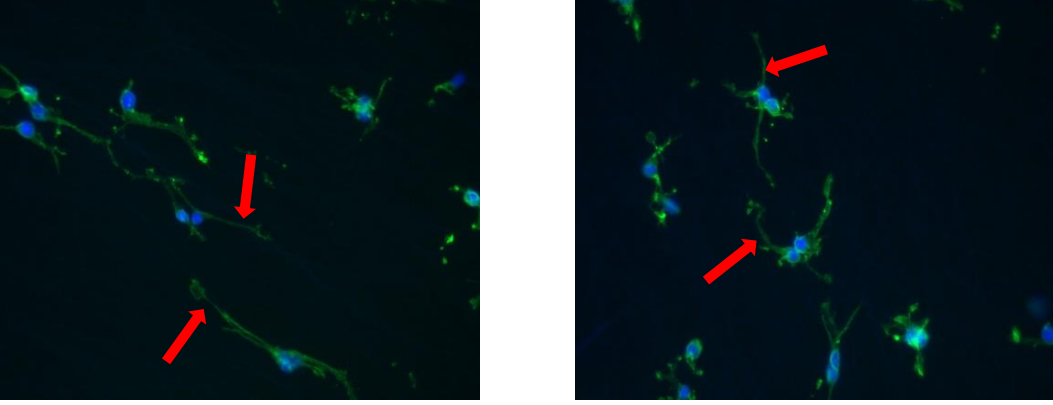
Doku iskeleleri üzerine ekimi yapılmış B35 merkezi sinir sistemi hücrelerinin iskeleler üzerindeki 3 günlük kültivasyonu sonrasında SEM görüntüleri şekil 4.6'daki gibidir. Hücrelerin mltipolar yapıları nörİtleri net olarak seçilmektedir. (Şekil 4.6)



Şekil 4.6 PCL doku iskeleleri üzerindeki B35 hücrelerinin SEM görüntüleri (kırmızı oklar soma, beyaz oklar nörİtleri göstermektedir)

4.7 Floresan Mikroskop Analizleri

Doku iskeleleri üzerine ekimi yapılmış B35 merkezi sinir sistemi hücrelerinin iskeleler üzerindeki 3 günlük kültivasyonu sonrasında floresan mikroskop görüntüleri şekil 4.7'deki gibidir. Kırmızı okla gösterilmiş olan kısımlar nöritler olup PCL doku iskeleleri üzerinde B35 merkezi sinir sistemi hücrelerinin akson organizasyonunu göstermektedir.

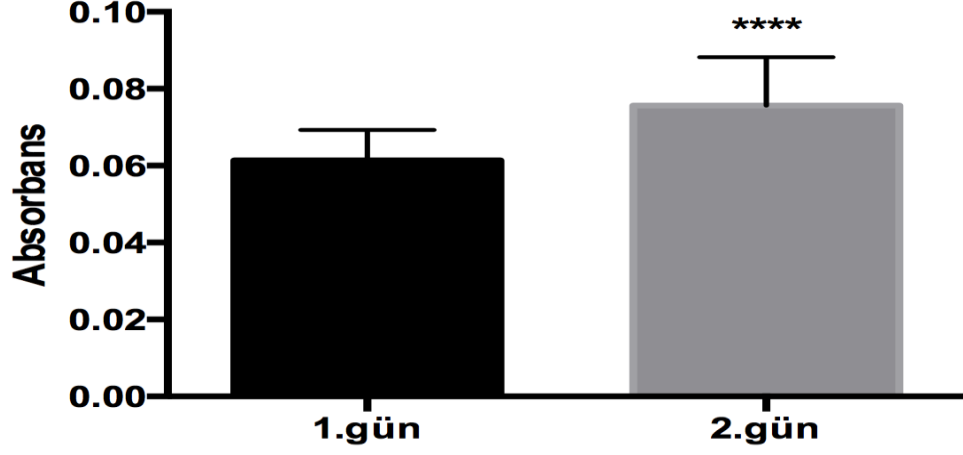


Şekil 4.7 PCL doku iskeleleri üzerindeki B35 hücrelerinin Floresan mikroskop görüntüleri (kırmızı oklar nöritleri göstermektedir)

4.8 Hücre Canlılık Testleri

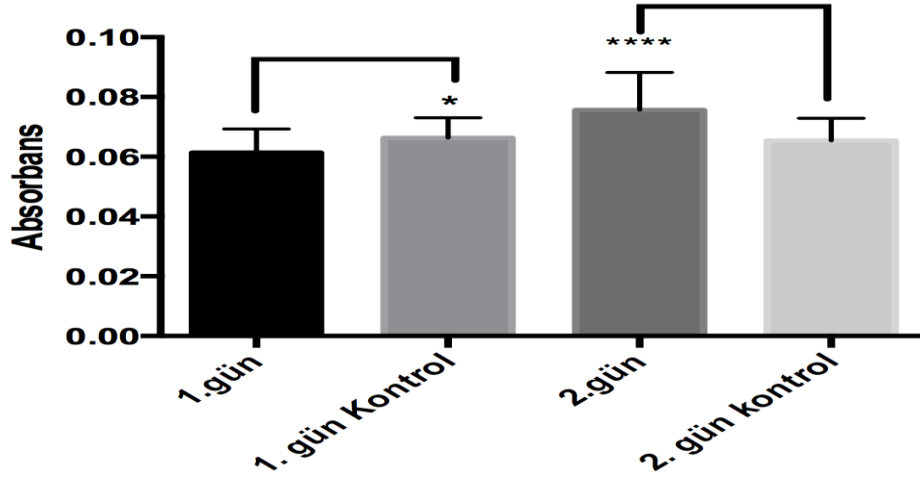
Üç farklı germe oranında (%0, 10, 25, 50) çalışıldıktan sonra mekanik stres uygulanan iskeleler üzerinde 24 ve 48. Saatlerde hücre canlılık analizi yapıldı.

%10 germe uygulanan iskelelerde hücrelerin 48 saat sonra 24 saate oranla daha fazla ürediği görüldü.



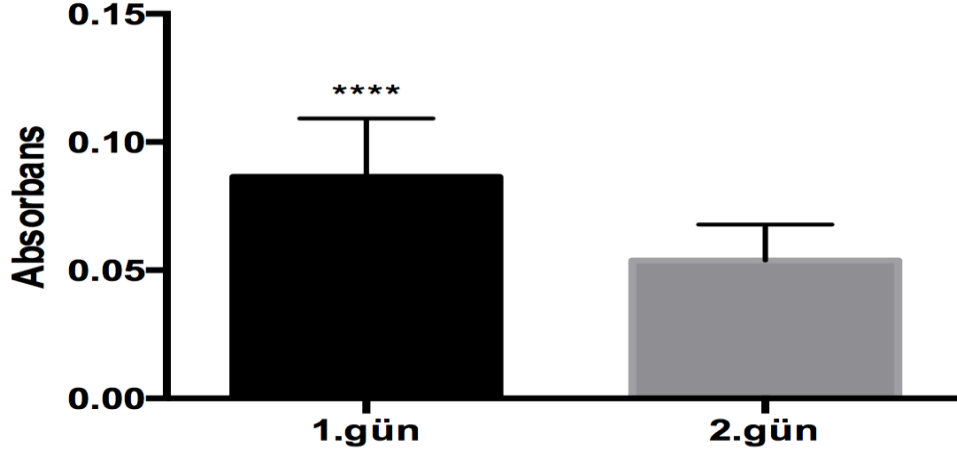
Şekil 4.8 %10 germe 1. ve 2. Gün MTT sonuçları

Ayrıca şekil 4.9'dan görüleceği üzere germe verildikten 2 gün sonra incelenen hücrelerde, iskeleler üzerine ekilmiş, ancak germe verilmemiş olan kontrol grubuna göre canlılık oranı daha fazladır.

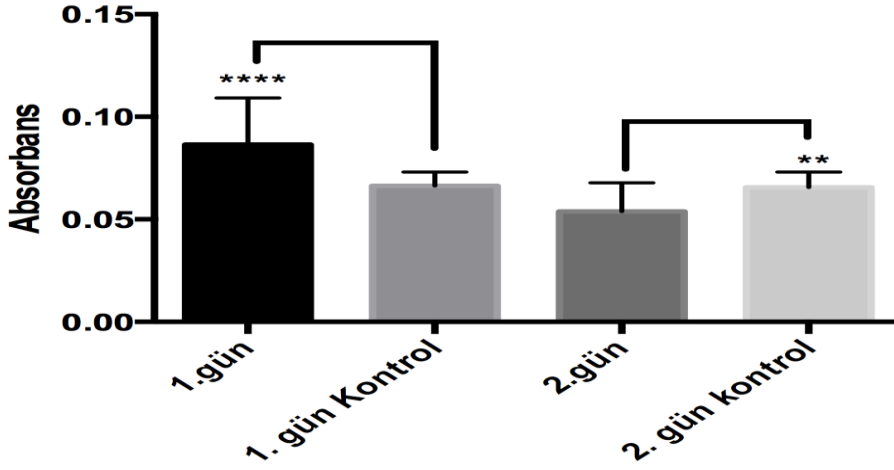


Şekil 4.9 %10 germe 1. ve 2. Gün ve kontrol MTT sonuçları

%25 germe uygulanan iskelelerde hücrelerin 48 saat sonra 24 saate oranla hücre ölümünün arttığı görüldü.



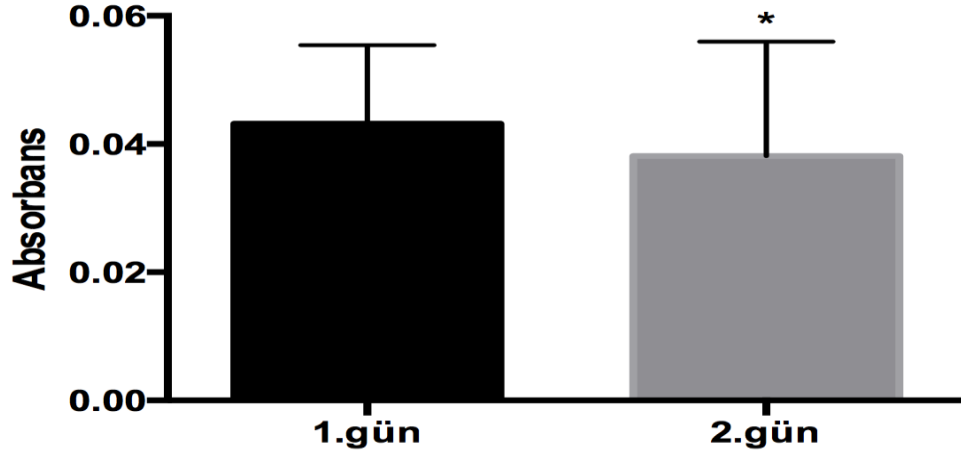
Şekil 4.10 %25 germe 1. ve 2. Gün MTT sonuçları



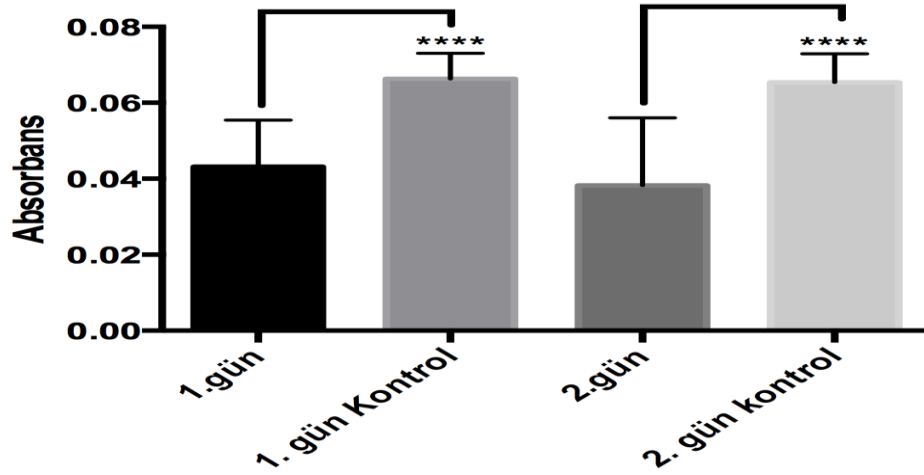
Şekil 4.11 %25 germe 1. ve 2. Gün ve kontrol MTT sonuçları

Ayrıca %25 germe verilmiş hücrelerin 2. gün sonunda kontrol grubuna oranla da daha az canlılık oranı gösterdiği tespit edildi. (Şekil 4.11)

%50 germe uygulanan iskelelerde de %25 germede olduğu gibi hücrelerin 48 saat sonra 24 saate oranla hücre ölümünün arttığı görüldü.



Şekil 4.12 %50 germe 1. ve 2. Gün MTT sonuçları

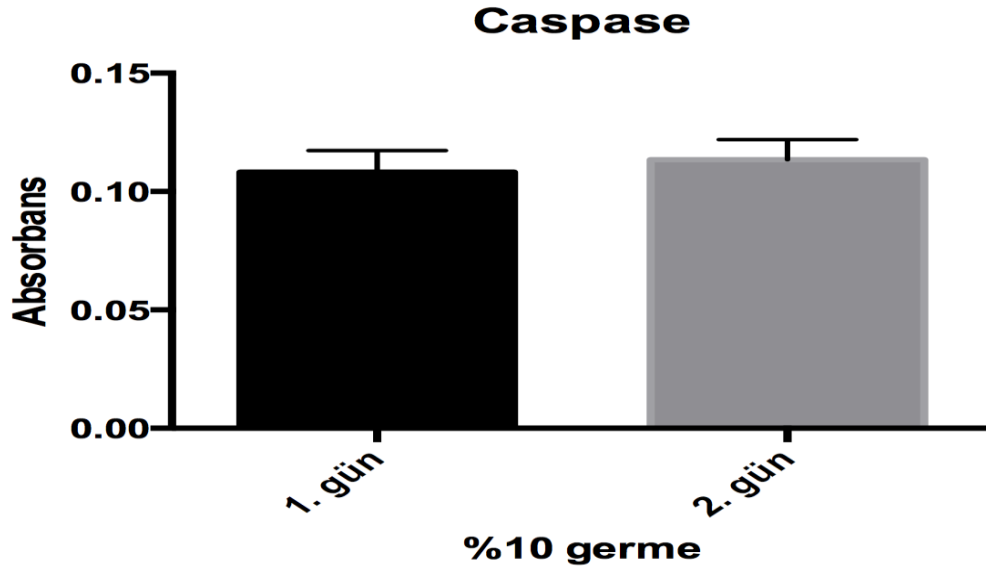


Şekil 4.13 %50 germe 1. ve 2. Gün ve kontrol MTT sonuçları

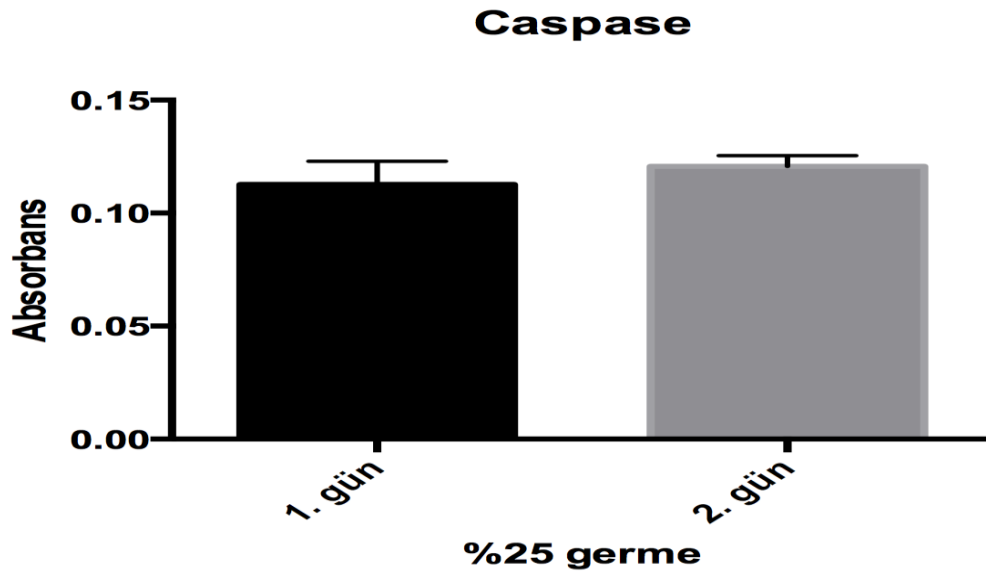
Ayrıca %50 germe verilmiş hücrelerin 2. gün sonunda kontrol grubuna oranla da daha az canlılık oranı gösterdiği tespit edildi. (Şekil 4.13)

4.9 Caspase-3 Analizi

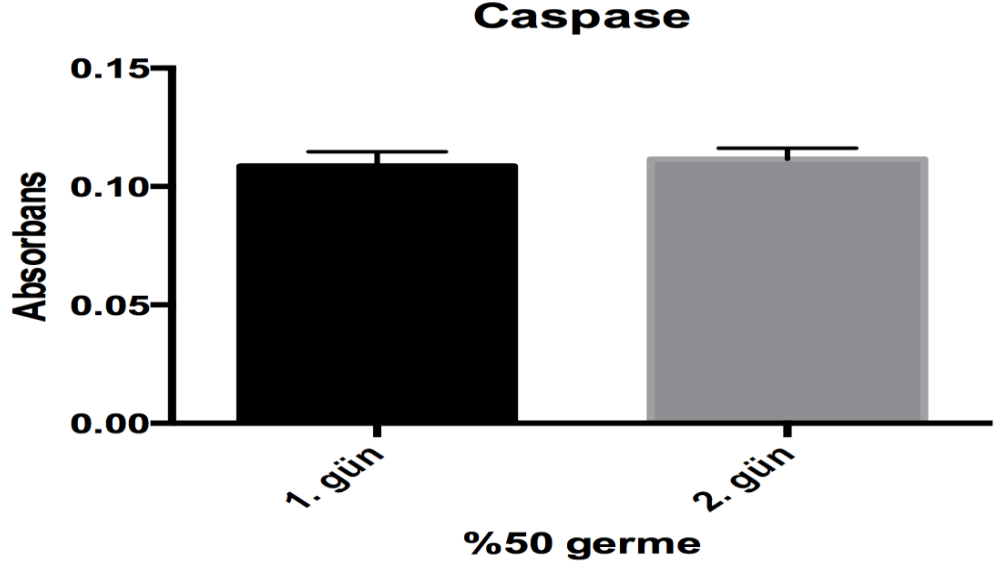
Germe verilen iskelelere yapılan caspase testi sonucunda hücre ölümlerinin caspase aktivitesi nedeniyle gerçekleşmediği görüldü.



Şekil 4.14 %10 germe 1. ve 2. gün Caspase-3 testi sonuçları

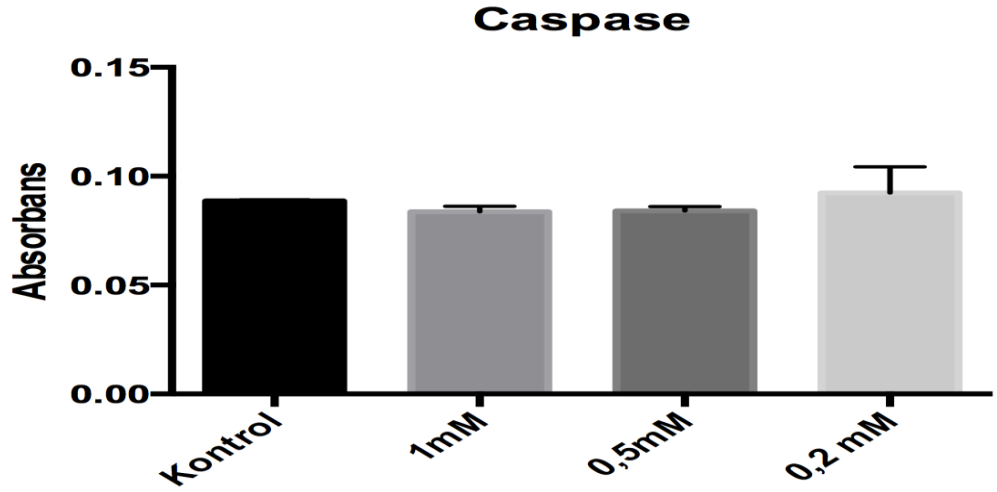


Şekil 4.15 %25 germe 1. ve 2. gün Caspase-3 testi sonuçları



Şekil 4.16 %50 germe 1. ve 2. gün Caspase-3 testi sonuçları

Caspase aktivitesi üzerine Caspase-3 yolağını aktive eden staurosporin ilacı ile kontroller yapılmıştır. Bu kontroller sonucunda da caspase-3 aktivitesine rastlanmaması elde edilen sonuçların güvenilir olmadığını gösterdi.



Şekil 4.17 Staurosporin ile yapılan Caspase testi sonuçları

5. TARTIŞMA

Doku mühendisliği, içinde hücrelerin büyüyüp çoğalabileceği üç boyutlu doku iskelelerinin üretimini içermektedir. Doku iskelelerinin üretilmesindeki amaç ise fizyolojik fonksiyonları devam ettirebilmek için hücrelerin doğal nişlerini taklit ederek hem hücre tutunması, hem de tutunan hücrelerin fonksiyonelliklerini ve fenotiplerini koruması bakımından vücudun adapte olabileceği yeni dokular oluşturmaktır. Bu şekilde iskelelerin üretimini başarmak için biyolojik dokuyu taklit eden geometriler önemlidir. Elektroēirilmiş iskelelerin fonksiyonel karmaşıklığı diğer tekniklere göre önemli avantajlar sağlamaktadır. Ancak *in vivo* kullanımının rutin hale gelmesinden önce bazı değişiklikler yapılması gerekmektedir (Lanutti et al., 2007).

Sentetik polimerlerden üretilen doku iskelelerinin yüzey özellikleri hücrelerin bu yüzeylere tutunması için yeterince uygun değildir. Prabhakaran ve arkadaşlarına göre doku mühendisliğinde karşılaşılan zorlukların başında tutunmaya elverişli, çoğalma ve farklılaşma için uygun, biyoyumlu ve biyobozunur iskeleleri tasarlamaktır. (Prabhakaran et al., 2008). Bu tez çalışmasında bir çok araştırmacı tarafından yaygın olarak kullanılan PCL doku iskeleleri üretilmiş ve B35 hücreleriyle etkileşimleri incelenmiştir.

Bu çalışmada B35 hücrelerinin farklı yüzey üzerinde farklı çoğalma ve tutunma profili oluşturacağı düşünöldüğünden polistiren yüzey ve PCL doku iskelelerinin yüzeyine ekilen B35 hücrelerinin çoğalmaları incelenmiştir. Literatürde PCL nanofiberler üzerinde költive edilen mezenşimal kök hücre (Çoğan et al., 2012) gibi sinir hücresinden farklı tip hücrelerde tutunma ve çoğalma özelliklerinin çok başarılı olmadığına rastlanmaktadır. Bu problemin PCL'nin hidrofobik olmasına bağlı olduğu düşünölmektedir. Daha önce makalelerde elektroēirme ile PCL doku iskeleleri üzerinde B35 költürüne rastlanmadığı için karşılaştırma yapılamamaktadır. Fakat testlerin sonucunda ortaya çıkan, B35 merkezi sinir sistemi hücrelerinin PCL doku iskelesi yüzeylerinde daha fazla çoğalma potansiyeli gösterdikleridir. İskele kimyası ve fiber yapı B35 hücreleri için oldukça tercih edilen bir uyuşma göstermiştir.

Çalışmanın başında PCL solventinin hazırlanması optimize edilmiş ve tüm çalışma boyunca solvent bu şekilde hazırlanarak kullanılmıştır. Optimizasyon yapılırken Yoshimoto ve arkadaşlarının kullandığı kloroform ile Xie ve arkadaşlarının kullandığı DCM, DMF solventleriyle denemeler yapılmıştır. Kloroform kullanıldığında istenilen vizkozite elde edilemediği için fiber oluşumu sağlanamamıştır. Bunun nedeni olarak kullanılan kloroform markası veya değişken ortam koşulları gösterilebilir. Xie ve arkadaşlarının kullandığı DCM ve DMF solventleriyle yapılan çalışmalardan kusursuz fiberlerin elde edildiği görülmüştür. (Yoshimoto et al., 2003; Xie et al., 2008)

Tekrarlanan çalışmalarda farklı denemelerde iskelelerin aynı şekilde üretilmediği görülmüştür. Çünkü elektroğirme yöntemi sıcaklık, nem ve viskozite gibi fiziksel koşullardan çok etkilenen bir doku iskelesi üretim yöntemidir. (Bhardwaj and Kundu, 2010). Bu nedenle ortam koşullarının da sürekli olarak aynı şartlarda olması için çaba sarf edilmiştir.

Yüzeyin hidrofilik veya hidrofobik olduğunun tespit edilmesi yüzey karakterizasyonunun önemli parçalarından biridir. Bu özellik hücre çoğalması ve tutunmasını etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Ghasemi-Mobarakeh ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada hidrofobik yüzeylerdeki hücre tutunma oranının hidrofilik yüzeylere oranla daha düşük olduğu tespit edilmiştir. (Ghasemi-Mobarak et al., 2008) Prabhakaran ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise fiberlere oranla polisitren yüzeylerdeki hücre tutunmasının daha çok olduğu tespit edilmiştir. Bu tez çalışmasında tespit edilen ise tam tersi, yani fiber yapıların B35 merkezi sinir sistemi hücrelerinin tutunmasına kolaylık sağladığı şeklindedir. Bunun bir nedeni olarak fiber yapıların beyin ECM yapısına en yakın yapı olması görülmektedir. (Dityatev et al., 2010; Baeten et. al, 2011)

Yüzey temas açısı ölçümü de yüzey karakterizasyonu açısından yüksek önem taşıyan bir testtir. Çapkın ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada PCL doku iskelelerinin yüzey temas açısı $130,60^\circ$ olarak bulunmuştur. Çoğan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda da rastgele dizilmiş PCL doku iskelelerinin temas açısı $132,6^\circ$ olarak bulunmuştur. Bu çalışmada elde edilen yüzey temas açısı $136,2^\circ$, literatür ile karşılaştırıldığında yüksek oranda benzerlikler

göstermektedir. Ufak farklılıkların nedeni kullanılan PCL polimerinin molekül ağırlığının farklılık göstermesi ve iskelelerin üretildiği ortamdaki fiziksel şartların farklı olması olarak düşünülmektedir. (Çapkın vd., 2012; Çoğan, 2012; Ghasemi-Mobarakeh et al., 2008; Prabhakaran et al., 2008)

Bu çalışmada B35 hücrelerinin PCL yüzeyler üzerinde 1. ve 3. gün sonundaki canlılıkları test edilmiştir. Bu testler sonucunda PCL üzerindeki çoğalmanın kontrol hücre kültürü polisitren yüzeylere göre fazla olduğu tespit edilmiştir. Hücre ve iskelelerin ilişkisi başarılı çalışmalar için önemli ve incelenmesi gereken bir özelliktir. Bu etkileşim hücrenin çoğalmasının yanı sıra tutunması, farklılaşması ve göçünü de etkilemektedir. Eğer tutunma iyi gerçekleşmezse iskelenin kullanılacağı yerdeki etkisini olumsuz yönde etkileyecektir. (doku bütünlüğü korunması, yara iyileşmesi gibi) Pürüzlülük, fiber çapı, porozite gibi etkenler hücre ve iskele arasındaki ilişkide önemli rol oynamaktadır. (Çoğan, 2012)

Bu çalışmada iskele SEM görüntüleri ImageJ görüntü işleme programıyla incelendi. Fiber çapı 367 ± 115 nm olarak ölçüldü. En küçük fiber çapı 252nm ve en büyük fiber çapı da 482nm olarak tespit edildi. Prabhakaran ve arkadaşlarının bulduğu fiber çapı 630 ± 40 nm bu çalışmadakiyle karşılaştırıldığında farklılık göstermektedir. Buradaki farklılık nedeninin daha önceki farklılık nedenleriyle aynı olduğu düşünülmektedir. Laboratuvar ortam koşulları ve kullanılan polimerin molekül ağırlığı oluşan fiber çaplarında farklılıklara neden olmuştur. (Prabhakaran et al., 2008)

Travmatik beyin hasarı çalışmaları incelendiğinde bazı nörokimyasal mekanizmaların ve hücre içi sinyal yollarının tetiklendiği tespit edilmiştir. Travma sonrası deneysel olarak oluşturulmuş modellerde nöronlarda ölümlerin apoptotik veya nekrotik olarak gerçekleştiği belirlenmiştir. Nekrozun aksine apoptoz; RNA ve protein sentezi ile yeni enzimlerin aktivitelerini gerektiren aktif bir hücre ölüm şeklidir. Hasarın etkisiyle ortaya çıkan hücre ölümlerinin caspase'lerin aktivasyonu nedeniyle gerçekleştiği belirtilmektedir.

Bu çalışmada caspase-3 aktivitesinin incelenmesi de gerçekleştirilmiştir. Fakat yapılan testler sonucu verilen mekanik stres sonrasında caspase aktivitesinin başlamadığı görülmüştür. Bunun nedeni olarak yeterli hücre sayısına ulaşılmamış olabileceğine karar verildi. Ayrıca hücre ölümlerinin sadece caspase yolağı aktive olarak gerçekleşmediği bilinmektedir. Hücre içi kalsiyum düzeylerindeki artış, kalpainlerin ve caspase'ların aktivasyonu, proapoptotik ve antiapoptotik Bcl-2 proteinleri arasındaki dengenin bozulması, mitojenle aktive olan protein kinazların düzeylerindeki değişiklikler ve DNA hasarı gibi çeşitli mekanizmaları içermektedir. Bu nedenle farklı test yöntemleri kullanılarak caspase yerine başka bir yolağın mı aktif olduğu tespit edilmeye çalışılmalıdır. Sonuç olarak %25 ve %50 germe verilen iskele üzerindeki B35 hücrelerinin ölüm nedeni olarak diğer testler yapılmadan nekrotik diyebiliriz. Ayrıca %10 germe sonunda hücre üremesi tetiklenmiş olmasına rağmen, bazı apoptotik yollar tetiklendiği için uzun vadede dejeneratif sonuçlar göstermesi de olasıdır. Birincil tip TBH sonrası görülen bir takım MSS rahatsızlıklarının bu tetiklemeye bağlı olup olmadığı incelenmelidir. Ama en net sonuçlar farklı yolların da incelenmesiyle tespit edilecektir.. (Galbraith et al., 1993; Pike et al., 2000)

Bir çok çalışma incelendiğinde mekanik uyarıların farklı hücrelerin çoğalması üzerinde pozitif etkisi olduğu görülmüştür. Kemik ve kas hücrelerinin mekanik uyarı altındaki kültürasyonlarının önemi uzun süredir tartışılmaktadır. Sadoshima ve arkadaşlarının yaptığı gibi sinir hücrelerinin mekanik stimülasyonlara etkisi çalışmaları da zamanla önem kazanmaya başlamıştır. Özellikle Bueona ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda belirli germeye maruz bırakılan sinir hücrelerinin 10 cm'ye kadar uzayabildiği tespit edilmiştir. Bu çalışmalar göz önüne alındığında, bu tez içerisinde uygulanan %10 germe miktarında 1. ve 2. günde hücre çoğalması incelendi ve hücre çoğalması ve canlılığının arttığı tespit edildi. %10 germe etkisinin B35 merkezi sinir sistemi hücrelerinin çoğalmasında pozitif etki yaptığı kabul edilebilir. Ayrıca daha farklı testlerle, Iwata ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadan görülen akson uzama miktarları da ölçülerek bu germe oranının pozitif etkileri tespit edilebilir.(Tabesh et al., 2009; Weinbaum et al., 1994; Burger et al., 1998; Shimko et al., 2008; Mullender et al., 2004; Iwata et al., 2006)

Suter, Chen ve LaPlaca'ya göre *in vitro* bir model *in vivo* bir ortama göre daha kontrollü olabileceği için kontrollü mekanik uyarı verilmesini ve hücrel mekanizmaların çözümlenmesini kolaylaştırmaktadır. Model üzerinde çalışmalar ilerledikçe zaten *in vivo* ortama geçiş daha kolaylaşacak ve olaylara daha sistematik yaklaşma olanağı ortaya çıkacaktır. Yapılan testler sonucunda bu tezde üretilen ve sinir hücrelerine mekanik germe vermeyi amaçlayan *in vitro* modelin amacına ulaşmış olduğu görüldü. (Suter et al., 2011; Chen et al., 2009; LaPlaca et al., 2010)

6. SONUÇLAR

Bu çalışmada travmatik beyin hasarını incelemek üzere *in vitro* bir hücre kültür düzeneği üretildi ve üç boyutlu, MSS hücrelerinin doğal nişlerini, fizyolojik olarak karşılaştıkları mekanik yükleri, ki bu tezde patlama etkisi üzerinde duruldu, simule eden bir model oluşturuldu. Germe verilen iskele üzerindeki B35 hücreleri polisitren yüzeyde bulunan hücrelerle karşılaştırıldı.

PCL üzerindeki B35 hücrelerinin polisitren yüzeydekiler göre daha iyi üredikleri görüldü. B35 sinir hücrelerinin beyin ECM'ine benzeyen fiber yapıların üzerinde üremelerinin pozitif yönde etkilendiği görüldü. Bu da bize fiber yapılar üzerinde çalışmanın pozitif etkisini gösterdi.

B35 hücrelerine verilen farklı oranlardaki germe miktarlarının hücre canlılığını etkilediği görüldü. %10 germe oranının B35 hücre gelişimini olumsuz etkilemediği, tersine ilk üç günde hücre üremesini tetiklediği; fakat %25 ve %50 germe oranlarının hücre ölümüne yol açtığı belirlendi.

Hücre ölüm nedenlerinin caspase aktivitesine bağlı olup olmadı incelendi. Tüm germe oranlarına bakıldığında hiç birinde caspase aktivitesine rastlanmadığı görüldü, ancak bu testin daha hassas bir yöntemle tekrar edilmesi gerektiği sonucuna varıldı.

7. ÖNERİLER

Travmatik beyin hasarı çalışmalarında birden çok nörokimyasal mekanizmanın ve hücre içi sinyal yollarının tetiklendiği bilinmektedir. Bu tez kapsamında bu testlerden sadece bir kısmı incelenmiştir ve bu yolların harekete geçmediği tespit edilmiştir. Gelecek çalışmalarda aynı sistem kullanılarak farklı hücre sinyal yollarının incelenmesi faydalı olacaktır. Ayrıca moleküler çalışmalar üzerine daha fazla yoğunlaşılması ölüm mekanizmasının açıklanmasını kolaylaştıracaktır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Adams, JH., Doyle D, Ford I, Graham DI, McGee M and McLellan DR.,** 1989, Brain damage in fatal non-missile head injury in relation to age and type of injury. *Scottish medical journal* , 34(1), 399-401pp.
- Ahmed, I., Liu H.-Y., Mamiya P.C., Ponery A.S., Babu A.N., Weik T., Schindler M. and Meiners S.,** 2006, Three-dimensional nanofibrillar surfaces covalently modified with tenascin-C-derived peptides enhance neuronal growth in vitro, *J. Biomed. Mater. Res. A.*, 76A, 851–860pp.
- Baeten, K. M. and Akassoglou, K.,** 2011, Extracellular matrix and matrix receptors in blood-brain barrier formation and stroke, *Developmental Neurobiology*, 71(11), 1018-1039pp.
- Bhardwaj, N. and Kundu, S. C.,** 2010, Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique, *Biotechnology Advances*, 28: 325–347pp.
- Bhattarai, N., Edmondson, D., Veiseh, O., Matsen, F.A. and Zhang, M.,** 2005, Electrospun Chitosanbased Nanofibers and Their Cellular Compatibility, *Biomaterials*, 26, 6176-84pp.
- Blackman, B.R., Barbee, K.A. and Thibault, L.E.,** 2000, *In vitro* cell shearing device to investigate the dynamic response of cells in a controlled hydrodynamic environment, *Ann Biomed Eng*, 28(4), 363-372pp.
- Bolan, E. D., Matthews, J. A., Pawlowski, K. J., Simpson, D. G., Wnek, G. E. and Bowlin, G. L.,** 2004, Electrospinning collagen and elastin: preliminary vascular tissue engineering, *Frontiers in Bioscience*, 9, 1422-1432pp.
- Bueno, F.R. and Shah, S.B.,** 2008, Implications of tensile loading for the tissue engineering of nerves, *Tissue Engineering Part B-Reviews*, 14(3), 219-233pp.
- Burger, E.H. and Klein-Nulend, J.,** 1998 Microgravity and bone cell mechanosensitivity, *Bone*, 22(5),127-130pp.
- Byfield, F.J., Wen, Q., Levental, I., Nordstrom, K., Arratia, P.E. and Miller, R.T.,** 2009, Absence of Filamin A Prevents Cells from Responding to Stiffness Gradients on Gels Coated with Collagen but not Fibronectin. *Biophys J* , 96(12), 5095-5102pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Cargill, R.S. and Thibault, L.E.**, 1996, Acute alterations in $[Ca^{2+}]_i$ in NG108-15 cells subjected to high strain rate deformation and chemical hypoxia: an *in vitro* model for neural trauma, *J Neurotrauma*, 13(7), 395-407pp.
- Chen, J., Graham, S.H., Chan, P.H., Lan, J., Zhou, R.L. and Simon, R.P.**, 1995, bcl-2 is expressed in neurons that survive focal ischemia in the rat, *Neuroreport*, 6(2), 394-398pp.
- Chen, Y.C., Smith, D.H. and Meaney, D.F.**, 2009, In-Vitro Approaches for Studying Blast-Induced Traumatic Brain Injury, *J Neurotrauma*, 26(6), 861-876pp.
- Cheng, M.Y., Deng, J.U., Yang, F., Gong, Y.D., Zhao, N.M. and Zhang, X.F.**, 2003, Study on physical properties and nerve cell affinity of composite films from chitosan and gelatin solutions, *Biomaterials*, 24(17), 2871-2880pp.
- Chetta, J., Kye, C and Shah, S.B.**, 2010, Cytoskeletal dynamics in response to tensile loading of mammalian axons, *Cytoskeleton*, 67(10), 650-665pp.
- Chew, S.Y., Mi, R., Hoke, A. and Leong, K.W.**, 2008, The effect of the alignment of electrospun fibrous scaffolds on Schwann cell maturation, *Biomaterials*, 29(6), 653-661pp.
- Choi, D.W.**, 1988 Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system, *Neuron*, 1(8), 623-634pp.
- Cioffi, M., Boschetti, F., Raimondi, M.T. and Dubini, G.**, 2006, Modeling evaluation of the fluid-dynamic microenvironment in tissue-engineered constructs: A micro-CT based model, *Biotechnology and Bioengineering*, 93(3), 500-510pp.
- Clark, R.S., Chen, J., Watkins, S.C., Kochanek, P.M., Chen, M. and Stetler, R.A.**, 1997, Apoptosis-suppressor gene bcl-2 expression after traumatic brain injury in rats, *J Neurosci*, 17(23), 9172-9182pp.
- Clark, R.S., Kochanek, P.M., Watkins, S.C., Chen, M., Dixon, C.E. and Seidberg, N.A.**, 2000, Caspase-3 mediated neuronal death after traumatic brain injury in rats, *Journal of neurochemistry*, 74(2), 740-753pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Cooper, A., Bhattari, N. and Zhang, M.**, 2011, Fabrication and cellular compatibility of aligned chitosan-PCL fibers for nerve tissue regeneration, *Elsevier Carbohydrate Polymers*, (85),149-156pp.
- Cullen, D.K., Stabenfeldt, S.E., Simon C.M., Tate C.C. and LaPlaca M.C.**,2007, *In vitro* neural injury model for optimization of tissue-engineered constructs, *J Neurosci Res*,85(16), 3642-3651pp.
- Çapkın, M., Çakmak, S., Özdal-Kurt, F., Gümüşderelioğlu, M., Şen, H. B., Türk, T. and Deliloğlu-Gürhan, S. İ.**, 2012, Random/aligned electrospun PCL/PCL-collagen nanofibrous membranes: comparison of neural differentiation of rat AdMSCs and BMSCs, *Biomed. Mater.*, 7: 045013.
- Davis, A.E.**, 2000, Mechanism of traumatic brain injury: biomechanical, structural and cellular considerations, *Crit Care Nurs Q*, 23(3), 1-13pp.
- De Vrieze, S., Westbroek, P., Van, Camp T., and Van Langenhove, L.**, 2007, Electrospinning of chitosan nanofibrous structures: feasibility study, *Journal of Materials Science*, 42(19), 8029-8034pp.
- del Rio, A., Perez-Jimenez, R., Liu, R.C., Roca-Cusachs, P., Fernandez, J.M. and Sheetz, M.P.**, 2009, Stretching Single Talin Rod Molecules Activates Vinculin Binding, *Science*, 323(5914), 638-641pp.
- Demirci, T., Sarıkanat, M. ve Sakızlı, M.**, 2009, Moleküler hücre biyolojisi çalışmaları için in-vitro mekanik germe sisteminin geliştirilmesi, *Biyomedikal Mühendisliği Ulusal Toplantısı (BİYOMUT)*.
- Desai, K., Kit, K., Li, J. and Zivanovic, S.**, 2008, Morphological and Surface Properties of Electrospun Chitosan Nanofibers, *Biomacromolecules*, 9(3), 1000-1006pp.
- Dillon, G. P., Yu, X., Sridharan, A., Ranieri, J. P. and Bellamkonda, R. V.**, 1998, The influence of physical structure and charge on neurite extension in a 3D hydrogel scaffold, *Journal of Biomaterials Science*, 9(10), 1049-1069pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Dityatev, A., Seidenbecher, C. I. and Schachner, M., 2010, Compartmentalization from the outside: the extracellular matrix and functional microdomains in the brain, *Trends in Neurosciences*, 33(11), 503-512pp.

Duman, M., 2012, Doku İskelelerinin Mekanik Karakterizasyonu, Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi.

Duncan, R. L. and Turner, C. H., 1995, Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain, *Calcified Tissue International*, 57(5), 344-358pp.

Durand, D.M., 2007, Neural engineering—a new discipline for analyzing and interacting with the nervous system, *Methods Inf Med*, 46, 142-6pp.

Engel, D.C., Slemmer, J.E., Vlug, A.S., Maas, A.I.R. and Weber, J.T.,2005, Combined effects of mechanical and ischemic injury to cortical cells: Secondary ischemia increases damage and decreases effects of neuroprotective agents, *Neuropharmacology*, 49(7), 985-995pp.

Flanagan, L. A., Ju, Y. E., Marg, B., Osterfield and M. and Janmey, P. A., 2002, Neurite branching on deformable substrates, *Neuroreport*, 13(18), 2411-2415pp.

Friedland, J.C., Lee, M.H. and Boettiger, D., 2009, Mechanically Activated Integrin Switch Controls alpha(5)beta(1) Function, *Science*, 323(5914), 642-644pp.

Fujimoto, S.T., Longhi, L., Saatman, K.E. and McIntosh, T.K., 2004, Motor and cognitive function evaluation following experimental traumatic brain injury, *Neurosci Biobehav Rev*, 28(4), 365-378pp.

Galbraith, J.A., Thibault, L.E. and Matteson, D.R., 1993, Mechanical and electrical responses of the squid giant axon to simple elongation, *Journal of biomechanical engineering*, 115(1), 13-22pp.

Gennarelli, T.A., Thibault, L.E., Adams, J.H., Graham, D.I., Thompson, C.J. and Marcincin, R.P., 1982, Diffuse axonal injury and traumatic coma in the primate, *Annals of neurology*, 12(6), 564-574pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gennarelli, T.A., Thibault, L. E. and Graham, D. I.**, 1998, Diffuse axonal injury: an important form of traumatic brain damage, *Neuroscientist*, 4, 202-215pp.
- Gennarelli, T.A.**, 1997, The pathobiology of traumatic brain injury, *Neuroscientist*, 3, 73-80pp.
- Ghasemi-Mobarakeh, L., Prabhakaran, M.P., Morshed, M., Nasr-Esfahani, M.H., Gong Haipeng, Z.Y., Li, J., Gong, Y., Zhao, N. and Zhang, X.**, 2000, Studies on nerve cell affinity of chitosan-derived materials, *Journal of Biomedical Materials Research*, 52(2), 285-295pp.
- Gordon-Weeks, P.R.**, 2000, Neuronal Growth Cones, *New York: Cambridge University Press*
- Graham, D.I., Adams, J.H., Nicoll, J.A., Maxwell, W.L. and Gennarelli, T.A.**, 1995, The nature, distribution and causes of traumatic brain injury. *Brain Pathol*, 5(4), 397-406pp.
- Gunatillake. P.A., Adhikari. R. and Gadegaard. N.**, 2003, Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering, *Eur Cells Mater*, 5, 1-16pp.
- Hengst. U., Deglincerti. A., Kim. H.J., Jeon. N.L. and Jaffrey. S.R.**, 2009, Axonal elongation triggered by stimulus-induced local translation of a polarity complex protein, *Nature Cell Biology*, 11(8), 1024-1263pp.
- Huang. Z.M., Zhang. Y.Z., Kotaki. M. and Ramakrishna. S.**, 2003, A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites, *Composites Science and Technology*, 63(15), 2223-2253pp.
- Huang, Y.C. and Huang, Y.Y.**, 2006, Tissue engineering for nerve repair. Biomedical Engineering-Applications, *Basis & Communications*, 18, 100-110pp.
- Hung. C.H., Lin. Y.L. and Young. T.H.**, 2006, The effect of chitosan and PVDF substrates on the behavior of embryonic rat cerebral cortical stem cells, *Biomaterials*, 27(25), 4461-4469pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Hutmacher, D. W., 2001, Scaffold design and fabrication Technologies for engineering tissues- state of the art and future perspectives, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn*, 12, 107-124pp.

Inanç, B., Arslan, Y.E., Seker, S., Elçin, A.E. and Elçin, Y.M., 2009. Periodontal ligament cellular structures engineered with electrospun poly(DL-lactide-coglycolide) nanofibrous membrane scaffolds, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 186-195pp.

Iwata, A., Browne, K.D., Pfister, B.J., Gruner, J.A. and Smith, D.H., 2006, Long-Term Survival and Outgrowth of Mechanically Engineered Nervous Tissue Constructs Implanted Into Spinal Cord Lesions, *Tissue Eng*, 12(1), 101-101-110pp.

Janmey, P.A. and Miller, R.T., 2011, Mechanisms of mechanical signaling in development and disease, *Journal of Cell Science*, 124(1), 9-18p.

Kemp, S.W., Syed, S., Walsh, S.K., Zochodne, D.W. and Midha, R., 2009, Collagen nerve conduits promote enhanced axonal regeneration, schwann cell association and neovascularization compare to silicone conduits, *Tissue Engineering Part A*, 1975-1988pp.

Klekkevold, P.R., Vandemark, L., Kenney, E.B. and Bernard, G.W., 1996, Osteogenesis Enhanced by Chitosan (Poly-N-Acetyl Glucosaminoglycan) *In Vitro*, *Journal of Periodontology*, 67(11), 1170-1175pp.

Koh, H.S., Yong, T., Chan, C.K., Ramakrishna, S., 2008, Enhancement of neurite outgrowth using nano-structured scaffolds coupled with laminin, *Biomaterials*, 29, 3574–3582pp.

Koutsopoulos, S., Unsworth, L. D., Nagai, Y. and Zhang, S., 2009, Controlled release of functional proteins through designer self-assembling peptide nanofiber hydrogel scaffold, *PNAS*, 106(12), 4623-4628pp.

Lamoureux, P., Heidemann, S.R., Martzke, N.R. and Miller, K.E., 2010, Growth and elongation within and along the axon, *Dev Neurobiol*, 70(3), 135-149pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lannutti, J., Reneker, D., Ma, T., Tomasko, D. and Farson, D.**, 2007, Electrospinning for tissue engineering scaffolds, *Materials Science and Engineering C*, 27: 504–509pp.
- LaPlaca, M.C., Lee, V.M. and Thibault, L.E.**, 1997, An *in vitro* model of traumatic neuronal injury: loading rate-dependent changes in acute cytosolic calcium and lactate dehydrogenase release, *J Neurotrauma*, 14(6), 355-368pp.
- LaPlaca, M.C. and Prado, G.R.**, 2010, Neural mechanobiology and neuronal vulnerability to traumatic loading, *Journal of Biomechanics*, 43(1), 71-78pp.
- LaPlaca, M.C. and Thibault, L.E.**, 1998, Dynamic mechanical deformation of neurons triggers an acute calcium response and cell injury involving the N-methyl-D-aspartate glutamate receptor, *J Neurosci Res*, 52(2), 220-229pp.
- Li, D., Wang, Y.L. and Xia, Y.N.**, 2004, Electrospinning nanofibers as uniaxially aligned arrays and layer-by-layer stacked films, *Advanced Materials*, 16(4), 361-366pp.
- Li, D. and Xia, Y.N.**, 2004, Electrospinning of nanofibers: Reinventing the Wheel, *Advanced Materials*, 16(14), 1151-1170pp.
- Lin, A.C. and Holt, C.E.**, 2008, Function and regulation of local axonal translation. *Curr Opin Neurobiol*, 18(1), 60-68pp.
- MacDonald, R.A., Voge, C.M., Kariolis, M. and Stegemann, J.P.**, 2008, Carbon nanotubes increase the electrical conductivity of fibroblast-seeded collagen hydrogels, *Acta Biomaterialia*, 4, 1583-1592pp.
- Madhally, S.V. and Matthew, H.W.T.**, 1999, Porous Chitosan Scaffolds for Tissue Engineering. *Biomaterials*, 20, 1133-1142pp.
- Margulies, S.S., Thibault, L.E. and Gennarelli, T.A.**, 1990, Physical model simulations of brain injury in the primate, *J Biomech*, 23(8), 823-836pp.
- Matthews, J.A., Wnek, G.E., Simpson, D.G. and Bowlin, G.L.**, 2002, Electrospinning of collagen nanofibers, *Biomacromolecules*, 3, 232–238pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

McCoy, R.J. and O'Brien, F.J., 2010, Influence of Shear Stress in Perfusion Bioreactor Cultures for the Development of Three-Dimensional Bone Tissue Constructs: A Review, *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 16(6), 587-601pp.

McIntosh, T.K., Smith, D., Meaney, D., Kotapka, M., Gennarelli, T. and Graham, D., Neurological sequelae of traumatic brain injury: Relationship to neurochemical and biochemical mechanisms. *Lab Invest* 1996;74((2)):315-342pp.

Mullender, M., El Haj A.J., Yang Y., van Duin M.A., Burger E.H. and Klein-Nulend J., 2004, Mechanotransduction of bone cells *in vitro*: mechanobiology of bone tissue, *Med Biol Eng Comput*, 42(1),14-21pp.

Nesil, T., Olcum, M., Koylu, E.O., Gurhan, I.D. and Sendemir Urkmez, A., Culture of Central Nervous System Neurons on Electrospun Polymer Fiber-Covered Surfaces. 2011, 10th International Workshop on Biomedical Engineering, Kos, Greece; 2011.

Nettles, D.L., Elder, S.H. and Gilbert, J.A., 2002, Potential Use of Chitosan as a Cell Scaffold Material for Cartilage Tissue Engineering, *Tissue Engineering*, 8(6), 1009-1016pp.

O'Toole, M. and Miller, K.E., 2011, The Role of Stretching in Slow Axonal Transport, *Biophys J*, 100(2), 351-360pp.

Orive, G., Anitua, E., Pedraz, J. L., Emerich, D. F., 2009, Biomaterials for promoting brain protection, repair and regeneration. *Nature Reviews Neuroscience* 2009, 10 (9), 682pp.

Orr, A. W., Heimke, B. P., Blackman, B. R. and Schwartz, M. A., 2006, Mechanism of mechanotransduction, *Developmental Cell*, 10, 11-20pp.

Panseri, S., Cunha, C., Lowery, J., Del Carro, U., Taraballi, F., Amadio, S., Vescovi, A. and Gelain F., 2008, Electrospun micro- and nanofiber tubes for functional nervous regeneration in sciatic nerve transections, *BMC Biotech*, 8, 39p.

Patel, S., Kurpinski, K., Quigley, R., Gao, H., Hsiao, B.S., Poo, M.M. and Li S., 2007, Bioactive nanofibers: synergistic effects of nanotopography and chemical signaling on cell guidance, *Nano Lett*, 7, 2122–2128pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Pfister, B.J., Huang, J.H., Kameswaran, N., Zager, E.L. and Smith, D.H.**, 2007, Neural engineering to produce *in vitro* nerve constructs and neurointerface, *Neurosurgery*, 60(1), 137-141pp.
- Pfister, B.J., Iwata, A., Meaney, D.F. and Smith, D.H.**, 2004, Extreme stretch growth of integrated axons, *J Neurosci*, 24(36), 7978-7983pp.
- Pike, B.R., Zhao, X., Newcomb, J.K., Glenn, C.C., Anderson, D.K. and Hayes, R.L.**, 2000, Stretch injury causes calpain and caspase-3 activation and necrotic and apoptotic cell death in septo-hippocampal cell cultures, *J Neurotrauma*, 17(4), 283-298pp.
- Povlishock, J.T., Erb, D.E. and Astruc, J.**, 1992, Axonal response to traumatic brain injury: reactive axonal change, deafferentation, and neuroplasticity, *J Neurotrauma*, 9(1), 189-200pp.
- Povlishock, J.T. and Katz, D.I.**, 2005, Update of neuropathology and neurological recovery after traumatic brain injury, *J Head Trauma Rehabil*, 20(1), 76-94pp.
- Prabhakaran M.P., Venugopal J.R., Chyan T.T., Hai L.B., Chan C.K., Lim A.Y. and Ramakrishna S.**, 2008, Electrospun biocomposite nanofibrous scaffolds for neural tissue engineering, *Tissue Eng. — Part A*, 14, 1787–1797pp.
- Raghupathi, R.**, 2004, Cell death mechanisms following traumatic brain injury, *Brain Pathol*, 14(2), 215-222pp.
- Ramakrishna, S.**, 2008, Electrospun biocomposite nanofibrous scaffolds for neural tissue engineering, *Tissue Eng. — Part A*, 14, 1787–1797pp.
- Ramakrishna, S.**, 2008, Electrospun poly(ϵ -caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering, 29(34), 4532–4539pp.
- Reichert, W. M.**, 2008, Indwelling Neural Implants: Strategies for Contending with the *In Vivo* Environment, *CRC Press: Boca Raton*.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Rho, K. S., Jeong, L., Lee, G., Seo, B. M., Park, Y. J., Hong, S. D., Roh, S., Chao, J. J., Park, W. H., Min, B. M., 2006, Electrospinning of collagen nanofibers: Effects on the behavior of normal human keratinocytes and early-stage wound healing, *Biomaterials*, 27(8), 1452-1461pp.

Roca-Cusachs, P., Gauthier, N.C., del Rio, A. and Sheetz, M.P., 2009, Clustering of alpha(5)beta(1) integrins determines adhesion strength whereas alpha(v)beta(3) and talin enable mechanotransduction, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(38), 16245-16250pp.

Sadoshima, J. and Izumo, S., 1997, The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress, *Annu Rev Physiol*, 59, 551-571pp.

Sangsanoh, P., Waleetorncheepsawat, S., Suwantong, O., Wutticharoenmongkol, P., Weeranantanapan, O., Chuenjitbuntaworn, B., Cheepsunthorn, P., Pavasant, P. and Supaphol, P., 2007, *In vitro* biocompatibility of Schwann cells on surfaces of biocompatible polymeric electrospun fibrous and solution-cast film scaffolds, *Biomacromolecules*, 1587–1594pp.

Schiffman, J.D. and Schauer, C.L., 2007, One-step electrospinning of cross-linked chitosan fibers, *Biomacromolecules*, 8(9), 2665-2667pp.

Schnell, E., Klinkhammer, K., Balzer, S., Brook, G., Klee, D., Dalton, P. and Mey, J., 2007, Guidance of glial cell migration and axonal growth on electrospun nanofibers of poly-[ε]-caprolactone and a collagen/poly-[ε]-caprolactone blend, *Biomaterials*, 28, 3012–3025pp.

Senses, Y.M., Deliloglu Gurhan, I. and Sendemir Urkmez, A., 2010, Neural and Glial Transdifferentiation of Mesenchymal Stem Cells on Chitosan/Sulfated Chitosan Surfaces, Vth International Bioengineering Congress; Izmir, Turkey.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Shi, R. and Whitebone, J.**, 2006, Conduction deficits and membrane disruption of spinal cord axons as a function of magnitude and rate of strain, *J Neurophysiol*, 95(6), 3384-3390pp.
- Shimko, V.F. and Claycomb, W.C.**, 2008, Effect of Mechanical Loading on Three-Dimensional Cultures of Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes, *Tissue Eng Part A*, 14(1), 49-58pp.
- Stålhammar, D.**, 1990, The mechanism of brain injuries. Handbook of Clinical Neurology, *Elsevier Publishing Company*, 13(57), 17-41pp.
- Stang, F., Keilhoff, G. and Fansa, H.**, 2009, Biocompatibility of different nerve tubes, *Materials*, 2, 1480-1507pp.
- Suh, J.K.F. and Matthew, H.W.T.**, 2000, Application of Chitosan-based Polysaccharide Biomaterials in Cartilage Tissue Engineering: A Review, *Biomaterials*, 21, 24, 2589-2598pp.
- Suter, D.M. and Miller, K.E.**, 2011, The emerging role of forces in axonal elongation. *Progress in Neurobiology*, 94(2), 91-101pp.
- Çoğan, Ş.**, 2012, Sıçan Kemik İliğinden ve Yağ dokusundan Elde Edilen Mezenkimal Kök Hücrelerin PCL Nanofibröz Yüzeyler Üzerinde Tutunma ve Çoğalma Özelliklerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Tabesh, H., Amoabediny, G., Nik, N.S., Heydari, M., Yosefifard, M., Siadat S.O.R. and Mottagy, K.**, 2009, The role of biodegradable engineered scaffold seeded with schwann cells for spinal cord regeneration, *Neurochemistry International*, 54(2), 73-83pp.
- Teng, Y.D., Lavik, E.B., Qu, X.L., Park, K.I., Ourednik, J. and Zurakowski, D.**, 2002, Functional recovery following traumatic spinal cord injury mediated by a unique polymer scaffold seeded with neural stem cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(14), 9606-9606pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Van Wachem, P.B., Beugeling, T. and Feijen, J., 1985, Interaction of cultured human endothelial cells with polymeric surfaces of different wettabilities, *Biomaterials*, 6, 403–408pp.

Verdu, E., Labrador, R.O., Rodriguez, F.J., Ceballos, D., Fores, J. and Navarro, X., 2002, Alignment of collagen and laminin-containing gels improve nerve regeneration within silicone tubes, *Restorative Neurology and Neuroscience*, 20(5), 169-179pp.

Vogel, V. and Sheetz, M., 2006, Local force and geometry sensing regulate cell functions, *Nat Rev Mol Cell Bio*, 7(4), 265-275pp.

Wang, K.K., 2000, Calpain and caspase: can you tell the difference?, *Trends Neurosci*, 23(2), 59p.

Wang, W., Itoh, S., Matsuda, A., Ichinose, S., Shinomiya, K. and Hata, Y., 2008, Influences of mechanical properties and permeability on chitosan nano/microfiber mesh tubes as a scaffold for nerve regeneration, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 84A(2), 557-566pp.

Weinbaum, S., Cowin, S.C. and Zeng, Y., 1994, A Model for the Excitation of Osteocytes by Mechanical Loading-Induced Bone Fluid Shear Stresses, *Journal of Biomechanics*, 27(3), 339-360pp.

Wennersten, A., Holmin, S. and Mathiesen, T., 2003, Characterization of Bax and Bcl-2 in apoptosis after experimental traumatic brain injury in the rat, *Acta neuropathologica*, 105(3), 281-288pp.

Wensheng, L., Guo, Y., Wang, H., Shi, D., Liang, C., Ye Z., Qing, F., Gong, J., 2008, Electrospun nanofibers immobilized with collagen for neural stem cells culture, *J. Mater. Sci-Mater*, 19, 847–854pp.

Willerth, S.M. and Sakiyama-Elbert, S.E., Approaches to neural tissue engineering using scaffolds for drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (2007) 325–338pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Xie, J., Li, X. and Xia, Y.**, 2008, Putting Electrospun Nanofibers to Work for Biomedical Research, *Macromolecular Rapid Communications*, 29(22), 1775-1792pp.
- Xie, J., MacEwan, M., Schwartz, A.G., Xia, Y.**, 2009, Electrospun nanofibers for neural tissue engineering, *Nanoscale*, 2, 35-44pp.
- Xu, C.Y., Inai, R., Kotaki, M. and Ramakrishna, S.**, 2004, Aligned biodegradable nanofibrous structure: a potential scaffold for blood vessel engineering, *Biomaterials*, 25(5), 877-886pp.
- Yang, F., Murugan, R., Wang, S. and Ramakrishna, S.**, 2005, Electrospinning of nano/micro scale poly(L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering, *Biomaterials*, 26(15), 2603-2610pp.
- Yoshimotoa, H., Shina, Y.M., Teraia, H. and Vacantia, J.P.**, 2003, A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering, *Biomaterials*, 24(12), 2077-2082pp.
- Zhang, Y., Ouyang, H., Lim, C.T., Ramakrishna, S. and Huang, Z.**, 2004, Electrospinning of Gelatin Fibers and Gelatin/PCL Composite Fibrous Scaffolds, *Journal of Biomedical Materials Research*, 72(1), 156-165pp.

ÖZGEÇMİŞ**OSMAN MERT DUMAN****Kişisel Bilgiler**

Doğum Tarihi: 14.06.1990

Doğum Yeri: İZMİR

Adres: Emlak Bankası Konutları 80-1 sokak B2-6 Blok Daire:6 Gaziemir/İZMİR

GSM: +905438853130

E-mail: mert.duman@yahoo.com.tr

duman.mrt@gmail.com

Eğitim Bilgileri

Lise Bornova Anadolu Lisesi

Eylül 2004 – Haziran 2008

Lisans Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü

Eylül 2008 – Haziran 2012

Y. Lisans Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü

Eylül 2012- Devam etmekte

İş Deneyimleri**Gönüllü Stajlar**

- Bahçeşehir Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Mekatronik Mühendisliği Bölümü – Tıp Mühendisliği Laboratuvarı – 2010 Yaz Dönemi.

Danışman: Öğr. Gör. Kamuran KADIPAŞAOĞLU – Bahçeşehir Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği Bölümü, İstanbul.

- Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü – Algal Biyoteknoloji Laboratuvarı – 2009 Yaz Dönemi.

Danışman: Prof. Dr. Meltem CONK DALAY - Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü, İzmir.

Zorunlu Yaz Stajı

- Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyomekanik Anabilim Dalı – Biyomekanik Laboratuvarı – 2011 Yaz Dönemi.
Danışman: Prof. Dr. Hasan HAVITÇIOĞLU – Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, İzmir.

AKADEMİK AKTİVİTELER:

i) Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan Bildiriler: ters tarih sırası

- **Osman Mert DUMAN**, Şeyma ÇOĞAN, Can MİNAZ, Cenk ÇELİK, Aylin ŞENDEMİR-ÜRKMEZ, “PCL/Fe₃O₄ Scaffold Production with Electrospinning”, *Advanced Materials World Congress*, 16-18 Eylül 2013, Çeşme-Türkiye, s.25, Sözlü Bildiri, Özet.
- **Osman Mert DUMAN**, Can MİNAZ, Cenk ÇELİK, Aylin ŞENDEMİR-ÜRKMEZ, “Elektroegirme Yöntemi ile PEO/Fe₃O₄ Doku İskelelerinin Üretimi”, *Sağlıkta İnovasyon*
- **Osman Mert DUMAN**, Mehmet SARIKANAT, Aylin ŞENDEMİR-ÜRKMEZ, “Investigation of central nervous system neurons under mechanical tension: an *in vitro* traumatic brain injury model”, *19th Congress of the European Society of Biomechanics (ESB)*, 25-28 Ağustos 2013, Patras-Yunanistan, Poster Bildiri, Özet.

Ulusal Yayınlar ve Bildiriler

- Duman, M., Ölümsüz Yaşamın Sırrı, Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü Hücre Dergisi, s.72-73

- Doku Mühendisliği İskelelerinin Mekanik Karakterizasyonu, Osman Mert DUMAN, I. Ulusal Ege Kompozit Malzemeler Sempozyumu / 19 Kasım 2011, Selçuk, İZMİR (sözlü bildiri, özet)
- Doku Mühendisliği İskelelerinin Mekanik Karakterizasyonu, Osman Mert DUMAN, EBİLTET Öğrenci Topluluğu / 24 Mart 2012, Bornova, İZMİR (sözlü sunum)
- Elektroçirime Yöntemi ile PEO/Fe₃O₄ Doku İskelelerinin Üretimi, Osman Mert DUMAN, I. Ege Nanoteknoloji Günleri/ 18-19 Nisan 2013, Bornova, İZMİR (poster sunumu)

Seminer, Sempozyum, Kongre Katılımları

- Kök Hücre Sempozyumu – 16 Mart 2009, İzmir
- Yapay Doku Ve Organ Sempozyumu: Artan Organ İhtiyacına Güncel Yaklaşımlar – 27 Ekim 2009, İzmir
- 2. Kök Hücre Sempozyumu – 23 Mart 2010, İzmir
- V. Uluslararası Biyomühendislik Kongresi – 16-19 Haziran 2010, İzmir
- 3. Kök Hücre Sempozyumu - 30 Nisan 2011, İzmir
- Nanotechnology in Medicine-Functional Materials and Their Medical Applications – 4-5 Temmuz 2011, İzmir
- I. Ulusal Ege Kompozit Malzemeler Sempozyumu – 17-19 Kasım 2011, İzmir
- 17. Uluslararası Biyomedikal Bilim ve Teknoloji Sempozyumu (BIOMED) – 23-25 Kasım 2011, Ankara

Deneyim ve Kurs Sertifikaları

- Araştırma Deneyim Sertifikası – Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü Algal Biyoteknoloji Laboratuvarı, 2009, İzmir (320 saat)
- İngilizce Dil kursu - EF International School of English - 4-22 Temmuz 2005, Cambridge – Great Britain

Araştırma Projeleri

- 2011-2012, “Doku Mühendisliği İskelelerinin Mekanik Karakterizasyonu”, TUBİTAK 2209 Üniversite Öğrencileri Yurt İçi Araştırma Destek Projesi (Proje Yürütücüsü)
- 2012-2014, “Mekanik Germe Altında Merkezi Sinir Sistemi Nöronlarının İncelenmesi ve *in vitro* Bir Travmatik Beyin Hasarı Modeli”, TUBİTAK Ulusal Genç Araştırmacı Kariyer Geliştirme Projesi (111M605) (Bursiyer)
- 2013-2014, “Rekombinant İnsanlaştırılmış Anti Tumör Nekrozis Faktör- α Monoklonal Antikor Üretim Prosesinin Optimizasyonu”, TUBİTAK 1001 Bilimsel Araştırma Projesi (Bursiyer)

Üyelikler

- Gaziemir Belediye Spor Kulübü Lisanslı Basketbol Oyuncusu, 1998-2006
- Ege Bilim ve Teknoloji Öğrenci Kulübü üyeliği, 2008-2009

Bilgisayar Yetenekleri

- Microsoft Word, Excel ve Powerpoint Uygulamaları
- MatLab programlama dili
- Orta derecede Photoshop programı

Hobiler

- Felsefe, Bilim- Kurgu, Yunan Mitolojisi kitapları okumak ve bunlar hakkında araştırma yapmak
- Basketbol
- Serbest dalış
- Yamaç paraşütü
- Model helikopter ve model araba kullanmak