

TOBB EKONOMİ VE TEKNOLOJİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DOKU MÜHENDİSLİĞİ VE BİYOSENSÖR UYGULAMALARI İÇİN
NANOGÖZENEKLİ ANODİZE ALÜMİNYUM OKSİT MEMBRANLARIN
FİZİKSEL VE KİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Sevde ALTUNTAŞ

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Fatih BÜYÜKSERİN

ARALIK 2018



Fen Bilimleri Enstitüsü Onayı

.....
Prof. Dr. Osman EROĞUL
Müdür

Bu tezin Doktora derecesinin tüm gereksinimlerini sağladığımı onaylarım.

.....
Prof. Dr. Osman EROĞUL
Anabilimdalı Başkanı

TOBB ETÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 151717003 numaralı Doktora Öğrencisi **Sevde ALTUNTAŞ** 'ın ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "**DOKU MÜHENDİSLİĞİ VE BİYOSENSÖR UYGULAMALARI İÇİN NANOGÖZENEKLI ANODİZE ALÜMİNYUM OKSİT MEMBRANLARIN FİZİKSEL VE KİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**" başlıklı tezi **27.12.2018** tarihinde aşağıda imzaları olan jüri tarafından kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı : **Doç. Dr. Fatih BÜYÜKSERİN**
TOBB Ekonomive Teknoloji Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU**
(Başkan)
Hacettepe Üniversitesi

Doç. Dr. Hatice DURAN
TOBB Ekonomive Teknoloji Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Ersin Emre ÖREN
TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Batur ERCAN
Orta Doğu Teknik Üniversitesi

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, alıntı yapılan kaynaklara eksiksiz atıf yapıldığını, referansların tam olarak belirtildiğini ve ayrıca bu tezin TOBB ETÜ Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlandığını bildiririm.

Sevde Altuntaş

ÖZET

Doktora Tezi

DOKU MÜHENDİSLİĞİ VE BİYOSENSÖR UYGULAMALARI İÇİN NANOGÖZENEKLİ ANODİZE ALÜMİNYUM OKSİT MEMBRANLARIN FİZİKSEL VE KİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Sevde Altuntaş

TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Fatih Büyükserin

Tarih: Aralık 2018

Anodik alüminyum oksit (AAO) membranlar biyomedikal mühendisliğinin birçok uygulama alanında fiziksel ve kimyasal avantajları nedeniyle ön plana çıkan seramik bir malzeme grubudur. Bu tez kapsamında, AAO membranlar doku mühendisliği ve biyosensör uygulamaları açısından ele alınmıştır. Tezin ilk kısmında AAO membranların nöroelektrot olma potansiyelleri araştırılmıştır. Sonuçlar, iletken 100 nm AAO (CAAO) membranların sinir gelişimini, farklılaşmasını iletken 250 nm AAO membranlara nazaran tetiklediğini göstermiştir. Dahası, 100 nm AAO membranlar, membranlardaki sinir büyüme faktörlerinin kontrollü salım parametreleri kontrol edilirse nöro-elektrot yüzeyi olma potansiyeline sahiptir.

Ayrıca, membranlar Alzheimer proteinlerinin tespiti için faydalanılan Raman aktif polikarbonat filmlerin üretiminde kalıp olarak kullanılmıştır. Çalışmalar 20 nm Au kaplanmış multi çatal desenli substratların (Au@MDS) 0,5 pg/ml konsantrasyonuna kadar amiloid β 1-42 (A β 1-42) proteininin tespitine olanak sağladığını göstermiştir. Ayrıca yüzeylerin sinyal tekrarlanabilirliği (% RSD: %17), seçiciliği (miyogloblin) test

edilmiştir. Sonuçlar Au@MDS'lerin fiziksel yapıları nedeniyle sıcak nokta oluşumunu tetiklediğini göstermiştir.

Ek olarak, damla yayma tekniği kullanılarak üretilen kitosan;jelatin (K:J) nanodesenli ve/veya epidermal büyüme faktörü katkılanmış filmler üretilmiş ve bu filmlerin implant kaplama ve yara örtü modeli (melanogenez perspektifinde) olarak potansiyelleri *in vitro/in vivo* koşullarda takip edilmiştir.

Kemik doku mühendisliği ile ilgili yapılan çalışmalar nano K:J filmlerin mezenkimal kök hücrelerini düz K:J filmlere ve TCPS yüzeylere nazaran daha başarılı kemik hücrelerine farklılaştırma potansiyeli olduğunu göstermiştir. Ayrıca benzer analizler olgun kemik hücreleri için tekrarlanmış ve benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Deri doku mühendisliği çalışmaları *in vitro* ve *in vivo* koşullarda yapılan protein ve gen temelli testler ile sunulmuştur. Epidermal büyüme faktörünün (EGF), melanogenezde önemli bir etkiye sahip olmamasına rağmen, yaranın kapanma performansını arttırdığı gösterilmiştir. Sonuçlar histoloji boyamaları ile doğrulanmıştır. Ancak, nanotopografik etkinin melanogenezde aktif rol aldığı tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, nano filmlerin EGF varlığında iyi bir yara yama modeli olabileceği düşünülmektedir.

Sonuçlar, AAO mebranların kontrol edilebilir parametrelerinin doğrudan ya da dolaylı (kalıp) olarak hücrel aktiviteyi ve optik sensörlerde sıcak nokta oluşumunu tetikleyici bir potansiyele sahip olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Anodik alüminyum oksit, Doku mühendisliği, Biyosensör

ABSTRACT

Doctor of Philosophy

INVESTIGATION OF PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF ANODIC ALUMINIUM OXIDE MEMBRANES FOR TISSUE ENGINEERING AND BIOSENSORS APPLICATIONS

Sevde Altuntas

TOBB University of Economics and Technology
Institute of Natural and Applied Sciences
Biomedical Engineering Science Programme

Supervisor: Assoc. Prof. Fatih Buyukserin

Date: December 2018

Anodic aluminum oxide (AAO) membranes are a ceramic material group which comes into prominence due to their physical and chemical advantages in various fields of biomedical engineering. In the thesis scope, AAO membranes were contextualized regarding their potential tissue engineering and biosensor applications.

In the first part of the thesis, the potential of AAO membranes as a neuro-electrode was investigated. The results showed that conductive 100 nm AAO (CAAO) membranes triggers neuron growing and differentiation compared to 250 nm AAO membranes. Moreover, 100 nm AAO membranes has a potential to be neuron electrode surfaces if controlled release parameters of nerve growth factors from the membranes.

Additionally, the membranes were used as a mold to fabricate Raman active substrates which were utilized for detecting of Alzheimer`s proteins. The results demonstrated that 20 nm Au coated multibranched substrates (Au@MDS) provide detecting amyloid β 1-42 (A β 1-42) proteins by 0,5 pg/ ml concentration. Furthermore, signal reproducibility (RSD%: 17%) and selectivity (against to myoglobin) of surfaces were

tested. Overall, the results indicated that Au@MDSs trigger hot spot formation due to their physical structures.

Moreover, nano-designed and/or epidermal growth factor doped chitosan:gelatin (C:G) films were synthesized with the drop casting technique and the potential of the films as an implant coating or wound patch model (melanogenesis perspective) were followed under in vitro / in vivo conditions.

Nano C:G films has potential to differentiate mesenchymal stem cells to bone cells compared to flat films and TCPS control group. Additionally, the same analyses were repeated for mature bone cells and same results were observed.

Skin tissue engineering studies were presented protein and gene-based analysis under in vitro and in vivo conditions. Although epidermal growth factor (EGF) has no significant effect on melanogenesis, it has been shown to improve wound closure performance. The results were confirmed by histology staining. However, it is established that nanotopography effect has taken active role on melanogenesis. When all results are evaluated together, it is thought that nano films can be a good wound patch model in the presence of EGF.

The results showed that the controllable parameters of AAO membranes have a potential to trigger cellular activity and hot spot formation in optic sensors, directly or indirectly (mold).

Keywords: Anodic aluminum oxide, Tissue engineering, Biosensor.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren, her ihtiyaç duyduğumda yanımda olan, engin sabırla beni sınırlarımı bugün bile bilmediğim bir bilimsel vizyonla yetiştiren kıymetli hocam Doç. Dr. Fatih Büyükserin`e, kıymetli tecrübelerinden faydalandığım Prof. Dr. Menemşe Gümüşderlioğlu, Dr. Öğr. Üyesi Ersin Emre Ören, Doç. Dr. Gökhan Demirel, Prof. Dr. Uğur Tamer ve Doç. Dr. Baran Önal Ulusoy`a teşekkür ederim. Tez çalışmalarımı tamamlamak için beni Northeastern Üniversitesi Eczacılık Fakültesi`ndeki grubuna bir yıl süre ile kabul eden ve hiçbir desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Mansoor Amiji`ye, in vivo temelli çalışmalarda bana her zaman yol gösterici olan dostlarım Dr. Harkiranpreet Dhaliwal ve Dr. Ahmed Eid Radwan`a, doktora sonrası çalışmalarına başlamam konusunda beni teşvik eden ve Harvard Üniversitesi Tıp Fakültesi “Brigham`s and Women” Hastanesi Nefroloji Bölümündeki grubuna beni kabul eden Dr. Dario Lemos`a teşekkür ederim. Ayrıca Amerika Birleşik Devletleri`ndeki ilk ders verme tecrübeme olanak sağladığı için Dr. Lara Scheherazade Milane`a teşekkür ederim. Doktora sürecim boyunca “BMM 102 Biyokimya” dersinden “MBN 304 Nanomalzemelerin Üretim ve Karakterizasyonu” dersine kadar pek çok farklı derste 4 yıldan fazla süre asistanlık yapmama imkan sağlayan ve bu bağlamda finansal olarak beni destekleyen TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi`ne, tez çalışmalarımın bir kısmını tez danışmanımın yürütücüsü olduğu 3501 Kariyer Geliştirme Programı (111M686) ve 1002 Hızlı Destek Programı (214Z167) projeleriyle, Amerika Birleşik Devletleri`nde yaptığım çalışmaları ise 1059B141601323 numaralı yürütücüsü olduğum 2214-A projesi ile destekleyen TUBITAK`a teşekkür ederim. Son olarak uzun soluklu doktora sürecimde beni yalnız bırakmayan bütün dostlarıma, Büyükserin Araştırma Grubu üyelerine, maddi/manevi desteğiyle her zaman yanımda olan anneme, özleminden hiçbir şey eksiltemediğim babama, desteklerini bir an olsun esirgemeyen kardeşlerim Zeynep Kübra, Selim ve Mustafa Emir`e, neşe kaynağım Alparslan`a gönülden teşekkür ederim.

Bu tez Doç. Dr. Fatih Büyükserin`e ithaf edilmiştir. Saygılarımla

İÇİNDEKİLER

Sayfa

| | |
|---|--------------|
| ÖZET | v |
| ABSTRACT | vii |
| TEŞEKKÜR | ix |
| İÇİNDEKİLER | x |
| ŞEKİL LİSTESİ | xii |
| ÇİZELGE LİSTESİ | xxii |
| KISALTMALAR | xxiii |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 1.1 Tezin Amacı..... | 1 |
| 1.2 Literatür Araştırması..... | 3 |
| 1.2.1 Sinir-elektrot olarak AAO membranlar..... | 5 |
| 1.2.2 Biyosensör teknolojisinde AAO membranlar | 6 |
| 1.2.3 İmplant kaplama teknolojilerinde AAO membranlar: Doğal polimer iskelelerin nanodesenlenmesindeki avantajlar | 11 |
| 1.2.4 Yara örtü modelleme teknolojilerinde AAO membranlar: Doğal polimer iskelelerin nanodesenlenmesindeki avantajlar | 13 |
| 2. SINIR-ARAYÜZ MALZEMESİ OLARAK PROTEİN SALIMI YAPAN İLETKEN ANODİK ALÜMİNYUM OKSİT MEMBRANLAR | 21 |
| 2.1 Amaç..... | 21 |
| 2.2 Materyal ve Yöntemler | 21 |
| 2.2.1 Materyaller | 21 |
| 2.2.2 Deneysel yöntemler..... | 22 |
| 2.2.2.1 AAO ve iletken AAO (CAAO) membranların sentezi ve karakterizasyonu..... | 22 |
| 2.2.2.2 Hücre kültürü çalışmaları | 23 |
| Hücre canlılık analizleri | 23 |
| Hücre yapışma ve nörit ölçüm çalışmaları | 24 |
| NGF katkılama ve salım çalışmaları | 25 |
| 2.3 Tartışma | 25 |
| 2.4 Sonuç | 40 |
| 3. TİYOFİAVİN T MODİFİYE NANODESENLEMELİ POLİMERİK YÜZEY ARTILMIŞ RAMAN SPEKTROSKOPİSİ SUBSTRATLARININ AMİLOİD β 1-42 PEPTİTLERİNİN ULTRA HASSAS DEDEKSİYONUNDA KULLANIMI | 43 |
| 3.1 Amaç..... | 43 |
| 3.2 Materyal ve Yöntemler | 44 |
| 3.2.1 Materyaller | 44 |
| 3.2.2 Deneysel yöntemler..... | 44 |
| 3.2.2.1 AAO kalıpların ve PK nanodesenlemeli yüzeylerin sentez ve karakterizasyonu..... | 44 |

| | |
|--|------------|
| 3.2.2.2 Altın kaplama, ThT modifikasyonu ve SERS ölçümleri | 46 |
| 3.2.2.3 FDTD simülasyonları..... | 46 |
| 3.2.2.4 Artma faktörünün hesaplanması | 47 |
| 3.2.2.5 A β 1-42 miktar analizleri | 47 |
| 3.3 Tartışma | 47 |
| 3.4 Sonuç | 59 |
| 4. NANODESENİLİ KİTOSAN: JELATİN FİLMLEİN FABRİKASYON VE KARAKTERİZASYONU, İMPLANT KAPLAMA MODELİ OLARAK VE MELANİN SENTEZİNİ TETİKLEYİCİ YARA ÖRTÜSÜ MODELİ OLARAK KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI..... | 61 |
| 4.1 Çalışmanın Amacı | 61 |
| 4.2 Materyaller ve Yöntemler..... | 62 |
| 4.2.1 Materyaller | 62 |
| 4.2.2 Deneysel yöntemler..... | 63 |
| 4.2.2.1 AAO kalıpların ve K:J nanodesenlemeli yüzeylerin sentez ve karakterizasyonu | 63 |
| 4.2.2.2 K:J filmlerin antimikrobiyal aktivitesi | 65 |
| 4.2.2.3 Kemik doku çalışmaları | 65 |
| Canlılık..... | 66 |
| Alkalın fosfataz aktivitesi | 66 |
| Alizarin kırmızısı boyaması, mineral birikimin miktarının belirlenmesi ve protein adsorpsiyonu | 66 |
| qPCR analizleri | 67 |
| 4.2.2.4 Deri doku çalışmaları | 68 |
| EGF katkılı filmlerin sentezi ve EGF salımının takibi | 68 |
| Canlılık..... | 68 |
| Epidermal büyüme faktörü reseptörlerinin (EGFR) miktar tayini | 69 |
| Fibronektin salımının tayini | 69 |
| Tirozinaz enzim aktivitesinin tayini..... | 69 |
| Optik mikroskop analizleri..... | 70 |
| PCR analizleri | 70 |
| Western blot analizleri | 70 |
| Yara kapanma çalışmaları | 71 |
| Biyopsi örneklerindeki fibronektin miktarının tayini | 72 |
| Biyopsi örneklerindeki tirozinaz aktivitesinin tayini | 72 |
| Biyopsi örneklerindeki melanin miktarının tayini | 72 |
| Biyopsi örnekleri için PCR analizi..... | 73 |
| Biyopsi örnekleri için histoloji analizleri..... | 74 |
| İstatiksel analizler..... | 75 |
| 4.3 Tartışma | 75 |
| 4.3.1 Kemik doku çalışmaları | 75 |
| 4.3.2 Deri doku çalışmaları | 92 |
| 4.4 Sonuç | 114 |
| 5. SONUÇ VE ÖNERİLER..... | 115 |
| KAYNAKLAR | 119 |
| ÖZGEÇMİŞ..... | 119 |

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

- Şekil 1.1: AAO membranların üretim mekanizması [14]. 4
- Şekil 1.2: SERS yüzeylerinde gerçekleşen elektromanyetik artırma (a) Altın nanoküre LSPR etkisi ile bir nanoanten gibi davranır. (b) Gelen (yeşil) ve giden (turuncu) alan LSPR etkisi ile desteklenmiş nanoküre yüzeyinden elastik ışık saçılımı ile artırılabilir [51]. 7
- Şekil 1.3: Nanodesenlenmiş silikon yongalar kullanılarak damla yayma yöntemiyle üretilen 40 nm gümüş ile kaplanmış polimer yüzeylerin taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüsü (a). 10^{-7} M R6G ile modifiye edilmiş düz ve desenlenmiş polimer yüzeyin SERS ölçümleri (b). Nanoyapılı filmde yüksek SERS sinyallerinin elde edilmesi, yüzey morfolojisine bağlı olarak oluşan plazmonik özellikli sinyal artırıcı noktalar (hot spot) ile ilgilidir [63]..... 9
- Şekil 1.4: Thioflavin – T molekülünün A β 1-42 tabakaları ve metal yüzeyler ile olan etkileşiminin şematik gösterimi [69]. 9
- Şekil 1.5: Keratinosit ve melanosit hücrelerinin ikili kültürleme çalışmaları sonucu elde edilen (a) kontrol grubunun ve (b) 4 gün 50 nM melanosit stimülasyon hormonu ile inkübe edilen çalışma grubunun optik mikroskop görüntüleri [40]. Bu görüntüler melanosit hücrelerinin morfolojisinin fibroblastik hücre hatlarından oldukça farklı olduğunu ortaya koymaktadır. 16
- Şekil 2.1: Alüminyumdan arındırılmış AAO (sağda) ve CAAO (solda) örneklerinin fotoğrafları (a). 100 nm (b) ve 250 nm (c) gözenek çapına sahip CAAO membranların SEM görüntüleri. Ölçek çubuğu 1 cm (a), 1 μ m (b) ve 5 μ m (c) uzunlukları temsil etmektedir. 27

- Şekil 2.2: Sıçan (a), insan (b) ve sığır (c) kolajeni kullanılarak kaplanan TCPS yüzeylerin 40X büyütmedeki optik mikroskop görüntüleri. Sıçan kolajeni ile yapılan çalışmalarda hücrelerin topaklandığı insan ve sığır kollajeninde yayılımın arttığı ancak hücre sayısı bakımından sığır kollajeninin daha avantajlı olduğu düşünülmektedir. Ölçek çubukları 50 µm uzunluğu temsil etmektedir. Çalışma 12'lik mikroplakada tamamlanmıştır..... 28
- Şekil 2.3: 100 nm-AAO membran üzerine 9500 hücre/ml konsantrasyonunda, 100 ng/ml NGF içerikli besi yerinde, 4 gün inkübasyon yapılarak büyütülen hücre hattının düşük büyütmedeki (a) ve yüksek büyütmedeki (c) SEM görüntüleri. 20000 hücre/ml konsantrasyonunda, 25 ng/ml NGF içerikli besi yerinde, 3 gün inkübasyon yapılarak büyütülen hücre hattının düşük büyütmedeki (b) ve yüksek büyütmedeki (d) SEM görüntüleri. Ölçek çubukları 10 µm uzunluğu temsil etmektedir. Çalışma 96'lık mikroplakada tamamlanmıştır. 29
- Şekil 2.4: PC12 hücrelerinin 2 ve 7 gün boyunca inkübasyonu sonrası WST-1 test kiti kullanılarak elde edilen hücre canlılık sonuçları. Çalışma 96'lık mikroplakada tamamlanmıştır. (* p <0,002) 29
- Şekil 2.5: 100 nm gözenek çapına kolajen kaplanmış AAO membranlar (a), kollajen kaplanmış TCPS yüzeyler (b) ve kollajen kaplanmamış 100 nm gözenek çapına sahip AAO membranlar (c) üzerinde inkübe edilen PC12 hücrelerinin SEM görüntüleri. Ölçek çubukları 50 µm uzunluğu temsil etmektedir. 31
- Şekil 2.6: Hücre tutunumu ve nörit uzaması için kullanılan substrat düzeneği (a). Sızma sorunu çözülmüş aktif AAO alanlı cam kuyucuklardan bir görüntü (b). Görüntü hücre çalışmaları sırasında alınmıştır. 32
- Şekil 2.7: 100 nm gözenek çapına sahip AAO (a) ve CAAO-E (b) membranlar ile 250 nm gözenek çapına sahip AAO (c) ve CAAO-E (d) membranlar üzerinde büyütülen PC12 hücrelerinin SEM görüntüleri. (b) içerisinde bulunan resimler artan nörit oluşumunu (sağ) ve elektrik uygulaması sonrası dallanmış nörit formunu (sol) göstermektedir. Çalışma 96'lık

mikroplakada tamamlanmıştır. Ölçek çubukları 10 µm uzunluğu temsil etmektedir.33

Şekil 2.8: Bar grafik 6 farklı substratın üzerinde büyütülen PC12 hücrelerinin karşılaştırmalı olarak yüzeylere yapışma eğilimini göstermektedir (a). Gözeneksiz alüminyum oksit (b) üzerinde 100 nm gözenek çapına sahip AAO membranlara (c) göre daha az hücre yapıştığını gösteren SEM resimleri. Çalışma 96'lık mikroplakada tamamlanmıştır. SEM resimlerinde bulunan ölçek çubuğu 50 µm`yi temsil etmektedir. (*p <0,002, **p <0,005)..... 34

Şekil 2.9: ALD ile alüminyum oksit kaplanmış silikon yongaların kolajen kaplanmadan önce (a) ve kaplandıktan sonraki (b) topografik profilleri. Bu görüntüler ve ilgili pürüzlülük değerleri Nanomagnetics EZ AFM cihazı kullanılarak elde edilmiştir (PPP-NCLR tip). Nanogözenekli AAO membranların kolajen kaplandıktan sonraki topografik profile ve pürüzlülük değeri (c). Görüntülerden anlaşıldığı üzere AAO membranın pürüzlülük değerleri diğer yüzeylere nazaran daha yüksektir. 35

Şekil 2.10: Ortalama nörit uzunluğunu (a), hücre başına düşen nörit sayısını (b) ve % dönüşüm oranını (c) gösteren bar grafikler. Çalışma 96'lık mikroplakada tamamlanmıştır. (*p <0,002 ve **p <0,005) 36

Şekil 2.11: 100 nm AAO (a) ve CAAO membranlardan (b) ex-vivo NGF salımını gösterimi, 100 ng NGF ile katkılandırılan AAO membranlar üzerindeki düşük hücre tutunumunu (b) ve kapalı gözenekleri gösteren (c) SEM görüntüleri. Grafiklerdeki katı çizgiler verilerin takibini kolaylaştırmak için kullanılmıştır. Çalışma 96'lık mikroplakada tamamlanmıştır. SEM resimlerinde bulunan ölçek çubuğu 100 µm`yi temsil etmektedir. 37

Şekil 2.12: 20 ng NGF ile katkılandırılmış AAO (a, c) ve CAAO membranlar üzerindeki PC12 hücrelerinin düşük ve yüksek büyütmedeki SEM görüntüleri. Şekil 21c ve d iç resimde görüldüğü üzere protein katkılması sonrası gözenekler açıktır. Hücre yapışması (e) ve ortalama nörit uzunluğu (f) standart NGF uygulaması ve katkılandırma uygulaması sonrası gösterilmiştir. Çalışma 96'lık mikroplakada tamamlanmıştır. Tek yönlü

ANOVA sonrası Scheffe testi yapılarak istatistiksel karşılaştırma yapılmıştır (p < 0,05). a ve b için ölçek çubuğu 10 µm, c ve d için 5 µm`dir. 39

Şekil 3.1 : SDS (a) ve MDS`lerin (b) silindirik ve multi-çatallanmış kolon yapılı AAO membranlardan elde edilşinin şematik gösterimi. Hidrofobik hale getirilmiş AAO membranlara PK solüsyonları damlatılmış ve solventler uzaklaştırılıp filmler elde edilmiştir. 48

Şekil 3.2 : Standart (a), multi-çatallanmış (d) AAO membranların, SDS (b) ve MDS`lerin (e) SEM görüntüsü. Dallanma noktaları ok ile gösterilmiştir. Silindirik ve multi-çatallanmış yapı ayrıca sol-jel kimyası temelli olarak sentezlenen silika nanotest tüpler ile de düz (c) ve dallanmış (f) topografi de gösterilmiştir. 49

Şekil 3.3 : DPS, MDS ve SDS`lerin 10,20 ve 30 nm altın kaplanmış ThT SERS sinyalleri. Bazı ThT özgü sinyaller spektrumlar üzerinde işaretlenmiştir ve en yüksek sinyal 20 nm altın kaplı MDS`lerde görülmüştür..... 51

Şekil 3.4 : 20 nm altın kaplama ile muamele edilmiş SDS (a) ve MDS (b) filmler üzerindeki FDTD-simüle elektrik alan yoğunluğu. Ayrıca altın kaplama kalınlığının etkisi 10 (c) ve 30 nm (d) koşulları için simüle edilmiştir. 52

Şekil 3.5 : Au@MDS`ler üzerinde ThT sinyallerinin azalan konsantrasyonla birlikte değişimi (a). 3 bağımsız Au@MDS`nin farklı noktalarından alınan spektrumların ortalamalarının tekrarlanabilirliğin gösterilebilmesi amacıyla standart sapma barları ile birlikte ThT (b) ve MB (c) boyaları için gösterimi. 54

Şekil 3.6 : Altın kaplanmış MDS ve DPS`ler üzerinde (a) MB ve (b) ThT`nin SERS spektrumları. 56

Şekil 3.7 : 10⁻⁵ M ThT ile modifiye edilmiş Au@MDS`lerde artan Aβ 1-42 konsantrasyonuna bağılı olarak değişen SERS spektrumları (a), artan peptit konsantrasyonuna bağılı olarak 1601 cm⁻¹`deki sinyal değişim (b) ve 1601 cm⁻¹`deki SERS sinyal baskılanmasının log [Aβ 1-42] karşı değişimi (c).Bu grafik kullanılan platform için dinamik aralığın 0,5 pg/ml ile 100 ng/ml arasında olduğunu ve R² değerinin~1 olduğunu göstermiştir. 57

- Şekil 3.8 : 10 pg/ml Aβ 1-42 uygulanmış ThT modifiye Au@MDS'lerin SEM görüntüsü. Çalışılan konsantrasyon aralığında yüzeylerde plak oluşumu gözlenmemiştir. 58
- Şekil 3.9 : ThT modifiye Au@MDS'lerin 1 ve 30 gün sonundaki SERS spektrumları (a), ve farklı inkübasyon sürelerinde 1601 cm⁻¹'deki sinyal değişimi gösteren grafik (b). Benzer spektrum protein katkılanmamış salya çözeltisinden de alınmıştır (c, siyah spektrum). ThT sinyalleri ortama Aβ 1-42 eklenmesi sonrası baskılanmış fakat bu azalma miyoglobin katılması ile anlamlı şekilde gerçekleşmemiştir. (c, mavi ve kırmızı spektrum). 1601cm⁻¹'deki sinyal azalması d'de gösterilmiştir. Her veri 3 bağımsız örneğin rastgele noktalarından alınmıştır (n=3). c ve d'deki lejantlar aynıdır. 59
- Şekil 4.1 : Nano K:J filmlerin üretim ve karakterizasyonu. Nanodesenli filmlerin üretiminin şematik gösterimi (a). AAO kalıpların (b), nanodesenli filmlerin SEM görüntüsü (c). Ölçek: 500 nm. Nanodesenli (d) ve düz filmlerin (f) 3-D AFM taraması. Nanodesenli (e) ve düz (g) filmlerin Owens/Wendth grafikleri..... 77
- Şekil 4.2 : Nano K:J filmlerin kimyasal ve termal karakterizasyonu. Çapraz bağlı olmayan (a) ve olan (b) filmlerin ¹H NMR spektrumları. Filmlerin FTIR analizi (c). 78
- Şekil 4.3 : Nano K:J filmlerin fiziksel karakterizasyonu. K:J filmlerin su tutma (a) ve % kalan ağırlık (b) çalışmaları. Çapraz bağlı olan K:J filmler üzerindeki nanodesenlemenin besi yeri içerisinde 1 saat (c), 3 saat (d) ve 24 saat (e) bekletildikten sonraki SEM görüntüleri. 80
- Şekil 4.4 : Nanodesenli ve düz K:J filmlerin antibakteriyel aktivitesi. *P. Aeruginosa* (a, b) ve *S. Aureus* (c, d) patojenlerinin filmler üzerindeki koloni sayma sonuçları. Veriler ortalama ± standart sapma olarak sunulmuştur. (n=3) Antibiyotik katkılama olmayan PS kontrol grubuna göre * p<0,05 ; düz filmlere göre * p<0,05 anlamlı kabul edilmiştir. Çalışma 96'lık mikropalakalarda tamamlanmış ve 10⁶ CFU/ml bakteri konsantrasyonu ile çalışılmıştır. 81

Şekil 4.5 : *P. Aeruginosa* patojenin PS kontrol (a), nanodesenli film (c) ve düz filmler (e) üzerinde propidiyum iyodid ve SYTO-9 boyaları kullanılarak yapılan canlı-ölü boyaması. *S. Aureus* patojenin PS kontrol (b), nanodesenli film (d) ve düz filmler (f) üzerinde propidiyum iyodid ve SYTO-9 boyaları kullanılarak yapılan canlı-ölü boyaması. Ölçek: 20 µm. Çalışma 96`lık mikropalakalarda tamamlanmış ve 10⁶ CFU/ml bakteri konsantrasyonu ile çalışılmıştır. 82

Şekil 4.6 : 3 günlük inkübasyon sonrası filmler üzerinde büyülen MSC hatlarının % canlılık sonuçları, (n=3). TCPS kontrol grubuna göre * p<0,05 anlamlı kabul edilmiştir. Çalışma 96`lık mikropalakalarda tamamlanmış ve 10⁴ hücre/kuyu konsantrasyonu ile çalışılmıştır. 83

Şekil 4.7 : Adsorbsiyon sonrası çözeltilerde kalan protein miktarının TCPS kontrol grubuna göre ve başlangıç konsantrasyonuna göre karşılaştırılması. Veriler ortalama ± standart sapma olarak sunulmuştur (n=3). TCPS kontrol grubuna göre ** p<0,005; başlangıç konsantrasyonuna göre # p<0,05 anlamlı kabul edilmiştir. Çalışma 96`lık mikropalakalarda tamamlanmış ve 10⁴ hücre/kuyu konsantrasyonu ile çalışılmıştır..... 84

Şekil 4.8 : Nanodesenli ve düz K:J filmler üzerinde büyütülen MSC hatlarının mineralizasyon ve osteoblast farklılaşması açısından karşılaştırılması. ALP aktivitesi (a) ve kantitatif mineralizasyon sonuçlarının (b) 1., 3., 7., 10., 14. ve 21. günler için analizi. 10. ve 21. günler için alizarin kırmızısı boyama sonuçları. Ölçek: 100 µm (c). Veriler ortalama ± standart sapma olarak sunulmuştur (n=3). TCPS kontrol grubuna göre * p<0,05 ** p<0,005; düz filmlere göre * p<0,05 ** p<0,005 anlamlı kabul edilmiştir. Çalışma 96`lık mikropalakalarda tamamlanmış ve 10⁴ hücre/kuyu konsantrasyonu ile çalışılmıştır. 87

Şekil 4.9 : Filmler üzerinde büyütülen MSC hatlarının 10 ve 21. günler için qPCR sonuçları. Veriler ortalama ± standart sapma olarak sunulmuştur (n=3). TCPS kontrol grubuna göre * p<0,05 ** p<0,005; düz filmlere göre * p<0,05 ** p<0,005 anlamlı kabul edilmiştir. Çalışma 12`lik

mikroplakalarda tamamlanmış ve 2×10^5 hücre/kuyu konsantrasyonu ile çalışılmıştır. 88

Şekil 4.10 : 3 günlük inkübasyon sonrası filmler üzerinde büyüyen MSC hatlarının % canlılık sonuçları. Örnekler arasında anlamlı fark bulunmamaktadır. Çalışma 96'lık mikroplakalarda tamamlanmış ve 10^4 hücre/kuyu konsantrasyonu ile çalışılmıştır. 88

Şekil 4.11 : Nanodesenli ve düz K:J filmler üzerinde büyütülen Saos-2 hücre hatlarının mineralizasyon ve osteoblast farklılaşması açısından karşılaştırılması. ALP aktivitesi (a) ve kantitatif mineralizasyon sonuçlarının (b) 1., 3., 7. ve 10. günler için analizi. 3. ve 10. günler için alizarin kırmızısı boyama sonuçları (d). Ölçek: $100 \mu\text{m}$. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak sunulmuştur (n=3). TCPS kontrol grubuna göre * $p < 0,05$ ** $p < 0,005$; düz filmlere göre * $p < 0,05$ ** $p < 0,005$ anlamlı kabul edilmiştir. Çalışma 96'lık mikroplakalarda tamamlanmış ve 10^4 hücre/kuyu konsantrasyonu ile çalışılmıştır. 90

Şekil 4.12 : Filmler üzerinde büyütülen Saos-2 hücre hatlarının 3. ve 10. günler için RUNX2 (a), OPN (b) ve OCN (c) genlerinin ekspresyon sonuçları. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak sunulmuştur (n=3). TCPS kontrol grubuna göre * $p < 0,05$ ** $p < 0,005$; düz filmlere göre * $p < 0,05$ ** $p < 0,005$ anlamlı kabul edilmiştir. Çalışma 12'lik mikroplakalarda tamamlanmış ve 2×10^5 hücre/kuyu konsantrasyonu ile çalışılmıştır..... 91

Şekil 4.13 : J774A.1 mürin makrofajlarının filmler üzerinde bir günlük inkübasyon sonrası elde edilen qPCR sonuçları. Gruplar arasında anlamlı fark gözlemlenmemiştir. Çalışma 12'lik mikroplakalarda tamamlanmış ve 2×10^5 hücre/kuyu konsantrasyonu ile çalışılmıştır. 91

Şekil 4.14 : Deri doku ile yapılan çalışmaların akışını gösteren şematik. 92

Şekil 4.15 : In vitro koşullarda EGF salımının zamana bağlı değişimini gösteren grafik (a). EGF (+/-) filmler üzerindeki NIH3T3 (b), B16F10 (c) ve bu hücre hatlarının 1:1(d) ve 5:1(e) oranında hazırlanmış ikili kültürlerinin filmler üzerindeki canlılık değerleri. Veriler ortalama \pm standart sapma

olarak sunulmuştur (n=3). TCPS kontrol grubuna göre * $p<0,05$ ** $p<0,005$ *** $p<0,0005$ anlamlı kabul edilmiştir. İkili gruplar halinde karşılaştırma yapılırken bağlantı çizgileri kullanılmış ve * $p<0,05$ ** $p<0,005$ *** $p<0,005$ anlamlı kabul edilmiştir. Çalışma 96`lık mikropalakalarda 3 günlük inkübasyon süresinde tamamlanmış ve 10^4 hücre/kuyu konsantrasyonu ile çalışılmıştır. 95

Şekil 4.16 : NIH3T3 (a), B16F10 (b) ve ikili kültür sistemindeki (c) EGFR sekresyonunun TCPS kontrol grubu ve K:J filmler varlığında tespiti. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak sunulmuştur (n=3). TCPS kontrol grubuna göre * $p<0,05$ anlamlı kabul edilmiştir. İkili gruplar halinde karşılaştırma yapılırken bağlantı çizgileri kullanılmış ve * $p<0,05$ anlamlı kabul edilmiştir. Çalışma 96`lık mikropalakalarda 3 günlük inkübasyon süresinde tamamlanmış ve 10^4 hücre/kuyu konsantrasyonu ile çalışılmıştır. 97

Şekil 4.17 : K:J filmler ve TCPS yüzeyler üzerinde büyütülen NIH3T3 (a) ve NIH3T3:B16F10 (5:1) (b) hücrelerinden salınan fibronektin miktarı. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak sunulmuştur (n=3). TCPS kontrol grubuna göre * $p<0,05$ ** $p<0,005$ *** $p<0,0005$ anlamlı kabul edilmiştir. İkili gruplar halinde karşılaştırma yapılırken bağlantı çizgileri kullanılmış ve * $p<0,05$ anlamlı kabul edilmiştir. Çalışma 96`lık mikropalakalarda 3 günlük inkübasyon süresinde tamamlanmış ve 10^4 hücre/kuyu konsantrasyonu ile çalışılmıştır. 98

Şekil 4.18 : K:J filmler ve TCPS yüzeyler üzerinde büyütülen B16F10 (a) ve NIH3T3:B16F10 (5:1) (b) hücrelerinin tirozinaz aktivitesi, Veriler ortalama \pm standart sapma olarak sunulmuştur (n=3). TCPS kontrol grubuna göre * $p<0,05$ ** $p<0,005$ anlamlı kabul edilmiştir. İkili gruplar halinde karşılaştırma yapılırken bağlantı çizgileri kullanılmış ve * $p<0,05$ anlamlı kabul edilmiştir. Çalışma 96`lık mikropalakalarda 3 günlük inkübasyon süresinde tamamlanmış ve 10^4 hücre/kuyu konsantrasyonu ile çalışılmıştır. 99

Şekil 4.19 : K:J filmler ve TCPS yüzeyler üzerinde büyütülen B16F10 (a) ve NIH3T3:B16F10 (5:1) (b) hücreleri kaynaklı melanin miktarının farklı kaynaklar üzerinden tespiti. Ölçek: 3 mm. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak sunulmuştur (n=3). TCPS kontrol grubuna göre * $p<0,05$ ** $p<0,005$ *** $p<0,0005$ anlamlı kabul edilmiştir. İkili gruplar halinde karşılaştırma yapılırken bağlantı çizgileri kullanılmış ve * $p<0,05$ ** $p<0,005$ *** $p<0,0005$ anlamlı kabul edilmiştir. Çalışma 96'lık mikrolakalarda 3 günlük inkübasyon süresinde tamamlanmış ve 10^4 hücre/kuyu konsantrasyonu ile çalışılmıştır. 101

Şekil 4.20 : EGF katkılanmış nano (a) ve düz (b) K:J filmler üzerindeki NIH3T3:B16F10 (5:1) ikili kültür hücrelerinin mikroskop görüntüleri. Ölçek: 50 μ m. Çalışma 96'lık mikrolakalarda 3 günlük inkübasyon süresinde tamamlanmış ve 10^4 hücre/kuyu konsantrasyonu ile çalışılmıştır. 102

Şekil 4.21 : Melanogenez ilişkili genlerin in vitro çalışmalar açısından qPCR sonuçları (a). Çalışma 12'lik mikrolakalarda 3 günlük inkübasyon süresinde tamamlanmış ve 2×10^5 hücre/kuyu konsantrasyonu ile çalışılmıştır. Tirozinaz proteinin B16F10 hücrelerindeki varlığının tespiti (b). Çalışma 12'lik mikrolakalarda 3 günlük inkübasyon süresinde tamamlanmış ve 10^5 hücre/kuyu konsantrasyonu ile çalışılmıştır. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak sunulmuştur (n=3). TCPS kontrol grubuna göre * $p<0,05$ ** $p<0,005$ anlamlı kabul edilmiştir. İkili gruplar halinde karşılaştırma yapılırken bağlantı çizgileri kullanılmış ve * $p<0,05$ anlamlı kabul edilmiştir. 104

Şekil 4.22 : Yara kapanma çalışmaları için gün bazında yaralardaki değişimi gösteren fotoğraflar (a) ve yara kapanma hızının zamana karşı değişimini gösteren grafik (b). Ölçek: 3 mm. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak sunulmuştur (n=3). TCPS kontrol grubuna göre * $p<0,05$ anlamlı kabul edilmiştir. Nano film_EGF (+) örneği Nano film örneğine göre yara kapanmasında anlamlı farklı bir performans göstermiştir. * $p<0,05$ anlamlı kabul edilmiştir. 105

| | |
|--|-----|
| Şekil 4.23 : Yara kapanma çalışmaları için kullanılan EGF katkılanmış nano (a) ve katkılanmamış (b) nano K:J filmlerin 10. gün sonundaki SEM görüntüleri. Ölçek: 50 µm. | 106 |
| Şekil 4.24 : Biyopsi örneklerindeki fibronektin miktarının analizi. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak sunulmuştur (n=3). Salin kontrol grubuna göre *p<0,05; sağlıklı dokuya göre #p<0,05 anlamlı kabul edilmiştir..... | 107 |
| Şekil 4.25 : Biyopsi örneklerindeki tirozinaz aktivitesinin (a) ve melanin miktarının (b) analizi. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak sunulmuştur (n=3). Salin kontrol grubuna göre *p<0,05; sağlıklı dokuya göre #p<0,05 anlamlı kabul edilmiştir. | 109 |
| Şekil 4.25 : Melanogenez ilişkili genlerin in vivo çalışmalar açısından 10 gün sonraki qPCR sonuçları. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak sunulmuştur (n=3). Salin kontrol grubuna göre *p<0,05; sağlıklı dokuya göre #p<0,05 anlamlı kabul edilmiştir. | 110 |
| Şekil 4.27 : Deri kesitlerinin 10. gün sonundaki H&E boyama görüntüleri. | 112 |
| Şekil 4.28 : Deri kesitlerinin 10. gün sonundaki Masson trikrom boyama görüntüleri. | 113 |

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

- Çizelge 3.1 : Deneysel olarak gözlenen ThT Raman titreşim modlarını ve bu modlara karşılık gelen dalga numaralarının gösterimi [67, 68]. Kısaltmalar: ν , gerilme; δ , düzlem içine eğilme; γ , düzlem dışına eğilme; ρ , düzlem içi katlanma, breath: gevşeme s, simetrik; as, asimetrik. 51
- Çizelge 3.2 : 10^{-5} M ThT modifiye Au@MDS spektrumlarından edinilen sinyal şiddeti, standart sapma ve CV değerleri. 53
- Çizelge 3.3 : 10^{-5} M MB modifiye Au@MDS spektrumlarından edinilen sinyal şiddeti, standart sapma ve CV değerleri. 53
- Çizelge 3.4 : Deneysel olarak gözlenen MB Raman titreşim modlarının ve bu modlara karşılık gelen dalga numaralarının gösterimi [166]. Kısaltmalar: ν , gerilme; α , düzlem içine halka deformasyonu; γ , düzlem dışına eğilme; β , düzlem içi katlanma 55
- Çizelge 4.1 : H&E boyama protokolü. *%70 ethanol içerisinde %5 asetik asit. 74
- Çizelge 4.2 : Masson trikrom boyama protokolü 75
- Çizelge 4.3 : Analizlerde kullanılan örnekler için oluşturulan lejant tablosu 92

KISALTMALAR

| | |
|--------------------------------|---|
| AAO | : Anodik alüminyum oksit |
| AFM | : Atomik kuvvet mikroskobu |
| ALD | : Atomik tabaka kaplama tekniği |
| ALP | : Alkalın fosfataz |
| Au@MDS | : 20 nm altın kaplanmış MDS |
| Aβ1-42 | : Amiloid β 1-42 |
| BCA | : Bikinkoninik asit analizi |
| BOS | : Beyin-omurilik sıvısı |
| CAAO | : İletken AAO |
| CAAO-E | : Elektrik uygulanmış iletken AAO |
| CV | : % RSD |
| DCM | : Diklorometan |
| DPS | : Düz polimer substrat |
| ECM | : Hücreler arası matriks |
| EGF | : Epidermal büyüme faktörü |
| ELISA | : Enzim bağlantılı immün test |
| FBS | : Fatal sığır serumu |
| FDTD | : Zaman domeninde sonlu farklar yöntemi |
| FTIR | : Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi |
| H&E | : Hematoksilin ve eosin |
| K:J | : Kitosan:Jelatin |
| L-DOPA | : L-3,4-dihidroksifenilalanin |
| MB | : Metilen mavisi |
| MDS | : Multi çatal desenli substrat |
| MTT | : 3- [4, 5-dimetiltiazol-2-il]-2, 5-difeniltetrazol bromür tuzu |
| NGF | : Sinir gelişim faktörü |
| NMR | : Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi |
| OCN | : Osteokalsin |
| OCT | : Optimal kesme sıcaklık bileşiği |
| ODTS | : Oktadesiltrimetoksisilan |
| OPN | : Osteopontin |
| PBS | : Fosfat tampon tuzu çözeltisi |
| PCR | : Polimeraz zincir reaksiyonu |
| PEGDE | : Poli etilen glikol diglisidileter |
| PK | : Polikarbonat |
| RSD | : Relatif standart sapma |
| RUNX2 | : RUNT ilişkili transkripsiyon faktörü 2 |
| SDS | : Silindir desenli substrat |
| SDS-PAGE | : Sodyum dodesil sülfat–poliakrilamid jel elektroforez |

| | |
|--------------|---|
| SEM | : Taramalı elektron mikroskobu |
| SERS | : Yüzey artırılmış Raman spektroskopisi |
| TCPS | : Doku kültürüne uygun polistiren |
| TeOS | : Trietoksisilane |
| ThT | : Tiyoflavin-T |
| TRP 1 | : Tirozinaz ilişkili protein-1 |
| TRP 2 | : Tirozinaz ilişkili protein-2 |
| TRY | : Tirozinaz |
| TSB | : Triptik soy agar |



1. GİRİŞ

Biyomedikal mühendisliği disiplinler arası bir bilim dalı olarak temelde canlı sağlığını ve canlıların etkileştiği ortamları sürdürülebilir bir biçimde iyileştirmeyi/optimize etmeyi amaçlar. Elektronik mühendisliğinden tıpa hatta sosyal ve beşerî bilimlere kadar pek çok alanla ortak paydaları bulunan bu alanın önemli paydaşlarından biri de malzeme mühendisliğidir. Malzeme mühendisliğinin biyomedikal mühendisliği ile kesişim noktalarından biri olan biyomalzeme alanı hastalıkların tanı ve tedavisine yön verecek gelecek nesil uygulamalara imkan sunmaktadır. Örnek olarak kemik hasarlarının hızlı ve kontrollü iyileşmesinde kullanılan titanyum ve alaşımlarından üretilmiş implantlar [1], sinir hasarlarının iyileştirilmesinde kullanılma potansiyeli olan iletken polimer iskeleler [2] ya da kontrollü ilaç salımına olanak sağlayan güdümlü ilaç taşıyıcıları [3] verilebilir.

Bu tez kapsamında seramik bir biyomalzeme sınıfı olan nanogözenekli anodik alüminyum oksit (AAO) membranlar fiziksel ve kimyasal özellikleri açısından incelenmiş ve bu malzemelerin doku mühendisliği ve biyosensörler alanlarındaki uygulamalarına örnekler verilmiştir. Bu doktora tez çalışması dört bölümden oluşmakta olup, AAO membranların doğrudan sinir-elektrot arayüzü olma potansiyellerinin araştırılması ile başlamış ve AAO membranların kalıp olarak kullanıldığı optik biyosensör uygulamasına ilaveten yine bu membranlar kullanılarak üretilen doğal polimer iskelelerin implant kaplama modeli ve melanizasyonu tetikleyici yara örtüsü olma potansiyelleri araştırılarak tamamlanmıştır. Tezin ilerleyen kısımlarında elde edilen veriler paylaşılmıştır.

1.1 Tezin Amacı

Bu tezin amacı, AAO membranların doğrudan ve kalıp olarak kullanıldığı doku mühendisliği ve optik biyosensör uygulamaları üzerinden AAO membranların fiziksel ve kimyasal özelliklerini analiz etmektir. Bununla ilintili olarak, bu tezin dört amacı bulunmaktadır ve bu amaçlar aşağıda maddeler halinde sunulmuştur.

- Tezin ilk amacı sinir dokunun rejenerasyonuna olanak verecek sinir gelişim faktörü (NGF) katkılanmış iletken AAO (CAAO) iskelelerin sentezlenmesi ve bu iskelelerin PC12 hücrelerinin farklılaşma, proliferasyon ve nörit gelişimi açısından davranışlarının incelenmesi amaçlanmıştır.
- Tezin ikinci amacı Alzheimer proteininin su ve yapay salya çözeltisi içerisinde tespitine yönelik multi çatal desenli substratların (MDS) ve silindir desenli substratların (SDS) sentezlenmesi ve bu yüzeylerin yüzey artırılmış Raman spektroskopisi (SERS) aktif yüzeyler olarak potansiyellerinin araştırılmasıdır. Bu çalışmada AAO membranlar kalıp olarak kullanılmıştır.
- Tezin üçüncü amacı nano kitosan:jelatin (K:J) filmlerin sentezlenmesi, nanotopografik etkinin ve film kaynaklı kimyasal etkinin kemik doku mineralizasyonuna etkisinin araştırılmasıdır. Bu çalışmada AAO membranlar kalıp olarak kullanılmıştır.
- Tezin son amacı epidermal büyüme faktörü (EGF) katkılanmış nano filmlerin sentezlenmesi, nanotopografik etkiye ilaveten EGF salımının in vitro ve in vivo koşullarda deri hücreleri ve ekzisyonel yara modellerindeki etkisinin araştırılmasıdır. Bu çalışmada AAO membranlar kalıp olarak kullanılmıştır.

Tez içerisinde sunulan çalışmaların özgün yönleri de ayrıca maddeler halinde bu kısımda sunulmuştur.

- Tezin ilk kısmında literatüre sinirsel gelişimi elektriksel, kimyasal ve fiziksel faktörler açısından bir arada kontrol edebilen bir substrat tasarımı tarafımızca ilk kez kazandırılmıştır. Bu bağlamda üretilen malzemenin patenti ile ilgili başvuru Türk Patent Enstitüsüne yapılmıştır (Başvuru numarası: 2014/00005).
- Tezin ikinci kısmında sunulan biyosensör uygulamasındaki yenilikçi yön tiyoflavin T ile modifiye edilmiş MDS ve SDS polikarbonat (PK) yüzeylerin amiloid β 1-42 ($A\beta$ 1-42) varlığını ve miktarını algılamada ilk kez kullanılacak olmasıdır.
- K:J filmlerle yapılan kemik doku çalışmasında doğal polimer iskeleler ilk kez kalıp sentez tekniği ile nanodesenli hale getirilmiş, bu filmler üzerinde oluşturulan bu tip bir topografinin kemik hücrelerinin mineralizasyonuna etkisi ilk kez araştırılmıştır.

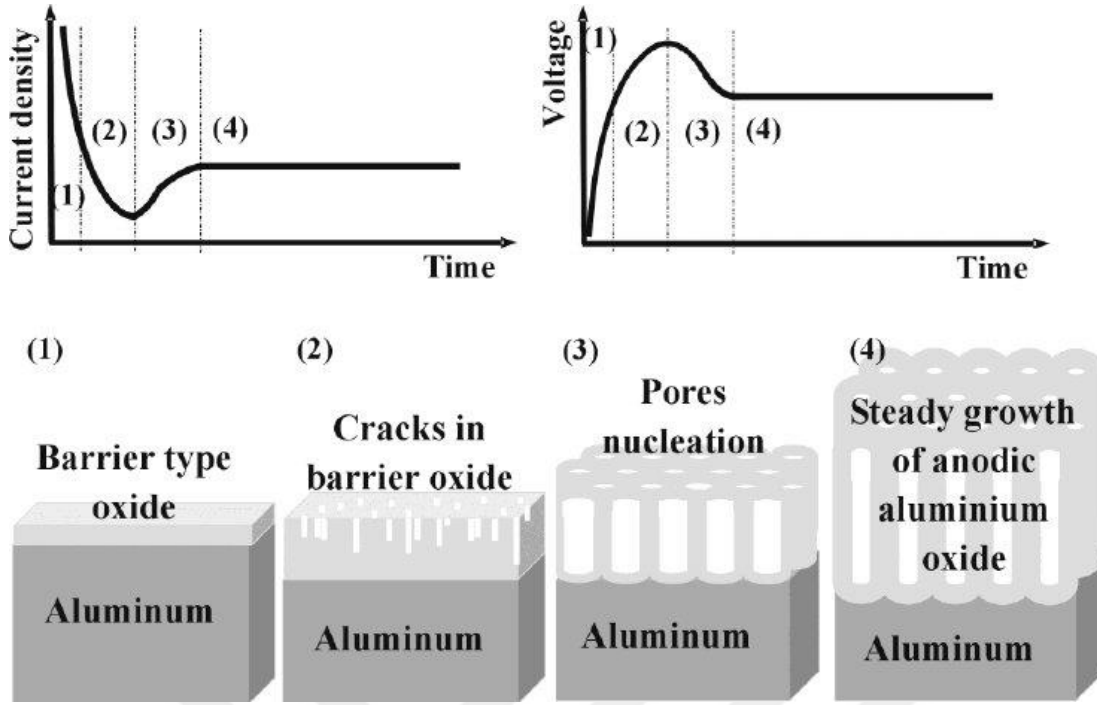
- Nano filmler ilk kez bu noktada EGF ile katkılanmış ve nanotopografik etkiye ilaveten yüzeylerden salınan EGF'nin deri hücreleri ve ekziyonel yara modelleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Ayrıca ilk kez fibroblastlar varlığında melanositlerin melanin sekresyon performansı incelenmiştir.

1.2 Literatür Araştırması

AAO membranlar yüksek saflıktaki alüminyum tabakaların elektrokimyasal tekniklerle kontrollü olarak oksitlendirilmesi sonucu elde edilir. Halihazırda, benzer özellikteki nano parçacıkların üretilmesi için bu yüzeylerin nano gözenekli ve düzenli yapısının kalıp olarak kullanıldığı çalışmalar yapılmaktadır [4-8]. Ayrıca AAO membranlar üzerine buharlaştırma ya da yüzeyden uzaklaştırma yöntemleri ile başka malzemelerin aktarılması suretiyle elde edilen nanotüpler, nanoçubuklar, nano özellikli yüzeyler, nano noktalar ile yapılan çalışmalar da mevcuttur [9-11]. Özellikle AAO membranların yüzeylerinde bulunan doğal nanotopografik yapı ve hücre/doku etkileşimine gittikçe artan bir ilgi mevcuttur [12].

Fiziksel özellikler açısından incelendiğinde, yüzeyler üzerindeki nanoyapıların gözenek çapının kullanılan asit cinsi, uygulanan potansiyel fark, sıcaklık ve elektrolitin derişimi gibi parametrelere bağlı olarak 50-400 nm arasında değiştiği görülmektedir. Bu parametrelere ek olarak anodizasyon süresi kontrol edilerek membran kalınlığını da kontrol etmek mümkündür. Oluşturulan nano yapıların düzenli dağılımı da başlangıç alüminyumunun yüzey pürüzlüğüne ilaveten bahsi geçen parametrelerle ilgilidir [13].

Fabrikasyon aşaması incelendiğinde, AAO membranlar 4 aşamalı bir süreç sonunda üretildikleri görülür (Şekil 1.1). İlk aşamada elektrokimyasal olarak temizlenen alüminyum tabaka üzerinde bariyer oksit tabaka oluşmaktadır. Bu oluşum sırasında hızla akım yoğunluğu düşerken eş zamanlı olarak voltaj artar. Sonrasında bariyer oksit tabakada akım yoğunluğunun düşme hızının azalması ve voltaj artma hızının artmasıyla bariyer tabakada çatlaklar oluşur. Üçüncü aşamada ise akım yoğunluğunun artması ve voltaj değerlerinin azalmasına binaen gözenek başlama noktalarının oluşumunu gerçekleştirir. Son aşamada ise akım yoğunluğu ve voltaj arasında bir denge durumu oluşur (steady state) ve gözenek oluşumları görülmeye başlar [14].



Şekil 1.1: AAO membranların üretim mekanizması [14].

Bu yüzeylerin doku mühendisliği uygulamaları açısından gelecek vadede yönlerinin olduğundan literatürde sıklıkla bahsedilmektedir [12, 14-16]. AAO membranların biyouyumlu yapıları, hücreler arası makriks (ECM) ile benzer morfolojileri ve üretildikleri asit kaynaklı kazandıkları iyonik karakter [17] kemik doku mühendisliği çalışmaları açısından detaylı incelenmesi gereken bir noktadır [1]. Ayrıca iletken tabakalar ile kaplanmaları sonucu elektriksel iletkenlik kazandırılması mümkün olan bu yüzeylerin sinir doku mühendisliği çalışmalarında kullanımları da mümkündür [18, 19].

Bu membranların doğrudan kullanımlarının yanında kalıp olarak kullanıldığı polimer temelli çalışmalarda mevcuttur. İlgili çalışmalarda taklit edilen gözenek yapısının avantajlarından faydalandığı görülmektedir. Organik güneş pillerinde artan yüzey alanı kaynaklı performans artışı [20] veya biyosensör teknolojilerinde kullanılan yüzeylerin alanlarının artması ile istatistiksel olarak anlamlı şekilde artan ve/veya hassaslaşan sinyal değerleri [21, 22] bu membranların kalıp olarak kullanımının önemine vurgu yapmaktadır. Bunların dışında doku mühendisliği çalışmalarında da artırılmış yüzey alanına sahip polimer iskelelerin düz iskelelere nazaran anlamlı farklı sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir. Örneğin, deri doku mühendisliğinde çalışılan yara örtülerine alternatif nanotopografiye sahip doğal polimer iskelelerinin sentezlenmesi de mümkündür [23]. Bu noktada hızlı yara iyileşmesini tetikleyecek etmenlerden

faydalanarak üretilen yüzeylerin aynı zamanda kontrollü ilaç salımına olanak veren yüzeyler olması sağlanabilir. Mevcut durumda ticarileşmiş kitosan yara örtülerinin performanslarını artırmaya yönelik olarak nanoteknoloji ve ilaç salımı teknolojilerinden faydalanmanın mümkün olabileceği düşünülmektedir [23-26].

1.2.1 Sinir-elektrot olarak AAO membranlar

Sinir doku mühendisliği açısından bakıldığında bu yüzeylerin gelecek vadeden yönlerinin olduğu düşünülmektedir. Hali hazırda 40 yıldır kalça implantlarında kullanılan bu seramik malzemenin kemik doku üzerindeki etkileri günümüzde yoğunlukla araştırılmaktadır [12]. Kimyasal ve topografik özelliklerinin kontrol edilebilir olmasına ek olarak bu yüzeyler üç boyutlu yapıları sayesinde ilaç [14], gelişim faktörü [27] ya da nanoparçacıkların [28] salımına olanak vererek kemik hücre davranışını kontrol edebilmektedir. Kemik doku dışında kalan epitel, kas, kan ve sinir doku kökenli hücre hatları ile tutunum, proliferasyon testleri ve filopodyum gelişiminin takibi gibi çalışmalar yapılmaktadır [12]. Sinirsel hücre hatlarının AAO membranlar üzerindeki davranışları genel olarak membranların topografi ve kimyası üzerinde yoğunlaşmaktadır [29, 30]. Ancak bazı çalışmalarda hücre sinyallerinin kontrolü ve gelişimi için AAO ile modifiye edilmiş silikonlar [31, 32], birbirini tamamlayan metal oksit yarı iletkenler [33] ve altın elektrot yüzeyler [34] kullanılmıştır. Ortopedik implant yüzeylerin modifiye edilmesi ile benzer mantıktan dolayı, AAO membranlarla kaplanmış nöroelektrotlar üzerinde hücre tutunumu ve hücre sinyal kapasitesi artacaktır.

İleri seviye nöroimplantlardaki bir diğer önemli özellikte sinir doku rejenerasyonunu tetiklemeleridir [35-37]. Literatürdeki pek çok çalışma elektrik uyarımının sinir doku rejenerasyonunu hızlandırabildiğini başarılı bir biçimde göstermiştir. İletken polimer yapı iskeleleri [2, 38] ve karbon nanotüpler [39, 40] sinirsel dönüşümde istenilen gelişimin elde edildiği yeni yüzeyler olarak literatüre kazandırılmıştır. Son olarak, yakın geçmişte yapılmış NGF salımına olanak veren nöroimplantların sinirsel dönüşümü tetiklediği gösterilmiştir [41].

Literatür incelendiğinde sinir gelişimini tetikleyici yüzeylerin elektriksel, kimyasal ve topografik faktörler açısından ayrı ayrı analiz edildiği görülmüştür [2, 42, 43]. Ancak bu substratların hücresel gelişimi tam anlamıyla kontrol edebilmesi için bahsi geçen üç faktörü aynı anda üzerinde taşıyan bir substrat üzerinde çalışılması gerekmektedir.

Bu bağlamda önceki çalışmalarımızda ürettiğimiz CAAO membranlar iyi birer aday olabilirler [18]. Üretilen ilekten AAO membranlar üç boyutlu gözenek yapıları nedeniyle bir takım büyüme faktörlerini, hormonları ya da farklı molekülleri taşıma ve kontrollü biçimde salma potansiyeline sahiptir. Elektriksel iletkenliğin yanında ayrıca membranların yüzeyindeki kontrol edilebilir topografide hücrel cevap açısından önemlidir [44]. Dolayısıyla ilgili faktörler açısından karakterize ettiğimiz yüzeylerin sinir gelişimini tetikleyici bir elektrot modeli olma potansiyeli mevcuttur.

1.2.2 Biyosensör teknolojisinde AAO membranlar

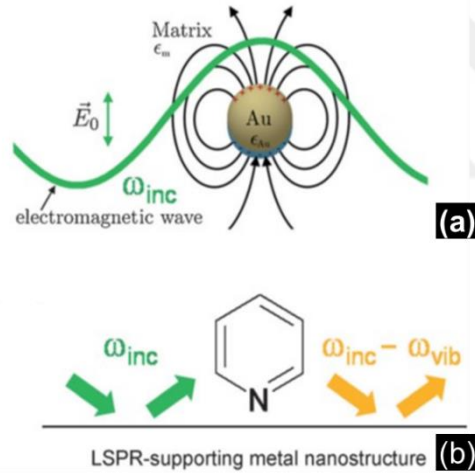
AAO membranlar kullanılarak elde edilen nano yapıların optik sensör teknolojileri açısından gelecek vadettiği düşünülmektedir [45]. Bu kapsamda tezin biyosensör uygulamaları ile ilgili kısmında SERS kullanılmıştır. Litografi tekniklerine [46] alternatif damla yayma yöntemi ile geniş alanlarda ergonomik olarak sentezlenmiş nanodesenli polimer SERS yüzeyleri ile Alzheimer hastalığına yönelik proteinlerin tespit edilmesine yoğunlaşmıştır.

Topografik özellikleri üretim sürecinde ve sonrasında kontrol edilebilir olan AAO membranların kalıp olarak kullanıldığı çalışmaların genel itibariyle optik ve arayüz (hidrofiliklik v.b) alanlarında yoğunlaştığı görülmüştür [47-49].

Yüzeye dik olarak uzanan (kolon yapısı) ve düzgün sıralı tek düze gözenekler ile üretilen AAO membranların yüzey özellikleri bir takım kimyasal uygulamalarla modifiye edilebilir. Örneğin, doğal halleri hidrofilik olan membranlar silan kimyası kullanılarak uzun hidrofobik gruplarla kaplanabilir ve kalıp olarak pekçok kez kullanımları mümkün olmaktadır [22, 45]. Dolayısıyla bu yüzeyler kullanılarak üretilen sıralı nano yapılara sahip polimer filmlerin optik sensör uygulamalarında kullanımları mümkündür. Optik sensörlerin çalışma alanlarından biri de SERS teknolojisidir.

SERS çalışmalarında normal Raman çalışmalarında bulunan bileşenlere ek olarak metal kaplı bir yüzey bulunması gerekir. Dolayısıyla SERS teknolojisinin daha iyi anlaşılabilmesi için molekül – ışık etkileşiminin yanında metal – ışık etkileşiminin de incelenmesi gerekir. Metallerin optik özellikleri fiziğin bir alt dalı olan plazmonik alanında incelenir. Bu terim metallerdeki osile olmuş iletim elektronlarının fotonlar ile olan etkileşimi anlatır. Metal nanoparçacık yüzeyine çarpan lazer, doğru frekansta ise metal yüzeyindeki iletim elektronlarının toplu (collective) osilasyonunu uyarır. Bu

rezonansın frekansı metal ve ortamın dielektrik fonksiyonlarına bağlıdır. Gümüş ve altın koloitler için plazmon rezonans aralığı görünür bölgededir. Bu sebeple bu metaller optik frekanslarda uyarılabilirler. Küresel bir altın parçacık üzerine elektromanyetik bir dalga yollandığında yüzey yükleri ayrışır. Bu tip bir rezonans lokalize yüzey plazmonlarının rezonansı olarak adlandırılır (LSPR) [50, 51]. Bu yük ayrımına bağlı olarak metal nanoparçacık üzerinde Şekil 1.2’de gözlenen etkin elektrik alan oluşur ve buna bağlı olarak bir nanoanten ortaya çıkar. LSPR ile desteklenmiş metal yüzey üzerindeki moleküllerde gerçekleşen titreşimler molekül üzerindeki elektron dağılımını değiştirir ve bu titreşim modları artmış olan elektrik alanın etkisiyle çok daha güçlü Raman sinyalleri olarak karşımıza çıkar [51]. Metal nanomalzemedede oluşan bu LSPR olgusu, pek çok yüzey artırılmış spektroskopi tekniğinde [52-55], kataliz çalışmalarında [56, 57], plazmonik güneş hücrelerinde [58] veya biyo uygulamalar için üretilen nanoyapılı malzemelerde [59, 60] sıklıkla kullanılmaktadır.



Şekil 1.2: SERS yüzeylerinde gerçekleşen elektromanyetik artırma (a) Altın nanoküre LSPR etkisi ile bir nanoanten gibi davranır. (b) Gelen (yeşil) ve giden (turuncu) alan LSPR etkisi ile desteklenmiş nanoküre yüzeyinden elastik ışık saçılımı ile artırılabilir [51].

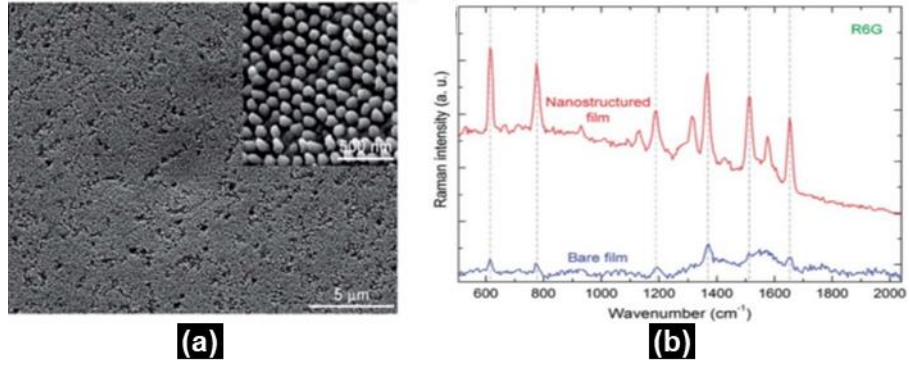
SERS çalışmalarında moleküllere özgü sinyallerin yüksek çıkmasında literatürde kimyasal ve elektromanyetik artırma mekanizmalarından sıklıkla bahsedilmektedir. Bu artırma mekanizmaları kullanılarak fM seviyede biyolojik moleküllerin tespit edilebildiği gösterilmiştir [61]. Metal kaplı plazmonik yüzeylerde elektromanyetik artırma faktörü daha baskındır. SERS şiddeti (I_{SERS}) doğrudan gelen (ω_{inc}) ve giden ($\omega_{inc}-\omega_{vib}$) dalganın frekansına bağlıdır. Yüzeydeki elektrik alan dağılımı (E) da

frekansın bir fonksiyonudur ve elektrik alan şiddeti ile ilgili dalgaların frekansa bağlı fonksiyonları arasında üssel bir ilişki mevcuttur (Eşitlik 1.1).

$$I_{SERS}=I_{inc}(\omega_{inc}).I(\omega_{inc}-\omega_{vib}) = |E_{inc}(\omega_{inc})|^2 |E(\omega_{inc}-\omega_{vib})|^2 \quad (1.1)$$

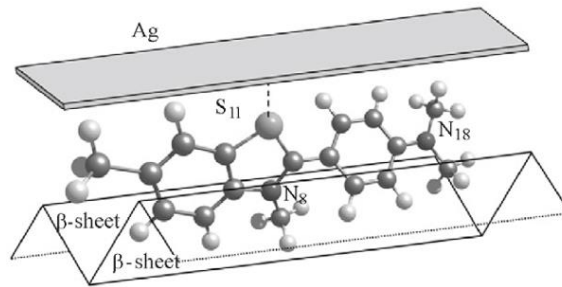
Dolayısıyla optimal SERS sinyali artması gelen ışının ve Stokes Raman kayması sonrası oluşan ışının metal yüzeydeki plazmon noktası ile rezonans halinde olması sayesinde gerçekleşir. (ω_{inc}) ve $(\omega_{inc}-\omega_{vib})$ birbirine çok yaklaştığında yani rezonans durumu gerçekleştiğinde $|E|^4$ yaklaşımı SERS sonuçları için kabul edilebilir olur. Bu noktada yüksek bölgesel elektrik alanında SERS sinyali şiddetinde Raman sinyali şiddetine göre daha fazla artma gözlemlenir. Örneğin $E_{loc}/E_{inc}=10^2$ olduğunda SERS'teki sinyal artışı elektromanyetik bu mekanizma nedeniyle $(10^2)^4 = 10^8$ olarak gözlemlenir. Başka bir deyişle E_{loc}/E_{inc} oranında meydana gelen küçük bir değişim SERS sinyallerinde büyük bir karşılık bulur.

SERS çalışmalarında moleküllerin metal kaplı yüzeye etkileşimi kadar yüzeyin morfolojik özellikleri de önemlidir [62]. Literatürde bulunan pek çok çalışmada farklı nanoyapıdaki yüzeylerin SERS sinyalleri üzerine olan etkisinden, özellikle birbirine mesafesi kontrol edilen metal nanomalzemeler arasında çok daha etkin oluşan elektrik alan faktöründen (hot spots) bahsedilmektedir. Örneğin Dağlar ve ark. tarafından yapılan çalışmada yeniden üretilebilir, hassas ve geniş alanlı SERS substratlarının üzerine yoğunlaştırılmıştır [63]. Yapılan çalışmada damla yayma yöntemi kullanılarak nanomotiflendirilmiş silikon kalıpların polimer ile dolması sağlanmış ve gümüş ile kaplanan bu biyoesinlenilmiş yüzeylerin antiyansıtıcı özelliklerinin yanında SERS sinyallerine olan etkileri de araştırılmıştır. Rodamin 6G (R6G) molekülü kullanılarak düşük konsantrasyonlarda yapılan çalışmalarda nano özellikli polimer yüzeylerde SERS sinyallerinin düz yüzeylere göre $4,9 \times 10^6$ kat daha iyi çıktığı tespit edilmiştir [63] (Şekil 1.3). Burada nanoanten olarak kullanılan polimer nanoçubuklar üzerine kaplanan gümüş nanobaşlıkları arasındaki uzaklık, gümüş kaplama süresi vasıtasıyla optimize edilmiş ve böylece etkin sıcak nokta oluşumu sağlanmıştır. Yine başka bir çalışmada kalp krizinin ön habercisi olan miyogloblin proteininin SERS vasıtasıyla tespiti üzerine çalışılmış ve gümüş parçacıklarla motiflendirilmiş yüzeydeki miyogloblin sinyallerinin daha yüksek çıktığı tespit edilmiştir [64].



Şekil 1.3: Nanodesenlenmiş silikon yongalar kullanılarak damla yayma yöntemiyle üretilen 40 nm gümüş ile kaplanmış polimer yüzeylerin taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüsü (a). 10^{-7} M R6G ile modifiye edilmiş düz ve desenlenmiş polimer yüzeyin SERS ölçümleri (b). Nanoyapılı filmde yüksek SERS sinyallerinin elde edilmesi, yüzey morfolojisine bağlı olarak oluşan plazmonik özellikli sinyal artırıcı noktalar (hot spot) ile ilgilidir [63].

Çalışmamızda tanıyıcı tabaka olarak kullanılan tiyoflavin-T (ThT)'de SERS çalışmalarında sıklıkla kullanılan ve senil dönem A β 1-42 plaklarının tespitinde kullanılan floresan bir boyadır. Bu boyanın floresan yoğunluğu A β 1-42 plakları ile etkileştiğinde artmaktadır [65, 66]. Dahası metal yüzeylere kovalent olarak bağlanabildiğinden karakteristik ThT sinyallerinin SERS çalışmalarında tespiti mümkün olabilmiştir [67-69]. ThT'nin β tabakalarla olan bağlanma mekanizması incelendiğinde literatürde pek çok model olduğu ancak yaygın kanı ThT moleküllerinin β tabakalar bakımından zengin fibrillerin arasına girdiği görüşüdür. N8 ve N18 bölgelerinden ThT'nin peptitler ile etkileşim kurduğu ve molekülün üzerindeki benzilamin ve benziltiazol halkasal yapılarının bu vasıta ile dönme kabiliyetlerini kaybettikleri düşünülmektedir. Bunun bir sonucu olarak ayrıca molekül uyarılmış halde kalmakta ve floresan sinyal şiddeti artmaktadır [69]. İlaveten, ThT yapısında bulunan S11 atomu sayesinde metal yüzeylere immobilize olabilmektedir [69] (Şekil 1.4).



Şekil 1.4: Thioflavin – T molekülünün A β 1-42 tabakaları ve metal yüzeyler ile olan etkileşiminin şematik gösterimi [69].

Kısaca Alzheimer hastalığı ile ilgili güncel verilerden de bahsetmek gerekirse Alzheimer hastalığı, demans kaynaklı nörodejeneratif bir hastalık olup, beynin hipokampus ve serebral korteks bölgelerinde dönülmez hasarların oluşmasına neden olmaktadır. Hastalığın seyri izlendiğinde ileri dönem hastalarda ön bellekte hafıza kayıpları, öz bakım becerilerinin kaybedilmesi, anksiyete gibi belirtilerin olduğu gözlemlenmiştir [70]. Yine hasta yakınları ile yapılan görüşmelerde hastalığın kişi ve ailesi üzerindeki olumsuz etkisi ortaya konulmuştur [71]. 2015 yılı “Alzheimer Raporu”na göre, gelecek 50 yılda Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklar üssel olarak artış gösterecektir [72]. Bu nedenle pek çok çalışma grubu bu hastalıkların mekanizmaları üzerinde çalışmakta, erken teşhisin nasıl yapılabileceğini, hastalıklara nasıl bir tedavi getirilebileceğini araştırmaktadır [70, 73].

Alzheimer hastalığı ile ilgili yapılan araştırmalar dikkate alındığında A β 1-42 peptitlerinin beyinde tabakalar halinde birikim yaptığı ve vücut sıvılarından belli oranlarda tespit edilebildiği ortaya çıkmaktadır [74]. Kan, salya, idrar veya beyin omurilik sıvısından (BOS) alınan numuneler içindeki ilgili peptit, Enzim bağlantılı immün testler (ELISA), polimeraz zincir reaksiyonları (PCR) gibi pahalı ve yüksek uzmanlık gerektiren yöntemler ile tespit edilmeye çalışılmaktadır [74-77]. Ayrıca bu yöntemler hastalığın ilerleyen dönemlerinde kullanıldığından hastalığın seyri açısından geç kalınmış olmakta ve en azından hastalığı geciktirici önlemlerin alınması, hasta konforunun sağlanması gibi hususlar tam anlamıyla sağlanamamaktadır. Ek olarak, erken dönemde başlatılan tedavi sürecinin takibi açısından da yüksek hassasiyetle testlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Erken teşhisin önündeki engellerden birisi A β 1-42 peptitlerinin vücut sıvıları içerisindeki düşük konsantrasyonlarda bulunmasıdır. Kan gibi kompleks ve büyük hacimli bir dokuda çok az miktarda bulunan bu peptitler, hastalık ilerlediğinde ancak tespit edilebilmektedir. Bununla birlikte peptitin tespiti amacıyla BOS seçimi ise, hasta konforu ve operasyon riskleri açısından sorgulanabilir bir noktadadır. Salya temelli bir tespit yönteminin seçilmesi hem hasta refahı hem de uygulama kolaylığı açısından avantajlı bir konumdadır. Ancak bu noktada literatür incelendiğinde normal bir bireyin salyasındaki Alzheimer proteininin $2,89 \pm 4,96$ pg/ ml seviyesinde olduğu hastalık ilerledikçe bu değer ancak $11,70 \pm 34,76$ pg/ ml ye kadar çıkabildiği görülmüştür [78]. Dolayısıyla salya temelli olarak oluşturulacak bir tanı test modelinde ne tür bir

tespit yönteminin kullanılacağı iyi araştırılmalıdır. Literatür incelendiğinde A β 1-42 peptitlerinin optik yöntemlerden elektrokimyasal tekniklere kadar pek çok teknik kullanılarak tespit edildiği nanobiyosensör platformlarının çalışıldığı görülmüştür. Bu sistemlerin bir özeti yapılan derlemede sunulmuştur [79]. Bu sistemlerden biri de neredeyse tek tabaka molekül tespitine olanak veren ve optik bir yöntem de daha önce detaylandırdığımız SERS tekniğidir.

1.2.3 İmplant kaplama teknolojilerinde AAO membranlar: Doğal polimer iskelelerin nanodesenlenmesindeki avantajlar

Titanyum ve alaşımları biyouyumlu doğaları, uygun mekanik özellikleri, yüksek korozyon dirençleri nedeniyle implant olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Bu malzemelerin biyouyumlulukları kimyasal kompozisyonları ve üzerlerinde taşıdıkları doğal oksit tabakası ile ilişkilidir. Ancak, bu oksit tabaka alüminyum, vanadyum gibi toksik metallerin salımını engelleyecek potansiyele sahip değildir [1]. İmplantlardan salınan bu metallerin Alzheimer, retina dejenerasyonu, her iki cinsiyet içinde uzun dönemli fertilitate problemlerine neden olduğu rapor edilmiştir [1-3]. Ek olarak, osteokondüktivite karakteri sınırlı olan bu oksit tabakanın yetersiz osteointegrasyon nedeniyle kemik doku ve implant kayıplarına neden olduğu rapor edilmiştir [4]. Bu olumsuzlukların üstesinden gelebilmek ve osteojenik rejenerasyonu tetikleyebilmek adına kimyasal ve topografik olarak kemik ekstrasellüler matriksini (ECM) taklit eden organik ya da inorganik orijinli implant kaplama modelleri önerilmiştir.

Hidroksiapatit (HA) ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$) kemik ECM'sinin baskın komponentlerinden biridir ve sıklıkla inorganik implant kaplama modeli olarak kullanımları mevcuttur. Metal yüzeyler üzerindeki HA kaplama modelleri biyouyumlu doğaları, biyoaktif ve osteokondüvitteyi tetikleyici yapıları ile doğal oksit tabakalara nazaran ümit verici sonuçlar vermiştir [5]. Bu olumlu özelliklerine rağmen, yüksek maliyetli kaplama prosedürleri (plazma sprey, iyon demeti ile biriktirme) ve enfeksiyon/inflamasyon temelli implant ve kemik doku kayıpları HA kaplama modellerinin kullanımını sınırlamaktadır. Bakterilerin Ca^{2+} iyonlarınca zengin HA yapılarına olan ilgisinin, kaplamaların bakterisidal özelliklerini zayıflattığı düşünülmektedir. Alternatif olarak, kaplama stratejilerinde organik matrikslerden (doğal polimerler veya proteinler) faydalanabileceği pek çok araştırma grubu tarafından rapor edilmiştir [6-8]. Örneğin, Liu ve arkadaşları kemik morfojenik protein-2'yi (BMP-2) kök hücre farklılaşması ve

osteoblast rejenasyonunu göstermek için implant kaplama modeli olarak başarılı bir biçimde kullanmıştır [6]. Biyolojik moleküllere ek olarak, kemik-implant etkileşimi artırmak için polimer temelli kaplama modelleri de önerilmektedir. Optimum osteointegrasyon sağlanabilmesi için ECM benzeri bir topografinin oluşturulmasının yanında seçilen polimer veya polimer karışımının (blend) ne olacağı da büyük önem kazanmaktadır. Bu tip çalışmalar için literatürde sıklıkla poli (D, L-laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) kopolimeri [9], polilaktik asit (PLA) [6] veya nano-HA/kitosan karışımları biyobozunur doğaları [7] gereği tercih edilmektedir.

Kitosan bol bulunurluk, biyouyumluluk, biyobozunurluk ve antibakteriyel özellikleri nedeniyle doku mühendisliği uygulamalarında sıklıkla tercih edilen bir biyopolimerdir. Bunların yanında hiyalünoik asit benzeri doğası nedeniyle de hücresel aktiviteler açısından büyük avantaj sağlamaktadır [80]. Kitosanın bu özellikleri doku mühendisliği uygulamalarında sık kullanılan bir biyomalzeme olmasına sebep olmuştur [81, 82]. Bu çalışmalarda kitosana membran [83], yapışkan [84], hidrojel [85], fiber [86], mikroküre [87] veya gözenekli iskele [88] formlarında rastlamak mümkündür. Ayrıca kitosanın pek çok biyomolekülün yüzeyine yapışmasına izin veren pozitif yüklü kimyasının yanında büyüme faktörlerinin salgılamasını kolaylaştırıcı bir yönü de vardır [89, 90]. Ancak yumuşak doku hücreleri ile kitosan üzerinde yapılan çalışmalarda hücre tutunumunun ve migrasyonunun zayıf kaldığı rapor edilmiştir [91-93]. Bu durumdan kurtulmak amacıyla literatürde kitosanın jelatin ile karıştırılarak kullanılması gerektiği rapor edilmiştir [94]. Jelatinin hücre tutunumunu artıracak etkide RGD sekansı taşıması ve kitosanın antibakteriyel özellikler göstermesi bu kombinasyonunun doku mühendisliği açısından potansiyeli olduğunu göstermektedir [92, 95]. Kitosan-jelatin karışımı düz filmlerde keratinosit-fibroblast hücre hatları birlikte kültürleme tekniği ile çalışılmış ve hücre yayılımının son derece uyumlu olduğu gözlemlenmiştir. Hatta bu filmlerin fibroblast çalışmaları için en uygun filmlerden biri olduğu rapor edilmiştir [26].

Güncel klinik uygulamalar takip edildiğinde kitosan, jelatin ve polaksamer karışımlarının yapışkanlık özellikleri kontrol edilerek jinekolojik hastalıklarla ilgili ameliyatlarda kullanıldığı veya meme kanserinde doku diseksiyonu sonrası bariyer membran olarak ilgili bölgeye yerleştirildiği çalışmalar mevcuttur. Bunun dışında kan akışını engelleyici yamalar ya da yara örtüsü olarak kullanımı da mevcuttur [24, 87, 96].

Kimyasal olarak incelendiğinde yapısındaki D-glikozamin ve N-asetil-D-glikozamin gruplarında var olan amin ve hidroksil grupları kitosanı biyoyumlu bir çevre haline getirmektedir. Ancak bu tarz aktif gruplarca zengin bir polisakkaritin nano boyutta desenlenmesinde birtakım problemlerle karşılaşmaktadır. Bu noktada çapraz bağlayıcılar (guluteraldehit, formaldehit, poli etilen glikol diglisidileter (PEGDE), sodyumtrifosfat vb.) veya başka polimerlerle (jelatin, polietilen glikol) katkıyla stabilite artırılmaya çalışılmaktadır. Ancak halihazırda literatürde kalıp sentez tekniği kullanılarak K:J karışımının nanodesenlenmesi çalışmaları ile karşılaşmamıştır. Bu tip bir desenlemenin hücre rejenerasyonunu ve sekresyonunu tetikleyici potansiyelde olacağı düşünülmektedir [97].

Nanoyapılar bakımından zengin (50-500 nm çaplarındaki kolajen fiberler) kemik doku ECM yapısı taklit edilerek üretilen kaplama modellerinin optimum osteointegrasyona etkisi de güncel araştırma konuları arasında yerini almıştır. Literatürde hücre tutunumu, farklılaşması veya osteointegrasyon/osteorejenerasyon kavramları üzerinden ilgili malzemeler üzerinde artan hücresel cevap tartışılmaktadır [98, 99]. Hücre sinyallerini tetikleyici arayüz (interface) malzemelerinin sentezlenmesinde elektroçizme, litografi, anodizasyon ve kalıp yaklaşımları gibi çeşitli teknikler kullanılmaktadır [22, 100-102]. AAO membranlar hegzagonal sıralanmış nanogözenekli yapısı ve kontrol edilebilir topografik parametreleri ile pek çok biyomedikal uygulamada alüminyumdan arınmış membran formunda [14], farklı bileşenlerle modifiye versiyonlarda [19] ve ayrıca implant kaplama malzemesi [103] olarak kullanılmaktadır. Bu bağlamda ilgili morfolojinin nanotopografik olarak doğal polimer yüzeyine aktarımında hücresel cevap açısından olumlu sonuçlar doğuracağı düşünülmektedir.

1.2.4 Yara örtü modelleme teknolojilerinde AAO membranlar: Doğal polimer iskelelerin nanodesenlenmesindeki avantajlar

Kitosan ve jelatin iskelelerin sıklıkla tercih edildiği bir diğer alan yara örtüleridir. Deri doku mühendisliği derideki kendiliğinden tamiri mümkün olmayan hasarların tedavisi ile ilgilenir. Bu noktada derinin iyi tanınması ve yaralanmalarda uygun iyileştirme stratejilerinin geliştirilmesi üzerine yoğunlaşılması gerekmektedir. Kısaca deri dokunun elemanlarından ve bu elemanların fonksiyonlarından bahsetmek gerekirse, deri immün sistemin ilk bariyeri olarak adlandırılmakta ve dıştan içe doğru epidermis,

dermis ve hipodermis tabakalarından oluşmaktadır. Epidermis tabakası keratinosit, melanosit, Langerhans ve Merkel hücrelerini yapısında taşımaktadır. Keratinositler deri dokunun mekanik dayanımını sağlayan keratini salgılayarak, melanositler UV ışığın absorpsiyonundan, yansıtılmasından ve oksidatif serbest radikallerin temizlenmesinden sorumlu melanin pigmentlerini salgılayarak dokudaki tonlamayı sağlamaktadırlar. Ayrıca melanositler melanosomlar aracılığı ile keratinosit hücrelerine melaninin aktarımını sağlar ve bu hücrelerin genetik materyalini UV ışınlarına karşı korurlar. Epidermis tabakasındaki Langerhans hücreleri immünolojik denetimden sorumlu iken Merkel hücreleri sensör reseptörlerini taşımaktadır. Keratinosit hücreleri dışında fibroblast ve Langerhans hücreleri de melanosit hücrelerinin aktivitesini düzenlemede görevlidir [104, 105]. Dermis tabakası ise deriye elastikiyet ve dayanım kazandıran kolajen, elastin ve fibrilin gibi yapılardan oluşan kalın bir tabakadır. Bu tabaka aynı zamanda kıl köklerini, kan damarlarını, ter bezlerini ve sinir uçlarını da içerir. Kas ve deri arasında bulunan hipodermis tabakası ise fibroblast ve adiposit hücrelerince zengin, deriye kan ve sinir hücrelerinin iletilmesinden sorumlu geçiş tabakasıdır [106]. Deri bu çok katmanlı yapısı ile vücudun en büyük organı olmasının yanında fazla ısının vücuttan atılması, suyun vücutta tutulması, kimyasal ve mekanik etkilerin vücuda zarar vermemesi gibi pek çok hayati fonksiyona da sahiptir. Bu organın çeşitli katmanlarında genetik, akut travma, kronik yaralar ve ameliyat sonrası yaşanan kayıplar enfeksiyonlarla hatta ölümlerle sonuçlanabilmektedir [107, 108].

Deri yaralanmaları epidermal ya da tam derinlikli olabilir ve tedavi süreci bu derinliklere göre şekil alır. Örnek vermek gerekirse güneş yanıkları daha çok epidermal yaralanmalar sınıfına giren az ağrılı yaralanmaların, rejeneratif epitel dokunun tamamen bozulduğu 3. derece yanıklar tam derinlikli yaralanmalara girmektedir [107].

Yara iyileşme süreci normal bir yaralanma açısından incelendiğinde hemostas, inflamasyon, mezenkimal hücre farklılaşması, proliferasyonu ve göçü, anjiyogenez, hızlı yeniden epitelizasyon, hücreler arası matriks (ECM) bileşenlerinin yaranın mekanik özelliklerinin iyileştirilmesi amacıyla salımı aşamaları ile karşılaşılır [109]. Ancak diyabet ülserleri, bası yaraları gibi kronikleşme eğiliminde olan yaraların davranışları incelendiğinde iyileşme sürecinin genellikle epitelizasyon aşamasında sekteye uğradığı gözlemlenmiştir ve bu durum sistemik enfeksiyona yol açabilmektedir. Yara temizliği, beslenme gibi hastaya bağlı etkenlerin yanında,

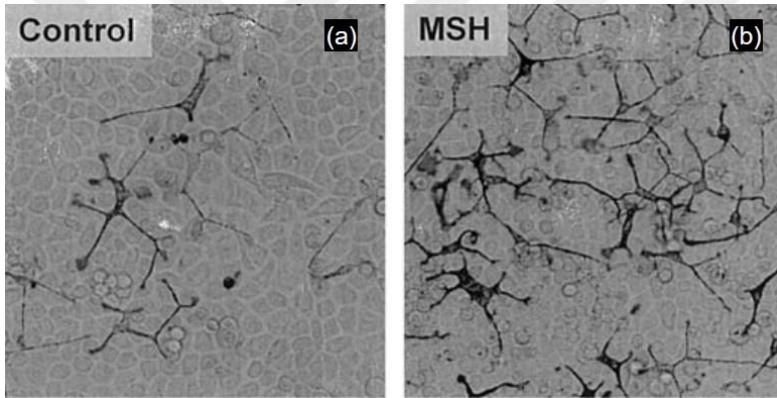
büyüme faktörlerinin yara bölgesinden salımının azalması, salınan faktörlerin proteazlar tarafından parçalanması, yetersiz ECM oluşumu, metalloproteinlerin yara dokusunda aşırı bir biçimde tanınmasıyla ECM yıkımının hızlanması ve yaşlanmış hücrelerin proliferasyon kabiliyetini kaybetmesi gibi etmenlerde dokuların iyileşmemesinde önemli etkenlerdir [110, 111].

Yara iyileşme sürecinde karşılaşılan bir diğer sorun bölgenin eklem esnekliğini engelleyecek biçimde oluşan yara dokusu ve bu dokunun medikal, kozmetik ve sosyal açıdan büyük sorunlar oluşturan heterojen renk dağılımıdır. Yara örtüsü olarak kullanılacak materyalin aynı zamanda melaninin salımını da tetiklemesi beklenmektedir [112]. Yara iyileşme sürecinde yara merkezine doğru artan hipopigmente bölgelerin güneş ışığının zararlı etkilerini absorbe etme kabiliyetinin azalması ile birlikte bu bölgelerde çeşitli yanıkların, deri kanserlerinin oluşabileceği rapor edilmiştir [113]. Doğal ortamında keratinositler içerisinde filopodialar uzatarak yayılan melanosit hücrelerinin keratinositler varlığında daha yüksek verimle melanin ürettiği ve melanosomların transferinin gerçekleştirilebildiği gösterilmiştir [114]. Bu durum 3 boyutlu bir ortamda melanositlerin daha aktif çalışabileceğini göstermektedir [115].

Başka çalışmalarda ise palmoplantar fibroblastlar varlığında melanosit aktivitesinin düştüğü diğer kısımlardaki fibroblastların ise melanosit aktivitesini artırdığı rapor edilmiş hatta konu ile ilgili embriyonik dönem çalışmalarına literatürde yer verilmiştir [116, 117]. Yaralanmalar sırasında ortamda bulunan fibroblastların da yara iyileşmesinin tetiklenmesi için gerekli olan ECM bileşenlerini (kolajen 1, fibronektin, elastin) ve melanosit stimülasyon hormonunu salgılamak gibi önemli görevleri vardır [116]. Gen seviyesinde bakıldığında ise fibroblastlarda COL1, FN genleri ECM bileşenlerinin salımını kontrol ederken melanositlerde tirozinaz, TRP1, TRP2 genleri hücre pigmentasyonunu kontrol eder. Bu genlerin tespiti amacıyla PCR ve ilgili proteinlerin tespiti ile ilgili "Western Blot" ve ELISA kullanılabilir [118-121]. Ayrıca melaninin tespiti amacıyla kolorimetrik analizler yapılabilir [115]. Dolayısıyla her iki hücre tipinin uygun bir yüzeyde gelişimini sağlayabilmek, pigmentasyon ve yara iyileşmesi perspektifinde bahsi geçen hücresel analizleri tamamlamak uygun yara örtülerinin sentezlenmesi açısından kritik öneme sahiptir.

In vitro deri mühendisliği çalışmalarında tek bir hücrenin davranışının incelenmesi, diğer hücrelerin ortamdaki katkılarının göz ardı edilmesi hücre çalışmalarını çıkmaza sokabilmektedir. Ayrıca tek boyutlu hücre kültür sistemlerin derideki yapıyı temsil

etmesi oldukça güçtür. Bunun yerine ikili kültürleme (co-culture) yöntemi kullanılarak farklı hücre hatlarının bir arada büyütüldüğü mikrodesezli sistemler tercih edilmiştir [105, 115, 122]. İkili kültürleme yönteminde karşılaşılan en önemli güçlüklerden biri ise hücre hatlarının gözlemsel olarak birbirinden ayıramamasıdır. Ancak çalışmamızda da kullanılacak olan melanosit ve fibroblast hücre hatları morfolojik olarak son derece farklı iki hücre hattı olduğundan yara tedavi ve pigmentasyon çalışmalarının in vitro eksenli ikili kültürleme yöntemi kullanılarak çalışılmasının sorun oluşturmayacağı düşünülmektedir. Benzer bir çalışmada keratinositler melanositler ile birlikte kültürlenmiş ve morfolojik olarak bu hücrelerin birbirinden oldukça farklı olduğu, melanosit hücrelerinin polar yapıda olduğu gösterilmiştir [105] (Şekil 1.5). Ayrıca hücre morfolojileri benzer olsa bile hücre stoplazmalarının farklı floresans boyalarla boyanması suretiyle hücrelerin ayrıştırılması sağlanabilir.



Şekil 1.5: Keratinosit ve melanosit hücrelerinin ikili kültürleme çalışmaları sonucu elde edilen (a) kontrol grubunun ve (b) 4 gün 50 nM melanosit stimülasyon hormonu ile inkübe edilen çalışma grubunun optik mikroskop görüntüleri [40]. Bu görüntüler melanosit hücrelerinin morfolojisinin fibroblastik hücre hatlarından oldukça farklı olduğunu ortaya koymaktadır.

Derinin kendisini yenilemesinin ve doğru renklenmeyi sağlamanın güç olduğu kronik yaralanmalarda tedavi amaçlı olarak otogreftler, allogreftler veya hayvan kökenli ksenogreftler kullanılabilir [94, 111]. Ancak büyük alanlı yaralanmalarda sağlıklı deri dokusunun miktarının yetersiz oluşu, başka kaynaklardan alınan greftlerde yaşanan immünolojik sorunlar doğrudan bu yöntemlerin kullanımını sınırlamaktadır [107]. Bu duruma alternatif olarak literatürde çeşitli doğal ve/veya sentetik biyobozunur polimerlerden sentezlenen doku iskeleleri önerilmektedir [123]. Bu iskelelerin hücrelerin kolay tutunabildiği, enfeksiyon riski azaltılmış, yara nem dengesini koruyabilecek ve mekanik özellikler açısından deri ile

uyumlu nitelikte olması gerekmektedir [94, 124]. Ayrıca bu malzemeler yara iyileşmesini hızlandırmak amacıyla farklı büyüme faktörleri, hormonlar veya ilaçlarla da katkılandırılması da mümkündür [125, 126].

Doğal polimerlerden biri olan kitosanın biyouyumlu, biyobozunur, biyoyapışkan olması ve fonksiyonelleştirilebilmesi gibi özellikleri, onun doku mühendisliği uygulamalarında sık kullanılan bir biyomalzeme olmasına sebep olmuştur [81, 82]. Bu çalışmalarda kitosana membran [83], yapışkan [84], hidrojel [85], fiber [86], mikroküre [87] veya gözenekli iskele [88] formlarında rastlamak mümkündür. Ayrıca kitosanın pek çok biyomolekülün yüzeyine yapışmasına izin veren pozitif yüklü kimyasının yanında büyüme faktörlerinin salgılamasını kolaylaştırıcı bir yönü de vardır [89, 90]. Ancak yumuşak doku hücreleri ile kitosan üzerinde yapılan çalışmalarda hücre tutunumunun ve migrasyonunun zayıf kaldığı rapor edilmiştir [91-93]. Bu durumdan kurtulmak amacıyla literatürde kitosanın jelatin ile karıştırılarak kullanılması gerektiği rapor edilmiştir [94]. Jelatinin hücre tutunumunu artıracak etkide RGD sekansı taşıması ve kitosanın antibakteriyel özellikler göstermesi bu kombinasyonunun deri doku mühendisliği açısından potansiyeli olduğunu göstermektedir [92, 127]. Kitosan-jelatin karışımı düz filmlerde keratinosit-fibroblast hücre hatları birlikte kültürlenme tekniği ile çalışılmış ve hücre yayılımının son derece uyumlu olduğu gözlemlenmiştir. Hatta bu filmlerin fibroblast çalışmaları için en uygun filmlerden biri olduğu rapor edilmiştir [26].

Epidermal büyüme faktörü (EGF) keratinositlerin ve fibroblastların farklılaşma ve göç eğilimlerini yaranma bölgelerinde regüle etmekle birlikte doku granülasyonunu da sağlayan bir büyüme faktörüdür [128]. Literatürde EGF stabilitesinin yaranın fiziksel ve kimyasal koşulları nedeniyle bozulduğu gösterilmiş ve bu durumun doku kaybı ve enfeksiyonu tetiklediği belirtilmiştir [129]. Çözüm olarak kontrollü salıma olanak veren düşük maliyetli, geniş alanlarda üretilebilen, antibakteriyel ve hemostatik aktivite gösterebilecek biyouyumlu doğal polimer sistemler önerilmiştir [94, 96, 127, 128]. Ayrıca çalışmada kullanılan jelatinin yara bölgesinde salınan EGF proteolizislerinin inhibisyonunu sağladığı rapor edilmiştir [128]. Bütün bunlarla birlikte EGF salımının fibroblastlardaki fibronektin mRNAlarının artmasını sağladığı gösterilmiştir [130]. Fibronektin ECM'nin bileşenlerinden biri olmasının yanında plazma glikoproteinleri arasındadır. Kolajen, fibrinojen ya da aktinlere tutunum gösterir ve hücre yapışması, çoğalması ve göçünde önemli roller üstlenir. Ayrıca yara

iyileşme sürecinde de önemli roller üstlenmektedir [130]. Dolayısıyla kontrollü EGF salımı yapan sistemlerde yara iyileşme sürecinin de bir belirteci olan fibroblastların fibronektin salımı takip edilmelidir.

ECM yapısında pek çok nano boyutlu bileşen barındırır da EGF katkılandırılmış sıralı nanodesenli doğal polimerlerden üretilmiş yara örtüleriyle literatürde karşılaşılmamıştır. Bunun yerine elektro-eğirme yöntemi kullanılarak sentetik ve/veya doğal polimerlerden sentezlenen iskeleler ile karşılaşılmıştır [81, 82, 131]. Bu örtüler yüksek gözeneklilik, üç boyutlu yapı gibi avantajları mikro çevrede sağlamaktadır [132]. Biyomoleküllerin etkin bir biçimde taşınabilmesi için organik çözücüler içerisinde hazırlanan polimer çözeltileri ile hidrofilik ortamda çözünen biyomoleküller çekirdek kabuk yapısı oluşturacak biçimde ortak eksenli (co-axial) olarak özel düzeneklerde elektro-eğirme yöntemine tabi tutulabilmektedir [131]. Elektro-eğirme yöntemi kullanılarak üretilen doku iskelelerinde karşılaşılan hücre infiltrasyonu ile ilgili problemler tuz uzaklaştırma, nano/mikro parçacık katkılama ya da yapıdaki ikincil polimerin uzaklaştırılması stratejileri izlenerek aşılabilmektedir [133]. Getirilen çözümlerle elektro-eğirme yöntemi doku iskeleleri açısından kullanışlı bir üretim yöntemi haline gelmiştir. Ancak oluşturulan fiberlerin kalsinasyon sonrası kırılğan özellik kazanması, endüstriyel skaladaki düşük üretim hızı nedeniyle oluşan yüksek maliyet bu yöntemin çözüm bekleyen sınırlılıkları arasındadır [134]. Ayrıca bu yöntem kullanılarak nanoçubuklarla bezeli bir filmin üretilmesi mümkün değildir. Elektro-eğirme uygulamaları dışında kitosan jeller içerisine katkılandırılmış EGF'nin farklı yaralar üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çalışmalar ile karşılaşılmıştır [25, 125]. Bu çalışmaların birinde EGF katkılı kitosan jel kullanımının yara iyileşmesini hızlandırdığı rapor edilmiştir [25]. Ayrıca nanogözenekli seramik yapıların keratinosit aktivitesini artırdığı ve yara iyileşme sürecini hızlandırdığı rapor edilmiştir [135]. Bu bağlamda doğal polimerler kullanılarak sentezlenecek nanodesenlemelerin yara iyileşme sürecine olan katkılarının araştırılması gerekmektedir. Bahsi geçen yöntemlerin kombinasyonlarının da deri doku mühendisliğinde kullanımı mümkündür. Örneğin tezde kullandığımız nanodesenlemenin elektro-eğirme yöntemi ile birleşimi sağlanabilir [136]. Böylece yüzey alanı nanoboyutta da artırılmış, hücre tutunumunu, göçünü ve yara nem dengesini sağlayacak filmler sentezlenebilir.

Polimerler kullanılarak nanotopografinin taklit edilebilmesi amacıyla literatürde litografik tekniklerin ve kalıp temelli üretim metotların sıklıkla kullanıldığı

gözlemlenmiştir [20, 45, 137]. Ancak yüksek maliyet, düşük verim ve limitli tekrar üretilebilirlik sorunları bu çalışmaları negatif yönde etkilemektedir. Alternatif olarak, AAO membranlar nanotopografi ile desenlenmiş polimer filmlerin üretiminde kalıp olarak kullanılmaktadır. AAO kalıplar düşük üretim maliyetleri, geniş alanlarda üretilebilir olmaları (~50 cm²), tekrar tekrar kullanılabilmeleri yönüyle nanodesenleme çalışmalarında ön plana çıkmaktadır [22, 138]. Bu bilgiler ışığında tezin bu kısmının konusunu ECM yapılarının sentezlemesinden görevli fibroblast hücrelerinin ve doku renklenmesini sağlayan melanositlerin nanodesenli filmler üzerindeki davranışlarının takip edilmesi oluşturmaktadır. Bunun için kitosan-jelatin karışımı ile hazırlanmış EGF (+/-) filmler AAO kalıplar kullanılarak sentezlenmiş ve bu filmlerin fiziksel ve kimyasal analizleri tamamlanmıştır. Hücre kültürü çalışmalarına geçildiğinde ise bu filmler üzerindeki fibroblast ve melanosit hücrelerinin davranışları canlılık, tutunum, gen ve protein analizleri vasıtasıyla incelenmiştir. Melanositlerden salgılanan melanin, ticari olarak elde edilen melanin çözeltisi ile hazırlanan standart eğriye göre hücre lizatlarından kolorimerik olarak tespit edilmiştir. Ayrıca fibroblastlardan elde edilecek fibronektin ELISA kullanılarak analiz edilmiş olup çalışmanın ilk aşamasında hücrelerdeki epidermal büyüme faktörü reseptörlerinin varlığı da yine ELISA ile tayin edilmiştir. Bütün bu çalışmalar ayrıca düz silikon yongalardan elde edilen düz polimer filmlerde de tamamlanmış, bu şekilde nanotopografiye sahip kitosan-jelatin karışımı filmlerin bir yara örtüsü modeli olma potansiyelleri araştırılmıştır.

Yara örtü modelleri ile çalışılırken kullanılan malzeme kadar kullanılan yara modeli de önem arz etmektedir. Rodent deri dokusu ile çalışılırken karşılaşılan güçlüklerden birisi dokunun insanlarda olduğu gibi yeniden epitelizasyon ile iyileşmemesidir. Bunun yerine büzülerek (contraction) küçülen yara dokusu çalışma sonuçlarını etkilemektedir. Bu noktada ekzisyonel yara modeli rodentler üzerinde tıbbi silikon halkalar vasıtasıyla oluşturulmuştur [139].

Melanin dağılımı açısından in vivo çalışmalar incelendiğinde farklı görüşlerin ortaya konulduğu tespit edilmiştir. Gine domuzları üzerinde yapılan araştırmalarda yara dokusundaki iyileşmeyi takiben melanositerin epitel dokunun 1-2 mm uzağına kadar migrasyonunun gerçekleştiği gösterilmiştir [140]. Diğer taraftan dermal tabaka insan yaraları ile yapılan çalışmalarda epitelizasyon öncesi melanositlere rastlanmadığı rapor edilmiştir. Bu durumun epitelizasyon sonrası melanosit migrasyonuna işaret ettiği düşünülmektedir [140]. Her iki görüşünde ortak noktası epitel doku çevresinde

gözlemlenen melanin birikimidir. Dolayısıyla bu doku içerisindeki fibroblastların proliferasyonu melanin sekresyonu ile ilişkilendirilebilir [141]. Yaralanmış dokuda melanositlerin varlığı lizozom organelleri temelli melanozomların varlığı açısından önemlidir. Melanozomlardan salınan melaninin UV ışınlarına karşı koruyucu yapısı haricinde reaktif oksijen türlerine karşı olan aktivitesi de bu hücrelerin yara dokuda birikimlerinin artmasını önemli hale getirmektedir. Yaralanmış dokudaki melanin birikimine ilaveten takip edilecek tirozinaz aktivitesi, bu bölgedeki melanizasyon hakkında bilgi vermektedir [142].



2. SİNİR-ARAYÜZ MALZEMESİ OLARAK PROTEİN SALIMI YAPAN İLETKEN ANODİK ALÜMİNYUM OKSİT MEMBRANLAR

2.1 Amaç

Çalışmamızın amacı kimyasal, morfolojik ve elektriksel özellikleri bakımından kontrol edilebilir nanogözenekli AAO substratların sinir doku mühendisliğinde kullanımının araştırılması ve uygun nöroelektrot modelinin tespit edilebilmesini sağlamaktır.

2.2 Materyal ve Yöntemler

2.2.1 Materyaller

Çalışma sırasında kullanılan alüminyum folyo (Puratronic, %99,99), $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Alfa Aesar firmasından temin edilmiştir. H_3PO_4 (%85) BDH Prolabo firmasından, HCl (%37), okzalik asit (%99) ve NaOH Sigma-Aldrich firmasından satın alınmıştır. H_2SO_4 (%95-98), CrO_3 Fluka firmasından alınmıştır. Hücre çalışmalarında kullanılan PC12 hücre hattı (ATCC® CRL-1721™) Amerikan Hücre Kültürü koleksiyonundan temin edilmiştir. Fatal sığır serumu (FBS), at serumu, L-glutamine İnvitrogen firmasından, penisilin-streptiyomisin ve besi yeri (DMEM) Gibco firmasından satın alınmıştır. Membranları kaplama materyali olarak kullanılan kolajen Advanced Biomatrix firmasından, NGF Life Technologies'ten sağlanmıştır. NGF-ELISA kiti (CYT304) EMD Millipore firmasından temin edilmiştir.

Çalışma sırasında akım-voltaj kaynağı (Sorensen), SEM (Quanta 200 FEI), fiziksel buhar biriktirme cihazı (GATAN, "Precision Etching-Coating System"), atomik kuvvet mikroskobu (AFM, ez-AFM, "tapping" modu, PPP cantilever, Nanomagnetics), otoklav (MLS-3751L, Panasonic), inkübatör (INNOVA 40, Eppendorf), absorbans ölçüm cihazı (Multiscan Go, Thermo Fischer), temas açısı

ölçüm cihazı (Dataphysics, OCA 30, ABD) ve atomik tabaka kaplama cihazı (ALD, Fiji, F200-LL ALD reaktör, Cambridge Nanotech Inc.) cihazı kullanılmıştır.

2.2.2 Deneysel yöntemler

2.2.2.1 AAO ve iletken AAO (CAAO) membranların sentezi ve karakterizasyonu

AAO ve CAAO membranların sentezi ve karakterizasyonu ile ilgili detaylı bilgi önceki çalışmamızda verilmiştir [18]. %99,999 saflıktaki alüminyum folyolar mekanik olarak temizlendikten sonra su ve aseton ile yıkanıp, sonikasyona tabi tutulmuşlardır. Ardından 450 °C`de tavlama (annealing) işlemine tabi tutulan yüzeyler oda sıcaklığına soğutulmuş ve yüzeyler elektrokimyasal olarak kurşun katot varlığında H_3PO_4 , H_2SO_4 ve CrO_3 bileşenlerinden oluşan çözelti içerisinde temizlenmiştir. Temizleme işlemlerinin ardından yüzeyler bir ya da iki aşamalı anodizasyona tabi tutulmuştur. Yaklaşık 250 nm ortalama gözenek çapına sahip AAO membranlar tek aşamalı anodizasyon ile 160 V potansiyel fark altında 0,4 M H_3PO_4 çözeltisi içerisinde sentezlenmiştir. Son gözenek çapına üretilen membranlar 22 dk sulu kromik asit çözeltisinde bekletilerek erişilmiştir. Burada iki aşamalı anodizasyon kullanılmamıştır. Çünkü ilk anodizasyon aşamasında oluşan oksit tabaka farklı uzaklaştırma çözeltileri kullanılmasına rağmen yüzeyden uzaklaştırılamamıştır. Yaklaşık 100 nm ortalama gözenek çapına sahip AAO membranlar ise iki aşamalı anodizasyon yöntemi ile sentezlenmiştir. Her iki anodizasyonda 0,3 M okzalik asit çözeltisi içerisinde 18 saat olarak gerçekleştirilmiştir. Seyreltilmiş fosforik asit çözeltisi içerisinde AAO membranlar son gözenek çapına ulaşmaları için bekletilmiştir.

Tipik olarak alüminyum folyonun her iki tarafında da oksit tabaka meydana gelmektedir [143]. Bu membranlardan hücre kültürü çalışmalarında faydalanabilmek için alt tabakada bulunan alüminyum folyonun yüzeyden uzaklaştırılması gerekmektedir. Bunun için AAO membranlardan birinin yüzü parafilm ile kapatılıp diğer yüzdeki AAO membran ve alüminyum metali sırasıyla NaOH ve asidik $CuCl_2$ çözeltileri kullanılarak yüzeyden uzaklaştırılmıştır. Parafilm tabaka ile korunan AAO membran hekzan ile muamele edilip su ile yıkandıktan sonra parafilm tabaka uzaklaştırılmış ve alüminyumdan arındırılmış AAO membranlar elde edilmiştir [18]. Elektrik stimülasyonunun hücreler üzerindeki etkisinin anlaşılabilmesi için iletken AAO substratlara ihtiyaç duyulmuştur. Bu durum termal buharlaştırma sistemi

kullanılarak AAO membranların 20 nm karbon ile kaplanması ile aşılmıştır. Böylece nanogözenekli CAAO membranlar elde edilmiştir. Üretilen tüm yüzeylerin elektriksel, morfolojik ve kimyasal karakterizasyonları AFM, X ışını spektroskopisi, enerji dağılımlı X ışını spektroskopisi, akım-voltaj ölçümleri, SEM ve geçirimli elektron mikroskopisi kullanılarak tamamlanmıştır [18]. Image J programı kullanılarak AAO membranların ortalama gözenek çapı ve gözeneklilik değerleri hesaplanmıştır. AAO membranların yüzey pürüzlülüğü (roughness) AFM kullanılarak analiz edilmiştir.

2.2.2.2 Hücre kültürü çalışmaları

PC12 hücreleri %10 FBS, %10 at serumu, %1 penisilin-streptomisin ve %1 L-glutamin içerikli besi yeri içerisinde 37 °C`de %5`lik CO₂ ortamında geliştirilmiştir. Hücrelerin pasaj numarası çalışma süresince düşük tutulmuştur ve gün aşırı olarak besi yeri değişimi sağlanmıştır. Steril malzemeler kullanılmış ve çözeltiler kullanılmadan önce 0,22 µm filtreden geçirilmiştir. Membranlar ve kendi tasarımı olan cam kuyular 45 dk 121 °C`de otoklav içerisinde steril edilmiş ve sonrasında yatay akış kabini içerisinde kullanılmıştır. Bütün AAO, CAAO membranlar ve doku kültürü için hazırlanmış polistiren yüzeyler tip 1 sığır kolajeni ile kaplanmıştır. Kaplama yapılmadan gerçekleştirilen çalışmalarda bu durum ifade edilmiştir. Kaplamada kullanılan kolajen çözeltisi steril fosfat tampon tuzu çözeltisinde (PBS) son konsantrasyon 53,5 µg/ml olacak biçimde hazırlanmıştır. Tüm örnekler bu çözelti içerisine 60 dakikalığına daldırılmış ve ardından PBS ile yıkanmıştır.

Hücre canlılık analizleri

Farklı yüzeyler üzerindeki hücre canlılığının tespiti için WST-1 hücre proliferasyon kiti üretici firmanın protokollerine göre tamamlanmıştır. 100 ve 250 nm gözenek çapına sahip AAO ve CAAO membranlar (n=3) yaklaşık 0,25 cm² alanlarda kesilip TCPS kontrolle birlikte kolajen kaplamaya tabi tutulmuştur. Bu membranlar 96 kuyulu plakaya yerleştirilmiş ve üzerlerine 10⁵ hücre/ml konsantrasyonda hücre ekimi yapıp örneklerin 2 ve 7 günlük canlılık testleri tamamlanmıştır. Her örnek 24 saat sonra 20 ng/ml NGF ile katkılanmış ve 7 gün çalışmasında gün aşırı besi yeri değişimi gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonrası her kuyuya 10 µl WST-1 çözeltisi eklenmiş ve örnekler 10 dk çalkalamalı inkübatörde bekletilmiştir. Ardından 37 °C %5 CO₂ ortamında örnekler 2 saat boyunca inkübe edilmiş ve çalkalama işlemi tekrarlanmıştır. Membranlardan kaynaklanan absorbans değerini azaltmak için absorbans değerleri

ölçülecek çözeltiler membranların bulunduğu kuyulardan çekilerek yeni bir 96 kuyulu plakaya aktarılmış [144] ve 450 nm dalga boyunda absorbanans gerçekleştirilmiştir.

Hücre yapışma ve nörit ölçüm çalışmaları

Kendi tasarımı olan cam kuyu tasarımları kullanılarak membranlar üzerindeki hücre tutunum çalışmaları tamamlanmıştır. Bu kuyu sistemlerinin kullanılmasındaki amaç belli bir alandaki membran üzerinde belli hacimde besi yeri kullanılarak inkübe edilen hücre hatlarının elektrik uygulamaları sonrası göstereceği davranışın karşılaştırmalı olarak belirlenebilmesidir. Ayrıca bu tasarım sayesinde elektrik uygulamasında kullanılan elektrotlar doğrudan hücre ortamı ile temas etmemiştir. 0,3 cm² açıklığa sahip 1 cm kalınlığındaki cam tabaka ve standart lam arasına parafilm ve doku yapıştırıcısı ile desteklenerek sıkıştırılan AAO ve CAAO membranlar ile sistem oluşturulmuştur. Besi yeri sızmalarının engellemesi için metalik kısıkaçlarla bu tasarım sıkıştırılmıştır. Gerekli olduğu yerlerde CAAO membranlar üzerinde elektrik bağlantıları sağlanmış ve bu bağlantıların hücre solüsyonları ile etkileşimi engellenmiştir. Düz alüminyum oksit (gözeneksiz) ve TCPS yüzeyler kontrol olarak kullanılmıştır. Atomik olarak gözeneksiz 5 nm kalınlığındaki alüminyum oksit tabakalar silikon yongalar üzerine ALD yöntemi kullanılarak kaplanmıştır. TCPS kontroller 6 kuyulu plakalardan 2 cm²-lik alanlar çıkartılarak hazırlanmıştır. Tüm çalışmalardan önce numuneler kolajen ile kaplanmıştır.

Cam kuyular içerisinde aynı aktif alana sahip örnekler üzerine 2×10^4 hücre/ml PC12 hücre hattı ekilip hücre tutunumu için 24 saat inkübasyon yapılmıştır [145]. Ardından tüm numuneler son konsantrasyon 20 ng/ml olacak şekilde NGF ile katkılandırılmış ve 36 saat hücre dönüşümü (differentiation) için inkübasyon yapılmıştır. Toplam inkübasyon süresi 60 saattir. CAAO membranlar üzerinde inkübe edilen hücreler 0,1 V DC voltaja inkübasyonun 57. saatinde 1 saat olarak tabi tutulmuştur [2, 146]. 60 saatlik sürecin sonrasında örnekler SEM görüntülemesi için fiksasyona tabi tutulmuştur. Elde edilen mikrograflar farklı substratlar üzerine tutunan hücre sayısı kadar ortalama nörit uzunluğu ve hücre başına düşen nörit sayısının tespitinde de kullanılmıştır. Fiksasyon protokolünde, 60 saatin sonunda PBS ile yıkanan örnekler, %2 formaldehit-%2 glutraldehit çözeltisi içerisinde 90 dk bekletilmiştir. Sonrasında artan etanol konsantrasyonu olan çözeltiler (%50 etanol içerikli çözelti içerisinde 2 dk, %75 etanol içerikli çözelti içerisinde 2 dk, %100 etanol içerisinde 45 dk) içerisinde bekletilmiştir. Son olarak numuneler 10 nm altın ile fiziksel buharlaştırma tekniği

kullanılarak kaplanmış ve SEM analizleri tamamlanmıştır. Aynı zamanda bazı örneklere ait floresan mikroskopi analizleri de tamamlanmış ve tartışma kısmında ilgili sonuçlara yer verilmiştir.

Yüzeyle yapışan hücre sayısı 3 bağımsız örneğin rastgele 5 farklı alanından elde edilen SEM görüntülerinden elde edilmiş olup sonuçlar mm² başına düşen hücre sayısı olarak hesaplanmıştır. Image J programı kullanılarak ortalama nörit uzunluğu yaklaşık 5 µm`den daha uzun uzantılar nörit olarak kabul edilerek ölçülmüştür. Aynı hesaplama yöntemi hücre başına düşen nörit sayısı hesaplanırken de kullanılmıştır [147, 148]. Burada, örnekler üzerinde dallanmış olan nöritlerden sadece en uzununu dikkate alınmış olup iki hücrenin paylaştığı nöritler bir hücreye ait olarak hesaplanmıştır. Farklılaşma oranını hesaplariken hücre çapından uzun nöritler dikkate alınmıştır [147, 149]. İstatiksel analizler için iki grubun karşılaştırılmasında “Student t-test” veya birden fazla ikilinin karşılaştırılmasında tek yönlü ANOVA ve post-test olarak da “Scheffe test” kullanılmıştır. $p < 0,002$ değeri anlamlı kabul edilmiş farklı değerler kabul edilmişse metin içinde belirtilmiştir.

NGF katkılama ve salım çalışmaları

Hücre tutunumu ve nörit uzanımı açısından gelişim gösteren yüzeylerin 60 saatlik standart prosedür ile incelenmesine ek olarak yüzeyler NGF ile katkılanmış ve hücre gelişimi bu yüzeyler üzerinden de takip edilmiştir. Burada standart prosedürden kasıt NGF doğrudan hücre besi yeri içerisinde çözünmesidir. 100 nm gözenek çapına sahip AAO ve CAAO yüzeylerden in vitro olarak NGF salımı analiz edilmiştir. Bu yüzeyler stok çözeltilerden alınan 80 ng/ml NGF ile muamele edilmiş ve gece boyu kurumaya bırakılmıştır. Yaklaşık 0,2 cm² alana sahip NGF ile katkılanmış bu AAO ve CAAO membranlar (n=3) 96 kuyulu plakalar içerisinde 200 µl salım medyasına (su) bırakılmıştır. 6, 24, 48 ve 72 saat için NGF salım analizleri NGF-ELISA kiti kullanılarak tamamlanmıştır. Kalibrasyon eğrisi ve ELISA üretici firmanın protokollerine göre tamamlanmıştır.

2.3 Tartışma

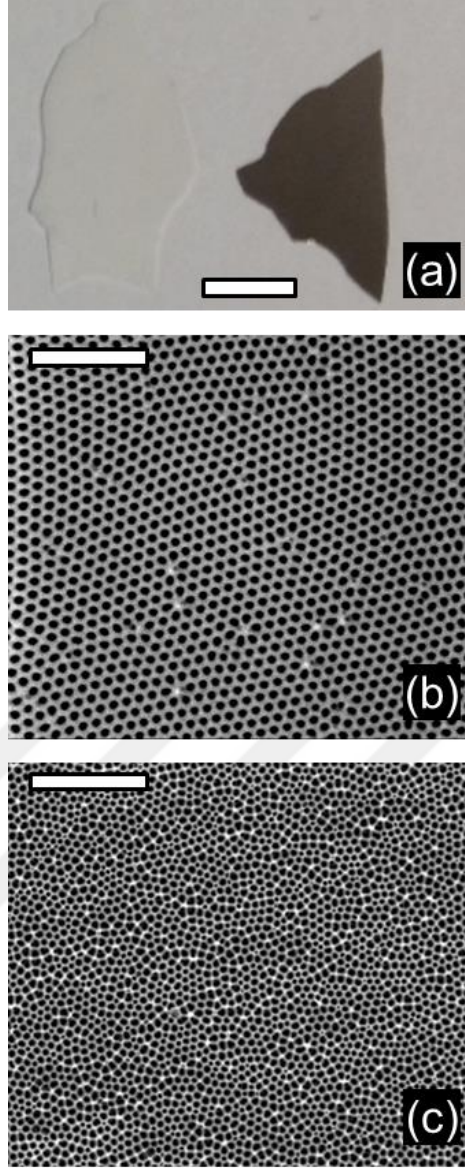
Yayınlarımızda [18, 138] AAO ve CAAO membran üretim ve karakterizasyonu ile ilgili sonuçlar paylaşıldığı için tezin bu bölümünde sadece AAO membranların SEM görüntülerine yer verilecektir. Bunun dışında kalan hücre çalışmaları ise detaylı bir

biçimde anlatılacak ve standartlaştırılmış prosedürlerin nasıl oluşturulduğu eldeki sonuçlar ile ortaya konulacaktır.

Alüminyumdan arındırılmış yaklaşık 100 ve 250 nm gözenek çapına sahip AAO membranlar yüksek saflıktaki alüminyumun sırasıyla okzalik ve fosforik asit içerisinde anodizasyonu sonrası elde edilmiştir. Elde edilen AAO membranların bariyer ve solüsyon olmak üzere iki farklı yüzü bulunmaktadır. Bu çalışmada solüsyon yüzü kullanılmış ve bu yüzeydeki gözenekler seyreltilmiş asit çözeltisi ile açılıp 100 ve 250 nm gözenek çapına erıştırilmiştir. Dahası elektriksel stimülasyonun etkilerinin araştırılması için, bazı membranlar fiziksel buharlaştırma yöntemi kullanılarak karbon kaplanmış ve iletken hale getirilmiştir. Şekil 2.1`de görüldüğü üzere resimlerde karbon kaplama sonrası AAO membranların rengi değişmiştir. SEM görüntüleri de açıkça karbon kaplama sonrası ortalama gözenek çaplarının $97,8 \pm 2,3$ nm olduğunu göstermektedir. Ayrıca $245,8 \pm 21,9$ nm gözenek çapına sahip CAAO membranlar da tek aşamalı anodizasyon kaynaklı oluşan dağınık gözenek yapısı gözlemlenmiştir. Bu membranların fiziksel, kimyasal ve elektriksel karakterizasyonu önceki çalışmalarımızda tamamlanmıştır [18]. Bu çalışmada yüzeye kaplanan karbonun yüzeyde iletkenliği sağladığı iletken AFM analizleri ile gösterilmiştir. Ayrıca gözeneklere giren karbon miktarının sınırlı olduğu ancak tüp benzeri yapılar oluşturma potansiyelleri olduğu gösterilmiştir.

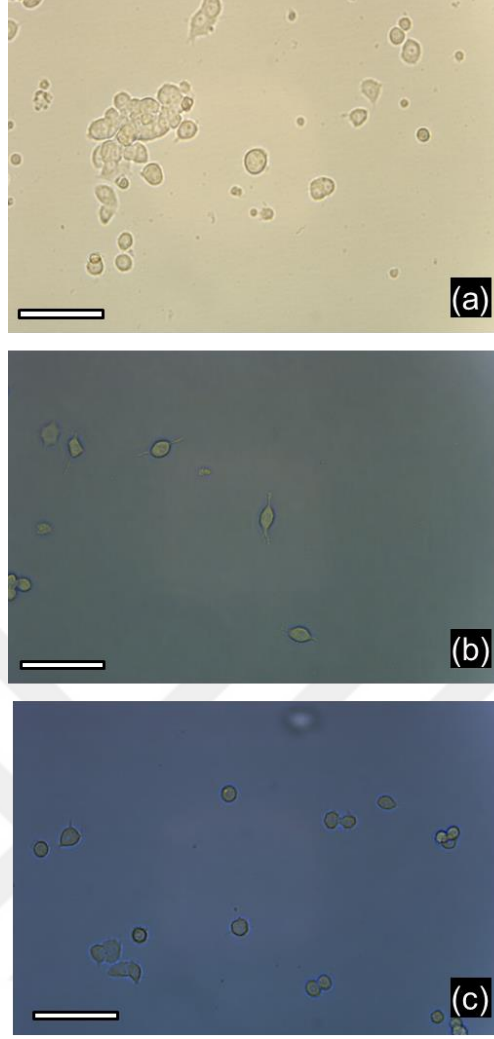
Üretilen AAO ve CAAO membranlar üzerinde PC12 hücre hattının proliferasyon ve başkalaşım analizleri yapılmadan önce hücrelerin TCPS yüzeyde gelişimi ve kullanılacak hücre yoğunluğu, yüzeylere hücre tutunumunu artırmak amacıyla kullanılacak hücreler arası matris bileşeninin tespiti ve optimum NGF miktarının tespiti üzerine yoğunlaşmıştır. Bu bağlamda sıçan, insan ve sığır kolajenleri ile yüzeye tutunum ve nörit gelişim çalışmaları TCPS üzerinde yapılmıştır. Sığır kolajeninde hücre tutunumunun diğer kolajenlere nazaran çok daha iyi olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 2.2). Tüm çalışma boyunca sığır kolajeni ile “Deneysel Çalışmalar” bölümünde belirtilen protokoller doğrultusunda yüzeylerin kaplaması yapılmıştır.

Hücre tutunumuyla ilgili sorunlar aşıldıktan sonra düşük pasaj numaralı hücre hatlarında uygun NGF miktarının tespiti üzerine çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarla birlikte hücre konsantrasyonu ile ilgili optimizasyon çalışmaları da gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar sonrası 20 ng/ml NGF ile 2×10^5 hücre/ml hücre ile ça-



Şekil 2.1: Alüminyumdan arındırılmış AAO (sağda) ve CAAO (solda) örneklerinin fotoğrafları (a). 100 nm (b) ve 250 nm (c) gözenek çapına sahip CAAO membranların SEM görüntüleri. Ölçek çubuğu 1 cm (a), 1 μ m (b) ve 5 μ m (c) uzunlukları temsil etmektedir.

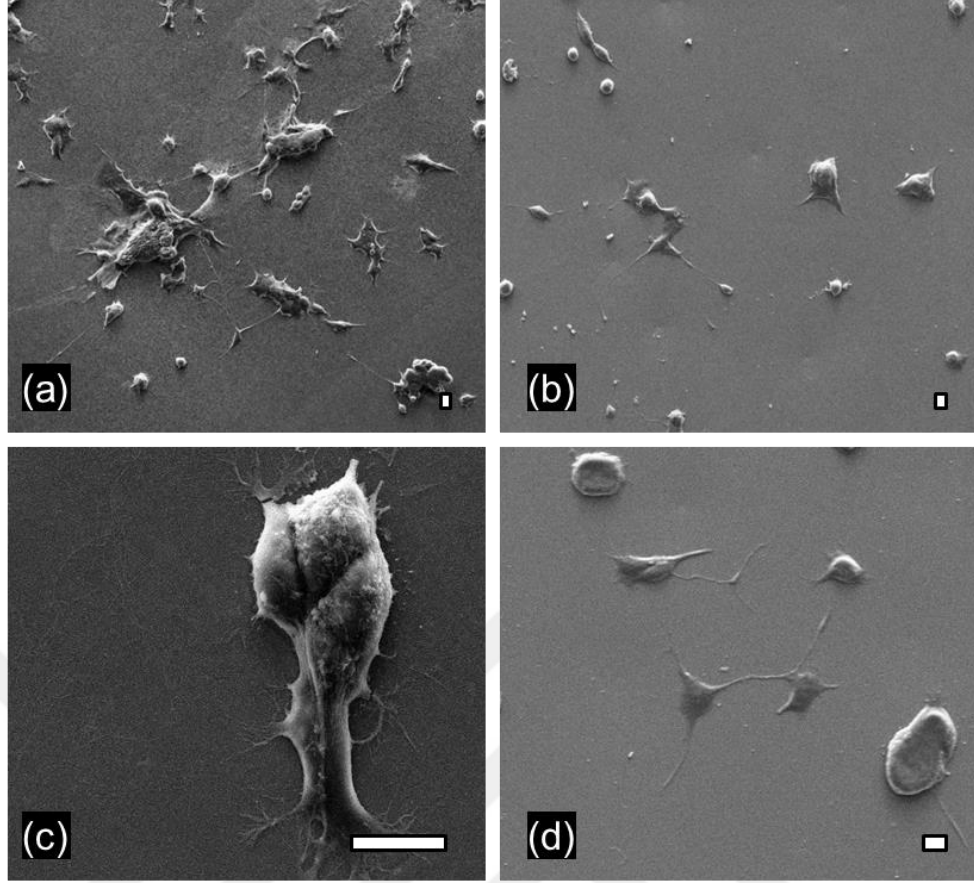
İşmanın istatistiksel analiz yapılması açısından uygun olduğu görülmüştür (Şekil 2.3). Düşük hücre yoğunluğunda ve uzun inkübasyon süresinde yüksek NGF miktarları ile çalışıldığında hücrelerin topaklandığı gözlemlenmiştir. Bu durum, hücrelerle ilgili istatistiksel analizlerin yapılması aşamasında hem birtakım güçlükler getirmekte hem de sonuçlarımızın tekrarlanabilir bir aralıkta olmasına engel olmaktadır. İnkübasyon süresi kısaltılıp NGF miktarı azaltıldığında ve bunlara paralel olarak başlangıçta ekilen hücre sayısı artırıldığında hücrelerin birbirinden daha ayrı konumlandığı gözlemlenmiştir ve istatistiksel analizler açısından bu koşulları takip etmenin daha doğru olduğuna karar verilmiştir.



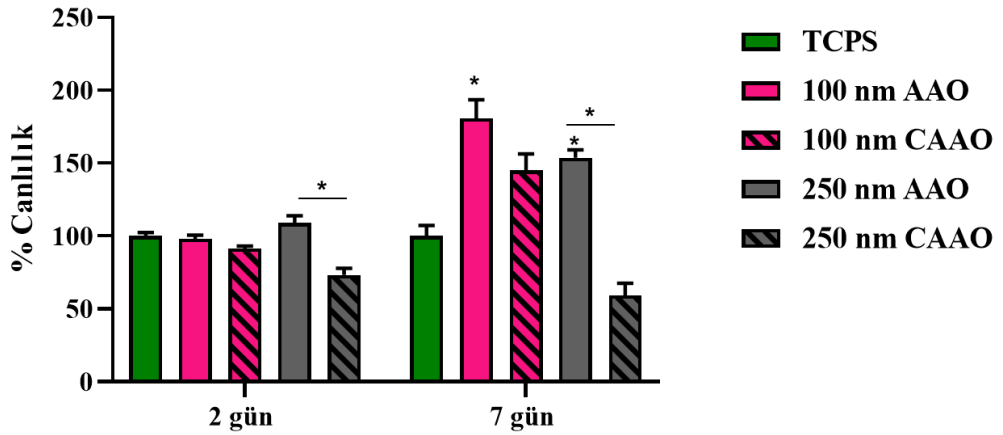
Şekil 2.2: Sıçan (a), insan (b) ve sığır (c) kolajeni kullanılarak kaplanan TCPS yüzeylerin 40X büyütmedeki optik mikroskop görüntüleri. Sıçan kolajeni ile yapılan çalışmalarda hücrelerin topaklandığı insan ve sığır kollajeninde yayılımın arttığı ancak hücre sayısı bakımından sığır kollajeninin daha avantajlı olduğu düşünülmektedir. Ölçek çubukları 50 µm uzunluğu temsil etmektedir. Çalışma 12'lik mikroplakada tamamlanmıştır.

Nörit gelişimini daha iyi analiz edebilme ve literatür ile doğru bir şekilde karşılaştırma yapabilme adına inkübasyon süresi 60 saate ve NGF miktarı da 20 ng/ml'ye düşürülmüştür [150].

Gözenekli yüzeyler üzerinde PC12 hücrelerinin canlılık eğilimlerini gözlemlemek için WST-1 kiti kullanılmıştır. Yaklaşık 0,2 cm² büyüklükteki AAO ve CAAO membranlar standart TCPS plakalara yerleştirilmiş ve 2 ve 7 gün için canlılık verileri elde edilmiştir. Analizi yapılacak çözeltiler membranların da bulunduğu mikroplakadan hızlı bir şekilde boş bir mikroplakaya aktarılmış ve absorbans değerlerinin okunması yeni mikroplakalarda yapılarak membran kaynaklı varyasyonlardan bağımsız analiz sonuçları ortaya konulmuştur [144] (Şekil 2.4).



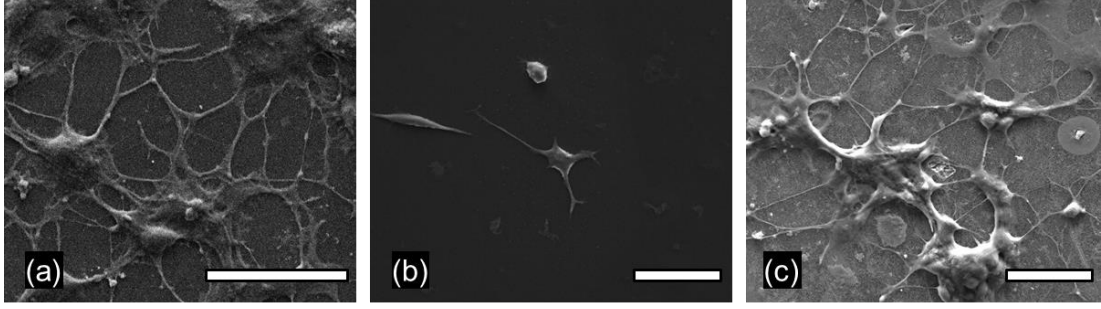
Şekil 2.3: 100 nm-AAO membran üzerine 9500 hücre/ml konsantrasyonunda, iyohücre hattının düşük büyütmedeki (a) ve yüksek büyütmedeki (c) SEM görüntüleri. 20000 hücre/ml konsantrasyonunda, 25 ng/ml NGF içerikli besi yerinde, 3 gün inkübasyon yapılarak büyütülen hücre hattının düşük büyütmedeki (b) ve yüksek büyütmedeki (d) SEM görüntüleri. Ölçek çubukları 10 µm uzunluğu temsil etmektedir. Çalışma 96'lık mikroplakada tamamlanmıştır.



Şekil 2.4: PC12 hücrelerinin 2 ve 7 gün boyunca inkübasyonu sonrası WST-1 test kiti kullanılarak elde edilen hücre canlılık sonuçları. Çalışma 96'lık mikroplakada tamamlanmıştır. (* p < 0,002)

Canlılık analizi sonuçları membran topografi ve kimyasının hücre metabolizması üzerinde etkili olduğunu göstermiştir. Kolajen kaplama olmadığında CAAO membranlar üzerinde ekili hücre hatlarının canlılık değerlerinin kontrol ve diğer test gruplarına göre oldukça düştüğü gözlemlenmiştir. Bu durumun nedenleri araştırılırken kullanılan yüzeylerin temas açısı ölçümleri yapılmış ve CAAO membranların üzerinde bulunan hidrofobik kaplamadan dolayı temas açısının $101,2^{\circ} \pm 2,2$ olarak ölçüldüğü ve bu değer hücre tutunumunda kullanılan yüzeylerin temas açısından (yaklaşık 55°) fazla olduğu görülmüştür [43]. Benzer şekilde 100 nm gözenek çapına sahip AAO membranların kolajen kaplama olmadan ($38,73^{\circ} \pm 2,6$) ve kolajen kaplama yapıldıktan ($49,69^{\circ} \pm 2$) sonraki temas açısı ölçümleri tamamlanmıştır. CAAO membranlar kolajen kaplandıktan sonra bu yüzeylerin temas açısı $66,47^{\circ} \pm 4,1$ olarak ölçülmüştür. Şekil 2.4`da görüldüğü üzere AAO membranlar 2 ve 7 günlük inkübasyon süreleri için AAO membranlar toksik etki göstermemiştir. İlgili değerlerdeki farklılıklar TCPS kontrole göre anlamlı değildir ($p > 0,05$). Ek olarak, her iki gözenek çapı içinde karbon kaplama kolajen kaplamaya rağmen hücre canlılığını olumsuz yönde etkilemiştir. Bu durum hidrofobik karbon kaplamanın yüzeylerdeki etkin kolajen kaplamayı engellediğini ve hücre canlılığının bu sebeple düştüğünü düşündürmektedir. Ayrıca yüzey kimyası ve topografinin de hücre davranışlarını etkilediği düşünülmektedir. Örneğin 250 nm gözenek çapına sahip AAO membranlardaki (gözeneklilik = $\%62,3 \pm 3,4$ pürüzlülük = $112,7 \pm 10,3$ nm) canlılık değerleri en yüksek çıkmış aynı zamanda gözeneklilik ve pürüzlülük açısından 100 nm gözenek çapına sahip AAO membranlardan (gözeneklilik = $\%48,6 \pm 2,3$ pürüzlülük = $31,2 \pm 4,4$ nm) daha yüksek değerlere sahiptirler. Bu hipotezi test etmek amacıyla yaklaşık 60 nm gözenek çapına sahip AAO membranlar (gözenek çapı = $64,7 \pm 1,8$ nm gözeneklilik = $\%44,1 \pm 1,8$ pürüzlülük = $3,6 \pm 0,1$ nm) üzerinde canlılık analizleri yapılmış canlılık değerleri TCPS yüzeye göre $\%64,8 \pm 7,1$ (Veri şekilde sunulmamıştır.) olarak tespit edilmiştir. Böylece gözeneklilik ve pürüzlülüğün canlılığı pozitif yönde etkilediği 2 günlük inkübasyon süresi için gösterilmiştir.

Hücre canlılığı 7 günlük inkübasyon sonrasında da analiz edilmiştir. Bu sette yapılan analizler 2 günlük canlılık sonuçlarına göre TCPS kontrole kıyasla 100 ve 250 nm AAO membranların hücre tutunum ve gelişimini tetiklediğini göstermiştir ve benzer sonuçlar SEM analizi aracılığı ile doğrulanmıştır (Şekil 2.5).



Şekil 2.5: 100 nm gözenek çapına kolajen kaplanmış AAO membranlar (a), kollajen kaplanmış TCPS yüzeyler (b) ve kollajen kaplanmamış 100 nm gözenek çapına sahip AAO membranlar (c) üzerinde inkübe edilen PC12 hücrelerinin SEM görüntüleri. Ölçek çubukları 50 µm uzunluğu temsil etmektedir.

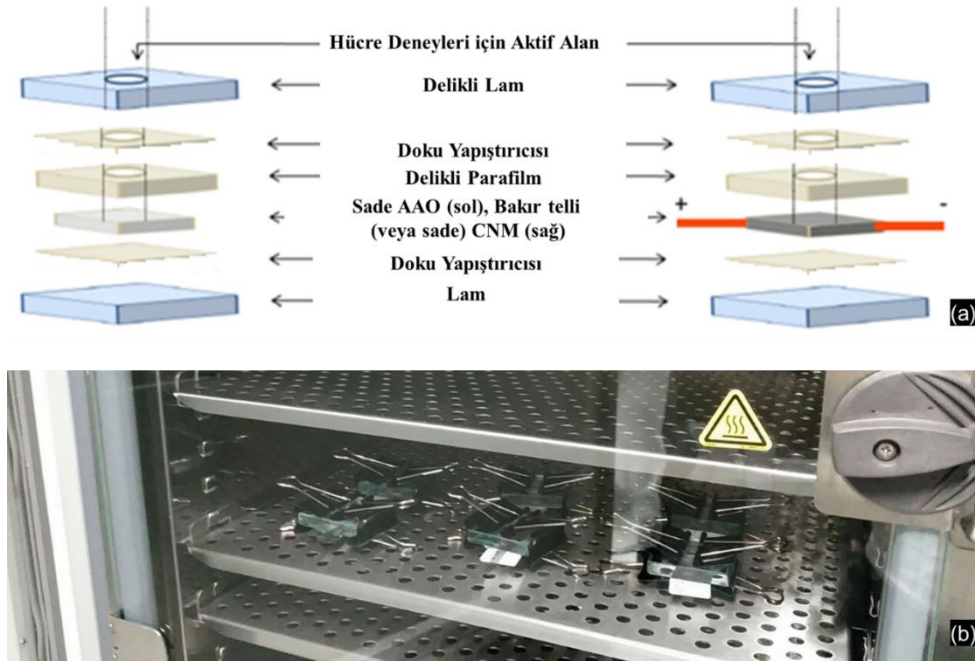
Şekil 2.4`deki sonuçlar bu gözlemi desteklemekte olup 100 ve 250 nm gözenek çapına sahip AAO membranlarda yüksek canlılık trendi 7 günlük inkübasyon süresi için TCPS yüzeylere göre artış göstermiştir. Topografik faktörler bu farkın oluşmasında önemli rol oynamıştır. Nanogözenekli membranlar TCPS kontrol grubuna göre artırılmış yüzey alanına sahiptir. Gün aşırı besi yeri değişimleri yapılarak sürdürülen uzun inkübasyon süresi boyunca nanogözenekli membranlar hücre yapışmasını tetiklemiş ve gözeneksiz TCPS yüzeye göre çok daha fazla hücrenin yapışmasını sağlamıştır. Yıkama ile yüzeye zayıf olarak bağlanmış hücrelerin TCPS yüzeyden uzaklaştığı ve hücre canlılığının bu nedenle kontrol grubunda düştüğü düşünülmektedir.

Ancak, 7 günlük çalışmalarda AAO membranlar arasındaki canlılık trendi tersine dönmüştür. Bu çalışmalarda 100 nm AAO membranlar üzerindeki hücrelerden alınan canlılık değeri 250 nm AAO membranlardan daha yüksek çıkmıştır. Bu durum 100 nm AAO membranlardaki 250 nm AAO membranlara göre daha düşük gözeneklilik ve pürüzlülük değerine rağmen gerçekleşmiştir. Önceki çalışmalarda anodizasyon için kullanılan elektrolit tipine bağlı olarak oluşan titanyum oksit tabakanın kimyasal özelliklerinin değiştiği ve bunun hücre davranışlarını değiştirdiği gözlemlenmiştir [151]. Benzer faktör bizim çalışmamızın sonuçlarını da açıklamakta kullanılabilir ve bu durumu doğrulamak için detaylı çalışmalar yapılması gerekmektedir.

Ayrıca, karbon kaplamanın negatif etkisi bu durum için bir kanıt oluşturabilir. 100 nm ve 250 nm CAAO membranlar AAO membranlara göre düşük hücre canlılığı göstermişlerdir, ancak bu fark 250 nm AAO-CAAO ikilisi için istatistiksel olarak daha dramatiktir. 250 nm AAO-CAAO membran ikilisi için p değeri 0,0002 iken 100 nm AAO-CAAO ikilisi için bu değer 0,02`dir.

Farklı yüzeyler üzerinde hücre yapışması ve nörit oluşumu ile ilgili detaylı çalışmalar yapılması ve bunlarla ilgili parametrelerin optimize edilmesi nöral implant uygulamaları için önem arz etmektedir [35, 36]. AAO ve CAAO membranlar üzerindeki hücre yapışma ve nörit oluşum çalışmalarının standart platformlarda yapılabilmesi amacıyla ve aynı zamanda CAAO membranlar üzerinde elektrik stimülasyonlarının takibi amacıyla kendi tasarımı olan cam kuyular kullanılmıştır (Şekil 2.6).

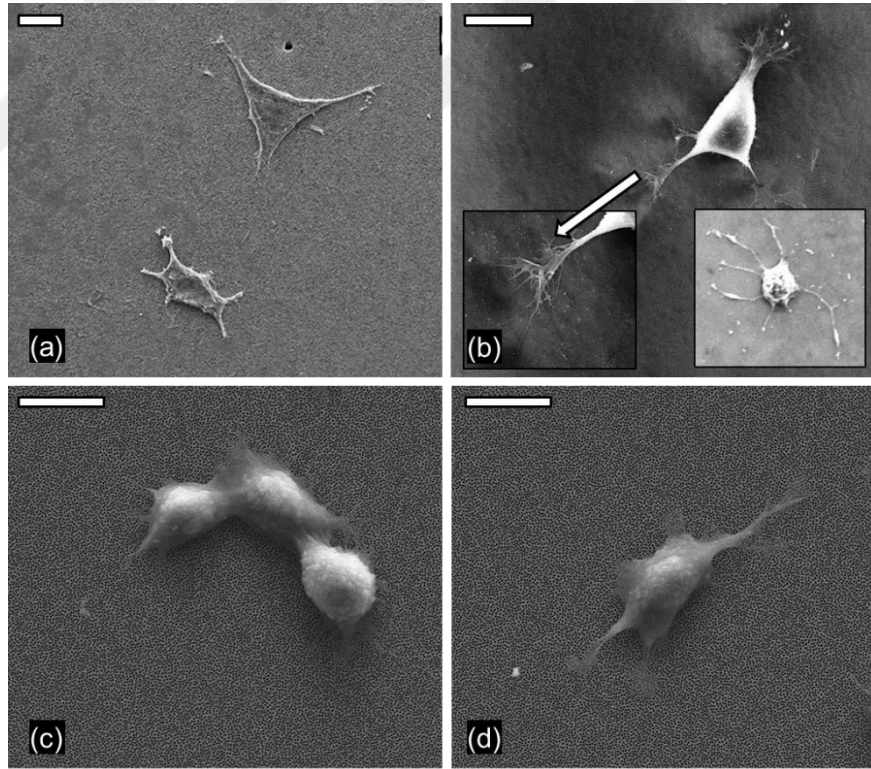
SEM görüntülemeleri için hücre fiksasyonu ile ilgili protokol optimize edildikten sonra hücre tutunum ve nörit uzama çalışmaları tamamlanmıştır. Şekil 2.7'de AAO ve CAAO membranlar üzerinde büyütülen PC12 hücre hatlarının SEM görüntüleri verilmiştir. Bu resimler 6 farklı substrat üzerinden yapışan hücre sayısını ve nörit uzunluklarını hesaplamak için kullanılmıştır. AAO, CAAO ve elektrik uygulaması için hazırlanmış elektrik uygulanmış iletken AAO (CAAO-E) membranlarında 100 ve 250 nm gözenek çapı için ve her defasında 5 rastgele yerden 3 bağımsız örnekten (n=3) alınan görüntülerle analiz edilmiştir. SEM analizleri sonrası iki önemli gözlem oluşmuştur. İlk olarak AAO membranlara CAAO membranlara göre çok fazla sayıda hücre yapıştığı gözlemlenmiştir. İkinci olarak elektrik uygulaması sonrası elde edilen nörit uzunluk verilerinin elektrik uygulaması yapılmamış yüzeylerden yüksek olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 2.6: Hücre tutunumu ve nörit uzaması için kullanılan substrat düzeneği (a). Sızma sorunu çözülmüş aktif AAO alanlı cam kuyucuklardan bir görüntü (b). Görüntü hücre çalışmaları sırasında alınmıştır.

Farklı yüzeylerde yapışan hücre popülasyonları ile ilgili sonuçlar Şekil 2.8`de verilmiştir. İncelenen substratlar arasında, 100 nm ve 250 nm gözenek çapına sahip AAO membranlar üzerinde tutunan hücre sayısı benzer çıkmış ($p > 0,7$) ve bu durum Şekil 10b ile paralellik göstermektedir. Bölüm başlangıcında da bahsedildiği üzere karbon kaplama AAO membran kimyasını değiştirmekte ve dolayısıyla kolajen kaplama etkin bir biçimde yüzeye kaplanamamaktadır. Bu durum 100 ve 250 nm gözenek çapına sahip CAAO membranlar üzerindeki hücre tutunumunu otomatik olarak düşürmektedir. CAAO ve CAAO-E membranları karşılaştırıldığında elektrik uygulamasının yapışan hücre sayısını anlamlı olarak değiştirmedeği tespit edilmiştir ($p > 0,3$ her iki AAO membran seti için).

Hücre yapışmasında yüzey morfolojisinin etkisini araştırmak için atomik seviyede düzgün alüminyum oksit substratlar ALD tekniği kullanılarak sentezlenmiştir. 50 nm kalınlığında alüminyum oksit ile kaplanan silikon yongaların pürüzlülük değeri 1,2 nm olarak ölçülmüştür (Şekil 2.9). 30 nm pürüzlülük değerine sahip 100 nm AAO memb-

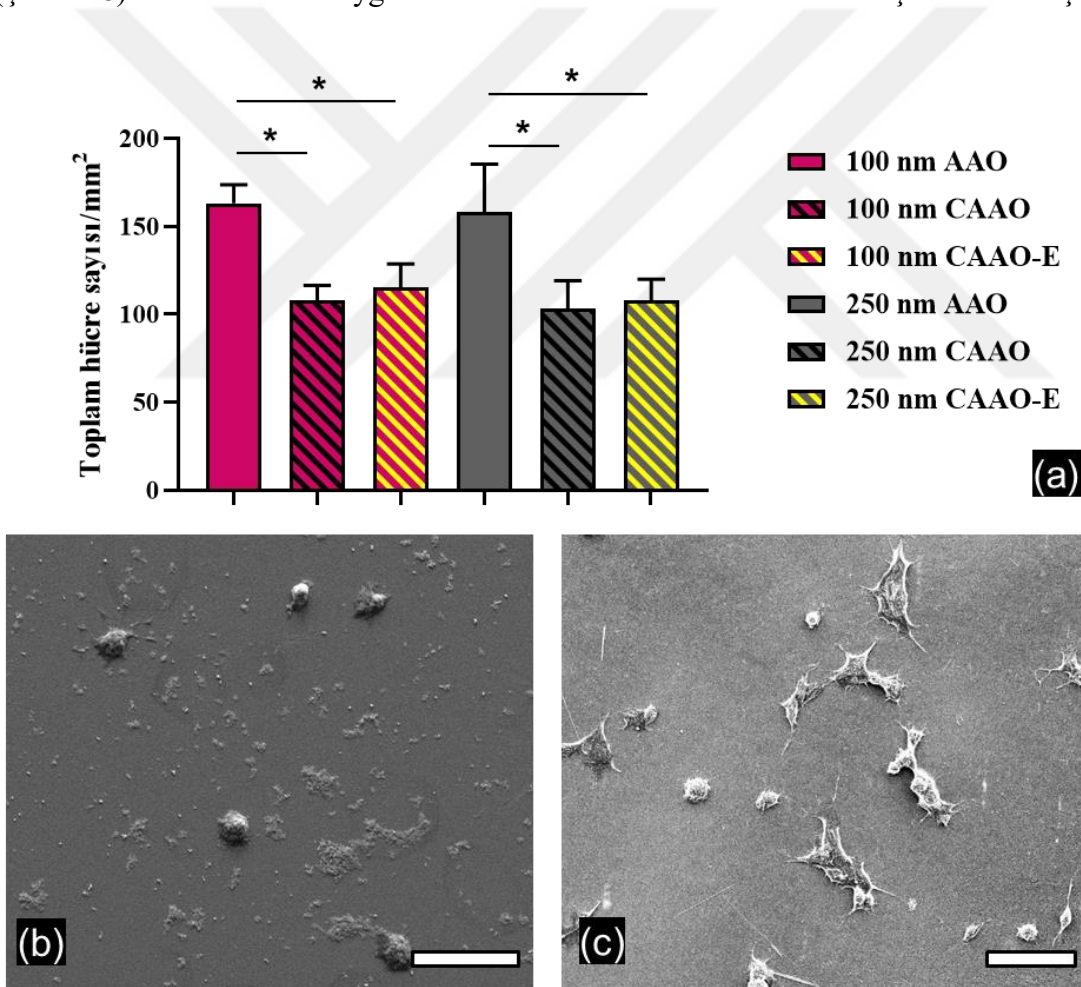


Şekil 2.7: 100 nm gözenek çapına sahip AAO (a) ve CAAO-E (b) membranlar ile 250 nm gözenek çapına sahip AAO (c) ve CAAO-E (d) membranlar üzerinde büyütülen PC12 hücrelerinin SEM görüntüleri. (b) içerisinde bulunan resimler artan nörit oluşumunu (sağ) ve elektrik uygulaması sonrası dallanmış nörit formunu (sol) göstermektedir. Çalışma 96`lık mikropalakada tamamlanmıştır. Ölçek çubukları 10 μ m uzunluğu temsil etmektedir.

ranlarla karşılaştırıldığında silikon yongalar üzerindeki hücre yapışması ve nörit oluşumu dramatik olarak düşmüştür.

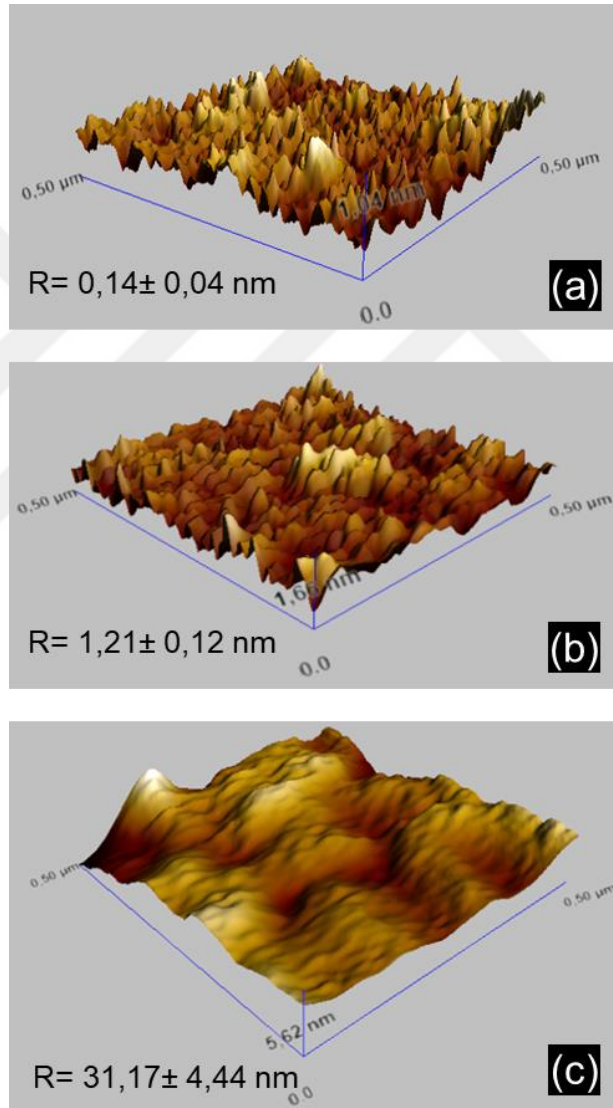
Cam kuyu tasarımı kullanılarak yapılan bu çalışmada düz alüminyum oksit üzerindeki hücre yoğunluğu $86,1 \pm 2,6$ hücre/ mm^2 olarak ölçülmüş ve bu değer en düşük tutunum değerinin bile altındadır. (CAAO mem branlar – $103,0 \pm 16,1$ hücre/ mm^2 , üstelik daha toksik, bkz. Şekil 2.5). Benzer sonuçlar osteoblastik [152], epitel [153], primer nöron [30] hücre tiplerinde de AAO membranlar üzerinde gözlemlenmiştir. Bu durum topografinin önemine ve nanotopografileri ile AAO membranların nöral biyomalzemeler olarak bir potansiyele sahip olduklarını işaret etmektedir.

Hücre yapışmasına elektrik stimülasyonunun etkisinin sınırlı kaldığı görülmüştür (Şekil 2.8). Ancak elektrik uygulaması PC12 hücrelerinin nörit davranışını dramatikçe



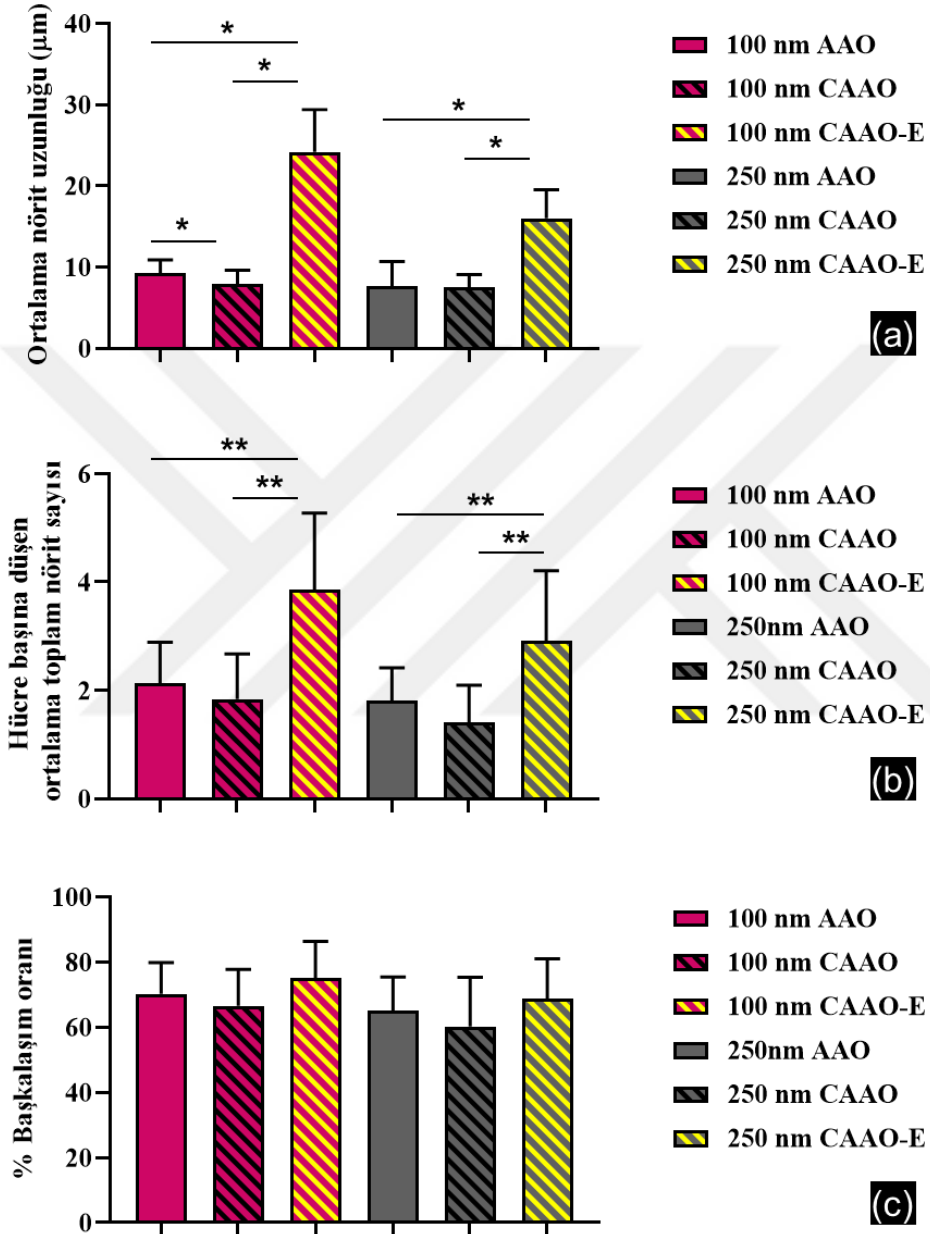
Şekil 2.8: Bar grafik 6 farklı substratın üzerinde büyütülen PC12 hücrelerinin karşılaştırmalı olarak yüzeylere yapışma eğilimini göstermektedir (a). Gözeneksiz alüminyum oksit (b) üzerinde 100 nm gözenek çapına sahip AAO membranlara (c) göre daha az hücre yapıştığını gösteren SEM resimleri. Çalışma 96'lık mikropalakada tamamlanmıştır. SEM resimlerinde bulunan ölçek çubuğu $50 \mu\text{m}$ 'yi temsil etmektedir. (* $p < 0,002$, ** $p < 0,005$)

değiştirmektedir. Şekil 2.10a ortalama nörit uzunluğu ile ilgili verileri içerirken, Şekil 2.10b`de ise hücre başına düşen nörit sayısı farklı substratlar üzerinden gösterilmektedir. Hem 100 nm hem de 250 nm gözenek çapına sahip CAAO membranlarda elektrik uygulaması ortalama nörit uzunluğunu ve sayısını artırmıştır. Bu durumun oluşmasında iletken alt taşın etkin olduğu düşünülmektedir. Özellikle 100 nm CAAO membranlardaki artış dikkat çekmektedir. Bu tip eğilimler literatürde farklı substratlar üzerinde de görülmektedir [154, 155] ve bu durum nöron ya da nöron benzer hücreler üzerinde elektrik stimülasyonunun nörorejeneratif kapasitesi ile ilgili bir durumdur.



Şekil 2.9: ALD ile alüminyum oksit kaplanmış silikon yongaların kolajen kaplanmadan önce (a) ve kaplandıktan sonraki (b) topografik profilleri. Bu görüntüler ve ilgili pürüzlülük değerleri Nanomagnetics EZ AFM cihazı kullanılarak elde edilmiştir (PPP-NCLR tip). Nanogözenekli AAO membranların kolajen kaplandıktan sonraki topografik profile ve pürüzlülük değeri (c). Görüntülerden anlaşıldığı üzere AAO membranın pürüzlülük değerleri diğer yüzeylere nazaran daha yüksektir.

Ortalama nörit sayısında açık olarak farklar oluşsa da (Şekil 2.10b) hücrelerin başkalaşım oranı sadece elektrik uygulaması ile az miktarda değişmiştir (Şekil 2.10c, $p > 0,2$). Burada, hücrelerin başkalaşımında ölçüt alınan kriter hücreler üzerindeki nöritlerin hücre çapına eşit ya da daha uzun olmasıdır [147, 148].

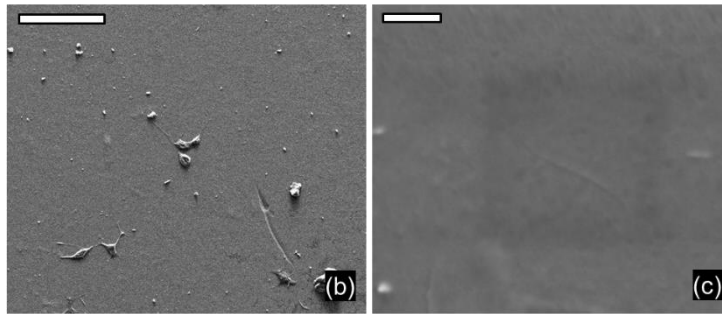
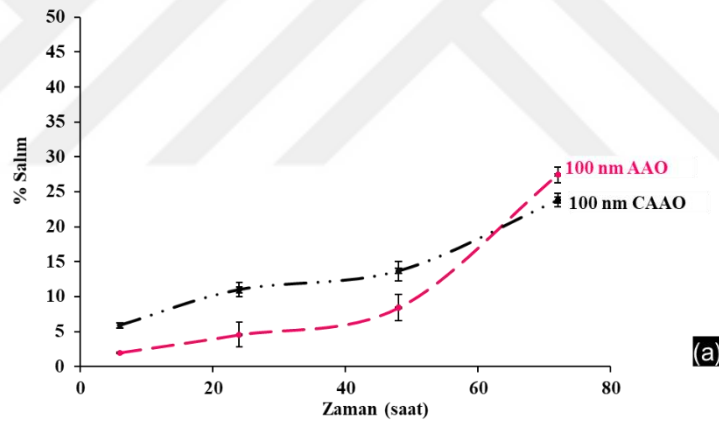


Şekil 2.10: Ortalama nörit uzunluğunu (a), hücre başına düşen nörit sayısını (b) ve % dönüşüm oranını (c) gösteren bar grafikler. Çalışma 96'lık mikropalakada tamamlanmıştır. (* $p < 0,002$ ve ** $p < 0,005$)

Fenotipteki değişim için gerekli minimum etki elektrik uygulaması ile ilgili değil besi yeri içerisindeki NGF miktarı ile ilişkilidir. Aynı miktarda NGF uygulanmış

substratlardaki hücre dönüşümü benzer biçimde gerçekleşmiş olup dönüşüm ~%70 olarak belirlenmiştir.

Nanogözenekli AAO membranların doğaları gereği barındırdıkları gözenek hacmi ilaç [14], protein, nanopartikül [28, 156] gibi malzemelerle doldurulabilir. AAO membranların nöron implant arayüzündeki ilaç salım/başkalaşım potansiyelini gösterebilmek için, 80 ng NGF en yüksek hücre tutunumunun gözlemlendiği yüzeye (100 AAO) ve en yüksek nörit uzanımının görüldüğü yüzeye (100 nm CAAO-E) katkılıdırılmıştır. Sonrasında hücre olarak elde edilen cevap standart koşullar (NGF doğrudan besi yeri içerisinde çözünmesi) ile karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmadan önce ex vivo NGF salım trendi elektrik uygulaması olmayan yüzeylerden tespit edilmiştir. Şekil 2.11`de görüldüğü üzere her iki tip membranda üzerine yüklenen NGF`nin %20`sini ilk 60 saatte salmıştır. 72 saatin sonunda ise toplam NGF`nin %25`i salınmıştır. Bu yavaş salım pekçok çalışma için avantaj olabilir [14].

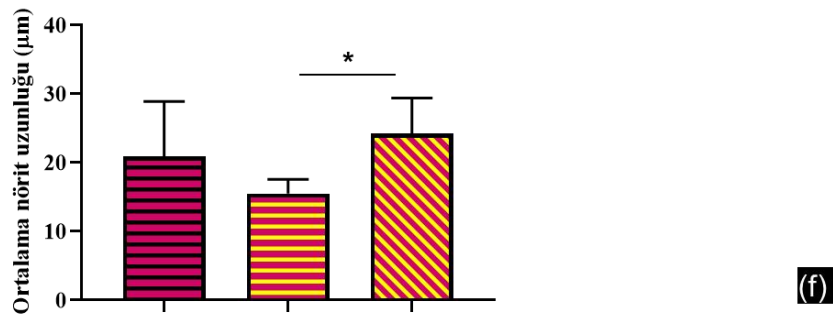
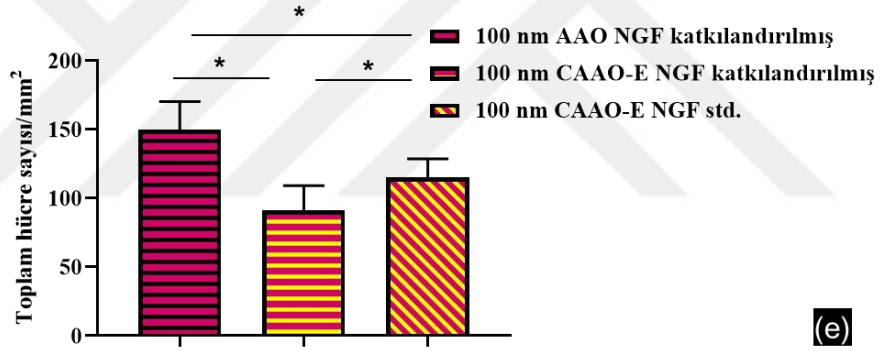
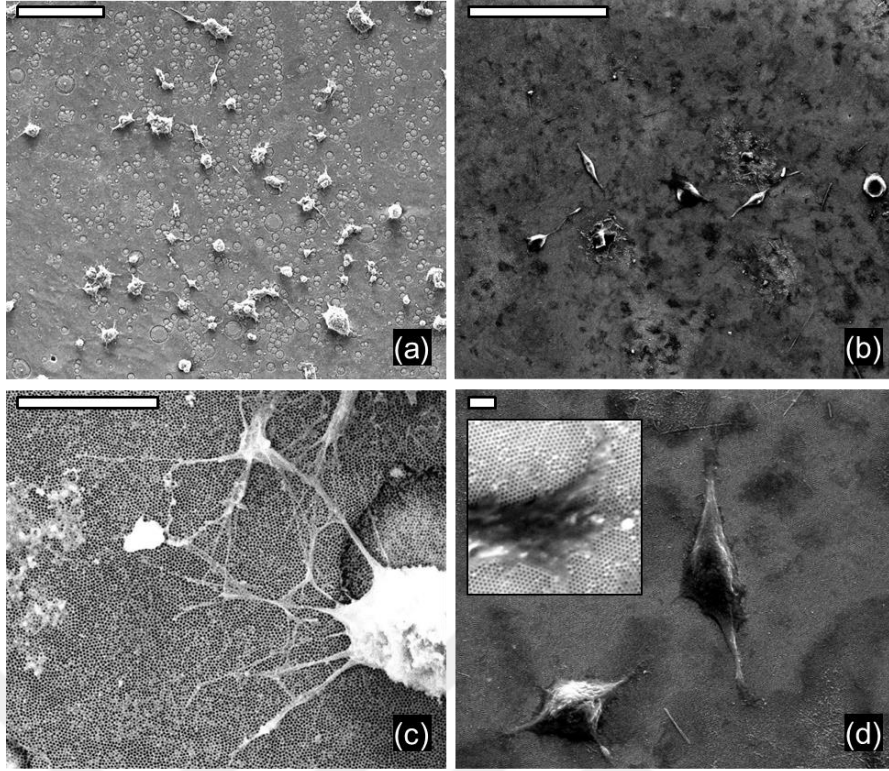


Şekil 2.11: 100 nm AAO (a) ve CAAO membranlardan (b) ex-vivo NGF salımını gösterimi, 100 ng NGF ile katkılıdırılan AAO membranlar üzerindeki düşük hücre tutunumunu (b) ve kapalı gözenekleri gösteren (c) SEM görüntüleri. Grafiklerdeki katı çizgiler verilerin takibini kolaylaştırmak için kullanılmıştır. Çalışma 96`lık mikropalakada tamamlanmıştır. SEM resimlerinde bulunan ölçek çubuğu 100 µm`yi temsil etmektedir.

NGF salınan membranlarla gerçekleştirilen in vitro çalışmalarda kendi tasarımıımız olan kuyular ($V = 1 \text{ ml}$) kullanılmış ve iki farklı senaryo ile NGF katkılandırma işlemi tamamlanmıştır. İlk olarak standart NGF uygulaması ile benzer koşullar (100 ng/ml NGF'nin %20'si $20 \text{ ng/ml} = [\text{NGF}]_{\text{standart}}$) sağlanması amacıyla yüzeyler 100 ng/ml NGF ile muamele edilmiş ve bu miktar 60 saatlik inkübasyon süresi dikkate alınarak belirlenmiştir. İkinci senaryoda ise yüksek dozdaki NGF'nin hücreler üzerindeki olumsuz etkisi görülerek membranlara 20 ng NGF katkılanması yapılmıştır. Bu durum Şekil 2.11b ve c ile doğrulanmış ve düşük hücre tutunumuna ilaveten yüzeylerde tıkanmış gözenekli yapı ile karşılaşılmıştır. Şekil 2.8'de de gösterilen standart koşullar kullanılarak büyütülen PC12 hücre hatlarının tutunum ve başkalaşım trendlerine nazaran Şekil 2.11b'de gösterilen hücrelerin daha az tutunduğu ve standart koşullara nazaran bu çalışmada başkalaşımın sınırlı kaldığı gözlemlenmiştir. Ayrıca yüzeylerde biriken protein tabakanın AAO membranın hücreler üzerindeki olumlu topografik etkisini baskıladığı düşünülmektedir (Şekil 2.11c).

20 ng NGF katkılanmış AAO ve CAAO membranlar üzerindeki PC12 hücre hatları ile ilgili sonuçları Şekil 12'de verilmiştir. Burada CAAO membranlar 1 saat elektrik uygulamasına tabi tutulmuştur. Önceki çalışmalarımızla paralel olarak bu çalışmada da AAO membranlar üzerinde tutunan hücre sayısı CAAO membranlara nazaran yüksektir (Şekil 2.12a, b). Her iki yüzeyde de düşük NGF konsantrasyonu kullanıldığı için gözenekli yapının varlığını sürdürdüğü gözlemlenmiştir (Şekil 2.12c, d) ve bu yüzden hücre yapışmasında topografik faktörler kimyasal faktörlerden öne çıkmaktadır. Şekil 2.12e ve f de hücrelerle ilgili tutunum ve nörit uzunluğu çalışmaları tamamlanmıştır. Bu çalışmalar elektrik uygulamasına tabi tutulan CAAO membranlarda nörit uzunluklarının standart yöntemlerle çalışıldığında elde edilen nörit uzunluklarından fazla olduğunu göstermiştir. Katkılandırılmış 100 nm AAO membran beklendiği gibi en yüksek hücre tutunum davranışının gözlemlendiği substrattır. Elde edilen tutunum değeri ($149,5 \pm 20,7 \text{ hücre/ml}$) (Şekil 2.12e) normal koşullarda elde edilen tutunum değeri ($163,0 \pm 10,7 \text{ hücre/ml}$) (Şekil 2.8a) ile benzerdir.

NGF katkılandırılmış CAAO membranlardaki hem hücre tutunumu hem de nörit uzunlukları standart koşullarda kullanılan CAAO membranların bu değerlerinden düşük olduğundan NGF katkılamanın 100 nm CAAO-E numuneler üzerinde negatif etkiye sahip olduğu söylenebilir. Ancak, katkılandırma çalışmalarında kullanılan AAO membranlar üzerindeki hücrelerin ortalama nörit uzunluğu standart uygulamadaki nö-



Şekil 2.12: 20 ng NGF ile katkılandırılmış AAO (a, c) ve CAAO membranlar üzerindeki PC12 hücrelerinin düşük ve yüksek büyütmedeki SEM görüntüleri. Şekil 21c ve d iç resimde görüldüğü üzere protein katkılaması sonrası gözenekler açıktır. Hücre yapışması (e) ve ortalama nörit uzunluğu (f) standart NGF uygulaması ve katkılandırma uygulaması sonrası gösterilmiştir. Çalışma 96'lık mikroyakada tamamlanmıştır. Tek yönlü ANOVA sonrası Scheffe testi yapılarak istatistiksel karşılaştırma yapılmıştır ($p < 0,05$). a ve b için ölçek çubuğu 10 µm, c ve d için 5 µm'dir.

rit uzunluklarının (Şekil 2.10a) neredeyse üç katıdır ve normal koşullarda kullanılan CAAO-E membranlar ile bu değer yakındır (Şekil 2.12f, $p > 0,05$). Standart koşullar uygulandığında 100 nm AAO membranlar kimyasal ve topografik özelliklerinden dolayı yüksek hücre tutunumu göstermektedirler. Ancak uygun miktarda NGF ile katkılandırıldıklarında tıpkı elektrik uygulanmış CAAO membranlar gibi onların üzerinde de ortalama nörit uzunlukları fazla olan hücreler oluşmakta ve hücre yapışma trendi kendi doğası ile uyumlu bir eğilim göstermektedir. Bu parametrelerin PC12 hücrelerindeki nöritlerin oluşması ve uzamasında önemli rol oynadığı gösterilmiş olup, protein salımı yapan AAO membranlar üzerindeki boşlukların içerisinde bulunan artırılmış bölgesel NGF konsantrasyonunun altta yatan sebep olabileceği düşünülmektedir [145].

2.4 Sonuç

Tezin bu bölümünde AAO membranlar doğrudan kullanılmış ve üzerlerine yapılan karbon kaplama ile iletken hale getirilmişlerdir. PC12 hücre hatlarının NGF, gözenek çapı ve elektrik uygulamalarına bağlı olarak verdiği hücresel cevaplar analiz edilmiştir. PC12 hücre davranışları AAO ve CAAO membranlar üzerinde hücre canlılığı, yapışması ve nörit uzaması gibi parametreler dikkate alınarak incelenmiştir. 100 ve 250 nm gözenek çapına sahip AAO membranlar sentezlenmiş ve iletken CAAO membranların eldesi için AAO membranlar ince karbon tabakası ile kaplanmışlardır. AAO membranların her iki gözenek çapı içinde hücreler açısından toksik olmadığı görülmüştür. Yine her iki gözenek çapı için de düşük hücre yapışması CAAO membranlarda gözlemlenmiştir. Benzer durumla gözeneksiz alüminyum oksit yüzeylerde de karşılaşılmıştır. Ancak ortalama nörit uzunluğu ve hücre başına düşen nörit sayısı elektrik uygulanmış CAAO membranlarda önemli ölçüde artmıştır. NGF katkılanması yapıldığında örneklerde artan bir hücre yapışması ve nörit uzaması gözlemlenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar, NGF katkılama koşulları optimize edildiğinde, 100 nm gözenek çapına sahip AAO membranların PC12 hücrelerinin yapışmasında elektrik uygulanmış CAAO membranlara nazaran ideal platformlar olduğunu göstermektedir. Bu yüzeylerde nörit uzamasının CAAO-E membranlardaki uzama miktarları ile eş değer olduğu görülmüştür. Artırılmış hücre yapışması ve tetiklenmiş başkalaşım nöroimplantlarda aranan özelliklerdir ve çalışmamızda tespit ettiğimiz durumlar protein katkılandırılmış nanogözenekli AAO membranların bu iki

Özellik açısından da nroimplant teknolojisinde kullanıma uygun olduğunu göstermektedir. Örneğin, termal olarak buharlaştırılan alüminyum elektrot yüzeylerinde bu tip bir oksit kaplamaya dönüştürülebilir ve elektrot empedansı değiştirilmeden bu filmlerin kalınlığı ayarlanabilir.





3. TİYOFİAVİN T MODİFİYE NANODESENLEMELİ POLİMERİK YÜZEY ARTILMIŞ RAMAN SPEKTROSKOPİSİ SUBSTRATLARININ AMİLOİD β 1-42 PEPTİTLERİNİN ULTRA HASSAS DEDEKSİYONUNDA KULLANIMI

3.1 Amaç

Tezdeki bu çalışmanın amacı, AAO kalıplar kullanılarak üretilen nanomotifli PK filmlerin Alzheimer hastalığının teşhisinde biyoalgılayıcı platformlar olarak kullanımının araştırılmasıdır. Elde edilen PK filmlerin motifleme biçimleri gibi koşullar optimize edilerek bir tanı test modeli ortaya çıkarılması hedeflenmiştir. Bu hedeflere ek olarak ThT molekülü ile modifiye edilmiş ve edilmemiş yüzeylerin A β 1-42 peptiti ile olan etkileşimlerinin su ve yapay salya çözeltisi içerisinde SERS aracılığıyla incelenmesi amaçlanmıştır.

Literatür incelendiğinde gerek ThT'nin gerekse A β 1-42'nin varlığının SERS metodu aracılığıyla tespitini içeren çalışmalar mevcuttur. Bizim çalışmamızdaki en yenilikçi yön AAO kalıplar vasıtasıyla oluşturulan oval ve çatallı başlıklı nanomotifli PK platformların A β 1-42'nin varlığını algılama ve tayini için ilk defa kullanılacak olmasıdır. Bu tip nanomorfolojiye sahip yüzeylerin SERS aktif yüzeyler olduğu önceki çalışmalarımızda gösterilmiştir [45].

Çatallı yapıda oluşturulacak PK nanokolonlarla güttüğümüz amaç birim alandaki metal adacık sayısını çoğaltmak ve sinyal artırıcı nokta (hotspot) yoğunluğunu artırmaktır ve bu yönde literatürde bir çalışma yoktur. Buna ek olarak literatürde ilk olarak A β 1-42'yi tayin edecek SERS platformları (nanomotifli PK yüzey) ölçümlerin tekrarlanabilirliğinin, yüzeylerin dayanıklılığının (Altın kaplanmış yüzeyde yıkamayla değişmeyecek kararlı sinyaller) tespiti amacı ile ThT modifikasyonu ile çalışılmıştır. Literatürde başka amaçlar için metal yüzeyler ThT ile modifiye edilmiştir ve bunlar yol gösterici olarak çalışmamızda kullanılmıştır. Elde edilen yüzeylerle A β 1-42 varlığı çeşitli şekillerde tespit edilebilir. İlk düşündüğümüz yöntem A β 1-42 varlığına bağlı olarak 572-1580 cm^{-1} bant aralığında oluşacak konsantrasyon ilintili sinyal artırımındır. Söz konusu sinyal artırımını ThT kaplanmamış yüzeylerde de incelenmiştir. Ancak, yukarıda bahsedilen özgüllük, tekrarlanabilirlik ve dayanım kriterlerinden dolayı böyle bir platformda gerçek örneklerde yanlış pozitiflerin ve yıkamaya bağlı sinyal kayıplarının oluşabileceği görülmüş ve çalışmalarda ThT kaplanmış yüzeylere

yoğunlaşmıştır. Bunlara ek olarak incelenen parametreler ThT SERS sinyalinin konsantrasyon ve altın kaplama kalınlığına bağlı olarak değişimidir.

Genel olarak, üretilmesi amaçlanan tanı test modelinin yukarıda belirtilen özellikler sebebiyle düşük konsantrasyonlarda protein tespitine olanak verebilecek özellikte olduğu düşünülmektedir.

3.2 Materyal ve Yöntemler

3.2.1 Materyaller

Çalışma sırasında kullanılan alüminyum folyo (Puratronic, %99,99), oktadesiltrimetoksisilan (ODS), metilen mavisi (MB) Alfa Aesar firmasından temin edilmiştir. H₃PO₄ (%85) BDH Prolabo firmasından, HCl (%37), okzalik asit (%99), diklorometan (DCM), hekzan, etanol, trietilortosilikat (TEOS), tiyoflavin T (ThT), A β 1-42, PK (Bisfenol A, 300 °C/1,2 kg) ve NaOH Sigma-Aldrich firmasından satın alınmıştır. H₂SO₄ (%95-98), CrO₃ Fluka firmasından alınmıştır.

Çalışma sırasında akım-voltaj kaynağı (Sorensen), SEM (Quanta 200 FEI), fiziksel buhar biriktirme cihazı (Nanovak, HD), Raman spektroskopisi cihazı (CCD dedektör, Delta Nu “Examiner Laramie”) cihazı kullanılmıştır. Simülasyonlar Lumerical FDTD simülasyon programı (Lumerical Solutions Inc.) kullanılarak tamamlanmıştır.

3.2.2 Deneysel yöntemler

3.2.2.1 AAO kalıpların ve PK nanodesenlemeli yüzeylerin sentez ve karakterizasyonu

Çalışma kapsamında iki farklı kolon yapısında AAO kalıp sentezlenmiştir. Standart AAO kalıplar iki aşamalı anodizasyon tekniği kullanılarak sentezlenmiştir [45, 157]. Kısaca yüksek saflıktaki alüminyum folyo 600 gritlik zımpara ile mekanik olarak temizlenip su (DI, 18 M Ω) ile yıkandıktan sonra hacimde ağırlıkça %95 H₃PO₄, %5 H₂SO₄ ve 20 g/ml CrO₃ karışımında 65°C`de elektrokimyasal olarak temizlenmiştir. Temizlenen alüminyum tabaka 0,3 M okzalik asit çözeltisi içerisinde 12 saat boyunca 50 V potansiyel fark altında 5 °C`de anodize edilmiştir. Alüminyum tabakanın her iki tarafında da oluşan ve bozuk gözenek dağılımına sahip oksit tabaka 75° C`de 0,4 M H₃PO₄ and 0,2 M CrO₃ çözeltisinde uzaklaştırılmıştır. İkinci anodizasyon aşaması ise

ilk anodizasyon aşaması ile benzer koşullarda 3 dk boyunca sürdürülmüştür. Bu yolla 300 nm gözenek derinliğine sahip standart AAO kalıplar alüminyum folyo üzerinde elde edilmiştir. Son olarak standart AAO kalıplar hacimce %5 H₃PO₄ çözeltisine 52 dk boyunca daldırılarak, kalıbın gözenek çapı 100 nm`ye ulaştırılmıştır.

Multi-çatallanmış AAO kalıpların sentezi için iki aşamalı anodizasyon sonrası kalıplar 0,3 M H₂SO₄ çözeltisi ile 25 V potansiyel fark altında 0 °C anodizasyon yapılmıştır. Multi-çatallanmış AAO kalıpların gözeneklerinin açılmasında iki aşamalı bir yol izlenmiştir. İlk olarak ikinci anodizasyon aşamasının ardından 25 dk, sülfürik asit anodizasyonu sonrası 27 dk AAO kalıplar %5 H₃PO₄ çözeltisine daldırılmıştır.

Standart ve multi-çatallanmış AAO kalıplar damla yayma tekniği için kalıp olarak kullanılmıştır [63] ve bu kalıpların morfolojileri PK yüzeyler üzerine transfer edilerek silindir (SDS) ve multi çatal desenli (MDS) substratlar elde edilmiştir. Yapışmaz AAO kalıpların eldesi için yüzeyler 10 mM oktadesiltrietoksisilane (ODS):DCM çözeltisi ile muamele edilmiştir. Silanlama işleminden sonra filmler 100 °C fırında 4 saat bekletilmiştir. SDS`lerin hazırlanması amacıyla 5 ml hacimde ağırlıkça %6`lık PK çözeltisi standart AAO kalıp üzerine yayılmıştır. Solventin uçması için 1 günlük süre beklendikten sonra filmler tek yöne doğru kalıplar üzerinden kaldırılmış ve SDS yüzeyler elde edilmiştir [45, 63]. Öte yandan, MDS yüzeyler iki aşamalı damla yayma yöntemi kullanılarak sentezlenmiştir. İlk olarak düşük viskoziteli hacimde ağırlıkça %1`lik PK çözeltisi multi-çatallanmış AAO kalıba dökülmüş ve solventin uçurulması için yapı +4°C`de 1 gece bekletilmiştir. Ardından hacimde ağırlıkça %6`lık PK çözeltisi ile muamele edilen örnekler 1 gece kurumaya bırakılmış ve benzer prosedürle MDS yüzeyler elde edilmiştir. Son olarak düz silikon yongalar üzerine PK çözeltisi yayılmış ve düz polimer substratlar (DPS) benzer prosedürle elde edilmiştir.

Üretilen kalıpların morfolojilerinin doğrulanabilmesi amacıyla kalıp temelli sol-jel kimyasından faydalanılmıştır [158, 159]. İlk olarak kalıplar DI su ile yıkanmış ve 100 °C fırında kurutulmuştur. Etanol, trietilortosilikat (TEOS) ve 1 M HCl karışımı hacimsel 50:5:1 oranı ile hazırlanmıştır. Hidroliz sürecinden sonra kalıplar bu çözelti ile 5 dk muamele edilmiş ve 3 saat fırında kurumaya bırakılmıştır. Son olarak kalıp 0,1 M NaOH solusyonunda uzaklaştırılmış ve serbest haldeki silika nanotest tüpler filtrelenmiş ve “Whatman Nucleopore Track Etch” membrane filtre üzerinde su ile

yıkanmıştır. Görüntüleme amaçlı tüpler 10 nm Au-Pd ile kaplanmış ve SEM görüntülemeleri yapılmıştır.

3.2.2.2 Altın kaplama, ThT modifikasyonu ve SERS ölçümleri

SDS, MDS ve DPS'ler ThT modifikasyonu öncesi 10, 20 ve 30 nm kalınlığında altın ile 10^{-5} torr basınç altında 0,1 kA/sec kaplama hızında termal buharlaştırıcı kullanılarak kaplanmıştır. Gerektiğinde altın kaplanmış yüzeyler SEM aracılığı ile görüntülenmiştir. Metal evaporasyonundan sonra, örnekler farklı konsantrasyonlardaki sulu ThT çözeltilerine 28 °C`de 12 saat boyunca daldırılmıştır. Ardından örnekler su ile yıkanmış ve oda sıcaklığında kurutulmuştur [68]. Üretilen substratların SERS spektrumları Raman modülü tarafından CCD dedektör kullanılarak toplanmıştır. Ölçümler 785 nm lazer kaynağı kullanılarak 150 mW güçte ve 3 µm lazer spot büyüklüğü kullanılarak 60 saniyelik ölçüm zamanlaması ile tamamlanmıştır. Her spektrum 9 ölçümün ortalamasını temsil etmektedir. Bu 9 nokta 3 farklı örneğin 3 farklı noktasından edinilmiştir (n=3). SERS sinyallerinin tekrarlanabilirliği 3 bağımsız örneğin rastgele noktalarından elde edilen spektrumlar (>10 nokta) vasıtasıyla sunulmuştur.

3.2.2.3 FDTD simülasyonları

Maxwell eşitliklerini çözmekte güvenilir bir yöntem olan 3D-dalga vektör zaman domeninde sonlu farklar yöntemi (FDTD) metodu kullanılarak SDS ve MDS filmler üzerindeki elektrik alan şiddeti simüle edilmiştir. Lumerical FDTD yazılımı (Lumerical Solutions, Inc) kullanılarak FDTD hesaplamaları yürütülmüştür. Sınır koşullarında kaynak (field-scattered field source), nano yapılar ve monitör aynı eksen üzerine yerleştirilmiştir. Çalışmada, ışık kaynaktan z-ekseni boyunca gönderilmiştir (λ merkez = 785 nm, zaman offset $1,5 \times 10^{-14}$ s). Simülasyonda etkileşim ortamı hava olarak alınmıştır. Antisimetrik ve simetrik sınır koşulları sırasıyla x veya eksenlerinde kullanılmıştır. Absorber tabaka olarak z ekseninde yerleştirilmiş tabaka (a stretched perfect matching layer) kullanılmıştır. Hesaplama zamanı 100 fs, hesaplama adım büyüklüğü 0,00113 fs olarak belirlenmiştir.

3.2.2.4 Artma faktörünün hesaplanması

Hem ThT hem de MB artma faktörünün hesaplanmasında kullanılmıştır (Eşitlik 3.1) [37, 40]. Bu amaçla 10^{-3} M sulu boya çözeltilerinin $10 \mu\text{l}$ 'si metal kaplı MDS ve DPS üzerine damlatılmıştır. Örnekler kurutulduktan sonra, SERS spektrumları aynı koşullarda toplanmıştır.

$$\text{Artma faktörü} = (N_{\text{RAMAN}} \times I_{\text{SERS}}) / (N_{\text{SERS}} \times I_{\text{RAMAN}}) \quad (3.1)$$

I_{SERS} ve I_{RAMAN} MDS ve DPS üzerindeki ThT'nin 1601 cm^{-1} 'deki sinyal şiddetini göstermektedir. Bu değerler MB için 1620 cm^{-1} 'den alınmıştır. N_{SERS} ve N_{RAMAN} ise aynı örnekler için aynı alandaki molekül sayısını temsil etmektedir.

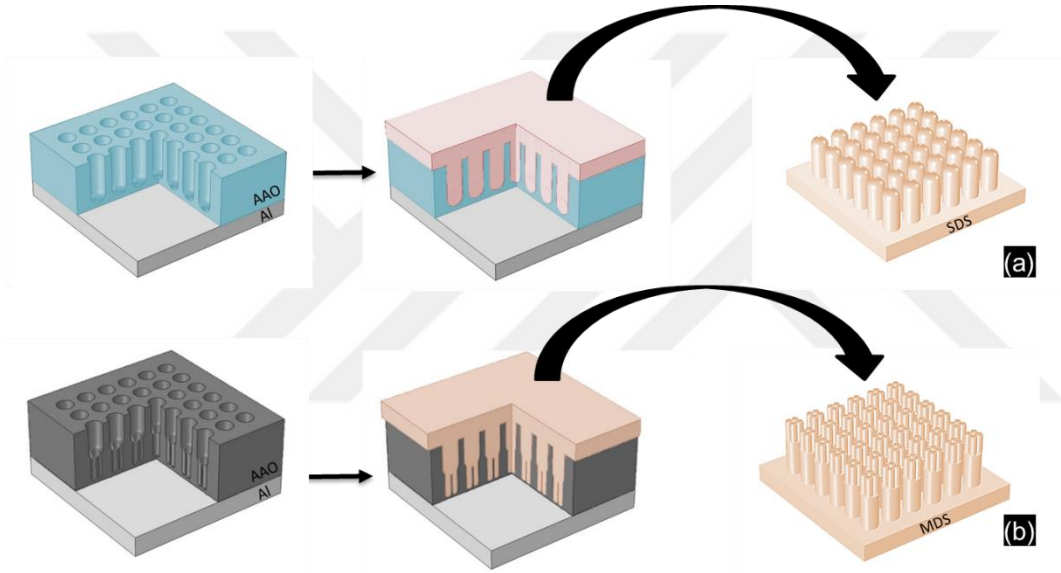
3.2.2.5 A β 1-42 miktar analizleri

ThT modifiye substratlar sulu A β 1-42 çözeltilerine farklı konsantrasyonlarda 12 saat boyunca $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de daldırılmıştır. Artan peptit konsantrasyonuna bağlı olarak 1601 cm^{-1} 'deki ThT sinyallerinin değişimi takip edilmiştir ve tespit edilen en düşük konsantrasyon (LOD: limit of detection) lineerliğin bittiği nokta tespit edilerek bulunmuştur [160]. Dinamik aralık hesaplamalarında maksimum A β 1-42 konsantrasyonu baskılanan ThT sinyallerinin 1601 cm^{-1} 'deki sinyal gürültü oranı dikkate alınarak tanımlanmıştır. Belli deneyler, peptit çözeltileri su yerine yapay salya çözeltileri içerisinde hazırlanmıştır. Yapay salya çözeltileri Ionta ve ark. tarafından önerilen prosedürle hazırlanmıştır [161]. ThT'nin 1601 cm^{-1} 'deki sinyal şiddeti ile ilgili istatistiksel analizler eşleşmemiş "Student's t test" kullanılarak farklı peptit konsantrasyonlarının uygulanması sonrası tamamlanmıştır ($p < 0,05$).

3.3 Tartışma

Şekil 3.1a'da SDS'lerin silindirik kolon yapısına sahip standart AAO membranlardan damla yayma yöntemi kullanılarak nasıl üretildikleri gösterilmiştir. Bu nanogözenekli kalıplar okzalik asit elektroliti içerisinde iki aşamalı anodizasyon protokolü ile üretilmiştir [157]. Ardından tüm numuneler yüzey enerjilerinin azaltılması ve tekrar kullanılabilir olmaları amacıyla ODS solüsyonu ile muamele edilmiştir. PK uygun refraktif indeks ve yüksek transmitans özellikleri nedeniyle optoelektronik uygulamalarında sıklıkla kullanılır. Özellikle damla yayma uygulamalarında, nanodesenli kalıplardan desen kopyalamada başarılı sonuçlar elde edilmektedir.

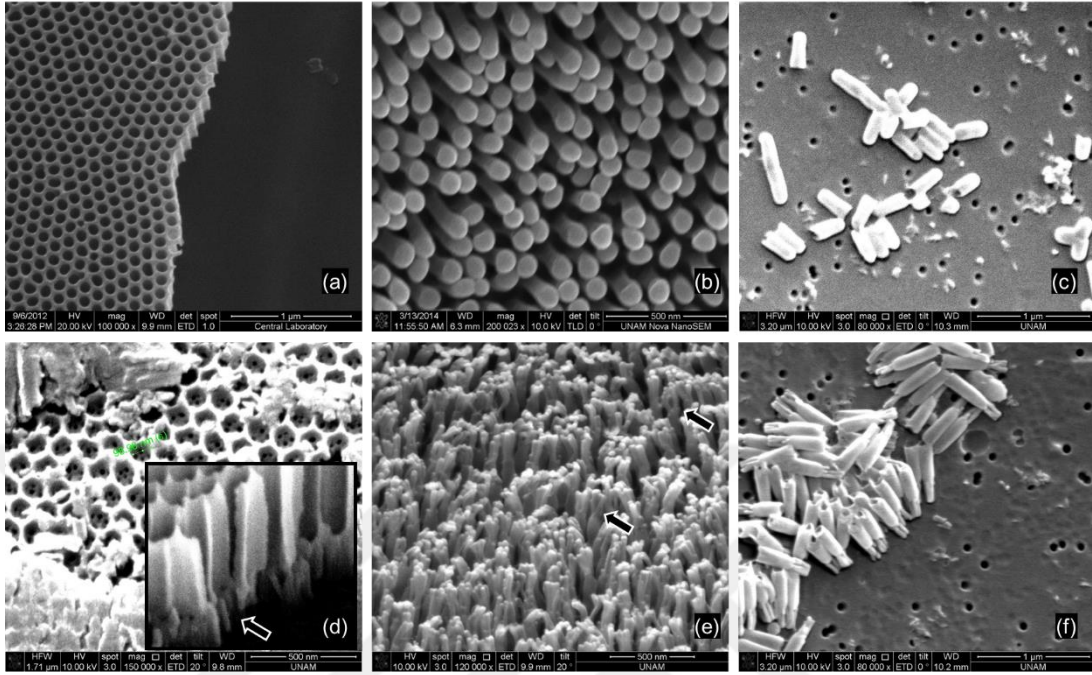
Nanodesenli filmlerin solvent uçurulduktan sonra yüzeyden kolaylıkla kaldırılabildiği gösterilmiştir [63]. Önceki çalışmalarda altın modifiye nanodesenli PK yüzeylerin SERS substratı olarak kullanımı gösterilmiş ve pM hassasiyette R6G tespit edilebildiği rapor edilmiştir [45]. Bu tip yüzeylerin hassasiyetini artırmak için makul bir yaklaşım ise nanodesen sıklığını artırmaktır. Böylece yüzeyde aynı geometrik alanda oluşacak sıcak nokta sayısı artırılmış olacak ve sinyal şiddeti artırılacaktır. Bu amaçla Multi-çatallanmış AAO kalıplar sentezlenmiştir [162] (Şekil 3.1b). Üçüncü anodizasyon sülfürik asit içerisinde gerçekleştirilmiş ve geniş silindir kolonlar içerisinde daha dar gözenekler elde edilmiştir. Ardından damla yayma yöntemiyle küçük gözenekler sayesinde MDS'ler elde edilmiştir.



Şekil 3.1 : SDS (a) ve MDS'lerin (b) silindirik ve multi-çatallanmış kolon yapılı AAO membranlardan elde edilmesinin şematik gösterimi. Hidrofobik hale getirilmiş AAO membranlara PK solüsyonları damlatılmış ve solventler uzaklaştırılıp filmler elde edilmiştir.

AAO membranların ve nanodesenli filmlerin karakterizasyonu SEM kullanılarak tamamlanmıştır (Şekil 3.2). Standart AAO membranlar iki aşamalı anodizasyonla okzalik asit içerisinde düzenli silindirik gözeneklere sahip olarak sentezlenmiştir (Şekil 3.2a) ve bu kalıplardan damla yayma yöntemi ile SDS'ler elde edilmiştir (Şekil 3.2b). Nanoyapılar incelendiğinde üst kısımlarının alt kısımlarına göre daha geniş olduğu görülmektedir. Bu durumun filmlerin kaldırılması sırasında uygulanan kuvvetten kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu yaklaşımı doğrulamak için kalıplar Martin ve ark. tarafından literatüre kazandırılan kalıp temelli sol-jel kimyası kullanılarak sentezlenen silika nanotest tüplerin üretiminde kullanılmıştır [163]. Bu

yaklaşımında katı silika katmanları AAO membranının duvarlarında birikme yapmaktadır ve kalıp uzaklaştırıldığında kalıbın kolon yapısını büyük oranda taklit eden silika nanotest tüpler elde edilmiştir [143, 158] (Şekil 3.2c).



Şekil 3.2 : Standart (a), multi-çatallanmış (d) AAO membranların, SDS (b) ve MDS`lerin (e) SEM görüntüsü. Dallanma noktaları ok ile gösterilmiştir. Silindirik ve multi-çatallanmış yapı ayrıca sol-jel kimyası temelli olarak sentezlenen silika nanotest tüpler ile de düz (c) ve dallanmış (f) topografi de gösterilmiştir.

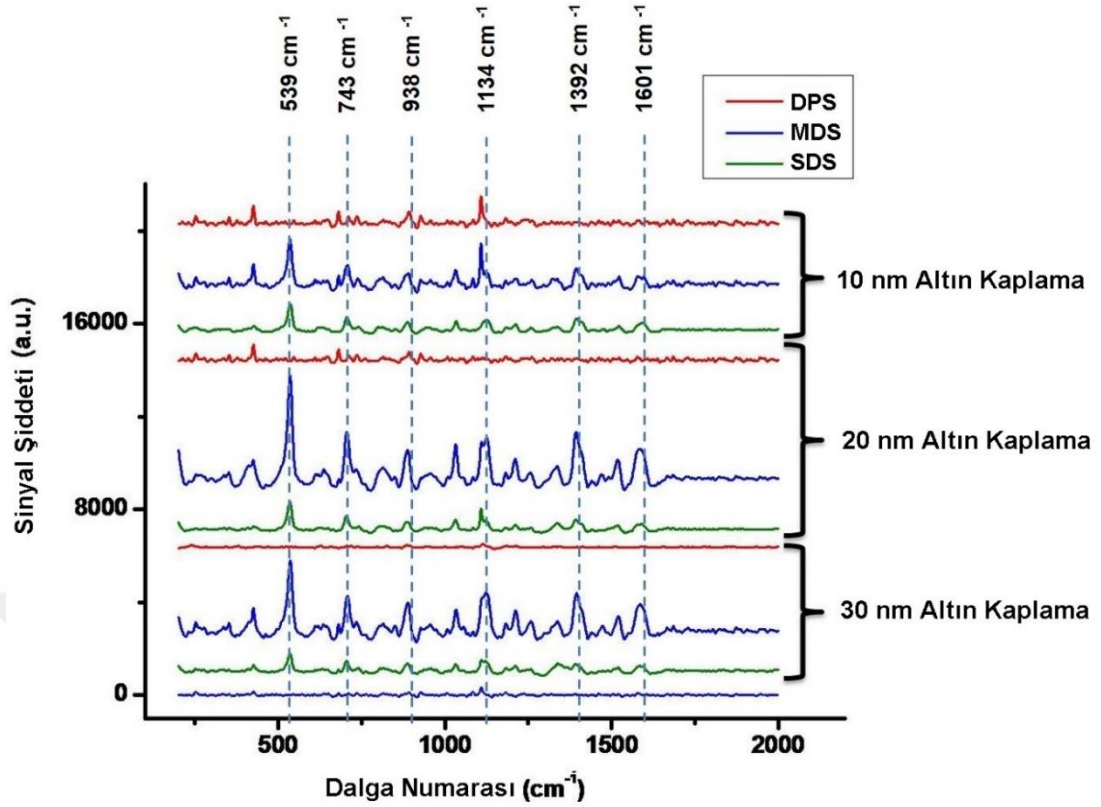
Şekil 3.2d`de çatallı daralmış gözenekler (~ 20 nm çaplı) daha büyük silindirik gözenekler ile sülfürik asit anodizasyonu sonrası gösterilmiştir. Anodik alüminada hiyerarşik gözenek geometrisi voltaj değişimi ile elde edilebiliyor olmasına [162] rağmen tekrarlanabilir desen transferi için elektrolit değişimi stratejisi tercih edilmiştir. Büyük alan MDS`ler (~ 50 cm²) bu kalıplar kullanılarak sentezlenmiştir ve üretilen yapılar aynı nanokökten çıkan dallanmış çoklu uzantılar şeklindedir (Şekil 3.2e). Yumuşak doğası gereği nanoyapılar katlanma ve bükülme gösterse de MDS`lerin farklı noktalarında dallanma gösterilmiştir. Kolay gözlem için sol-jel ile sentezlenen dallanmış silika nanotest tüpler kullanılmıştır. Beklendiği üzere üretilen silika nanotest tüpler aşağıya doğru daralmakta ve dallanma göstermektedir (Şekil 3.2f).

SDS`lerin SERS substratı olarak kullanım potansiyeli Raman raportörü olan RG6 kullanılarak önceki çalışmalarda gösterilmiştir [63]. MDS`lerin SERS temelli biyosensör çalışmalarında kullanımının gösterilmesi için A β 1-42 peptitlerince zengin

amiloid plakalarının arasına spesifik olarak giren ThT seçilmiştir [65]. Bu molekül ayrıca plazmonik metal nanoparçacıklara kovalent olarak bağlandıktan sonra Raman spesifik sinyaller vermektedir [67, 69]. ThT SERS sinyallerinin A β 1-42 ile etkileşimi sonrası potansiyel varyasyonu bu biyosensör çalışmasının temelini oluşturmaktadır. SERS aktif yüzeyler ve molekül arasındaki özel etkileşim ile Raman ölçümlerine nazaran düşük konsantrasyonlarda biyomolekül dedeksiyonu mümkün olmaktadır [164]. Şekil 3.3 DPS, MDS ve SDS`lerin farklı altın kaplama kalınlıkları sonrası ThT ile modifiye olduğunu göstermiştir. Karakteristik ThT sinyalleri 539, 743, 938, 1134, 1392 ve 1601 cm⁻¹ dalga numaralarında bütün nanodesenli filmler üzerinde elde edilmiştir [67] ve ilgili dalga numaralarının hangi vibrasyon modlarına karşılık geldiği Çizelge 3.1`de gösterilmiştir.

Şekil 3.3`te gösterildiği üzere, ultra düz silikon yongalar üzerinde damla yayma yöntemi ile elde edilen DPS`lerden altın kalınlığına bakılmaksızın en düşük sinyaller elde edilmiştir. Bu tip filmlerde plazmonik parçacıkların oluşma ihtimali çok düşüktür. Bu arada, 10, 20 ve 30 nm kalınlıkların tamamında en yüksek SERS sinyalleri MDS`ler üzerinde elde edilmiştir. Bu durum çok sayıda plazmonik yapının nanodallanmalar arasında oluştuğunun artan yüzey alanı ile sağlandığını göstermiştir. Dallanma ile birlikte plazmonik metal parçacıkları arasında nanoboşlukların oluşma ihtimalinin arttığı düşünülmektedir. Nanoboşluk temelli sıcak noktaların benzer nanoyüzeylere nazaran elektrik alan artırımını daha iyi sağladığı rapor edilmiştir [45]. Farklı kaplama kalınlıklarında MDS`lerden elde edilen sinyaller incelendiğinde, 20 nm altın kaplamada en yüksek ThT SERS sinyallerinin elde edildiği gösterilmiştir. Çalışmanın bundan sonraki kısmında 20 nm altın kaplı MDS`ler kullanılmıştır (Au@MDS).

SDS yüzeylere göre MDS yüzeylerdeki artan sıcak nokta oluşum ihtimali FDTD kullanılarak analiz edilmiştir. SEM görüntülerinden yola çıkarak oluşturulan geometri simülasyona uygulandığında dallanma arttıkça sıcak nokta oluşum ihtimalinin arttığını göstermiştir (Şekil 3.4). Bu sıcak noktaların oluşumunda elektromanyetik artma faktörlerinin kimyasal artma faktörlerine nazaran etkin olduğu düşünülmektedir. Optimum kaplama kalınlığında (20 nm) çatallar arasında oluşan nano boşluk kimyasal olarak adsorbe olmuş ThT molekülleri etrafında nanoanten olarak davranmakta ve sinyal gücünü artırmaktadır.

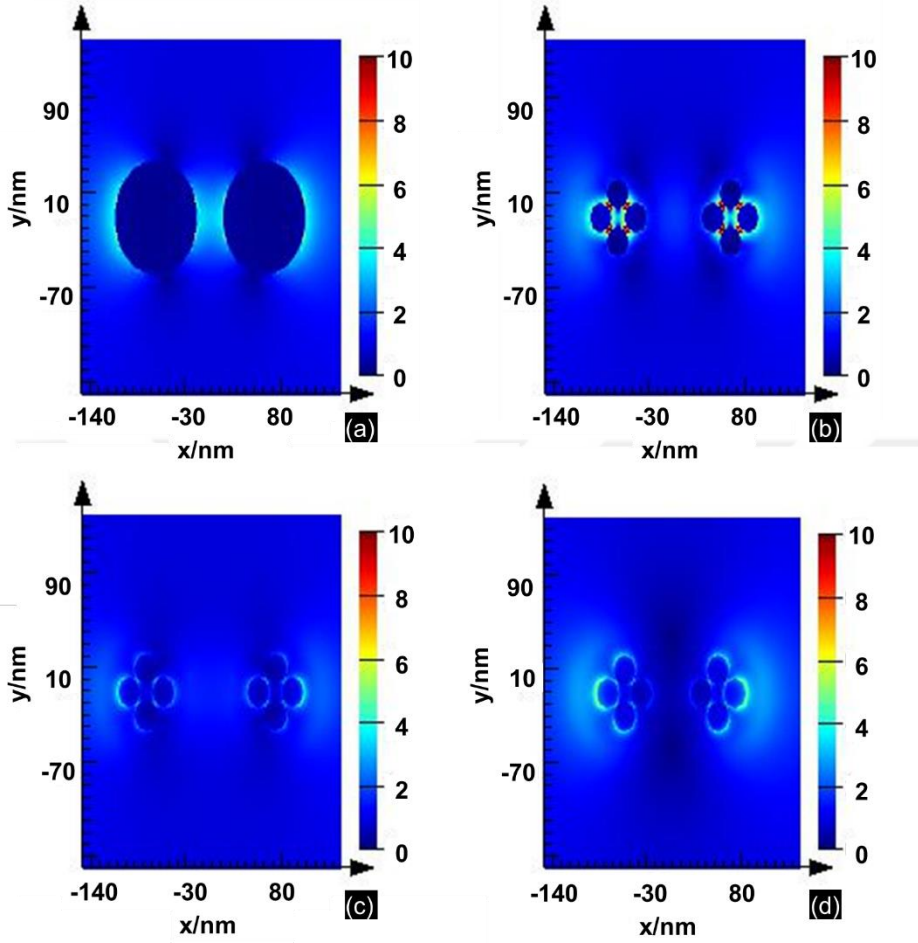


Şekil 3.3 : DPS, MDS ve SDS'lerin 10,20 ve 30 nm altın kaplanmış ThT SERS sinyalleri. Bazı ThT özgü sinyaller spektrumlar üzerinde işaretlenmiştir ve en yüksek sinyal 20 nm altın kaplı MDS'lerde görülmüştür.

Çizelge 3.1 : Deneysel olarak gözlenen ThT Raman titreşim modlarını ve bu modlara karşılık gelen dalga numaralarının gösterimi [67, 68]. Kısaltmalar: ν , gerilme; δ , düzlem içine eğilme; γ , düzlem dışına eğilme; ρ , düzlem içi katlanma, breath: gevşeme s, simetrik; as, asimetrik.

| Raman Dalga Numarası (cm ⁻¹) | Titreşim Modları |
|--|--|
| 539 | δ (CSC)[67, 68], ν (CCC) _(halka I) [67, 68], γ (CCC) _(halka III) [67], γ (CNC) [67] |
| 743 | δ (CCC) [67, 68], ν (C6SC) [68], ν (CN18C) [67] |
| 938 | ν (N18CC) [67], γ (CH ₃) _(C10,11) [67, 68], ν (CC) _(breath III) [67] |
| 1139 | ρ (CH ₃) _{C11} [68], ρ (CCH) _(halka I) [68], ν (CH) [68] |
| 1392 | ν (CH ₃) _{C10,11} [67, 68], ν_{as} (N5C6C12) [67], ν (CCH) _(halka I) [67, 68] |
| 1601 | ν (CC) _(halka III) [67, 68] |

Elektromanyetik artma faktörü SDS yüzeyler için 1.5×10^3 V/m, Au@MDSler için $3,7 \times 10^4$ V/m, 10 nm kaplama kalınlığı için 88,2 V/m ve 30 nm kaplama kalınlığı $7,6 \times 10^2$ V/m olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.4 : 20 nm altın kaplama ile muamele edilmiş SDS (a) ve MDS (b) filmler üzerindeki FDTD-simüle elektrik alan yoğunluğu. Ayrıca altın kaplama kalınlığının etkisi 10 (c) ve 30 nm (d) koşulları için simüle edilmiştir.

Şekil 3.5a farklı ThT konsantrasyonlarında SERS sinyallerinin Au@MDS yüzeylerde değişimini göstermektedir. Burada azalan konsantrasyonla birlikte bazı önemli ThT sinyallerinde azalma olduğu görülmüştür. Literatürde, ThT'nin dimetilaminobenzen yapısındaki C-C gerinmesinden kaynaklanan 1601 cm^{-1} 'deki sinyalin plazmonik metal yüzeylere kemisorbe olan ThT miktarını takip etmede kullanılabileceği gösterilmiştir [67]. Bu sinyal kullanılarak, pikomolar seviyelerden daha alt seviyelerde ThT modifikasyonunun ThT bulunmayan kontrol spektrumlarıyla karşılaştırılarak (0,1 pM ThT için sinyal/gürültü= ~ 10) nanodesenlemeli yüzeyler üzerinden tanımlanabileceği düşünülmüştür. Bu bağlamda ThT sinyallerinin tekrarlanabilirliği de bazı dalga numaraları için analiz edilmiştir. Bağımsız hazırlanmış üç Au@MDS örneğinin çeşitli

noktalarından toplanan spektrumların ortalaması Şekil 3.5b`de sunulmuştur. Burada yüzde relatif standart sapma (RSD%) bazı önemli sinyaller için ~ %17 olarak hesaplanmış ve bu veriler Çizelge 3.2`de verilmiştir.

Çizelge 3.2 : 10^{-5} M ThT modifiye Au@MDS spektrumlarından edinilen sinyal şiddeti, standart sapma ve CV değerleri.

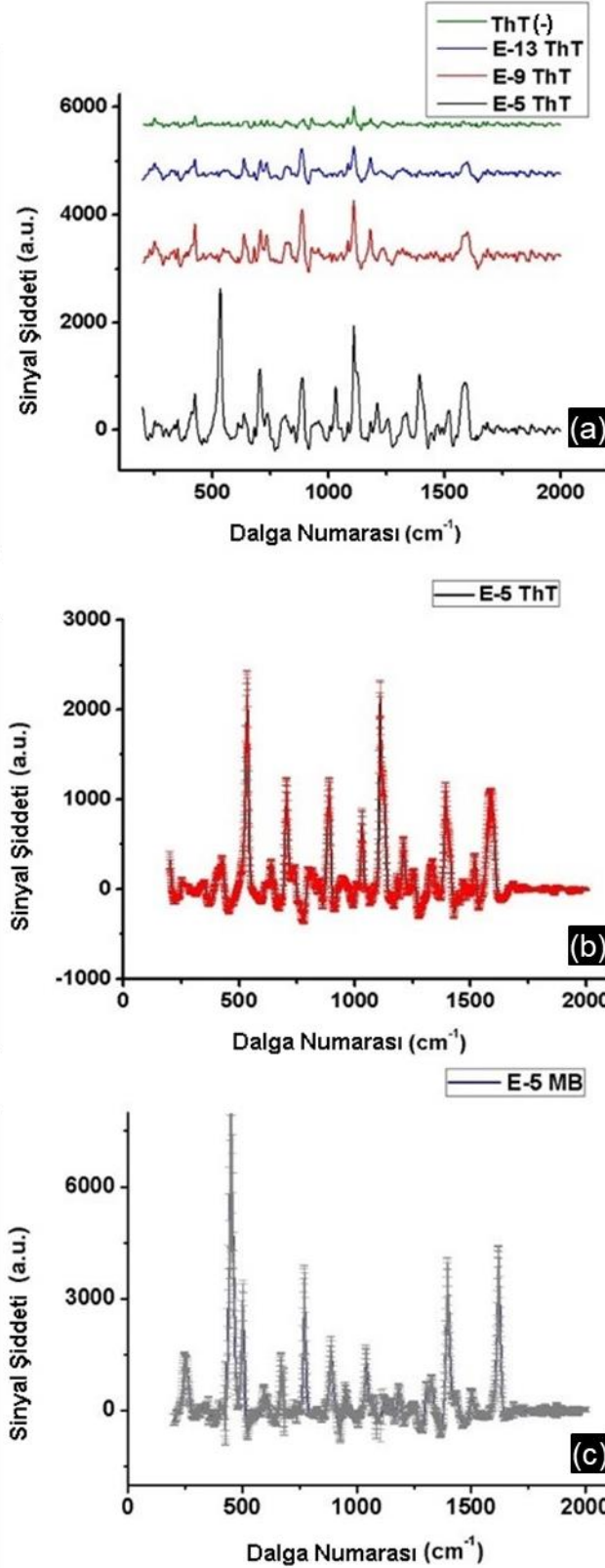
| Raman Dalga Numarası (cm ⁻¹) | Sinyal Şiddeti (a.u.) | Standart sapma | % RSD |
|--|-----------------------|----------------|-------|
| 539 | 2028 | 409,29 | 17,87 |
| 743 | 238,33 | 33,51 | 14,00 |
| 938 | 126,33 | 30,24 | 23,93 |
| 1139 | 2122,22 | 201,46 | 9,49 |
| 1392 | 986,77 | 209,10 | 21,18 |
| 1601 | 949,77 | 169,74 | 17,87 |

İyi bir Raman raportörü olarak bilinen MB boyası yüzeyden elde edilen sinyallerin tekrarlanabilirliğini göstermek ve artma faktörünün hesaplanması amacıyla kullanılmıştır (Şekil 3.5c). Ayrıca MB boyasından alınan önemli sinyallerin tekrarlanabilirliği ve bunların karşılık geldiği modların neler olabileceği sırasıyla Çizelge 3.3 ve Çizelge 3.4`te özetlenmiştir.

Çizelge 3.3 : 10^{-5} M MB modifiye Au@MDS spektrumlarından edinilen sinyal şiddeti, standart sapma ve CV değerleri.

| Raman Dalga Numarası (cm ⁻¹) | Sinyal Şiddeti (a.u.) | Standart sapma | % RSD |
|--|-----------------------|----------------|-------|
| 445 | 6975,37 | 1190,06 | 17,06 |
| 772 | 2690,83 | 482,63 | 17,94 |
| 890 | 1512,88 | 277,05 | 18,31 |
| 1392 | 3143,88 | 459,86 | 14,63 |
| 1620 | 3422,50 | 340,10 | 9,94 |

MB boyasının artma faktörünün hesaplanması amacıyla 10^{-12} M MB Au@MDS ve 10^{-5} M MB DPS üzerine uygulanmış ve 1620 cm⁻¹deki sinyal seviyeleri analiz edilmiştir [37]. Sinyal şiddetleri sırasıyla $96,77 \pm 16,00$ ve $88,16 \pm 13,58$ olarak ölçülmüştür (Şekil 3.6a). Ayrıca boya damlalarının çapları dikkate alındığında mm²`ye düşen molekül sayısı arasında ~4 kat fark bulunmuştur. Bu sebeple $EF = (10^{-5}/10^{-12}) \times (0,25) = 2,7 \times 10^6$ olarak hesaplanmıştır. Benzer şekilde 1601 cm⁻¹deki sinyalin ortalama şiddeti kullanılarak ortalama artma faktörü ThT için $4,6 \times 10^6$ olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.6b). Göreceli olarak düşük artma faktörleri SERS artma faktörünün hesaplanma yöntemi [165] ile ilgili bir durumdur. Tek bir sıcak noktadan elde edilen veriler yerine tüm alandan alınan sinyaller dikkate alınmıştır.



Şekil 3.5 : Au@MDS`ler üzerinde ThT sinyallerinin azalan konsantrasyonla birlikte değişimi (a). 3 bağımsız Au@MDS`nin farklı noktalarından alınan spektrumların ortalamalarının tekrarlanabilirliğinin gösterilebilmesi amacıyla standart sapma barları ile birlikte ThT (b) ve MB (c) boyaları için gösterimi.

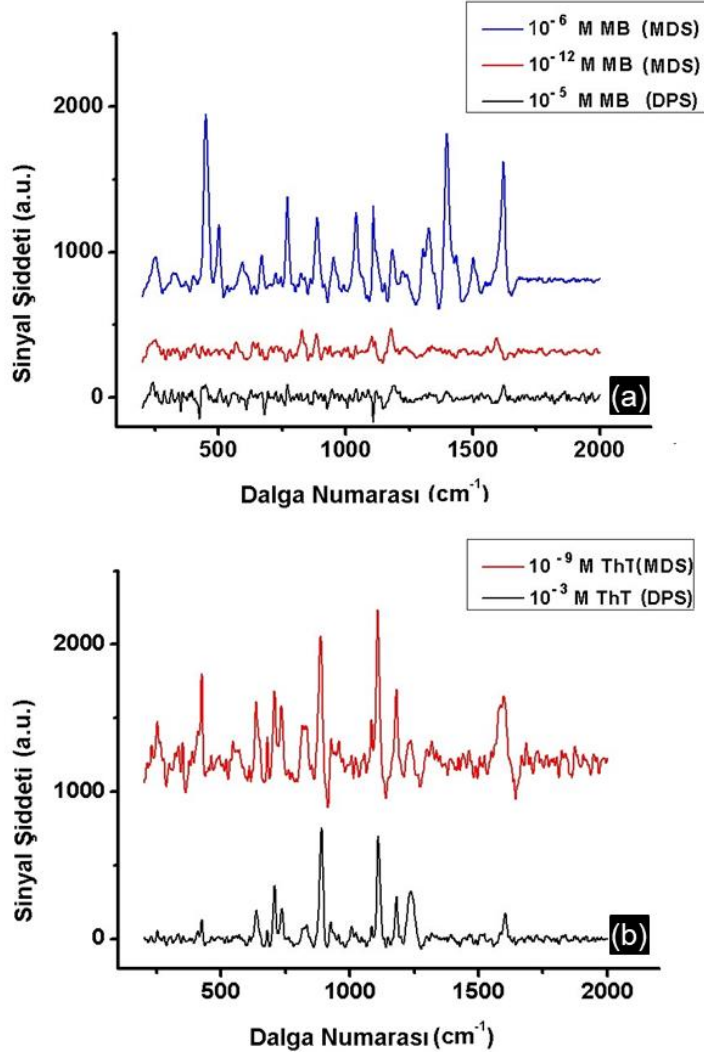
Çizelge 3.4 : Deneysel olarak gözlenen MB Raman titreşim modlarının ve bu modlara karşılık gelen dalga numaralarının gösterimi [166]. Kısaltmalar: ν , gerilme; α , düzlem içine halka deformasyonu; γ , düzlem dışına eğilme; β , düzlem içi katlanma

| Raman Dalga Numarası (cm^{-1}) | Titreşim Modları |
|---|---------------------------------|
| 445 | $\nu(\text{CC})_{\text{halka}}$ |
| 772 | $\gamma(\text{CH})$ |
| 890 | $\beta(\text{CH})$ |
| 1392 | $\alpha(\text{CH})$ |
| 1620 | $\nu(\text{CC})_{\text{halka}}$ |

MB için daha büyük artma faktörleri artan elektromanyetik artma faktörüne ilaveten artan kimyasal artma faktörü nedeniyle elde edilmiştir [167].

ThT ve A β 1-42 peptitlerince zengin amiloid plaklarının özel etkileşimi günümüzde Alzheimer hastalığının tespitinde klinik olarak kullanılmaktadır [168]. Bu nedenle, ortamdaki peptit varlığının ThT SERS sinyallerini potansiyel olarak etkileyebileceği beklenmektedir [46]. Şekil 3.7a`da Au@MDS`ler artan konsantrasyondaki sulu A β 1-42 çözeltileriyle inkübe edildiğinde kademeli olarak azalan ThT sinyalleri gösterilmiştir. Bazı önemli sinyallerde de sinyal azalması görülmüş olmasına rağmen, 1601 cm^{-1} deki sinyal peptit varlığı ile açık şekilde azalma göstermiştir (Şekil 3.7b). Önceki çalışmalar ThT`nin SERS ve floresan sinyallerinin çözelti fizikokimyasal özelliklerine karşı hassas olduğunu göstermiştir [67-69]. Çalışmamızda sinyal azalmasına boya etrafında konumlanmaya çalışan β tabaklarınca zengin peptit moleküllerinin neden olduğu düşünülmektedir [65, 66]. Plazmonik yüzey üzerindeki boya peptit konsantrasyonu arttıkça bu sinyal engellemesinden etkilenmektedir [22]. Ancak bu davranışın daha iyi açıklanabilmesi için detaylı analizlere ihtiyaç vardır. Bu noktada moleküler afinite sabitlerinin detaylı şekilde araştırılması ve yüzey üzerinde konumlanmış ThT moleküllerinin A β 1-42 proteinleri ile olan etkileşim sonrası nasıl konumlandığı analiz edilmelidir.

ThT modifikasyonu bulunmayan Au@MDS`leri 100 pg/ml A β 1-42 ile muamele edilmiş kontrol örneğinden anlamlı bir spektrum elde edilememiştir. Bu sonuç ortamda ThT olmadığında peptitlerin yıkama sonrası yüzeyden kolaylıkla uzaklaştığını göstermektedir. Bir önemli vurgulanması gereken nokta da peptit uygulaması sonrası ThT modifiye Au@MDS`lerde plak oluşumu gözlemlenmemesidir (Şekil 3.8).

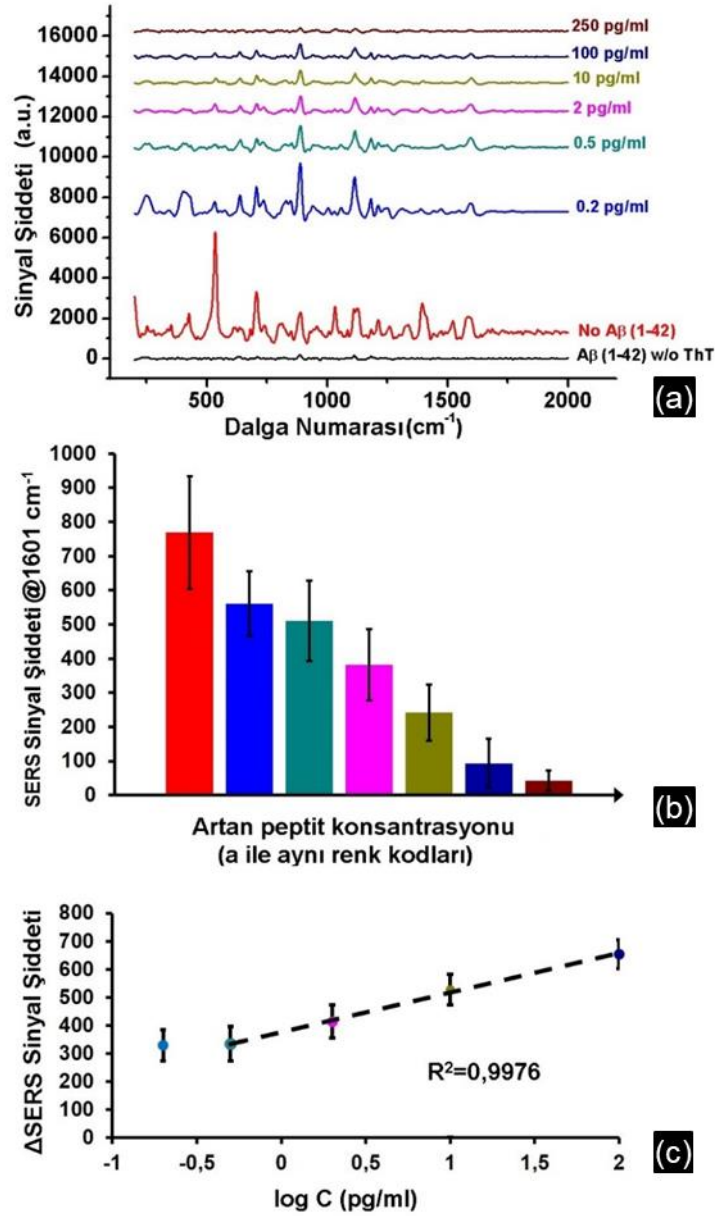


Şekil 3.6 : Altın kaplanmış MDS ve DPS`ler üzerinde (a) MB ve (b) ThT`nin SERS spektrumları.

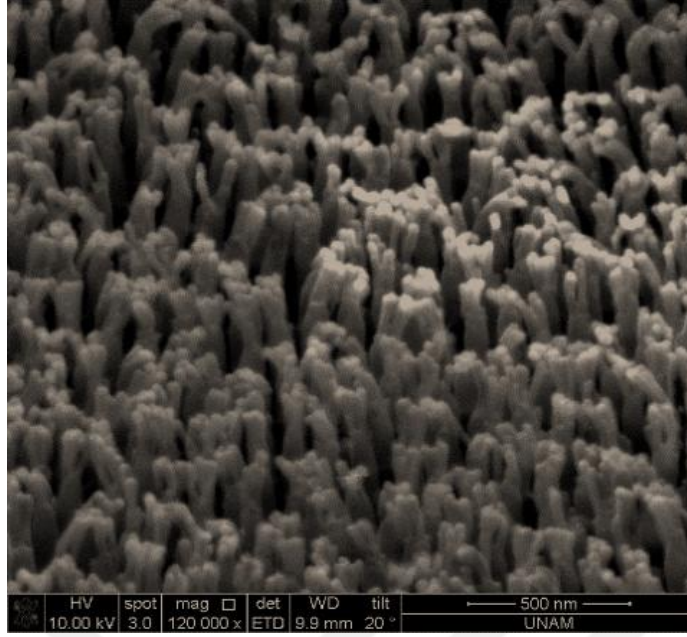
Literatür incelendiğinde bu tip plak oluşumlarının μM seviyedeki A β 1-42 konsantrasyonlarında olduğu rapor edilmiştir [168]. Ancak bu çalışmada en fazla 0,12 μM konsantrasyonda A β 1-42 ile çalışılmıştır.

1601 cm^{-1} 'deki orijinal ve baskılanmış ThT sinyallerinin farkı Şekil 3.7c`de sunulmuştur. Beklendiği üzere, baskılama peptid konsantrasyonu arttıkça artmıştır. En yoğun çözelti 250 pg/ml olarak hazırlanmış ancak bu nokta Şekil 3.7c`de gösterilmemiştir. Çünkü bu noktada sinyal/gürültü oranı 3`ün altına düşmüştür. Diğer yandan, A β 1-42 dedeksiyon tayin limiti 0,5 pg/ml olarak hesaplanmıştır ki bu değer bu platformlarda lineerliğin rapor edildiği en küçük değerdir [160]. Çözülebilir A β 1-42 için biyosenörlerle tespit edilebilen en küçük değer yine aynıdır [169]. İlginç olarak literatürde antikor ilişkili bir çalışma ile karşılaşılmış ve bu çalışma ile benzer

sonuçların elde edildiği görülmüştür (500 fg/ml) [169]. Ayrıca, 0,5 pg/ml ile 100 ng/ml lineer aralıkta çalışacak şekilde ilgili sistem geliştirilmiştir. Bu aralık vücut sıvılarındaki A β 1-42 seviyelerini ölçecek özelliindedir. Serebrospinal sıvıda bu oran ~ 400-700 pg/ml iken salyada ~3-10 pg/ml [78] aralığındadır.



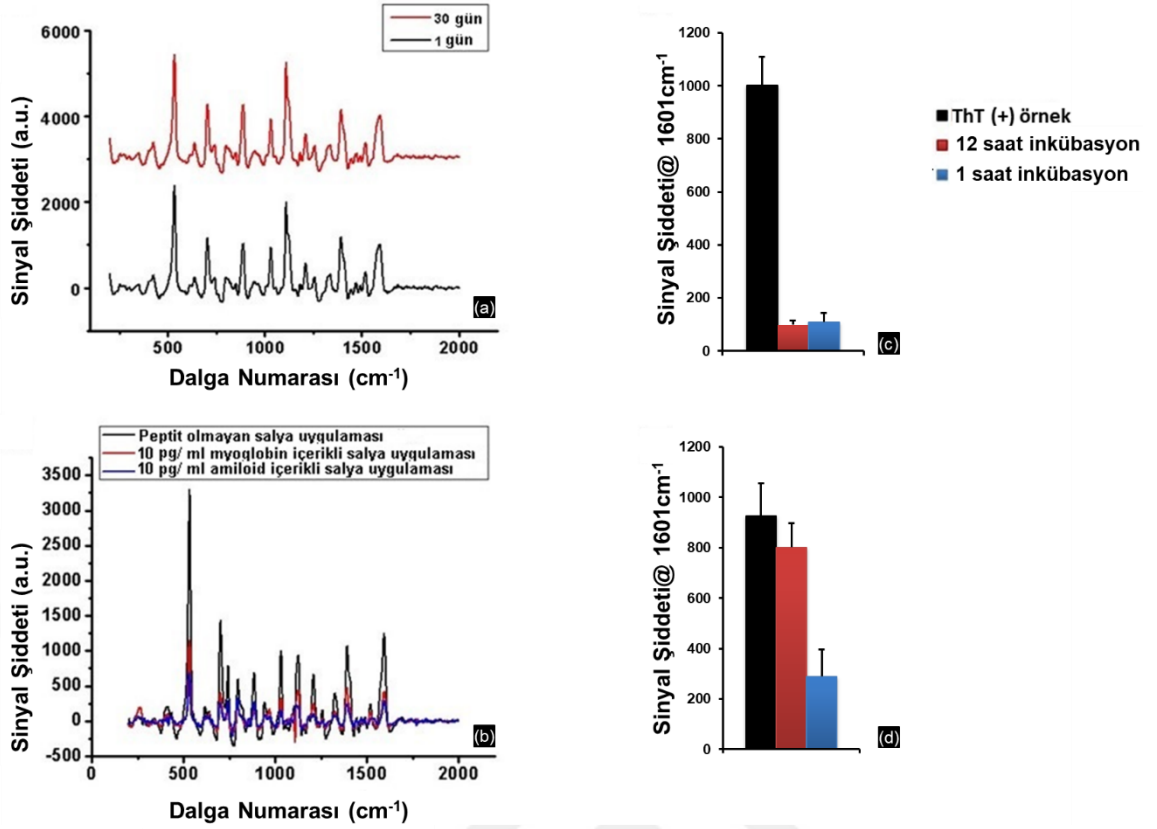
Şekil 3.7 : 10^{-5} M ThT ile modifiye edilmiş Au@MDS'lerde artan A β 1-42 konsantrasyonuna bağlı olarak değişen SERS spektrumları (a), artan peptit konsantrasyonuna bağlı olarak 1601 cm⁻¹'deki sinyal değişim (b) ve 1601 cm⁻¹'deki SERS sinyal baskılanmasının log [A β 1-42] karşı değişimi (c).Bu grafik kullanılan platform için dinamik aralığın 0,5 pg/ml ile 100 ng/ml arasında olduğunu ve R^2 değerinin ~1 olduğunu göstermiştir.



Şekil 3.8 : 10 pg/ml A β 1-42 uygulanmış ThT modifiye Au@MDS`lerin SEM görüntüsü. Çalışılan konsantrasyon aralığında yüzeylerde plak oluşumu gözlenmemiştir.

Son olarak biyosensör filmler kalıcılık, cevap süresi ve gerçek ortamlardaki durum açısından araştırılmıştır. Şekil 3.9a`da ThT modifiye Au@MDS`lerin 1 ve 30 gün sonundaki sinyal ölçümleri verilmiştir ve örnekler bu süre boyunca 4 °C`de saklanmıştır. Sinyal yerlerinde ve şiddetlerinde göz ardı edilebilir değişimler gözlemlenmiştir bu ThT modifiye substratların stabil kalabildiğini göstermiştir. Platformların hızlı cevap verebilme kabiliyetleri de ayrıca araştırmıştır. 100 pg/ml A β 1-42 uygulaması 1 saat ve 12 saat için yapılmış istatistiksel olarak farklı olmayan sinyal azalmaları elde edilmiştir (Şekil 3.9b, $p < 0,05$). İnkübasyon süresini daha fazla azaltılması benzer sinyal azalmasına neden olmadığından rapor edilmemiştir.

Nanodesenli filmlerin salya çözeltisi içerisindeki performansları da araştırılmıştır. ThT modifiye filmler peptit katkılanmamış salya çözeltileri içerisinde tipik sonuçları vermiştir (siyah spektrum, Şekil 3.9c). Bu sinyaller A β 1-42 uygulaması sonrası büyük oranda azalmıştır. Miyoglobinin plazmonik yüzeye olan etkileşimi nedeniyle sinyalleri baskıladığı düşünülmektedir [160] ancak yine de A β 1-42 katkılamasında olduğu gibi ThT kaplanmış örneğe (siyah spektrum) nazaran anlamlı bir farklı bir azalma göstermemiştir. Yine de yanlış pozitif elde etme ihtimalini ortadan kaldırmak amacıyla yüzeye farklı modifikasyonların (aptamer, peptid vb.) yapılması gerektiği düşünülmektedir.



Şekil 3.9 : ThT modifiye Au@MDS'lerin 1 ve 30 gün sonundaki SERS spektrumları (a), ve farklı inkübasyon sürelerinde 1601 cm⁻¹'deki sinyal değişimi gösteren grafik (b). Benzer spektrum protein katkılanmamış salya çözeltilisinden de alınmıştır (c, siyah spektrum). ThT sinyalleri ortama Aβ 1-42 eklenmesi sonrası baskılanmış fakat bu azalma miyoglobin katkılması ile anlamlı şekilde gerçekleşmemiştir. (c, mavi ve kırmızı spektrum). 1601cm⁻¹'deki sinyal azalması d'de gösterilmiştir. Her veri 3 bağımsız örneğin rastgele noktalarından alınmıştır (n=3). c ve d'deki lejantlar ayımdır.

3.4 Sonuç

Aβ 1-42 peptitlerinin ultra hassas dedeksiyonu (0,5 pg/ml, literatürde ve çalışmamızda tespit edilebilmiş en küçük konsantrasyon) amacıyla MDS'ler multi-çatallanmış AAO kalıplar kullanılarak tasarlanmıştır. İnce altın tabaka kaplama sonrası damla yama yöntemi ile üretilen MDS'lerden SDS ve DPS'lere nazaran metal kaplama kalınlığına bakılmaksızın yüksek sinyaller elde edilmiştir. Tekrarlanabilir SERS sinyalleri pM ve altı seviyelerde ThT modifiye MDS'lerden elde edilmiştir. Ancak daha önemlisi artan peptit konsantrasyonu ile birlikte ThT sinyallerinde kademeli bir azalma gözlemlenmiştir. Peptitler için dedeksiyon tayin limiti 0,5 pg/ml olarak belirlenmiştir. Stabil ThT sinyallerinin 30 gün sonunda da alınabildiği, anlamlı sinyal azalmalarının 1 saatlik inkübasyon süreleri sonunda da elde edilebildiği gösterilmiştir. Aynı

baskılama trendi salya çözeltilerinde de görülmüş olmasına rağmen seçiciliğin geliştirilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulduğu düşünülmektedir ve alternatif stratejiler bu noktada araştırılmaktadır.



4. NANODESENLI KİTOSAN: JELATİN FİMLERİN FABRİKASYON VE KARAKTERİZASYONU, İMPLANT KAPLAMA MODELİ OLARAK VE MELANİN SENTEZİNİ TETİKLEYİCİ YARA ÖRTÜSÜ MODELİ OLARAK KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI

Yaşayan organizmaların doğal yapılarından esinlenen biyomimetik stratejileri nano-biyomateryallerin tasarımında sıklıkla kullanılmaya başlamıştır. Özellikle, litografik olmayan teknikler büyük ölçekte bu tip topografilerin üretimine imkân sağlamaktadır. Ortopedik biyomateryallerin, kaplamaların ya da yara örtü modellerinde geniş alanlı üretim son derece önem kazanmaktadır. Aynı şekilde tercih edilen malzemenin fiziksel ve kimyasal özellikleri de uygulama alanları ile bağlantılı olarak önem kazanmaktadır. Bu noktada doğal polimerlerin kullanımı amince zengin, biyobozunur, biyoyumlu doğaları gereği doku mühendisliği uygulamalarında belli avantajlar sağlayabileceği düşünülmektedir. Dolayısıyla tezin bu kısmında implant kaplama ve yara örtü modeli olarak nanodesenli kitosan: jelatin (K:J) filmlerin kullanımına karar verilmiştir. Temelde tezin bu kısmı üç ana bölümden oluşmaktadır. İlk olarak K:J filmlerin üretim ve karakterizasyonundan bahsedilecek olup sonrasında üretilen filmlerin kök hücrelerin kemik dokuya farklılaşması ve mineralizasyonuna etkisi ile ilgili elde edilen hücre bazındaki sonuçlar paylaşılacaktır. Son olarak da filmlerin yara iyileşmesine etkisinin yanında melanin salımına etkisi ikili kültürleme tekniği kullanılarak hazırlanan hücre kültür sistemleri üzerinden analiz edilecek ve bu filmlerin yara iyileşmesi ve melanin sentezine etkisi ekzisyonel yara modelleri üzerinden tartışılacaktır.

4.1 Çalışmanın Amacı

Bu çalışmanın amacı nano K:J filmlerin kemik ve deri doku rejenerasyonunu tetikleyici potansiyelinin araştırılmasıdır. Bu bağlamda kemik doku hücreleri ile yapılan çalışmalarda doğrudan nano K:J filmleri kullanılırken, deri doku çalışmalarından epidermal büyüme faktörü (EGF) katkılanmış nano filmler diğer kontrol grupları ile karşılaştırmalı olarak kullanılmıştır. Literatürde damla yayma yöntemi kullanılarak hazırlanmış nanodesenli doğal polimer filmlerin olmayışının yanında bu tip filmlere karşı alınan hücresel sinyallerin de ilk kez rapor edildiği çalışmamız literatürde ilk olma özelliğindedir.

4.2 Materyaller ve Yöntemler

4.2.1 Materyaller

Kalıpların üretiminde kullanılan alüminyum folyo (Puratronic, %99,99) Alfa Aesar firmasından temin edilmiştir. H₃PO₄ (%85) BDH Prolabo firmasından, HCl (%37), okzalik asit (%99), antimitotik-antibiyotik solüsyonu, kitosan (medium moleküler ağırlık, 190-310 kDa, %75-85 deasetilasyon derecesi), asetik asit (glasiyal, %99,85), poli (etilen glikol) diglisidilether (PEGDE, moleküler ağırlık 500 g/mol), gliserin ve etilen glikol (%99,8), tryptic soy agar, β-gliserofosfat, askorbik asit, deksametazon, alkalın fosfataz dietanolamin aktivite kiti (AP0100), tripsin-EDTA, L-3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA), Anti-GAPDH, izoflorin, MgCl₂, proneazCB ve NaOH Sigma-Aldrich firmasından satın alınmıştır. Jelatin (sıgır jelatini, deri kaynaklı) Halavet Gıda Sanayi ve Ticaret A.Ş.'den temin edilmiştir. ProtinEX solüsyonu GeneAll firmasından edinilmiştir. H₂SO₄ (%95-98), CrO₃ Fluka firmasından alınmıştır. Saos-2 (ATCC® HTB-85™), mezenkimal kök hücre (MSC, ATCC® PCS-500-12™), NIH3T3 (ATCC® CRL-1658™), B16F10 (ATCC® CRL-6475™), J774A.1 (ATCC® TIB-67™), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853; gram-positif), *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600; gram-negatif), mezenkimal kök hücre geliştirme kiti (fibroblastik büyüme faktörü, L-Alanin-L-Glutamin, ATCC® PCS-500-041™), penisilin-stepriyomisin-amfoterisin B (ATCC® PCS-999-002™), Amerikan Hücre Kültürü koleksiyonundan temin edilmiştir. FBS, ikincil antikor (Goat anti-Mouse IgG (H+L) Superclonal™ Secondary Antibody, Alexa Fluor 488) Invitrogen firmasından, besi yeri (DMEM, 4,5 g/L glikoz & L-glutamine) Corning firmasından, McCoy's 5A besi yeri Gibco firmasından satın alınmıştır. Canlılık analizleri için kullanılan 2,4 M 3- [4, 5-dimetiltiazol-2-il]-2, 5-difeniltetrazol bromür (MTT) tuzu, SYTO™ 9 yeşil floresans nükleik asit boyası, propidiyum iyodid, bikinkoninik asit analizi (BCA), epidermal büyüme faktörü (EGF) ELISA kiti, RIPA solüsyonu, NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Protein Gels (NP0321BOX), PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (10 to 250 kDa), iBlot® Gel Transfer Stacks (PVDF, Regular), Pierce™ 20X TBS Tween™ 20 tampon çözeltisi, Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay kiti Thermo Fisher Scientific firmasından temin edilmiştir. Osteogenesis miktar tayin kiti, dimetilsulfoksit (DMSO), merkaptotanol, Trizol Merck firmasından, Quick RNA™ izolasyon kiti Zymo Research firmasından, cDNA sentezleme kiti, SYBR® green reaksiyon solüsyonu Applied Biosystems firmasından,

RNA later Qiagen firmasından alınmıştır. Primer sekansları Eurofins firmasından temin edilmiştir. EGF (rekombinant insan kaynaklı, 6.2 kDa \pm %10) GenScript firmasından satın alınmıştır. EGFR (fare, 10207-630), fibronektin (fare, 76172-336) ELISA kitleri Boster Biological Technology`den alınmıştır. Hücre stop plazmalarının boyanması amacıyla kullanılan boyalar CellBright™ firmasından temin edilmiştir. Laemmli yükleme tampon çözeltisi (X4) BIO-RAD firmasından, tirozinaz antibadisi (sc-20035) Santa Cruz firmasından satın alınmıştır. Optimal kesme sıcaklık bileşiği (OCT) Scigen firmasından, hematoksilin&eosin (H&E) ve Masson`s trikrom boyama kitleri Polysciences Inc. firmasından satın alınmıştır.

Çalışma sırasında akım-voltaj kaynağı (Sorensen), SEM (Quanta 200 FEI), AFM (ez-AFM, “tapping” modu, SSS cantilever, Nanomagnetics), inkübatör (Thermo Scientific), absorban ölçüm cihazı (Multiscan Go, Thermo Fischer), temas açısı ölçüm cihazı (Dataphysics, OCA 30), PCR döngü cihazı (LightCycler® 480 Instrument II), optik mikroskop (Keyence), floresans mikroskop (Zeiss Axio Observer, Zen 2 Pro görüntüleme yazılımı), life iBlot2 sistemi (Thermo Scientific) cihazı, Nanodrop2000 (Thermo Scientific) Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR, Mattson 1000), nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (NMR, Varian MR 400 MhZ) kullanılmıştır.

4.2.2 Deneysel yöntemler

4.2.2.1 AAO kalıpların ve K:J nanodesenlemeli yüzeylerin sentez ve karakterizasyonu

AAO kalıplar bu tezin bir önceki kısımlarında belirtilen koşullarda 300 nm derinliğinde 100 nm çapında gözeneklere sahip olacak biçimde üretilmiştir. Sonrasında filmler ODTS ile kaplanmış ve hidrofobik hale getirilmiştir. Tezin bir önceki bölümünde de detaylandırıldığı üzere damla yayma tekniği kullanılarak nanodesenleme doğal polimer yüzeye aktarılmıştır. Bu polimer çözeltisi (ağırlıkça 1,25 kitosan: 0,25 jelatin) hazırlanırken hacimce %0,3 asetik asit sulu içerisinde 1000 rpm de 45 °C`de iki gün karıştırma yaparak elde edilmiştir. Filmlerin sulu ortamda stabiliteğini artırabilmek amacıyla PEGDE hacimce %0,3 olacak şekilde çözeltiliye katkılanmıştır (pH 7,5). 15 dk`lık karıştırma sürecinin ardından çözeltiler AAO kalıplar ve silikon yongalar üzerine yayılmıştır. Kalıplar üzerindeki çözeltiler 25 °C`de

nem kontrollü bir inkübatör içerisinde gece boyu bekletilmiş ve filmler yüzeyden tek yöne doğru çekilerek kaldırılmıştır.

Filmlerin morfolojik karakterizasyonu SEM ve AFM kullanılarak tamamlanmıştır. Düz ve nanodesenli filmlerle ilgili pürüzlülük değerleri 3 boyutlu AFM taramalarından elde edilmiştir. Damla analiz sistemi kullanılarak filmler üzerinde rastgele seçilen noktalardan temas açısı ölçümleri alınmış ve Owens/Wendt eşitliği (Eşitlik 4.1) kullanılarak filmlerin yüzey enerjileri hesaplanmıştır. Yüzey enerjilerinin hesaplanmasında su, gliserin ve etilen glikol kullanılarak elde edilen temas açısı değerlerinden faydalanılmıştır.

$$\frac{\sigma_L(\cos \theta + 1)}{2(\sigma_L^D)^{1/2}} = (\sigma_S^P)^{1/2} \frac{\sigma_L^P^{1/2}}{\sigma_L^D^{1/2}} + \sigma_S^D^{1/2} \quad (4.1)$$

Yukarıdaki Owens/Wendth eşitliğinde σ_L^D ve σ_L^P sıvılar için yüzey geriliminin dispersif ve polar komponentlerini göstermektedir. σ_S^D ve σ_S^P yüzeyler için yüzey geriliminin dispersif ve polar komponentlerini göstermektedir. θ ise temas açısını göstermektedir.

Filmlerin çapraz bağlanma ile ilgili kimyasal karakterizasyonları FTIR ve NMR kullanılarak tamamlanmıştır. FTIR analizleri için örnekler doğrudan ATR-FTIR cihazına yerleştirilip 400-4000 cm^{-1} aralığında tarama yapılmıştır. NMR analizleri için sıvı formdaki örnekler D_2O içerisinde 1:100 oranında seyreltilerek NMR tüplerine aktarılmış ve ölçümler tamamlanmıştır (n=2).

Filmlerin şişme ve bozunma performansları ayrıca takip edilmiştir. Şişme kabiliyetlerinin takibi amacıyla 6 mm çapındaki filmler 1 ml PBS içerisinde (pH 7,2) 37 °C'de 20 gün boyunca takip edilmiştir. İlgili zaman noktalarında filmlerdeki fazla sıvı uzaklaştırılmış ve şişme oranı (Q) Eşitlik (4.2) kullanılarak hesaplanmıştır.

$$Q = (W_2 - W_0) \times 100/W_0 \quad (4.2)$$

Burada W_2 1., 2., 3., 4., 5., 10. ve 20. günün sonunda kalan film ağırlığını temsil ederken W_0 filmlerin ilk ağırlığını göstermektedir.

Aynı zaman noktalarında filmlerde oluşan toplam ağırlık kaybının analizi için 6 mm çapında filmler kullanılmıştır. Bu filmler hacimde ağırlıkça %0,02 sodyum azit ve %0,5 NaCl çözeltisi içerisinde bekletilmiştir (pH 7,4). Sonrasında 24 saat boyunca liyofilize edilmiş ve Eşitlik (4.3) kullanılarak kalan ağırlık oranı (W_r) hesaplanmıştır.

$$W_r = (W_2) \times 100/W_0 \quad (4.3)$$

Burada W_2 ve W_0 sırasıyla kalan ağırlık ve filmlerin ilk ağırlığını temsil etmektedir.

4.2.2.2 K:J filmlerin antimikrobiyal aktivitesi

Filmlerin antibakteriyel özelliklerinin araştırılması amacıyla nanodesenli ve düz K:J filmler koloni sayma ve ölü-canlı testleri kullanılarak analiz edilmiştir. *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853; gram-positif) ve *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600; gram-negatif) bakteri türleri kullanılarak yapılan analizlerde bakteriler triptik soy agar (TSB) içerisinde bir gece inkübe edilmiş ardından 10^6 CFU/ml bakteri konsantrasyonu kullanılarak analizler tamamlanmıştır. Koloni sayma çalışması için filmler 96'lık mikroparka içerisine yerleştirilmiş ve bakterilerin gelişimi 4 ve 24 saat zaman noktaları için yüzeylerde takip edilmiştir. Ardından filmler üzerinde gelişimleri takip edilen bakteri çözeltileri 10^6 ve 10^7 kez seyreltilerek TSB agar yüzeyleri üzerine 10 µl hacimde damlatılmış ve agarların 37°C'de %5 CO₂ ortamında inkübasyonu sağlanmıştır. Ardından TSB agarlar üzerindeki koloniler sayılmış ve gerekli hesaplamalar yapılmıştır. (n=3)

Anti-bakteriyel aktivitenin görsel olarak sunulabilmesi için ölü-canlı testleri propidiyum iyodid ve SYTO-9 boyaması yapılarak tamamlanmıştır. 10^6 CFU/ml bakteri konsantrasyonu filmlerin üzerinde bir gece inkübe edildikten sonra bahsi geçen boyalar hacimce 1:1 oranında karıştırılmış ve filmlerle 10 dk boyunca muamele edilmiştir. Ardından floresan mikroskop ile görüntülemeler yapılmıştır.

4.2.2.3 Kemik doku çalışmaları

Kemik doku ile ilgili çalışmalar kapsamında insan osterosarkoma hücreleri (Saos-2) ve insan kemik iliğinden izole edilmiş mezenkimal kök hücre hattı (MSC) kullanılmıştır. Saos-2 hücre hattı %10 FBS) ve %1 antibiyotik-antimitotik solüsyon ile katkılanmış McCoy's 5A besi yeri içerisinde rutin olarak 37 °C'de %5 CO₂ ortamında geliştirilmiştir. Tipik olarak hücre besi yeri her üç günde bir yenilenmiştir. Hücrelerin osteojenik aktivitesini artırmak amacıyla bahsi geçen hücre besi yeri 5 mM β-gliserofosfat, 50 mM askorbik asit ve 10 nM deksametazon ile katkılanmıştır. MSC hattı ise %7 FBS 2.4 mM rekombinant insan insülin büyüme faktörü-1, 5 ng/ml fibroblastik büyüme faktörü-β, 2,4 mM L-Alanin-L-Glutamin ve %1 penisilin-stepriyomisin-amfoterisin B katkılanmış bazal besiyeri içerisinde büyütülmüştür. MSC'lerin osteojenik farklılaşmasını tetikleyebilmek için ilgili besi yeri içerisine 10 mM β-glycerophosphate, 50 mM askorbik asit ve 10 nM deksametazon katkılanması yapılmıştır. Başkalaşım besi yeri her 3-4 günde bir değiştirilmiştir. TCPS üzerinde büyütülen hücrelerden elde edilen sonuçlar kontrol olarak değerlendirilmiştir.

Filmlerin üzerindeki immünolojik cevabı görmek için J774A.1 (ATCC® TIB-67™) mürin makrofaj hücreleri kullanılmıştır. %10 FBS ile desteklenmiş DMEM içerisinde büyütülen hücreler filmler üzerinden 24 saat sonra toplanmış ve TNF- α gen ekspresyonu qPCR ile analiz edilmiştir.

Canlılık

Hücre canlılığının takibi amacıyla, Saos-2 ve MSC hatları 10^4 hücre/kuyu konsantrasyonunda filmler üzerinde 3 gün inkübe edilmiş ardından besi yeri fenol kırmızı içermeyen besi yeri ile değiştirilmiş ve bu besi yeri 10 μ l MTT tuzu ile katkılanmıştır. 2 saat 37 °C`de inkübasyon yapıldıktan sonra tetrazolyum kristallerini çözmek amacıyla kuyulara 100 μ l DMSO eklenmiştir. 37 °C`de 10 dk`lık inkübasyonun ardından çözeltilerin absorbans değerleri 540 nm dalga boyunda okunmuştur.

Alkalın fosfataz aktivitesi

Saos-2 ve MSC hücre hatlarının alkalın fosfataz (ALP) aktivitesi p-nitro fenil fosfatın p- nitro fenola dönüşümünün takibine dayalı olarak takip edilmiştir. Hücreler filmler üzerinde geliştirildikten sonra 1, 3, 7 ve 10. günler için ALP analizi yapılmıştır. Sonuçların normalizasyonu için yüzeyden tripsin ile kaldırılan hücre hatlarından ProtinEx™ solüsyonu ile protein ekstraksiyonu yapılmıştır. Toplam protein miktarı BCA ile tamamlanmıştır. ALP analizi için 2 μ l 0,67 M p-nitro fenil fosfat 96 μ l 10 M diethanolamin ve 0,5 mM MgCl₂ içeren çözeltiye eklenmiş ve bu çözelti 37 °C`de 1 saat inkübe edilmiştir. Ardından 20 μ l kontrol ve test grupları kuyulara eklenmiştir. 405 nm dalga boyunda okuma yapılmış olup aynı analizler MSC hattı için 14. ve 21. günler içinde tekrarlanmıştır (n=3).

Alizarin kırmızısı boyaması, mineral birikimin miktarının belirlenmesi ve protein adsorbsiyonu

Hücrelerdeki mineral birikimini göstermek amacıyla hücreler (10^4 hücre/kuyu) nanodesenli ve düz filmler üzerinde 3 ,10, 14, 21 gün süreyle inkübe edilmiş tripsin ile kaldırılarak TCPS yüzeye transfer edilmiştir. Hücreler bir günlük inkübasyonun ardından formalin ile fikse edilmiş ve %2 Alizarin kırmızısı ile 30 dk muamele edilmiştir. Yıkama sonrası hücreler optik mikroskop ile görüntülenmiştir. Ayrıca,

mineral miktarı ve filmlerin adsorblayabileceği protein miktarı analiz edilmiştir. Alizarin kırmızısı ile boyanan hücreler 80 µl %10 asetik asit çözeltisi ile 30 dk inkübe edildikten sonra hücreler yüzey hücre kazıyıcısı ile kaldırılmıştır. Ardından çözeltiler mikrosantrifüj tüplerine aktarılmış ve 80 °C`de 10 dk inkübe edilip 5 dk buz üzerinde bekletilmiştir. 20000 xg de 15 dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernantlar yeni bir tüpe aktarılıp 30 µl %10 amonyum hidroksit çözeltisi ile muamele edilmiştir. 405 nm dalga boyunda okuma yapılmıştır (n=3). Örneklerle ilgili normalizasyon toplam DNA miktarı üzerinden tamamlanmıştır. Bu bağlamda tris (10 mM)-EDTA (1 mM) tampon çözeltisi (pH 7,5) içerisinde Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA çözeltisi 20 kat seyreltilmiştir. 1:2 oranında fenol kırmızısı içermeyen DMEM ile seyreltilen örneklerin içerisine bu çözelti ile eşit hacimde (100 µl) seyreltilmiş PicoGreen™ çözeltisi eklenmiştir. 2-5 dk inkübasyon yapıldıktan sonra eksitasyon 450 nm, emisyon 520 nm dalga boyunda okuma yapılmıştır.

Protein adsorbsiyonu için aynı ağırlıktaki nanodesenli filmler %5 FBS içerisinde 2 saat bekletilmiştir. Ardından, filmler üzerindeki fenol kırmızısı içeriği bulunmayan medya mikropalakaya transfer edilerek BCA analizi sonrası 562 nm dalga boyunda okuma yapılmıştır. FBS ile muamele edilmemiş örnekler ile normalizasyon yapılmış ve TCPS kontrol grubu olarak seçilmiştir.

qPCR analizleri

Saos-2 ve MSC hatları nanodesenli ve düz filmler üzerine 2×10^5 hücre/kuyu yoğunlukta 12'lik mikropalakalar içerisinde ekilmiştir. 1 günlük inkübasyonun ardından, besi yerleri osteojenik ortam ile değiştirilmiştir. 3,10 ve 21. günlerin sonunda tripsin-EDTA ile hücreler yüzeylerden kaldırılmış ve elde edilen hücre pelleti PBS ile yıkandıktan sonra RNA izolasyonu yapılmıştır. Toplam RNA içeriği Quick-RNA™ izolasyon kiti ile tamamlanmıştır. RNA konsantrasyonu Nanodrop2000 ile tespit edilmiştir. cDNA transkripsiyonu cDNA sentezleme kiti (Applied Biosystems) kullanılarak tamamlanmıştır. Hücrelerdeki RUNT ilişkili transkripsiyon faktörü 2 (RUNX2), osteokalsin (OCN), osteopontin (OPN) ve GAPDH miktarları 7300 Real-time PCR cihazı ile SYBR® green reaksiyon döngüsü kullanılarak analiz edilmiştir. Primer sekansları RUNX2 (F:5'-TTACTTACACCCCGCCAGTC-3'; R:5'-TATGGAGTGCTGCTGGTCTG-3'), OCN (F:5'-GACTGTGACGAGTTGGCTGA-3'; R: 5'-CTGGAGAGGAGCAGAACTGG-3'), OPN (F:5'-

TGGAGTACGTCAAGCAGGAG-3'; R:5'-GTGTCTTGGTCGCCATTTTT-3') ve GAPDH (F:5'-GACTGTGACGAGTTGGCTGA-3'; R:5'-CTGGAGAGGAGCAGAACTGG-3') olarak belirlenmiştir. J774A.1 makrofajları içinde TNF- α (F: 5'-CCGATGGGTTGTACCTTGTC-3'; R: 5'-CGGACTCCGCAAAGTCTAAG-3'), ve GAPDH (F: 5'-GGTCCTCAGTGTAGCCCAAG-3'; R: 5'- AATGTGTCCGTCGTGGATCT-3') sekansları tercih edilmiştir.

İstatiksel analizler

Bütün veriler 3 bağımsız örnek kullanılarak sağlanmıştır ve sonuçlar ortalama \pm standart sapma şeklinde sunulmuştur. Tek yönlü ANOVA analizi test ve kontrol grupları arasındaki ilişkiyi göstermek için kullanılmış ve $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.

4.2.2.4 Deri doku çalışmaları

EGF katkılı filmlerin sentezi ve EGF salımının takibi

Filmler hazırlanırken solüsyon aşamasında katkılanan EGF miktarının tespiti için ELISA analizi kullanılmıştır. 6 mm çapındaki filmler 100 μ l fosfat tampon çözeltisine (10 mM, pH 7,5) 6, 24, 48, 72, 96, 120 ve 144 saat sürelerince 37 °C'de tabii tutulmuştur. Süreler sonrasında ilgili çözeltiler üzerinde ELISA analizi kullanılarak miktar tayini yapılmıştır. Her 9,3 mm² lik alan (6 mm çap, ~50 μ m film kalınlığı) içerisine 14,5 ng/ml EGF katkılanması yapılmıştır.

Canlılık

NIH3T3 (fibroblast), B16F10 (melanosit) hücreleri ve bu hücrelerin ikili kültürlendiği hücre sistemlerinin (NIH3T3:B16F10 1:1 ve 5:1) nanodesenli ve düz filmler üzerindeki canlılıkları MTT canlılık analizi kullanılarak tamamlanmıştır. 3 günlük inkübasyon sürelerinin ardından besi yerleri fenol kırmızısı içeriği bulunmayan besi yeri ile değiştirilmiş ve her kuyuya MTT solüsyonu eklenmiştir. 2 saat 37 °C'de inkübasyon yapıldıktan sonra örnekler DMSO ile muamele edilmiş ve örnekler 540 nm dalga boyunda okunmuştur. Canlılık ve diğer protein temelli analizlerde hücre yoğunluğu 10⁴ hücre/kuyu olarak inkübasyon süresi 3 gün olarak belirlenmiştir. Çalışmalar 96'lık mikropalakalar kullanılarak tamamlanmıştır.

Epidermal büyüme faktörü reseptörlerinin (EGFR) miktar tayini

3 günlük inkübasyon sonrasında hücreler ilgili filmler üzerinden tripsin-EDTA ile kaldırılmış, PBS ile yıkanmış ve santrifüj sonrası hücre pelletleri 100 µl memeli hücre protein ekstraksiyon tampon çözeltisi (RIPA) ile muamele edilmiştir. Sonrasında elde edilen protein çözeltileri buza aktarılmış ve BCA analizi sonrası eşit miktarda protein çözeltisi ile EGFR ELISA analiz tamamlanmıştır. Çalışmalar 96'lık mikrolakalar kullanılarak tamamlanmıştır.

Fibronektin salımının tayini

NIH3T3 ve NIH3T3:B16F10 (5:1) hücre hatları ile fenol kırmızı içermeyen besi yeri içerisinde 3 gün boyunca büyütülmüş ve hücre lizatlarından elde edilen çözeltiler 500 rpm'de santrifüj edilmiştir. BCA analizini takiben ilgili çözeltiler içerisindeki fibronektin miktarı ELISA analizi kullanılarak ölçülmüştür. Elde edilen çözeltilerin optik yoğunluğu 450 nm dalga boyunda tespit edilmiştir (n=3). Çalışmalar 96'lık mikrolakalar kullanılarak tamamlanmıştır.

Tirozinaz enzim aktivitesinin tayini

B16F10 ve NIH3T3:B16F10 (5:1) hücre hatları 3 günlük inkübasyon sonrası tripsin-EDTA ile yüzeyden kaldırılmış ve mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır. Santrifüj sonrası elde edilen pelletler PBS ile yıkanmış ve 100 µl RIPA tampon çözeltisi ile muamele edilmiş ve çözeltiler 10000 rpm de 30 dk santrifüj edilmiştir. Tüplerdeki çözelti yeni bir tüpe aktarılmış ve BCA analizi sonrası 10 mM L-DOPA çözeltisi 10 µl'lik hacimlerde çözeltilere eklenmiş ve bir saatlik inkübasyonun ardından 405 nm dalga boyunda okuma yapılmıştır. Çalışmalar 96'lık mikrolakalar kullanılarak tamamlanmıştır.

Melanin salımının farklı kaynaklardan tespiti

B16F10 ve NIH3T3:B16F10 (5:1) hücre hatları 3 günlük inkübasyon sonrası kullanılan filmler, besi yeri ve hücrelerden melanin miktarı tespit edilmiştir. Kullanılan filmler 3 gün 1M sulu asetik asit içerisinde bekletilmiş ve filmlerde biriken melaninin salımı sağlanmıştır. Bu çalışmada normalizasyon melanin birikmemiş filmlerden alınan optik yoğunluklar kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen çözeltiler 405 nm dalga boyunda okunarak melanin miktarı analiz edilmiştir. Bunun yanında ilgili besi yerleri de benzer şekilde analiz edilmiştir. Hücreler ise 1N NaOH+ %10 DMSO

karışımı çerisinde bekletilmiş ve 10000 rpm`de 15 dk santrifüj sonrası süpernatantlar 405 nm dalga boyunda okunmuştur. Bu analiz için eşit miktarda protein solüsyonu kullanımı sağlanmıştır. Çalışmalar 96`lık mikrolakalar kullanılarak tamamlanmıştır.

Optik mikroskop analizleri

10⁴ hücre/kuyu yoğunluğunda ikili kültür hücre hattı EGF katkılı nanodesenli ve düz filmler üzerine ekilmiştir. Bu ekim öncesi B16F10 hücreleri Cell Bright™ sitoplazmik membran boyası (kırmızı) ile 10 dk muamele edilmiş ve sonrasında ikili kültür sistemi oluşturulmuştur. Ardından optik mikroskop ile filmler üzerindeki hücreler görüntülenmiştir.

PCR analizleri

Önceki bölümlerde bahsedildiği şekilde ekstraksiyon, cDNA sentezi ve SYBR® green reaksiyon döngüsü kullanılarak analiz tamamlanmıştır. Melanin salım aktivitesinin anlaşılabilmesi amacıyla Tayrozinase (TRY), Tirozinaz ilişkili protein-1 (TRP-1) ve Tirozinaz ilişkili protein-2 (TRP-2) genlerinin ekspresyon seviyesi takip edilmiştir. Primer sekansları TRY (F:5'-CTCTGGGCTTAGCAGTAGGC-3'; R:5'-GCAAGCTGTGGTAGTCGTCT-3'), TRP-1 (F:5'-GCTGCAGGAGCCTTCTTTCTC-3'; R: 5'- AAGACGCTGCACTGCTGGTCT-3'), TRP-2 (F:5'-TGGAGTACGTCAAGCAGGAG-3'; R:5'-ATTCGGTTGTGACCAATGGGT-3') ve GAPDH (F: 5'-GGTCCTCAGTGTAGCCCAAG-3'; R: 5'- AATGTGTCCGTCGTGGATCT-3') olarak belirlenmiştir.

Western blot analizleri

10⁵ hücre/kuyu ekimi yapıldıktan sonra hücreler 3 gün filmlerle birlikte 12`lik mikrolakalarda inkübe edilmiştir. Ardından hücreler PBS ile yıkanmış ve yüzeyden hücre kazıyıcısı ile toplanan hücreler ependorf tüpe aktarılmıştır. 13000 rpm de 4 °C`de 5 dk hücreler pellet olarak elde edilmiş ve pellet üzerine 50 µl RIPA tamponu eklenmiştir. Aynı koşullarda 15 dk santrifüj sonrası çözeltiler yeni tüplere aktarılmış ve -20 °C`de saklama koşulu olarak belirlenmiştir. Toplam protein miktarı BCA analizi ile belirlenmiştir. Sonrasında örnekler Lamella loading tampon çözeltisi ile muamele edilmiştir. Buffer kullanım öncesi merkaptoethanol ile 1:20 oranında katılanmıştır. Sonrasında örnekler 1:1 oranında bu çözelti ile karıştırılmış ve 95 °C`de

15 dk protein denatürasyonu için tutulmuştur. Sonrasında örnekler 4-14% SDS gel içerisinde yüklenmiş ve 100 V da 2 saat yürütülmüştür. Life iBlot2 sistemi kullanılarak jeller PVDF membrana üzerine aktarılmış ve 7 dk'lık döngü kullanılarak proteinler PVDF membrana transfer edilmiştir. Ardından membran çözgeni TBST olan %5'lik süt tozu çözeltisi içerisinde oda sıcaklığında bir saat inkübe edilmiştir. Sonrasında sırasıyla 1:200 ve 1:1000 oranında seyreltilmiş GAPDH ve Tirozinaz antikoları ile %1 süt tozu çözeltisi içerisinde 4 °C'de 500 rpm çalkalama koşullarında membran inkübe edilmiştir. Ardından membran 10 dk'lık 3 TBST yıkamasına tabi tutulmuş ve ikincil antikor (Alexa Flour 488) ile %1 süt tozu çözeltisinde inkübe edilmiştir. İkincil antikor direk görüntülemeye izin verdiği için membran geliştirme ajanları kullanılmamıştır.

Yara kapanma çalışmaları

18 adet 8-10 haftalık erkek C57BL/6 cinsi siyah/kahverengi fare ($27 \pm 1,6$ gram) Northeastern Üniversitesi etik kurul onayı (Protokol # 17-0518R) ile Eczacılık bölümüne transfer edilmiş ve üç gün boyunca *ad libitum* diyet uygulaması ile 22-25 °C'de %55 nemlilik bulunan ortamlarda 12 saat aydınlık/ 12 saat karanlık döngüsü kontrol edilerek gözlemlenmiştir. Bütün ameliyatlar izoflorin anestezi altında tamamlanmıştır. Yapılan uygulamalar sonrası üç günlük 5 mg/kg Meloxicam uygulaması ile hayvanlarda ağrı kontrolü sağlanmıştır. Tüm uygulama sürecinde hayvanların ağırlıkları takip edilmiştir.

Hayvanların dorsal flank bölgesi traş edilip ethanol ile steril edilmiştir. Ardından bu bölgeye 6 mm çapa sahip biyopsi punch kullanılarak iki ayrı yara bölgesi açılmış ve bölgeler tıbbi silikon ve sütürlerle sabitlenmiştir. Sonrasında ilgili bölgeye EGF katkılı olan ve olmayan nano K:J filmler yerleştirilmiştir. Kontrol grubu olarak steril salin solüsyonu uygulanmış yara bölgeleri kabul edilmiştir. Her grup için üç hayvan ve toplamda altı yara bölgesi takip edilmiştir. Yara bölgeleri 10 gün boyunca fotoğraflanmış ve yaraların kapanma hızları yara alanı takip edilerek tespit edilmiştir. Sonrasında yara bölgeleri ilgili bölgelerden edinilerek protein, gen ve histoloji analizleri için kullanılmıştır. Çalışmada 5 ve 10 gün olmak üzere iki zaman noktası ile çalışılmıştır (n=3, n: hayvan sayısı). 10. günün sonunda yaralar üzerinde kalan filmler %2 elektron mikroskopiye uygun formaldehit ile 30 dk muamele edilmiş ardından heksametildisilazanın %50 lik sulu çözeltisi ile bir saat inkübe edilmiştir. Ardından

örnekler hekzametildisilazan ile doğrudan muamele edilmiş ve bir gece yatay akış kabini içerisinde bekletilmiştir. Sonrasında %10, 30, 50,70 ve 100 ethanol çözeltileri ile muamele edilen örnekler kurutulduktan sonra 10 nm altın ile kaplanıp SEM görüntülemesi ile incelenmiştir.

Biyopsi örneklerindeki fibronektin miktarının tayini

Protein ekstraksiyonu için 20-50 mg ağırlığındaki doku sıvı nitrojen içerisinde saklanmış ve mikrosantrifüj tüp içerisine transfer edilerek proteaz inhibitor kokteyli içeren soğuk PBS içerisinde homojenize edilmiştir. Ardından örnekler 20 dk boyunca 1000Xg`de santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant BCA ve fibronektin ELISA analizi için -20 °C`de saklanmıştır. Toplam protein miktarı eşitlenmiş çözeltiler ELISA analizine tutulmuş ve 450 nm dalga boyunda okuma yapılarak sonuçlar elde edilmiştir.

Biyopsi örneklerindeki tirozinaz aktivitesinin tayini

Protein ekstraksiyonu fibronektin analizlerinde bahsedildiği şekliyle tamamlanmıştır. Tüplerdeki çözelti yeni tüplere aktarılmış ve BCA analizi sonrası 10 mM L-DOPA çözeltisi 10 µl`lik hacimlerde çözeltilere eklenmiş ve bir saatlik inkübasyonun ardından 405 nm dalga boyunda okuma yapılmıştır (n=3).

Biyopsi örneklerindeki melanin miktarının tayini

Melanin ekstraksiyonu için 50-150 mg deri biyopsi örneği likit nitrojen içerisine daldırılmıştır. Cam bir vial içerisinde 5 ml su ile örnekler homojenize edilmiştir. Ardından örnekler 20 dk boyunca 10000Xg`de santrifüj edilmiştir. Elde edilen çökelti 5 ml 0,05 M, pH 6,8 fosfat tampon çözeltisinde yıkanarak çözülebilir bileşenlerin sistemden uzaklaştırılması sağlanmıştır. Sonrasında çökelti 2:1 kloroform:methanol ve 3:1 ethanol:ether çözeltileri ile sırasıyla aynı koşullarda santrifüj edilerek dokularda bulunan yağ dokusunun sistemden uzaklaştırılması sağlanmıştır. Ardından elde edilen çökelti azot gazı ortamında kurutulmuştur. Bu sırada lizis çözeltisi %0,3 saponinin %0,9 NaCl çözeltisi çözünmesiyle hazırlanmış ve bu çözelti çökeltilere 30 dk uygulanarak hemoproteinlerinde uzaklaştırılması sağlanmıştır. Çözelti tekrar santrifüj edilmiş ve her numune 0,15 M NaCl içerisinde hazırlanmış 5 mM MgCl₂ çözeltisinin 7 ml`si ile 2 kere yıkanmıştır. Sonrasında çökelti %0,5 sodyumdodesilsülfat içerisinde hazırlanmış 0,05 M tris tamponu ve 2 mg/ml proneazCB karışımı ile

muamele edilmiştir. Örnekler 30 °C'de 48 saat bu çözelti içerisinde muamele edilmiştir. Ardından 10000Xg'de 30 dk santrifüj edilen örnekler 6 ml %0,9 NaCl çözeltisi ile yıkanmıştır. Son olarak örnekler bir kere su ile yıkayıp örnekler polipropilen tüplere aktarılmıştır. 1 N NaOH içerisinde çözünen pelletlerden elde edilen çözeltilerin optik yoğunluğu 405 nm dalga boyunda okunarak dokulardaki melanin yoğunluğu tespit edilmiştir. Ticari olarak edinilen melanin kullanılarak hazırlanan standart eğrisi ile miktar tayini yapılmıştır.

Biyopsi örnekleri için PCR analizi

Önceki bölümlerde bahsedilen PCR analiz yöntemlerinden farklı olarak RNA ekstraksiyonu trizol kullanılarak tamamlanmıştır. Örnekler -80°C saklama koşullarında tutulmuştur. Örneklerin üzerindeki RNAlater (Qiagen, ABD) çözeltisi örnekler santrifüj edilerek uzaklaştırılmıştır. Ardından örnekler PBS ile yıkanmış ve PBS tamamen tüplerden uzaklaştırılmıştır. 30 mg doku numunesi için 600 µl Trizol ile örnekler muamele edilmiş ve örneklerin homojenizasyonu yapılmıştır. 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilen çözeltiler üzerine 120 µl kloroform (5:1 trizol:kloroform) eklenmiştir. 10 kere elde aşağı yukarı yavaş şekilde karıştırılan çözelti oda sıcaklığında 3 dk daha inkübe edilmiştir. Ardından hızlıca vorteks ile muamele edilen örnekler 4°C'de 12000Xg'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Bu aşamada tüpler içerisinde iki fazlı bir görüntü elde edilmiştir. Sulu faz RNA içeriğini taşıdığından yeni tüplere aktarılmıştır. Kullanılan trizolün yarı hacminde (300 µl) izopropanol çözeltilere eklenmiştir. Kısa süreli vortekslenen numuneler oda sıcaklığında 10 dk inkübe edilmiştir. İkil faz dikkatle incelendiğinde zamanla bulanık bir görüntü oluştuğu görülüyorsa bu durum RNA'nın dokudan ekstre edilebildiğinin bir göstergesidir. Sonrasında solüsyon 4°C'de 12000Xg'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Pellet elde edildikten sonra tüplere 1 ml %80 ethanol eklenmiştir. Kısa süreli vortekslenen çözeltiler 4°C'de 7500Xg'de 5 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant tüplerden uzaklaştırılmıştır. Oda sıcaklığında ters biçimde 10 dk kurutulan tüpler içerisindeki pelletlerin bulunduğu bölgeler işaretlenmiş 30-50 µl RNAaz-DNAaz bulunmayan su ile içerisinde elde edilen pellet çözülmüştür. Sonrasında önceki bölümlerde de bahsedildiği gibi RNA konsantrasyonu ayarlanmış, cDNA sentezi tamamlanmış ve SYBR® green reaksiyon döngüsü ile Try, TRP 1 ve TRP2 genleri için ekspresyon analizleri GAPDH kontrolüne göre tamamlanmıştır.

Biyopsi örnekleri için histoloji analizleri

Alınan deri biyopsi örnekleri 1 gün %4 formaldehit, 2 gün %30 sükröz ve 1 gün FBS içerisinde bekletilmiş ve sonrasında OCT ile muamele edilerek blok hale getirilmiştir. OCT içerisine zemine dik şekilde yerleştirilen biyopsi örnekleri histoloji kasetleri içerisinde likit nitrojene daldırılarak dondurulmuştur. Sonrasında kroyostat ile 10 µm kalınlığında kesit alınan deri numuneleri Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2'deki protokoller takip edilerek sırasıyla hematoksilin ve eosin (H&E) boyama ve Masson trikrom boyamaya tabi tutulmuştur. Boyama adımları takip edildikten sonra kesitlerin fazla kurummasına izin verilmeden "Cytoseal" ile kesitler kaplanmış ve uzun ömürlü olmaları sağlanmıştır. İstatiksel ve metrik analizler elde edilen görüntüler ile tamamlanmıştır.

Çizelge 4.1 : H&E boyama protokolü. *%70 ethanol içerisinde %5 asetik asit.

| No | Bileşen | Uygulama Süresi | No | Bileşen | Uygulama Süresi |
|----|--------------------|-----------------|----|----------------------------|-----------------|
| 1 | Ksilen | 4 dk | 12 | Scott tampon çözeltisi | 10 daldırma |
| 2 | Ksilen | 4 dk | 13 | Musluk suyu | Hızlı yıkama |
| 3 | Ethanol | 2 dk | 14 | %70 Ethanol | Hızlı yıkama |
| 4 | Ethanol | 3 dk | 15 | Eosin | 1 dk |
| 5 | %95 Ethanol | 1 dk | 16 | %95 Ethanol | 1 dk |
| 6 | %70 Ethanol | 1 dk | 17 | %95 Ethanol | 1 dk |
| 7 | Distile su | 2 dk | 18 | Ethanol | 2 dk |
| 8 | Mayer Hematoksilin | 8 dk | 19 | Ethanol | 3 dk |
| 9 | Musluk suyu | 1 dk | 20 | Ksilen | 3 dk |
| 10 | Asit alkol* | 20 saniye | 21 | Ksilen | 3 dk |
| 11 | Musluk suyu | Hızlı yıkama | 22 | Mikroskop slaytı hazırlama | |

Çizelge 4.2 : Masson trikrom boyama protokolü

| No | Bileşen | Uygulama Süresi | No | Bileşen | Uygulama Süresi |
|----|---------------------------------|---|----|----------------------------|---------------------|
| 1 | Bouin Fiksatif | 1 dk, mikrodalga uygulaması ile birlikte | 7 | Distile su | 3 kere hızlı yıkama |
| 2 | Musluk suyu | 5 dk yıkama | 8 | %1 Asetik asit | 1 dk |
| 3 | Weigert demir hematoksin | 10 dk | 9 | %95 Ethanol | 1 dk |
| 4 | Distile su | Hızlı yıkama | 10 | Ethanol | 2 dk |
| 5 | Fosfotungstik/fo sfomoldik asit | 10 dk | 11 | Ksilen | 1 dk |
| 6 | Anilin mavisi | 5 dk | 12 | Mikroskop slaytı hazırlama | |

İstatiksel analizler

Bütün veriler 3 bağımsız örnek kullanılarak sağlanmıştır ve sonuçlar ortalama \pm standart sapma şeklinde sunulmuştur. İstatiksel olarak $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.

4.3 Tartışma

4.3.1 Kemik doku çalışmaları

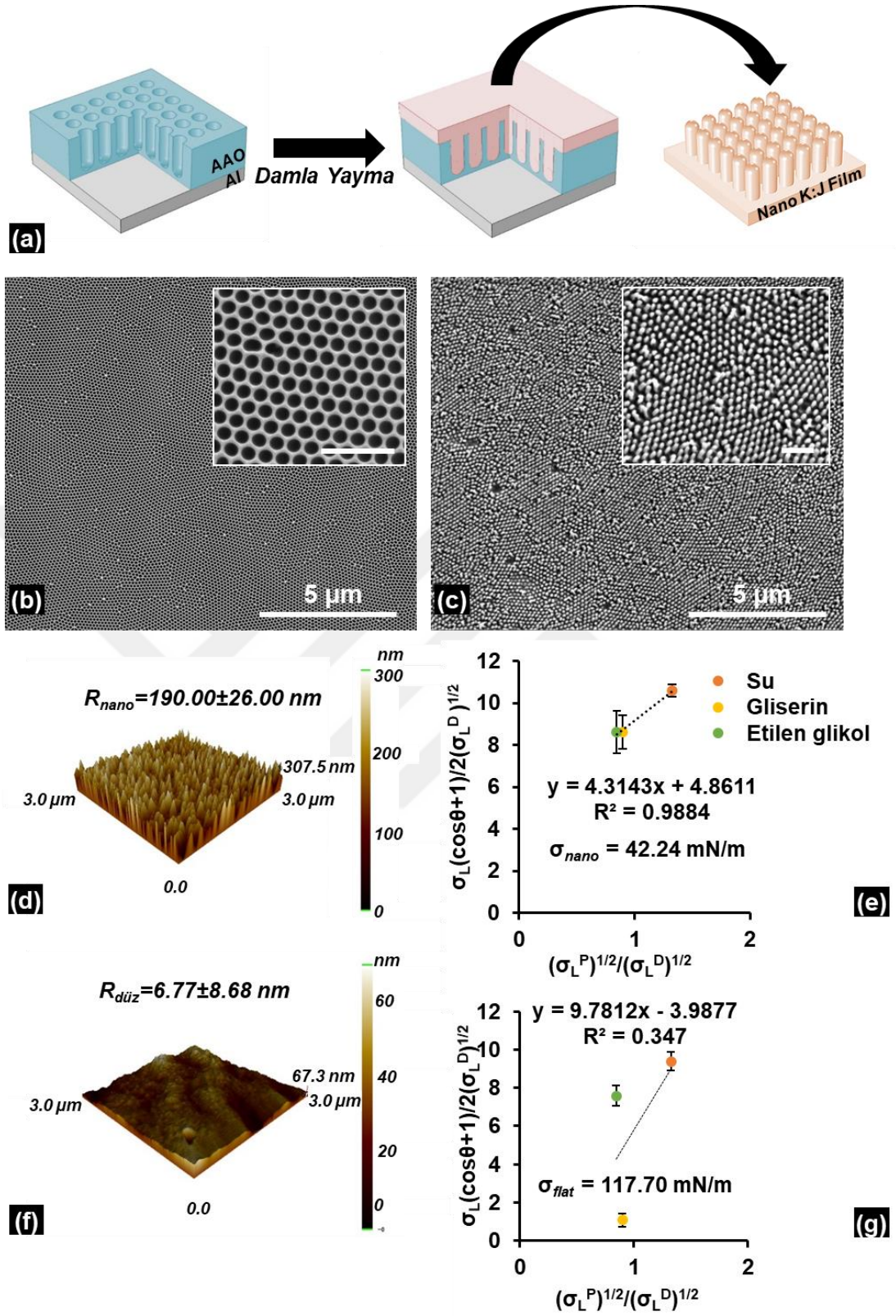
Tezin bu kısmında, nano K:J filmlerin litografik olmayan damla yayma tekniği ile AAO kalıplardan elde edilmesi ve bu filmlerin osteojenik potansiyellerinin tespit edilmesi üzerine yoğunlaşmıştır. Nano K:J filmlerin üretimi şematik olarak Şekil 4.1a`da sunulmuştur. Kalıplar iki aşamalı anodizasyon tekniği kullanılarak önceden de detaylandırıldığı şekilde üretilmiştir [18, 19, 22, 138, 170]. Öncelikle, AAO kalıplar hidrofobik bir silan olan ODTS ile yüzey enerjilerinin azaltılması ve filmleri yüzeyden kolaylıkla kaldırılabilmesi amacıyla kaplanmıştır. Modifiye edilmiş ve modifiye edilmemiş kalıpların temas açıları sırasıyla $119,10 \pm 17,80^\circ$ ve $45,80 \pm 9,30^\circ$ olarak ölçülmüştür. AAO kalıpların ve K:J filmlerin morfolojik karakterizasyonu SEM ile tamamlanmıştır. Sonuçlar silindir gözeneklere sahip kalıpların $103,9 \pm 4,20$ nm gözenek çapına sahip olduğunu göstermiştir (Şekil 4.1). Bu yapılar kullanılarak

yaklaşık 90 nm çapında ve 300 nm yüksekliğinde nanodesenlerin K:J filmler üzerine aktarılması sağlanmıştır. Kalıplar ve üretilen nanodesenlerin kolon çapları arasındaki fark, filmler kalıplardan kaldırılırken oluşan mekanik stresten kaynaklanmaktadır [22, 170].

Yüzey morfolojisinin ve enerjisinin bakteriyel/ hücrel cevap üzerindeki etkisinin araştırılması amacıyla ODTS kaplanmış Si yongalardan kaldırılan düz K:J filmler kontrol grubu olarak seçilmiştir. Filmlerin pürüzlülük değerleri nanodesenli filmler için $190,00 \pm 26,00$ nm olarak düz filmler için $6,77 \pm 8,68$ nm olarak tespit edilmiştir. Düz filmlerin yüzey enerjisi $117,70$ mN/m ve nanodesenli filmlerin yüzey enerjisi $42,24$ mN/m olarak hesaplanmıştır. Bu parametrelerin bakteriyel/hücrel davranışa ve protein adsorpsiyonuna olan etkisi tezin ilerleyen kısımlarında tartışılacaktır.

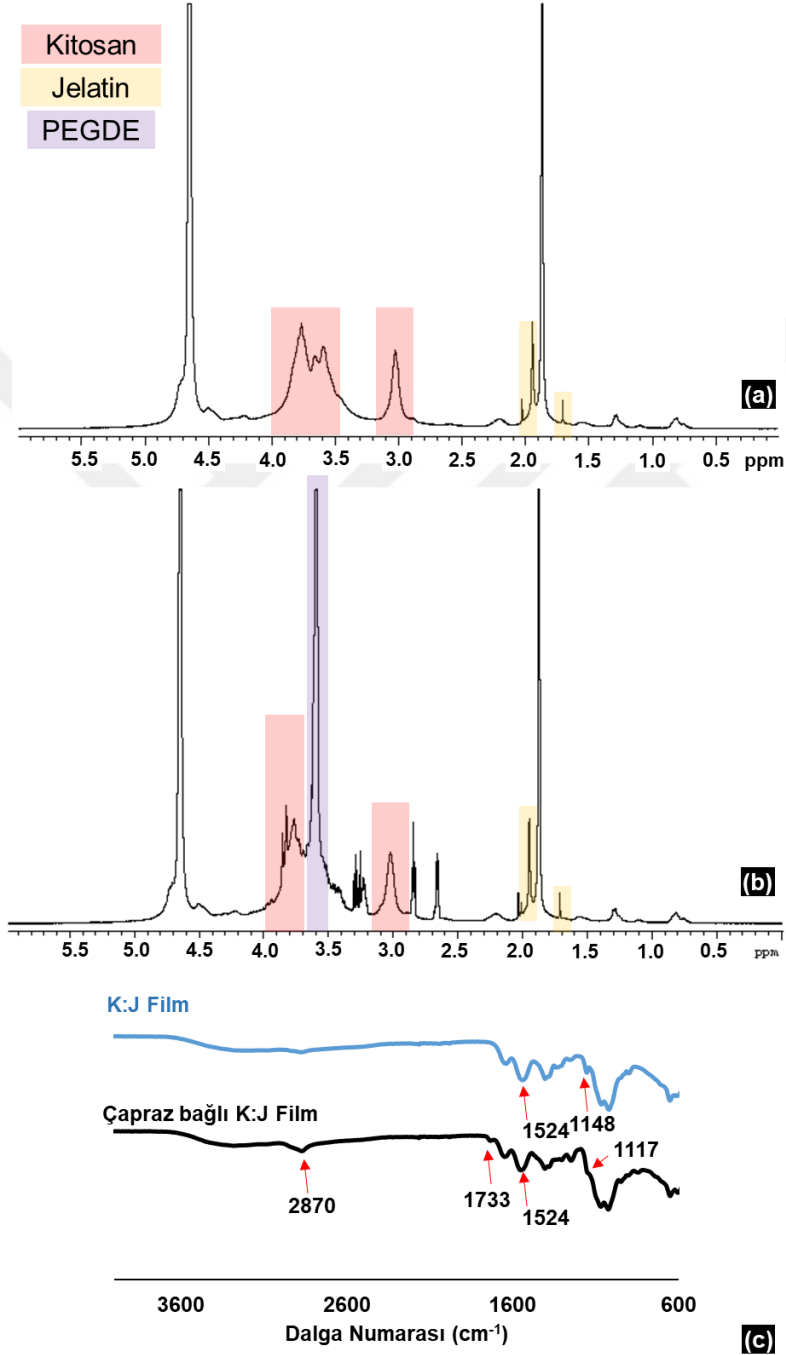
İyi bilinen biyouyumlu çapraz bağlayıcı olan PEGDE, K:J filmlerin sulu ortamlarda stabilizasyonu amacıyla kullanılmıştır. Bu çapraz bağlayıcı K:J solüsyonunda hidroksil grupları ve deproton amine grupları ile epoksi halkalarının açılması vasıtasıyla bağ kurmaktadır [23]. Çapraz bağlanma reaksiyonunun incelenmesi amacıyla ^1H NMR analizi yürütülmüş ve farklı fonksiyonel grupların varlığı ortaya konulmuştur (Şekil 4.2a,b). 3,5-4ppm ve 3,1 ppm de gözlenen piklerin glikoazamin kaynaklı H-2 protonlar olduğu gözlemlenmiştir. Bunlar kitosandaki primer amin gruplarına işaret etmektedir (Şekil 4.2a). Aynı şekildeki 1,5-2,00 ppm civarlarındaki pikler jelatinin proline zengin yapısına işaret etmektedir [171]. PEGDE eklenmesi ile birlikte, 3,7 ppm çevrelerinde gözlemlenen pikin PEGDE'nin $-\text{OCH}_2$ protonlarından kaynaklandığı görülmüştür ve bu sinyal epoksit gruplarının halka açılmasını göstermektedir [172]. İki spektradaki pikler (örneğin 3,1 ppm) amin gruplarınca karşılaştırıldığında serbest amin gruplarının PEGDE eklemesiyle yaklaşık %23,7 azaldığı gözlemlenmiştir [23, 173].

Filmlerin kimyasal karakterizasyonu ayrıca FTIR spektroskopisi ile analiz edilmiştir (Şekil 4.2e). PEGDE katılanmamış filmlerde 1148 cm^{-1} de gözlenen pik kitosanın tipik $-\text{NH}_2$ grubundan kaynaklanmaktadır. Bu pik amin ve epoksi gruplarının etkileşimi sonrası gözlemlenmemiştir. Ek olarak çapraz bağlanmış filmde 1733 cm^{-1} de gözlenen pik PEGDE varlığı ile ilgilidir ve bu pik PEGDE ve kitosanın bağlandığını göstermektedir [173]. Jelatin ve PEGDE arasındaki çapraz bağlanma ise 1117 cm^{-1} de gözlenen C-O-H ilişkili piki ilişkilidir. Ayrıca, 2870 cm^{-1} dalga numarasında PEGDE kaynaklı $-\text{CH}_2$ sinyalleri gözlemlenmiştir.



Şekil 4.1 : Nano K:J filmlerin üretim ve karakterizasyonu. Nanodesenli filmlerin üretiminin şematik gösterimi (a). AAO kalıpların (b), nanodesenli filmlerin SEM görüntüsü (c). Ölçek: 500 nm. Nanodesenli (d) ve düz filmlerin (f) 3-D AFM taraması. Nanodesenli (e) ve düz (g) filmlerin Owens/Wendth grafikleri.

1524 cm^{-1} ise kitosanın amin grupları ile jelatinin hidroksil grupları arasındaki elektrostatik etkileşime işaret etmektedir [174]. NMR ve FTIR sonuçları birlikte incelendiğinde PEGDE'nin kitosan ve jelatin ile kimyasal ve elektrostatik etkileşime girdiği gözlemlenmiştir.

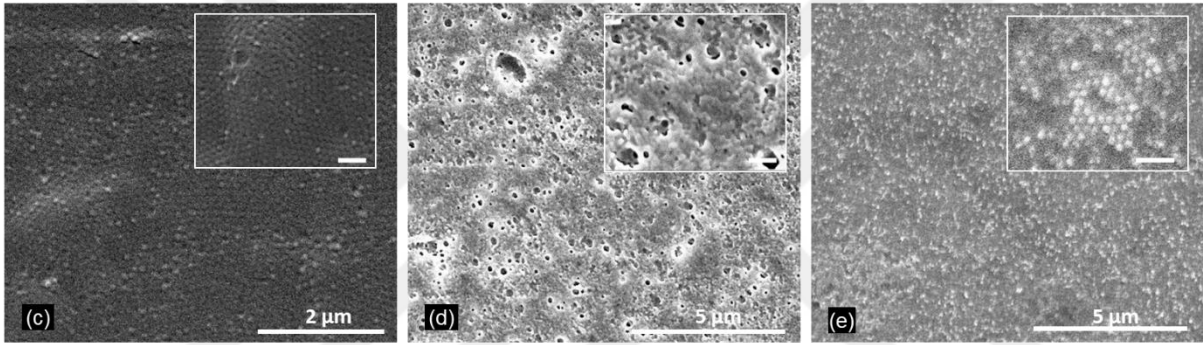
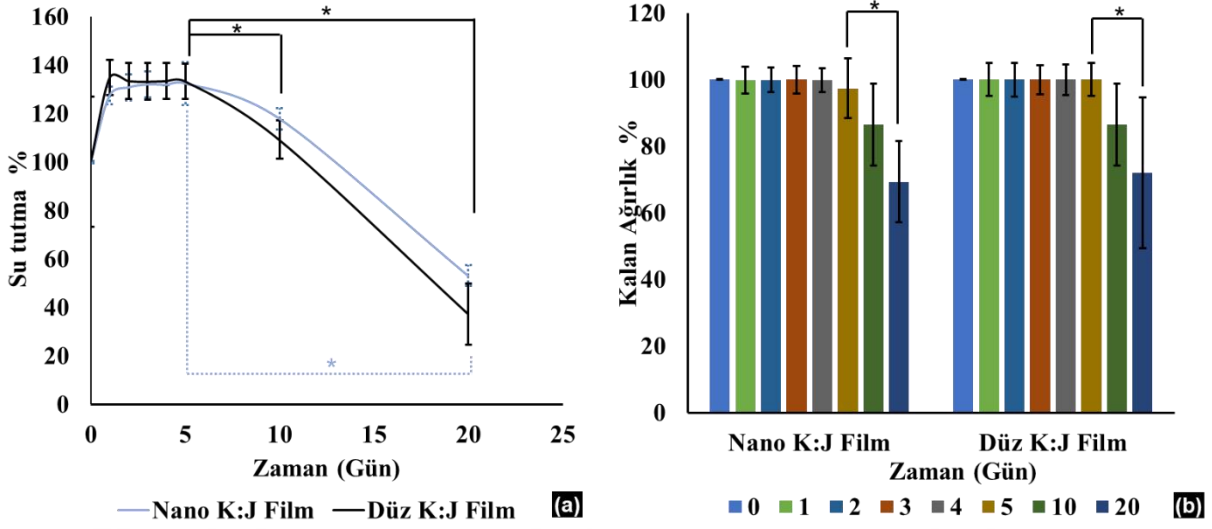


Şekil 4.2 : Nano K:J filmlerin kimyasal ve termal karakterizasyonu. Çapraz bağlı olmayan (a) ve olan (b) filmlerin ^1H NMR spektrumları. Filmlerin FTIR analizi (c).

Kimyasal ve termal özelliklerine ek olarak, filmlerin su tutma ve degradasyon davranışları incelenmiştir [175]. İlk olarak nanodesenli ve düz filmlerin su tutma kapasiteleri incelenmiştir ve sonuçlar malzemenin orjinal ağırlığının %30 una kadar miktardaki suyu absorblayabildiğini göstermiştir (Şekil 4.3a). Bu durum doğal polimerlerin hidrofilik yapısı ile açıklanabilir. Her iki filmde 5 gün boyunca stabil olduğu gözlemlenmiştir ve 20. günün sonunda ilk ağırlıklarının yaklaşık %40'ını kaybettikleri gözlemlenmiştir (Şekil 4.3b). Nanodesenlerin besi yeri içerisinde kalıcılıkları ayrıca incelenmiştir. Örnekler 1, 3 ve 24 saat DMEM içerisinde bekletilmiştir. SEM analizleri 1 saatlik periyodun sonunda nanoyapıların kısmen şiştiği ve birbirine değdiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.3c). Şişen nanoyapılar 3 saat sonunda bütünleşmiş bir görünüm almıştır ve bu durum degradasyonunda su tutma davranışı ile koordine olduğunu düşündürmektedir. Filmde bölgesel boşlukların da bu sebeple oluştuğu düşünülmektedir (Şekil 4.3d). Bu degradasyon davranışı gözlemlenmiş olmasına rağmen, nanodesen 24 saat sonunda halen gözlemlenmiştir (Şekil 4.3e). Hücre hatlarının saatler içerisinde benzer yüzeylere tutunduğu düşünüldüğünde [176], göreceli olarak stabil nanoyapıların kök hücre ve/veya osteoblast tutunum ve sonrasındaki gerçekleşecek olan osteojenik başkalaşımında rol aldığı düşünülmektedir [177-179].

S.Aurus (gram pozitif) ve *P.Aeruginosa* (gram negatif) iyi bilinen kemik patojenleridir ve implant yüzeylerinde biyofilm oluşumundan sorumludurlar [180, 181]. Ayrıca diğer kültür tiplerine göre yüksek antibiyotik direnç geliştirme potansiyeline sahiptirler [182]. Bu sebeple, bu bakteri türleri filmlerin antibakteriyel özelliklerinin araştırılmasında tercih edilmiştir. Polistiren (PS) yüzeyler antibiyotik (Amphicilin) varlığında ve yokluğunda kontrol grubu olarak tercih edilmiştir [180, 182, 183]. Koloni sayma analizi sonuçları nanodesenli ve düz filmlerin antibiyotiksiz PS kontrol grubuna göre baskın antibakteriyel özellik göstermiştir (Şekil 4.4). *P.Aeruginosa* patojen grubunda 4 saat ve 24 saat için nanodesenli ve düz filmler birbirinden anlamlı farklı sonuçlar vermemiştir. Ancak antibiyotik katılanmamış PS yüzeye nazaran CFU/ ml değerlerinde 4 saat için 2,9 kat ($p>0,05$) azalma tespit edilmişken 24 saat yaklaşık 1000 kat ($p<0,05$) azalma gözlemlenmiştir (Şekil 4.4a,b). Bu durumun oluşmasında kitosanın antibakteriyel özelliklerinin etkili olduğu bilinmektedir [184].

Nanodesenli filmlerin ($1555,56 \pm 525,1$ CFU/ml) antibakteriyel özelliğinin düz film-

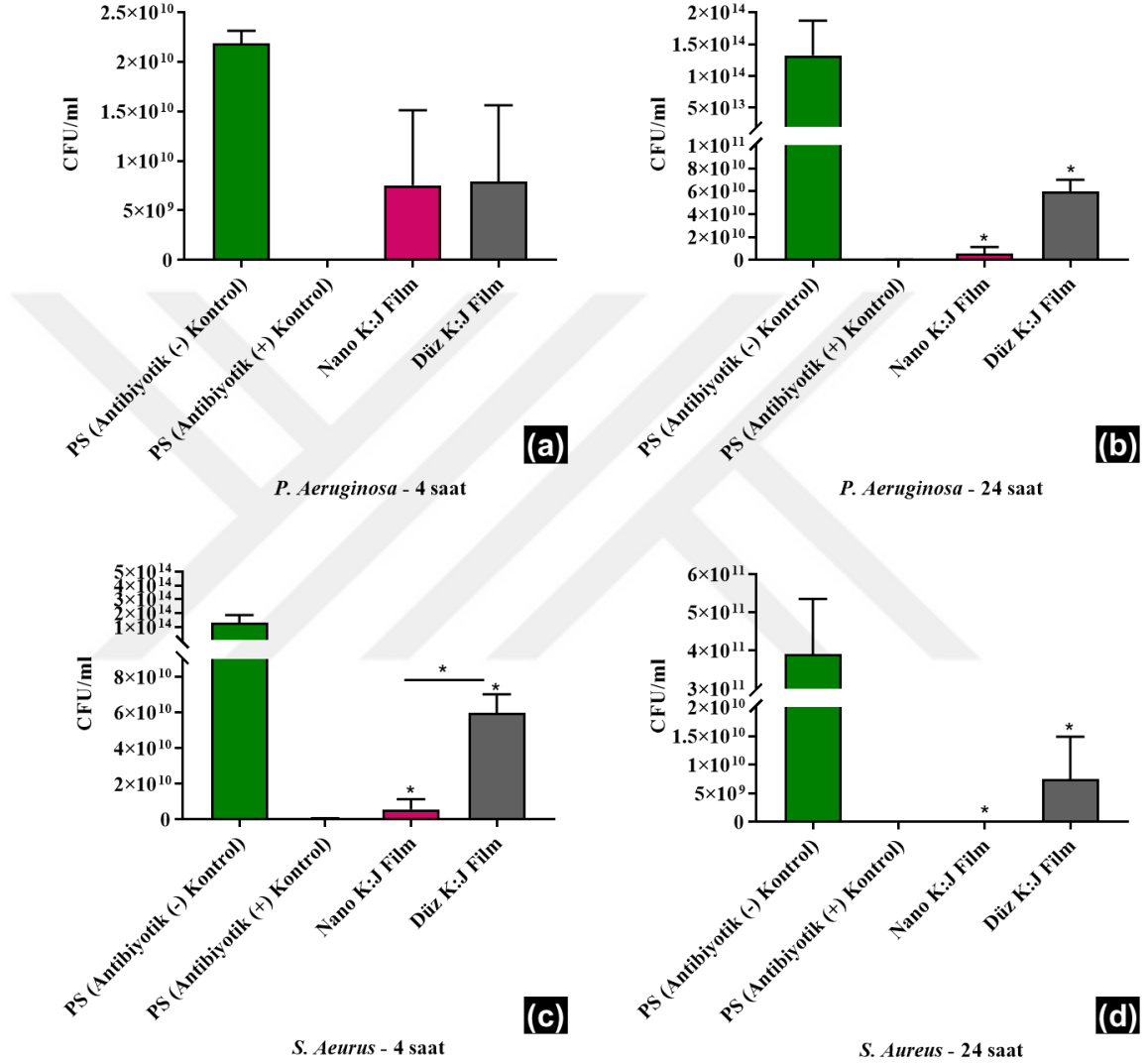


Şekil 4.3 : Nano K:J filmlerin fiziksel karakterizasyonu. K:J filmlerin su tutma (a) ve % kalan ağırlık (b) çalışmaları. Çapraz bağlı olan K:J filmler üzerindeki nanodesenlemenin besi yeri içerisinde 1 saat (c), 3 saat (d) ve 24 saat (e) bekletildikten sonraki SEM görüntüleri.

lere ($39666 \pm 1387,8$ CFU/ml) göre *S. Aeurus* patojen grubu için 4 saatlik inkübasyon sonrası yaklaşık 25,5 kat daha fazla olduğu gözlemlenmiştir ($p < 0,05$) (Şekil 4.4c). Benzer fark *P.Aeruginosa* patojen grubunda gözlemlenmemiştir (Şekil 4.4a). 24 saatlik inkübasyon süresinin sonunda *S. Aeurus* patojen grubu içinde antibakteriyel aktivitenin nanodesenli filmlerde ($1,01 \times 10^7 \pm 2,90 \times 10^6$ CFU/ml) düz filmlere ($7,00 \times 10^9 \pm 4,29 \times 10^9$ CFU/ml) nazaran 700 kat arttığı görülmüştür ($p > 0,05$) (Şekil 4.4 d).

Antibakteriyel aktivite için ideal yüzey enerjisinin 20-30 mN/m olarak rapor edildiği dikkate alınır [185], nanodesenli filmlerdeki göze çarpan yüksek antibakteriyel özelliklerin optimale yakın yüzey enerjisi (42,24 mN/m) ve/veya topografi ($R_{\text{nano}} = 190,00 \pm 26,00$ nm) kaynaklı [186, 187] olabileceği düşünülmektedir. Ancak düz yüzeyler için yapılan yüzey enerjisi hesaplamalarında elde edilen düşük R^2 değeri

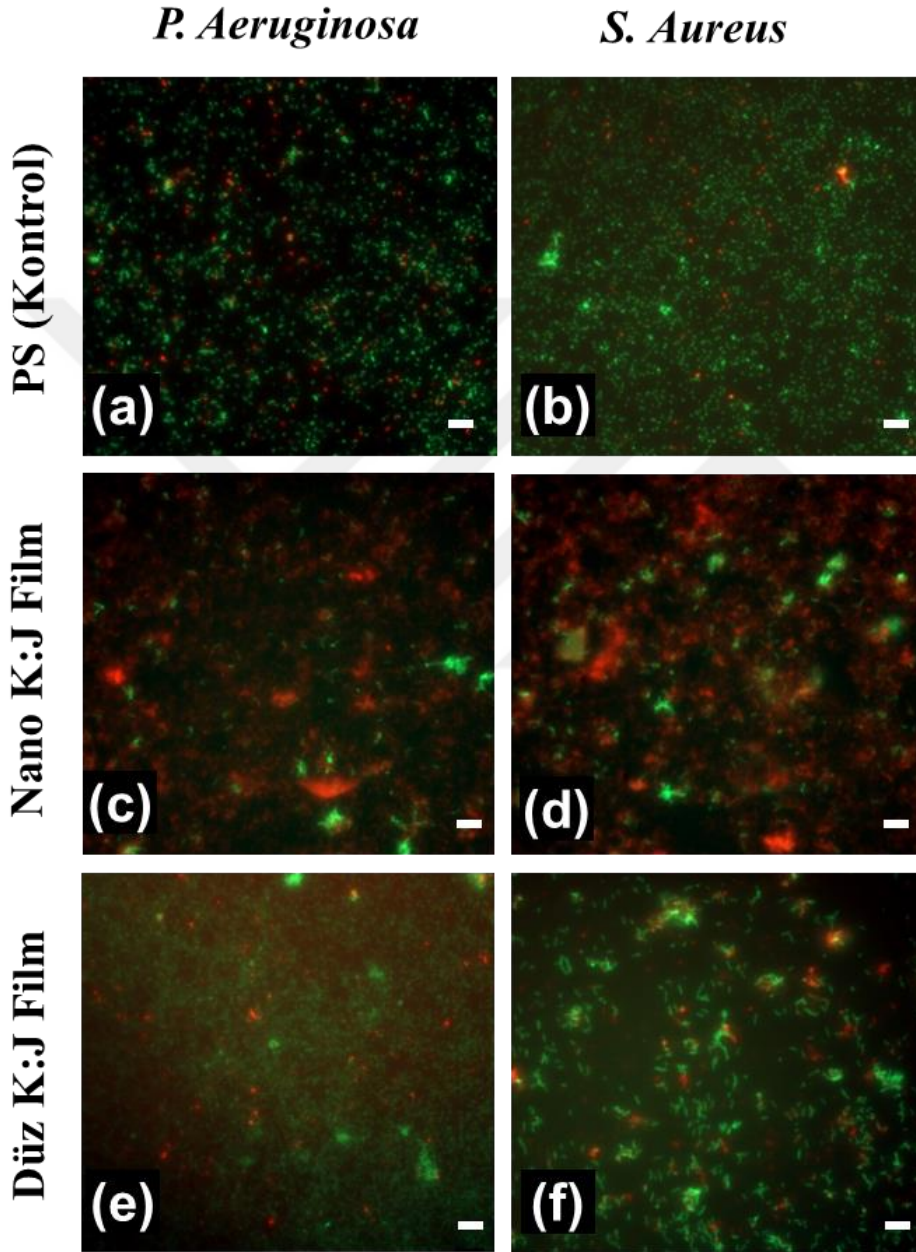
benzer yorumun düz filmler için yapılmasını güçleştirmektedir. Bu noktada şişen filmlerin temas açısının ölçümünü zorlaştırdığı tespit edilmiştir. Topografik etki literatürdeki veriler ile birlikte değerlendirildiğinde, hücrelerin iki desen arasında sıkıştıklarında hücre membranlarının deforme olarak gerildiği ve sonuç olarak da hücre ölümü ile sürecin sonuçlandığı düşünülmektedir [186].



Şekil 4.4 : Nanodesenli ve düz K:J filmlerin antibakteriyel aktivitesi. *P. Aeruginosa* (a, b) ve *S. Aureus* (c, d) patojenlerinin filmler üzerindeki koloni sayma sonuçları. Veriler ortalama ± standart sapma olarak sunulmuştur. (n=3) Antibiyotik katkılamaya olmayan PS kontrol grubuna göre * p<0,05 ; düz filmlere göre * p<0,05 anlamlı kabul edilmiştir. Çalışma 96'lık mikropalakalarda tamamlanmış ve 10⁶ CFU/ml bakteri konsantrasyonu ile çalışılmıştır.

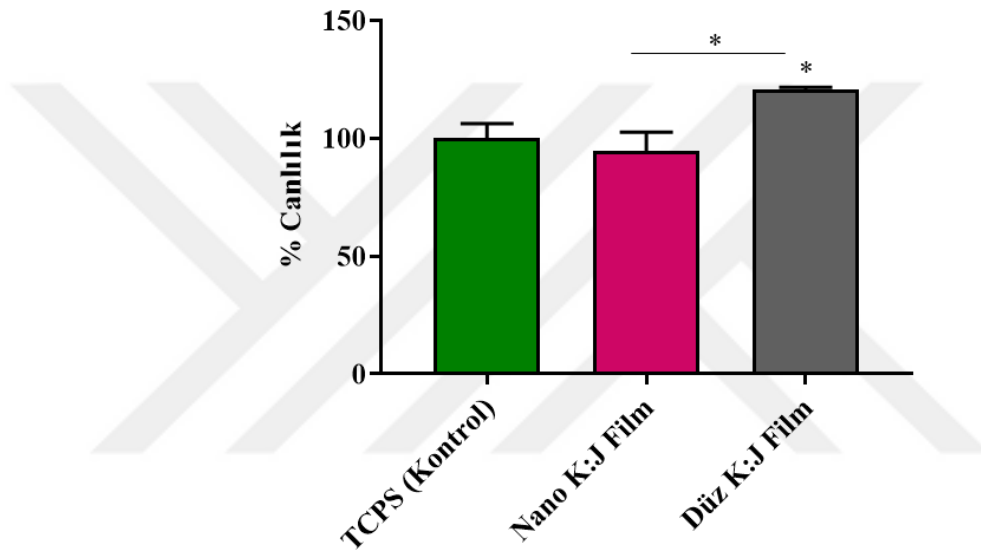
Nanodesenli filmlerin antibakteriyel aktivitesi canlı-ölü hücre boyamaları ile ayrıca görselleştirilmiştir. Bu çalışmalar koloni sayma çalışmaları ile benzer sonuçları ortaya koymuştur (Şekil 4.5) ve nanodesenli film büyük ölçüde hücre ölümüne sebep

olmuştur (Şekil 4.5c,d). Düz filmler de hücre ölümüne sebep olmuştur, ancak bu durum nanodesenli yüzeylere göre daha zayıf kalmıştır (Şekil 4.5e,f). Kitosanın antimikrobiyel özellikleri literatürde tartışılmış ve kitosanın amin grupları ile bakteri hücre membranının fosfolipid bileşenleri arasındaki elektrostatik etkileşimin bakteri ölümünü tetikleyebileceği tespit edilmiştir [188].



Şekil 4.5 : *P. Aeruginosa* patojenin PS kontrol (a), nanodesenli film (c) ve düz filmler (e) üzerinde propidiyum iyodid ve SYTO-9 boyaarı kullanılarak yapılan canlı-ölu boyaması. *S. Aureus* patojenin PS kontrol (b), nanodesenli film (d) ve düz filmler (f) üzerinde propidiyum iyodid ve SYTO-9 boyaarı kullanılarak yapılan canlı-ölu boyaması. Ölçek: 20 µm. Çalışma 96'lık mikropalakalarda tamamlanmış ve 10⁶ CFU/ml bakteri konsantrasyonu ile çalışılmıştır.

MSC hatları osteogenesis sürecinde osteoblastik ve kondroblastik farklılaşmanın başlatıcıları olmaları ve bu sayede kemik doku iyileşmesini sağladıkları için büyük öneme sahiptirler [189]. Bu sebeple, filmler üzerinde bu hücre hatlarının osteojenik besi yeri varlığındaki davranışları bir takım mineralizasyon ve genetik analiz açısından incelenmiştir. İlk olarak, hücre canlılığı analiz edilmiş ve TCPS kontrole ($100 \pm 6,28$) göre canlılıkta nanodesenli filmler ($94,67 \pm 7,90$) için anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. Düz filmlerin ($120 \pm 1,09$) TCPS kontrolüne göre daha anlamlı yüksek canlılık sonuçlarına sahip olduğu gözlemlenmiş ve çalışmada kullanılan bütün filmlerin MSC hatları için toksik olmadığı sonucuna ulaşılmıştır (Figür 4.6).

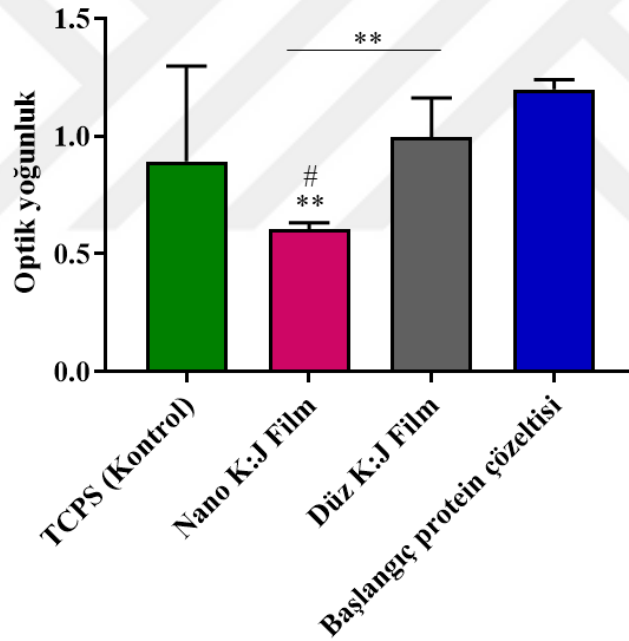


Şekil 4.6 : 3 günlük inkübasyon sonrası filmler üzerinde büyüyen MSC hatlarının % canlılık sonuçları, (n=3). TCPS kontrol grubuna göre * $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir. Çalışma 96'lık mikropalakalarda tamamlanmış ve 10^4 hücre/kuyu konsantrasyonu ile çalışılmıştır.

Canlılık analizleri sonrası, ALP aktivitesi ve kantitatif mineral birikimi 1 günden 21 güne kadar yürütülmüştür. ALP aktivitesi sonuçları nanodesenli filmlerde ($0,23 \pm 0,01$ birim) düz filmlere ($0,06 \pm 0,01$ birim) ve TCPS ($0,07 \pm 0,01$ birim) yüzeylere göre 7. gün için daha yüksek değerler sunmuştur ($p < 0,05$). Bu trend artarak 10. günde pik yapmıştır (Şekil 4.8a). ALP osteojenik olgunlaşmanın ilk belirteçlerinden olduğundan [190], bu sonuçlar farklılaşmanın/mineralizasyonun 7. günden itibaren nanodesenli filmlerde diğer substratlara göre daha fazla belirginleşmeye başladığını ortaya koymaktadır. Benzer eğilim mineral birikiminde de gözlemlenmiş olup 21. günde nanodesenli filmde ($2,05 \pm 0,02$ mM/ μ M DNA) mineral birikimin düz filmlere

($0,84 \pm 0,01$ mM/ μ M DNA) ve TCPS yüzeylere ($0,87 \pm 0,02$ mM/ μ M DNA) nazaran büyük oranda arttığı belirlenmiştir ($p < 0,005$) (Şekil 4.8b).

Oluşan nodüllerin gözlemlenmesi amacıyla alizarin kırmızısı boyaması yapılmıştır. Şekil 4.8c'de sunulduğu üzere nodül oluşumu nanodesenli filmler üzerinde düz filmlere ve TCPS ye göre özellikle 10 gün sonrası yapılan boyamalarda daha belirgindir. 21. günün sonunda yine nanodesenli filmler üzerinde nodül oluşumun daha fazla olduğu gözlemlenmiş ancak, bu nodüllerin boyutlarının 10. güne göre daha küçük olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, nanodesenli filmlerin MSC hatları için osteojenik farklılaşmada umut verici olduğunu ve bu hücre hatlarının nanotopografiye karşı hassas olduğunu göstermiştir [191]. MSC hatlarının stimülasyonu artan hücre reseptörlerinin ve fokal adezyon bölgelerinin artması ile açıklanabilir ki bu durum hücreler arası sinyal yollarını tetiklemekte ECM salımı ve takibinde osteogenesisi kontrol etmektedir [192].



Şekil 4.7 : Adsorbsiyon sonrası çözeltilerde kalan protein miktarının TCPS kontrol grubuna göre ve başlangıç konsantrasyonuna göre karşılaştırılması. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak sunulmuştur ($n=3$). TCPS kontrol grubuna göre ** $p < 0,005$; başlangıç konsantrasyonuna göre # $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir. Çalışma 96'lık mikropalakalarda tamamlanmış ve 10^4 hücre/kuyu konsantrasyonu ile çalışılmıştır.

Hücrel aktivitenin bir yüzeyde artması yüzeye kısa süre içerisinde biriken protein miktarı ile ilişkilidir. Proteinlerin adsorblanabildiği yüzeylerde hücre proliferasyonu, farklılaşması gibi aktivitelerin belirgin biçimde arttığı pekçok çalışmada rapor edilmiştir [193]. Dolayısıyla tezin bu kısmında filmler üzerindeki kısa süre içerisinde

yüzeylerde adsorblanabilen toplam protein miktarı araştırılmıştır (Şekil 4.7). Bu kapsamda FBS çözeltileri içerisinde numuneler bekletilmiş ve başlangıç konsantrasyonuna nazaran azalan protein miktarı ölçülmüştür. Düz filmlerin (0,99±0,16) ve TCPS yüzeylerin (0,89±0,40) daldırıldığı protein çözeltilerinden alınan optik yoğunluk değerleri başlangıç protein çözeltisi optik yoğunluğuna (1,19±0,04) nanodesenli filmlerin optik yoğunluk değerlerine (0,61±0,02) nazaran daha yakındır. Dolayısıyla sonuçlar nanodesenli filmlerde diğer gruplara nazaran daha fazla proteinin tutunduğu göstermiştir (**p<0,005). Bu durum artan yüzey alanı ile ilişkilidir. Aynı ilişki fokal bölgelerin, yüzey reseptörlerinin ve salınan ECM proteinlerinin yapışması ile de ilişkilendirilebilir. Bu durum da halihazırda nanodesenli filmlerde artan bir farklılaşma ve mineralizasyona sebep olmaktadır.

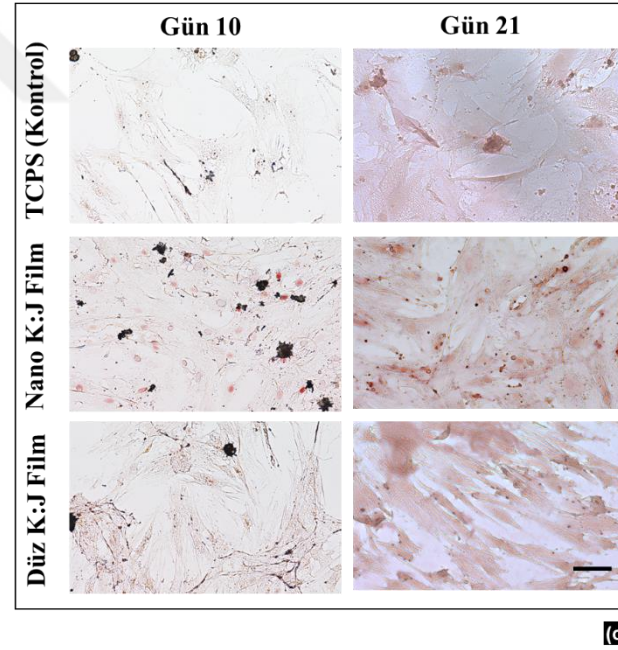
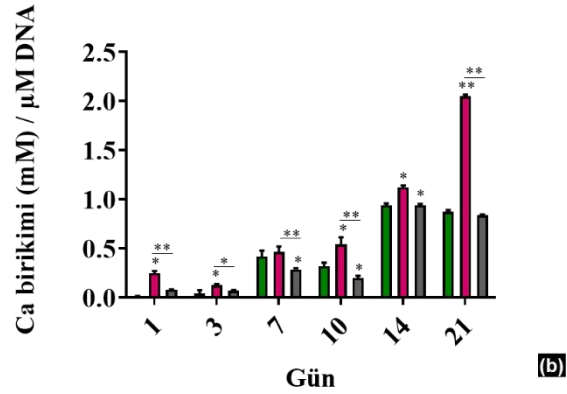
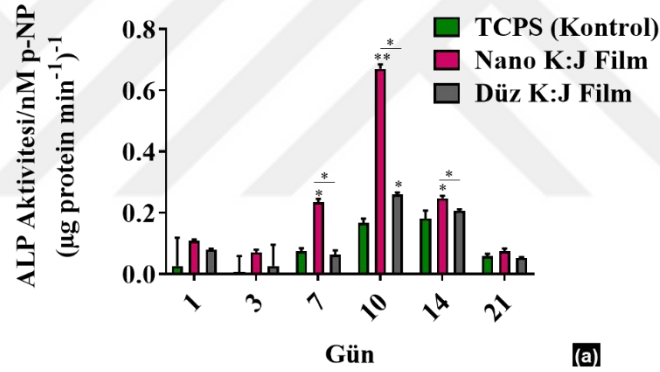
Sonrasında, 10. ve 21. günler için MSC hatlarının osteojenik farklılaşmadan sorumlu RUNX2, OPN ve OCN genlerinin ekspresyon seviyeleri takip edilmiştir. RUNX2 osteojenik farklılaşmanın başlangıcı için belirleyici bir gen olarak bilinirken, OCN post-proliferatif osteoblastlarda ekspres etmektedir ki bu gen osteogenesis yolağında baskın genlerden birisidir [194]. Ayrıca OPN erken ve orta dönemde glikolize fosfo-proteinlerin salımından sorumlu olup MSC farklılaşmasını tetikleyici yapıdadır [195]. MSC hatlarının RUNX2 ve OCN ekspresyonu her iki zaman noktası içinde anlamlı şekilde farklıdır. Bu farklılık değişen nanotopografik ve artan inkübasyon süresi ile doğru orantılıdır. RUNX2 ekspresyonu TCPS yüzeylere göre 21 kat, düz filmlere göre 18 kat daha fazladır (p<0,05) (Şekil 4.9a). Benzer trend 21. gün sonunda OPN ve OCN genleri için 10 kat olarak gözlemlenmiştir (p<0,05) (Şekil 4.9b,c). Bu sonuçlar nanodesenli filmlerin MSC hatlarındaki erken ve ileri dönemdeki osteogenesisi artırdığını göstermektedir. Benzer biçimde, OPN'deki artış artan mineral nodülleri ile ilişkilendirilebilir [196]. Sonuç olarak, ilgili genlerin yüksek ekspresyonu ve gözlenen yüksek mineralizasyon eğilim, nanodesenli filmlerin yani nanotopografik öğelerin MSC hatlarının farklılaşmasında/mineralizasyonunda önemli rol oynadığını ortaya koymaktadır [197].

Kemik doku ile ilgili çalışmaların son kısmında osteoblast benzeri Saos-2 hücre hatlarının farklılaşma ve mineralizasyon davranışları incelenmiştir. Bu hücre hatları MSC hatlarına göre daha olgun hücre hatlarıdır [198]. TCPS kontrol grubu ile karşılaştırıldığında nanodesenli ya da düz filmlerin canlılık sonuçlarının anlamlı bir farklılık göstermediği gözlemlenmiştir (Şekil 4.10). Bu durum filmlerin biyouyumlu yapısına vurgu yapmaktadır.

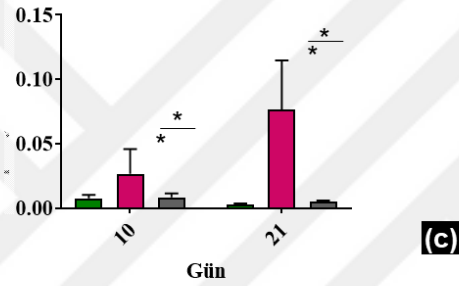
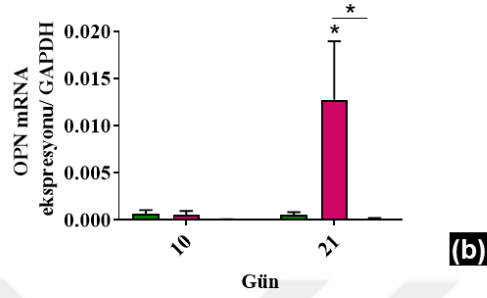
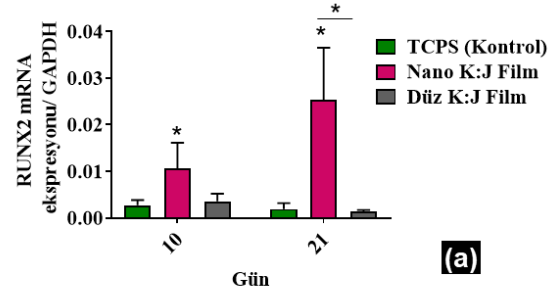
ALP aktivitesinin analizi için filmler üzerinde bu hücre hattı 10 güne kadar inkübe edilmiştir. Düz ($3,24 \pm 0,05$ birim) ve nanodesenli ($5,94 \pm 0,01$ birim) filmler için maksimum ALP aktivitesi 3. günün sonunda gözlemlenmiştir (Şekil 4.11a). Nanotopografi düz filmlere nazaran ALP aktivitesini 1,5 kat artırmıştır ($p < 0,05$) ve bu fark TCPS yüzeye ($0,54 \pm 0,16$ birim) göre 11 kattır ($p < 0,005$, 3 gün). Erken dönemde artan enzim aktivitesinin bu hücre hatlarının MSC hatlarından daha olgun olmalarıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Benzer şekilde nanodesenli yüzeylerde mineral birikimi ilk günden itibaren gözle görülür bir farkla diğer substratlardan farklıdır (Şekil 4.11b). En büyük farklılık 10. günde gözlemlenmiştir (nanodesenli filmlerde ($0,13 \pm 0,03$ birim) düz filmlere ($0,07 \pm 0,02$ birim) nazaran 1,85 kat daha fazla artış, $p < 0,05$). Bu sonuçlar ayrıca alizarin kırmızısı boyaması ile de doğrulanmıştır (Şekil 4.11c). Nanodesenli filmler üzerindeki hücrelerde nodül oluşumunun bütün zaman noktaları için diğer substratlar dan fazla olduğunu görülmüştür. MSC hücrelerine nazaran Saos-2 hücrelerinde kısa sürede daha büyük mineral nodüllerinin oluştuğu tespit edilmiştir.

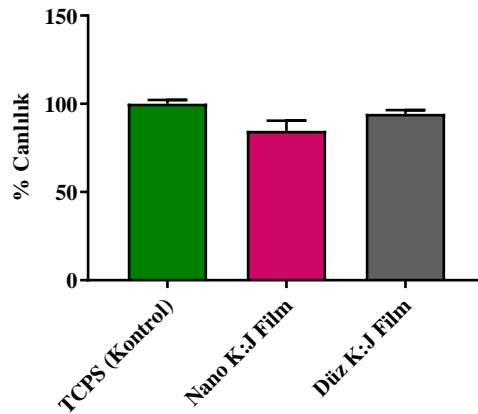
Mineralizasyon çalışmalarının devamında RUNX2, OCN ve OPN genlerinin ekspresyonları da bu hücreler için 3 ve 10 günlük sürelerle takip edilmiştir (Şekil 4.12). TCPS kontrol grubuna göre 3. günün sonunda nanodesenli filmlerde büyütülen hücrelerdeki RUNX2 seviyesinin 4 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,005$). Benzer sonuç düz filmlere kıyasla nanodesenli filmlerde 2 kat olarak elde edilmiştir ($p < 0,05$) (Şekil 4.12a). Artan inkübasyon süresi ile bu farkların 5 kata kadar çıktığı gözlemlenmiştir. Benzer biçimde, OPN geninin ekspresyon seviyesi nanodesenli filmler üzerinde diğer gruplara göre anlamlı şekilde fazladır ($p < 0,05$). OPN mineral üretiminden sorumlu osteoid oluşumunda ve patolojik kalsifikasyonda görevlidir [196]. Bu sebeple, nanodesenli filmler üzerinde oluşan kalsiyum nodül formasyonlarının yüksek OPN ekspresyonu ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Şekil 4.12b). OCN kemik mineralizasyonunun son aşamalarında yer alan bir gen olarak [199] nanodesenli filmler üzerinde 3. günün sonunda TCPS yüzeylere nazaran anlamlı olarak artmıştır. Benzer artış 3 kat olarak düz filmlere ve TCPS kontrol grubuna göre 10. gün sonunda da gözlemlenmiştir ($p < 0,05$) (Şekil 4.12c). Son olarak üretilen filmlerin immünolojik aktivitesi, kemik hasarlarının iyileşmesinde inflamasyon basamağının aldığı rol dikkate alınarak mürin makrofajları ile çalışılmıştır [200]. İnflamasyon belirteci olan TNF- α için gen ekspresyonu sonuçları mürin makrofajları kullanılarak filmler ve TCPS yüzeyler üzerinden elde edilmiş , g-



Şekil 4.8 : Nanodesenli ve düz K:J filmler üzerinde büyütülen MSC hatlarının mineralizasyon ve osteoblast farklılaşması açısından karşılaştırılması. ALP aktivitesi (a) ve kantitatif mineralizasyon sonuçlarının (b) 1., 3., 7., 10., 14. ve 21. günler için analizi. 10. ve 21. günler için alizarin kırmızısı boyama sonuçları. Ölçek: 100 µm (c). Veriler ortalama ± standart sapma olarak sunulmuştur (n=3). TCPS kontrol grubuna göre * p<0,05 ** p<0,005; düz filmlere göre * p<0,05 ** p<0,005 anlamlı kabul edilmiştir. Çalışma 96'lık mikropalakalarda tamamlanmış ve 10⁴ hücre/kuyu konsantrasyonu ile çalışılmıştır.



Şekil 4.9 : Filmler üzerinde büyütülen MSC hatlarının 10 ve 21. günler için qPCR sonuçları. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak sunulmuştur (n=3). TCPS kontrol grubuna göre * $p < 0,05$ ** $p < 0,005$; düz filmlere göre * $p < 0,05$ ** $p < 0,005$ anlamlı kabul edilmiştir. Çalışma 12'lik mikropalakalarda tamamlanmış ve 2×10^5 hücre/kuyu konsantrasyonu ile çalışılmıştır.

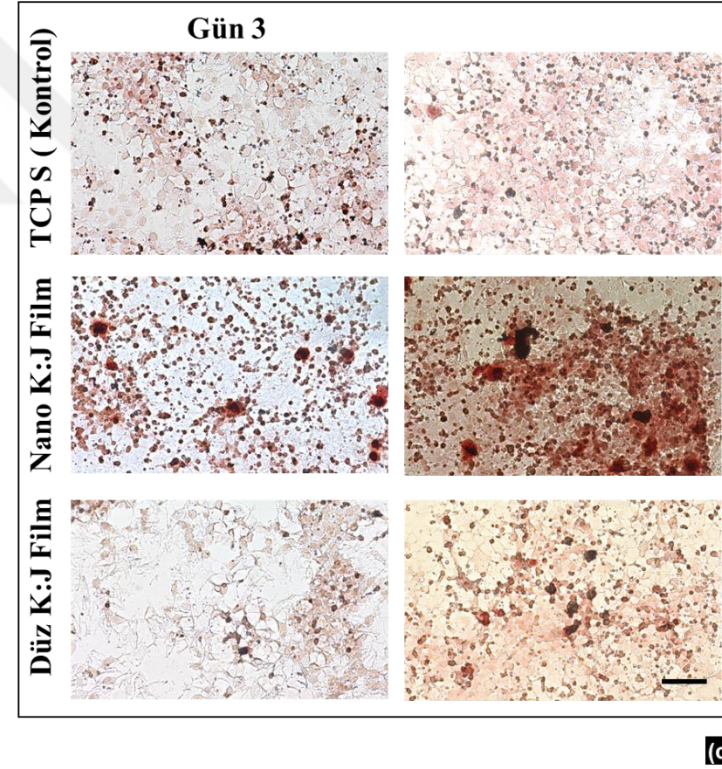
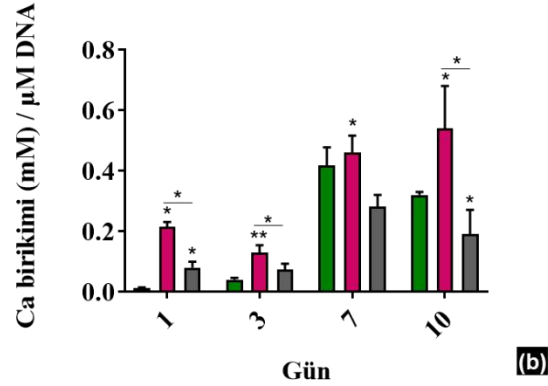
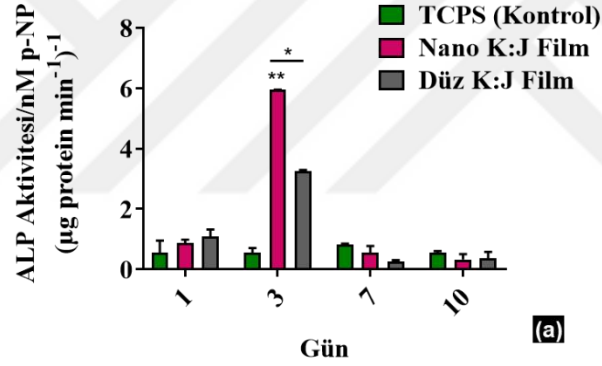


Şekil 4.10 : 3 günlük inkübasyon sonrası filmler üzerinde büyütülen MSC hatlarının % canlılık sonuçları. Örnekler arasında anlamlı fark bulunmamaktadır. Çalışma 96'lık mikropalakalarda tamamlanmış ve 10^4 hücre/kuyu konsantrasyonu ile çalışılmıştır.

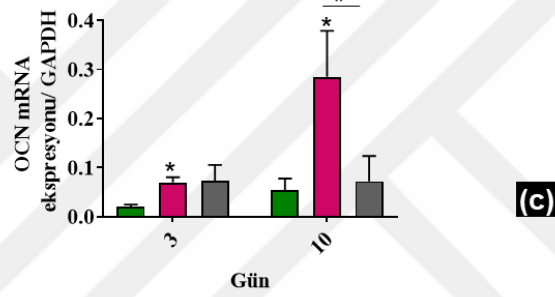
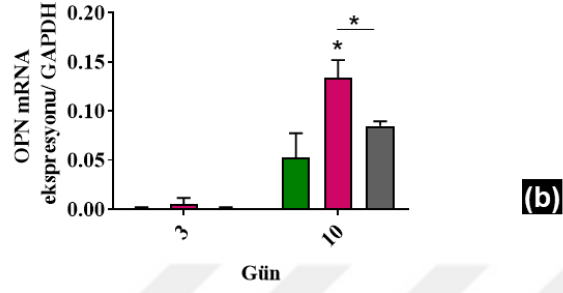
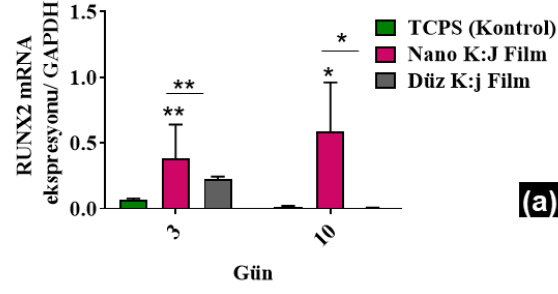
ruplar arasında herhangi bir anlamlı fark tespit edilmemiştir (Şekil 4.13).

Özetle, çalışmanın bu kısmında damla yayma yöntemi kullanılarak hazırlanan nanodesenli filmler fiziksel ve kimyasal olarak karakterize edilmiştir. NMR ve FTIR sonuçları PEGDE ile K:J filmlerin kovalent ve elektrostatik olarak etkileşime girdiğini göstermiştir. Ayrıca bu filmlerin 5 güne kadar sulu ortamlarda stabil kaldığı şişme ve kalan ağırlık analizleri ile ortaya konulmuştur. SEM analizi ile filmler üzerindeki nanotopografinin 24 saate kadar yüzeyde kalabildiği gösterilmiştir. Ayrıca filmlerin antibakteriyel analizleri tamamlanmış ve kemik patojenlerinin nano K:J filmler üzerinde canlılıklarının sınırlandırıldığı görülmüştür.

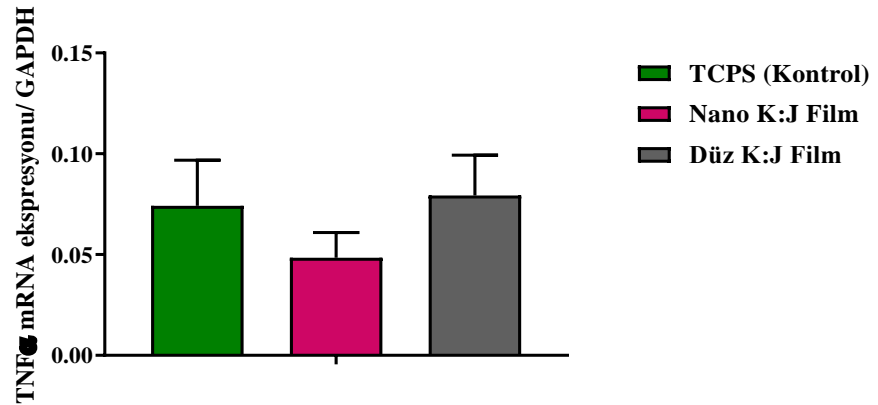
Olgun kemik hücreleri ve kök hücrelerin mineralizasyon potansiyelleri filmler üzerinde ALP aktivitesi, Ca miktar tayini, alizarin kırmızısı boyaması ve PCR analizleri ile ortaya konulmuştur. Elde edilen sonuçlar nano K:J filmlerin diğer test gruplarına nazaran mineralizasyonu tetikleyici özellikte olduğu tespit edilmiştir. Gelecekte uygun mekanik koşullar sağlandığında bu filmlerin implant yüzeylerine modifikasyonu planlanmıştır. Ayrıca bu filmlerin farklı büyüme faktörleri ya da ilaçlarla modifikasyonuda mümkün görünmektedir.



Şekil 4.11 : Nanodesenli ve düz K:J filmler üzerinde büyütülen Saos-2 hücre hatlarının mineralizasyon ve osteoblast farklılaşması açısından karşılaştırılması. ALP aktivitesi (a) ve kantitatif mineralizasyon sonuçlarının (b) 1., 3., 7. ve 10. günler için analizi. 3. ve 10. günler için alizarin kırmızısı boyama sonuçları (d). Ölçek: 100µm. Veriler ortalama ± standart sapma olarak sunulmuştur (n=3). TCPS kontrol grubuna göre * p<0,05 ** p<0,005; düz filmlere göre * p<0,05 ** p<0,005 anlamlı kabul edilmiştir. Çalışma 96'lık mikropalakalarda tamamlanmış ve 10⁴ hücre/kuyu konsantrasyonu ile çalışılmıştır.



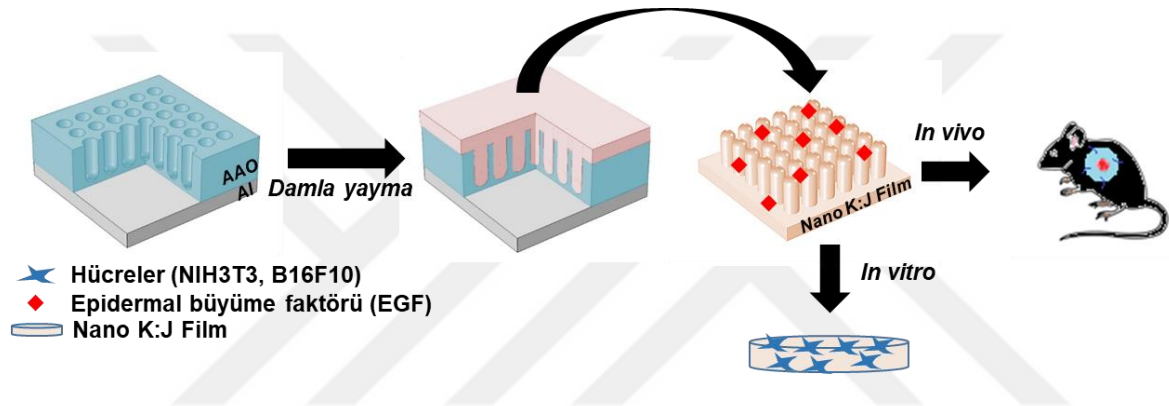
Şekil 4.12 : Filmler üzerinde büyütülen Saos-2 hücre hatlarının 3 ve 10. günler için RUNX2 (a), OPN (b) ve OCN (c) genlerinin ekspresyon sonuçları. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak sunulmuştur (n=3). TCPS kontrol grubuna göre * $p < 0,05$ ** $p < 0,005$; düz filmlere göre * $p < 0,05$ ** $p < 0,005$ anlamlı kabul edilmiştir. Çalışma 12'lik mikropalakalarda tamamlanmış ve 2×10^5 hücre/kuyu konsantrasyonu ile çalışılmıştır.



Şekil 4.13 : J774A.1 mürin makrofajlarının filmler üzerinde bir günlük inkübasyon sonrası elde edilen qPCR sonuçları. Gruplar arasında anlamlı fark gözlemlenmemiştir. Çalışma 12'lik mikropalakalarda tamamlanmış ve 2×10^5 hücre/kuyu konsantrasyonu ile çalışılmıştır.

4.3.2 Deri doku çalışmaları

Kemik doku rejenerasyonuna olan katkıları göz önüne bulundurulduğunda K:J filmlerin yumuşak dokularda göstereceği performansın da araştırılması gerektiği düşünülmüştür. Bu sebeple deri doku yumuşak doku modeli olarak seçilmiştir. Şekil 4.14'da gösterilen şematikten de anlaşıldığı üzere üretim sırasında filmlere EGF katkılama yapılmış ve bu katkılamanın nanotopografi ile birleştirdiğinde ortaya koyacağı olası sonuçlar *in vitro* (ikili kültürleme) ve *in vivo* olarak araştırılmıştır. İlk olarak fibroblast ve melanositlerin tekli ve ikili kültürlenmesi ile ortaya konulan veriler sonrasında ekzisyonel yara modeli üzerinden C5BL/6 fareleri ile yapılan çalışmalar ile desteklenmiştir.



Şekil 4.14 : Deri doku ile yapılan çalışmaların akışını gösteren şematik.

Örnek sayısının fazlalığı sebebiyle örnekler kodlama kullanılarak şekillerde sunulmuştur (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3 : Analizlerde kullanılan örnekler için oluşturulan lejant tablosu

| Örnek | Lejant |
|---------------------------------|-------------------|
| Doku kültürüne uygun polistiren | TCPS |
| EGF kaplanmış TCPS | TCPS* |
| EGF katkılanmış nano K:J film | Nano film_EGF (+) |
| EGF kaplanmış nano K:J film | Nano film_EGF* |
| Nano K:J film | Nano film |
| EGF katkılanmış düz K:J film | Düz film_EGF (+) |
| EGF kaplanmış düz K:J film | Düz film_EGF* |
| Düz K:J film | Düz film |
| Serum fizyolojik | Salin (Kontrol) |

Tekli ve ikili kültürlenme çalışmalarından önce filmlerden salınan EGF miktarı ELISA analizi ile tespit edilmiştir. 6 mm'lik çapta 96'lık mikrolaka ve deri yaralarına eş alanda kesilen K:J filmlerden salınan EGF 6., 24., 48., 72., 96., 120. ve 144. saatler için kaydedilmiştir. 6. günün sonunda düz yüzeylerde mm² başına düşen EGF'in tamamının salımı (14,5 ng/ml) gerçekleşmiş, ancak bu miktar nanodesenli film için yaklaşık %50 oranında kalmıştır (Şekil 4.15a). Nano filmlerin bu davranışları daha önce tanımlamak su alma ve kalan ağırlık analizleri ile de uyumluluk göstermektedir (Bkz. Şekil 4.3). Literatürde yara ortamındaki 1-5 ng/ml EGF'in hücre migrasyonunu, farklılaşmasını ve yara iyileşmesini optimal koşullarda gerçekleştirmede avantaj sağlayacağı gösterilmiştir [201]. Salım analizi incelendiğinde 3. günün sonunda yaklaşık 1,7 ng/ml EGF'nin nano filmlerden, 5,3 ng/ml EGF'ninde düz K:J filmlerden salındığı tespit edilmiştir. Dolayısıyla bu zaman noktasının hücre kültürü çalışmalarında kullanımına karar verilmiştir. Ayrıca ani (burst) salım filmler kullanılmadan önce PBS ile kısa süreli yıkandığından gözlenmemiştir.

Filmlerin NIH3T3, B16F10 ve bu hücrelerin ikili kültürlenmesi için biyouyumlulukları (mitokondriyel aktiviteleri) MTT analizi ile araştırılmıştır (Şekil 4.15b-e). Sonuçlar NIH3T3 ve B16F10 hücre hatları için Nano film_EGF (+) numunelerinin TCPS kontrol grubuna göre anlamlı bir biyoaktivite farklılığına neden olduğunu göstermiştir, (p<0,05). Benzer durum EGF katkılanmamış filmler içinde geçerlidir. EGF katkılmanın her iki hücre hattı içinde hücre canlılığına etkisi bulunmamaktadır. Örneğin; nano film_EGF (+) numunesindeki canlılık değeri nano film'e göre fibroblastlar için anlamlı farklı sonuçlar sunmamıştır (p>0,05). TCPS yüzeylere nazaran filmlerde artan metabolik aktivite, fibroblastların genel itibari ile EGF ile olan yüksek uyumuna işaret etmektedir [202].

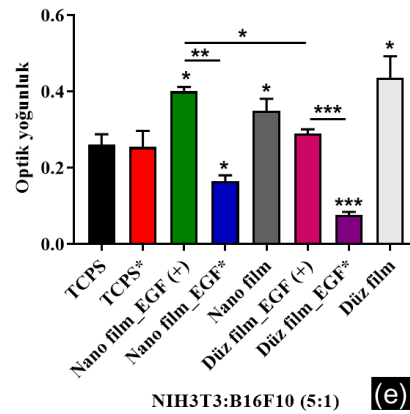
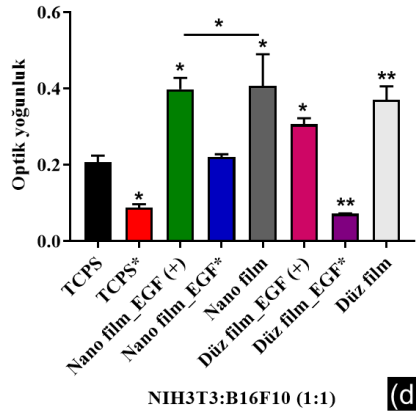
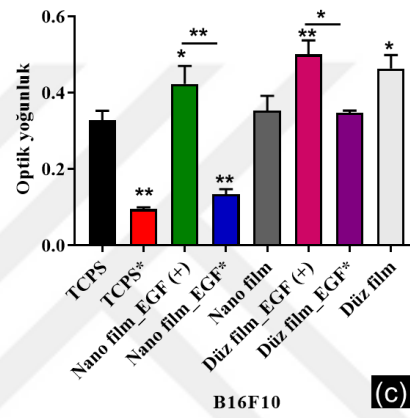
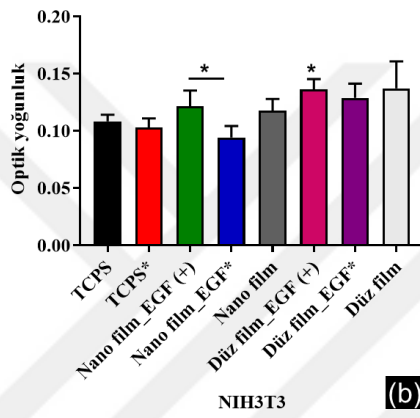
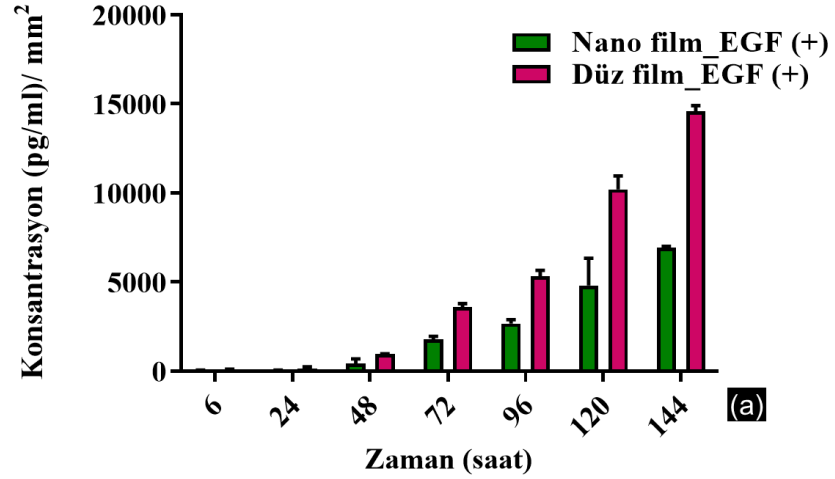
EGF'nin hücre ortamına gönderiminde salım prensiplerinin kullanılmasının sağladığı artıları göstermek amacıyla filmlere yüklenen miktarda EGF, TCPS ve film yüzeylerine kaplanmıştır. Elde edilen metabolik aktivite sonuçları salım sistemlerine nazaran bu kaplama yüzeylerden alınan canlılık değerlerinin en az 2 kat düşük çıktığını göstermiştir. Hücrelerin filmler üzerindeki tekil davranışları analiz edildikten sonra ikili kültürlenme ortamındaki hücresel performans araştırılmıştır. Bahsi geçen iki hücre hattı 1:1 ve 5:1 oranında karıştırılmış ve toplam hücre sayısı değiştirilmeden canlılık analizlerine başlanmıştır. 3 günlük inkübasyon süresinin ardından, 5:1 oranında çalışılan kuyularda canlılık açısından optimal sonuçlar gözlemlendiğinden ve bu oran

deri dokudaki fibroblast:melanosit oranına daha yakın olduğundan çalışmanın devamında kullanılmıştır.

Hücre çalışmalarına başlamadan önce bu hücrelerin yüzeylerinde taşıdıkları EGF reseptörlerinin (EGFR) miktarı analiz edilmiştir (Şekil 4.15). Fibroblastlar için sonuçlar incelendiğinde TCPS kontrol grubuna göre ($217,27 \pm 7,82 \mu\text{g EGFR/ mg protein}$) nano film_EGF (+) örneğinden ($320,57 \pm 2,61 \mu\text{g EGFR/ mg protein}$) 1,5 kat daha fazla EGFR elde edilmiştir ($p < 0,05$). Benzer şekilde, EGF yokluğunda nano filmler ($327,33 \pm 3,27 \mu\text{g EGFR/ mg protein}$) üzerindeki fibroblastlardan elde edilen EGFR miktarının TCPS kontrol grubundan 1,5 kat fazla olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Bu durum nanodesenli filmlerde EGF varlığına bakılmaksızın EGFR reseptörlerinin fibroblastlarda arttığını göstermiştir. Ancak düz film_EGF (+) ve düz filmlerde benzer istatistiksel farklılık gözlemlenmemiştir. Düz film_EGF (+) örneğinden ($125,38 \pm 8,25 \mu\text{g EGFR/ mg protein}$) salınan EGFR miktarı düz filmlere ($65,25 \pm 8,15 \mu\text{g EGFR/ mg protein}$) nazaran 1,9 kat daha fazladır ($p < 0,05$) (Şekil 4.16a). Bu durum EGF varlığının düz filmlerde EGFR sentezini tetiklediğini göstermektedir.

Burada dikkat çeken nokta fibroblastlarda bu fark düz filmler üzerinde görülürken, üç boyutlu keranosit ağları içerisinde gelişim gösterme eğilimi olan melanositler için düz film_EGF (+) örneği ($31,20 \pm 55,86 \mu\text{g EGFR/ mg protein}$) ve düz film ($35,10 \pm 31,39 \mu\text{g EGFR/ mg protein}$) arasında herhangi bir farklılık tespit edilmemesidir. Ancak EGF varlığına bağlı benzer karşılaştırma nano film_EGF (+) örneği ($154,27 \pm 4,51 \mu\text{g EGFR/ mg protein}$) ve nano film ($100,67 \pm 6,25 \mu\text{g EGFR/ mg protein}$) örneği arasında yapıldığında 1,5 fark tespit edilmiştir ($p < 0,05$) (Şekil 4.16b). Dolayısıyla EGF varlığına ilaveten nanodesenlemenin de melanositlerde EGFR salımını tetiklediğini ortaya koymaktadır.

Tekli kültürleme çalışmalarına ilaveten, yapılan ikili kültür çalışmaları da melanositlerle yapılan çalışmalarla benzer sonuçları ortaya koymuştur. Nano filmler üzerinde büyütülen ikili kültür hücrelerinin toplam EGFR salımı mg protein başına $301,05 \pm 7,01 \mu\text{g}$ olurken, bu değer nano film_EGF (+) örneği için mg protein başına $462,05 \pm 2,67 \mu\text{g}$ olarak tespit edilmiştir. Nano film_EGF (+) örneği fibroblast ve melanosit hücreleri açısından incelendiğinde belirtilen oranda fibroblastlardan $256,46 \mu\text{g}$ ve melanositlerden $30,85 \mu\text{g EGFR}$ 'ın salımı beklenmektedir (Toplamda $287,31 \mu\text{g}$). Ancak ikili kültürleme sonucu elde edilen miktar ($462,05 \mu\text{g}$) bu değerden 1,61



Şekil 4.15 : In vitro koşullarda EGF salımının zamana bağlı değişimini gösteren grafik (a). EGF (+/-) filmler üzerindeki NIH3T3 (b), B16F10 (c) ve bu hücre hatlarının 1:1(d) ve 5:1(e) oranında hazırlanmış ikili kültürlerinin filmler üzerindeki canlılık değerleri. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak sunulmuştur (n=3). TCPS kontrol grubuna göre * p<0,05 ** p<0,005 *** p<0,0005 anlamlı kabul edilmiştir. İkili gruplar halinde karşılaştırma yapılırken bağlantı çizgileri kullanılmış ve * p<0,05 ** p<0,005 *** p<0,0005 anlamlı kabul edilmiştir. Çalışma 96'lık mikropalakalarda 3 günlük inkübasyon süresinde tamamlanmış ve 10^4 hücre/kuyu konsantrasyonu ile çalışılmıştır.

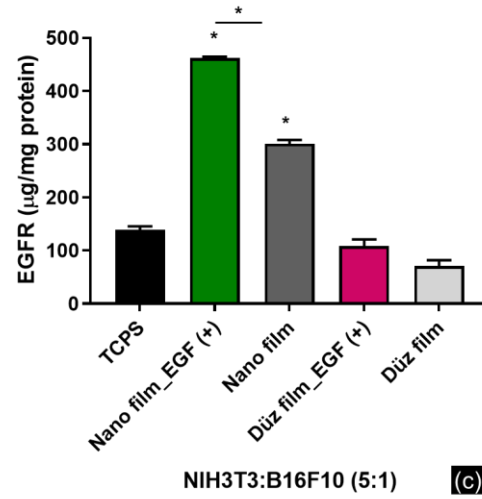
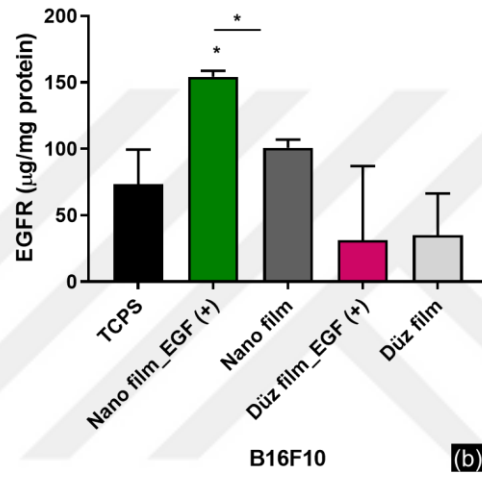
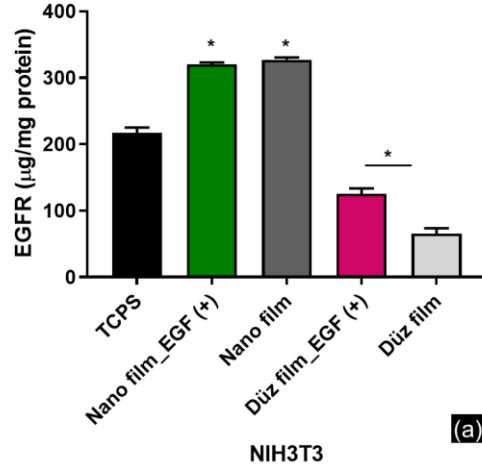
kat daha fazladır. Bu durum hücrelerin bu iki etmenin birleşiminde sekresyonlarını belirgin şekilde artırdığını göstermektedir (Şekil 4.16c). Yara iyileşme sürecinin bir parçası olan ECM bileşenlerinin salımı aynı zamanda melanogenez süreci için de belirleyicidir. Embriyonik ektoderm tabakasında geçici olarak oluşan ve ECM ve/veya büyüme faktörlerinin etkisi ile farklı hücelere dönüşen nöral krest adacıklarının fibronektin varlığında melanositlere farklılaşması da bu ECM bileşeninin melanojeniz açısından önemini ortaya koymaktadır [203]. Bu sebeple, çalışmada fibroblastlardan ve ikili kültür sisteminden salınan fibronektin miktarı da takip edilmiştir (Şekil 4.17). Fibroblastlar açısından yapılan analiz incelendiğinde nano filmlerin ($12,08 \pm 1,19 \mu\text{g}$ fibronektin/ mg protein) TCPS kontrol grubuna ($6,73 \pm 0,56 \mu\text{g}$ fibronektin/ mg protein) göre 1,8 daha fazla fibronektin salımına olanak sağladığı tespit edilmiştir ($p < 0,05$), (Şekil 4.17a). Bu durum EGF varlığından dolayı TCPS kontrol grubuna nazaran anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir. Ancak fibroblastlarda EGFR analizleri ile benzer olarak fibronektin salımında da nano film_EGF (+) ve nano film örneklerinde düz film gruplarına göre belirgin bir biçimde artış olduğu tespit edilmiştir.

İkili kültürleme yapıldığında birim protein başına düşen fibronektin miktarında her numune için yaklaşık %20 bir azalma olduğu görülmüştür (Şekil 4.17b). Bu durumun sistemde %20 oranında azalan fibroblast (5:1 hücre oranı nedeniyle) miktarı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. İkili kültür sistemi incelendiğinde düz film_EGF (+) örneğinden ($3,38 \pm 0,46 \mu\text{g}$ fibronektin/ mg protein) salınan fibronektin miktarının düz film örneğinden ($1,95 \pm 0,55 \mu\text{g}$ fibronektin/ mg protein) salınan fibronektin miktarından 1,73 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$).

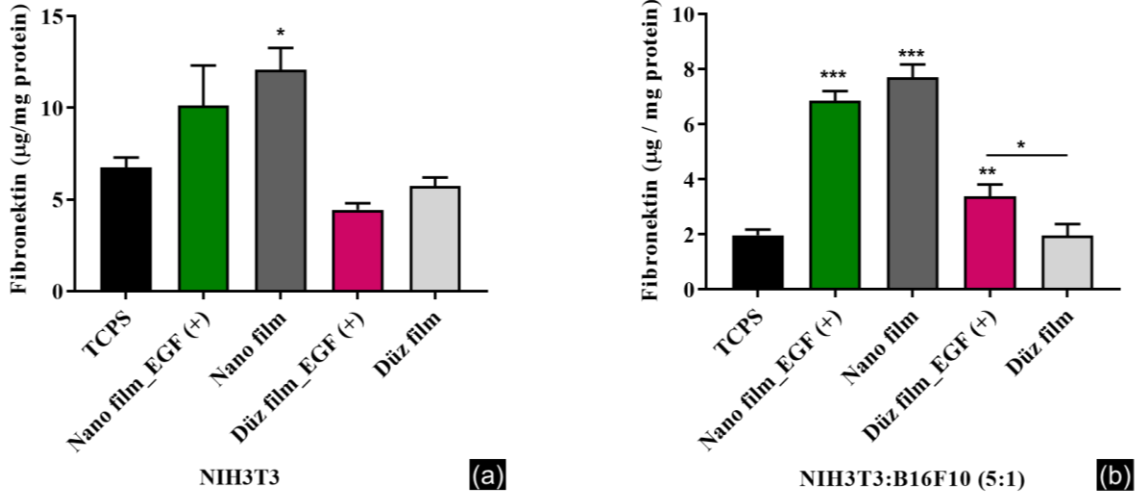
Literatür incelendiğinde EGF varlığının fibronektin salımını tetiklediğini görülmüştür [130]. Ancak, gerek tekli fibroblast kültürlemesi ($9,27 \pm 2,19 \mu\text{g}$ fibronektin/ mg protein) gerekse ikili kültürleme ($6,84 \pm 0,39 \mu\text{g}$ fibronektin/ mg protein) için bu fibronektin salımını artırıcı bu etki nano film_EGF (+) örneğinde nanotopografi ile birleşmiştir ve fibronektin salımı belirgin biçimde artmıştır.

EGFR ve fibronektin salımları birlikte değerlendirildiğinde nanodesenlemenin EGF varlığından bağımsız olarak hücrel aktiviteyi artırdığı tespit edilmiştir. Düz filmlerde EGF varlığının etkisi daha belirgin biçimde gözlemlenmiştir. Bu durumun 3. günün sonunda salınan EGF miktarının düz filmlerde ($5,3 \text{ ng/ml/mm}^2$) nano filmlere ($1,7 \text{ ng/ml/mm}^2$) nazaran daha fazla olması ile açıklanabileceği düşünülmektedir.

Deri yaralanmalarındaki sorunlardan biri de bu bölgelerde oluşan melanin bakımından fakir hipopigmente bölgelerdir. Dış görünüş ile ilgili endişelerin ötesinde bu tip bölge-



Şekil 4.16 : NIH3T3 (a), B16F10 (b) ve ikili kültür sistemindeki (c) EGFR sekresyonunun TCPS kontrol grubu ve K:J filmler varlığında tespiti. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak sunulmuştur (n=3). TCPS kontrol grubuna göre * $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir. İkili gruplar halinde karşılaştırma yapılırken bağlantı çizgileri kullanılmış ve * $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir. Çalışma 96'lık mikropalakalarda 3 günlük inkübasyon süresinde tamamlanmış ve 10^4 hücre/kuyu konsantrasyonu ile çalışılmıştır.

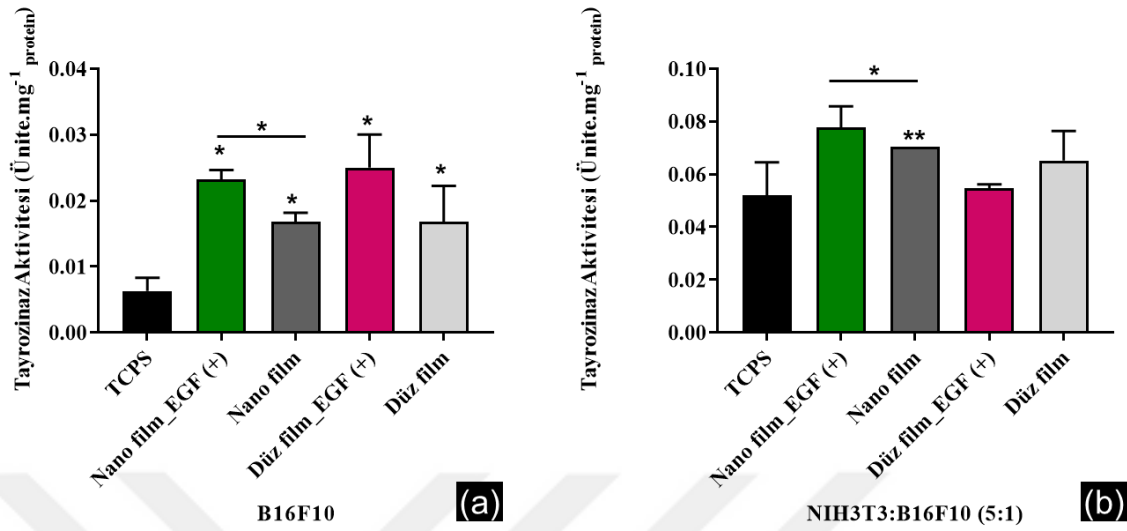


Şekil 4.17 : K:J filmler ve TCPS yüzeyler üzerinde büyütülen NIH3T3 (a) ve NIH3T3:B16F10 (5:1) (b) hücrelerinden salınan fibronectin miktarı. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak sunulmuştur (n=3). TCPS kontrol grubuna göre * $p<0,05$ ** $p<0,005$ *** $p<0,0005$ anlamlı kabul edilmiştir. İkili gruplar halinde karşılaştırma yapılırken bağlantı çizgileri kullanılmış ve * $p<0,05$ anlamlı kabul edilmiştir. Çalışma 96'lık mikropalakalarda 3 günlük inkübasyon süresinde tamamlanmış ve 10^4 hücre/kuyu konsantrasyonu ile çalışılmıştır.

lerin melanoma türlerini tetiklediği bilinmektedir [204]. Dolayısıyla melanin salımı ile ilgili yollarında yara iyileşme sürecinde test edilmesi gerekmektedir. Melanin salım yolağı melanin stimülasyon hormonunun salımı ile başlamakta olup, tirozinaz salımı ile devam eder. Bu nedenle tirozinaz enzim aktivitesi melanositler ve ikili kültürleme için örnekler üzerinde analiz edilmiştir (Şekil 4.18).

Melanositler ile yapılan çalışmalarda nano film_EGF (+) örneği ($0,02\pm0,002$ Ünite/ mg^{-1} protein) TCPS kontrol grubuna ($0,004\pm0,0003$ Ünite/ mg^{-1} protein) göre 5 kat fazla bir enzim aktivitesi göstermiştir ($p<0,05$). Ayrıca nano film_EGF (+) örneği nano filmlere ($0,016\pm0,009$ Ünite/ mg^{-1} protein) nazaran 1,25 kat daha fazla enzim aktivitesi göstermiştir ($p<0,05$). Bu durum üç boyutlu filmlerin EGF ile katkılındıklarında melanosit hücrelerinin melanin sekresyonlarını tetiklediğini göstermektedir (Şekil 4.18a). İlginç bir biçimde ikili kültürleme tekniği ile çalışıldığında fibroblastların varlığının tirozinaz aktivitesini her grup için olumlu yönde etkilediği görülmüştür. Melanositlerin tekil kültürlemlerindeki sonuçlar ile paralel olarak, nano film_EGF (+) örneği ($0,077\pm0,008$ Ünite/ mg^{-1} protein) nano filmlere ($0,070\pm E-18$ Ünite/ mg^{-1} protein) nazaran 1,1 kat daha fazla enzim aktivitesi göstermiştir ($p<0,05$). İkili kültürleme içerisinde melanosit miktarı tekli kültürlemeye göre 5 kat azalmasına rağmen (5:1 hücre oranı nedeniyle) fibroblast kaynaklı hücresel aktivitenin melanosit

sekresyonlarını tetiklediği düşünülmektedir [205]. Literatürde bu noktada sınırlı bilgi olması çalışmamızın bu kısmında yapılabilecek açıklamaları sınırlandırmaktadır.



Şekil 4.18 : K:J filmler ve TCPS yüzeyler üzerinde büyütülen B16F10 (a) ve NIH3T3:B16F10 (5:1) (b) hücrelerinin tirozinaz aktivitesi, Veriler ortalama ± standart sapma olarak sunulmuştur (n=3). TCPS kontrol grubuna göre * p<0,05 ** p<0,005 anlamlı kabul edilmiştir. İkili gruplar halinde karşılaştırma yapılırken bağlantı çizgileri kullanılmış ve * p<0,05 anlamlı kabul edilmiştir. Çalışma 96'lık mikropalakalarda 3 günlük inkübasyon süresinde tamamlanmış ve 10⁴ hücre/kuyu konsantrasyonu ile çalışılmıştır.

Melanogenez sürecinde son ürün olan melaninin farklı kaynaklardan tespiti yapılmıştır (Şekil 4.19). Analiz edilecek örnekler hücre lizatlarından, hücre kültürü medyumundan ve K:J filmlerden elde edilmiştir. Nano film_EGF (+) örneklerinden her üç kaynak için de elde edilen melanin miktarı melanositler için anlamlı biçimde diğer gruplardan fazladır. Hücre içi biriken melanin açısından melanosit kültürü açısından değerlendirildiğinde nano film_EGF (+) örneği (178,00±0,92 µg melanin/ mg protein) kaynaklı melanin miktarının nano film örneğinden (65,06±0,23 µg melanin/ mg protein) 2,73 kat, düz film_EGF (+) örneğinden (59,90±0,33 µg melanin/ mg protein) 3 kat fazla olduğu tespit edilmiştir (p<0,05). Melanin salımının en büyük kaynağını oluşturan hücre içinde biriken melanin miktarının nano film_EGF (+) örneklerinde artmış olması bu filmlerin melanin salımında diğer gruplara göre daha aktif rol aldığını göstermektedir. Diğer melanin kaynakları kullanılarak yapılan analizlerde gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir. Melanosit hücreleri açısından toplam melanin miktarı incelendiğinde ise nano film_EGF (+) örneği kaynaklı edinilen melanin miktarının diğer test gruplarına göre 2,8 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir (TCPS kontrol grubuna göre p<0,0005, nano film

örneğine göre $p < 0,005$) (Şekil 4.19a). Bu sonucun EGF varlığı ve nanotopografik etkinin ortak bir sonucu olduğu düşünülmektedir.

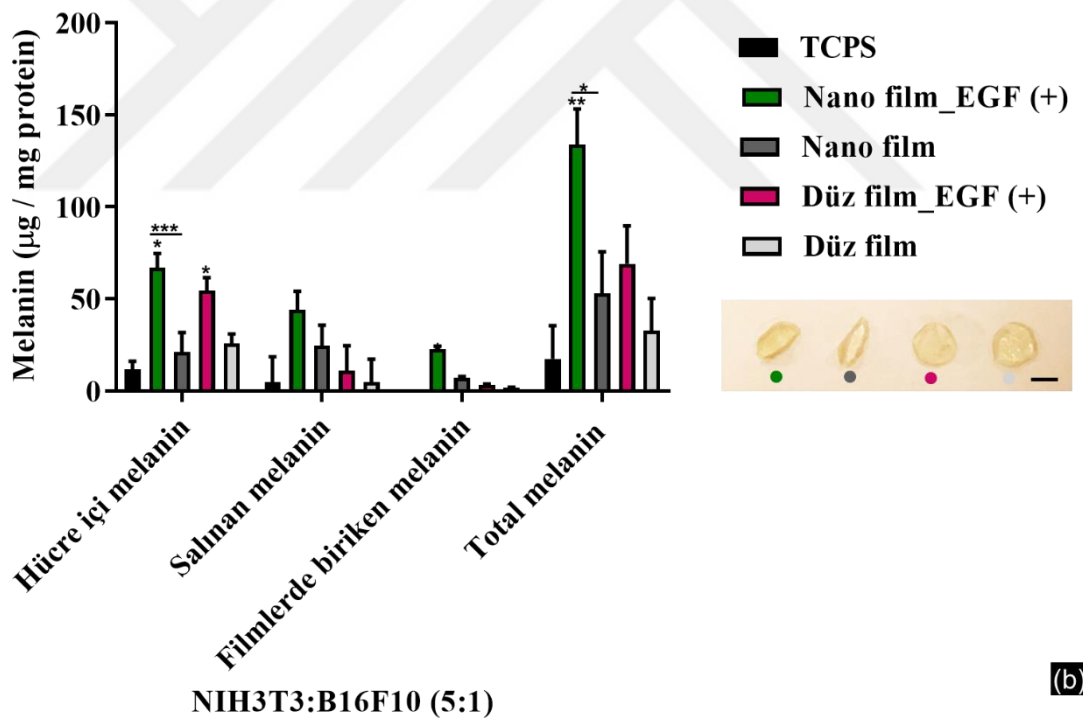
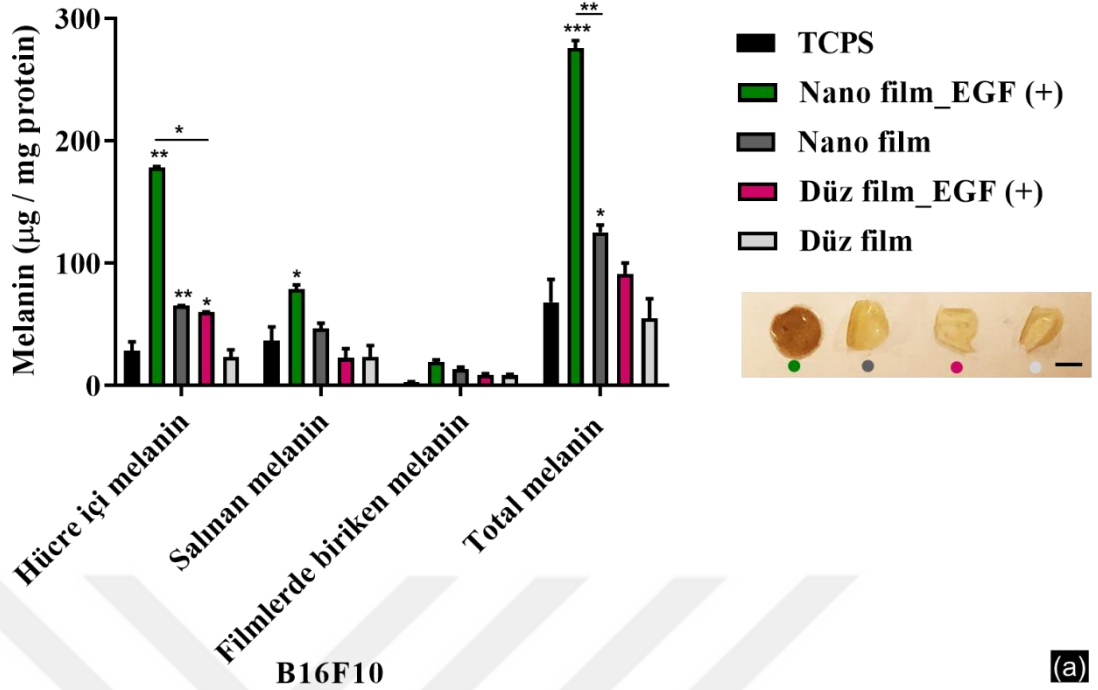
İkili kültürleme açısından bakıldığında 5 kat daha az melanosit içeriği olan ikili kültür sisteminde de benzer sonuçların elde edildiği görülmüştür (Şekil 4.19b). Ancak burada dikkat edilmesi gereken nokta nano film_EGF (+) örneğinden melanositlerin tekli kültürlemesinden mg protein başına $178,00 \pm 0,92 \mu\text{g}$ melanın elde edilmişken ikili kültürlemede 5 kat daha az melanosit kullanıldığında bu miktar $66,88 \pm 7,89 \mu\text{g}$ olarak kaydedilmiştir. Normal koşullarda $35,6 \mu\text{g}$ melanın salımının ($178 \mu\text{g}$ 'ın %20'si) gerçekleşmesi gerekirken gözlemlenen bu 1,87 katlık farkın EGF ve nanotopografik etkiye ilaveten ortamda bulunan fibroblastlar kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

Ayrıca Şekil 19a'da sunulan resimlerde nano film_EGF (+) örneklerinde filmlerde biriken melanın diğer gruplara nazaran dah belirgin olduğu tespit edilmiştir. Ancak filmlerden elde edilen melanın miktarı için gruplar arasında anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir.

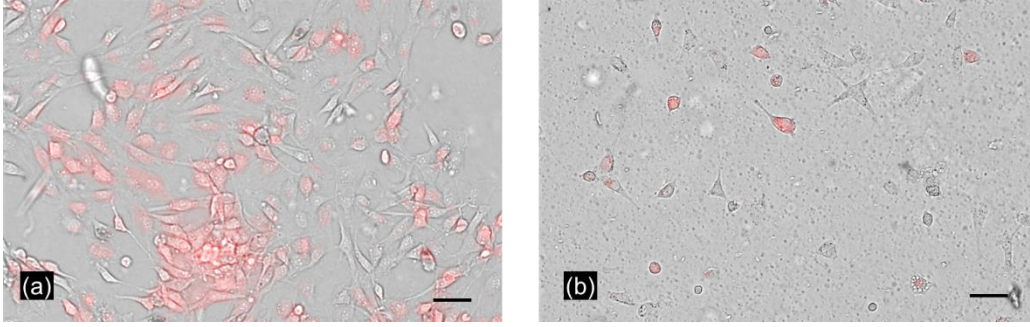
Alternatif olarak doğal melanın birikimine olanak sağlayan bu filmlerin, melanın reaktif oksijen türlerini baskılayıcı özellikleri nedeniyle karaciğer yaralanmalarında yama olarak kullanılabilecekleri düşünülmektedir [206]. Bu noktada filmlerde biriken melanın miktarının deney parametreleri çeşitlendirilerek çalışılmalıdır.

Fibroblastlar varlığında artan melanojenik aktivite, bizi hücrelerin ikili kültürlemede nasıl bir dağılım gösterdiği sorusuna yöneltmiştir. Melanositlerin hücre sitoplazmaları floresan boyama ile işaretlendikten sonra ikili kültürleme yapılmış ve örneklerin optik ve floresan görüntüleri karşılaştırılarak sonuçlar elde edilmiştir. Bu analiz için melanın salımında en iyi sonucu veren nano film_EGF (+) örnekleri tercih edilmiştir (Şekil 4.20a). Ayrıca düz filmlerde kontrol grubu olarak çalışılmıştır (Şekil 4.20b). Sonuçlar nanodesenli filmler üzerinde hücre yayılımının diğer yüzeye göre daha iyi olduğunu göstermiştir. Ayrıca yapılan çalışmada melanositlerin fibroblastlar arasında kümelenme eğiliminde olduğu tespit edilmiştir. Bu durum melanositlerin/pregenitör hücrelerin bölgeselleşerek bir organoid/sferoid yapısı meydana getirme potansiyeline dikkat çekmektedir [207]. Melanın dağılımının kontrol edildiği deri dokuların oluşturulması ile ilgili çalışmalarda bu ikili kültür sisteminin gelecek vaat eden bir yönü olduğu düşünülmektedir.

Protein temelli çalışmaların ardından melanogenez mekanizmasından sorumlu TRY, TRP-1 ve TRP-2 genlerinin ekspresyon analizleri tamamlanmıştır. Sonuçlar nano film_EGF (+) grubunun melanositlerin genetik stimülasyonunu tetiklediğini de TRY



Şekil 4.19 : K:J filmler ve TCPS yüzeyler üzerinde büyütülen B16F10 (a) ve NIH3T3:B16F10 (5:1) (b) hücreleri kaynaklı melanin miktarının farklı kaynaklar üzerinden tespiti. Ölçek: 3 mm. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak sunulmuştur (n=3). TCPS kontrol grubuna göre * $p < 0,05$ ** $p < 0,005$ *** $p < 0,0005$ anlamlı kabul edilmiştir. İkili gruplar halinde karşılaştırma yapılırken bağlantı çizgileri kullanılmış ve * $p < 0,05$ ** $p < 0,005$ *** $p < 0,0005$ anlamlı kabul edilmiştir. Çalışma 96'lık mikropalakalarda 3 günlük inkübasyon süresinde tamamlanmış ve 10^4 hücre/kuyu konsantrasyonu ile çalışılmıştır.



Şekil 4.20 : EGF katkılanmış nano (a) ve düz (b) K:J filmler üzerindeki NIH3T3:B16F10 (5:1) ikili kültür hücrelerinin mikroskop görüntüleri. Ölçek: 50 μm . Çalışma 96'lık mikropalakalarda 3 günlük inkübasyon süresinde tamamlanmış ve 10^4 hücre/kuyu konsantrasyonu ile çalışılmıştır.

geni açısından bakıldığında nano film_EGF (+) örneğinin TCPS kontrol grubuna göre 3 kat daha fazla gen ekspresyonuna sebep olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,005$) (Şekil 21a). Nano film_EGF (+) örneğinin nano filmlerden 3 kat daha fazla TRP-1 ekspresyonu gösterdiği de ayrıca tespit edilmiştir ($p < 0,05$).

TRP-1 ve TRP-2 genleri için örnekler açısından benzer sonuçların elde edildiği görülmüştür. Örneğin; TRP-1 açısından bakıldığında nano film_EGF (+) örnekleri TCPS kontrol grubuna göre 6,5 kat daha fazla ekspresyon artışı sağlamıştır ($p < 0,005$). Ancak nano film_EGF (+) örneği ile nano film arasında oluşan 1,14 kat farkın istatistiksel anlamı bulunmamaktadır. Dolayısıyla, nanodesenleme TRP-1 ekspresyonunda pozitif yönde etki ederken filmlere EGF katkılanmanın nanodesenli filmlerde bir etkisi gözlemlenmemiştir. Ancak, düz filmlerde EGF varlığına bağlı olarak düz film_EGF (+) ve düz film örnekleri arasında 2,86 kat ekspresyon farkı oluşmuştur. Sonuçlar TRP-1 geni açısından genel olarak değerlendirildiğinde, nanodesenlemenin EGF varlığına rağmen genetik ekspresyonu module ettiği görülmektedir. Topografik etkinin ortadan kalması ile EGF kaynaklı ekspresyon belirginleşmiştir. Ancak bu noktada birim yüzeydeki EGF miktarının 3. günün sonunda nano filmlerde düz filmlere nazara 3,1 kat daha az olmasında etkili olabileceği düşünülmektedir.

TRP-2 açısından bakıldığında nano film_EGF (+) örnekleri TCPS kontrol grubuna nazaran 8,6 kat daha fazla ekspresyon artışı sağlamıştır ($p < 0,05$). Nano filmler ise TCPS kontrol grubuna göre 5,23 kat ekspresyon farkına neden olmuştur. Ancak nano film_EGF (+) örneği ile nano film arasında oluşan 1,53 kat farkın istatistiksel anlamı bulunmamaktadır. Yapılan analizler TRP-1 geni için yapılan yorumların TRP-2 geni içinde geçerli olduğunu ortaya koymuştur.

Ekspresyon seviyeleri takip edilen genler ile melanin salımı arasında pozitif bir kolerasyon vardır [208] ve bu fark özellikle TRY geni için nano film_EGF (+) örneği için diğer gruplara nazaran daha ön plana çıkmaktadır.

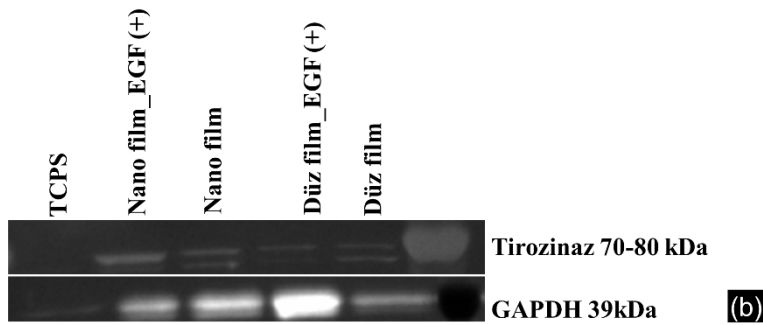
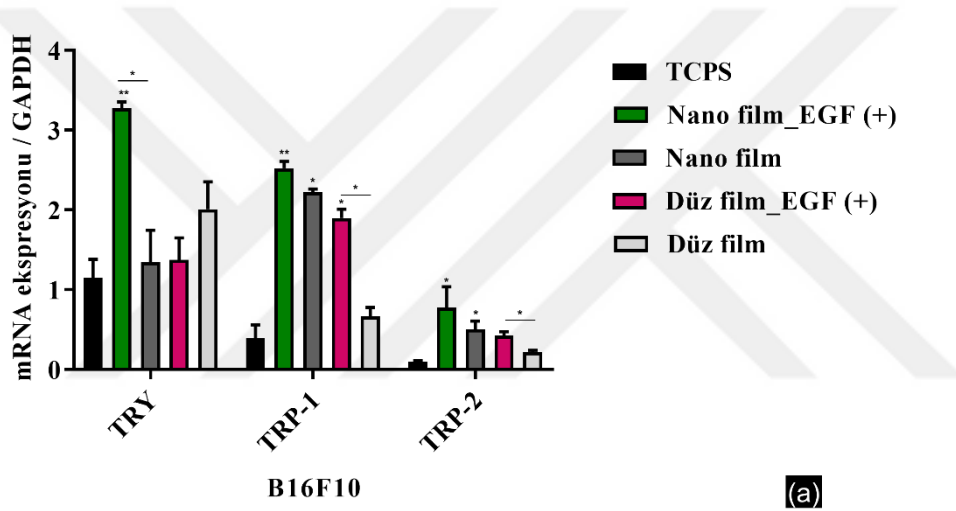
Western Blot analizleri ile de tirozinaz proteininin hücre lizatları içerisinde varlığı üzerine çalışılmıştır. GAPDH proteini kontrol grubu olara alınmıştır. Ancak tekrarlanabilir ve tek banttıan oluşıan sonuçlar alınamamıştır. Hücrelerde biriken melanin yapıların sodyum dodesil sülfat–poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) jellerinde proteinlerin yürümesini zorlaştırdığı tespit edilmiştir. Bu durum eşit miktarda protein konulmasına rağmen GAPDH proteinleri kaynaklı gözlenen farklı kalınlıktaki bantlar ile de doğrulanmıştır. Ayrıca, tirozinazın dimer-trimer oluşturma eğiliminin jel üzerinde ilgili bölgelerde ikili üçlü bant oluşumuna sebep olduğu görülmüştür. Dolayısıyla bu veriler kullanılarak istatistiksel analiz yapılamamıştır (Şekil 4.21b).

Hücresele analizler nanodesenli filmlerin melanosit sekresyonlarını tetiklemede diğer test gruplarına göre daha başarılı olduğunu göstermiştir. Bu bağlamda nano film_EGF (+) ve nano film örneklerinin salın kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak ekzisyonel yara modellerindeki performansı gen ve protein seviyesinde araştırılmıştır.

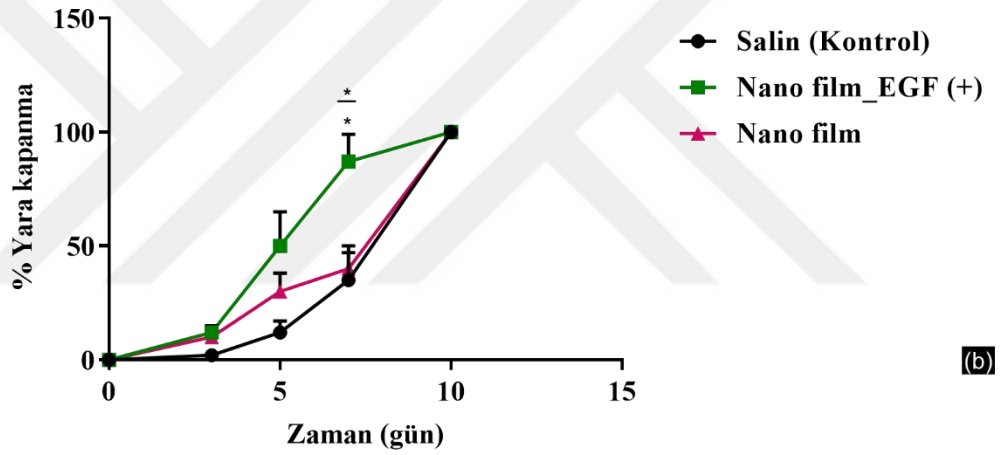
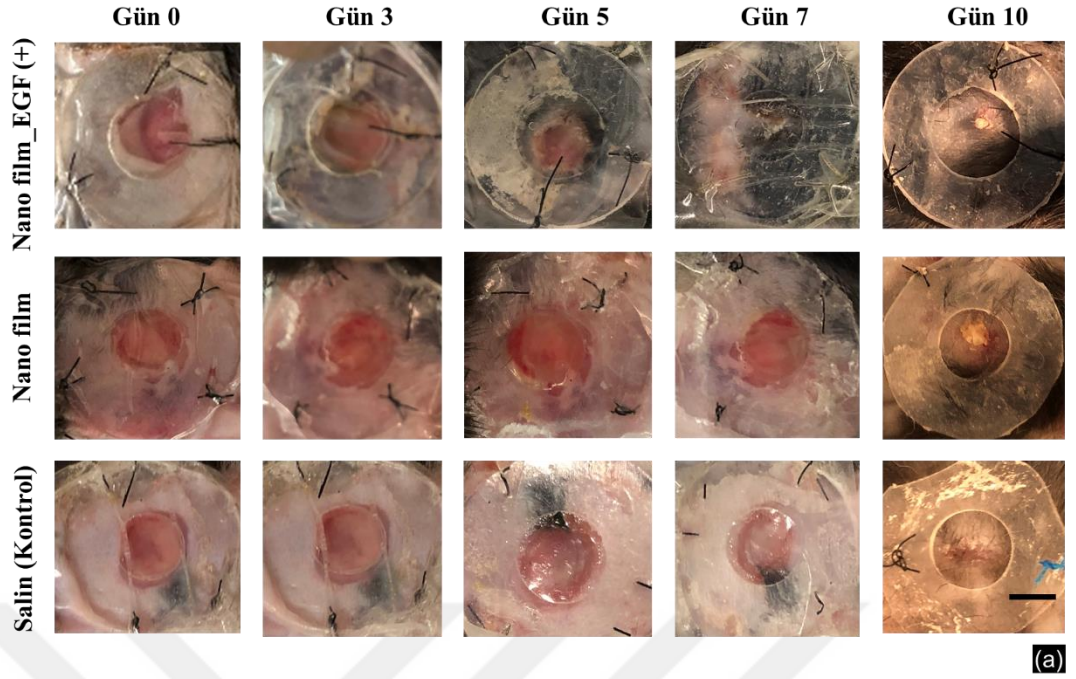
Çalışmamızda kullanılan yara iyileşme fare modelinde ikili tüm kalınlık dairesel yaralar (yaklaşık 30 mm²) her farenin dorsal flank bölgesinde açılmıştır. Yaraların iyileşme hızı her yara için yara alanının zamana karşı bir fonksiyonu olarak tanımlanmıştır. 10 gün içinde tüm test gruplarında %95`ten fazla yara kapanmasını gerçekleştirdiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.22). Özellikle ilk 7 günde EGF katkılanmış filmlerdeki yara kapanma oranı %90`a yaklaştığı (%87±12) tespit edilmiştir. Yara bölgelerinden 10 günlük uygulama sonrası alınan K:J filmler SEM ile incelendiğinde EGF katkılı filmler üzerinde daha fazla materyalin birikim yaptığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.23). Bu durumun hücrelerin materyal üzerine olan migrasyon eğilimi ve EGF varlığına ilaveten yüzeye yapışan protein tabakası ile ilgili olduğu bilinmektedir [209]. 7. günün sonunda yara kapanma hızında EGF filmler ile diğer gruplar arasında anlamlı fark gözlemlenmiştir (Şekil 4.22b). Yapılan analizler ayrıca histolojik boyama teknikleri kullanılarak da ilerleyen kısımlarda tartışılacaktır.

Yara kapanma çalışmalarına ek olarak yara dokusundaki fibronektin miktarı da analiz edilmiştir (Şekil 4.24). Sağlıklı dokudaki fibronektin miktarı 2,69±0,28 µg/ mg protein olarak tespit edilmiştir. İlgili veriler incelendiğinde ilk 5 günlük sürede nano film (1,23±0,13 µg fibronektin/ mg protein) ile salın kontrol grubu (0,35±0,18 µg

fibronektin/ mg protein) arasında anlamlı fark tespit edilmişken ($p<0,05$) bu nano film_EGF (+) örnekleri ($0,72\pm0,32$ μg fibronektin/ mg protein) ile salin kontrol grubu arasında gözlemlenmemiştir. Ayrıca bütün test grupları sağlıklı dokuya göre daha az fibronektin içermektedir ($p<0,05$). 10 günlük sonuçlar incelendiğinde salin kontrol grubunda ($0,26\pm0,06$ μg fibronektin/ mg protein) diğer test gruplarında gözlemlenen artışın olmadığı görülmüştür ($p<0,05$). Ancak nano film_EGF (+) örneğinin kullanıldığı yara dokusundan ($3,10\pm0,37$ μg fibronektin/ mg protein) ve nano film örneğinin kullanıldığı yara dokusundan ($2,64\pm0,29$ μg fibronektin/ mg protein) elde edilen fibronektin miktarı 5 gün analizleri ile karşılaştırıldığından belirgin biçimde artmıştır.

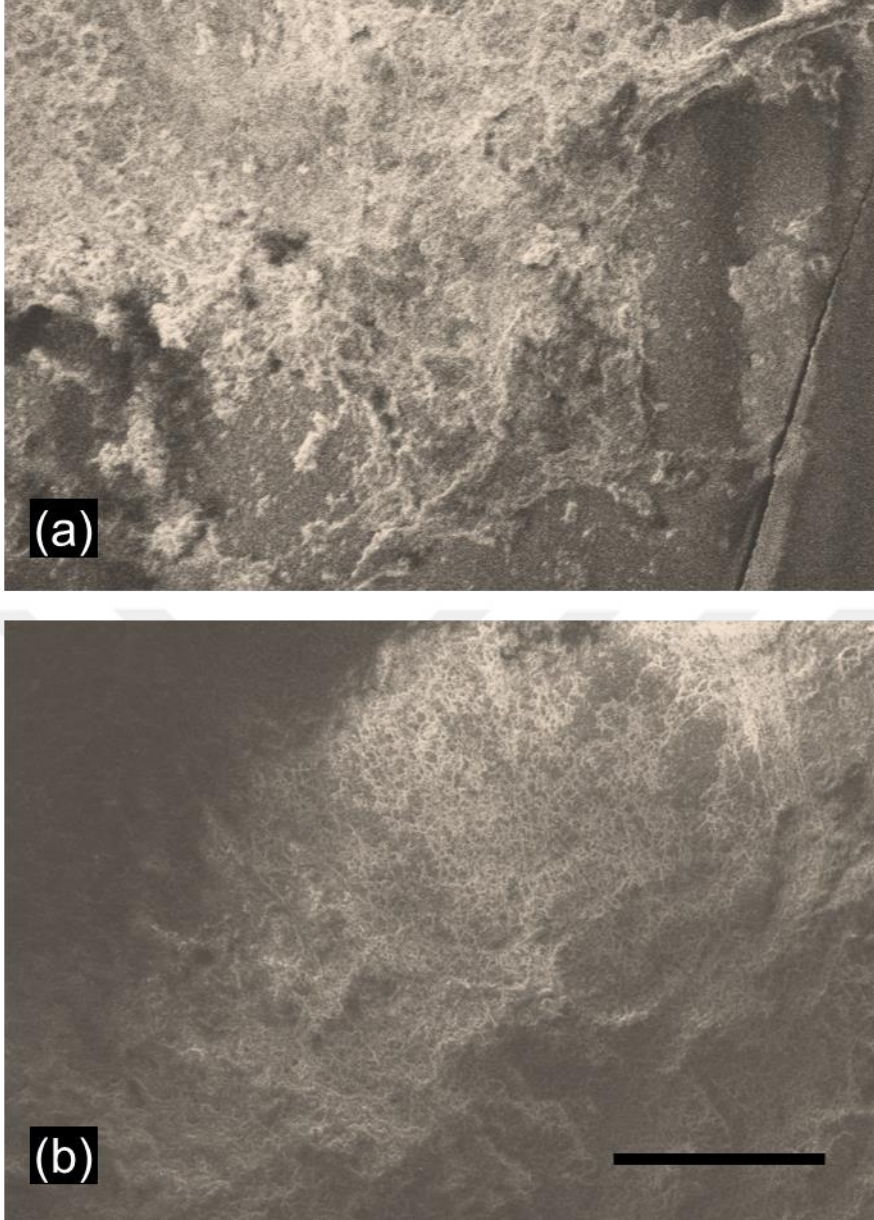


Şekil 4.21 : Melanogenez ilişkili genlerin in vitro çalışmalar açısından qPCR sonuçları (a). Çalışma 12'lik mikropalakalarda 3 günlük inkübasyon süresinde tamamlanmış ve 2×10^5 hücre/kuyu konsantrasyonu ile çalışılmıştır. Tirozinaz proteinin B16F10 hücrelerindeki varlığının tespiti (b). Çalışma 12'lik mikropalakalarda 3 günlük inkübasyon süresinde tamamlanmış ve 10^5 hücre/kuyu konsantrasyonu ile çalışılmıştır. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak sunulmuştur ($n=3$). TCPS kontrol grubuna göre * $p<0,05$ ** $p<0,005$ anlamlı kabul edilmiştir. İkili gruplar halinde karşılaştırma yapılırken bağlantı çizgileri kullanılmış ve * $p<0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.



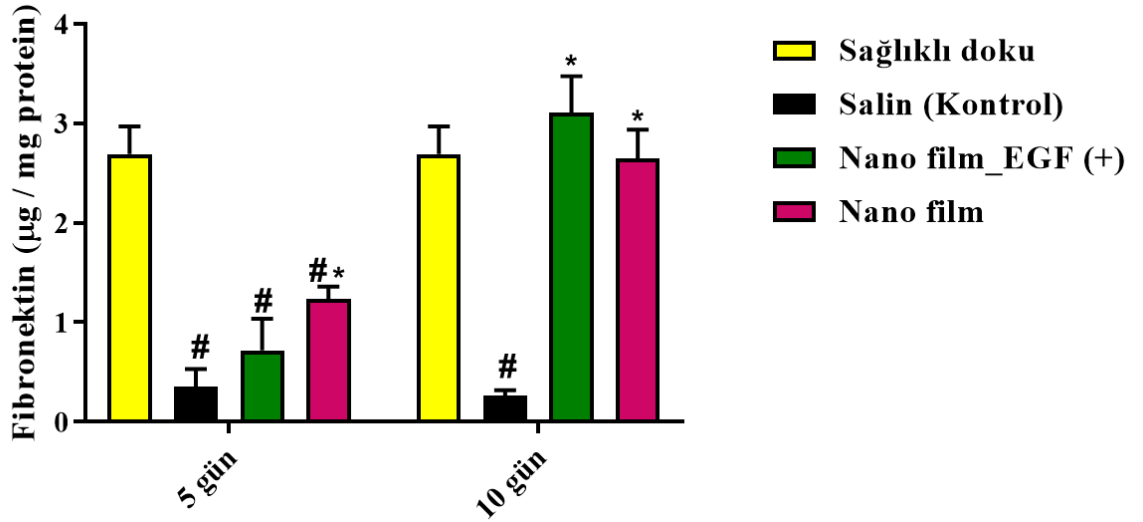
Şekil 4.22 : Yara kapanma çalışmaları için gün bazında yaralardaki değişimi gösteren fotoğraflar (a) ve yara kapanma hızının zamana karşı değişimini gösteren grafik (b). Ölçek: 3 mm. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak sunulmuştur (n=3). TCPS kontrol grubuna göre * $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir. Nano film_EGF (+) örneği Nano film örneğine göre yara kapanmasında anlamlı farklı bir performans göstermiştir. * $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.

Bununla birlikte 10 günün sonunda sağlıklı doku ile filmler kıyaslandığında her iki test grubunun da sağlıklı doku ile benzer sonuçlar verdiği görülmüştür. Yara kapanma çalışmaları 5 gün sonunda yara dokularından edinilen fibronektin miktarı ile ilişkilendirildiğinde yara bölgesinin kapanması ile fibronektin salımı arasında doğrusal bir ilişki olduğu tespit edilmiştir. 5. günün sonunda salin uygulanmış yaraların %12 \pm 5'i kapanmışken nano film_EGF (+) örneği için bu değer %50 \pm 15, nano film için %30 \pm 8'dir.



Şekil 4.23 : Yara kapanma çalışmaları için kullanılan EGF katkılanmış nano (a) ve katkılanmamış (b) nano K:J filmlerin 10. gün sonundaki SEM görüntüleri. Ölçek: 50 μ m.

Ancak 10. gün için bakıldığında yara yamalarından salınan EGF'nin yara iyileşmesini hızlandırdığı ve ilk 5 günlük fibronektin salımına nazaran daha fazla fibronektinin yara bölgesinde salındığı tespit edilmiştir. Hali hazırda 7. günde nano film_EGF (+) örneklerinin uygulandığı yaraların diğer gruplardan istatistiksel olarak farklı şekilde kapanmış olması 6 günde salınan toplam EGF miktarı ($7,285 \text{ ng/ml/mm}^2$) ile ilişkilendirilmelidir. Sonuç olarak EGF varlığının nano filmlerde yara kapanması üzerine olumlu etkisi olduğu yara kapanmasını belirgin şekilde hızlandırdığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.24 : Biyopsi örneklerindeki fibronektin miktarının analizi. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak sunulmuştur (n=3). Salin kontrol grubuna göre * $p < 0,05$; sağlıklı dokuya göre # $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.

Biyopsi örneklerindeki fibronektin miktarlarının analizini takiben, bu örneklerdeki toplam melanin miktarı ve tirozinaz aktivitesi de analiz edilmiştir (Şekil 4.25). Sonuçlar ilk beş gün içinde birim protein başına tirozinaz aktivitesinin sağlıklı dokulara ($0,16 \pm 0,01$ Ünite/ $\text{mg}^{-1}_{\text{protein}}$) göre sadece nano film_EGF (+) örneklerinde ($0,38 \pm 0,06$ Ünite/ $\text{mg}^{-1}_{\text{protein}}$) arttığını göstermiştir (2,37 kat, $p < 0,05$). Ancak bu farklılık diğer test grupları arasında istatistiksel anlamlı olarak tespit edilmemiştir. Topografik etkinin tek başına tirozinaz aktivitesini erken dönemde (5 gün) enzim aktivitesini module edemediği ancak EGF varlığında bu tip bir aktivite artışı tespit edilmiştir.

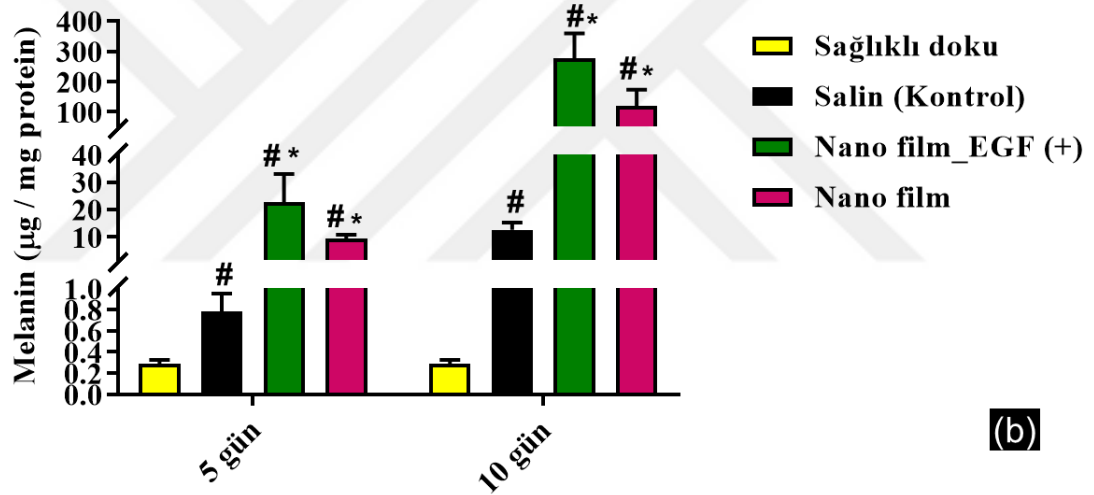
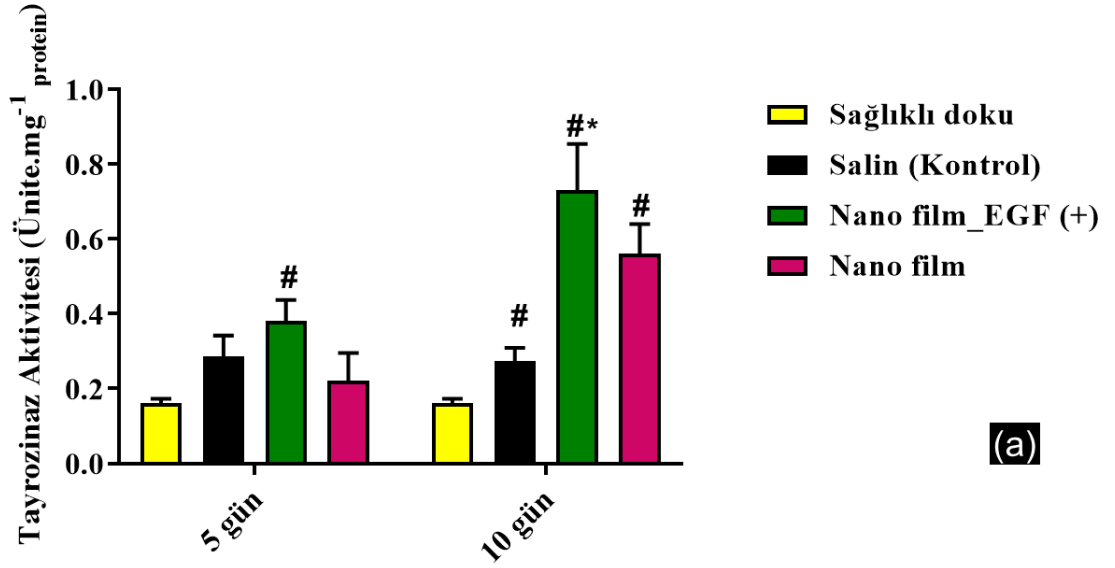
Literatürde doğrudan EGF uygulaması yapılmış melanositlerin tirozinaz aktivitelerinin azaldığı bununla birlikte melanin salımlarında da istatistiksel bir farklılığın olmadığı rapor edilmiştir [210]. Ancak kullandığımız kontrollü salım sisteminin bu noktada avantaj sağladığı tespit edilmiştir.

10. günün sonunda salin kontrol grubuna ($0,27 \pm 0,04$ Ünite/ $\text{mg}^{-1}_{\text{protein}}$) göre 2,7 kat daha fazla enzim aktivitesi sağlayan nano film_EGF (+) örneği ($0,73 \pm 0,12$ Ünite/ $\text{mg}^{-1}_{\text{protein}}$) ($p < 0,05$), nano filmlere ($0,56 \pm 0,08$ Ünite/ $\text{mg}^{-1}_{\text{protein}}$) nazaran anlamlı bir artış trendi yakalayamadığı belirlenmiştir (Şekil 4.25a). Dolayısıyla artan enzim aktivitesinin topografi kaynaklı olduğu düşünölmektedir. Tirozinaz enzimi pek çok yerde bulunabilecek oksidatif bir enzim çeşididir. Bu enzim proteinlerin düşük moleköl ağırlıklı fenol ve ulaşılabilir tayrozin bölgelerini kuinonlara çevirebilme

kabiliyetine sahiptir [211]. Jelatinin trizol bölgeleri ile etkileşime girebilen tirozinaz enzimi kitosan-jelatin karışımlarında jel oluşumunu kovalent bağlar yardımıyla tetikleyecek yapıdadır [211-213]. Dolayısıyla yara dokusu içerisinde zamanla sentezlenen tirozinaz enzimi sadece melanin sekresyonunu değil film stabilitesini de etkilemektedir. Hücrelerin oksijene duyarlı bu enzimin daha uzun süre stabil olarak kaldığı bir ortamda daha fazla sekresyon (melanin salımı) yapmaları da muhtemeldir. Benzer eğilim melanin salımı çalışmalarında da elde edilmiştir (Şekil 4.25b). Sağlıklı dokuya ($0,28 \pm 0,04$ μg melanin/ mg protein) nazaran nano film_EGF (+) örneğinden ($22,61 \pm 10,34$ μg melanin/ mg protein) 5. günün sonunda 80,8 kat fazla melanin salımı gerçekleşmiştir ($p < 0,05$). Sağlıklı dokuya nazaran nano film_EGF (+) örneğinden ($275,48 \pm 83,69$ μg melanin/ mg protein) 10. günün sonunda 983,75 kat fazla melanin salımı gerçekleşmiştir ($p < 0,05$). Bu durum melanin açısından eksik kalmış bölgelerde melanin salımını tetikleyici özelliğini tirozinaz aktivitesindeki sonuçlara benzer olarak ortaya koymaktadır. Ancak EGF varlığının 5. ve 10. günler için nano film_EGF (+) örnekler nano filmlere nazaran anlamlı bir farklılık göstermemiştir.

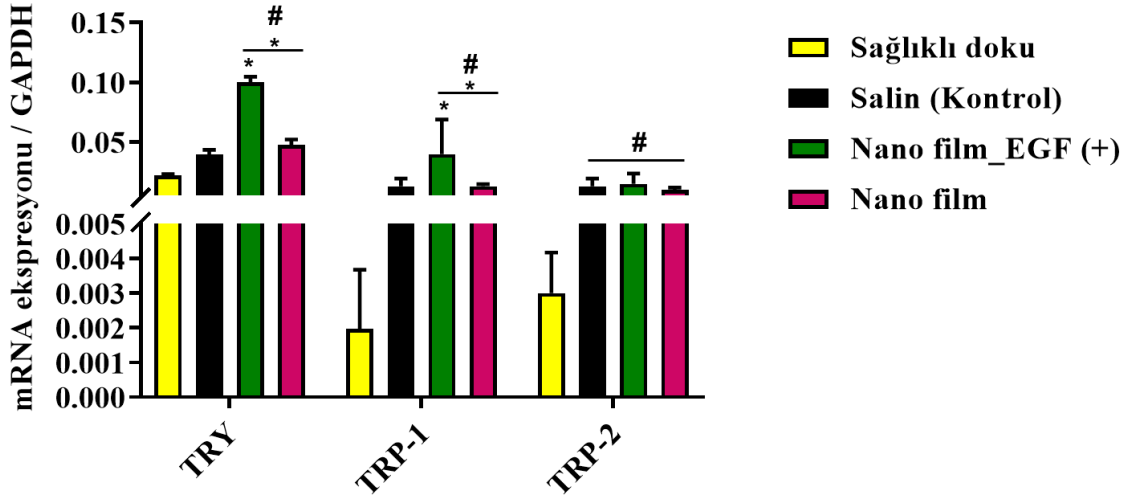
Filmlerin melanogenezi tetikleme potansiyeli protein seviyesinde test edildikten sonra TRY, TRP-1 ve TRP-2 genlerinin ekspresyonları 10. gün örnekleri için analiz edilmiştir (Şekil 4.26). Nano film_EGF (+) örnekleri üzerinde elde edilen tirozinaz geni açısından incelendiğinde nano filmlere nazaran 2,13 kat fazla ekspresyon göstermiştir ($p < 0,05$). Bu sonuçlar tirozinaz aktivitesi ile ilgili sonuçları doğrular niteliktedir. Benzer eğilim sağlıklı dokuya nazaran nano film_EGF (+) örneklerinde 4,76 kat olarak tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Nitekim EGF katkılı yüzeylerdeki artan melanin sekresyonunu TRP-1 genine ait ekspresyon sonuçları doğrulamaktadır. Ancak TRP-2 genine ekspresyon seviyeleri in vitro PCR sonuçlarında olduğu gibi diğer gruplara nazaran düşük çıkmıştır. Bu durum oluşmasında TRP-2 geninin diğer bahsi geçen genlerden farklı olarak melanogenezi mekanizmasında sadece sekresyondan değil UV uygulaması sonrası melanositlerin apoptoz mekanizmalarının regülasyonundan sorumlu olması ile açıklanabilir [214].

Histoloji çalışmaları kapsamında kesitleri alınan deri biyopsileri H&E ve Masson trikrom boyaları ile boyanmıştır (Şekil 4.27). H&E analizlerinde ilk göze çarpan durum EGF katkılanmış nanodesenli filmler ile muamele edilen yara bölgelerindeki epidermis-dermis arasındaki boşluğun kolajence doldurulmuş olmasıdır [215]. Diğer gruplarda bu iki tabaka arasında belli bölgelerde boşluklar olmakla birlikte bu örneklerdeki epidermis tabakasının kalınlığı da dikkat çekmektedir.



Şekil 4.25 : Biyopsi örneklerindeki tirozinaz aktivitesinin (a) ve melanin miktarının (b) analizi. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak sunulmuştur (n=3). Salin kontrol grubuna göre * $p < 0,05$; sağlıklı dokuya göre # $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.

Bununla beraber EGF katkılanmış nano film ile muamele edilen yara bölgesinde blast hücrelerinin yoğunlaştığı (mor renkli hücreler) gözlemlenmiştir. Bu blast hücrelerinin yara iyileşme süresinde fibroblasta farklılaştığı bilinmektedir ve bu durumda yara iyileşmesinin başladığının bir göstergesidir [216]. Diğer örnek gruplarında görülen çok çekirdekli nötrofil yapısı bu dokularda da inflamasyonun başladığını göstermektedir.



Şekil 4.25 : Melanogenez ilişkili genlerin in vivo çalışmalar açısından 10 gün sonraki qPCR sonuçları. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak sunulmuştur (n=3). Salin kontrol grubuna göre *p<0,05; sağlıklı dokuya göre #p<0,05 anlamlı kabul edilmiştir.

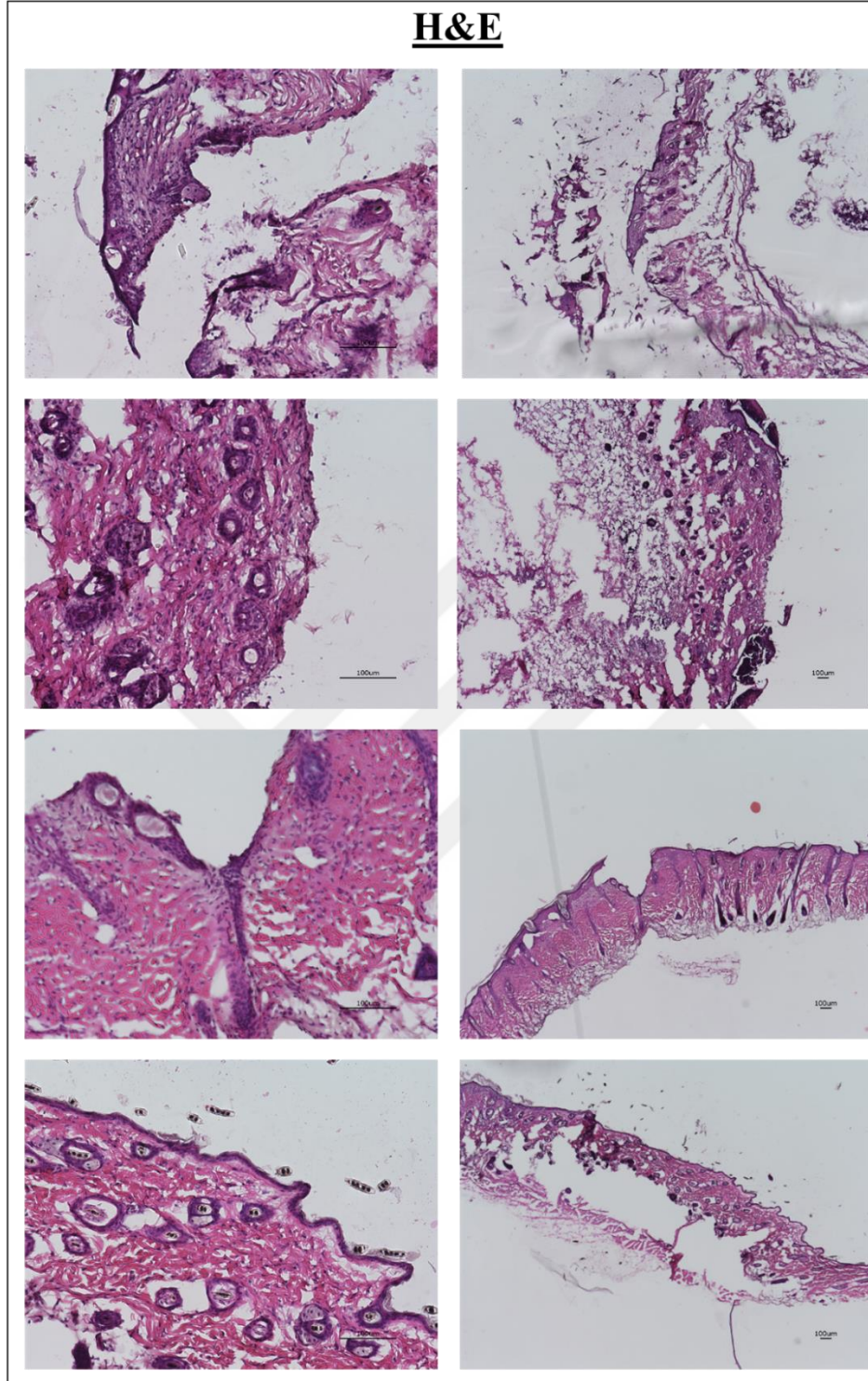
Ancak, EGF katkılanmış filmlerin uygulandığı dokular kadar hızlı bir yara iyileşmesi nanodesenli filmlerde ve salin kontrol grubunda gözlenmemiştir [217]. H&E boyama sonuçlarına bakarak EGF katkılanmış filmlerin yara dokusunun iyileşmesinde ön plana çıktığı söylenebilir. Özellikle EGF varlığına bağlı olarak tetiklenen fibroblast farklılaşması bu filmlerin uygulandığı yaraları daha hızlı iyileşmeye teşvik etmektedir. Deri biyopsi numuneleri ile yapılan melanogenez sonuçları da EGF katkılanmış/katkılanmamış filmlerin melanin sentezini tetikleyici potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. Bu noktada in vitro/in vivo sonuçlar ve histolojik analizler birlikte ele alındığında Nano film_EGF (+) örnekleri yara örtü modeli olarak ön plana çıkmaktadır.

Ek olarak, Masson trikrom boyaması da kolajen birikimini detaylı biçimde gözlemleyebilmek için deri kesitlerine uygulanmıştır (Şekil 4.28). Elde edilen sonuçlar nano film_EGF (+) örnekleri ile muamele edilen yara bölgelerindeki kolajen birikimi gözle görülür biçimde diğer test gruplarından fazla olduğunu göstermektedir. Bu durum yara iyileşme hızının artmasında önemli bir etkidir [218].

Sonuç olarak bir melanin salınımı tetikleyici yara örtü modeli olarak Nano film_EGF (+) örneklerinin kullanımının bahsedilen genomik ve proteomik analizlerin sonuçlarına dayanarak mümkün olabileceği düşünülmektedir.

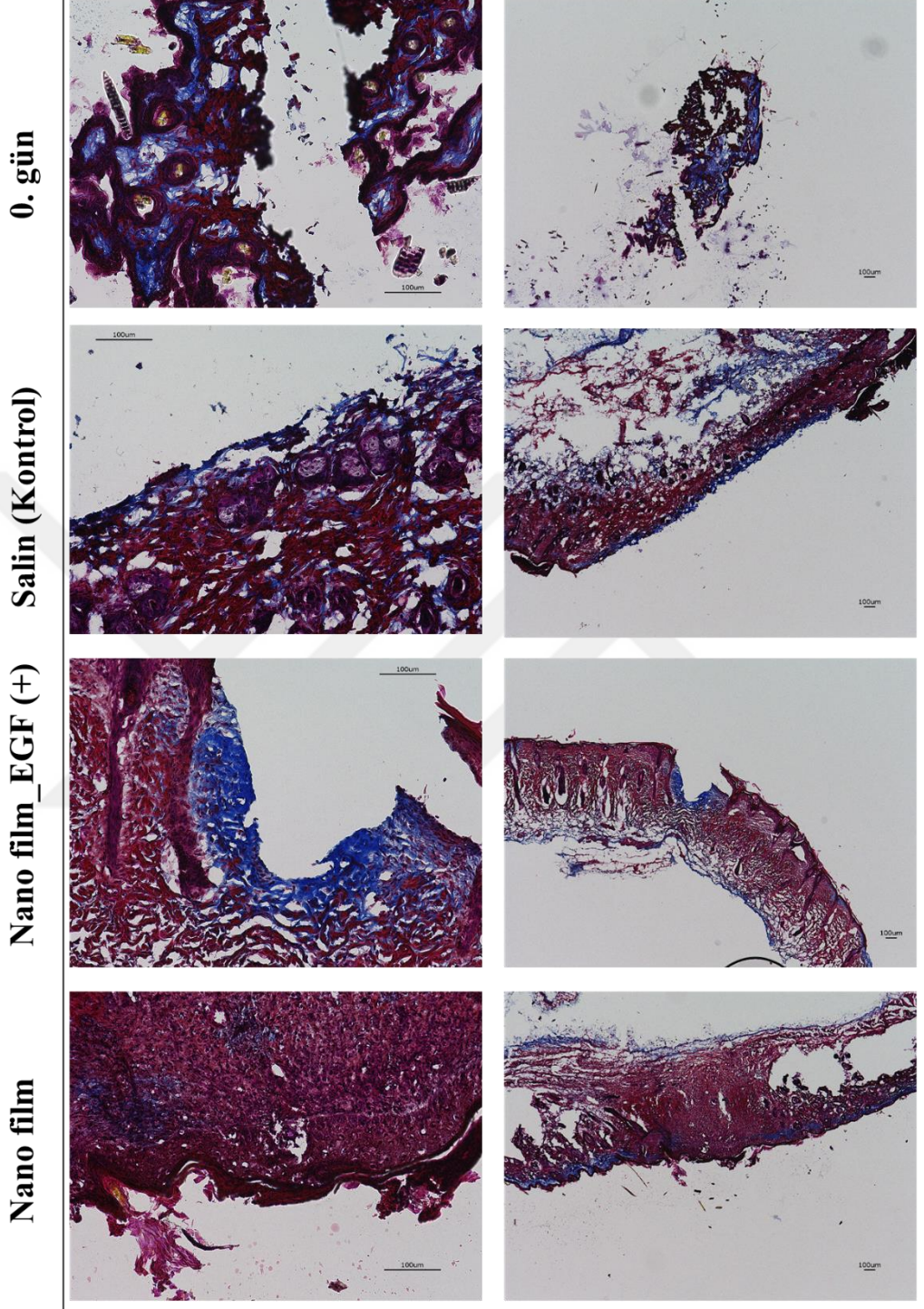
Özetle, kemik çalışması sırasında fiziksel ve kimyasal karakterizasyonu yapılmış olan nano filmler EGF ile katkılanmış ve nano film_EGF (+) örneklerinden salınan EGF

miktarı düz film_EGF (+) örneklerle karşılaştırmalı olarak tespit edilmiştir. Ardından fibroblast ve melanosit hücreleri ile canlılık analizleri yapılmış ve nano film_EGF (+) örneklerinin hücresel bazda biyoyumluluğu diğer test grupları ile karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. Sonuçlar EGF katkılamanın ve nanotopografinin biyolojik aktiviteyi artırdığını göstermiştir. İkili kültürlemede benzer sonuçları ortaya koymuştur. EGFR miktarı açısından hücre lizatları incelenmiş ve ikili kültürlemede tekil kültürlemelerin toplamından daha fazla EGFR elde edilmiştir. Ek olarak fibronektin analizleride tamamlanmıştır. Sonuçlar EGF varlığından bağımsız olarak nanotopografinin fibronektin salımını artırdığını göstermektedir. Melanogenez ile ilgili yapılan tirozinaz enzim aktivitesi, melanin salımı ve PCR analizleride nano film_EGF (+) örneklerinin ön plana çıktığı sonuçlar vermiştir. In vitro koşullarda tamamlanan analizlerin sonrasında ekzisyonel yara modelleri üzerinde nano film_EGF (+) ve nano film örneklerinin salın kontrol grupları ile karşılıklı analiz edilmiştir. 7. günün sonunda nano film_EGF (+) örneklerinin uygulandığı yaraların büyük oranda kapandığı tespit edilmiştir. Fibronektin analizleri açısından analiz edildiğinde EGF varlığından bağımsız olarak fibronektin salımını artırdığını göstermiştir. Tirozinaz enzim aktivitesi, melanin salımı ve PCR analizleri açısından incelendiğinde yine edildiğinde EGF varlığından bağımsız olarak melanogenezi artırdığı gözlemlenmiştir. Ek olarak yapılan histoloji çalışmaları nano film_EGF (+) örneklerinin uygulandığı yara modellerindeki epidemis dermis tabakası arasında diğer gruplara nazaran boşluğun kaybolduğunu, blast hücrelerinin yara bölgesinde yoğunlaştığını göstermiştir. Sonuçlar in vitro, in vivo ve histoloji sonuçları birlikte değerlendirildiğinde nano film_EGF (+) örneklerinin artan tirozinaz enzim aktivitesi, melanin salım trendi ve gen ekspresyonları ile yara yama modeli olma konusunda potansiyeli olduğu düşünülmektedir. Melanogeneze ek olarak yara bölgelerinin fiziksel olarak kapanması konusunda gösterdiği performansta bu filmlerin yama olma potansiyeline dikkat çekmektedir.



Şekil 4.27 : Deri kesitlerinin 10. gün sonundaki H&E boyama görüntüleri.

Masson Trikrom



Şekil 4.28 : Deri kesitlerinin 10. gün sonundaki Masson trikrom boyama görüntüleri.

4.4 Sonuç

Yenilikçi biyobozunur K:J filmler AAO kalıplar kullanılarak nanodesenli hale getirilmiş antimikrobiyel aktiviteleri düz filmler ve PS kontrol grubuna nazaran araştırılmıştır. Nanotopografi ve kitosan içerik kaynaklı antibakteriyel aktivitenin arttığı gösterilmiştir. Dahası nano K:J filmler üzerinde mezenkimal kök hücrelerinin ve olgun kemik hücrelerinin farklılaşma ve mineralizasyon aktivitesi araştırılmıştır. ALP aktivitesine ilaveten yapılan mineral birikim analizleri ve PCR analizleri nano K:J filmlerin osteojenik farklılaşmaya diğer gruplara nazaran yaptığı katkıyı ortaya koymuştur. Nanoteknolojinin prensipleri kullanılarak dizayn edilmiş implant yüzeylerinin osteojenik farklılaşmayı tetiklediği göz önünde bulundurulduğunda [219], nano K:J filmlerin üstün antibakteriyel özellikleri, osteoblastik farklılaşmayı tetikleyen yüzey özellikleri ve yüksek verimlilikteki mineralizasyon kapasiteleri ile ideal implant kaplama modeli olacakları düşünülmektedir.

Fiziksel ve kimyasal karakterizasyonları önceki çalışmada tamamlanan nano filmler EGF ile kaplanmış ve düz yüzeylerle karşılaştırmalı olarak EGF salımı takip edilmiştir. In vitro ve in vivo koşullarda EGFR, fibronektin, tirozinas enzim aktivitesi, melanin salımı ve PCR analizleri tamamlanmıştır. Sonuçlar histoloji ve yara kapanma analizleri ile birlikte değerlendirildiğinde nano film_EGF (+) örneklerin melanogenezi tetikleyici bir yama modeli olması mümkün görünmektedir. Bir yara örtü modeli olarak düşünüldüklerinde bu filmlerin EGF katkılama ile hem yara iyileşmesinde hem de melanin salımının artırılmasında hipopigmente yara bölgeleri için avantaj sağlayacağı düşünülmektedir. Bu noktada biyomimetik bir yapıya sahip nano filmlerin doku mühendisliği alanında pekçok uygulama açısından yer bulabileceği düşünülmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

AAO membranlar fiziksel ve kimyasal özellikleri nedeniyle biyomedikal mühendisliği uygulamalarının birçoğunda kendine yer edinebilmiş bir biyomalzeme sınıfıdır. Kontrol edilebilir gözenek çapı, gözenek derinliği ve yüzey kimyası ile özellikle hücresel cevabın önemli olduğu doku mühendisliği uygulamalarında ümit vaat etmektedirler. Özellikle kemik doku mühendisliğinde implant kaplama modeli olarak kullanımları ile osteointegrasyonu artırıcı yönleri ortaya konulmuştur. Fiziksel, kimyasal ve elektriksel özelliklerinin bir arada kontrol edildiği membranların sinir-implant modeli olma potansiyelleri bu çalışma kapsamında araştırılmış ve sonuçlar 100 nm gözenek çapına sahip AAO membranlarında en az iletken eş değerleri kadar deney parametrelerinin kontrolü ile beklenen nörit farklılaşmasını sağlayabileceğini göstermiştir. İlerleyen dönemlerde yapılacak çalışmalarda tasarlanan bu yüzeyler üzerinde in vivo sinir gelişim performansının takip edilmesi mümkün görünmektedir. Ayrıca bu iletken yüzeyler üretilirken kullanılan fiziksel buharlaştırma tekniği daha hassas tekniklerle (ALD) desteklenebilir ve serbest ya da bir yüzey üzerinde sıralı karbon tüplerin yapımı mümkün olabilir. Bu yüzeylerin elektronikten optik biyosensör uygulamalarına kadar pek çok alanda kendine yer bulabileceği düşünülmektedir. Ayrıca sıralı karbon tüplerle bezeli yüzeylerin elektriksel iletkenliklerinin kemik veya sinir hücrelerinin gelişimine olan etkisi de yine araştırılması gereken konulardandır.

AAO membranlar üç boyutlu, kontrol edilebilir yapıları gereği sıralı yapıların üretiminde kalıp da olarak kullanılmaktadır. Aynı membranın defalarca kullanılmasının yanında bu membranlar tek düze yapıların oluşturulması konusunda da oldukça elverişlidir. Bu durum sensör yüzeylerinden alınacak sinyallerin şiddeti kadar tekrarlanabilirliği açısından da önemlidir. Tezin ikinci kısmında bu sıralı yapıların optik bir biyosensör tasarımındaki etkisi araştırılmıştır. Yapılan çalışmalar üretilen PC filmlerdeki nanodesenlenme arttıkça alınabilecek sinyal şiddetinin artabileceğini/hassaslaşabileceğini göstermiştir. Alzheimer proteininin tespitine yönelik yapılan çalışmalarda dedeksiyon limiti literatürdeki güncel alt sınır olan 0,5 pg/ml olarak tayin edilmiştir. Dolayısıyla bu kalıplar kullanılarak üretilen PC filmlerin SERS teknolojilerinde biyolojik moleküllerin tespitine yönelik olarak kullanım potansiyelleri mevcuttur. Yapay salya çözeltisi içerisinde yapılan çalışmalar miyogloblin proteini uygulanmış ThT kaplı Au@MDS örneklerden alınan ThT sinyallerinin standart ThT sinyallerine nazaran istatistiksel anlamlı şekilde azalmadığını

gösterirken bu fark A β 1-42 proteini uygulanmış yüzeyler ile standart ThT kaplanmış yüzeyler arasında anlamlı bir farklılığa sahiptir. Bu durum, üretilen substratların sinyal hassasiyeti, tekrarlı sinyal oluşturma potansiyeli kadar amiloid spesifik yüzeyler olma konusundaki potansiyelini de ortaya koymaktadır. Ancak seçicilik kriterinin farklı proteinler ve bu proteinlerin karışımları ile tekrarlı biçimde yapılacak ölçümler ile daha belirgin biçimde ortaya konması gerektiği düşünülmektedir. Ayrıca bu yüzeylerin aptamerler bakımından zengin hale getirilmesi ve biyolojik silah ajanlarından olan risin B'nin tekisinde olay mahalinde kullanılması da mümkündür.

AAO membranlar kullanılarak ayrıca doğal polimer iskeleler de nanodesenli hale getirilebilir ve bu yüzeyler amin gruplarınca zengin yapıları nedeniyle doku mühendisliği uygulamalarında tercih edilebilir yüzeyler olabilirler. Örneğin tezin son kısmında bahsedilen implant kaplama modeli osteointegrasyonu ve kök hücre farklılaşmasını tetikleyici özelliktedir. Kitosanın doğası gereği sağladığı antibakteriyel ortama ilaveten jelatinin RGD sekanslarınca zengin özellikteki kimyasal yapısı hücre yapışma ve farklılaşmayı tetikler niteliktedir. Nitekim, MSC'lerin nano K:J filmler üzerindeki osteojenik aktivitesi düz filmler ve TCPS kontrol grubuna nazaran araştırılmış ve sonuçlar bu yüzeylerin kök hücrelerin kemik dokuya farklılaşmasını tetiklediğini göstermiştir. İlaveten olgun kemik hücreleri ile benzer testler tamamlanarak benzer sonuçlar elde edilmiştir. Gelecekte bu filmlerin tavşan tibiasına yerleştirilecek vida yapılarındaki mineralizasyonu tetikleyici özellikleri araştırılacaktır.

Aynı filmler yumuşak dokularda jel özellikleri nedeniyle yara yaması olarak görev alabilirler. Ancak yara iyileşme hızını artırabilmek kadar kullanılan malzemenin melanizasyona katkısını da bu noktada dikkate almak gerekmektedir. Şöyle ki UV ışınlarına karşı korumasız hipopigmente bir deri dokusu pek çok melanoma türü için ideal bir ortamdır. Dolayısıyla kullanılacak yara yamasının en az yara iyileştirme özelliği kadar melanin salımını tetikleyici potansiyelinin olması gerekmektedir. Dolayısıyla nano film EGF (+) örneklerle yapılan in vitro/in vivo analizler ilgili filmlerin bu potansiyele sahip olabileceğini göstermektedir. In vitro, in vivo ve histoloji boyama analizlerinin sonuçları dikkate alındığında nano film EGF (+) örneklerinin gerek fibronektin, EGFR ve melanin salımı, tirozinaz enzim aktivitesi ve PCR sonuçları açısından öne çıkar özellikte olduğu görülmüştür. EGF varlığı kadar nanodesenlemeninde yara iyileşmesini tetiklediği gösterilmiştir. Ancak histoloji boyamalarında deri doku etrafında biriken yüksek kolajen miktarı, iyileşmiş

epidermis-dermis tabakası görüntüsü nano film EGF (+) örneklerini nano filmlerden daha avantajlı hale getirmiştir.

Bu filmler üzerindeki ikili kültür yapısı mikroskop altında incelendiğinde melanositlerin fibroblastlar üzerinde kümeler halinde bulunduğu tespit edilmiştir. Bu durum melanosom organoidlerinin oluşturulması amacıyla üretilen nano film EGF (+) örneklerinin uygun substratlar olabileceğini düşündürmektedir.

Genel olarak değerlendirildiğinde AAO membranların doğrudan kullanıldığı veya fiziksel özelliklerinin taklit edildiği yüzey tasarımlarının hücresel cevabı artırıcı özellikte olduğu, ilaveten biyosensör uygulamalarında sinyal tekrarlanabilirliğini artırıcı niteliğine ilaveten düşük konsantrasyonlu biyolojik yapılardan yüksek sinyal şiddeti almaya olanak sağlayabilecek potansiyelde olduğu tespit edilmiştir.





KAYNAKLAR

- [1] **E. Briggs, A. Walpole, P. Wilshaw, M. Karlsson, E. Palsgard**, Formation of highly adherent nano-porous alumina on Ti-based substrates: a novel bone implant coating, *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* 15(9) (2004) 1021-1029.
- [2] **C. Schmidt, V. Shastri, J. Vacanti, R. Langer**, Stimulation of neurite outgrowth using an electrically conducting polymer, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(17) (1997) 8948-8953.
- [3] **F. Buyukserin, S. Altuntas, B. Aslim**, Fabrication and modification of composite silica nano test tubes for targeted drug delivery, *Rsc Advances* 4(45) (2014) 23535-23539.
- [4] **S. Lee, D. Mitchell, L. Trofin, T. Nevanen, H. Soderlund, C. Martin**, Antibody-based bio-nanotube membranes for enantiomeric drug separations, *Science* 296(5576) (2002) 2198-2200.
- [5] **D. Mitchell, S. Lee, L. Trofin, N. Li, T. Nevanen, H. Soderlund, C. Martin**, Smart nanotubes for bioseparations and biocatalysis, *Journal of the American Chemical Society* 124(40) (2002) 11864-11865.
- [6] **W. Lee, R. Scholz, K. Niesch, U. Gosele**, A template-based electrochemical method for the synthesis of multisegmented metallic nanotubes, *Angewandte Chemie-International Edition* 44(37) (2005) 6050-6054.
- [7] **L. Zhi, J. Wu, J. Li, U. Kolb, K. Mullen**, Carbonization of disclike molecules in porous alumina membranes: Toward carbon nanotubes with controlled graphene-layer orientation, *Angewandte Chemie-International Edition* 44(14) (2005) 2120-2123.
- [8] **W. Lee, R. Ji, C. Ross, U. Gosele, K. Nielsch**, Wafer-scale Ni imprint stamps for porous alumina membranes based on interference lithography, *Small* 2(8-9) (2006) 978-982.
- [9] **M. Kang, S. Yu, N. Li, C. Martin**, Nanowell-array surfaces prepared by argon plasma etching through a nanopore alumina mask, *Langmuir* 21(18) (2005) 8429-8438.

- [10] **G. Ding, M. Zheng, W. Xu, W. Shen**, Fabrication of controllable free-standing ultrathin porous alumina membranes, *Nanotechnology* 16(8) (2005) 1285-1289.
- [11] **H. Chik, J. Xu**, Nanometric superlattices: non-lithographic fabrication, materials, and prospects, *Materials Science & Engineering R-Reports* 43(4) (2004) 103-138.
- [12] **D. Bruggemann**, Nanoporous Aluminium Oxide Membranes as Cell Interfaces, *Journal of Nanomaterials* (2013) 18.
- [13] **H. Masuda, F. Hasegawa, S. Ono**, Self-ordering of cell arrangement of anodic porous alumina formed in sulfuric acid solution, *Journal of the Electrochemical Society* 144(5) (1997) L127-L130.
- [14] **A. Jani, D. Losic, N. Voelcker**, Nanoporous anodic aluminium oxide: Advances in surface engineering and emerging applications, *Progress in Materials Science* 58(5) (2013) 636-704.
- [15] **C. Eckstein, L.K. Acosta, L. Pol, E. Xifré-Pérez, J. Pallares, J. Ferré-Borrull, L.F. Marsal**, Nanoporous Anodic Alumina Surface Modification by Electrostatic, Covalent, and Immune Complexation Binding Investigated by Capillary Filling, *ACS applied materials & interfaces* 10(12) (2018) 10571.
- [16] **S. Ni, X. Li, P. Yang, S. Ni, F. Hong, T.J. Webster**, Enhanced apatite-forming ability and antibacterial activity of porous anodic alumina embedded with CaO–SiO₂–Ag₂O bioactive materials, *Materials Science & Engineering C* 58 (2016) 700-708.
- [17] **M. Michalska-Domanska, M. Norek, W. Stepniowski, B. Budner**, Fabrication of high quality anodic aluminum oxide (AAO) on low purity aluminum-A comparative study with the AAO produced on high purity aluminum, *Electrochimica Acta* 105 (2013) 424-432.
- [18] **S. Altuntas, F. Buyukserin**, Fabrication and characterization of conductive anodic aluminum oxide substrates, *Applied Surface Science* 318 (2014) 290-296.
- [19] **S. Altuntas, F. Buyukserin, A. Haider, B. Altinok, N. Biyikli, B. Aslim**, Protein-releasing conductive anodized alumina membranes for nerve-interface materials, *Materials Science & Engineering C-Materials For Biological Applications* 67 (2016) 590-598.

- [20] **M. Aryal, F. Buyukserin, K. Mielczarek, X.M. Zhao, J.M. Gao, A. Zakhidov, W.C. Hu**, Imprinted large-scale high density polymer nanopillars for organic solar cells, *Journal of Vacuum Science & Technology B* 26(6) (2008) 2562-2566.
- [21] **J. Ferre-Borrull, J. Pallares, G. Macias, L. Marsal**, Nanostructural Engineering of Nanoporous Anodic Alumina for Biosensing Applications, *Materials*, 2014, pp. 5225-5253.
- [22] **S. Altuntas, F. Buyukserin**, Fabrication of thioflavin-T-modified nanopillared SERS substrates for ultrasensitive beta-amyloid peptide detection, *Journal of Raman Spectroscopy* 49(8) (2018) 1247-1256.
- [23] **A. Aqil, V.T. Tchemtchoua, A. Colige, G. Atanasova, Y. Poumay, C. Jérôme**, Preparation and characterizations of EGDE crosslinked chitosan electrospun membranes, *Clinical hemorheology and microcirculation* 60(1) (2015) 39.
- [24] **S.M. Saraiva, S.P. Miguel, M.P. Ribeiro, P. Coutinho, I.J. Correia**, Synthesis and characterization of a photocrosslinkable chitosan-gelatin hydrogel aimed for tissue regeneration, *Rsc Advances* 5(78) (2015) 63478-63488.
- [25] **C. Alemdaroglu, Z. Degim, N. Celebi, F. Zor, S. Ozturk, D. Erdogan**, An investigation on burn wound healing in rats with chitosan gel formulation containing epidermal growth factor, *Burns* 32(3) (2006) 319-327.
- [26] **J.S. Mao, L.G. Zhao, K. de Yao, Q.X. Shang, G.H. Yang, Y.L. Cao**, Study of novel chitosan-gelatin artificial skin in vitro, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 64A(2) (2003) 301-308.
- [27] **B.Y. Lee, C.W. Li, G.J. Wang, Asme**, A Microporous Chitosan/Collagen Composite Encapsulated Small Tube Of Nanoporous Anodic Aluminum Oxide For Long-Acting Drug Release, *Proceedings of the Asme International Mechanical Engineering Congress and Exposition*, 2015, Vol 10 (2016) 7.
- [28] **M.S. Aw, S. Simovic, J. Addai-Mensah, D. Losic**, Polymeric micelles in porous and nanotubular implants as a new system for extended delivery of poorly soluble drugs, *Journal of Materials Chemistry* 21(20) (2011) 7082-7089.

- [29] **F. Haq, V. Anandan, C. Keith, G. Zhang**, Neurite development in PC12 cells cultured on nanopillars and nanopores with sizes comparable with filopodia, *International Journal of Nanomedicine* 2(1) (2007) 107-115.
- [30] **W.K. Cho, K. Kang, G. Kang, M.J. Jang, Y. Nam, I.S. Choi**, Pitch-Dependent Acceleration of Neurite Outgrowth on Nanostructured Anodized Aluminum Oxide Substrates, *Angewandte Chemie-International Edition* 49(52) (2010) 10114-10118.
- [31] **B. Wolfrum, Y. Mourzina, F. Sommerhage, A. Offenhausser**, Suspended nanoporous membranes as interfaces for neuronal biohybrid systems, *Nano Letters* 6(3) (2006) 453-457.
- [32] **S. Prasad, J. Quijano**, Development of nanostructured biomedical micro-drug testing device based on in situ cellular activity monitoring, *Biosensors & Bioelectronics* 21(7) (2006) 1219-1229.
- [33] **A.H.D. Graham, C.R. Bowen, J. Robbins, J. Taylor**, Formation of a porous alumina electrode as a low-cost CMOS neuronal interface, *Sensors and Actuators B-Chemical* 138(1) (2009) 296-303.
- [34] **M. Wesche, M. Huske, A. Yakushenko, D. Bruggemann, D. Mayer, A. Offenhausser, B. Wolfrum**, A nanoporous alumina microelectrode array for functional cell-chip coupling, *Nanotechnology* 23(49) (2012) 8.
- [35] **W. He, R.V. Bellamkonda**, Nanoscale neuro-integrative coatings for neural implants, *Biomaterials* 26(16) (2005) 2983-2990.
- [36] **L. Vaysse, A. Beduer, J.C. Sol, C. Vieu, I. Loubinoux**, Micropatterned bioimplant with guided neuronal cells to promote tissue reconstruction and improve functional recovery after primary motor cortex insult, *Biomaterials* 58 (2015) 46-53.
- [37] **B. Mammadov, M. Sever, M.O. Guler, A.B. Tekinay**, Neural differentiation on synthetic scaffold materials, *Biomaterials Science* 1(11) (2013) 1119-1137.
- [38] **S. Seidlits, J. Lee, C. Schmidt**, Nanostructured scaffolds for neural applications, *Nanomedicine* 3(2) (2008) 183-199.

- [39] **J.Y. Hwang, U.S. Shin, W.C. Jang, J.K. Hyun, I.B. Wall, H.W. Kim**, Biofunctionalized carbon nanotubes in neural regeneration: a mini-review, *Nanoscale* 5(2) (2013) 487-497.
- [40] **W.T. Su, Y.A. Shih**, Nanofiber containing carbon nanotubes enhanced PC12 cell proliferation and neuritogenesis by electrical stimulation, *Bio-Medical Materials and Engineering* 26 (2015) S189-S195.
- [41] **Z.L. Zhang, Q.Q. Li, L. Han, Y.H. Zhong**, Layer-by-layer films assembled from natural polymers for sustained release of neurotrophin, *Biomedical Materials* 10(5) (2015) 9.
- [42] **A. Jacovina, F. Zhong, E. Khazanova, E. Lev, A. Deora, K. Hajjar**, Neuritogenesis and the nerve growth factor-induced differentiation of PC-12 cells requires annexin II-mediated plasmin generation, *Journal of Biological Chemistry* 276(52) (2001) 49350-49358.
- [43] **S. Lee, G. Khang, Y. Lee, H. Lee**, The effect of surface wettability on induction and growth of neurites from the PC-12 cell on a polymer surface, *Journal of Colloid and Interface Science* 259(2) (2003) 228-235.
- [44] **Y. Fan, F. Cui, S. Hou, Q. Xu, L. Chen, I. Lee**, Culture of neural cells on silicon wafers with nano-scale surface topograph, *Journal of Neuroscience Methods* 120(1) (2002) 17-23.
- [45] **B. Daglar, G.B. Demirel, T. Khudiyev, T. Dogan, O. Tobail, S. Altuntas, F. Buyukserin, M. Bayindir**, Anemone-like nanostructures for non-lithographic, reproducible, large-area, and ultra-sensitive SERS substrates, *Nanoscale* 6(21) (2014) 12710-12717.
- [46] **I. Wathuthanthri, Y. Liu, K. Du, W. Xu, C. Choi**, Simple Holographic Patterning for High-Aspect-Ratio Three-Dimensional Nanostructures with Large Coverage Area, *Advanced Functional Materials* 23(5) (2013) 608-618.
- [47] **Z.Q. Chen, J.J. Zhang, S. Singh, P. Peltier-Pain, J.S. Thorson, B.J. Hinds**, Functionalized Anodic Aluminum Oxide Membrane-Electrode System for Enzyme Immobilization, *Acs Nano* 8(8) (2014) 8104-8112.

- [48] **S.H. Jo, S.G. Lee, D.Y. Kim, Ieee**, Fabrication and crystallization of AAO template for sensor applications, 2012 12th Ieee Conference on Nanotechnology (Ieee-Nano) (2012) 4.
- [49] **L. Tan, H. Gao, Y. Zong, W. Knoll**, Atomic Layer Deposition of TiO₂ to Bond Free-Standing Nanoporous Alumina Templates to Gold-Coated Substrates as Planar Optical Waveguide Sensors, *Journal of Physical Chemistry C* 112(45) (2008) 17576-17580.
- [50] **L. Guerrini, D. Graham**, Molecularly-mediated assemblies of plasmonic nanoparticles for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy applications, *Chemical Society Reviews* 41(21) (2012) 7085-7107.
- [51] **S. Schlucker**, Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: Concepts and Chemical Applications, *Angewandte Chemie-International Edition* 53(19) (2014) 4756-4795.
- [52] **S. Lal, N. Grady, J. Kundu, C. Levin, J. Lassiter, N. Halas**, Tailoring plasmonic substrates for surface enhanced spectroscopies, *Chemical Society Reviews* 37(5) (2008) 898-911.
- [53] **J. Li, Y. Huang, Y. Ding, Z. Yang, S. Li, X. Zhou, F. Fan, W. Zhang, Z. Zhou, D. Wu, B. Ren, Z. Wang, Z. Tian**, Shell-isolated nanoparticle-enhanced Raman spectroscopy, *Nature* 464(7287) (2010) 392-395.
- [54] **N. Pieczonka, R. Aroca**, Single molecule analysis by surfaced-enhanced Raman scattering, *Chemical Society Reviews* 37(5) (2008) 946-954.
- [55] **I. Larmour, D. Graham**, Surface enhanced optical spectroscopies for bioanalysis, *Analyst* 136(19) (2011) 3831-3853.
- [56] **P. Christopher, H. Xin, S. Linic**, Visible-light-enhanced catalytic oxidation reactions on plasmonic silver nanostructures, *Nature Chemistry* 3(6) (2011) 467-472.
- [57] **E. Larsson, C. Langhammer, I. Zoric, B. Kasemo**, Nanoplasmonic Probes of Catalytic Reactions, *Science* 326(5956) (2009) 1091-1094.
- [58] **S. Standridge, G. Schatz, J. Hupp**, Distance Dependence of Plasmon-Enhanced Photocurrent in Dye-Sensitized Solar Cells, *Journal of the American Chemical Society* 131(24) (2009) 8407-+.

- [59] **L. Austin, B. Kang, C. Yen, M. El-Sayed**, Plasmonic Imaging of Human Oral Cancer Cell Communities during Programmed Cell Death by Nuclear-Targeting Silver Nanoparticles, *Journal of the American Chemical Society* 133(44) (2011) 17594-17597.
- [60] **E. Dreaden, M. Mackey, X. Huang, B. Kang, M. El-Sayed**, Beating cancer in multiple ways using nanogold, *Chemical Society Reviews* 40(7) (2011) 3391-3404.
- [61] **K.C. Bantz, A.F. Meyer, N.J. Wittenberg, H. Im, O. Kurtulus, S.H. Lee, N.C. Lindquist, S.H. Oh, C.L. Haynes**, Recent progress in SERS biosensing, *Physical Chemistry Chemical Physics* 13(24) (2011) 11551-11567.
- [62] **F. Bezares, J. Caldwell, O. Glembocki, R. Rendell, M. Feygelson, M. Ukaegbu, R. Kasica, L. Shirey, N. Bassim, C. Hosten**, The Role of Propagating and Localized Surface Plasmons for SERS Enhancement in Periodic Nanostructures, *Plasmonics* 7(1) (2012) 143-150.
- [63] **B. Daglar, T. Khudiyev, G.B. Demirel, F. Buyukserin, M. Bayindir**, Soft biomimetic tapered nanostructures for large-area antireflective surfaces and SERS sensing, *Journal of Materials Chemistry C* 1(47) (2013) 7842-7848.
- [64] **G. Das, F. Mearini, F. Gentile, F. De Angelis, H. Kumar, P. Candeloro, C. Liberale, G. Cuda, E. Di Fabrizio**, Nano-patterned SERS substrate: Application for protein analysis vs. temperature, *Biosensors & Bioelectronics* 24(6) (2009) 1693-1699.
- [65] **M. Biancalana, S. Koide**, Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils, *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* 1804(7) (2010) 1405-1412.
- [66] **R. Khurana, C. Coleman, C. Ionescu-Zanetti, S. Carter, V. Krishna, R. Grover, R. Roy, S. Singh**, Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils, *Journal of Structural Biology* 151(3) (2005) 229-238.
- [67] **E. Lopez-Tobar, M. Antalik, D. Jancura, M. Canameres, A. Garcia-Leis, D. Fedunova, G. Fabriciova, S. Sanchez-Cortes**, Adsorption and Detection of Amyloid Marker Thioflavin T on Ag Nanoparticles

by Surface-Enhanced Raman Scattering, *Journal of Physical Chemistry C* 117(8) (2013) 3996-4005.

- [68] **N. Maiti, R. Chadha, A. Das, S. Kapoor**, Adsorption and sub-nanomolar sensing of thioflavin T on colloidal gold nanoparticles, silver nanoparticles and silver-coated films studied using surface-enhanced Raman scattering, *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 149 (2015) 949-956.
- [69] **A. Maskevich, S. Kurhuzenkau, A. Lavysh, L. Kivach, S. Maskevich**, Surface-Enhanced Raman Scattering Spectra of Thioflavin T: Manifestation of the Electromagnetic and Molecular Enhancement Mechanisms, *Journal of Applied Spectroscopy* 82(4) (2015) 532-539.
- [70] **P. Nestor, P. Scheltens, J. Hodges**, Advances in the early detection of Alzheimer's disease, *Nature Medicine* 10(7) (2004) S34-S41.
- [71] **E. Papastavrou, A. Kalokerinou, S. Papacostas, H. Tsangari, P. Sourtzi**, Caring for a relative with dementia: family caregiver burden, *Journal of Advanced Nursing* 58(5) (2007) 446-457.
- [72] **A. Assoc, A. Assoc**, Alzheimer's Association Report 2015 Alzheimer's disease facts and figures, *Alzheimers & Dementia* 11(3) (2015) 332-384.
- [73] **G. Chetelat, J. Baron**, Early diagnosis of Alzheimer's disease: contribution of structural neuroimaging, *Neuroimage* 18(2) (2003) 525-541.
- [74] **B. Qu, Y. Gong, C. Moore, M. Fu, D. German, L. Chang, R. Rosenberg, R. Diaz-Arrastia**, Beta-amyloid auto-antibodies are reduced in Alzheimer's disease, *Journal of Neuroimmunology* 274(1-2) (2014) 168-173.
- [75] **C. Humpel**, Identifying and validating biomarkers for Alzheimer's disease, *Trends in Biotechnology* 29(1) (2011) 26-32.
- [76] **F. Hulstaert, K. Blennow, A. Ivanoiu, H. Schoonderwaldt, M. Riemenschneider, P. De Deyn, C. Bancher, P. Cras, J. Wiltfang, P. Mehta, K. Iqbal, H. Pottel, E. Vanmechelen, H. Vanderstichele**, Improved discrimination of AD patients using beta-amyloid((1-42)) and tau levels in CSF, *Neurology* 52(8) (1999) 1555-1562.

- [77] **S. Rajnish, A. Ganesh**, Salivary A β -40, A β -42, IGF-I, IGF-II, Alpha Amylase, IL-1 β , and TNF-alpha in Alzheimer's Disease: A Useful Diagnostic Tool, *WebmedCentral Neurosciences* 5(1) (2014) 1-10.
- [78] **F. Bermejo-Pareja, D. Antequera, T. Vargas, J. Molina, E. Carro**, Saliva levels of Abeta1-42 as potential biomarker of Alzheimer's disease: a pilot study, *Bmc Neurology* 10 (2010).
- [79] **A. Kaushik, R.D. Jayant, S. Tiwari, A. Vashist, M. Nair**, Nano-biosensors to detect beta-amyloid for Alzheimer's disease management, *Biosensors & Bioelectronics* 80 (2016) 273-287.
- [80] **S. Mathews, P.K. Gupta, R. Bhonde, S. Totey**, Chitosan enhances mineralization during osteoblast differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells, by upregulating the associated genes, *Cell Proliferation* 44(6) (2011) 537-549.
- [81] **A.R. Costa-Pinto, R.L. Reis, N.M. Neves**, Scaffolds Based Bone Tissue Engineering: The Role of Chitosan, *Tissue Engineering Part B-Reviews* 17(5) (2011) 331-347.
- [82] **T. Jiang, M. Deng, R. James, L.S. Nair, C.T. Laurencin**, Micro- and nanofabrication of chitosan structures for regenerative engineering, *Acta Biomaterialia* 10(4) (2014) 1632-1645.
- [83] **H.H. Shuai, C.Y. Yang, H.I.C. Harn, R.L. York, T.C. Liao, W.S. Chen, J.A. Yeh, C.M. Cheng**, Using surfaces to modulate the morphology and structure of attached cells - a case of cancer cells on chitosan membranes, *Chemical Science* 4(8) (2013) 3058-3067.
- [84] **M. Maruyama, M. Ito**, In vitro properties of a chitosan-bonded self-hardening paste with hydroxyapatite granules, *Journal of Biomedical Materials Research* 32(4) (1996) 527-532.
- [85] **T.E.L. Douglas, M. Pilarek, I. Kalaszczynska, I. Senderek, A. Skwarczynska, V. Cuijpers, Z. Modrzejewska, M. Lewandowska-Szumiel, P. Dubruel**, Enrichment of chitosan hydrogels with perfluorodecalin promotes gelation and stem cell vitality, *Materials Letters* 128 (2014) 79-84.
- [86] **R. Nirmala, B.W. Il, R. Navamathavan, M.H. El-Newehy, H.Y. Kim**, Preparation and characterizations of anisotropic chitosan

- nanofibers via electrospinning, *Macromolecular Research* 19(4) (2011) 345-350.
- [87] **X.Y. Shi, Q. Fang, M. Ding, J. Wu, F. Ye, Z.B. Lv, J. Jin**, Microspheres of carboxymethyl chitosan, sodium alginate and collagen for a novel hemostatic in vitro study, *Journal of Biomaterials Applications* 30(7) (2016) 1092-1102.
- [88] **I. Saygun, V. Bal, A. Kiziltay, P.Y. Huri, F. Avcu, K. Ustun, V. Hasirci, N. Hasirci**, Proliferation and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells in Chitosan Scaffolds Loaded with Nanocapsules Containing Bone Morphogenetic Proteins-4, Platelet-Derived Growth Factor and Insulin-Like Growth Factor 1, *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering* 4(3) (2014) 181-188.
- [89] **P. He, S.S. Davis, L. Illum**, In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres, *International Journal of Pharmaceutics* 166(1) (1998) 75-88.
- [90] **S. Kung, H. Devlin, E. Fu, K.Y. Ho, S.Y. Liang, Y.D. Hsieh**, The osteoinductive effect of chitosan-collagen composites around pure titanium implant surfaces in rats, *Journal of Periodontal Research* 46(1) (2011) 126-133.
- [91] **T.W. Huang, Y.H. Young, P.W. Cheng, Y.H. Chan, T.H. Young**, Culture of Nasal Epithelial Cells Using Chitosan-Based Membranes, *Laryngoscope* 119(10) (2009) 2066-2070.
- [92] **Y. Huang, S. Onyeri, M. Siewe, A. Moshfeghian, S.V. Madihally**, In vitro characterization of chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering, *Biomaterials* 26(36) (2005) 7616-7627.
- [93] **S.J. Lin, S.H. Jee, W.C. Hsaio, S.J. Lee, T.H. Young**, Formation of melanocyte spheroids on the chitosan-coated surface, *Biomaterials* 26(12) (2005) 1413-1422.
- [94] **B. Dhandayuthapani, U.M. Krishnan, S. Sethuraman**, Fabrication and characterization of chitosan-gelatin blend nanofibers for skin tissue engineering, *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials* 94B(1) (2010) 264-272.
- [95] **C. Yang, L. Xu, Y. Zhou, X. Zhang, X. Huang, M. Wang, Y. Han, M. Zhai, S. Wei, J. Li**, A green fabrication approach of gelatin/CM-

chitosan hybrid hydrogel for wound healing, *Carbohydrate Polymers* 82(4) (2010) 1297-1305.

- [96] **D. Archana, J. Dutta, P. Dutta**, Evaluation of chitosan nano dressing for wound healing: Characterization, in vitro and in vivo studies, *International Journal of Biological Macromolecules* 57 (2013) 193-203.
- [97] **C.Y. Yang, C.Y. Sung, H.H. Shuai, C.M. Cheng, J.A. Yeh**, Probing cellular behaviors through nanopatterned chitosan membranes, *Science and Technology of Advanced Materials* 14(4) (2013) 9.
- [98] **L. M. S. Castro-Raucci, M. S. Francischini, L. N. Teixeira, E. P. Ferraz, H. B. Lopes, P. T. De Oliveira, M.Q. Hassan, A.L. Rosa, M.M. Beloti**, Titanium With Nanotopography Induces Osteoblast Differentiation by Regulating Endogenous Bone Morphogenetic Protein Expression and Signaling Pathway, *Journal of Cellular Biochemistry* 117(7) (2016) 1718-1726.
- [99] **P. Tambasco de Oliveira, A. Nanci**, Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells, *Biomaterials* 25(3) (2004) 403-413.
- [100] **U.F. Gunpath, H. Le, R.D. Handy, C. Tredwin**, Anodised TiO₂ nanotubes as a scaffold for antibacterial silver nanoparticles on titanium implants, *Materials Science & Engineering C* 91 (2018) 638-644.
- [101] **A.S.K. Kiran, T.S. Sampath Kumar, G. Perumal, R. Sanghavi, M. Doble, S. Ramakrishna**, Dual nanofibrous bioactive coating and antimicrobial surface treatment for infection resistant titanium implants, *Progress in Organic Coatings* 121 (2018) 112-119.
- [102] **B.K. Ekambara, M.S. Niepel, B. Fuhrmann, G. Schmidt, T. Groth**, Introduction of laser interference lithography to make nanopatterned surfaces for fundamental studies on stem cell response, *ACS Biomaterials Science & Engineering* 4(5) (2018).
- [103] **N.-S. Kim, M.-S. Vang, H.-S. Yang, S.-W. Park, H.-O. Park, H.-P. Lim**, Comparison of stability in titanium implants with different surface topographies in dogs, *The Journal of Advanced Prosthodontics* 1(1) (2009) 47-55.

- [104] **C. Berking, R. Takemoto, K. Satyamoorthy, R. Elenitsas, M. Herlyn,** Basic fibroblast growth factor and ultraviolet B transform melanocytes in human skin, *American Journal of Pathology* 158(3) (2001) 943-953.
- [105] **T.C. Lei, V.M. Virador, W.D. Vieira, V.J. Hearing,** A melanocyte-keratinocyte coculture model to assess regulators of pigmentation in vitro, *Analytical Biochemistry* 305(2) (2002) 260-268.
- [106] **S.G. Priya, H. Jungvid, A. Kumar,** Skin tissue engineering for tissue repair and regeneration, *Tissue Engineering Part B-Reviews* 14(1) (2008) 105-118.
- [107] **R.V. Shevchenko, S.L. James, S.E. James,** A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction, *Journal of the Royal Society Interface* 7(43) (2010) 229-258.
- [108] **G. Sriram, P.L. Bigliardi, M. Bigliardi-Qi,** Fibroblast heterogeneity and its implications for engineering organotypic skin models in vitro, *European Journal of Cell Biology* 94(11) (2015) 483-512.
- [109] **H.F. Guo, Z.S. Li, S.W. Dong, W.J. Chen, L. Deng, Y.F. Wang, D.J. Ying,** Piezoelectric PU/PVDF electrospun scaffolds for wound healing applications, *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 96 (2012) 29-36.
- [110] **M. Choi, K. Stanton-Maxey, J. Stanley, C. Levin, R. Bardhan, D. Akin, S. Badve, J. Sturgis, J. Robinson, R. Bashir, N. Halas, S. Clare,** A cellular Trojan horse for delivery of therapeutic nanoparticles into tumors, *Nano Letters* 7(12) (2007) 3759-3765.
- [111] **K.G. Harding, H.L. Morris, G.K. Patel,** Science, medicine, and the future - Healing chronic wounds, *British Medical Journal* 324(7330) (2002) 160-163.
- [112] **S.T. Boyce, E.E. Medrano, Z. Abdelmalek, A.P. Supp, J.M. Dodick, J.J. Nordlund, G.D. Warden,** Pigmentation And Inhibition Of Wound Contraction By Cultured Skin Substitutes With Adult Melanocytes After Transplantation To Athymic Mice, *Journal of Investigative Dermatology* 100(4) (1993) 360-365.

- [113] **S. Chadwick, R. Heath, M. Shah**, Abnormal pigmentation within cutaneous scars: A complication of wound healing, *Indian Journal of Plastic Surgery* 94B(2) (2012) 403-411.
- [114] **M. Seiberg**, Keratinocyte-melanocyte interactions during melanosome transfer, *Pigment Cell Research* 14(4) (2001) 236-242.
- [115] **S. Jungbauer, R. Kemkemer, H. Gruler, D. Kaufmann, J.P. Spatz**, Cell shape normalization, dendrite orientation, and melanin production of normal and genetically altered (haploinsufficient NF1)-melanocytes by microstructured substrate interactions, *Chemphyschem* 5(1) (2004) 85-92.
- [116] **Y. Yamaguchi, V.J. Hearing, S. Itami, K. Yoshikawa, I. Katayama**, Mesenchymal-epithelial interactions in the skin: Aiming for site-specific tissue regeneration, *Journal of Dermatological Science* 40(1) (2005) 1-9.
- [117] **Y. Yamaguchi, S. Itami, H. Watabe, K. Yasumoto, Z.A. Abdel-Malek, T. Kubo, F. Rouzaud, A. Tanemura, K. Yoshikawa, V.J. Hearing**, Mesenchymal-epithelial interactions in the skin: increased expression of dickkopf1 by palmoplantar fibroblasts inhibits melanocyte growth and differentiation, *Journal of Cell Biology* 165(2) (2004) 275-285.
- [118] **J.H. Kim, J. Jang, Y.H. Jeong, T.J. Ko, D.W. Cho**, Fabrication of a Nanofibrous Mat with a Human Skin Pattern, *Langmuir* 31(1) (2015) 424-431.
- [119] **C.Y. Li, T.W. Gao, G. Wang, Z.Y. Han, Z. Shen, T.H. Li, Y.F. Liu**, The effect of antisense tyrosinase-related protein 1 on melanocytes and malignant melanoma cells, *British Journal of Dermatology* 150(6) (2004) 1081-1090.
- [120] **M. Ohji, N. Sundarraj, R.A. Thoft**, Transforming Growth-Factor-Beta Stimulates Collagen And Fibronectin Synthesis By Human Corneal Stromal Fibroblasts In-Vitro, *Current Eye Research* 12(8) (1993) 703-709.
- [121] **J. Roman, J.D. Ritzenthaler, R. Bechara, L.A. Brown, D. Guidot**, Ethanol stimulates the expression of fibronectin in lung fibroblasts via kinase-dependent signals that activate CREB, *American Journal of*

Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology 288(5)
(2005) L975-L987.

- [122] **C. Todd, S.D. Hewitt, J. Kempenaar, K. Noz, A.J. Thody, M. Ponec,** Coculture Of Human Melanocytes And Keratinocytes In A Skin Equivalent Model - Effect Of Ultraviolet-Radiation, *Archives of Dermatological Research* 285(8) (1993) 455-459.
- [123] **F. Groeber, M. Holeiter, M. Hampel, S. Hinderer, K. Schenke-Layland,** Skin tissue engineering - In vivo and in vitro applications, *Advanced Drug Delivery Reviews* 63(4-5) (2011) 352-366.
- [124] **S. MacNeil,** Progress and opportunities for tissue-engineered skin, *Nature* 445(7130) (2007) 874-880.
- [125] **J.S. Choi, K.W. Leong, H.S. Yoo,** In vivo wound healing of diabetic ulcers using electrospun nanofibers immobilized with human epidermal growth factor (EGF), *Biomaterials* 29(5) (2008) 587-596.
- [126] **S.N. Park, J.K. Kim, H. Suh,** Evaluation of antibiotic-loaded collagen-hyaluronic acid matrix as a skin substitute, *Biomaterials* 25(17) (2004) 3689-3698.
- [127] **C. Yang, L. Xu, Y. Zhou, X.M. Zhang, X. Huang, M. Wang, Y. Han, M.L. Zhai, S.C. Wei, J.Q. Li,** A green fabrication approach of gelatin/CM-chitosan hybrid hydrogel for wound healing, *Carbohydrate Polymers* 82(4) (2010) 1297-1305.
- [128] **A. Tanaka, T. Nagate, H. Matsuda,** Acceleration of wound healing by gelatin film dressings with epidermal growth factor, *Journal of Veterinary Medical Science* 67(9) (2005) 909-913.
- [129] **T. Dinh, S. Braunagel, B.I. Rosenblum,** Growth Factors in Wound Healing The Present and the Future?, *Clinics in Podiatric Medicine and Surgery* 32(1) (2015) 109-+.
- [130] **Y. Mimura, H. Ihn, M. Jinnin, Y. Asano, K. Yamane, K. Tamaki,** Epidermal growth factor induces fibronectin expression in human dermal fibroblasts via protein kinase C delta signaling pathway, *Journal of Investigative Dermatology* 122(6) (2004) 1390-1398.
- [131] **R.L. Dahlin, F.K. Kasper, A.G. Mikos,** Polymeric Nanofibers in Tissue Engineering, *Tissue Engineering Part B-Reviews* 17(5) (2011) 349-364.

- [132] **W. Zhong, M.M.Q. Xing, H.I. Maibach**, Nanofibrous materials for wound care, *Cutaneous and Ocular Toxicology* 29(3) (2010) 143-152.
- [133] **A. Guimaraes, A. Martins, E.D. Pinho, S. Faria, R.L. Reis, N.M. Neves**, Solving cell infiltration limitations of electrospun nanofiber meshes for tissue engineering applications, *Nanomedicine* 5(4) (2010) 539-554.
- [134] **X.M. Shi, W.P. Zhou, D.L. Ma, Q. Ma, D. Bridges, Y. Ma, A.M. Hu**, Electrospinning of Nanofibers and Their Applications for Energy Devices, *Journal of Nanomaterials* (2015) 20.
- [135] **L.G. Parkinson, S.M. Rea, A.W. Stevenson, F.M. Wood, M.W. Fear**, The Effect of Nano-Scale Topography on Keratinocyte Phenotype and Wound Healing Following Burn Injury, *Tissue Engineering Part A* 18(7-8) (2012) 703-714.
- [136] **N.E. Zander**, Hierarchically Structured Electrospun Fibers, *Polymers* 5(1) (2013) 19-44.
- [137] **F. Buyukserin, M. Aryal, J.M. Gao, W.C. Hu**, Fabrication of Polymeric Nanorods Using Bilayer Nanoimprint Lithography, *Small* 5(14) (2009) 1632-1636.
- [138] **M. Celik, S. Altuntas, F. Buyukserin**, Fabrication of nanocrater-decorated anodic aluminum oxide membranes as substrates for reproducibly enhanced SERS signals, *Sensors & Actuators: B. Chemical* 255(P3) (2018) 2871-2877.
- [139] **L. Chen, R. Mirza, Y. Kwon, L.A. DiPietro, T.J. Koh**, The murine excisional wound model: Contraction revisited, *Wound Repair and Regeneration* 23(6) (2015) 874-877.
- [140] **S.L. Chadwick, C. Yip, M.W.J. Ferguson, M. Shah**, Repigmentation of cutaneous scars depends on original wound type, *Journal of Anatomy* 223(1) (2013) 74-82.
- [141] **Y.J. Wang, C. Viennet, S. Robin, J.Y. Berthon, L. He, P. Humbert**, Precise role of dermal fibroblasts on melanocyte pigmentation, *Journal of Dermatological Science* 88(2) (2017) 159-166.
- [142] **F.V. Filipp, S. Birlea, M.W. Bosenberg, D. Brash, P.B. Cassidy, S.Z. Chen, J.A. D'Orazio, M. Fujita, B.K. Goh, M. Herlyn, A.K. Indra, L. Larue, S.A. Leachman, C. Le Poole, F. Liu-Smith, P. Manga**,

- L. Montoliu, D.A. Norris, Y. Shellman, K.S.M. Smalley, R.A. Spritz, R.A. Sturm, S.M. Swetter, T. Terzian, K. Wakamatsu, J.S. Weber, N.F. Box**, *Frontiers in pigment cell and melanoma research, Pigment Cell & Melanoma Research* 31(6) (2018) 728-735.
- [143] **F. Buyukserin, C. Martin**, The use of Reactive Ion Etching for obtaining "free" silica nano test tubes, *Applied Surface Science* 256(24) (2010) 7700-7705.
- [144] **I. Chung, C. Li, G. Wang**, The influence of different nanostructured scaffolds on fibroblast growth, *Science and Technology of Advanced Materials* 14(4) (2013).
- [145] **M. Marcus H. Skaat**, NGF-conjugated iron oxide nanoparticles promote differentiation and outgrowth of PC12 cells, *Nanoscale*, 2015, pp. 1058-1066.
- [146] **G. Kang, R. Ben Borgens, Y. Cho**, Well-Ordered Porous Conductive Polypyrrole as a New Platform for Neural Interfaces, *Langmuir* 27(10) (2011) 6179-6184.
- [147] **E.S. C. Simitzi, C. Fotakis, I. Athanassakis and A. Ranella**, Microconical silicon structures influence NGF-induced PC12 cell morphology, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2015, pp. 424-434.
- [148] **A.N. Yang, Z.B. Huang, G.F. Yin, X.M. Pu**, Fabrication of aligned, porous and conductive fibers and their effects on cell adhesion and guidance, *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 134 (2015) 469-474.
- [149] **V. Malkoc, D. Gallego-Perez, T. Nelson, J.J. Lannutti, D.J. Hansford**, Controlled neuronal cell patterning and guided neurite growth on micropatterned nanofiber platforms, *Journal of Micromechanics and Microengineering* 25(12) (2015) 11.
- [150] **B. Mammadov, R. Mammadov, M. Guler, A. Tekinay**, Cooperative effect of heparan sulfate and laminin mimetic peptide nanofibers on the promotion of neurite outgrowth, *Acta Biomaterialia* 8(6) (2012) 2077-2086.

- [151] **X.L. Zhu, J. Chen, L. Scheideler, T. Altebaeumer, J. Geis-Gerstorfer, D. Kern**, Cellular reactions of Osteoblasts to micron- and submicron-scale porous structures of titanium surfaces, *Cells Tissues Organs* 178(1) (2004) 13-22.
- [152] **K. Popat, E. Swan, V. Mukhatyar, K. Chatvanichkul, G. Mor, C. Grimes, T. Desai**, Influence of nanoporous alumina membranes on long-term osteoblast response, *Biomaterials* 26(22) (2005) 4516-4522.
- [153] **S.H. Chung, S.J. Son, J. Min**, The nanostructure effect on the adhesion and growth rates of epithelial cells with well-defined nanoporous alumina substrates, *Nanotechnology* 21(12) (2010) 7.
- [154] **L.P. Wang, Q.W. Huang, J.Y. Wang**, Nanostructured Polyaniline Coating on ITO Glass Promotes the Neurite Outgrowth of PC 12 Cells by Electrical Stimulation, *Langmuir* 31(44) (2015) 12315-12322.
- [155] **H.W. Liu, W.C. Huang, C.S. Chiang, S.H. Hu, C.H. Liao, Y.Y. Chen, S.Y. Chen**, Arrayed rGOSH/PMASH Microcapsule Platform Integrating Surface Topography, Chemical Cues, and Electrical Stimulation for Three-Dimensional Neuron-Like Cell Growth and Neurite Sprouting, *Advanced Functional Materials* 24(24) (2014) 3715-3724.
- [156] **A. Walpole, Z. Xia, C. Wilson, J. Triffitt, P. Wilshaw**, A novel nano-porous alumina biomaterial with potential for loading with bioactive materials, *Journal of Biomedical Materials Research Part a* 90A(1) (2009) 46-54.
- [157] **H. Masuda, K. Fukuda**, Ordered Metal Nanohole Arrays Made By A 2-Step Replication Of Honeycomb Structures Of Anodic Alumina, *Science* 268(5216) (1995) 1466-1468.
- [158] **F. Buyukserin, C. Medley, M. Mota, K. Kececi, R. Rogers, W. Tan, C. Martin**, Antibody-functionalized nano test tubes target breast cancer cells, *Nanomedicine* 3(3) (2008) 283-292.
- [159] **F. Buyukserin, S. Altuntas, B. Aslm**, Fabrication and Modification of Composite Silica NanoTest Tubes for Targeted Drug Delivery, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 2013.
- [160] **W.A. El-Said, D.M. Fouad, S.A. El-Safty**, Ultrasensitive label-free detection of cardiac biomarker myoglobin based on surface-enhanced

Raman spectroscopy, Sensors and Actuators B-Chemical 228 (2016) 401-409.

- [161] **F.Q. Ionta, F.L. Mendonca, G.C. de Oliveira, C.R.B. de Alencar, H.M. Honorio, A.C. Magalhaes, D. Rios**, In vitro assessment of artificial saliva formulations on initial enamel erosion remineralization, *Journal of Dentistry* 42(2) (2014) 175-179.
- [162] **G.W. Meng, F.M. Han, X.L. Zhao, B.S. Chen, D.C. Yang, J.X. Liu, Q.L. Xu, M.G. Kong, X.G. Zhu, Y.J. Jung, Y.J. Yang, Z.Q. Chu, M. Ye, S. Kar, R. Vajtai, P.M. Ajayan**, A General Synthetic Approach to Interconnected Nanowire/Nanotube and Nanotube/Nanowire/Nanotube Heterojunctions with Branched Topology, *Angewandte Chemie-International Edition* 48(39) (2009) 7166-7170.
- [163] **C.R. Martin**, Nanomaterials - A Membrane-Based Synthetic Approach, *Science* 266(5193) (1994) 1961-1966.
- [164] **H.T. Ngo, H.N. Wang, A.M. Fales, T. Vo-Dinh**, Label-Free DNA Biosensor Based on SERS Molecular Sentinel on Nanowave Chip, *Analytical Chemistry* 85(13) (2013) 6378-6383.
- [165] **M. Yilmaz, E. Senlik, E. Biskin, M.S. Yavuz, U. Tamer, G. Demirel**, Combining 3-D plasmonic gold nanorod arrays with colloidal nanoparticles as a versatile concept for reliable, sensitive, and selective molecular detection by SERS, *Physical Chemistry Chemical Physics* 16(12) (2014) 5563-5570.
- [166] **G.N. Xiao, S.Q. Man**, Surface-enhanced Raman scattering of methylene blue adsorbed on cap-shaped Silver nanoparticles, *Chemical Physics Letters* 447(4-6) (2007) 305-309.
- [167] **A. Dandapat, T.K. Lee, Y.M. Zhang, S.K. Kwak, E.C. Cho, D.H. Kim**, Attomolar Level Detection of Raman Molecules with Hierarchical Silver Nanostructures Including Tiny Nanoparticles between Nanosized Gaps Generated in Silver Petals, *Acs Applied Materials & Interfaces* 7(27) (2015) 14793-14800.
- [168] **C.C. Wu, B.C. Ku, C.H. Ko, C.C. Chiu, G.J. Wang, Y.H. Yang, S.J. Wu**, Electrochemical impedance spectroscopy analysis of A-beta (1-

42) peptide using a nanostructured biochip, *Electrochimica Acta* 134 (2014) 249-257.

- [169] **T. Demeritte, B.P.V. Nellore, R. Kanchanapally, S.S. Sinha, A. Pramanik, S.R. Chavva, P.C. Ray**, Hybrid Graphene Oxide Based Plasmonic-Magnetic Multifunctional Nanoplatfrom for Selective Separation and Label-Free Identification of Alzheimer's Disease Biomarkers, *Acs Applied Materials & Interfaces* 7(24) (2015) 13693-13700.
- [170] **W. Cho, I. Choi**, Fabrication of hairy polymeric films inspired by geckos: Wetting and high adhesion properties, *Advanced Functional Materials* 18(7) (2008) 1089-1096.
- [171] **G. Vargas, J.L. Acevedo, J. López, J. Romero**, Study of cross-linking of gelatin by ethylene glycol diglycidyl ether, *Materials Letters* 62(21) (2008) 3656-3658.
- [172] **Y.S. Peng, P.L. Lai, S. Peng, H.C. Wu, S. Yu, T.Y. Tseng, L.F. Wang, I.M. Chu**, Glial cell line-derived neurotrophic factor gene delivery via a polyethylene imine grafted chitosan carrier, *International Journal of Nanomedicine* 9 (2014) 3163-3174.
- [173] **B.D. McCloskey, H. Ju, B.D. Freeman**, Composite Membranes Based on a Selective Chitosan-Poly(ethylene glycol) Hybrid Layer: Synthesis, Characterization, and Performance in Oil-Water Purification, *Industrial & Engineering Chemistry Research* 49(1) (2010) 366-373.
- [174] **C.D. Qiao, X.G. Ma, J.L. Zhang, J.S. Yao**, Molecular interactions in gelatin/chitosan composite films, *Food Chemistry* 235 (2017) 45-50.
- [175] **G. Pasparakis, N. Bouropoulos**, Swelling studies and in vitro release of verapamil from calcium alginate and calcium alginate–chitosan beads, *International Journal of Pharmaceutics* 323(1) (2006) 34-42.
- [176] **L. Postiglione, G. Di Domenico, L. Ramaglia, A.E. di Lauro, F. Di Meglio, S. Montagnani**, Different titanium surfaces modulate the bone phenotype of SaOS-2 osteoblast-like cells, *European Journal of Histochemistry* 48(3) (2004) 213-222.

- [177] **E. Ngandu Mpoyi, M. Cantini, P.M. Reynolds, N. Gadegaard, M.J. Dalby, M. Salmerón-Sánchez**, Protein Adsorption as a Key Mediator in the Nanotopographical Control of Cell Behavior, *ACS nano* 10(7) (2016) 6638.
- [178] **A.A. Zadpoor**, Bone tissue regeneration: the role of scaffold geometry, *Biomater. Sci.* 3(2) (2015) 231-245.
- [179] **S. Zhang, B. Ma, F. Liu, J. Duan, S. Wang, J. Qiu, D. Li, Y. Sang, C. Liu, D. Liu, H. Liu**, Polylactic Acid Nanopillar Array-Driven Osteogenic Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells Determined by Pillar Diameter, *Nano letters* 18(4) (2018) 2243.
- [180] **K.J. Hendricks, T.A. Burd, J.O. Anglen, A.W. Simpson, G.D. Christensen, B.J. Gainor**, Synergy between *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in a rat model of complex orthopaedic wounds, *Journal of Bone and Joint Surgery-American* Volume 83A(6) (2001) 855-861.
- [181] **E.M. Hetrick, M.H. Schoenfisch**, Reducing implant-related infections: active release strategies, 2006, pp. 780-789.
- [182] **S. Cometa, M.A. Bonifacio, F. Baruzzi, S. de Candia, M.M. Giangregorio, L.C. Giannossa, M. Dicarlo**, Silver-loaded chitosan coating as an integrated approach to face titanium implant-associated infections: analytical characterization and biological activity.(Research Paper), *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 409(30) (2017) 7211.
- [183] **Y. Chung, Y. Su, C. Chen, G. Jia, H. Wang, J. Wu, J. Lin**, Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall, *Acta Pharmacologica Sinica* 25(7) (2004) 932-936.
- [184] **M.S. Benhabiles, R. Salah, H. Lounici, N. Drouiche, M.F.A. Goosen, N. Mameri**, Antibacterial activity of chitin, chitosan and its oligomers prepared from shrimp shell waste, *Food Hydrocolloids* 29(1) (2012) 48-56.
- [185] **Y. Yuan, M.P. Hays, P.R. Hardwidge, J. Kim**, Surface characteristics influencing bacterial adhesion to polymeric substrates, *RSC Adv.* 7(23) (2017) 14254-14261.

- [186] **S. Wu, F. Zuber, K. Maniura-Weber, J. Brugger, Q. Ren**, Nanostructured surface topographies have an effect on bactericidal activity, *Journal of Nanobiotechnology* 16(1) (2018).
- [187] **A. Elbourne, R.J. Crawford, E.P. Ivanova**, Nano-structured antimicrobial surfaces: From nature to synthetic analogues, *Journal of Colloid And Interface Science* 508 (2017) 603-616.
- [188] **H. Liu, Y. Du, X. Wang, L. Sun**, Chitosan kills bacteria through cell membrane damage, *International Journal of Food Microbiology* 95(2) (2004) 147-155.
- [189] **M.N. Knight, K.D. Hankenson**, Mesenchymal Stem Cells in Bone Regeneration, *Advances in wound care* 2(6) (2013) 306.
- [190] **S. Kocabey, H. Ceylan, A. Tekinay, M. Guler**, Glycosaminoglycan mimetic peptide nanofibers promote mineralization by osteogenic cells, *Acta Biomaterialia* 9(11) (2013) 9075-9085.
- [191] **E. Dawson, G. Mapili, K. Erickson, S. Taqvi, K. Roy**, Biomaterials for stem cell differentiation, *Advanced Drug Delivery Reviews* 60(2) (2008) 215-228.
- [192] **E.K.F. Yim, E.M. Darling, K. Kulangara, F. Guilak, K.W. Leong**, Nanotopography-induced changes in focal adhesions, cytoskeletal organization, and mechanical properties of human mesenchymal stem cells, *Biomaterials* 31(6) (2010) 1299-1306.
- [193] **M. Rabe, D. Verdes, S. Seeger**, Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces, *Advances in Colloid and Interface Science* 162(1-2) (2011) 87-106.
- [194] **E. Castrun, T. Sillat, S. Oja, A. Noro, A. Laitinen, Y.T. Kontinen, P. Lehenkari, M. Hukkanen, M. Korhonen**, Osteogenic differentiation of mesenchymal stromal cells in two-dimensional and three-dimensional cultures without animal serum, *Stem Cell Research & Therapy* 6(1) (2015).
- [195] **Y. Yamaguchi, J. Ohno, A. Sato, H. Kido, T. Fukushima**, Mesenchymal stem cell spheroids exhibit enhanced in-vitro and in-vivo osteoregenerative potential, *BMC biotechnology* 14(1) (2014) 105.

- [196] **E. Holm, J.S. Gleberzon, Y. Liao, E.S. Sørensen, F. Beier, G.K. Hunter,** H.A. Goldberg, Osteopontin mediates mineralization and not osteogenic cell development in vitro, *The Biochemical journal* 464(3) (2014) 355.
- [197] **R.A. Gittens, R. Olivares-Navarrete, T. McLachlan, Y. Cai, S.L. Hyzy, J.M. Schneider, Z. Schwartz, K.H. Sandhage, B.D. Boyan,** Differential responses of osteoblast lineage cells to nanotopographically-modified, microroughened titanium-aluminum-vanadium alloy surfaces, *Biomaterials* 33(35) (2012) 8986-8994.
- [198] **G. Bonuccelli, S. Avnet, G. Grisendi, M. Salerno, D. Granchi, M. Dominici, K. Kusuzaki, N. Baldini,** Role of mesenchymal stem cells in osteosarcoma and metabolic reprogramming of tumor cells, *Oncotarget* 5(17) (2014) 7575-7588.
- [199] **P. Shao, Y. Wei, C.R. Dass, G. Zhang, Z. Wu,** Systemic Delivery of Free Chitosan Accelerates Femur Fracture Healing in Rats, *Current drug targets* 19(5) (2018) 460.
- [200] **T. Ono, H. Takayanagi,** Osteoimmunology in Bone Fracture Healing, *Current Osteoporosis Reports* 15(4) (2017) 367-375.
- [201] **S. Ramineni, C. Fowler, P.D. Fisher, L. Cunningham, D. Puleo,** Effects of epidermal growth factor-loaded mucoadhesive films on wounded oral tissue rafts, *Biomed. Mater.* 10(1) (2015).
- [202] **Z.Z. Wu, Y. Tang, H.D. Fang, Z.C. Su, B. Xu, Y.L. Lin, P. Zhang, X. Wei,** Decellularized scaffolds containing hyaluronic acid and EGF for promoting the recovery of skin wounds, *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* 26(1) (2015) 10.
- [203] **S.L. Rogers, P.J. Gegick, S.M. Alexander, P.G. McGuire,** Transforming Growth-Factor-Beta Alters Differentiation In Cultures Of Avian Neural Crest-Derived Cells - Effects On Cell Morphology, Proliferation, Fibronectin Expression, And Melanogenesis, *Developmental Biology* 151(1) (1992) 192-203.
- [204] **D.L. Stulberg, N. Clark, D. Tovey,** Common hyperpigmentation disorders in adults: Part I. Diagnostic approach, cafe au lait macules, diffuse

hyperpigmentation, sun exposure, and phototoxic reactions, American Family Physician 68(10) (2003) 1955-1960.

- [205] **J.A. Buffey, A.G. Messenger, M. Taylor, A.T.T. Ashcroft, G.E. Westgate, S. Macneil**, Extracellular-Matrix Derived From Hair And Skin Fibroblasts Stimulates Human Skin Melanocyte Tyrosinase Activity, British Journal of Dermatology 131(6) (1994) 836-842.
- [206] **Y.C. Hung, V.M. Sava, V.A. Blagodarsky, M.Y. Hong, G.S. Huang**, Protection of tea melanin on hydrazine-induced liver injury, Life Sciences 72(9) (2003) 1061-1071.
- [207] **M.X. Lei, L.J. Schumacher, Y.C. Lai, W.T. Juan, C.Y. Yeh, P. Wu, T.X. Jiang, R.E. Baker, R.B. Widelitz, L. Yang, C.M. Chuong**, Self-organization process in newborn skin organoid formation inspires strategy to restore hair regeneration of adult cells, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 114(34) (2017) E7101-E7110.
- [208] **K. Kameyama, C. Sakai, S. Kuge, S. Nishiyama, Y. Tomita, S. Ito, K. Wakamatsu, V.J. Hearing**, The Expression Of Tyrosinase, Tyrosinase-Related Protein-1 And Protein-2 (Trp1 And Trp2), The Silver Protein, And A Melanogenic Inhibitor In Human-Melanoma Cells Of Differing Melanogenic Activities, Pigment Cell Research 8(2) (1995) 97-104.
- [209] **M. Ishihara, K. Nakanishi, K. Ono, M. Sato, M. Kikuchi, Y. Saito, H. Yura, T. Matsui, H. Hattori, M. Uenoyama, A. Kurita**, Photocrosslinkable chitosan as a dressing for wound occlusion and accelerator in healing process, Biomaterials 23(3) (2002) 833-840.
- [210] **W.J. Yun, S.H. Bang, K.H. Min, S.W. Kim, M.W. Lee, S.E. Chang**, Epidermal Growth Factor and Epidermal Growth Factor Signaling Attenuate Laser-Induced Melanogenesis, Dermatologic Surgery 39(12) (2013) 1903-1911.
- [211] **T.H. Chen, H.D. Embree, E.M. Brown, M.M. Taylor, G.F. Payne**, Enzyme-catalyzed gel formation of gelatin and chitosan: potential for in situ applications, Biomaterials 24(17) (2003) 2831-2841.

- [212] **A. Aljawish, I. Chevalot, J. Jasniewski, J. Scher, L. Muniglia**, Enzymatic synthesis of chitosan derivatives and their potential applications, *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 112 (2015) 25-39.
- [213] **H. Nagata, S. Takekoshi, R. Takeyama, T. Homma, R.Y. Osamura**, Quercetin enhances melanogenesis by increasing the activity and synthesis of tyrosinase in human melanoma cells and in normal human melanocytes, *Pigment Cell Research* 17(1) (2004) 66-73.
- [214] **E. Nishioka, Y. Funasaka, H. Kondoh, A.K. Chakraborty, Y. Mishima, M. Ichihashi**, Expression of tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 in ultraviolet-irradiated human melanomas and melanocytes: TRP-2 protects melanoma cells from ultraviolet B induced apoptosis, *Melanoma Research* 9(5) (1999) 433-443.
- [215] **A.M. Hilmi, A.S. Halim, H. Jaafar, A. Asiah, A. Hassan**, Chitosan Dermal Substitute and Chitosan Skin Substitute Contribute to Accelerated Full-Thickness Wound Healing in Irradiated Rats, *Biomed Research International* (2013) 13.
- [216] **F. Han, Y. Dong, Z. Su, R. Yin, A.H. Song, S.M. Li**, Preparation, characteristics and assessment of a novel gelatin-chitosan sponge scaffold as skin tissue engineering material, *International Journal of Pharmaceutics* 476(1-2) (2014) 124-133.
- [217] **A.N. Khodja, M. Mahlous, D. Tahtat, S. Benamer, S.L. Youcef, H. Chader, L. Mouhoub, M. Sedgelmaci, N. Ammi, M.B. Mansouri, S. Mameri**, Evaluation of healing activity of PVA/chitosan hydrogels on deep second degree burn: Pharmacological and toxicological tests, *Burns* 39(1) (2013) 98-104.
- [218] **X.L. Chen, X.M. Cao, H. Jiang, X.X. Che, X.Y. Xu, B.C. Ma, J. Zhang, T. Huang**, SIKVAV-Modified Chitosan Hydrogel as a Skin Substitutes for Wound Closure in Mice, *Molecules* 23(10) (2018) 12.
- [219] **L. Xia, Y. Xie, B. Fang, X. Wang, K. Lin**, In situ modulation of crystallinity and nano-structures to enhance the stability and osseointegration of hydroxyapatite coatings on Ti-6Al-4V implants, *Chemical Engineering Journal* 347 (2018) 711-720.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Sevde Altuntaş
Uyruğu : T. C.
Doğum Tarihi ve Yeri : 09.06.1988 Ankara/Keçiören
E-posta : saltuntas@bwh.harvard.edu

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2010, Gazi Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Fen Bilgisi Öğretmenliği
- **Yüksek lisans** : 2013, TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi, Mikro ve Nanoteknoloji Anabilim Dalı

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

| Yıl | Kurum | Ödül |
|------|---------|----------------------|
| 2017 | TUBITAK | 2214-A Burs Programı |

YABANCI DİL: İngilizce

TEZDEN TÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR:

- **Altuntas, S., Dhaliwal H., Buyukserin, F., Amiji, M., 2018.** Wound Healing and Melanogenesis Potential of EGF Loaded Nano-Pillared Chitosan Films in 2D *co-culture* System and Excisional Wound Models, Adv. Health. Mater., Manuscript Preparation.
- **Altuntas, S., Dhaliwal H., Bassous, N., Alpaslan, P., Radwan, A., Webster, T., Amiji, M., Buyukserin, F. 2018.,** Nanopillared Chitosan-Gelatin Films: An Implant Coating Model for Improved Osteogenesis, Nanoscale, Submitted.

- **Altuntas, S.**, Buyukserin, F., 2018. Fabrication of Thioflavin-T-Modified Nanopillared SERS Substrates for Ultrasensitive Beta-Amyloid Peptide Detection, Journal of Raman Spectroscopy
- **Altuntas, S.**, Buyukserin, F., Haider, A., Altinok, B., Aslim, B., Biyikli, N., 2016. Protein-Releasing Conductive Anodized Alumina Membranes for Nerve-Interface Materials, Mater Sci and Eng C
- **Altuntas, S.**, Hamamcıoğlu, B., Aslım, B., Biyikli, N., Buyukserin, F. Investigation Of Anodic Alumina-Based Biomaterials For Improved Nerve-Material Interaction, NanoEngineering for Medicine and Biology Conference, Houston, USA, 2016.
- **Altuntas, S.**, Buyukserin, F. Investigation Of The Use Of Ordered Nano-patterned Polycarbonate Films For Detecting Alzheimer`s Protein, NanoEngineering for Medicine and Biology Conference, Houston, USA, 2016.
- Alparslan, P., **Altuntas, S.**, Buyukserin, F. Fabrication and Cellular Investigation of Biomimetic Collagen-Gelatin Nanopillar Films, MRS, Boston, USA, 2017. Control ID: BM04.04.08
- **Altuntas, S.**, Buyukserin, F. An Optical Biosensor Application: Investigation of Amyloid β 1-42 and Thioflavin T Interaction on Nano-designed Polymer Surfaces, The International 22nd Biomedical Science and Technology Symposium, Ankara, TR, 2017.
- **Altuntas, S.**, Pervane, C.S., Buyukserin, F. Detection of Alzheimer`s Protein on Polycarbonate Nanopillared Films by Using Surface Enhanced Raman Spectroscopy, 3rd International Congress on BIOSENSORS, Ankara, TR, 2016.
- **Altuntas, S.**, Hamamcıoğlu, B., Aslım, B., Biyikli, N., Buyukserin, F. Conductive and Protein Releasing Nanoporous Membranes for Controlled Neuron Behavior, 25th International Materials Research Congress, Cancun, MX, 2016.
- **Altuntas, S.**, Pervane, C.S., Buyukserin, F. Detection of Alzheimer`s Protein on Polycarbonate Nanopillared Films by Using Surface Enhanced Raman Spectroscopy, 46th IUPAC World Polymer Congress, İstanbul, TR, 2016.
- **Altuntas, S.**, Buyukserin, F. Sıralı Nanomotifli Polikarbonat Yüzeylerin Alzheimer Proteinin Tespitinde Kullanımının Araştırılması, ASELSAN 1. Sağlık Çalıştayı, Ankara, TR, 2015.

- **Altuntas, S.**, Hamamcıoğlu, B., Aslım, B., Buyukserin, F. Influence of Topographic and Electrical Cues on the Nerve-Like Cell Development on Anodic Alumina Membrane Substrates, 21st International Biomedical Science and Technology Symposium, Antalya, TR, 2015.
- **Altuntas, S.**, Buyukserin, F. A Comparison Study: Behavior of Neuron-like Cells on Naked and Conductive Anodic Alumina Membranes, European Biotechnology Congress, Bucharest, RO, 2015.
- **Altuntas, S.**, Altınok, B., Aslım, B., Buyukserin, F. Fabrication and Characterization of Carbon Nanotube Membranes for Neural Tissue Engineering, European Biomaterials Society Conference, Liverpool, UK, 2014.
- **Altuntas, S.**, Altınok, B., Aslım, B., Buyukserin, F. Fabrication of Conductive Alumina Membranes as a Biomaterial for Neural Tissue Engineering, MRS, San Francisco, USA, 2014.
- **Altuntas, S.**, Altınok, B., Aslım, B., Buyukserin, F. Improved Neural Behavior on Nanoporous Alumina-Based Biomaterials, 30th European Conference on Surface Science, Antalya, TR, 2014.
- **Altuntas, S.**, Altınok, B., Aslım, B., Buyukserin, F. The Proliferation of Neurons on Nanoporous Alumina-Based Biomaterials, NANOTR-10, İstanbul, TR, 2014.
- **Altuntas, S.**, Buyukserin, F. Fabrication and Characterization of Carbon Nanotube Membranes For Neural Tissue Engineering, Porous and Powder Materials, İzmir, TR, 2013.
- **Altuntas, S.**, Yegenoglu, H., Aslım, B., Buyukserin, F. Silica Nanotesttubes: A Novel Platform For Multifunctional Delivery, Porous and Powder Materials İzmir, TR, 2013.
- **Altuntas, S.**, Buyukserin, F. Fabrication of Carbon Nanotube Membranes from Anodized Alumina Films for Neural Tissue Engineering, NANOTR-9, Erzurum, TR, 2013.

DİĞER YAYINLAR, SUNUMLAR:

- Celik, M., **Altuntas, S.**, Buyukserin, F. Fabrication of Nanocrater-decorated Anodic Aluminum Oxide Membranes as Substrates for Reproducibly Enhanced SERS Signals, Sensors and Actuators B: Chemical, 2017.

- Daglar, B., B. Demirel, G., Khudiyev, T., Dogan, T., Tobail, O., **Altuntas, S.**, Buyukserin, F., Bayindir, M. Anemone-like nanostructures for non-lithographic, reproducible, large-area, and ultra-sensitive SERS substrates, *Nanoscale*, 2014.
- Buyukserin, F., **Altuntas, S.**, Aslim, B. Fabrication and modification of composite silica nano test tubes for targeted drug delivery, *RSC Adv.*, 2014.
- **Altuntas, S.**, Buyukserin, F. Fabrication and Characterization of Conductive Anodic Aluminum Oxide Substrates, *Applied Surface Science*, 2014.
- **Altuntas, S.**, Buyukserin, F. Development of Ultra-Thin Nanoporous Metal-Insulator-Metal SERS Substrates for Recognizing Tumor Cells, MRS, Boston, USA, 2017. Control ID: 2800093
- Celik, M., **Altuntas, S.**, Buyukserin, F. Investigation of the Use of Nanocrater-decorated Anodic Aluminum Oxide Membranes as Substrates for Reproducibly Enhanced SERS Signals, MRS, Boston, USA, 2017. Control ID: NM06.13.04/NM7.14.04
- Celik, M., **Altuntas, S.**, Buyukserin, F. Investigation of the Use of Nanocrater-decorated Anodic Aluminum Oxide Membranes as Substrates for Reproducibly Enhanced SERS Signals, International Conference on Nanomedicine and Nanobiotechnology, Barcelona, ES, 2017.
- Alparslan, P., **Altuntas, S.**, Buyukserin, F. Fabrication and Cellular Investigation of Biomimetic Collagen-Gelatin Nanopillar Films, International Conference on Nanomedicine and Nanobiotechnology, Barcelona, ES, 2017.
- Deminskyi, P., Haider, A., Eren, H., **Altuntas, S.**, Elmabruke, K., Yilmaz, Y., Yilmaz, M., Buyukserin, F., Biyikli, N. Low-Temperature Conformal Growth of Ordered III-Nitride and Metal-Oxide Hollow Nanocylinder Arrays for Optoelectronics and Photocatalysis, MRS, Boston, USA, 2016. Control ID: NM1.8.22
- Haider, A., Deminskyi, P., Khan, T. M., Eren, H, Yilmaz, M., **Altuntas, S.**, Buyukserin, F., Biyikli, N. Area-Selective Atomic Layer Deposition Using Inductively Coupled Plasma Polymerized C₄F₈ Layer—A Case Study for Metal-Oxides MRS, Boston, USA, 2016. Control ID: PM3.7.07
- Celik, M., **Altuntas, S.**, Buyukserin, F. Investigation of The Use of Periodic Nanobump Structures for Detecting Myoglobin Protein, 3rd International Congress on BIOSENSORS, Ankara, TR, 2016.

- Celik, M., **Altuntas, S.**, Buyukserin, F. Investigation of The Use of Periodic Nanobump Structures for Detecting Alzheimers Disease, 25th International Materials Research Congress, Cancun, MX, 2016.
- Alparslan, P., **Altuntas, S.**, Buyukserin, F. A Comparison of Different Shape Silica Nanoparticles, European Biotechnology Congress, Bucharest, RO, 2015.
- Uyar, T., Erdamar, A., Aksahin, M.F., Erogul, O., **Altuntas, S.**, Buyukserin, F. Detection of PC12 Cell Line Proliferation on AAO Membranes Using Image Processing Techniques, European Biotechnology Congress, Bucharest, RO, 2015.
- Kaleli, G., **Altuntas, S.**, Buyukserin, F., Mutlu, M. Generation of amphoteric surfaces via glow-discharge technique with single precursor on Polycarbonate Nanorod Arrays for Biomedical Applications, IMEPS 2014, Antalya, TR, 2014.
- **Altuntas, S.**, Kabay, G., Buyukserin, F., Mutlu, M. Investigation of Low-Pressure Low-Frequency Oxygen Plasma on Chemical/Physical Properties of Polycarbonate Nanorod Arrays, IMEPS 2014, Antalya, TR, 2014.
- Dincel, O., **Altuntas, S.**, Buyukserin, F., Mutlu, M. Amination of Polycarbonate Nanorod Array Surfaces by Low-Pressure Low-Frequency Plasma Treatment, IMEPS 2014, Antalya, TR, 2014.
- **Altuntas, S.**, Yegenoglu, H., Aslim, B., Buyukserin, F. Composite Silica Nanotubes for Targeted Cell Death, NANOTR-9, Erzurum, TR, 2013.
- **Altuntas, S.**, Buyukserin, F. Selective plasma damage for obtaining free one dimensional nanoparticles, 2nd Workshop On Physics Based Modelling Of Material Properties & Experimental Observations Antalya, TR, 2013.
- **Altuntas, S.**, Buyukserin, F. Use of silica nano test tubes as a multifunctional platform for targeted delivery, 10th Chemical Physics Congress Ankara, TR, 2012.

PATENT:

- **Altuntas, S.**, Buyukserin, F. Large Scale Fabrication of Free-Standing Anodic Aluminum Oxide Membranes with Ordered Nanopores, Turkish Patent Institute, Patent Application #2014/00005, 2014, Submitted (at last examine stage).