2005-255

TÜBİTAK

TÜRKİYE BİLİMSEL VE TEKNOLOJİK ARAŞTIRMA KURUMU

THE SCIENTIFIC AND TECHNOLOGICAL RESEARCH COUNCIL OF TURKEY

NANOTEKNOLOJİK YÖNTEMLERLE NEO-ORGAN ÜRETİMİNE YÖNELİK MİKRO DESENLİ POLİMERİK YÜZEY TASARLANMASI VE BUNLARIN KEMİK HÜCRELERİNİN ÇOĞALMA, FARKLILAŞMA VE YÖNLENMESİNE ETKİSİNİNİN İNCELENMESİ

72419

PROJE NO : TBAG-2288 (103T056)

Temel Bilimer Araştırma Grubu

Basic Sciences Research Grant Committee

NANOTEKNOLOJİK YÖNTEMLERLE NEO-ORGAN ÜRETİMİNE YÖNELİK MİKRO DESENLİ POLİMERİK YÜZEY TASARLANMASI VE BUNLARIN KEMİK HÜCRELERİNİN ÇOĞALMA, FARKLILAŞMA VE YÖNLENMESİNE ETKİSİNİNİN İNCELENMESİ

72419

PROJE NO : TBAG-2288 (103T056)

Prof. Dr. VASIF HASIRCI
Prof. Dr. ATİLLA AYDINLI
Yrd. Doç. Dr. AYŞEN TEZCANER
Dr. İSA KIYAT
HALİME KENAR

Ağustos 2005

ÖNSÖZ

Projemiz "Nanoteknolojik Yöntemlerle Neo-Organ Üretimine Yönelik Mikro Desenli Polimerik Yüzey Tasarlanması Ve Bunların Kemik Hücrelerinin Çoğalma, Farklılaşma Ve Yönlenmesine Etkisinin İncelenmesi" Proje No: TBAG-2288, ODTÜ ve Bilkent Üniversitelerinin ortaklaşa yürüttüğü bir Biyomateryaller, doku mühendisliği, nano-ve mikroteknoloji araştırması olup TÜBİTAK Temel Bilimler Araştırma Grubunca 2 yıl süreyle desteklenmiştir.

İçindekiler

Özet 9
Giriş 10
Genel Bilgiler 10
Gereç ve yöntem 19
I. Mikrodesenli şablonların hazırlanması 19
I-A. Fotomaskelerin tasarlanması ve üretimi 19
I-B. Şablonların mikroişleme yöntemleriyle üretilmesi 20
II. Mikrodesenli ve desensiz polimerik sübstratların hazırlanması 21
II–A. Çözücü uçurma yöntemiyle PHBV filmlerin hazırlanması 21
II –B. Fotopolimerizasyon yöntemiyle poli(HEMA) jellerinin hazırlanması 22
II-C. Fotopolimerizasyon yöntemiyle PHBV8/PHEMA IPN yapılarının hazırlanması 22
III. Fibrinojenin mikrodesenli ve desensiz yüzeylere bağlanması 22
III-A. Polimerik yüzeylere bağlanacak fibrinojenin FITC ile İşaretlenmesi 22
III-B. Fibrinojenin mikrodesenli ve desensiz yüzeylere kovalent olarak bağlanması 23
III-C. Fibrinojenin mikrodesenli ve desensiz yüzeylere adzorpsiyon yöntemiyle bağlanması 23
IV. Alkalen fosfataz (ALP) enziminin mikrodesenli ve desensiz yüzeylere kovalent olarak bağlanması ve karakterizasyonu 23
IV-A. ALP enziminin kovalent olarak mikrodesenli ve desensiz polimerik yüzeylere bağlanması 23
IV-B. İndirekt immün boyama ile bağlanan ALP enzimlerinin incelenmesi 24
IV-C. Mikrokanallar ve kuyucuklar içinde ve düz yüzeye bağlanmış ALP enziminin Ca-P kristalleri oluşturmasının sağlanması 24
V. Fibrinojenin Desensiz PHBV8, PHEMA ve PHBV/PHEMA IPN Film Yüzeyine Mikrokontak Damgalama Yöntemi ile Transferi 24
V-A. Silikon PDMS Damganın Hazırlanması 24
V-B. FITC-Dekstran'ın ve Fibrinojen'in mikrokontak damgalama yöntemi ile polimerik yüzeylere transferi 25
VI. In vitro Çalışmalar 25
VI-A. Sıçan kemik iliği hücrelerinin izolasyonu 25
VI-B. Filmlere hücre ekimi 25
VI-C. Hücrelerin yöneliminin belirlenmesi 26
VI-D. Film yüzeyinde hücreler tarafından salgılanan kollajen tip I ve Osteokalsin'in indirekt immün boyama ile işaretlenmesi 26
VI-E. Film Üzerindeki Hücre Çoğalmasının Tayini 26
VI-F. Alkalen Fosfataz Testi 27

Bulgular ve tartışma/sonuç 27
Bulgular 27
I. Şablon üretimi 27
II. Mikrokontak damga ve polimerik film üretimi: 28
III. Polimerik yüzeylere bağlanacak fibrinojenin FITC ile İşaretlenmesi 29
IV. Fibrinojenin mikrodesenli ve desensiz polimerik yapıların yüzeyine kovalent olarak ve adsorpsiyon yöntemiyle bağlanması 30
V. Alkalen fosfataz (ALP) enziminin mikrodesenli ve desensiz yüzeylere kovalent olarak bağlanması ve karakterizasyonu 31
V-a) İndirekt immün boyama ile bağlanan ALP enzimlerinin incelenmesi 31
V-b) Mikrokanallar ve kuyucuklar içinde bağlanmış ALP enziminin aktivitesinin incelenmesi 32
VI. FITC-Dekstran'ın mikrokontak damgalama yöntemi ile polimerik yüzeylere transferi: Fibrinojen transferinin olabilirliğinin incelenmesi 33
VII. In vitro Çalışmalar 35
VII-a) Hücrelerin yöneliminin belirlenmesi 36
VII-b) Osteoblast hücrelerinin PHBV8, PHEMA ve PHBV8/PHEMA IPN yapılar üzerindeki organizasyonunun ve mikrodesenler üzerindeki yönelimlerinin taramalı elektron mikroskobu ile incelenmesi 38
VII-c) Mikrokontak damgalama yöntemiyle PHBV, PHEMA ve PHBV8/PHEMA IPN yapılar üzerine paralel şeritler halinde transfer edilen fibrinojenin hücre yönelimi üzerindeki etkisi 41
VII-d) Film yüzeyinde hücreler tarafından salgılanan kollajen tip I'in indirekt immün boyama ile işaretlenmesi 43
VII-e) Film yüzeyinde hücreler tarafından salgılanan Osteokalsin'in indirekt immün boyama ile işaretlenmesi 45
VII-f) Film Üzerindeki Hücre Çoğalmasının Tayini 46
VII-g) Alkalen Fosfataz Testi 55
Tartışma/Sonuç 70
Kaynaklar 71

Tablo listesi

Tablo 1: Üç Boyutta Mikro Desenleme ile elde edilen yüzeylerde hücre kültürü çalışmaları **13-16**

Tablo 2: İki Boyutta Mikro Desenleme ile elde edilen yüzeylerde hücre kültürü çalışmaları **17-18**

Tablo 3. Tasarlanan şablonların ölçüleri. **20**

Tablo 4. Silikon şablonların mikrodesen boyutları (μm) **28**

Tablo 5. Farklı PHBV örnekler üzerindeki sapma açıları **36**

Şekil listesi

Şekil 1. Şablonda yer alan yapıların kesitten görüntüsü **19**

Şekil 2. Şablonların fotomaske üzerinde dağılımı **19**

Şekil 3. Mikroişleme yöntemiyle şablon üretim aşamaları **21**

Şekil 4. Mikrodesenli silikon şablonların stereozoom mikroskobu ile alınan görüntüleri. **28**

Şekil 5. Mikrodesenli filmlerin ışık mikroskobu ile elde edilen görüntüleri. **29**

Şekil 6. FITC-fibrinojen ve bağlanmamış FITC'nin spektroflorometrik olarak elde edilen kromatogramı. **30**

Şekil 7. G-25 kolonundan elüsyonu yapılan tüplerdeki protein miktarlarının incelenmesi için 280 nm dalga boyunda ölçülen abzorbans değerleri **30**

Şekil 8. Epiklorohidrin ile a) PHBV8 film, b) PHEMA, c) PHBV8 / PHEMA IPN film yüzeylerine bağlanmış FITC-fibrinojenin floresan mikroskop görüntüleri **31**

Şekil 9. B3 şablonu ile hazırlanmış mikrodesenli a) PHBV8 film, b) PHEMA, ve c) PHBV8/PHEMA film yüzeylerine adsorpsiyon yöntemiyle bağlanmış FITC-fibrinojenin floresan mikroskobu görüntüleri **31**

Şekil 10. Kovalent olarak mikrodesenli a) PHBV8 film (A3), b) PHBV8 film (D1, kuyucuklu), c) PHEMA, d) PHBV8/PHEMA IPN (B3), ve e) desensiz PHBV8/PHEMA IPN filmlerin yüzeyine bağlanmış ALP enziminin indirekt immün boyama floresan mikroskopi görüntüleri **32**

Şekil 11. Mikrodesenli PHBV8 filmlere kovalent olarak bağlanmış ALP enzimlerinin 90 sa Ca-organik fosfat kaynağı varlığında 37°C'de inkübasyonu sonucunda film yüzeyinde oluşturdukları Ca-P kristallerinin taramalı elektron mikroskobu görüntüleri **33**

Şekil 12. Yüzeyine FITC-Dekstran adzorplanmış PDMS damganın floresan mikroskopi görüntüsü **34**

Şekil 13. Mikrokontak damgalama yöntemi ile transfer edilmiş FITC-Dekstranın a) PHBV8 film ve b) PHBV8/PHEMA IPN film yüzeylerine transfer edildikten sonra elde edilmiş floresan mikroskobu görüntüleri **34**

Şekil 14. Saos-2 ve sıçan kemik iliği hücrelerinin farklılaştırılması ile elde edilmiş kemik hücrelerinin (osteoblast) yüzeyine Fb adzorplanmış A3 PHBV8 filmi üzerinde 7 günlük inkübasyon sonunda Acridine Orange boyaması ile elde edilen floresan mikroskop görüntüleri **35**

Şekil 15. Acridine Orange ile boyanmış osteoblast hücrelerinin yüzeyine Fb adzorplanmış ve kovalent tutuklanmış filmler üzerindeki morfolojileri **37**

Şekil 16. Osteoblast hücrelerinin kimyasal modifikasyona uğramamış (işlenmemiş) ve yüzeyine B adzorplanmış PHBV8 filmler üzerinde 4 günlük inkübasyonu sonunda elde taramalı elektron mikroskobu görüntüleri **38**

Tablo listesi

Tablo 1: Üç Boyutta Mikro Desenleme ile elde edilen yüzeylerde hücre kültürü çalışmaları **13-16**
Tablo 2: İki Boyutta Mikro Desenleme ile elde edilen yüzeylerde hücre kültürü çalışmaları **17-18**
Tablo 3. Tasarlanan şablonların ölçüleri. **20**
Tablo 4. Silikon şablonların mikrodesen boyutları (μm) **28**
Tablo 5. Farklı PHBV örnekler üzerindeki sapma açıları **36**

Şekil listesi

Şekil 1. Şablonda yer alan yapıların kesitten görüntüsü **19**
Şekil 2. Şablonların fotomaske üzerinde dağılımı **19**
Şekil 3. Mikroişleme yöntemiyle şablon üretim aşamaları **21**
Şekil 4. Mikrodesenli silikon şablonların stereozoom mikroskobu ile alınan görüntüleri. **28**
Şekil 5. Mikrodesenli filmlerin ışık mikroskobu ile elde edilen görüntüleri. **29**
Şekil 6. FITC-fibrinojen ve bağlanmamış FITC'nin spektroflorometrik olarak elde edilen kromatogramı. **30**
Şekil 7. G-25 kolonundan elüsyonu yapılan tüplerdeki protein miktarlarının incelenmesi için 280 nm dalga boyunda ölçülen abzorbans değerleri **30**
Şekil 8. Epiklorohidrin ile a) PHBV8 film, b) PHEMA, c) PHBV8 / PHEMA IPN film yüzeylerine bağlanmış FITC-fibrinojenin floresan mikroskop görüntüleri **31**
Şekil 9. B3 şablonu ile hazırlanmış mikrodesenli a) PHBV8 film, b) PHEMA, ve c) PHBV8/PHEMA film yüzeylerine adsorpsiyon yöntemiyle bağlanmış FITC-fibrinojenin floresan mikroskobu görüntüleri **31**
Şekil 10. Kovalent olarak mikrodesenli a) PHBV8 film (A3), b) PHBV8 film (D1, kuyucuklu), c) PHEMA, d) PHBV8/PHEMA IPN (B3), ve e) desensiz PHBV8/PHEMA IPN filmlerin yüzeyine bağlanmış ALP enziminin indirekt immün boyama floresan mikroskopi görüntüleri **32**
Şekil 11. Mikrodesenli PHBV8 filmlere kovalent olarak bağlanmış ALP enzimlerinin 90 sa Ca-organik fosfat kaynağı varlığında 37°C'de inkübasyonu sonucunda film yüzeyinde oluşturdukları Ca-P kristallerinin taramalı elektron mikroskobu görüntüleri **33**
Şekil 12. Yüzeyine FITC-Dekstran adzorplanmış PDMS damganın floresan mikroskopi görüntüsü **34**
Şekil 13. Mikrokontak damgalama yöntemi ile transfer edilmiş FITC-Dekstranın a) PHBV8 film ve b) PHBV8/PHEMA IPN film yüzeylerine transfer edildikten sonra elde edilmiş floresan mikroskobu görüntüleri **34**
Şekil 14. Saos-2 ve sıçan kemik iliği hücrelerinin farklılaştırılması ile elde edilmiş kemik hücrelerinin (osteoblast) yüzeyine Fb adzorplanmış A3 PHBV8 filmi üzerinde 7 günlük inkübasyon sonunda Acridine Orange boyaması ile elde edilen floresan mikroskop görüntüleri **35**
Şekil 15. Acridine Orange ile boyanmış osteoblast hücrelerinin yüzeyine Fb adzorplanmış ve kovalent tutuklanmış filmler üzerindeki morfolojileri **37**
Şekil 16. Osteoblast hücrelerinin kimyasal modifikasyona uğramamış (işlenmemiş) ve yüzeyine B adzorplanmış PHBV8 filmler üzerinde 4 günlük inkübasyonu sonunda elde taramalı elektron mikroskobu görüntüleri **38**

Şekil 17. Osteoblast hücrelerinin yüzeyine kovalent olarak ALP tutuklanmış ve bu enzim sayesinde yüzeyinde Ca-P kristalleri biriktirilmiş PHBV8 filmler üzerinde 4 günlük inkübasyonu sonunda elde edilen taramalı elektron mikroskobu görüntüleri 39

Şekil 18. Osteoblast hücrelerinin kimyasal modifikasyona uğramamış (işlenmemiş) ve yüzeyine Fb adzorplanmış PHEMA filmler üzerinde 4 günlük inkübasyonu sonunda elde edilen taramalı elektron mikroskobu görüntüleri 40

Şekil 19. Osteoblast hücrelerinin kimyasal modifikasyona uğramamış (işlenmemiş) (a) ve yüzeyine Fb adzorplanmış (b, c, d) PHBV8/PHEMA IPN filmler üzerinde 4 günlük inkübasyonu sonunda elde edilen taramalı elektron mikroskobu görüntüleri 41

Şekil 20. Osteoblast hücrelerinin mikrokontak damgalama yöntemiyle yüzeyine paralel şeritler halinde fibrinojen transfer edilmiş filmler üzerindeki yönelimi 42

Şekil 21. Fb adzorplanmış PHBV film ve TCPS yüzeyinde hücreler tarafından salgılanan kollajen tip I'in indirekt immün boyama ile işaretlenmesi sonucu elde edilen floresan mikroskop görüntüleri 43

Şekil 22. ALP tutuklanmış ve yüzeyinde bu enzimin Ca-P kristalleri oluşturduğu PHBV film ve işlenmemiş TCPS yüzeyinde hücreler tarafından salgılanan kollajen tip I'in indirekt immün boyama ile işaretlenmesi sonucu elde edilen floresan mikroskop görüntüleri 44

Şekil 23. ALP tutuklanmış ve yüzeyinde bu enzimin Ca-P kristalleri oluşturduğu PHBV film ve işlenmemiş TCPS yüzeyinde hücreler tarafından salgılanan osteokalsin'in indirekt immün boyama ile işaretlenmesi sonucu elde edilen floresan mikroskop görüntüleri 45

Şekil 24. PHBV8 Filmler ve TCPS üzerindeki iki haftada hücre çoğalması 46

Şekil 25. PHBV8 filmler ve TCPS üzerindeki tutunan hücre sayısı (1 gün) ve hücre çoğalması (2 hafta) 48

Şekil 26. IPN ve PHEMA Filmler ve TCPS üzerindeki tutunan hücre sayısı (1 gün) ve hücre çoğalması (2 hafta). 49

Şekil 27. Yüzeyine şeritler halinde mikrokontak damgalama (MKD) yöntemiyle Fb adzorplanmış düz PHBV8, IPN ve PHEMA filmler ve TCPS üzerindeki hücre çoğalması (2 hafta) 50

Şekil 28. İşlenmemiş ve yüzeyi kimyasal olarak modifiye edilmiş PHBV8 ve işlenmemiş ve yüzeyine Fb adzorplanmış PHBV8, IPN ve PHEMA filmler üzerindeki, karşılaştırma amaçlı TCPS'e göre normalize edilmiş hücre tutunma verileri (1 gün) 51

Şekil 29. İşlenmemiş ve yüzeyi kimyasal olarak modifiye edilmiş PHBV8 ve işlenmemiş ve yüzeyine Fb adzorplanmış PHBV8, IPN ve PHEMA filmler üzerindeki, karşılaştırma amaçlı TCPS'e göre normalize edilmiş hücre çoğalma verileri (2 hafta) 53

Şekil 30. Yüzeyine hücre ekilmiş tüm PHBV8, IPN ve PHEMA film çeşitleri üzerindeki normalize hücre çoğalma verileri (2 hafta) 54

Şekil 31. PHBV8 filmler ve TCPS üzerindeki örnek başına düşen iki haftalık ALP aktivitesi 55

Şekil 32. PHBV filmler ve TCPS üzerindeki hücre başına düşen iki haftalık ALP aktivitesi 56

Şekil 33. PHBV8 filmler ve TCPS üzerindeki 2 haftalık örnek başına düşen ALP aktivitesi 57

Şekil 34. IPN ve PHEMA filmler ve TCPS üzerindeki 2 haftalık örnek başına düşen ALP aktivitesi 58-59

Şekil 35. Yüzeyine şeritler halinde mikrokontak damgalama yöntemiyle Fb adzorplanmış PHBV8, IPN e PHEMA Filmler ve TCPS üzerindeki örnek başına düşen ALP aktivitesi (2 hafta) 59

Şekil 36. İşlenmemiş ve yüzeyi kimyasal olarak modifiye edilmiş PHBV ve işlenmemiş ve yüzeyine Fb adzorplanmış PHBV, IPN ve PHEMA filmler üzerindeki, karşılaştırma amaçlı TCPS'e göre normalize edilmiş örnek başına düşen ALP aktivitesi verileri (2 hafta) 60

Şekil 37. Yüzeyine hücre ekilmiş tüm PHBV8, IPN ve PHEMA film çeşitleri üzerindeki normalize örnek başına düşen ALP aktivitesi verileri **62**

Şekil 38. PHBV8 filmler ve TCPS üzerindeki 2 haftalık hücre başına düşen ALP aktivitesi **64**

Şekil 39. IPN ve PHEMA filmler ve TCPS üzerindeki 2 haftalık hücre başına düşen ALP aktivitesi **65**

Şekil 40. Yüzeyine şeritler halinde mikrokontak damgalama yöntemiyle Fb adzorplanmış PHBV8, IPN e PHEMA filmler ve TCPS üzerindeki hücre başına düşen ALP aktivitesi (2 hafta) **66**

Şekil 41. İşlenmemiş ve yüzeyi kimyasal olarak modifiye edilmiş PHBV8 ve işlenmiş ve yüzeyine Fb adzorplanmış PHBV8, IPN ve PHEMA filmler üzerindeki, karşılaştırma amaçlı TCPS'e göre normalize edilmiş hücre başına düşen ALP aktivitesi verileri (2 hafta) **67**

Şekil 42. Yüzeyine hücre ekilmiş tüm PHBV8, IPN ve PHEMA film çeşitleri üzerindeki normalize hücre başına düşen ALP spesifik aktivitesi verileri (2 hafta) **69**

Özet

Proje silisyum temelli litografik yöntemle hazırlanmış çeşitli boyutlu şablonların üzerinde polimerik filmler hazırlanması ve bu filmler üzerine sıçan kemik iliği kökenli kök hücreler ekerek hücre yönlendirmesine yüzey kimya ve topografyasının etkisini incelemeyi ve böylelikle biyomateryaller konusunda temel bilgi üretilmesini amaçlamaktaydı.

Film malzemesi olarak poli(3-hidkroksibütirat-ko-3-hidroksivalerat) (PHBV), poli(hidroksietilmetakrilat) (PHEMA) ve bunların interpenetre karışımları (IPN) kullanılmıştır. 16 değişik desen tasarlanmış ve bunların belli bir kısmı çalışmamızda kullanılmıştır. Polimerik yüzeylere hücre yapışmasını kolaylaştırmak amacıyla fibrinojen adsorpsiyonla, kovalent bağla ve kontak damgalama yöntemiyle polimer yüzeylerine tutturulmuştur. Alkalen fosfataz enzimi de (ALP) kovalent olarak yüzeylere immobilize edilmiş ve kalsiyum fosfat depozisyonunu artırarak hücre bağlanmasını kolaylaştırması beklenmiştir. Sprague-Dawley tipi sıçanların arka bacak kemik iliğinden elde edilen kök hücreleri in vitro ortamda büyütülmüş ve osteoblasta dönüştürülmüştürr. Hücrelerin desenler boyunca yönelimi floresan ve S.E.M (tarama elektron) mikroskopisiyle, çoğalmaları ve başkalaşımları da hücre sayıları belirlenerek, ALP miktarı ölçülerek, kollajen tip I ve osteokalsin üretimleri immün boyamayla incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler
Fotolitografi, biyomateryal, doku mühendisliği, osteoblast, başkalaşım (diferansiyasyon)

Giriş

Bu çalışmada nanoteknolojik teknikler kullanılarak neo-organ üretimine uygun polimerik yüzeyler hazırlanması ve malzeme-hücre etkileşimine etki eden parametrelerin incelenmesi planlanmıştır. Bu amaçla PHBV, poli(HEMA) ve PHBV/poli(HEMA) mikrodesenli sübstratlar üzerinde mikrokanallar ve mikrokuyular oluşturulmuş, bunların içine alkalen fosfataz ve fibrinojen proteinleri kimyasal olarak tutuklanmış ya da adsorpsiyonu sağlanmıştır. Bu malzemeler üzerinde çoğalıp farklılaşma gösterebilen, kanallar doğrultusunda yönlendirilmiş kemik hücreleri elde edilmiştir. Ayrıca bu projede, fibrinojen mikrokontak baskı yöntemi ile kimyasal ipucu işlevi görmek amacıyla hazırlanan sübstratlar üzerinde paralel şeritler halinde transfer edilmiş ve bunun kemik hücreleri üzerindeki etkisi incelenmiştir.

Genel Bilgiler

Doku mühendisliği, hastalık ya da travma sonucu kaybedilen dokuların yerini alabilecek ve bu doğal dokuların işlevini koruyabilecek ve geliştirebilecek biyolojik yapay doku tasarımını temel amaç edinmiş bir bilim dalıdır. Genel yaklaşım olarak biyolojik yapay dokunun oluşturulmasında canlı hücreler ve bu hücrelerin tutunabileceği ve üzerinde çoğalabileceği doğal ya da yapay biyobozunur polimerik yüzeyler kullanılır. Hücreleri çevreleyen ortamın hücre morfolojisine, hücre iskeleti organizasyonuna ve doğal hücre fonksiyonunun korunmasına büyük etkisi vardır. Doku mühendisliğinde gerçekleştirilmesi gereken hedeflerden biri, doğal dokunun sahip olduğu karmaşık yapı ve organizasyonun yapay dokularda da oluşturulabilmesidir [DESAI, 2000]. Mikro- ve nanoteknoloji, karmaşık doğal doku yapısının ve vücut içi koşullarının oluşturulması açısından büyük bir potansiyele sahiptir. İyi tasarlanmış ve önceden belirlenebilen bir mikroyapıya sahip doğal ya da yapay polimerik yüzeyler hücre morfolojisinin, farklılaşmasının ve fonksiyonunun uzun süre korunmasını sağlayabilirler [DESAI, 2000]. Buna ek olarak, bazı durumlarda, örneğin kopmuş periferal sinir uçlarının birleştirilmesi ve üç boyutlu biyolojik yapay dokulara damar ağı oluşturulmasında, hücre yönlendirilmesi büyük önem taşımaktadır. Hücre yönlendirilmesini sağlamanın bir yolu da hücrelerin seçici olarak tutunacağı protein ile kaplanmış mikrodesenli yüzeyler ve/ya da mikrotopografik (mikrokanallı) yapıya sahip yüzeyler kullanmaktır. Bu yapıların oluşturulmasında da fotolitografiyi içeren mikrofabrikasyon yöntemleri kullanılmaktadır.

Fotolitografi mikroelektronik endüstrisinde oldukça geniş bir kullanım alanına sahiptir. Fotolitografide temel olarak silikon pul (wafer) üzerine fotorezist kaplanır ve istenilen deseni üzerinde barındıran fotomaske yardımıyla, fotorezist UV'ye tutulur. UV'nin ulaştığı fotorezist yüzeylerde elde edilen çözünürlük, fotorezistin türüne bağlı olarak (pozitif ya da negatif), artar ya da azalır. Dolayısıyla, UV'ye tutulmuş fotorezist çözücü içinde belirli bir süre bekletilerek banyo

edilir ve istenilen desen silikon pul üzerinde elde edilmiş olur [DESAI, 2000]. Desende yer alan mikrokanalların derinliğini arttırmak için silikon pulun üzerindeki desene göre kimyasal olarak aşındırılması da mümkündür. Oluşan desenli silikon pul, mikrokanallı bir filmin oluşturulabilmesi için ya da PDMS (polidimetil silokzan) mikrodamga oluşturulmasında kalıp olarak kullanılır. PDMS mikrodamga ile, hücrelerin yönlendirilmesinde etkili olan proteinler polimerik yüzeyler üzerinde istenilen desen içerisinde ya da üzerinde tutturulabilir.

Mikrofabrikasyon yöntemiyle üretilmiş sübstratları içeren ilk çalışmalardan biri Brunette ve ark. tarafından yapılmıştır [BRUNETTE, 1983]. Bu grup, insan gingiva eksplantlarının çoğalma yönünün kontrol edilmesinde kullanılacak olan kanallı yüzeylerin silikon üzerinde maske yardımıyla aşındırılmasını hedefleyen tekniğin kullanımını göstermiştir. Bu çalışma sonunda, mikroyapıya sahip yüzeyin daha iyi bir osteointegrasyonu ve mineral doku uyarılmasını sağladığı saptanmıştır [BRUNETTE, 1999]. Yapılan diğer çalışmalarda mikroyapının hücre çoğalması ve tutunması üzerindeki büyük etkisi kanıtlanmıştır. Mikrotopografiye sahip yüzeyler fibroblast tutunmasını arttırabilmekte ve bu hücrelerin istenilen doğrultuya yönlenmesini uyarabilmektedir [CLARK, 1991; MEYLE, 1993; MEYLE 1995]. Bir çok araştırmacı yüzey topografisinin hücrelerin ilerlemesini etkileyebileceğini ve hücreleri yönlendirebileceğini göstermiştir (Tablo 1). Hücre boyutları dolayında (10-50 μm) bir topografik özelliğe sahip hücre taşıyıcı yüzeylerinin kullanılmasıyla elde edilen hücre morfolojisi doğal dokudaki hücrelerinkine oldukça benzemektedir.

Mikroteknoloji, tanımlanmış kimyasal moleküllerin hücre mikroçevresine uygulanmasında da kullanılmaktadır (Tablo 2). Son yıllarda bilim adamları sinir hücrelerinin, laminin tutturularak oluşturulmuş iki boyutlu mikrodesenli yapılar üzerindeki tutunma ve farklılaşmalarını [RANIERI, 1994] ve karaciğer hücrelerinin (hepatosit ve fibroblast) iki boyutlu ortak kültürlerde birbirleriyle etkileşmelerini araştırmışlardır [BHATIA, 1997; BHATIA 1998]. Her iki çalışmada da, belirli bir düzende yerleşmemiş hücrelere oranla mikrodesenli yüzeylerdeki hücre fonksiyonlarında gelişme görülmüştür.

Doku mühendisliği kullanılarak oluşturulmuş kalın ve karmaşık yapıların, örneğin karaciğer ve böbrek, vücuda nakledildikten sonra hala canlılığını sürdürebilmesi için damar ağına sahip olması gerekir [VACANTI, 2000]. Vacanti ve ark. silikon ve Pyrex üzerinde mikrofabrikasyon yöntemlerini kullanarak, karaciğer ve damar dokularını (dallanan damar ağı) tek hücre katmanı halinde oluşturmuşlardır [VACANTI, 2000]. Oluşturulan bu dokuların bir araya getirilmesiyle kalın, üç boyutlu, damarlı bir organın meydana getirilebileceği düşünülmektedir [VACANTI, 2000].

Daha etkili bir yönlendirme aracı oluşturmak için topografik ve kimyasal modifikasyonlar bir arada kullanılabilmektedir. Miller ve ark. polimer sübstrat üzerinde kimyasal ve fiziksel yönlendirmenin Schwann hücrelerinin çoğalması ve ilerleme yönleri üzerindeki etkisini

araştırmışlardır [MILLER, 2001]. Yapılan çalışmada mikrokanallı silikon yapı kalıp olarak kullanılmış ve mikrokanallı biyobozunur polimer oluşturulmuştur. Polimer yüzeyindeki mikrokanallara laminin proteini adzorplanmıştır. Hücre ekimini takiben alınan sonuçlara göre laminin Schwann hücrelerinin sübstrata daha çok tutunmalarını sağlamış ve hücreleri mikrokanalların doğrultusunda yönlendirmiştir.

Yapılan tüm bu çalışmalar, mikrofabrikasyon yöntemlerinin kullanılmasıyla oluşturulabilen kimyasal ve topografik yüzey modifikasyonlarının kompleks biyolojik yapay doku oluşturulmasında ve hücre yönlendirilmesi alanında büyük bir potansiyele sahip olduğunun bir kanıtıdır.

Tablo 1: Üç Boyutta Mikro Desenleme ile elde edilen yüzeylerde hücre kültürü çalışmaları

Hücre Tipi	Malzeme	Metoda	Kanal derinliği (μm)	Kanal Genişliği (μm)	Tepe Genişliği (μm)	Sonuçlar	Kaynak
Nötrofil	Au-Pd ya da Ti ile kaplanmış polimid tepelere sahip cam	Fotolitografi	3 ya da 5	6, 10, 14	3 ve 5	Topografik geometrisi ve kimyasından bağımsız hücre yönlenmesi.	TAN, 2002
Epitel Doku ve Hücreleri	Polistiren	Fotolitografi	1 ya da 5	1 –10	1-10	Kanallar boyunca hücre yürümesinde artış gözlenmiştir. Derin kanallarda daha olumlu sonuçlar elde edilmiştir.	DALTON, 2001
Mdck Tavuk Serebral Sinir ve Bhk Hücreleri	Kuvartz	Modifiye lazer holografik metod	0.1, 0.21, 0.4	0.13	0.13	MDCK ve BHK hücreleri oluşturulan kanallar doğrultusunda derinliğe bağlı olarak yönlenmiştir. Hücre adalarındaki MDCK ve sinir hücreleri yüzey yükseltilerinden etkilenmemiştir. Elde edilen sonuçlar hücre yönlendirmesinin hücre tipi ve hücresel ilişkilere bağlı olduğunu göstermiştir.	CLARK, 1991
Fibroblast	Polistiren	Fotolitografi	1	1,2,5,10	1,2,5,10	1 ya da 2 μmlik kanallara sahip silikon sübstratlar üzerinde sıçan dermal fibroblast hücreleri sadece kanal tepelerinde kalmıştır. 5 ve 10 μm lik kanallarda hücreler kanal diplerine ulaşıp yüzeye bağlanmıştır.	WALBOOMERS, 1998
Fibroblast	Polistiren (PS), poli-L-laktik asid (PLLA), silikon (Si), titanium (Ti) - (radyofrekans deşarj yöntemiyle yüzey modifiye edilmiştir)	Fotolitografi	0.5	1-10	1-10	PS-geniş kanallarda herhangi bir yönlenme gözlenmemiştir. PLLA-hücresel yönlenmeyi arttırmıştır. Si-hücreler kanalları buruşturarak bozmuştur. Ti- diğer sübstratlara göre daha az hücresel yönlenme.	WALBOOMERS, 1999 (1)
Fibroblast	Polistiren (PS)	Fotolitografi	0.5-5.4	1-20	1-20	Fibroblast hücreler genellikle kanallarda yönlenmiştir. Hücre yönlenmesinin kanal derinliğine bağlı olduğu gösterilmiştir.	WALBOOMERS, 1999 (2)

Tablo 1: Üç Boyutta Mikro Desenleme ile elde edilen yüzeylerde hücre kültürü çalışmaları (devam)

Hücre Tipi	Malzeme	Yöntem	Kanal derinliği (μm)	Kanal Genişliği (μm)	Tepe Genişliği (μm)	Sonuçlar	Kaynak
Fibroblast	Polistiren (PS) (radyofrekans deşarj yöntemiyle yüzey modifiye edilmiştir)	Fotolitografi	0.5	1, 2, 5,10	1, 2, 5,10	Hücrelerin en hızlı dar kanallar boyunca yönlendiği gözlendi. Bu çalışmada iyi oluşmuş hücresel aktin çatısının hücre yönlendirme için şart olamadığı savunuldu. Aktin filamentlerinin kanallarda yönlenmesinin hücresel yönlenmenin sebebi olmayıp bir sonucu olduğu belirtilmiştir.	WALBOOMERS, 2000
Fibroblast	Silikon plastik (radyofrekans deşarj yöntemiyle yüzey modifiye edilmiştir)	Fotolitografi	0.45-1	1-10	1-10	Hücrelerin kanallar boyunca yönlenmesi ve uzantı vermesi tepe yüksekliği 4.0 μm den küçük olan paralel kanallarda gözlenmiştir.	DEN BRABER, 1996
Fibroblast	Silikon polimer (radyofrekans deşarj yöntemiyle yüzey modifiye edilmiştir)	Fotolitografi	0.5	2, 5 ya da 10	2, 5 ya da 10	Fibroblast hücrelerinin mikrofilamentleri ve vinkülin agregatlarının 2 μm kalınlığındaki kanallara sahip silikon sübstratlarında yönlendiği belirtilmiştir. 5 ve 10 μmluk mikrokanallarda ise proteinlerin daha az yönlendiği ve vinkülin aggregatların tepelerde biriktiği gözlenmiştir.	DEN BRABER, 1998
Kemik hücresi	Poli (etilen tereftalat)	Lazer ekzimer ışını ile mikrofotolitografi	1 ve 3	10 ve 30 μm		Pürüzsüz mikrotopografiye sahip (minimal kanal kalınlık ve derinliğe sahip) yüzeylerde kemik hücrelerinin hücredışı depozit yaptığı gözlenmiş. Bu çalışmada sadece mikrotopografinin değil yüzey kimyasının da hücre davranışları (morfoloji ve yönelme) üzerinde önemli etkisi olduğu sonucuna varılmıştır.	DUNCAN, 2002
Kıkırdak hücresi	Agaroz jel	Fotolitografi ve reaktif iyon aşındırma yöntemleri	40 μm	Kübik çukurlar	15-65	Mikrodesenli polimerik jeller kıkırdak hücrelerinin fenotipik özelliklerini (yuvarlak morfoloji) korumalarını sağlamıştır. Yapılan çalışmada kollajen tip II'nin varlığı immün boyama yöntemiyle gösterilmiştir. Bu yöntem kıkırdak hücre kültüründe büyük bir yenilik getirmiştir.	PETERSEN, 2002

Tablo 1: Üç Boyutta Mikro Desenleme ile elde edilen yüzeylerde hücre kültürü çalışmaları (devam)

Hücre Tipi	Malzeme	Metod	Kanal derinliği (μm)	Kanal Genişliği (μm)	Tepe Genişliği (μm)	Sonuçlar	Kaynak
Sıçan kemik iliğinden elde edilen kemik hücresi	Poli-L-laktik asit ve polistiren	Fotolitografi	0.5, 1.0 ya da 1.5	1, 2, 5 ve 10	1, 2, 5 ve 10	Kollajen ağırlıklı mineralize olmuş hücre dışı matriks depozisyonu olmuştur. Kanallarda hücrelerin yönlenmesi gözlenmiştir. En fazla mineralizasyon 1.0 μmlik derinliğe ve 1 ve 2 μm'lik kanal genişliğine sahip PLA sübstratların üzerinde görülmüştür. Alkalen fosfataz aktivitesi mikrodesenlere sahip PLA yüzeylerinde daha yoğun olarak bulunmuştur.	MATSUZAKA, 1999
MC3T3-E1 osteoblast	Bozunabilir Silikon kaplar	Mikrodesenlere sahip (Fotolitografi ve reaktif iyon aşındırma yöntemiyle hazırlanmış	1.6	1 – 6		Hücrelerin % 4 lük esnemeyle ya da esnemesiz her boyut kanalda yönlendirildiği aktin filamentlerin, hücre çekirdeklerinin ve hücre çatılarının incelenmesiyle gözlenmiştir. 3, 4 ve 7 günlük % 4 lük devamlı esnemeler mikrokanallı ve desensiz polimer sübstratlarında hücre sayısı olarak bir farklılık getirmemiştir.	WANG, 2000
Rat osteoblast	Hidroksiapatit ya da titanyum kaplanmış kanallı silikon şablonlar	Silikon templatlara anizotropik aşındırma ve püskürtme yöntemiyle Ti ve HA depozit edilmesi	3, 10 ve 30	42		Titanyum ve hidroksiapatitli mikrokanallarda kemik hücreleri kanal doğrultusunda uzantı vermiş, yönlenmiş ve hareket etmiştir. Ti'lu yüzeylere oranla kemik hücreleri HA'li yüzeylerde daha fazla kemiksi nodüller oluşturmuştur. Mineralize nodüller oluşumunda yüzey topografisi ve kimyası arasında bir bağlantı bulunmuştur. 30 μm derinliğe sahip HA'lı yüzeylerde en fazla sayıda nodül gözlenmiştir.	PERIZZOLO, 2001

Tablo 1: Üç Boyutta Mikro Desenleme ile elde edilen yüzeylerde hücre kültürü çalışmaları (devam)

Hücre Tipi	Malzeme	Metod	Kanal derinliği (μm)	Kanal genişliği (μm)	Tepe genişliği (μm)	Sonuçlar	Kaynak
MC3T3-E1 kemik hücresi	Titanyum	Değişik tanecik boyutlarına sahip SiC kağıtlarıyla aşındırma yöntemiyle	Yüzey pürüzlülüğü (tepe-düzlem yükseklik oranı): 1.4, 1.0, 0.35, 0.12, ve 0.08 μm			Engebeli (aşındırılmış) titanyum yüzeye bağlanan kemik hücreleri yüzeyde oluşturulan yapılar doğrultusunda yayılmış ve uzantı vermişlerdir. Pürüzsüz yüzeylerde daha az organize olmuş aktin mikrofilamentleri görülmüştür.	EISENBARTH, 2002
Primer insan kemik hücresi	Titanyum, aluminyum, vanadyum, ve niyobiyum kombinasyonları	Fotolitografi	20 nm lik topografik yükseltiler		50, 100 ya da 150	Oluşturulan yükseltilerin hücre yönlendirmesinde bir etkisi gözlenmedi. Hücre sayısı ve aktivitesi açısından tek tip metal kullanımı bir farklılık yaratmadı.Vanadyum üzerinde hücreler ipliksi bir morfolojiye sahipti. Aluminyum içeren ikili metal kombinasyonlarında en fazla hücre reaksiyonu (aluminyumdan uzak durma) görüldü. Gözlenen değişik hücre tepkilerinin metal oksit yüzeylere bağlanan farklı serum proteinlerine bağlı olabileceği tartışılmıştır.	SCOCHFORD, 2003

Tablo 2: İki Boyutta Mikro Desenleme ile elde edilen yüzeylerde hücre kültürü çalışmaları

Hücre	Polimer	Metod	Oluşturulan desenin eni	Sonuçlar	Kaynak
Ganglion sinir hücresi	Cam	Dimetildiklorosilan ile kovalent bağla cam üzerine fotolitografi yönteminin kullanılmasıyla laminin mikrodesenlerinin oluşturulması	2 ve 25 μm lik hücre yapışkan alanlar	Nöronal hücrelerin uzantı vermesi yüzeyde oluşturulan desenlerin geometrisine ilintili olduğu gözlenmiştir. Hücresel uzantıların yönlenmesi sadece 50 μm lik alanlarda olmuştur. Oluşturulan yapışkan alanlarda bağlanan hücrelerin bipolar olduğu görülmüştür.	CLARK, 1993
Hipokampus sinir hücreleri	Cam	Heterofonksiyonel çapraz bağlayıcı ile sentetik peptidin (laminin içerdiği) amin bağlanmış cama bağlanması ve UV fotomaskelerle mikrodesenlerin oluşturulması	5 μm	Hippokampal sinir hücrelerinin morfolojisinin yüzeyde oluşturulan geometrik desenleri (hücre yapışkan ve olmayan alanlar) yansıttığı gözlenmiştir. Bu iki alanların sınır bölgelerinde hücrelerin uzantılarının büyümesinin durduğu ya da yön değiştirdiği görülmüştür.	MATSUDA, 1996
Çin hamsteri yumurtalık hücreleri (CHO)	Polistiren	Fotoreaktif polialilamin ile konjuge olmuş epidermal büyüme hormonun fotomaske ile UV ışımasıyla polistiren üzerinde paralel kanallar olarak immobilize edilmesi	100 ya da 2 μm	2 μm'lik alanlarda hücre çoğalması olmuş fakat hücresel yönlenme görülmemiştir. 100 μm'lik oluşturulan dairesel alanlarda hücrelerin desene bağlı büyümesi gözlenmiştir.Bu çalışmada epidermal büyüme hormonun immobilizasyonu ile oluşan sinyal taşımının sağlanmasının yatay difüzyon ve EGF-EGF reseptör kompleksinin içeriye alımının inhibe edilmesi sonucu olduğunu savunmuşlardır. EGF nin immobilize olmadığı bölgelerde hücre büyümesi görülmemiştir.	ITO, 1998

Tablo 2: İki Boyutta Mikro Desenleme ile elde edilen yüzeylerde hücre kültürü çalışmaları (devam)

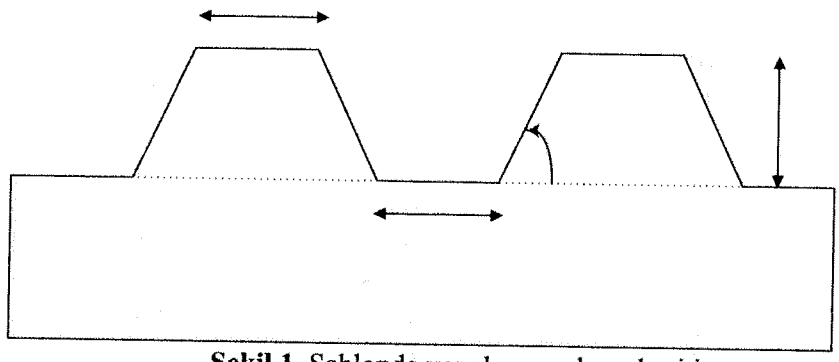
Hücre	Polimer	Metod	Oluşturulan desenin eni	Sonuçlar	Kaynak
Retinal pigment epitel hücresi (RPE)	cam	Mikrokontak baskı	10 ve 50 μm çaplı yuvarlak cam bölgeler ve bu bölgeleri ayıran oktadesiklotriklorosilan	Yüzeyde oluşturulan yapışkan adalar RPE hücrelerinin morfolojisini, yüzeye bağlanmasını, sınırlandırılmış yüzeye yayılmalarını olumlu yönde etkilemiştir. Buna karşılık desensiz cama ekilen RPE hücreleri fibroblastik morfolojiye sahip olduğu gözlenmiştir.	LU, 1999
Kemik ve fibroblast hücreleri	Borosilikat cam	Mikrokontak baskı yöntemiyle OTS ile ayrılan yuvarlak DETA alanlar ve Yapışkan protein peptidlerinin DETA alanlarına immobilizasyonu	10, 50,100 ve200 μm çaplı yuvarlak desenler	Serum yokluğunda nonyapışkan RDGS ve KSSR peptidleri ile oluşturulmuş mikrodesen alanlarda kemik ve fibroblast hücrelerinin yüzeye bağlanmaları dağınık ve düşüktü. İki hücre tipi RGDS ile modifiye olmuş yuvarlak alanlarda yüzeye bağlanmıştır. Yalnızca kemik hücreleri KRSR ile modifiye olmuş alanlara bağlanmıştır.	HASENBEIN, 2002
Fibroblast STO	Poli(etilen-tereftalat) ve polistiren	Fotolitografi ile fotoreaktif sülfatlı hiyoloronik asit ve heparinin mikrodesen olarak yüzeye immobilizasyonu.	100 μm	Pıhtılaşma testinde immobilize sülfatlı hiyaluronik asit trombus oluşumunu engellediği görülmüştür. Bazik fibroblastik büyüme faktörünün varlığında sadece heparin immobilize edilmiş yüzeylerde hücre büyümesi görülmüştür.	ITO, 2000
3T3 ve insan endotel hücreleri	cam	Cam üzeride fotomaske yardımıyla fotopolimerizasyon yöntemiyle hiyoluronan ve sülfatlanmış hiyoluronan mikro desenlerin	10, 25, 50, 100 μm	Hücre tipi ve desen boyutlarına göre hücre davranışlarında farklılıklar gözlendi. Bu çalışmada hem kimyasal ipuçlarının hem de topografik kontrollerin hücre yönlendirmesinde önemli faktörler olduğu sonucuna varılmıştır.	MAGNANI, 20003

Gereç ve yöntem

I. Mikrodesenli şablonların hazırlanması

I-A. Fotomaskelerin tasarlanması ve üretimi

İhtiyaç duyulan şablonlar belirlendi. Bu şablonlar değişik çukur taban genişlik ve derinliklerden oluşan mikrokanallar ve kübik yükseltiler içermektedir. Bu yapıların kesiti Şekil 1'deki gibidir.



Şekil 1. Şablonda yer alan yapıların kesiti

Bu şablonları içeren fotomaske Wavemaker dizayn programıyla tasarlandı. Tasarlanan maskede yer alan şablonların yeri Şekil 2'de, ayrıntıları ise Tablo 3'te görülmektedir.

Tepe Genişliği

A1	A2	A3	A4
B1	B2	B3	B4
C1	C2	C3	C4
D1	D2	D3	D4

Çuku

Şekil 2. Şablonların fotomaske üzerinde dağılımı

Tablo 3. Tasarlanan şablonların ölçüleri.

*Şablon No.	Eğim Açısı (^{0})	Tepe Genişliği (μm)	Çukur Genişliği (μm)	Tepe Yüksekliği (μm)
A1	90	30	10	4.5
A2	54.7	30	10	20
A3	54.7	10	2	30
A4	54.7	2	2	30
B1	90	10	10	4.5
B2	54.7	10	10	20
B3	54.7	5	2	30
B4	54.7	2	50	10
C1	90	5	14	3
C2	90	5	13	3
C3	54.7	10	2	20
C4	54.7	2 ve 5	2	20
D1	90	5 ve 15	8	3
D2	90	5 ve 15	7	3
D3	54.7	3 ve 7	2	20
D4	54.7	30	2	20
A2A	90	40	10	10

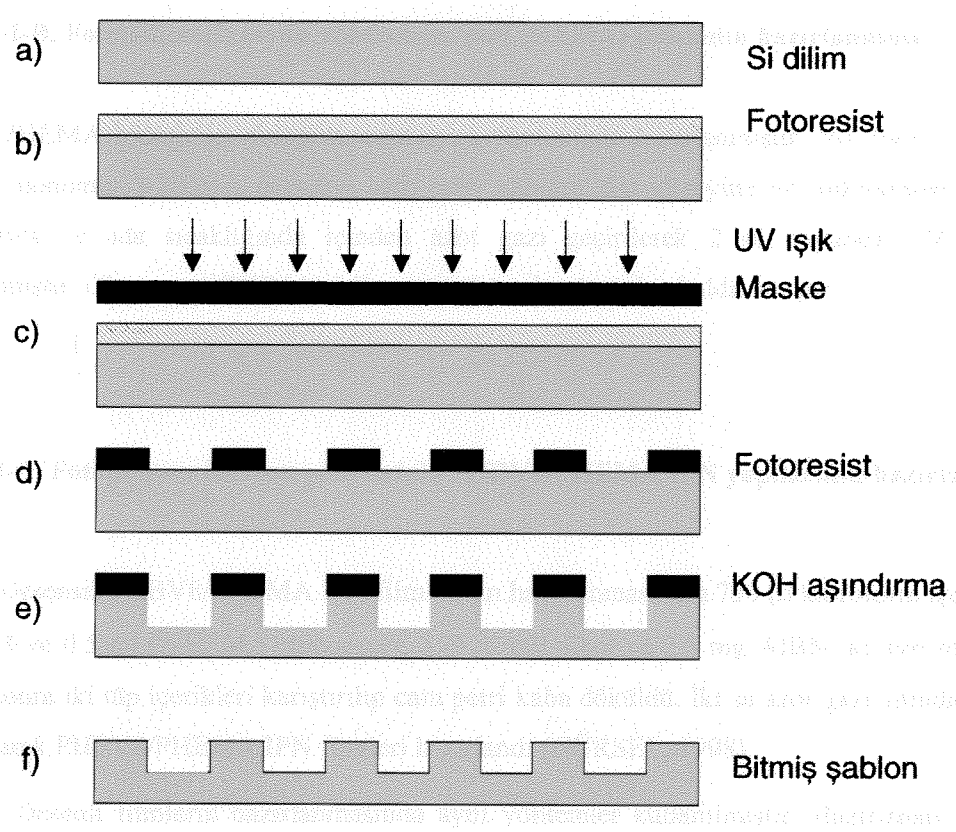
*Burada C1 11 μm, C2 13 μm D1 11 ve 21 μm ve D2 11 ve 21 μm lik kübik yükseltilerdir. Geri kalan şablonlar mikro kanallardan oluşmaktadır.

Tasarlanan maskenin GDS II dosyası elektronik olarak maske üreticisine gönderilerek üzeri krom kaplı kuvartz plakalar üzerinde imal ettirildi.

I-B. Şablonların mikroişleme yöntemleriyle üretilmesi

Şablon platformu olarak genelde tek kristal silikon dilimler kullanıldı. Bu dilimlerden 1.5 x 1.5 cm'lik parçalar kesildi. Kesilen parçalar TCA (trikloroetan), ACE (aseton) ve ISO (isopropil alkol) kimyasal temizliğinden geçirildi. SiNx ince tabakalar, plazma ile hızlandırılmış kimyasal biriktirme yöntemi ile (PECVD: Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition) bu parçaların yüzeyine büyütüldü. Şablon maskesindeki desenin, şablon platformuna aktarılması aşağıdaki gibi gerçekleştirildi: Kimyasal olarak temizlenmiş ve üzerine ince film büyütülmüş olan parçaların üzerine UV ışığa duyarlı fotorezist film 40 sn süreyle 4000 rpm hızda döndürülerek kaplandı. Daha sonra fotomaske kullanılarak ışığa duyarlı film Karl Suss Maske hiza sağlayıcısında 6 mW lık UV ışıkla 25 sn pozlandırıldı. Daha sonra da 40 sn banyo edildi. Böylece maskedeki şablon deseni ışığa duyarlı tabakaya aktarılmış oldu. Daha sonra yaklaşık 60 sn bir derişik HF (hidroflorik asit) aşındırmasıyla şablon büyütülen ince SiNx tabakasına geçirildi. Işığa duyarlı fotorezist film aseton ile kaldırıldı. SiNx tabaka Si dilimi aşındırma işlemi sırasında (ikincil) maske görevi görmektedir. Üzerindeki SiNx

(potasyum hidroksit) çözeltisine bırakıldı ve açıkta kalan Si istenen derinliğe kadar aşındırıldı. En son olarak SiNx tabaka derişik HF ile temizlendi. Böylece şablon platform üretimi bitmiş oldu. Üretim işlemleri aşağıdaki Şekil 3'te özetlenmiştir.



Şekil 3. Mikroişleme yöntemiyle şablon üretim aşamaları

PDMS kalıbın hazırlanması

Hazırlanmış yüzeyin üzerine sıvı halde olan PDMS ve katalizör karışımı dökülüp yaklaşık 70° C derecede fırınlandı ve PDMS'in polimerleşmesi sağlandı. Polimerleşen ve sertleşen PDMS mekanik olarak yüzeyden ayrıldı.

II. Mikrodesenli ve desensiz polimerik sübstratların hazırlanması

II-A. Çözücü uçurma yöntemiyle PHBV filmlerin hazırlanması

PHBV (poli(3-hidroksibütirat-ko-3-hidroksivalerat), 8% mol HV)'nin diklorometan içinde %6 (w/v)'lık çözeltisi oluşturulmuş ve bu çözelti mikrokanallı ve kübik yükseltili silikon şablonlar üzerine yayılmıştır. Çözücünün buharlaşması sonucu oluşan film kalıptan kaldırılmış ve böylece kalıbın

yayılmıştır. Çözücünün buharlaşması sonucu oluşan film kalıptan kaldırılmış ve böylece kalıbın üzerindeki şekiller film üzerinde ters olarak elde edilmiştir. Desensiz filmlerin elde edilmesi için de aynı çözelti cam petri kabına dökülerek çözücüsü buharlaştırılmıştır.

II-B. Fotopolimerizasyon yöntemiyle poli (HEMA) jellerinin hazırlanması

PHEMA hidrojeller fotopolimerizasyon yöntemiyle hazırlanmıştır. %1 (w/v) oranında AIBN içeren monomer 2-HEMA çözeltisi cam petri kabının düz yüzeyine ve mikrodesenli kalıp üzerine dökülmüş ve oda sıcaklığında içinden azot gazı geçirilerek 2 sa boyunca UV ışığına maruz bırakılmıştır. Oluşan poli(HEMA) jeller su varlığında yüzeyden kaldırılmıştır.

II-C. Fotopolimerizasyon yöntemiyle PHBV8/PHEMA IPN yapılarının hazırlanması

Desensiz PHBV8/PHEMA IPN filmlerinin hazırlanması için 750 µl kloroform içerisinde 7.5 mg PHBV8 ve 0.5 ml (2-HEMA) monomer, 250 µl etil alkol ve 2.5 mg AIBN iki ayrı tüpte hazırlandı. Daha sonra iki tüp içerikleri karıştırılıp cam petri kaba döküldü. İki sa azot gazı altında UV'ye maruz bırakılarak PHBV8/PHEMA IPN filmleri hazırlandı (GÜRSEL, 1998).

Desenli filmlerin hazırlanmasında aynı yöntemler kullanılmıştır. Hazırlanan çözeltiler petri kabına yerleştirilen silisyum A3, A4, B3 ya da D1şablonları üzerine dökülmüş ve daha sonra oluşan yapılar su varlığında şablondan ayrılmıştır.

III. Fibrinojenin mikrodesenli ve desensiz yüzeylere bağlanması

III-A. Polimerik yüzeylere bağlanacak fibrinojenin FITC ile İşaretlenmesi

Fibrinojen (10 mg/ml) 0.1 M fosfat tamponu içinde çözüldükten sonra % 5'lik sodyum bikarbonat ile pH 8'e ayarlandı. Fibrinojeni FITC ile işaretlemek için 1 ml protein çözeltisine 2 mg FITC eklendi ve 18 sa 4°C'de çalkalandı. FITC ile işaretlenmiş fibrinojeni bağlanmamış FITC'den ayırmak için elde edilen çözelti 0.1 M (pH 7.2) fosfat tamponu ile G25 kolonundan geçirilmiştir. İki ml'lik toplanan örneklerin spektroflorometre ile floresan intensitesine (FI) (λ_{Ex}: 490 nm, λ_{Em} 524 nm)

bakılmış, ve UV/Vis spektrofotometrede (λ_{max} 280 nm) protein miktarını tayin için abzorbans ölçümleri yapılmıştır.

III-B. Fibrinojenin mikrodesenli ve desensiz yüzeylere kovalent olarak bağlanması

Mikrodesenli ve desensiz PHBV8 film yüzeylerine FITC-fibrinojenin kovalent olarak bağlanması için filmler 2 sa UV'ye (λ = 313 nm, 75 W) tutulmuştur. UV uygulamasından sonra film yüzeylerine 150 µl çapraz bağlayıcı epiklorohidrin (% 2'lik) eklenerek hemen fazlası yüzeyden alınmış ve filmler karbondioksit etüvünde 15 dk bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda filmler 37°C'de fosfat tamponu ile 1 sa yıkanmıştır. Epiklorohidrin tutturulmuş filmler % 70'lik etanol içerisinde 2 sa sterilize edilmiş, % 50'lik etanol içerisinde 30 dk yıkanmış ve PHBV8 filmleri daha sonra FITC-fibrinojen çözeltisine batırılıp 17 sa bekletilmiştir. Fosfat tamponunda 4 salik yıkama aşamalarından sonra floresan mikroskobunda filmler incelenmiştir. FITC-fibrinojen, mikrodesenli ve desensiz PHEMA ve PHBV8/PHEMA IPN polimerik yapılara epiklorohidrin ile UV 'ye tutulmadan kovalent olarak yukarıda belirtilen şekilde bağlanmıştır.

Hücre ekimi için kullanılacak filmlerin yüzeyine, yukarıda belirtilen yöntem kullanılarak, sadece fibrinojen (2mg/mL çözeltisi kullanılarak) kovalent olarak bağlanmıştır.

III-C. Fibrinojenin mikrodesenli ve desensiz yüzeylere adzorpsiyon yöntemiyle bağlanması

Mikrodesenli ve desensiz hazırlanan polimerik yapılar üzerine 250 µl FITC-fibrinojen (1 mg/ml) çözeltisi eklendi ve 10 dk bekletildi. 10 dk sonunda protein çözeltisi çekildi ve filmler bir gece boyunca karanlıkta kurutuldu (KENAR, 2003). Yüzeye bağlanan FITC-fibrinojen floresan mikroskopisi ile incelendi.

Hücre ekimi için kullanılacak filmlerin yüzeyine, yukarıda belirtilen yöntem kullanılarak, sadece fibrinojen (1 mg/mL çözeltisi kullanılarak) adzorplanmıştır.

IV. Alkalen fosfataz (ALP) enziminin mikrodesenli ve desensiz yüzeylere kovalent olarak bağlanması ve karakterizasyonu

IV-A. ALP enziminin kovalent olarak mikrodesenli ve desensiz polimerik yüzeylere bağlanması

ALP enzimi yukarıda belirtilen aynı yöntemlerle (fibrinojenin film yüzeylerine kovalent olarak bağlanması) mikrodesenli ve desensiz PHBV8 film, PHEMA, PHBV8/PHEMA polimerik yapılar

yüzeylerine kovalent olarak bağlanmıştır. Epiklorohidrin çözeltisi polimerik yapılar yüzeyinden çekildikten sonra filmler ALP enzimi (0.2 M, pH 9 borat tamponu içinde,2 mg/ml) içerisinde 17 sa oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda fosfat tamponu ile 37°C 'de 4 sa yıkanmıştır ve anti-ALP antikoru ile indirekt immün boyama yapılmıştır. İmmün boyama sonrasında ALP'nin mikrodesenli ve desensiz yüzeylerde dağılımı floresan mikroskopisi ile incelenmiştir.

Hücre ekimi için kullanılacak filmlerin yüzeyi anti-ALP antikoru ile boyanmamıştır.

IV-B. İndirekt immün boyama ile bağlanan ALP enzimlerinin incelenmesi

İndirekt immün boyama işleminin ilk aşaması olarak bütün filmler spesifik olmayan antikor bağlanmasını önleyen çözelti (10 mM fosfat tamponu içinde % 1'lik BSA, % 10 'luk FCS) ile 30 dk inkübe edildi. Filmler 1:1000 seyreltilmiş primer anti-ALP antikoru ile 4 °C 'de bir gece boyunca inkübe edildi. Yıkama aşamalarından sonra 1:400 seyreltilmiş ikincil IgG antikoruyla 37°C 'de 1 sa inkübasyonu yapıldı. İkinci inkübasyon sonunda filmler fosfat tamponu ile yıkandı ve floresan mikroskobunda incelendi.

IV-C. Mikrokanallar ve kuyucuklar içinde ve düz yüzeye bağlanmış ALP enziminin Ca-P kristalleri oluşturmasının sağlanması

Kovalent olarak mikrokanallar ve çukurlar içerisine bağlanmış ALP enziminin PHBV film yüzeyinde kemik dokusunda bulunan hidroksiapatite özdeş Ca-P kristalleri oluşturması amacıyla, filmler 24 mM Ca^{2+}, 0.5 mM Mg^{2+}, 142 mM NaCl ve 12.5 mM β- gliserofosfat içeren 1 mL'lik Tris tampon çözeltisi (pH 7.4, 25 mM) içerisinde 37°C'de, 90 sa bekletilmiştir. İnkübasyonun ikinci gününde Tris tampon çözeltisi yenilenmiştir. Örnekler PBS içerisinde (pH 7.4, 10 mM) yıkandıktan sonra kurumaya bırakılmış ve bir kısmı taramalı elektron mikroskobunda incelenmiş, diğerleri de hücre ekiminde kullanılmıştır.

V. Fibrinojenin Desensiz PHBV8, PHEMA ve PHBV/PHEMA IPN Film Yüzeyine Mikrokontak Damgalama Yöntemi ile Transferi

V-A. Silikon PDMS Damganın Hazırlanması

Hazırlanmış yüzeyin üzerine sıvı halde olan PDMS ve katalizör karışımı dökülüp yaklaşık 70o C derecede fırınlandı ve PDMS'in polimerleşmesi sağlandı. Polimerlesen ve sertleşen PDMS mekanik olarak yüzeyden ayrıldı.

V-B. FITC-Dekstran'ın ve Fibrinojen'in mikrokontak damgalama yöntemi ile polimerik yüzeylere transferi

Polimerik film yüzeylerine mikrokontak damgalama yöntemiyle protein transfer işleminin başarılı bir şekilde gerçekleşebileceğinin kanıtlanması amacıyla mikrokontak damgalama metodu önce FITC ile işaretlenmiş dekstran kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

PDMS damganın yüzeyi önce 60 sn süresince 100 watt'lık O_2 RF plasma'ya maruz bırakılarak hidrofilikliği arttırılmıştır. Hidrofilik damga % 70 'lik etil alkol ile yıkanıp kurutulduktan sonra FITC-Dekstran çözeltisine (2mg /ml) batırılıp 30 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda PDMS damga laminer kabin (steril) içindeki steril filtre kağıtları üzerinde dik pozisyonda 15 dk kurutulmuştur. Damga daha sonra % 70 'lik etil alkol içinde sterilize edilmiş ve yüzeyi hafif nemli olan PHBV, PHEMA ya da PHBV/PHEMA IPN film yüzeyine transfer edilmiş ve üzerine 50 g ağırlık koyulduktan sonra 15 dk karbon dioksit etüv içinde bekletilmiştir. Damga film yüzeyinden uzaklaştırıldıktan sonra filmler floresan mikroskobu ile incelenmiştir.

Hücre ekimi için ise desensiz filmlerin yüzeyine yukarıda belirtilen yöntem kullanılarak fibrinojen (1mg/mL çözeltisi kullanılarak) baskılanmıştır.

VI. In vitro Çalışmalar

VI-A. Sıçan kemik iliği hücrelerinin izolasyonu

Sprague-Dawley cinsi sıçanların arka bacak kemiklerinden kemik iliği elde edilmiş, buradaki kök hücreleri hücre kültüründe DMEM (Dulbecco's Minimal Eagle Medium, high glucose) ortamında ve %20 FBS (Fetal Bovine Serum) varlığında çoğaltılmış ve birinci pasaj hücreleri DMSO çözeltisi (%15, FBS içerisinde) içerisinde dondurulmuş ve sıvı azot tankında hücre ekimine kadar saklanmıştır.

VI-B. Filmlere hücre ekimi

Sıvı azotta bekletilen kök hücreler tekrar canlandırıldı, DMEM besiyerinde (Dulbecco's Minimal Eagle Medium, high glucose, %20 FBS) büyütüldü ve tripsin ile yüzeyden kaldırılarak yüzeyinde a) adzorplanmış fibrinojen, b) kovalent olarak tutuklanmış Fb, c) kovalent olarak tutuklanmış ALP'nin oluşturduğu Ca-P mineralleri bulunduran, ya da d) fibrinojen içermeyen (işlenmemiş) mikrokanallı, kuyucuklu ve desensiz PHBV, PHEMA ya da PHBV/PHEMA IPN filmlerin üzerine ekilmiş (film başına 5,000/15,000 hücre) ve bu hücre kültürleri 2 hafta süre ile 37^0C'de %5 CO_2'li etüvde bekletilmiştir. Ekimden 3 sa sonra hücrelerin osteoblast hücrelerine

dönüşmeleri amacıyla üzerlerine %10 FBS ve farklılaşma faktörleri (10 mM β-gliserofosfat, 50 mg/mL L-askorbik asit ve 10 nM deksametazon) içeren DMEM besiyeri eklenmiştir. İki günde bir hücre kültürlerinin besiyerleri yenilenmiştir.

VI-C. Hücrelerin yöneliminin belirlenmesi

Hücrelerin yöneliminin belirlenebilmesi amacıyla hücrelerin birbiriyle etkileşimini en aza indirecek şekilde PHBV8 film başına 1,000 hücre (25,000 hücre/mL) ekildi ve 4 günlük inkübasyon dönemi sonunda, hücreler % 2.5'luk glutaraldehit kullanılarak film yüzeyine sabitlenmiş ve Acridine Orange'la boyanmıştır. Oluşan preparatlar floresan mikroskobu kullanılarak 480 nm'de incelenmiştir.

Alınan görüntüler kullanılarak mikrokanallı filmler üzerindeki hücrelerin kanal doğrultusundan sapma açıları belirlendi (0^o -90^o arası; 0^o: kanala paralel uzanma, 90^o: kanala dik uzanma). Kuyucuklu ve düz yüzeyler için de rasgele belirlenen bir doğrultu temel alınarak hücrelerin yerleşimi aynı şekilde belirlendi.

VI-D. Film yüzeyinde hücreler tarafından salgılanan kollajen tip I ve Osteokalsin'in indirekt immün boyama ile işaretlenmesi

Filmler üzerine ekilen hücreler ve oluşturdukları hücredışı matriks 2 haftalık inkübasyon sonunda etanol kullanılarak film yüzeyine sabitlendi. Filmler önce PBS tampon çözeltisi ile sonra da %70'lik etanol ile yıkandı ve %99'luk etanol içerisinde 3 sa süreyle bekletildi. İndirekt immün boyama işleminin ilk aşaması olarak bütün filmler spesifik olmayan antikor bağlanmasını önleyen çözelti (10 mM fosfat tamponu içinde % 1'lik BSA, % 10 'luk FBS) ile 30 dk inkübe edildi. Filmler kollajen tip I boyaması için 1:1000 ya da 1:100 seyreltilmiş primer anti-kollajen tip I antikoru (anti collagen type I, Sigma) ile, Osteokalsin boyaması için ise 1:100 seyreltilmiş primer anti-osteokalsin antikoru (Bovine Osteocalcin Monoclonal Antibody, QED Biosciences) ile 4°C 'de bir gece boyunca inkübe edildi. Kollajen tip I ve Osteokalsin boyaması için ayrı filmler kullanıldı. Yıkama aşamalarından sonra 1:400 seyreltilmiş ikincil IgG antikoruyla (Alexa Fluor 488, Molecular Probes) 37°C 'de 1 sa inkübe edildi. İkinci inkübasyon sonunda filmler fosfat tamponu ile yıkandı ve 480 nm'de floresan mikroskobunda incelendi.

VI-E. Film Üzerindeki Hücre Çoğalmasının Tayini

Filmlerin yüzeyindeki hücre miktarı ve çoğalması MTS testi kullanılarak belirlendi. MTS testi hücre ekimini takiben 24 sa sonra yüzeye tutunan hücre sayısını ve 2 hafta sonunda da hücre çoğalmasını belirlemek için kullanıldı. Her örnek için 0.5 mL %10'luk MTS/PMS karışımı (%10'luk FBS içeren DMEM içerisinde) kullanıldı ve MTS'in canlı hücreler tarafından formazana

dönüştürülmesi ile vasatta oluşan renk değişimi 490 nm'de Elisa Plate Reader kullanılarak tesbit edildi. Hücre sayısı, aynı koşullarda oluşturulan MTS kalibrasyon eğrisi kullanılarak belirlendi.

VI-F. Alkalen Fosfataz Testi

Farklı desene ve kimyasal modifikasyona sahip yüzeylerdeki hücre-yüzey etkileşiminin osteoblast fenotip ifadesi (işlevi) üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla hücreler tarafından üretilen alkalen fosfataz aktivitesi tayin edildi. Bu amaçla, 2 haftalık inkübasyon süresi sonunda filmler fosfat tamponu ile yıkandı ve 10 mM Tris- Triton X (%1 Triton X 100) tamponu ihtiva eden tüpler içerisine alınarak -20 °C'de donduruldu. Doku kültürü polistireni üzerinde büyütülmüş ve pozitif kontrol görevi görecek olan hücreler de aynı tampon çözeltisi kullanılarak yüzeyden kaldırıldı. Tüplerdeki hücreler "dondur-erit" yöntemiyle iyice parçalandıktan sonra sonikatör kullanılarak (25 W, 5 dk) ALP enziminin serbest kalması sağlandı ve diğer büyük parçacıklar santrifüjle (2000 dev/dk, 10 dk) çöktürüldü. Her örnek üzerindeki alkalen fosfataz aktivitesi, oda sıcaklığında bu enzim varlığında p-nitrofenil fosfat'ın p-nitrofenol'e hidrolizinin 405 nm'de 2 dk'da bir spektrofotometrik tayini ile belirlendi.
Dakikadaki alkalen fosfataz aktivitesi, "ışık emilimi-zaman" eğrisinin eğimi kullanılarak hesaplandı. p-Nitrofenol'ün oda sıcaklığındaki kalibrasyon eğrisi kullanılarak da enzim aktivitesi (ürüne dönüştürülen µmol sübstrat/dk) tayin edildi.

Bulgular ve Tartışma

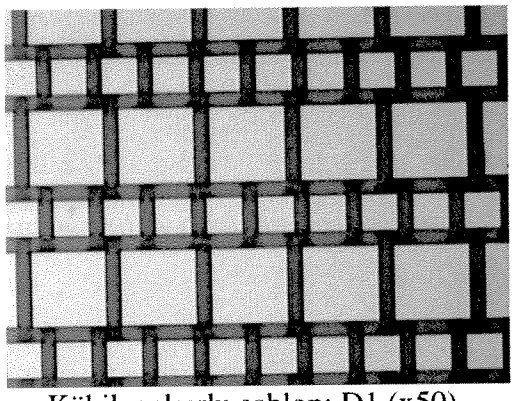
Bulgular:

I. Şablon üretimi

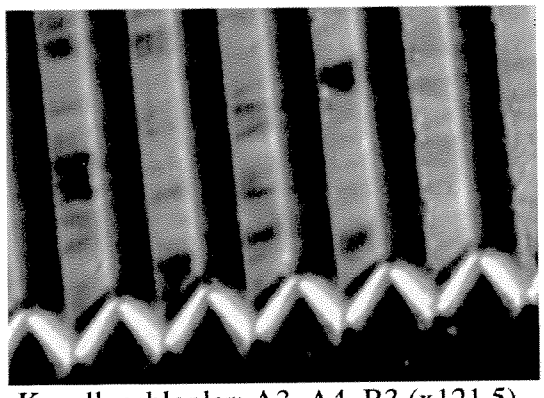
Oluşturulan maskeden polimerik film yapımında kullanılmak üzere, yüzeyinde farklı desen (mikrokanallı ya da kübik çukurlu) bulunduran tasarımlar seçildi ve bunların silikon şablonları üretildi. Aralarında hücre davranışı açısından karşılaştırma yapabilmek amacıyla kübik çukurlu yapılardan D1, mikro kanallılardan da tek parametrede (çukur taban genişliği) farklılık gösteren A3, B3 ve A4 seçildi. Üretilen şablonların (A3, B3 ve A4) boyutları tasarlanandan çok az farklı olması (Tablo 4) proje amaçları yönünde kullanım açısından bir engel oluşturmamıştır (Şekil 4). Kimyasal aşındırma yöntemi D1 şablonunun planlanan boyutlarda üretimine olanak vermemiştir, bu nedenle bu şablonun üretimi için farklı bir yöntem olan Reactive Ion Etching (RIE) kullanılmıştır. Kimyasal aşındırma sonucu elde edilen A3, A4 ve B3 şablonları yüzeyindeki kanalların yan duvarları zeminle 54.7°, D1 yüzeyindeki kuyucukların duvarları ise 90° lik bir açı yapmıştır. PDMS damga yapımında kullanılacak olan A2A şablonunun üretimi için de RIE kullanılmıştır.

Tablo 4. Silikon şablonların desen boyutları (μm)

	Tasarlanan Boyutlar (μm)					**Elde Edilen Boyutlar (μm)**				
Örnek Kodu	A3	B3	A4	A2A	D1	A3	B3	A4	A2A	D1
Çukur Taban Genişliği	2	2	2	10	8	1	1	1	10	4
Tepe Genişliği	10	5	2	40	5 ve 15	8	3	1	40	10 ve 20
Tepe Yüksekliği	30	30	30	10	3	30.1	31	30.2	10	5



Kübik çukurlu şablon: D1 (x50)

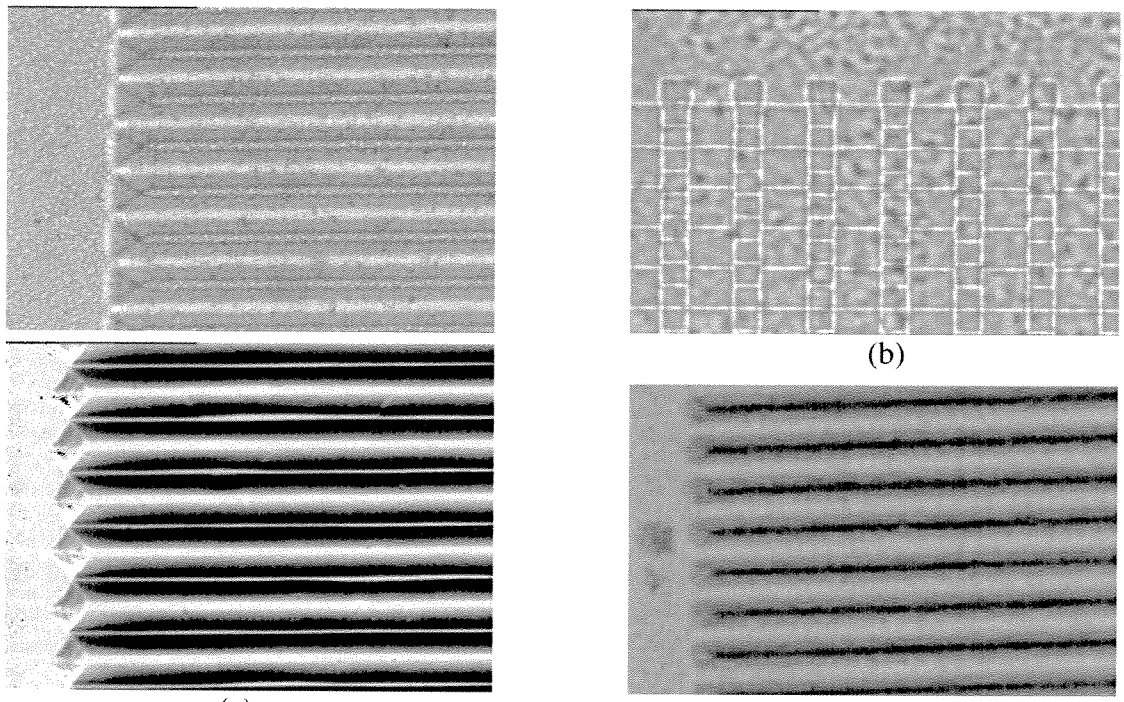


Kanallı şablonlar: A3, A4, B3 (x121,5)

Şekil 4. Mikrodesenli silikon şablonların stereozoom mikroskobu (Nikon SMZ 1500) ile alınan görüntüleri.

II. Mikrokontak damga ve polimerik film üretimi:

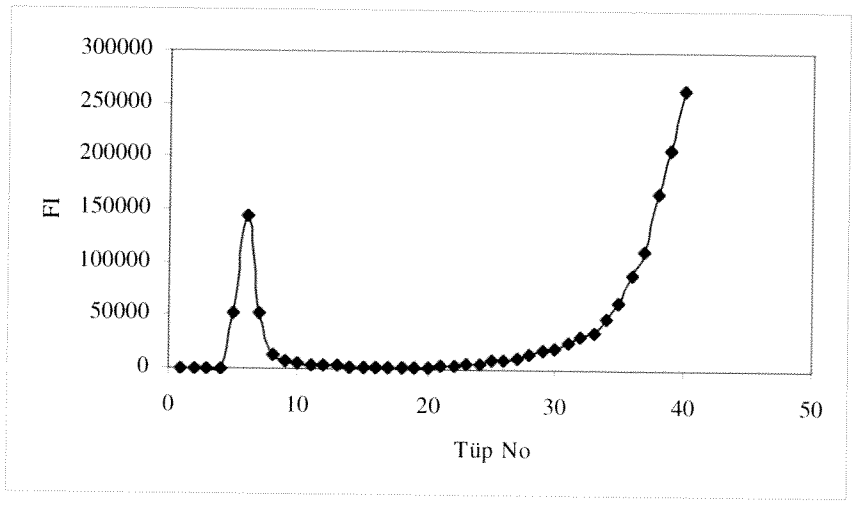
Silikon şablon üzerindeki desen yüksek duyarlılıkla mikrokontak damga, mikrodesenli PHBV filmler, PHEMA jeller ve PHBV8/PHEMA IPN yapılar üzerine şablon deseninin tersini yansıtacak şekilde taşınabilmiştir (Şekil 5).



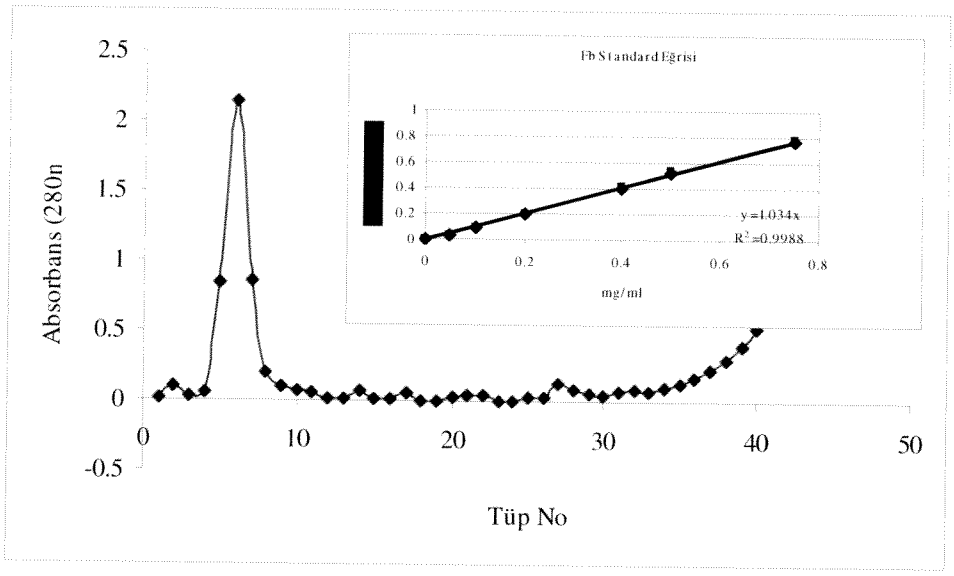
Şekil 5. Mikrodesenli filmlerin ışık mikroskobu (Olympus IX-70 Inverted System Microscope) ile elde edilen görüntüleri. a) PHBV A4 (x75), b) PHBV D1 (x150), c) PHEMA B3 (x75), d) PHBV8/PHEMA IPN A3 (x150).

III. Polimerik yüzeylere bağlanacak fibrinojenin FITC ile İşaretlenmesi

FITC-fibrinojenin ve bağlanmamış FITC'nin GPC kromatogramı Şekil 6'da verilmiştir. Moleküler ağırlığa göre ayırım yapan jel kromatografisi ile farklı molekül ağırlıklarına sahip FITC ile işaretlenmiş fibrinojen ve bağlanmamış FITC farklı tüplerde gelmiştir (Şekil 6). Aynı tüplerin 280 nm'de okunan abzorbansları da protein ve FITC'nin birbirinden ayırımının başarılı olduğunu göstermiştir (Şekil 7). Protein miktarı ve okunan FI değerlerine göre 5-7 numaralı tüpler biraraya toplanıp bağlama işlemi için kullanılmıştır. FITC-fibrinojen çözeltisinin konsantrasyonu fibrinojen ile oluşturulan kalibrasyon eğrisinden 0.948 mg/ml olarak bulunmuştur.



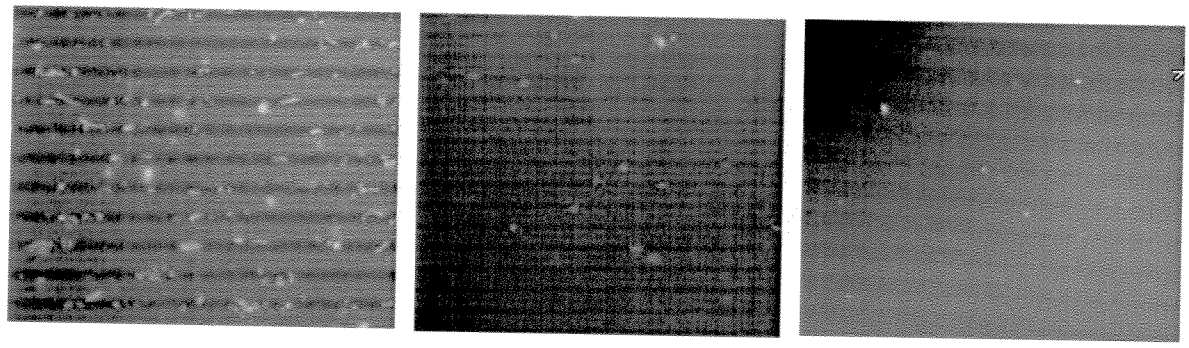
Şekil 6. FITC-fibrinojen ve bağlanmamış FITC'nin spektroflorometrik olarak elde edilen kromatogramı.



Şekil 7. G-25 kolonundan elüsyonu yapılan tüplerdeki protein miktarlarının incelenmesi için 280 nm dalga boyunda ölçülen abzorbans değerleri, (küçük şekil protein miktarının ölçülmesi için hazırlanan fibrinojen kalibrasyon eğrisidir)

IV. Fibrinojenin mikrodesenli ve desensiz polimerik yapıların yüzeyine kovalent olarak ve adsorpsiyon yöntemiyle bağlanması

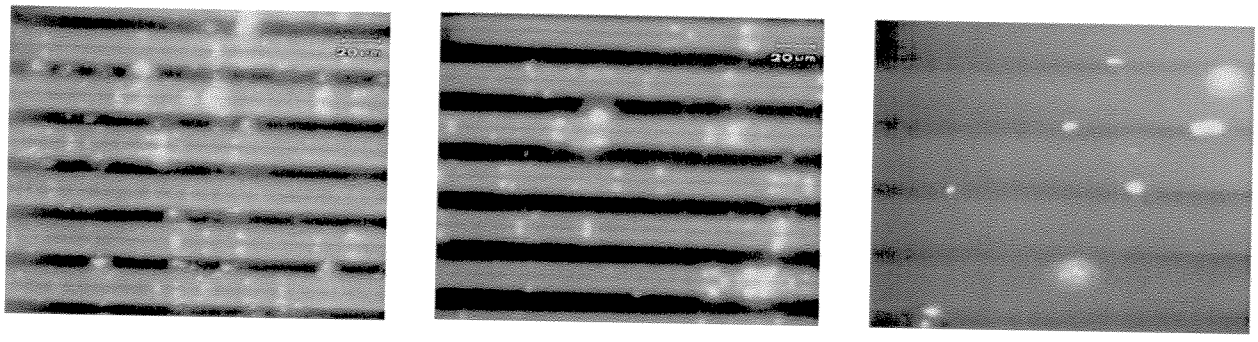
Kovalent olarak bağlanan FITC-fibrinojenin mikrodesenli polimerik yapılarda daha çok kanal yan yüzeyleri ya da kanal tabanlarını tercih ettiği görülmüştür (Şekil 8). PHBV8/PHEMA IPN yapılarının kalın olması nedeniyle bu filmlerden iyi görüntüler elde edilememiştir.



(a) (b) (c)

Şekil 8. Epiklorohidrin ile a) PHBV8 film, (x150), b) PHEMA, (x150), c) PHBV8 / PHEMA IPN film (x75), yüzeylerine bağlanmış FITC-fibrinojenin floresan mikroskop görüntüleri.

Şekil 9'da görülen sarı-yeşil yapılar yüzeye bağlanmış FITC-fibrinojen moleküllerine aittir. Mikrodesenli polimerik yapılara bağlanan proteinlerin daha çok paralel kanalların yan yüzeylerini tercih ettiği gözlenmiştir.



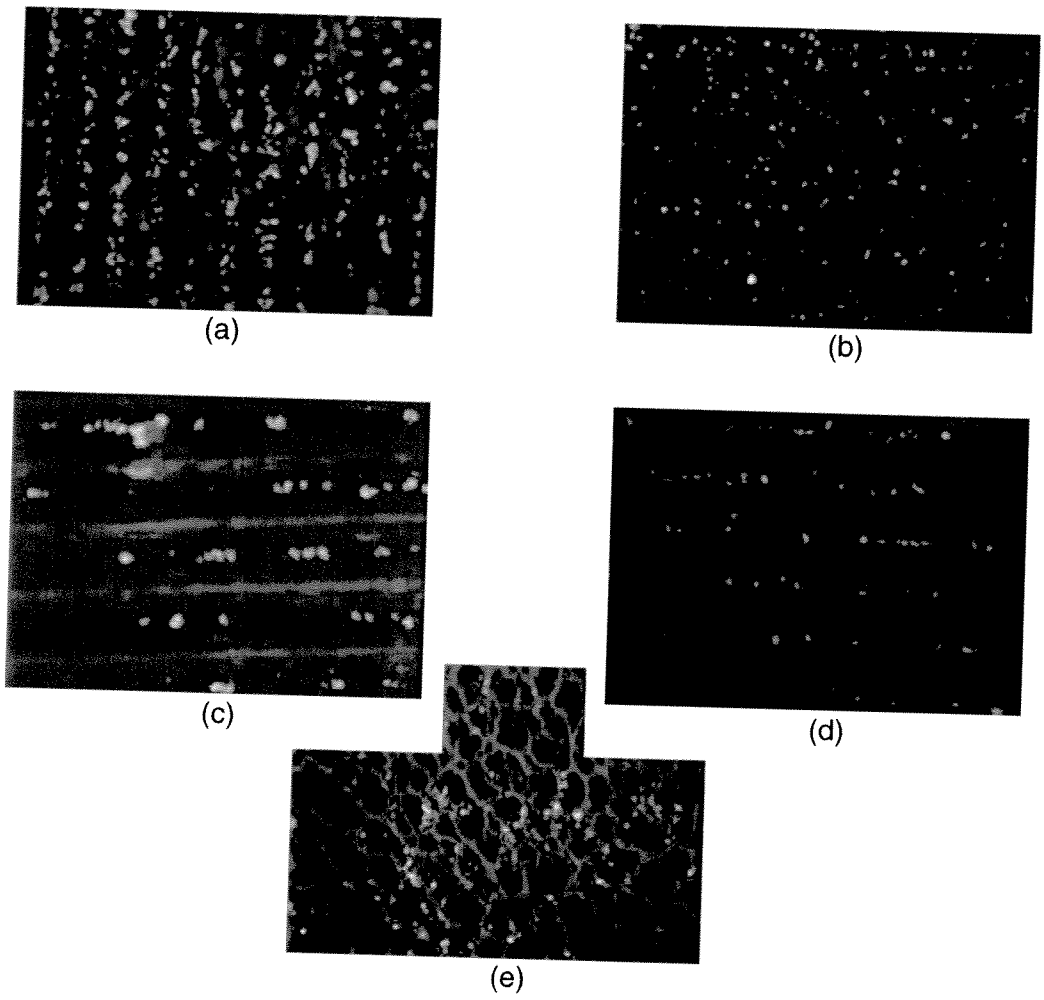
(a) (b) (c)

Şekil 9. B3 şablonu ile hazırlanmış mikrodesenli film yüzeylerine adsorpsiyon yöntemiyle bağlanmış FITC-fibrinojenin floresan mikroskobu görüntüleri. a) PHBV8 film, b) PHEMA, ve c) PHBV8/PHEMA (x300 büyütme)

V. Alkalen fosfataz (ALP) enziminin mikrodesenli ve desensiz yüzeylere kovalent olarak bağlanması ve karakterizasyonu

V-a) İndirekt immün boyama ile bağlanan ALP enzimlerinin incelenmesi

Mikroskopik incelemelerde (Şekil 10a-d) mikrodesenli yapılarda ALP enziminin kanal ya da kuyucuk içlerine bağlandığı gözlenmiştir. Şekil 10 e'de desensiz PHBV8/PHEMA IPN filmlerinde yüzeye homojen dağılmış olarak enzim bağlandığı görülmüştür.



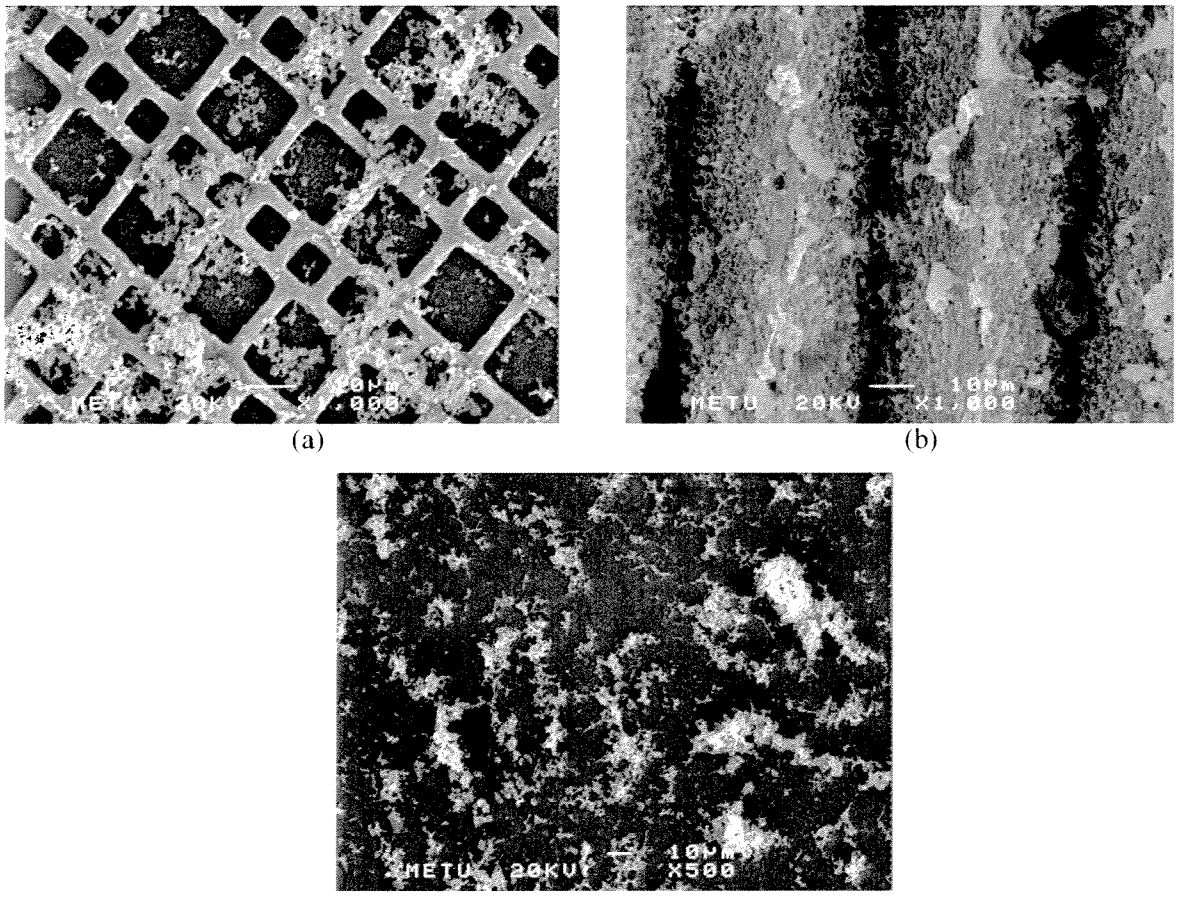
Şekil 10. Kovalent olarak mikrodesenli PHBV8/PHEMA IPN filmlerin yüzeyine bağlanmış ALP enziminin indirekt immün boyama floresan mikroskopi görüntüleri. a) PHBV8 film (A3), b) PHBV8 film (D1, kuyucuklu), c) PHEMA, d) PHBV8/PHEMA IPN (B3), ve e) desensiz (x150 büyütme).

V-b) Mikrokanallar ve kuyucuklar içinde bağlanmış ALP enziminin aktivitesinin incelenmesi

ALP'ye karşı yapılan indirekt immün boyaması ile ALP enzimlerinin mikrodesenli yapılarda başarı ile kanal içlerine bağlandıkları görülmüştü (Şekil 10). Epiklorohidrin ile kimyasal çapraz bağlama aşamasında enzim aktivitesinde kayıp olmadığı, hem filmlerin ALP enziminin sübstratını içeren çözelti içinde aktivite göstermeleri hem de organik fosfat kaynağı ve kalsiyum varlığında film yüzeyinde hidroksiapatit (Ca-P kristalleri) oluşturmaları ile ıspatlanmıştır (Şekil 11).

Mikrodesenli polimerik yüzeylerde kontrollü olarak kanallar içinde kristallerin oluşturulmasıyla doğal kemik hücredışı matriksinin taklit edilebileceği, bu sayede kemik hücrelerinin kanal içine bağlanmasının sağlanabileceği ve hücrelerin özelliklerini kaybetmeden yönlendirilmiş olarak büyütülebileceği düşünülmüştür.

Film yüzeyine kovalent tutuklanmış ALP enzimlerinin bazı filmlerde belirgin Ca-P kristalleri oluşumunu sağladığı, bazılarında ise belirgin bir birikmeye neden olmadığı gözlenmiştir. Kanallı ve kübik çukurlu filmlerin yüzeyinde Ca-P kristallerinin sadece çukurlarda değil, tepelerde de birikebileceği ve filmin tüm yüzeyinde homojen olmayabileceği görülmüştür (Şekil 11 a, b).



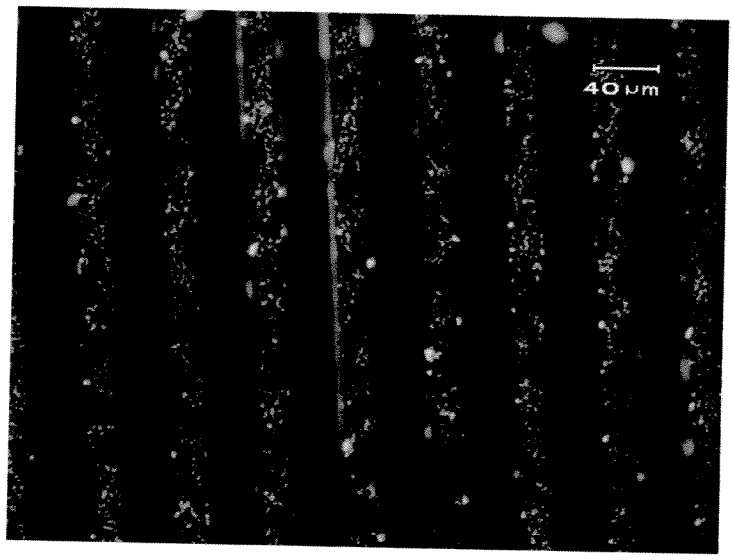
(a) (b)

(c)

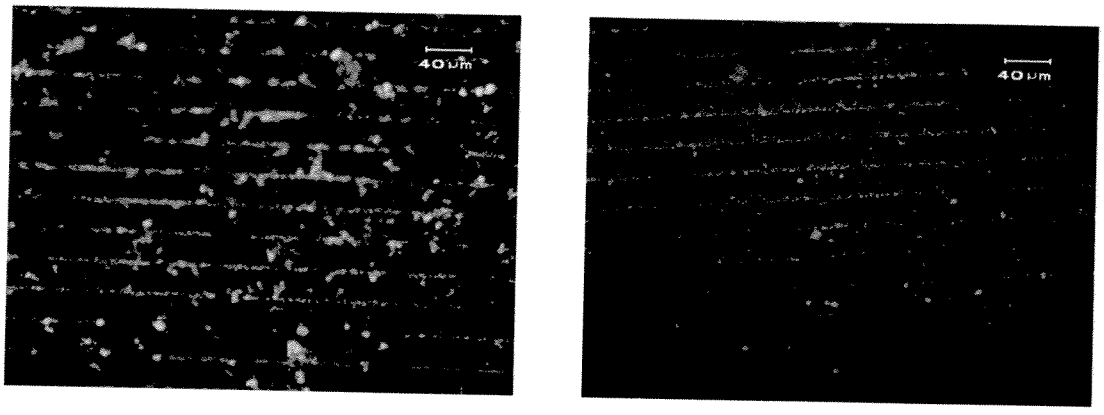
Şekil 11. Mikrodesenli PHBV8 filmlere kovalent olarak bağlanmış ALP enzimlerinin 90 sa Ca-organik fosfat kaynağı varlığında 37°C'de inkübasyonu sonucunda film yüzeyinde oluşturdukları Ca-P kristallerinin taramalı elektron mikroskobu görüntüleri. a) D1, b) A3 c) desensiz

VI. FITC-Dekstran'ın mikrokontak damgalama yöntemi ile polimerik yüzeylere transferi: Fibrinojen transferinin olabilirliğinin incelenmesi

PDMS damganın yüzeyinin protein ya da dekstran adzorpsiyonuna elverişli olamayacak kadar hidrofobik olması nedeniyle, bu yüzey önce O_2 RF plazma'ya maruz bırakılarak hidrofilikliği arttırılmıştır. O_2 RF plasma sonrası FITC-Dekstran moleküllerinin PDMS damganın yüzeyine adzorplandığı floresan mikroskobu ile saptanmıştır (Şekil 12).



Şekil 12. Yüzeyine FITC-Dekstran adzorplanmış PDMS damganın floresan mikroskopi görüntüsü (x300 büyütme).



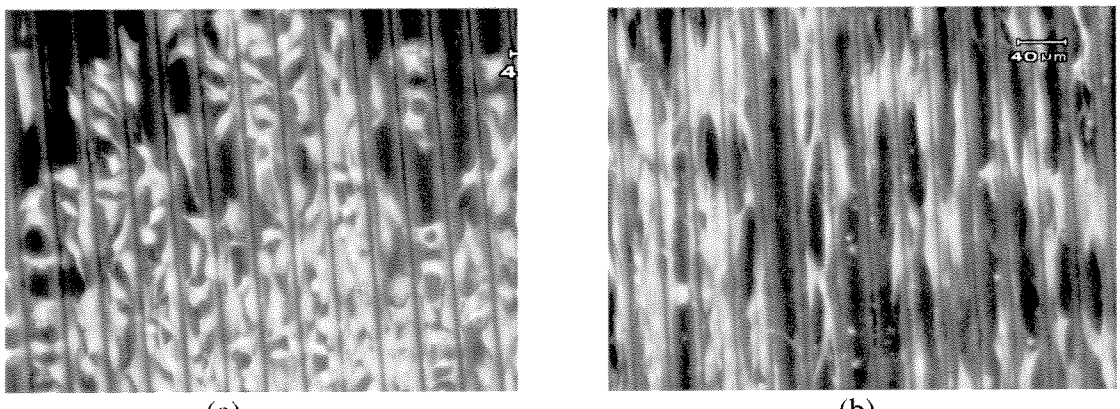
(a) (b)

Şekil 13. Mikrokontak damgalama yöntemi ile transfer edilmiş FITC-Dekstranın a) PHBV8 film,(x150 büyütme) ve b) PHBV8/PHEMA IPN film (x150 büyütme) yüzeylerine transfer edildikten sonra elde edilmiş floresan mikroskobu görüntüleri.

FITC ile işaretlenmiş dekstran desensiz PHBV8, PHEMA ve PHBV8/PHEMA IPN filmlerine transfer edilmiştir (Şekil 13).Transfer edilen proteinler sarı (ya da yeşile yakın), paralel şeritler olarak görülmektedir. PHBV8 ve PHEMA filmleri üzerine bağlanmış FITC-Dekstran protein şeritlerinde floresans daha parlak olup IPN yapılarda aynı verim elde edilememiştir. Bunun en belirgin nedeni hazırlanan IPN filmin diğer yapılara göre daha kalın ve mat olup ışığı daha az geçirmesidir. Buna karşın, PHEMA ve PHBV8/PHEMA IPN mebranlarına transfer edilen protein şeritlerinin PHBV8 yüzeyine transfer edilenlere göre daha düzgün ve kesintisiz olduğu gözlenmiştir. Elde edilen bu sonucun kullanılan iki yapının farklı yüzey özelliklerine sahip olmasından, yani PHBV8'in diğer yapılara göre daha hidrofobik oluşundan kaynaklandığı düşünülmektedir.

VII. İn vitro Çalışmalar

Bu proje çerçevesinde, farklı kimyasal ve fiziksel yüzey modifikasyonlarına sahip filmlerin kemik hücresi yönelimi üzerindeki etkilerinin ve bunun hücre aktivitesine olası etkilerinin saptanması amacıyla, hücre kaynağı olarak bir kemik osteosarkoma hücresi olan Saos-2'nin kullanılması planlanmıştı. Ancak, bu hücrelerin film yüzey topografisinden normal kemik hücrelerinden farklı şekilde etkilenmeleri ve belirli bir doğrultuda yönelimlerinin sağlanamaması sebebiyle bu çalışmada, sıçan kemik iliği hücrelerinin farklılaştırılması ile elde edilecek kemik hücrelerinin (osteoblast) kullanılmasına karar verildi (Şekil 14).



(a) (b)

Şekil 14. Saos-2 ve sıçan kemik iliği hücrelerinin farklılaştırılması ile elde edilmiş kemik hücrelerinin (osteoblast) yüzeyine Fb adzorplanmış A3 PHBV8 filmi üzerinde 7 günlük inkübasyon sonunda Acridine Orange boyaması ile elde edilen floresan mikroskop görüntüleri. (a) Saos-2, (b) osteoblast (x150 büyütme).

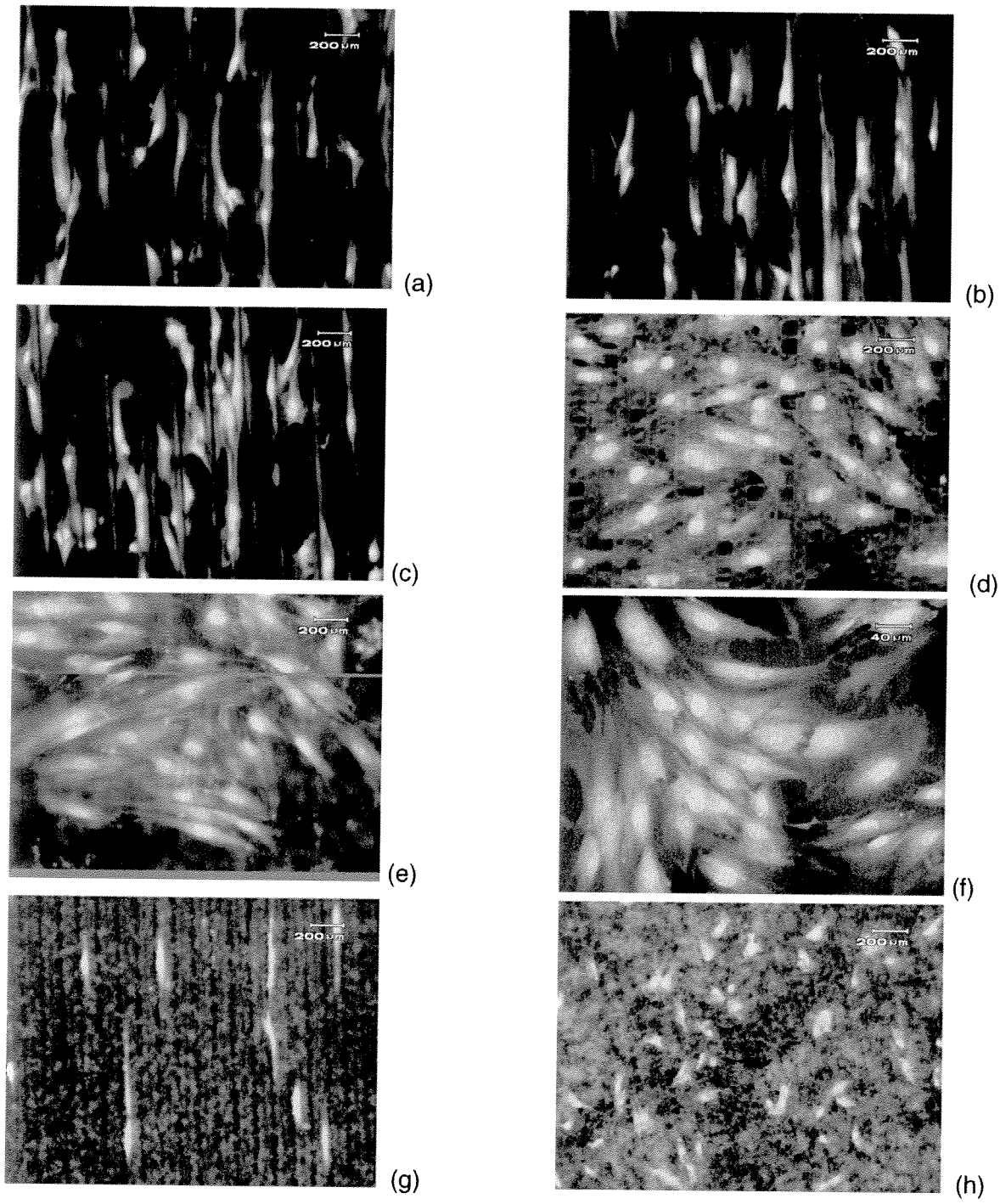
VII-a) Hücrelerin yöneliminin belirlenmesi:

Hücrelerin en çok Fb adzorplanmış filmler üzerine tutunduğu, Fb kovalent bağlanmış yüzeylerde ise modifikasyona uğramamış yüzeylere oranla daha yüksek sayıda hücrenin bulunduğu floresan mikroskobunda gözlenmiştir. Fb'nin kovalent tutuklandığı filmler arasında en çok hücre D1 üzerinde saptanmıştır. Fb adzorplanmış D1 filmleri üzerinde hücrelerin çekirdeklerinin büyük çoğunluğunun büyük kuyucuklarda yer aldığı görülmüş, ancak hücrelerin uzantılarında herhangi bir lokalizasyona rastlanmamış, rasgele bir dağılım görülmüştür (Şekil 15d). Fb'nin kovalent olarak tutuklandığı filmler üzerinde aşırı protein birikmesi gözlenmiş ve bunun besiyerindeki proteinlerin film yüzeyinde bulunan epiklorohidrin ara bağlayıcının serbest ucuna bağlanması sonucu oluştuğu düşünülmektedir (Şekil 15 g ve h).

Tablo 5'te mikrokanallı filmler (A3, A4, B3) üzerindeki hücrelerin kanal doğrultusundan sapma açıları ve diğer yüzeylerde de rasgele alınmış bir çizgiye göre yerleşimleri verilmiştir. Mikrokanallı filmler üzerinde belirgin bir fark olmamakla birlikte, çukur taban genişliği arttıkça sapma açısının da arttığı görülmektedir. İşlenmemiş mikrokanallı filmler üzerinde çok az sayıda (1-6) hücre gözlenmiş ve bunların da kanal doğrultusunda uzandıkları görülmüştür. İşlenmemiş D1 filmi üzerindeki hücrelerin yuvarlak bir morfolojiye sahip olmaları nedeniyle sapma açıları belirlenememiştir. Genel olarak düz yüzeylerde ve D1 üzerinde hücrelerin rastgele yönlendiği görülmektedir.

Tablo 5. Farklı PHBV örnekler üzerindeki sapma açıları

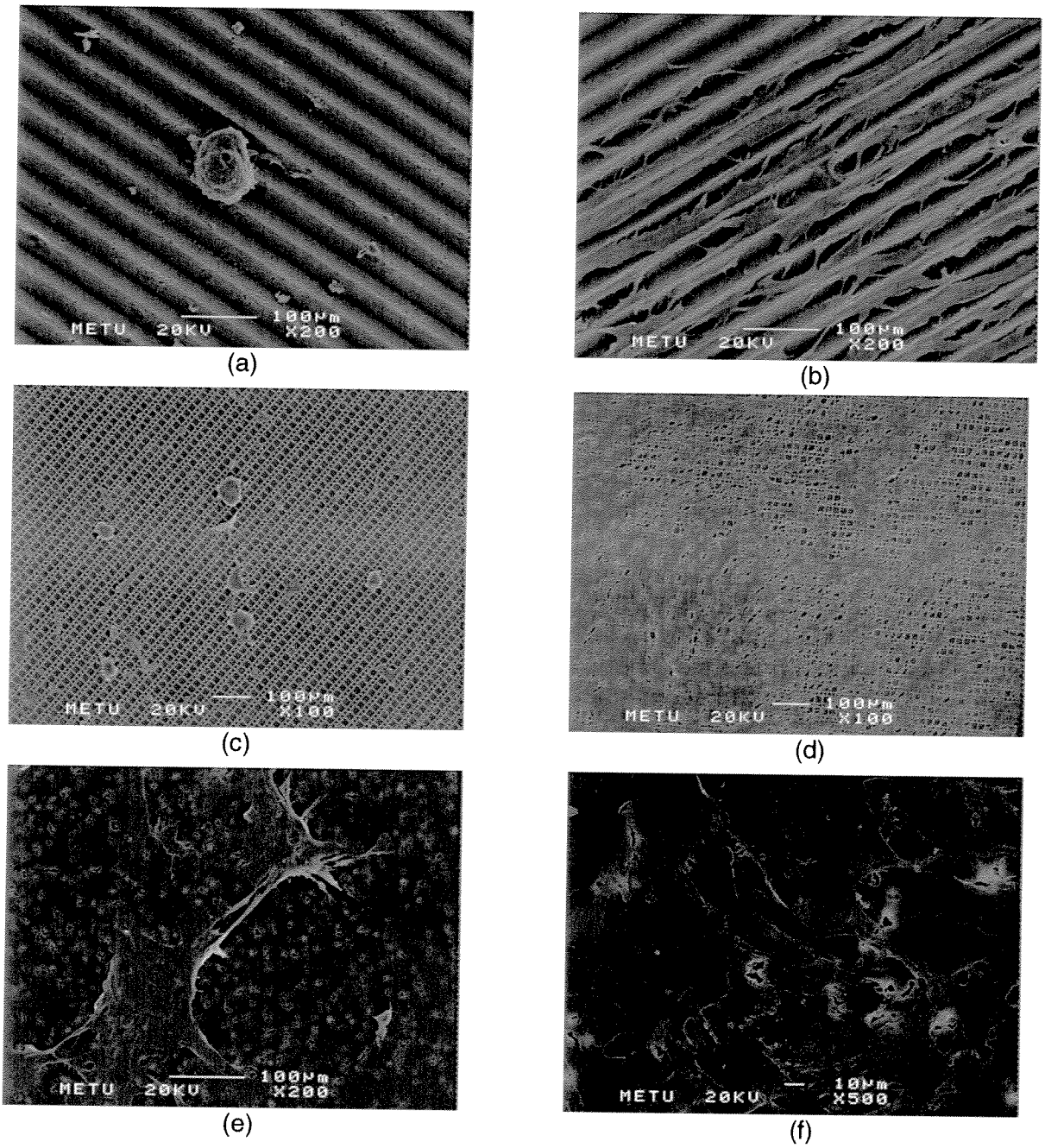
Kimyasal İşlem / Örnek	İşlenmemiş	Fb Adzorplanmış	Fb Kovalent Tutuklanmış
A3	0	4.66 ± 7.59	5.26 ± 11.94
A4	0	3.32 ± 6.75	2.45 ± 6.46
B3	0	4.21 ± 7.73	4.00 ± 10.03
D1	–	37.08 ± 23.12	48.26 ± 23.25
Düz	41.82 ± 21.75	44.90 ± 25.36	42.85 ± 27.37
TCPS	37.71 ± 30.35		



Şekil 15. Acridine Orange ile boyanmış osteoblast hücrelerinin yüzeyine Fb adzorplanmış (x150) (a, b, c, d, e, f) ve kovalent tutuklanmış (x 75) (g, h) filmler üzerindeki morfolojileri. a) A3, b) A4, c) B3, d) D1, e) düz film, f) TCPS, g) A4 ve h) D1.

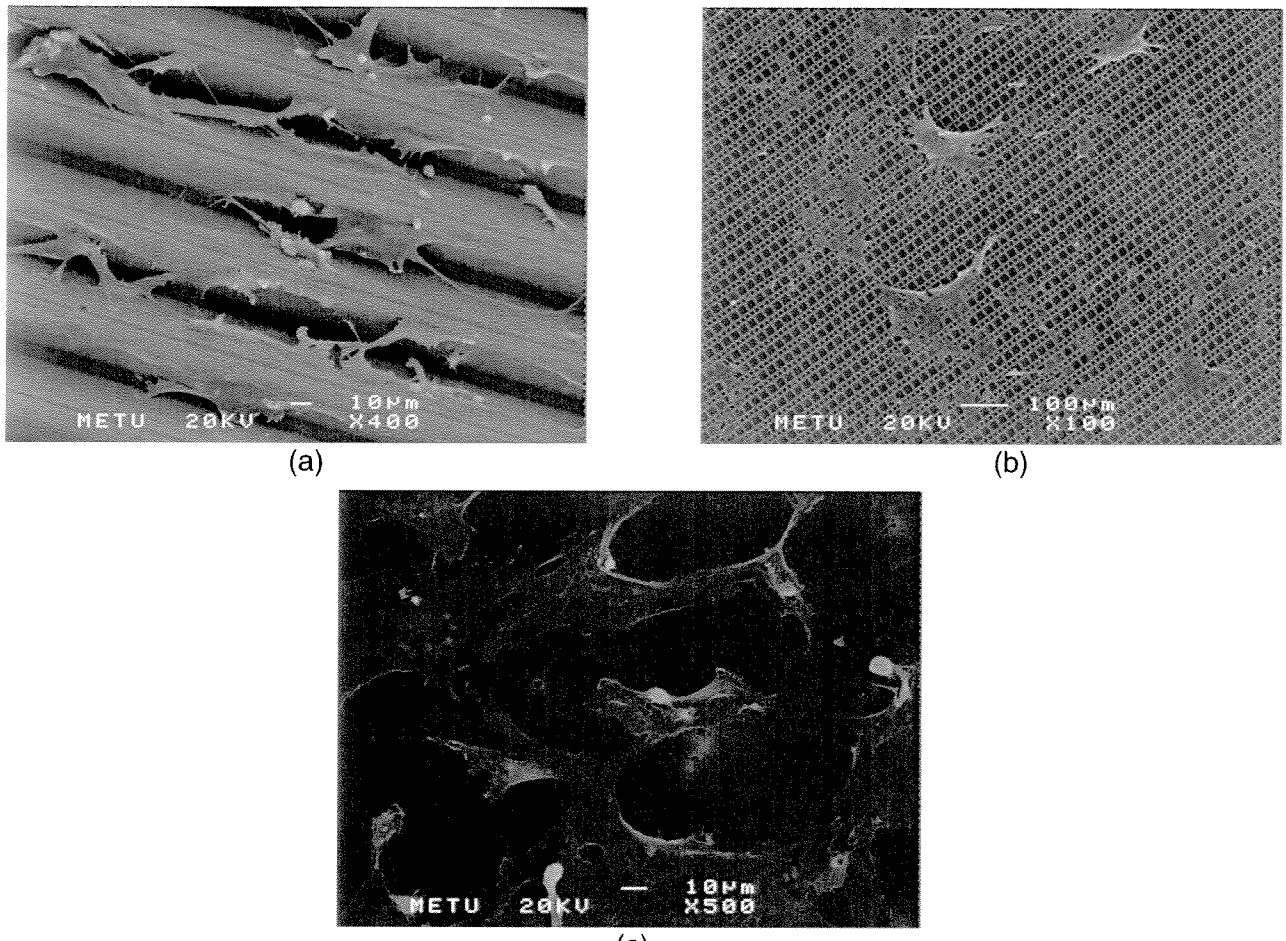
VII-b) Osteoblast hücrelerinin PHBV8, PHEMA ve PHBV8/PHEMA IPN yapılar üzerindeki organizasyonunun ve mikrodesenler üzerindeki yönelimlerinin taramalı elektron mikroskobu ile incelenmesi

Hücre ekimini takiben 4 günlük inkübasyon sonunda elde edilen taramalı elektron mikroskobu görüntüleri işlenmemiş tüm polimer yüzeylerin, desenli ya da desensiz, hücre tutunmasına elverişli olmadığını ortaya çıkarmıştır (Şekil 16a, 16c, 16e, 18a ve 19a).



Şekil 16. Osteoblast hücrelerinin kimyasal modifikasyona uğramamış (işlenmemiş) (a, c, e) ve yüzeyine Fb adzorplanmış (b, d, f) PHBV8 filmler üzerinde 4 günlük inkübasyonu sonunda elde taramalı elektron mikroskobu görüntüleri. (a, b) A3, (c, d) D1 ve (e, f) Düz film.

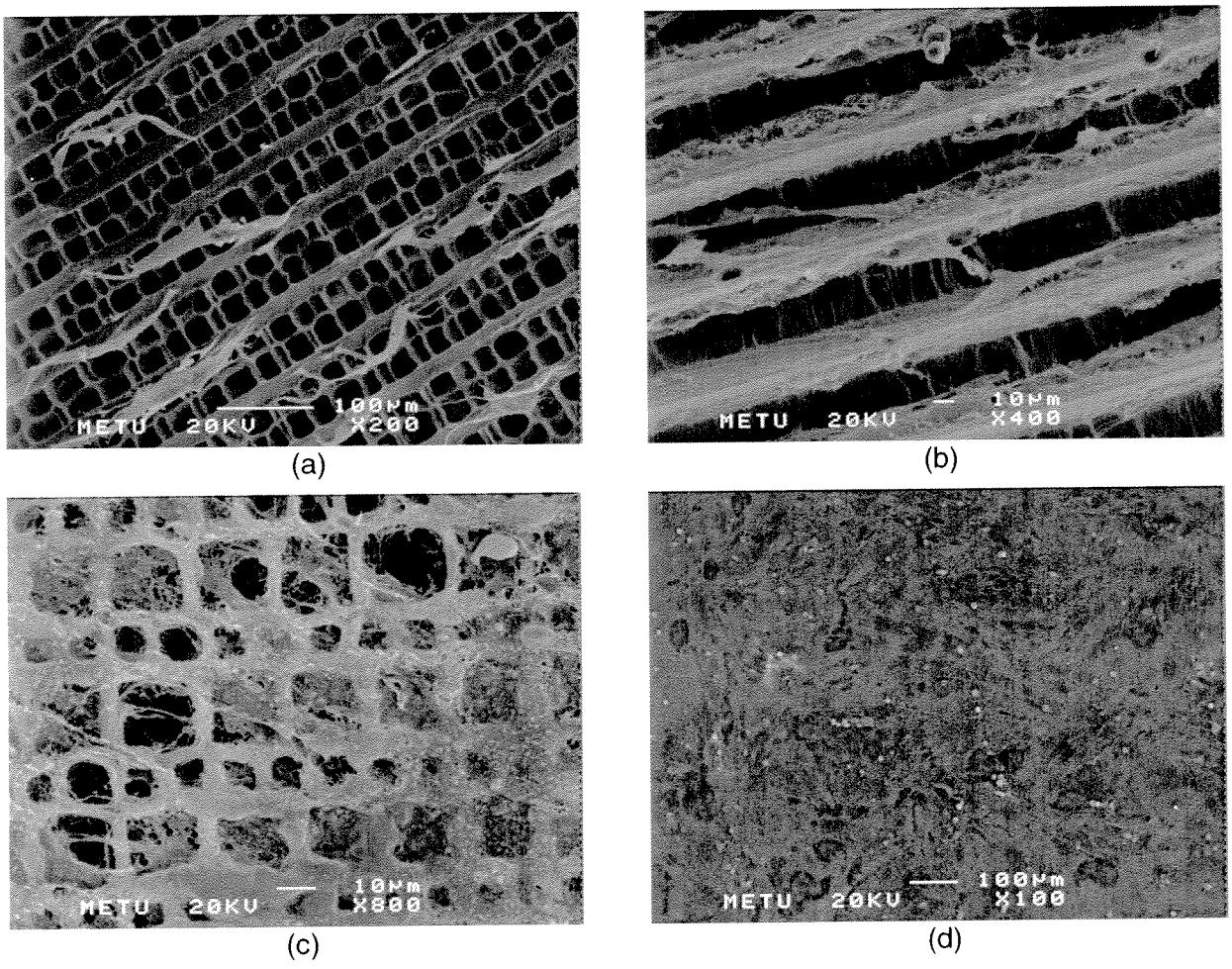
İşlenmemiş polimerler arasında hücre tutunmasına en elverişlisi PHBV8/PHEMA IPN olmuştur (Şekil 19a). Bu sonuç ise, PHBV çok hidrofobik, PHEMA çok hidrofilik iken PHBV8/PHEMA IPN'in ikisinin ortasında bir hidrofilisiteye sahip olması ile açıklanabilir. Hücrelerin genelde orta düzeyde bir hidrofilisiteye sahip yüzeylere tutunmayı tercih ettikleri bilinmektedir. Hidrofobik PHBV yüzey (desenli ya da densiz) üzerindeki hücreler, yüzeye tutunmak yerine birbirleriyle etkileşip büyük hücre kümeleri oluşturmuşlardır (Şekil 16 a, c, e). İşlenmemiş mikrokanallı PHEMA ve IPN üzerindeki hücreler ise az olmalarına karşın kanallar doğrultusunda paralel uzanmışlardır (Şekil 18a ve 19a).



Şekil 17. Osteoblast hücrelerinin yüzeyine kovalent olarak ALP tutuklanmış ve bu enzim sayesinde yüzeyinde Ca-P kristalleri biriktirilmiş PHBV8 filmler üzerinde 4 günlük inkübasyonu sonunda elde edilen taramalı elektron mikroskobu görüntüleri. a) A3, b) D1 ve c) Düz film.

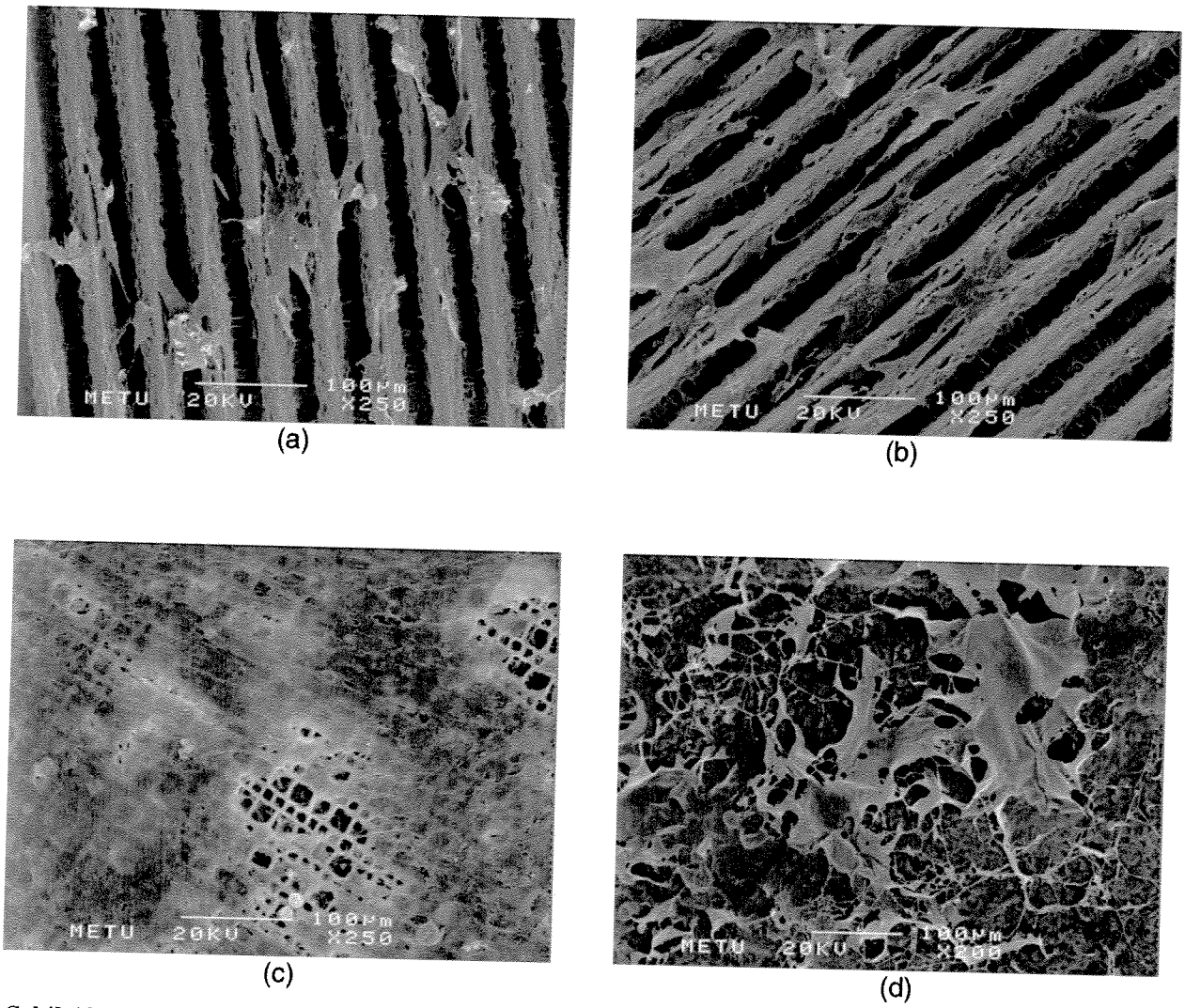
Polimer film yüzeyine fibrinojen adzorplanması ya da yüzeye tutuklanmış ALP enzimi sayesinde Ca-P kristallerinin biriktirilmesi, yüzeye tutunan hücre sayısını ve homojen dağılımı büyük ölçüde arttırmıştır (Şekil 16b, 16d, 16e, 17a-c, 18b, 18c, 19b ve 19c). Fibrinojen varlığında, tüm mikrokanallı filmler üzerindeki hücreler genelde kanalların yan duvarlarına tutunup kanal

doğrultusuna paralel uzanmışlardır (Şekil 16b, 18b ve 19b). Yüzeyine ALP enzimi tutuklanmış ve Ca-P kristalleri biriktirilmiş mikrokanallı filmler üzerindeki osteoblastlar ise daha büyük kanal doğrultusundan sapma açısına sahip olmuşlardır (Şekil 17a).



Şekil 18. Osteoblast hücrelerinin kimyasal modifikasyona uğramamış (işlenmemiş) (a) ve yüzeyine Fb adzorplanmış (b, c, d) PHEMA filmler üzerinde 4 günlük inkübasyonu sonunda elde edilen taramalı elektron mikroskobu görüntüleri. a, b) A3, c) D1 ve d) Düz film.

Yüzeyine Fb adzorplanmış tüm mikrokuyucuklu filmler üzerindeki hücrelerin kuyucukların içine lokalize olmadığı ve yükseltileri aşarak herhangi bir yönelime sahip olmaksızın tüm desen yüzeyini kapladıkları gözlenmiştir (Şekil 16d, 18c ve 19c). Aynı şekilde düz polimerik filmler üzerindeki osteoblastlar herhangi bir yönelime sahip olmaksızın rasgele yüzeye uzanmışlardır (Şekil 16e, 16f, 17c, 18d ve 19d).

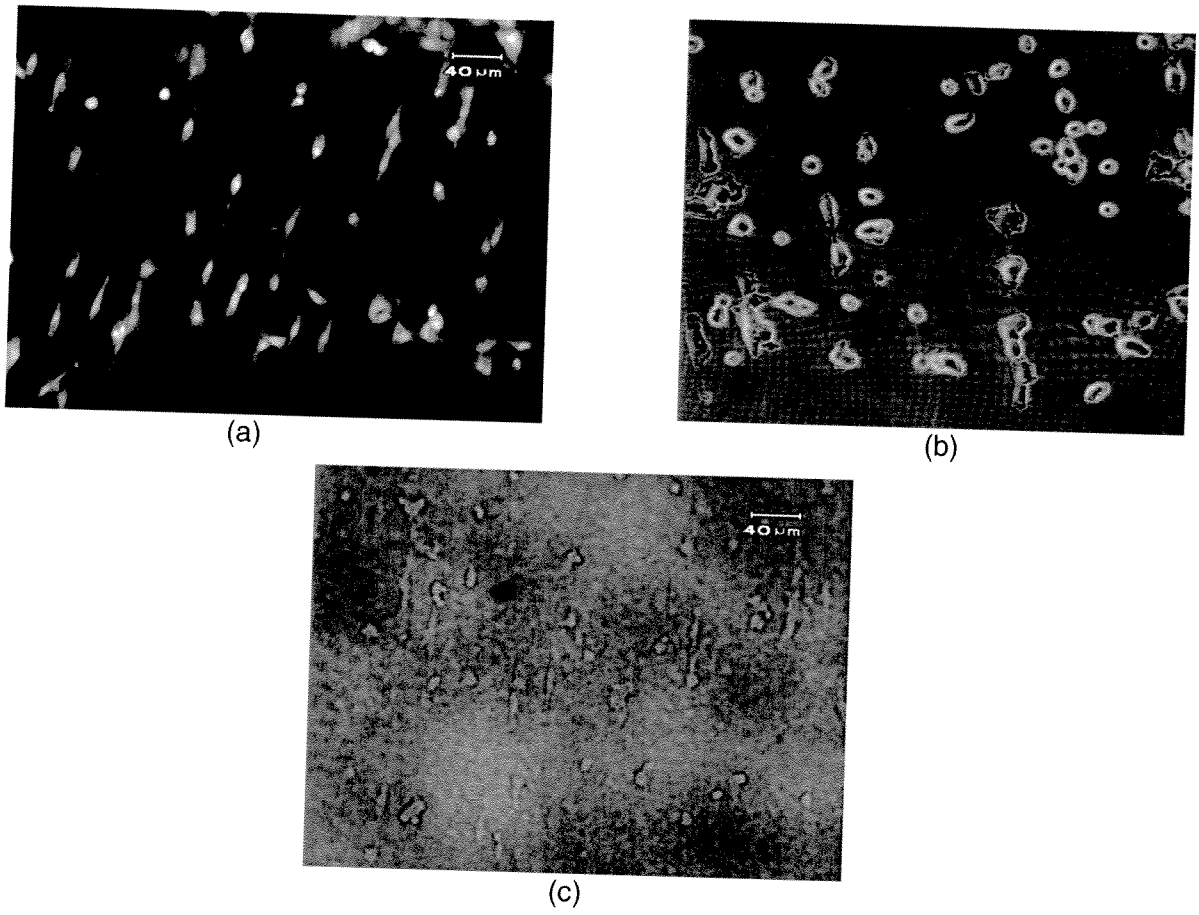


Şekil 19. Osteoblast hücrelerinin kimyasal modifikasyona uğramamış (işlenmemiş) (a) ve yüzeyine Fb adzorplanmış (b, c, d) PHBV8/PHEMA IPN filmler üzerinde 4 günlük inkübasyonu sonunda elde edilen taramalı elektron mikroskobu görüntüleri. a, b) A3, c) D1 ve d) Düz film.

VII-c) Mikrokontak damgalama yöntemiyle PHBV, PHEMA ve PHBV8/PHEMA IPN yapılar üzerine paralel şeritler halinde transfer edilen fibrinojenin hücre yönelimi üzerindeki etkisi

Mikrokontak damgalama yöntemiyle düz film yüzeyine adzorplanan Fb sayesinde osteoblastların hücre ekimini takiben 4 saatlik bir süre sonunda tüm polimerik filmler üzerinde Fb şeritler doğrultusunda yönlendirilebileceği gösterilmiştir (Şekil 20). Mikrokanallı film yüzeyinde ise hücre yönlendirmesi için yaklaşık 24 saate ihtiyaç vardır. Bu çalışmada PDMS damga, düz film yüzeyine aralarında 40 mikron uzaklık bulunan paralel 10 mikron genişliğinde Fb şeritler baskılayacak şekilde tasarlanmıştı. Her ne kadar hücre yönlendirmesi bu boyutlarla geçekleştirilebilmiş ise de, hücrelerin kalabalık oldukları yerlerde Fb şeritler arasında bağlantı oluşturabildikleri ve şeritlere dik olacak şekilde bile uzanabildikleri gözlenmiştir (Şekil 17a ve 17b). Bu nedenle şeritler arasındaki

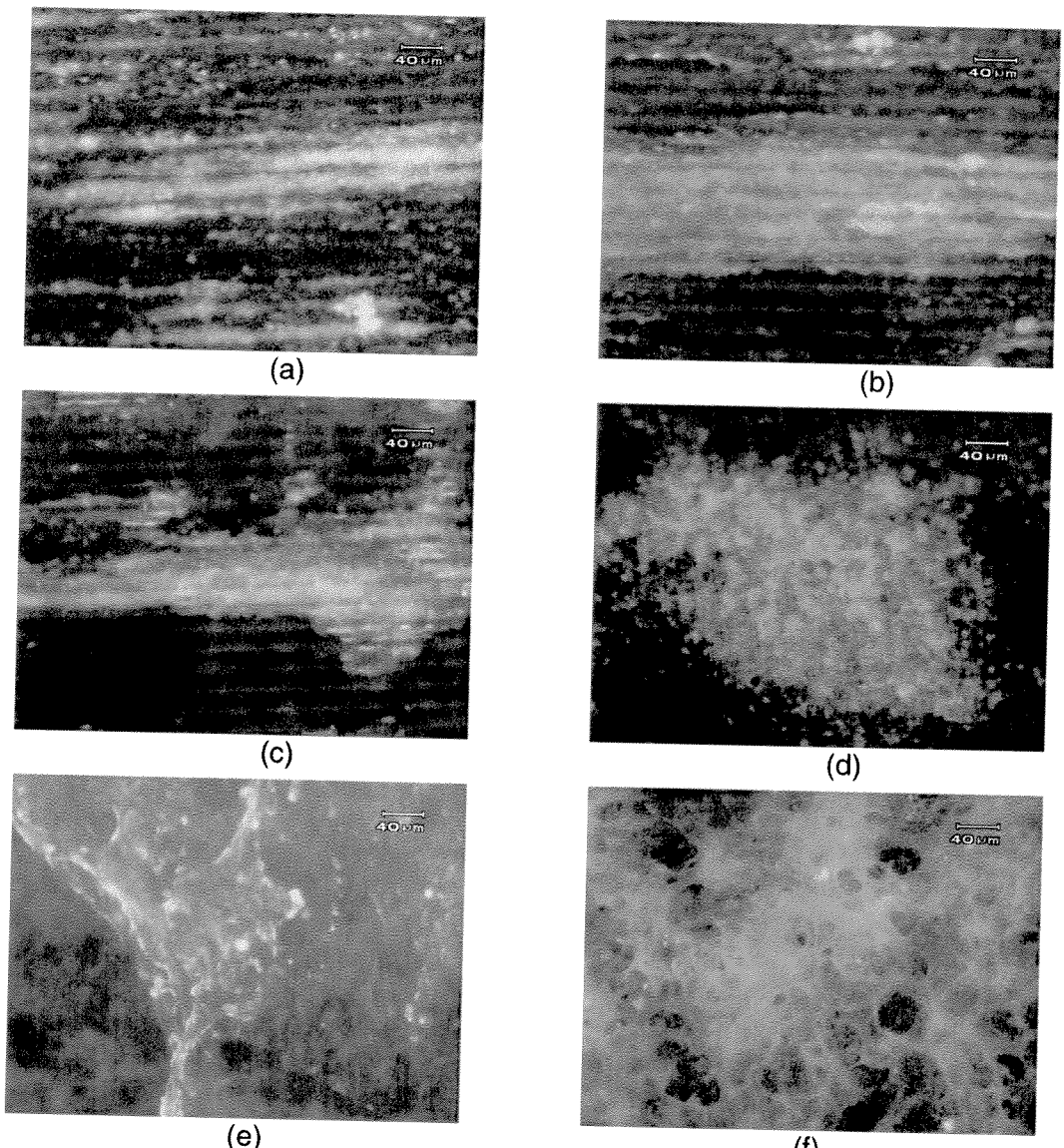
mesafenin daha geniş tutulmasının yönlendirilmiş hücre yüzdesinde artışa neden olacağı düşünülmektedir.



Şekil 20. Osteoblast hücrelerinin mikrokontak damgalama yöntemiyle yüzeyine paralel şeritler halinde fibrinojen transfer edilmiş filmler üzerindeki yönelimi (hücre ekimini takiben 4 sa sonunda elde edilmiş floresan ve ışık mikroskopisi görüntüleri, x150 büyütme). a) PHBV, b)PHEMA ve c)PHBV8/PHEMA IPN

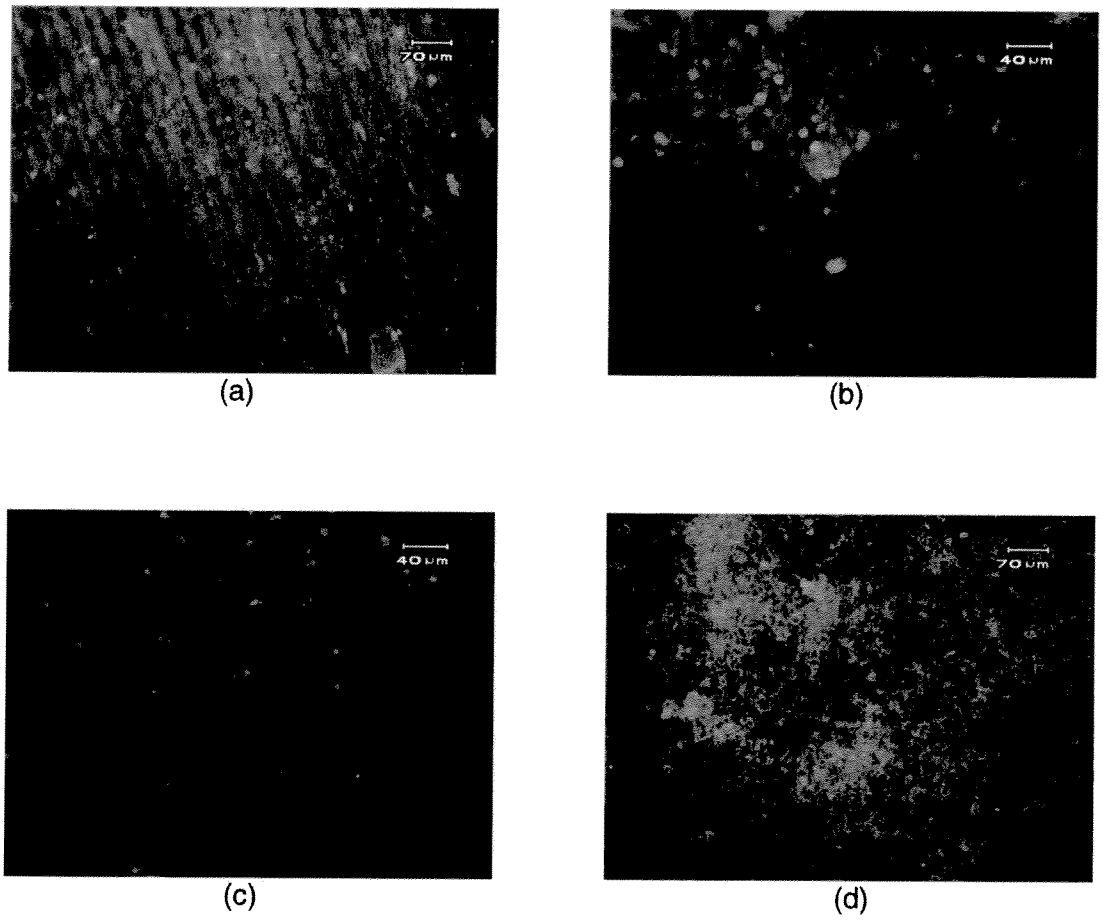
VII-d) Film yüzeyinde hücreler tarafından salgılanan kollajen tip I'in indirekt immün boyama ile işaretlenmesi:

Yüzeyine Fb adzorplanmış tüm PHBV8 filmlerin (A3, A4, B3, D1, düz) ve doku kültürü polistireninin (TCPS) yüzeyinde kemik hücrelerinin (film başına 5000 hücre ekildiğinde) kollajen tip I salgıladıkları saptanmıştır (Şekil 21). Mikrokanallı filmlerde kollajen tip I'in kanal içlerine biriktiği gözlenmiştir. Herhangi bir kimyasal modifikasyona tabi tutulmamış (işlenmemiş) PHBV filmlerde ve Fb'nin kovalent olarak tutuklandığı yüzeylerde ise, kollajen tip I belirgin olarak sadece D1'in yüzeyinde ve az da olsa düz filmin üzerinde saptanmıştır.



Şekil 21. Fb adzorplanmış PHBV film ve TCPS yüzeyinde hücreler tarafından salgılanan kollajen tipI'in indirekt immün boyama ile işaretlenmesi sonucu elde edilen floresan mikroskop görüntüleri (x150 büyütme). a) A3, b) A4, c) B3, d) D1, e) düz PHBV ve f) TCPS.

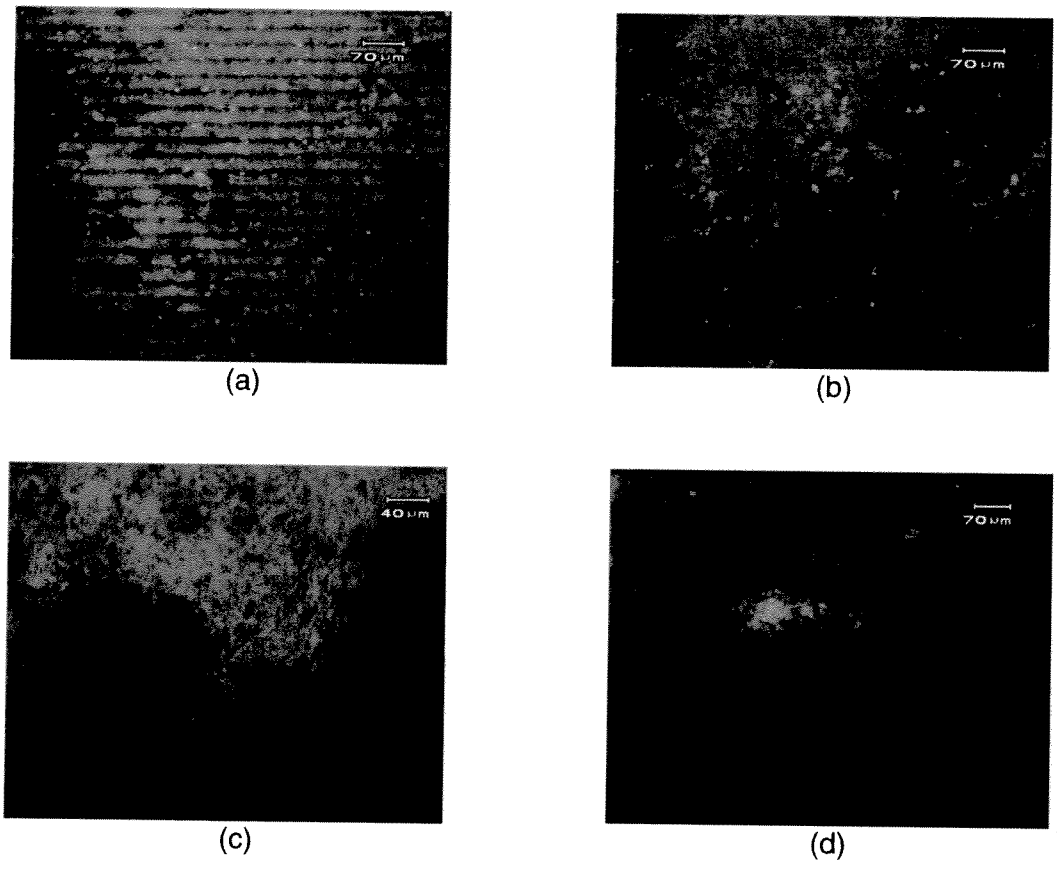
Yüzeyine kovalent olarak ALP tutuklanmış ve Ca-P oluşturulmuş PHBV8 filmlerin (A3, D1, düz) üzerine 15000 hücre ekilerek 2 haftalık inkübasyon sonunda elde edilen hücredışı matriksin kollajen tip I için immün boyanması sonucu elde edilen floresan mikroskop görüntüleri Şekil 22'de verilmiştir. Desenli ya da desensiz, tüm bu filmler üzerindeki kollajen tip I küçük kürecikler halinde saptanmıştır. Mikrokanallı film yüzeyindeki kollajen tip I'in genel olarak kanal içlerine lokalize olduğu gözlenmiştir.



Şekil 22. ALP tutuklanmış ve yüzeyinde bu enzimin Ca-P kristalleri oluşturduğu PHBV film ve işlenmemiş TCPS yüzeyinde hücreler tarafından salgılanan kollajen tipI'in indirekt immün boyama ile işaretlenmesi sonucu elde edilen floresan mikroskop görüntüleri (film başına 15000 hücre ekildiğinde). a) A3 (x75), b) D1 (x150), c) Düz (x150), ve d) TCPS (x75).

VII-e) Film yüzeyinde hücreler tarafından salgılanan Osteokalsin'in indirekt immün boyama ile işaretlenmesi

Bu çalışmada kullanılan kemik iliği kaynaklı kök hücrelerinin osteoblast hücrelerine farklılaşabildiğini kanıtlamanın bir yolu da vücutta sadece bu hücreler tarafından salgılanan Osteokalsin proteininin polimerik filmler ve TCPS üzerindeki inkübasyon sonunda bu yüzeylerde üretilebildiğinin gösterilmesidir. Bu amaçla, yüzeyine kovalent olarak ALP tutuklanmış ve Ca-P biriktirilmiş PHBV8 filmlerin (A3, D1, düz) üzerine 15000 hücre ekilerek 2 haftalık inkübasyon sonunda elde edilen hücredışı matriksin Osteokalsin için immün boyanması gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Osteokalsin'in tüm bu filmlerin yüzeyinde az da olsa, D1 ve A3 üzerinde küçük kürecikler halinde, üretilebildiğini göstermiştir (Şekil 23).



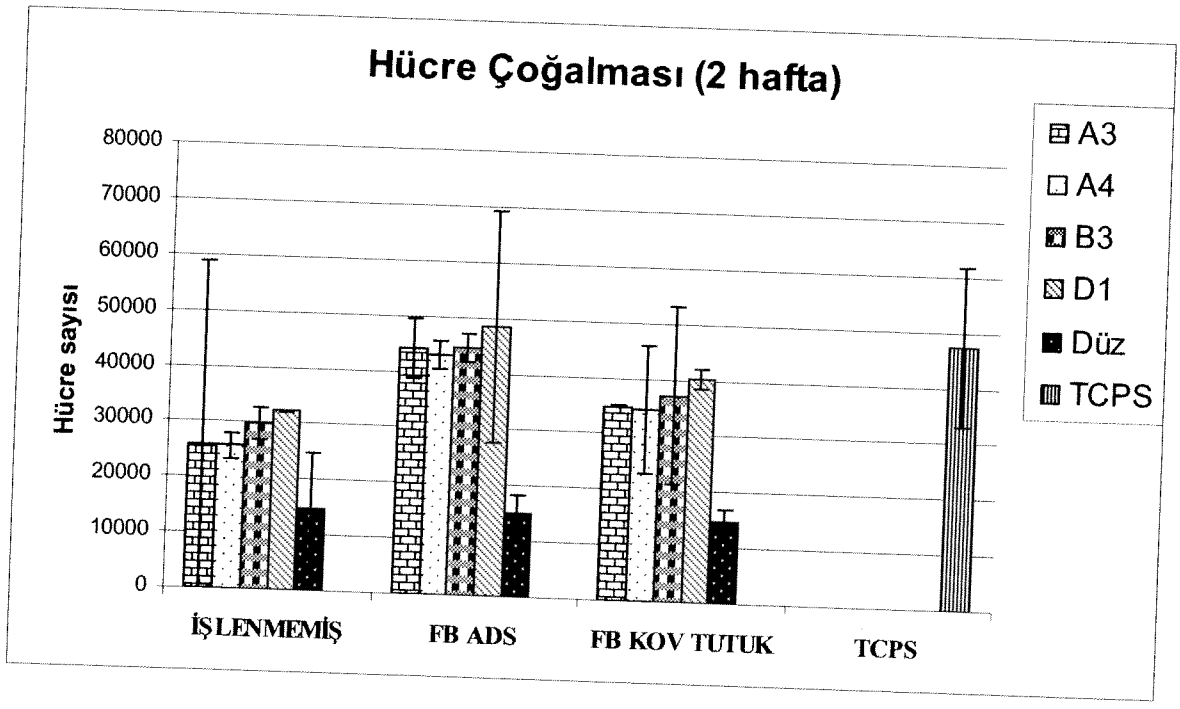
Şekil 23. ALP tutuklanmış ve yüzeyinde bu enzimin Ca-P kristalleri oluşturduğu PHBV film ve işlenmemiş TCPS yüzeyinde hücreler tarafından salgılanan osteokalsin'in indirekt immün boyama ile işaretlenmesi sonucu elde edilen floresan mikroskop görüntüleri (film başına 15000 hücre ekildiğinde, x75). a) A3, b) D1, c) Düz PHBV ve d) TCPS.

VII-f) Film Üzerindeki Hücre Çoğalmasının Tayini:

Yüzeyine Fb adzorplanmış, Fb kovalent tutuklanmış ve yüzeyi işlenmemiş PHBV8 filmler üzerine hücre ekimini (5000 hücre/film) takiben 24 sa sonra yüzeye tutunan hücre sayısını belirlemek amacıyla yapılan MTS testi sonunda, film yüzeyine tutunan hücre sayısının doku kültürü polistirenine tutunan hücre sayısından daha az olduğu belirlenmiştir. Farklı kimyasal modifikasyona sahip filmler üzerindeki hücre sayısı sıralanışı şöyledir:

Fb adzorplanmış filmler > Fb kovalent tutuklanmış filmler > İşlenmemiş filmler.

İki haftalık inkübasyon sonunda yapılan MTS testi sonuçları Şekil 24'te verilmiştir.



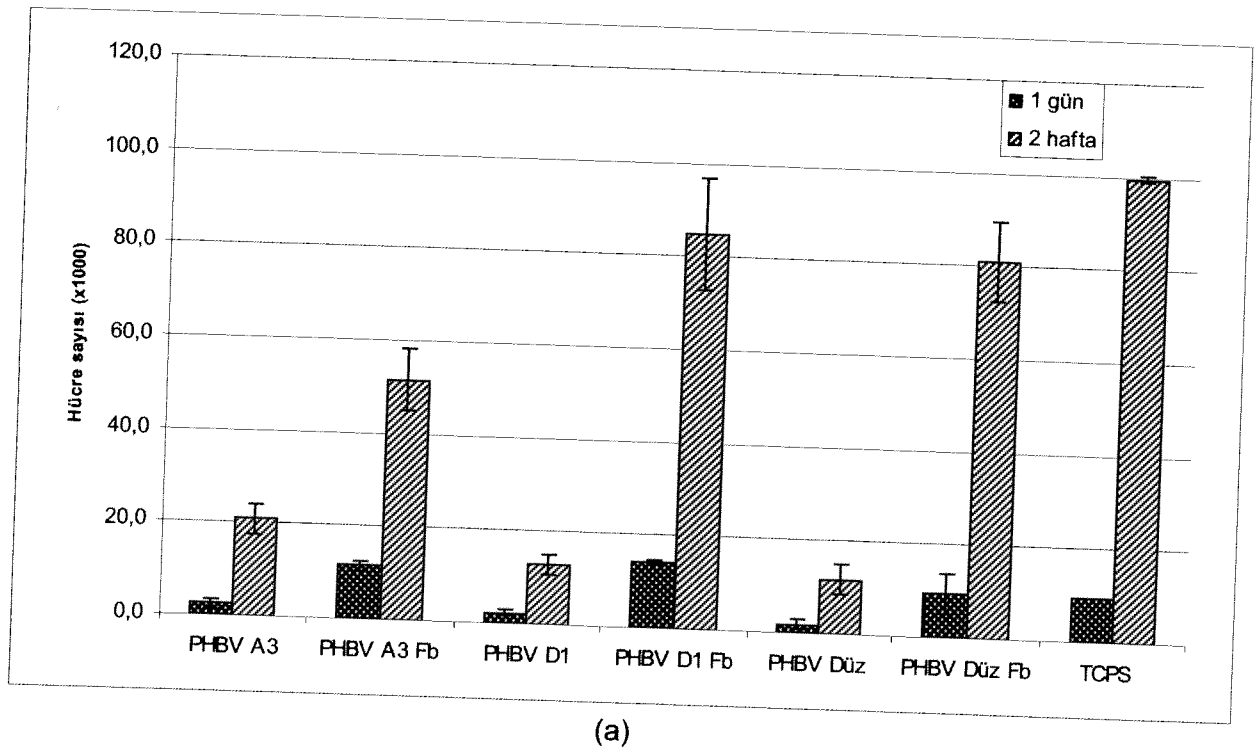
Şekil 24. PHBV8 Filmler ve TCPS üzerindeki iki haftada hücre çoğalması (film başına ekilen hücre sayısı: 5000, n=2).

Şekil 24'te, hidrofobik film yüzeyinin hücrelerin tutunmayı tercih ettikleri RGD amino asit sekanslarını taşıyan Fb ile modifiye edilmesi sonucu yüzeydeki hücre sayısının arttığı görülmektedir. Fb'nin PHBV8 yüzeyine adzorplanması hücrelerin en çok bu filmler üzerinde çoğalmasına ve hücre sayısının TCPS üzerindeki ile eşdeğer olmasına olanak sağlamıştır. Fb'nin kovalent olarak yüzeye tutuklanması ise işlenmemiş yüzeye oranla hücre çoğalmasında daha etkili olmuş, fakat bu filmler Fb adzorplanmış örneklerdekinden daha düşük hücre sayısına sahip olmuştur. Tek bir grup içindeki (aynı kimyasal modifikasyona fakat farklı topografiye sahip) PHBV8 filmler karşılaştırılırsa, düz filmlerin yüzeyinin tamamen pürüzsüz oluşunun hücre tutunmasını ve çoğalmasını zorlaştırdığı, kuyucuklu filmlerin (D1) ise herhangi bir yönlendirmeye neden olmasalar da hücrelerin tutunmasını ve

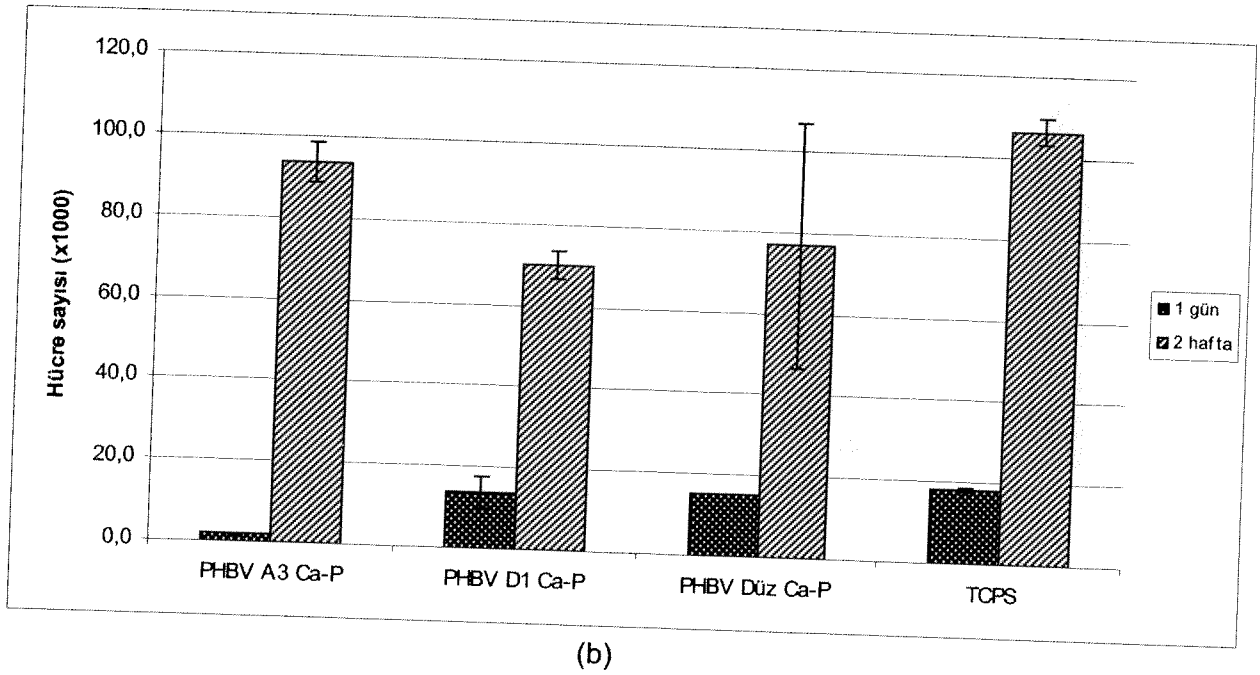
çoğalmasını büyük ölçüde arttırdığı görülmektedir. Bu da yüzeyde mikron düzeyindeki yükseltilerin varlığının önemini göstermektedir.

Şekil 24 dikkate alınarak, mikrokanallı filmlerin (A3, A4, B3) üzerindeki hücre sayısının ise D1'inkine yakın olduğu ve kendi aralarında belirgin bir farka neden olmadıkları görülmüştür. Bu nedenle takip eden çalışmalarda (PHBV8, IPN ve PHEMA filmlerin karşılaştırılması) mikrokanallı filmlerden sadece biri, A3, kullanılmıştır. Buna ek olarak Fb'nin yüzeye adzorplandığında kovalent bağlanmasına oranla hücre çoğalmasında daha etkili olması üzerine, takip eden çalışmalarda Fb ile yapılan kimyasal modifikasyonda sadece adzorplama uygulanmıştır.

PHBV8, IPN ve PHEMA filmler üzerine hücre ekiminde tutunan hücre sayısının sağlıklı belirlenebilmesi amacıyla film başına 15000 hücre ekilmiştir ve 1 gün sonunda alınan MTS testi sonuçları yüzeye tutunan hücre sayısını ve 2 hafta sonundaki MTS testi sonuçları ise film yüzeyindeki hücre çoğalmasını belirlemede kullanılmıştır. PHBV8 yüzeyine uygulanan kimyasal modifikasyonun (Fb adzorplama, ALP kovalent bağlama ve bu enzime Ca-P biriktirtme) işlenmemiş yüzeye göre hücre tutunmasını ve çoğalmasını genel olarak büyük oranda arttırdığı, ve hücre sayılarının TCPS üzerindeki ile eşdeğer olmasını sağladığı görülmüştür (Şekil 25). Yüzeyine Fb adzorplanmış PHBV8 filmler arasında en düşük hücre çoğalması mikrokanallı film (A3) üzerinde, yüzeyine ALP kovalent bağlanmış ve Ca-P biriktirilmiş PHBV8 filmler arasında ise en düşük hücre çoğalması mikrokuyucuklu film (D1) üzerinde gözlenmiştir (Şekil 25). IPN filmler üzerine Fb'nin adzorplanması yüzeye tutunan hücre sayısında artışa neden olmuş ve değerler D1 ve düz IPN'lerde TCPS üzerindekine eşdeğer düzeyde saptanmıştır (Şekil 26a). 2 hafta sonunda tüm IPN filmler üzerindeki hücre sayısı desen ve Fb varlığı fark etmeksizin aynı düzeye ulaşmış, fakat D1 ve düz IPN filmler üzerindeki değerler tutunan hücre sayısından daha düşük bulunmuştur (Şekil 26a). PHEMA filmler üzerindeki hücre tutunma ve çoğalma verileri IPN filmlerinkine çok benzer olmakla birlikte işlenmemiş PHEMA A3 filmler üzerinde herhangi bir hücre tutunma ve çoğalma verisi elde edilememiştir (Şekil 26b). Dolayısıyla PHEMA filmlerin hücre taşıyıcısı olarak kullanılabilmesi için kimyasal olarak modifiye edilmesi ve hücre tutunmasına elverişli hale getirilmesi gerektiği saptanmıştır.

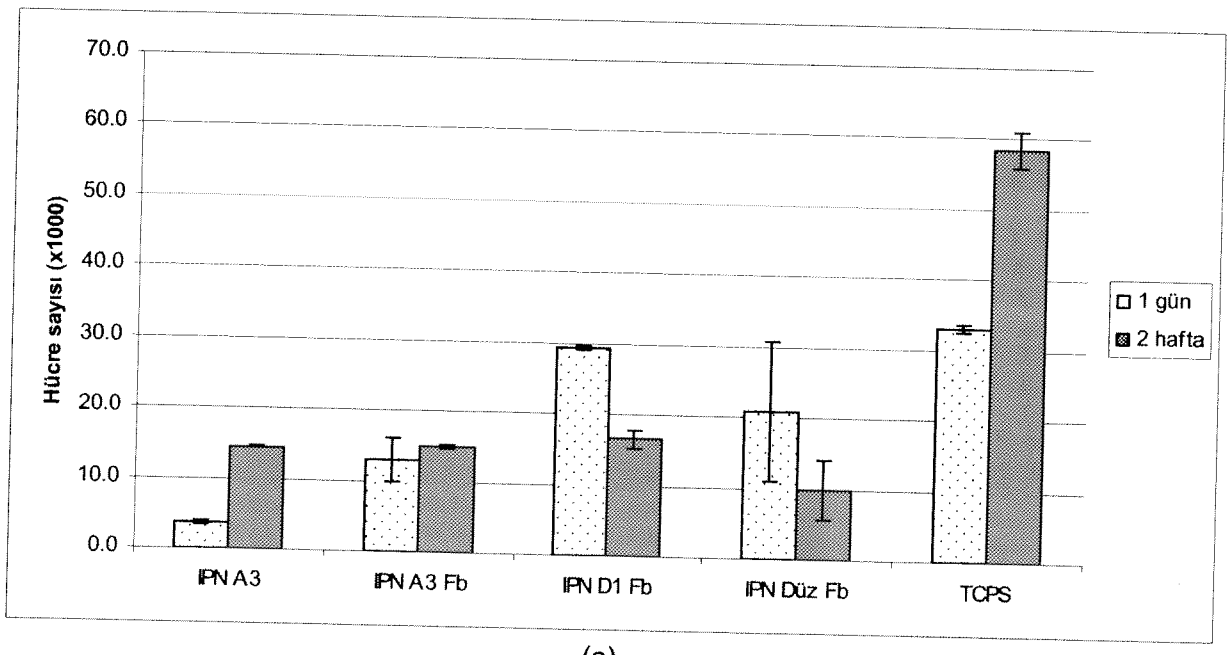


(a)

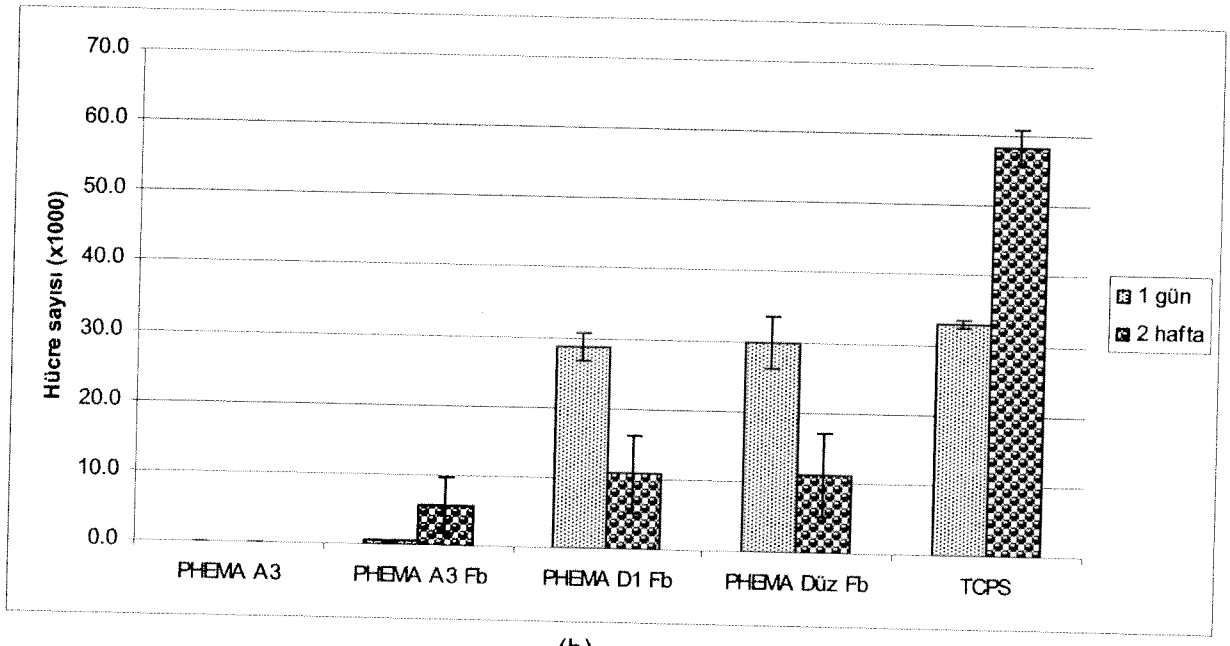


(b)

Şekil 25. PHBV8 filmler ve TCPS üzerindeki tutunan hücre sayısı (1 gün) ve hücre çoğalması (2 hafta). a) İşlenmemiş ve yüzeyine Fb adzorplanmış filmler, ve b) yüzeyine kovalent olarak ALP tutuklanmış ve Ca-P kristalleri biriktirilmiş filmler üzerindeki hücre sayıları. (film başına ekilen hücre sayısı: 15000, n=3)



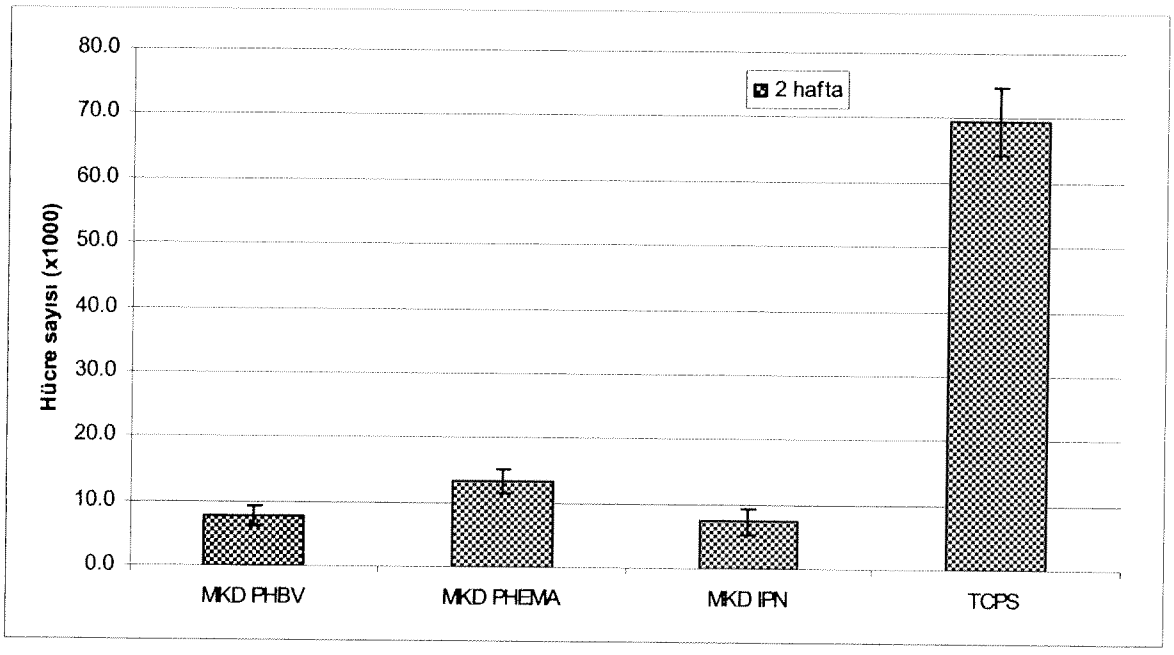
(a)



(b)

Şekil 26. IPN ve PHEMA Filmler ve TCPS üzerindeki tutunan hücre sayısı (1 gün) ve hücre çoğalması (2 hafta). a) İşlenmemiş ve yüzeyine Fb adzorplanmış IPN filmler, ve b) İşlenmemiş ve yüzeyine Fb adzorplanmış PHEMA filmler üzerindeki hücre sayıları. (film başına ekilen hücre sayısı: 15000, n=3)

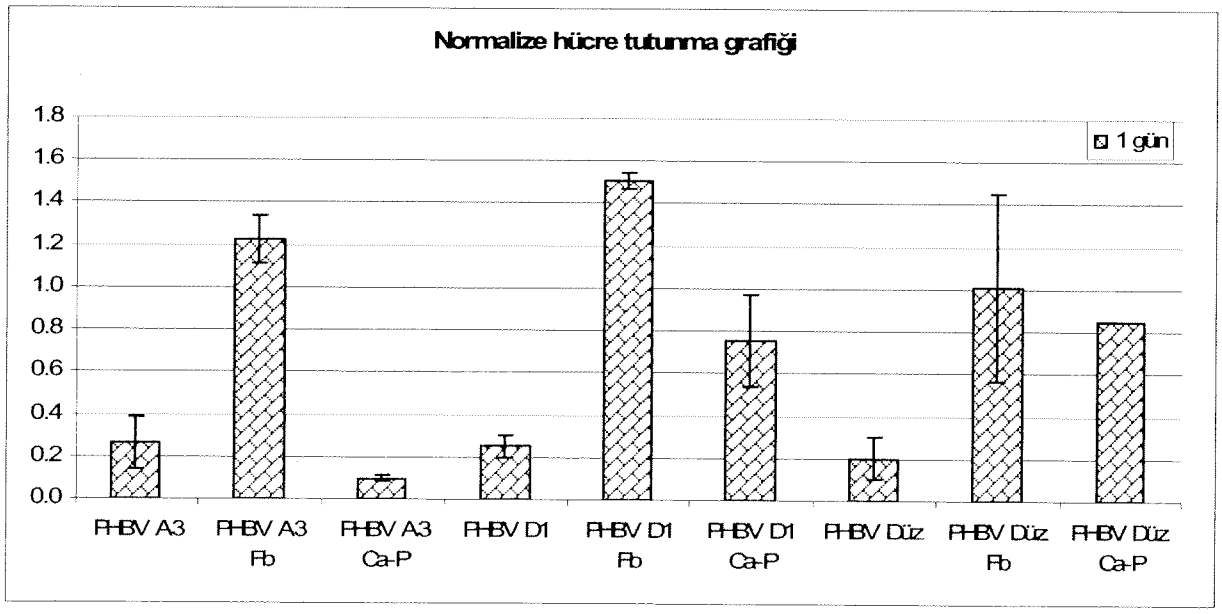
Mikrokontak damgalama (MKD) yöntemiyle düz PHBV8, IPN ve PHEMA filmler üzerine hücreleri yönlendirme amacıyla paralel şeritler halinde adzorplanan Fb, en çok hücre çoğalmasının PHEMA üzerinde gerçekleşmesini sağlamıştır (Şekil 27). Ancak bu değer bile TCPS üzerindeki hücre sayısından çok düşük olarak saptanmıştır.



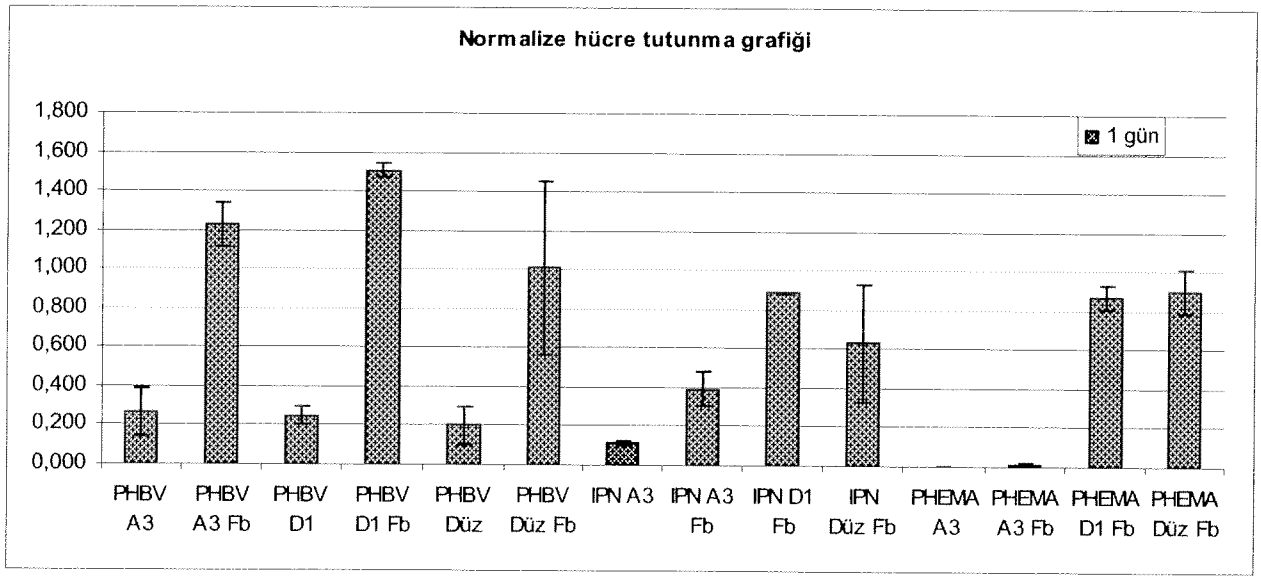
z

Şekil 27. PHBV8, IPN ve PHEMA filmler ve TCPS üzerindeki hücre çoğalması (2 hafta). (film başına ekilen hücre sayısı: 15000, n=3)

Farklı topografi ve kimyasal modifikasyona sahip PHBV8, IPN ve PHEMA filmler üzerindeki hücre tutunma verileri (1 gün), aralarında karşılaştırma yapabilmek amacıyla TCPS'e göre normalize edilmiştir (Şekil 28). Bu verilere göre, PHBV8 yüzeyini kimyasal olarak modifiye etmenin (Fb adzorplama, Ca-P kristalleri biriktirme) genel olarak işlenmemiş film yüzeyine oranla tutunan hücre sayısını büyük ölçüde arttırdığı, fakat işlevsel olarak adzorplanmış Fb'nin Ca-P kristallerinden daha etkili olduğu görülmüştür (Şekil 28a). Film yüzeyine adzorplanmış Fb'nin tüm film çeşitlerinde (PHBV8, IPN ve PHEMA) işlenmemiş yüzeye göre tutunan hücre sayısını arttırdığı, ancak bu yöntemin PHBV8'e uygulandığında en yüksek hücre sayısının elde edilmesine olanak verdiği görülmüştür (Şekil 28b).



(a)



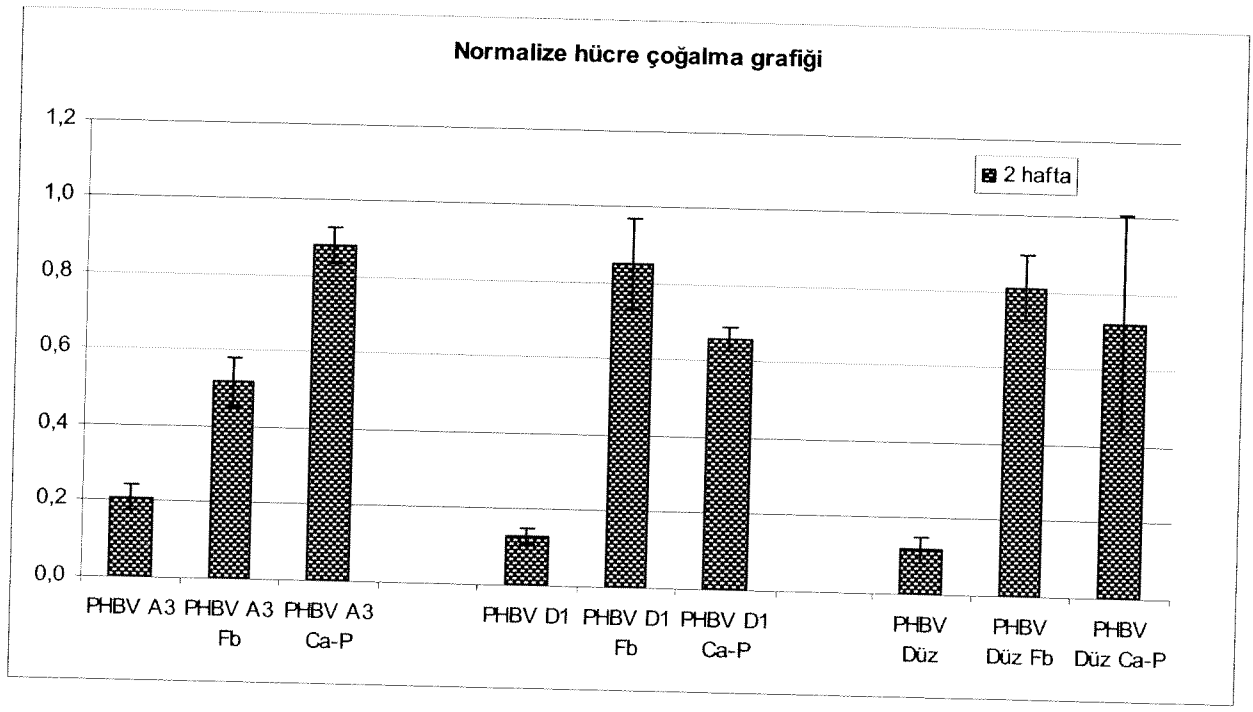
(b)

Şekil 28. İşlenmemiş ve yüzeyi kimyasal olarak modifiye edilmiş (Fb adzorplama, Ca-P kristalleri biriktirme) PHBV8 (a) ve işlenmemiş ve yüzeyine Fb adzorplanmış PHBV8, IPN ve PHEMA (b) filmler üzerindeki, karşılaştırma amaçlı TCPS'e göre normalize edilmiş hücre tutunma verileri (1 gün). (film başına ekilen hücre sayısı: 15000, n=3).

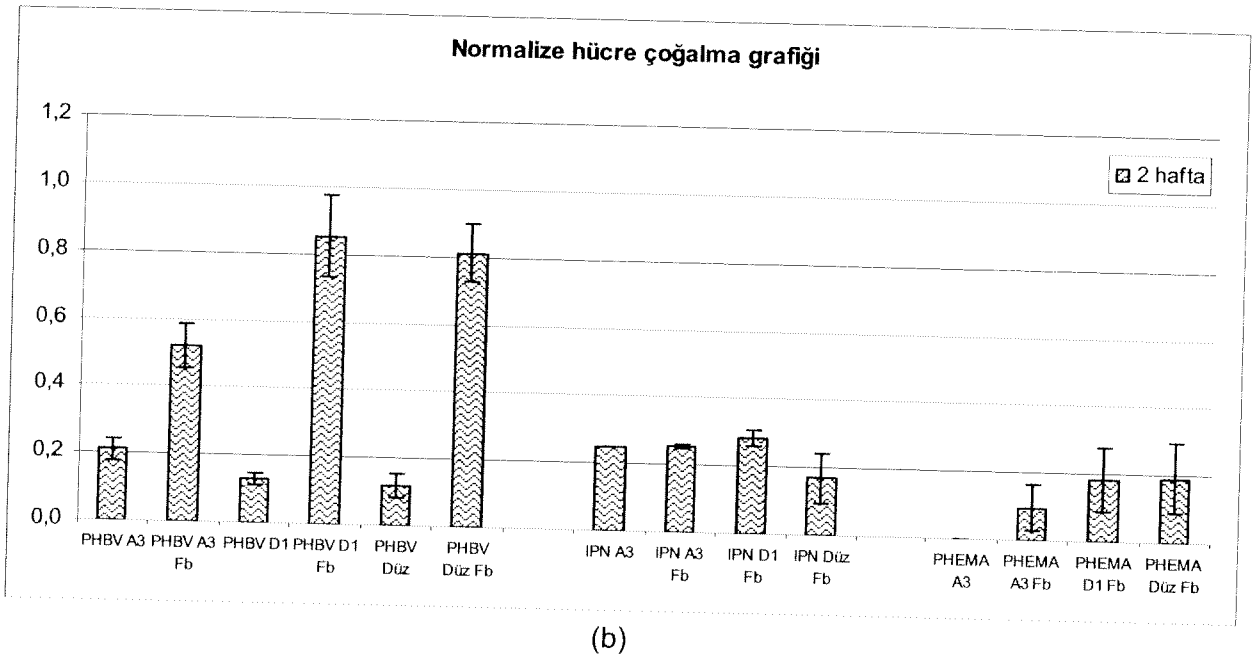
Şekil 29a'daki normalize hücre çoğalma grafiği dikkate alınırsa, film yüzeyindeki desen fark etmeksizin PHBV8 filmlerde kimyasal modifikasyonun (Fb adzorplama, Ca-P kristalleri biriktirme) genel olarak işlenmemiş film yüzeyine oranla hücre sayısını büyük ölçüde arttırdığı görülmektedir. Mikrokanallı (A3) filmlerde yüzeye Ca-P kristalleri biriktirmenin, mikrokuyucuklu filmlerde ise yüzeye Fb adzorplamanın daha etkili olduğu görülmektedir.

Film yüzeyine adzorplanmış Fb'nin PHBV8 ve PHEMA filmlerde işlenmemiş yüzeye göre hücre çoğalmasını arttırdığı, ancak IPN filmlerde bir fark yaratmadığı saptanmıştır (Şekil 29b). Fb adzorplama yönteminin PHBV8'e uygulandığında en yüksek hücre sayısının elde edilmesine olanak verdiği ve bu değerin TCPS üzerindekine çok yakın olduğu görülmüştür (Şekil 29b).

Tüm film çeşitlerini ve topografik ve kimyasal modifikasyonları içeren normalize hücre çoğalma grafiğine bakıldığında yüzey topografisinden bağımsız olarak 2 haftalık süre sonunda en çok hücrenin yüzeyine Fb adzorplanmış ya da Ca-P biriktirilmiş PHBV8 filmler üzerinde elde edildiği görülmektedir (Şekil 30). Mikrokontak damgalama (MKD) yöntemiyle düz film yüzeylerine şeritler halinde transfer edilen Fb'nin PHBV yüzeyinde işlenmemiş filme oranla hücre çoğalmasında bir farka neden olmadığı, IPN ve PHEMA filmlerde ise yüzeyine Fb adzorplanmış düz filmler kadar etkili olduğu belirlenmiştir (Şekil 30). MKD ile düz film yüzeyine şeritler halinde transfer edilen Fb (iki boyutta kimyasal modidfikasyon) ile A3 üzerine adzorplanan Fb (üç boyutta kimyasal modifikasyon) hücre çoğalmasına olan etkisi açısından karşılaştırılacak olursa, PHBV'de ve IPN'de üç boyutta kimyasal modifikasyonun, PHEMA'da ise iki boyutta kimyasal modifikasyonun daha etkili olduğu söylenebilir (Şekil 30).

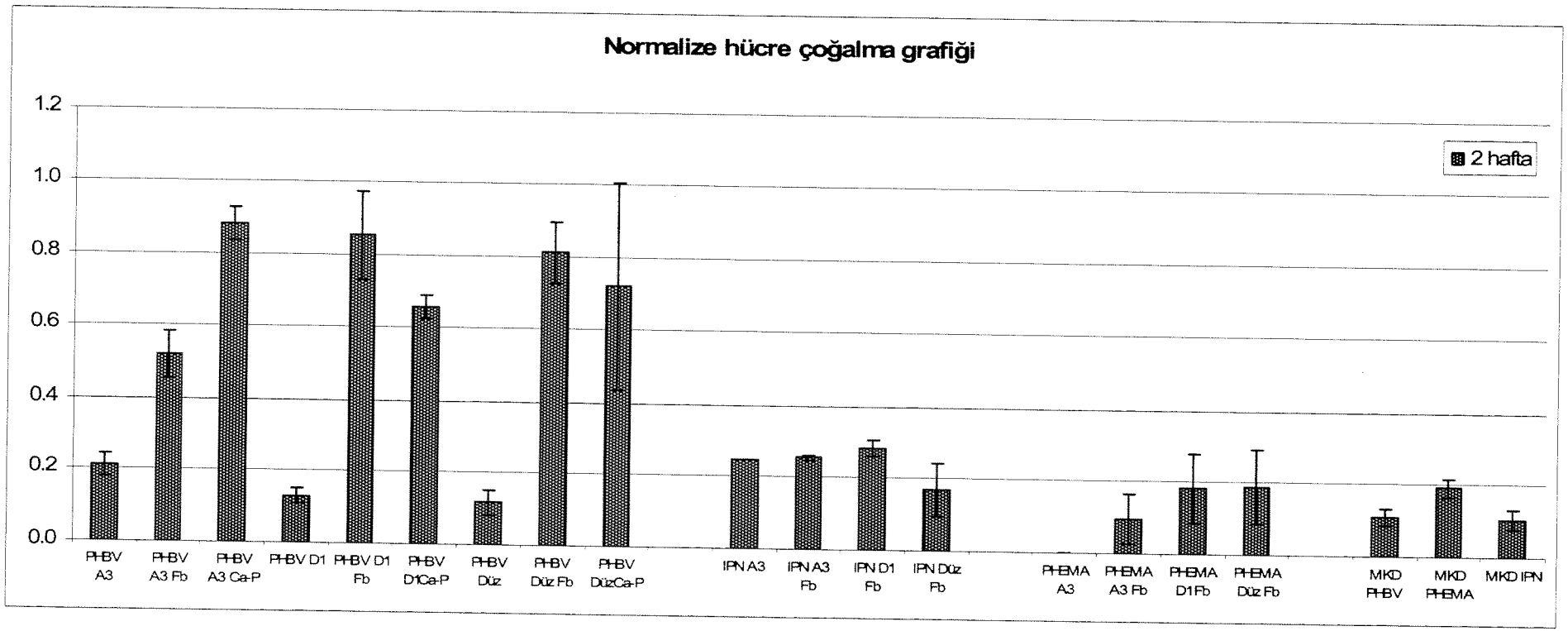


(a)



(b)

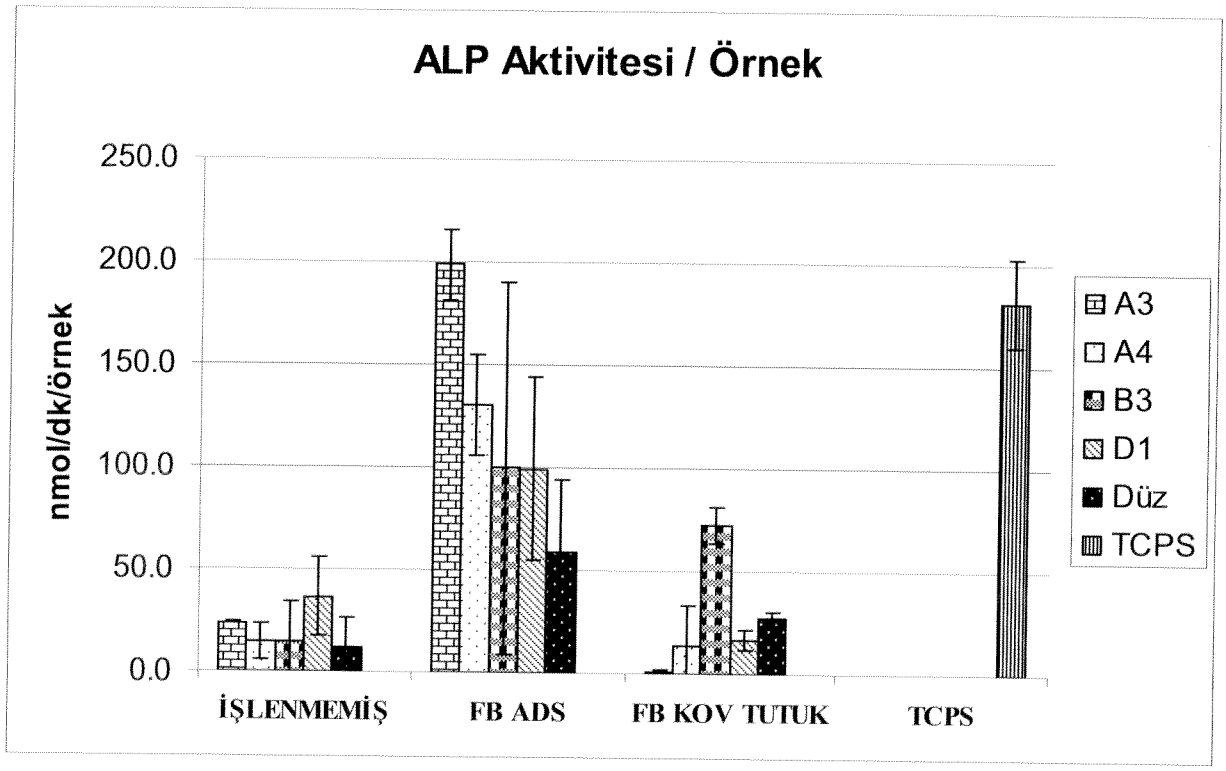
Şekil 29. İşlenmemiş ve yüzeyi kimyasal olarak modifiye edilmiş (Fb adzorplama, Ca-P kristalleri biriktirme) PHBV8 (a) ve işlenmemiş ve yüzeyine Fb adzorplanmış PHBV8, IPN ve PHEMA (b) filmler üzerindeki, karşılaştırma amaçlı TCPS'e göre normalize edilmiş hücre çoğalma verileri (2 hafta). (film başına ekilen hücre sayısı: 15000, n=3)



Şekil 30. Yüzeyine hücre ekilmiş tüm PHBV8, IPN ve PHEMA film çeşitleri üzerindeki normalize hücre çoğalma verileri (2 hafta). (film başına ekilen hücre sayısı: 15000, n=3)

VII-g) Alkalen Fosfataz Testi:

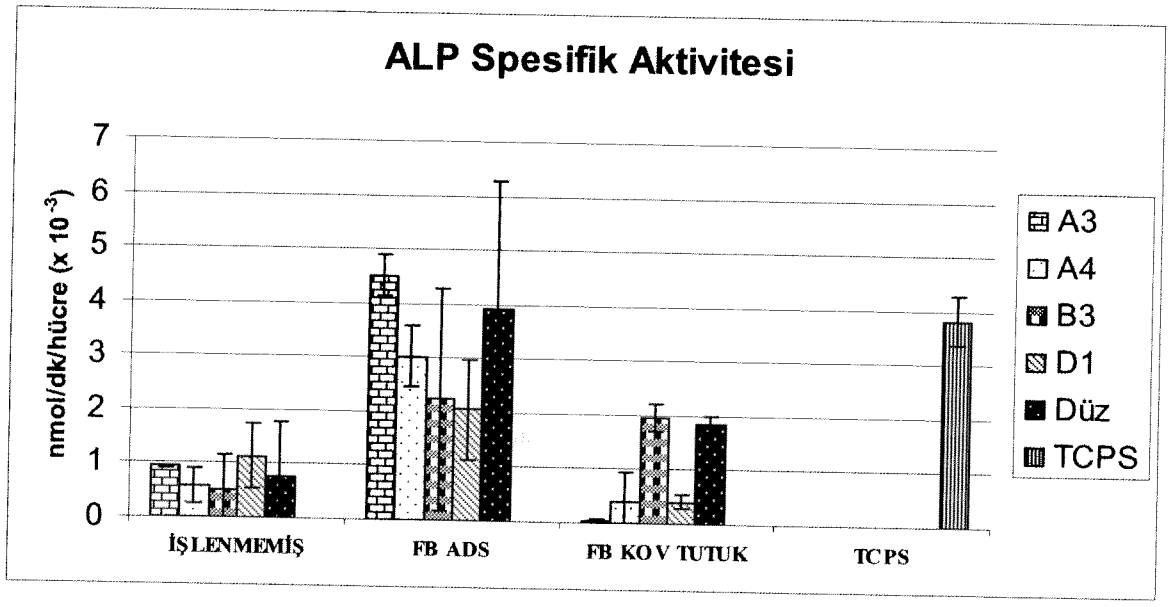
İki haftalık inkübasyon sonunda yüzeyine Fb adzorplanmış, Fb kovalent tutuklanmış ve yüzeyi işlenmemiş PHBV8 filmler arasında en yüksek ALP aktivitesi, yüzeyinde Fb adzorplanmış örnekler üzerinde tesbit edilmiştir (Şekil 31). Genel olarak yüzeyinde Fb adzorplanmış örnekler arasında mikrokanallı filmler en yüksek ALP aktivitesi göstermiştir ki bu da hücre morfolojisinin, yani yönlenmiş hücre iskeletinin gen ekspresyonunu etkileyecek olası sinyal iletiminin, hücre aktivitesi üzerindeki etkisini göstermektedir. Kuyucuklu filmler de düz filmlere oranla daha yüksek ALP aktivitesi göstermiştir.



Şekil 31. PHBV8 filmler ve TCPS üzerindeki örnek başına düşen iki haftalık ALP aktivitesi (film başına ekilen hücre sayısı: 5000, n=2) .

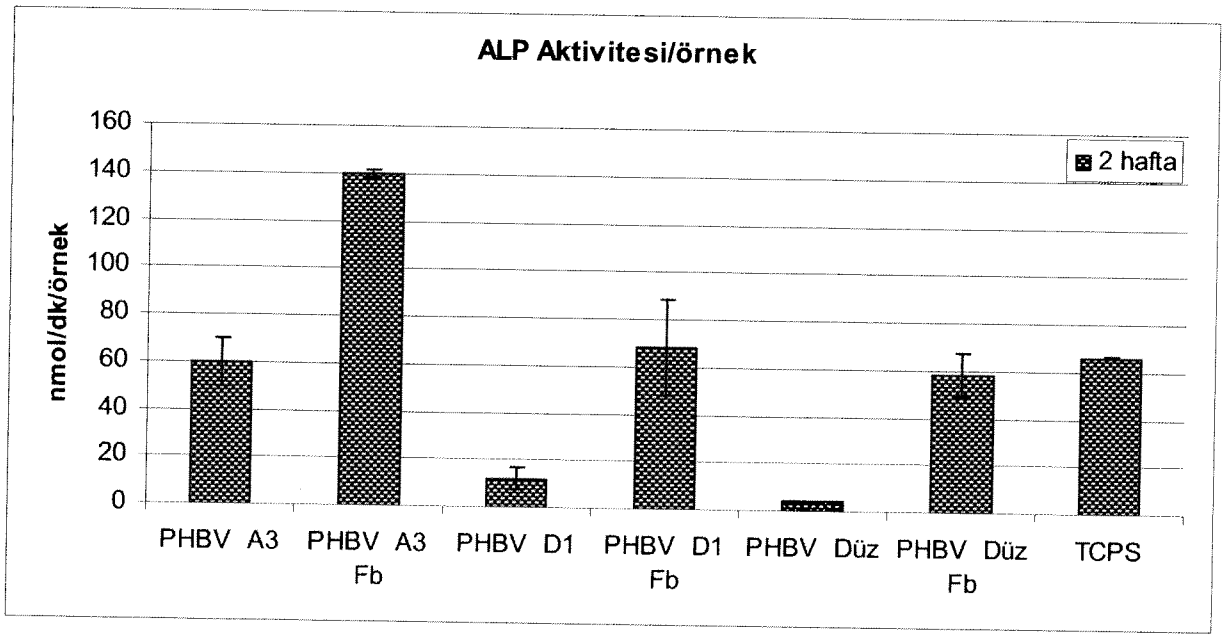
Ancak hücre şeklinin gen ekspresyonu üzerindeki etkisinin belirlenmesi için ALP aktivitesinin hücre bazında (spesifik aktivite) belirlenmesi gerekir (Şekil 32). ALP spesifik aktivitesinin de örnek başına düşen ALP aktivitesi ile büyük ölçüde benzer olduğu görülmektedir, ancak Fb adzorplanmış düz filmde büyük bir farklılık göze çarpmaktadır. Bu düz film üzerinde gözlenen çok aşırı spesifik aktivitenin hücre sayısının yanlış belirlenmesinden kaynaklandığı yinelenen deney sonucunda ortaya çıkmıştır (Şekil 38). Yüzeyine Fb adzorplanmış A3 filmi üzerindeki ALP spesifik aktivitesinin TCPS üzerindeki aktiviteden de yüksek olduğu saptanmıştır. A3 filminin yüzeyindeki mikrokanallar,

mikrokanallı filmler arasında en geniş çukur tabanına sahiptir ve bu nedenle hücrelerin kanal doğrultusundan sapma açıları en büyük olarak bu filmler üzerinde gözlenmişti. Buna rağmen en yüksek ALP spesifik aktivitesinin A3 üzerinde elde edilmesi sapma açısının hala küçük oluşu ve tepeler arasındaki genişliğin daha büyük olması nedeniyle hücre-hücre etkileşiminin daha iyi sağlanmış olmasına bağlanabilir.

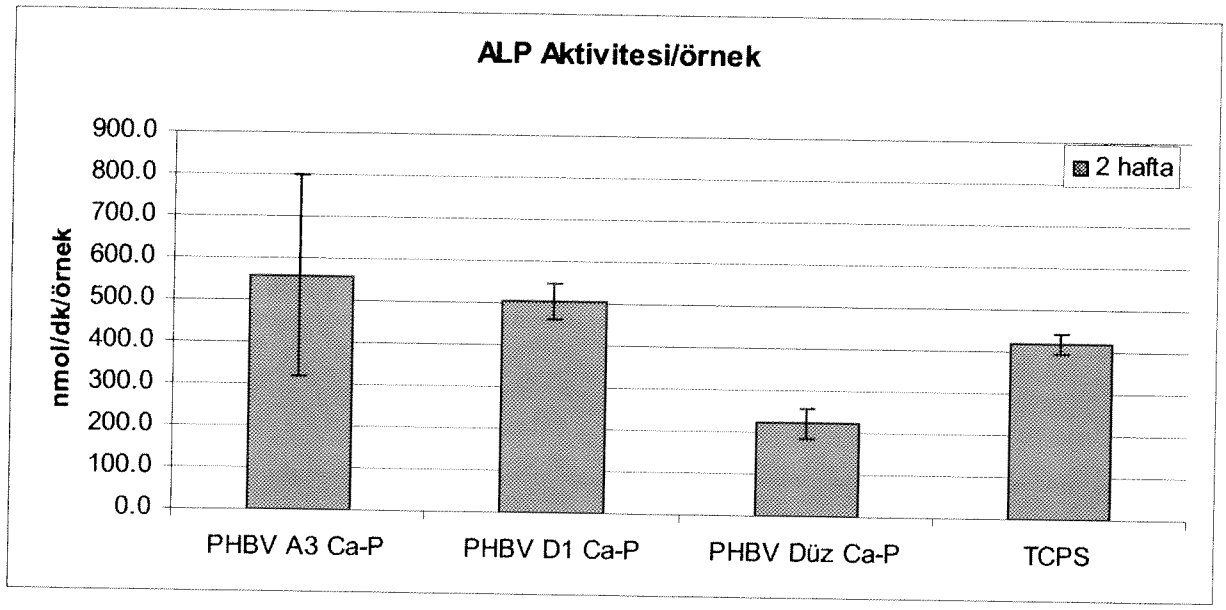


Şekil 32. PHBV filmler ve TCPS üzerindeki hücre başına düşen iki haftalık ALP aktivitesi (film başına ekilen hücre sayısı: 5000, n=2).

Mikrokanallı (A3), mikrokuyucuklu (D1) ve düz PHBV8, IPN ve PHEMA filmler üzerindeki ALP aktivitesinin karşılaştırmalı olarak belirlenebilmesi amacıyla takip eden çalışmalarda film başına 15000 hücre ekilmiştir ve 2 hafta sonunda film (örnek) ve hücre başına düşen ALP aktivitesi belirlenmiştir. PHBV8 yüzeyine adzorplanan Fb'nin işlenmemiş yüzeye göre örnek başına düşen ALP aktivitesini büyük oranda arttırdığı görülmüştür (Şekil 33a).



(a)

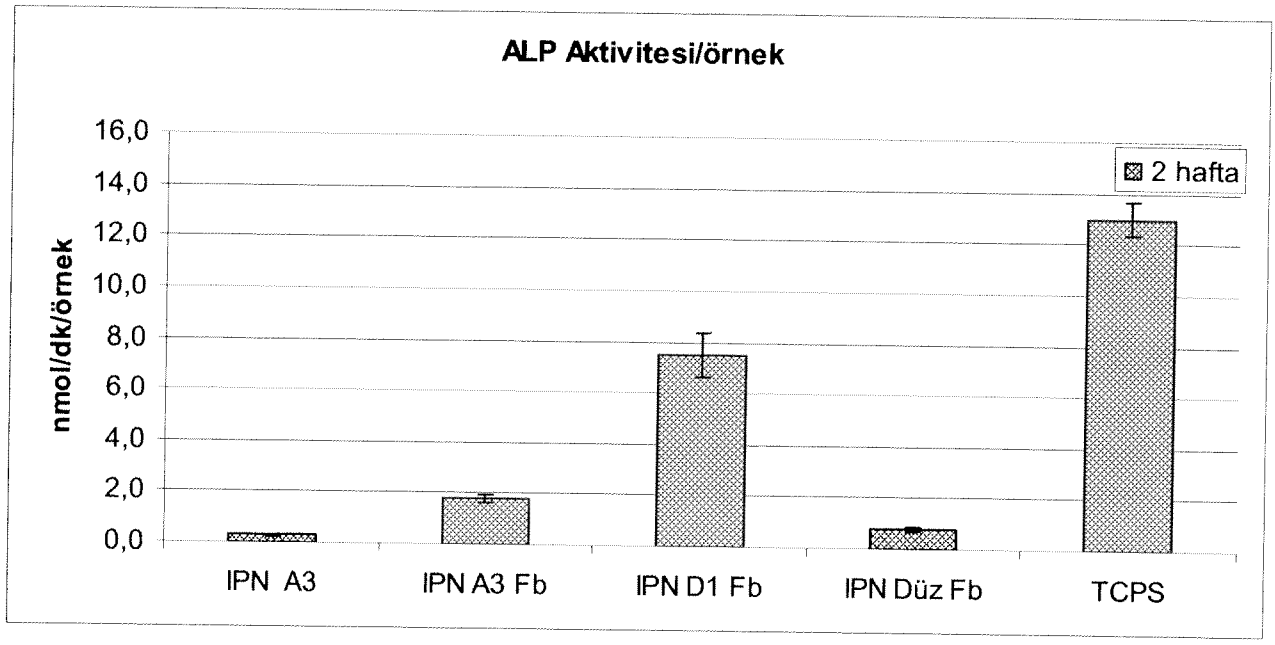


(b)

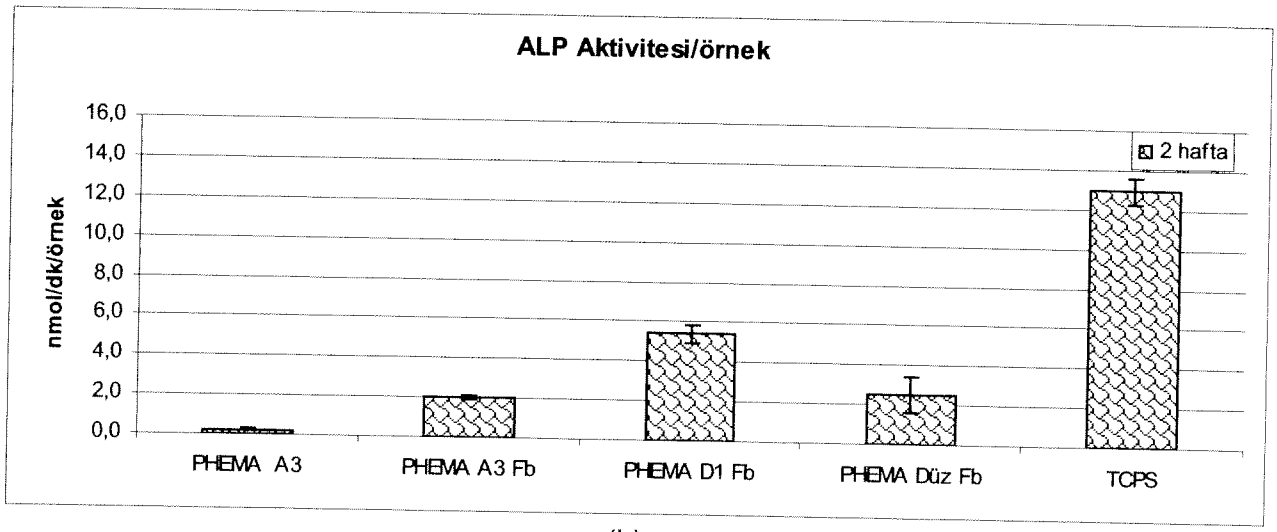
Şekil 33. PHBV8 filmler ve TCPS üzerindeki 2 haftalık örnek başına düşen ALP aktivitesi. a) İşlenmemiş ve yüzeyine Fb adzorplanmış filmler, ve b) yüzeyine kovalent olarak ALP tutuklanmış ve Ca-P kristalleri biriktirilmiş filmler üzerindeki ALP aktivitesi. (film başına ekilen hücre sayısı: 15000, n=3)

Mikrokanallı (A3) PHBV8 üzerindeki ALP aktivitesinin mikrokuyucuklu (D1) ve düz PHBV8 filmlere oranla oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 33a). PHBV8 A3 yüzeyindeki ALP aktivitesi TCPS üzerindekiyle eşdeğer, PHBV8 A3 Fb yüzeyindeki ALP aktivitesi ise TCPS üzerindekinin en az iki katı olarak saptanmıştır (Şekil 33a). Bu sonuçlar, osteoblastların mikrokanallı filmlerdeki yönlendirilmiş morfolojilerinin ALP aktiviteleri üzerindeki tetikleyici etkisini göstermektedir. D1 ve düz PHBV8 filmler ancak Fb varlığında TCPS üzerindeki ALP aktivitesine ulaşmıştır. PHBV8 film yüzeyine kovalent olarak ALP tutuklanması ve Ca-P kristallerinin biriktirilmesi ile elde edilen kimyasal modifikasyon sonucunda ise Mikrokanallı (A3) ve mikrokuyucuklu (D1) PHBV8 üzerinde TCPS üzerindekiyle eşdeğer, düz PHBV8'de ise daha düşük ALP aktivitesi saptanmıştır (Şekil 33b). Bu da film yüzeyinde mikron düzeyindeki desenlerin varlığının önemini vurgulamaktadır.

IPN ve PHEMA yüzeyine adzorplanan Fb'nin işlenmemiş yüzeye göre örnek başına düşen ALP aktivitesini büyük oranda arttırdığı görülmüştür (Şekil 34). Hem IPN hem de PHEMA filmler arasında en yüksek ALP aktivitesi yüzeyine Fb adzorplanmış mikrokuyucuklu (D1) filmler üzerinde saptanmıştır fakat bu değerler bile TCPS üzerindekinin oldukça altındadır (Şekil 34). IPN A3 Fb, IPN Düz Fb'ye göre iki kat daha yüksek ALP aktivitesi gösterirken, PHEMA filmlerde bunun tam tersi bir durumla karşılaşılmıştır (Şekil 34).



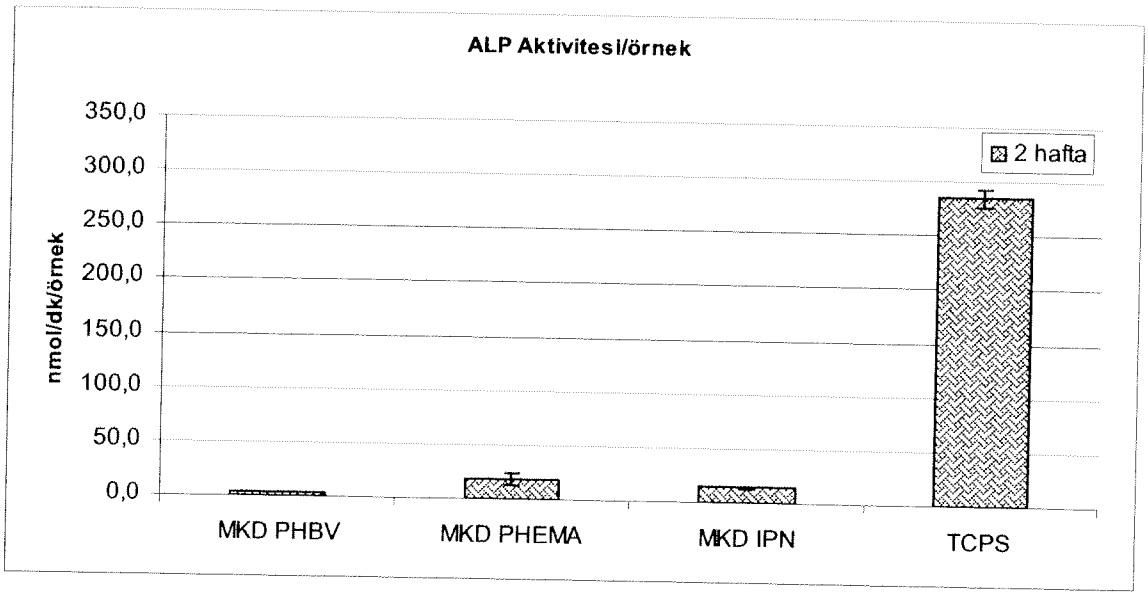
(a)



(b)

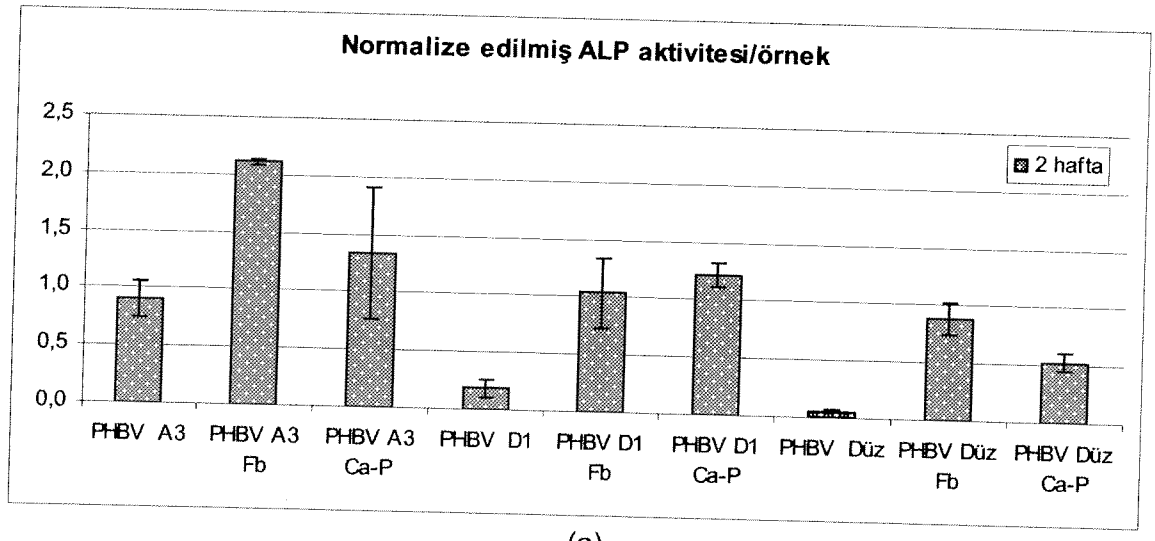
Şekil 34. IPN ve PHEMA filmler ve TCPS üzerindeki 2 haftalık örnek başına düşen ALP aktivitesi. a) İşlenmemiş ve yüzeyine Fb adzorplanmış IPN filmler, ve b) İşlenmemiş ve yüzeyine Fb adzorplanmış PHEMA filmler üzerindeki ALP aktivitesi. (film başına ekilen hücre sayısı: 15000, n=3)

Mikrokontak damgalama (MKD) yöntemiyle düz PHBV8, IPN ve PHEMA filmler üzerine hücreleri yönlendirme amacıyla paralel şeritler halinde adzorplanan Fb, en yüksek ALP aktivitesinin PHEMA ve IPN üzerinde gerçekleşmesini sağlamıştır (Şekil 35). Ancak bu değer de TCPS üzerindeki aktiviteden çok düşük olarak saptanmıştır.

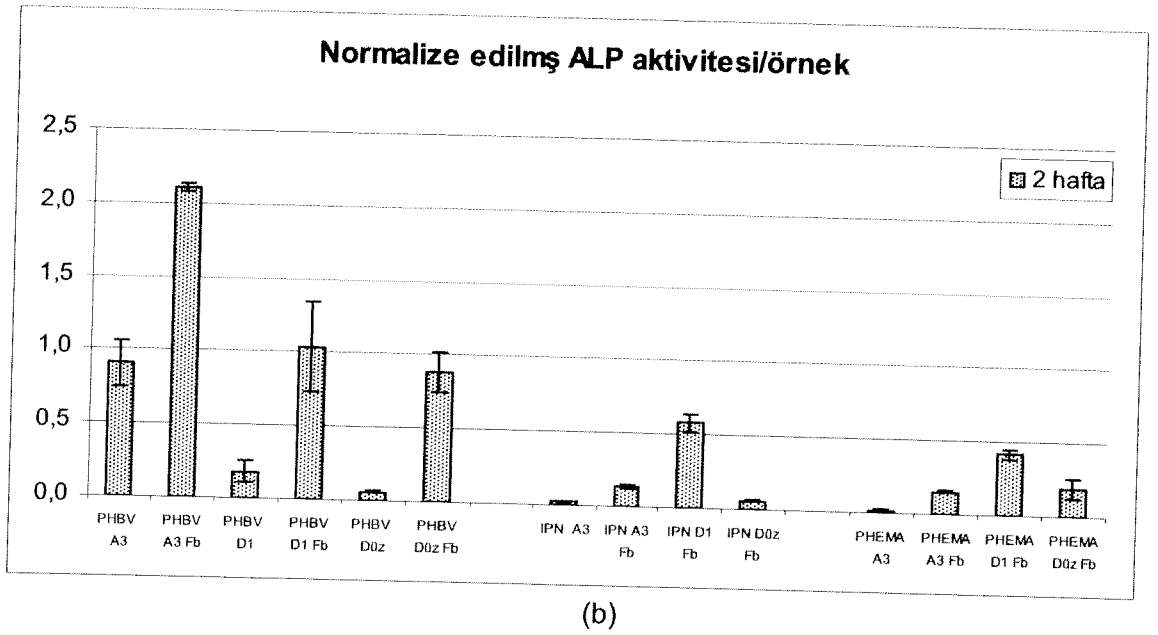


Şekil 35. Yüzeyine şeritler halinde mikrokontak damgalama yöntemiyle Fb adzorplanmış PHBV8, IPN e PHEMA Filmler ve TCPS üzerindeki örnek başına düşen ALP aktivitesi (2 hafta). (film başına ekilen hücre sayısı: 15000, n=3)

Farklı topografya ve kimyasal modifikasyona sahip PHBV8, IPN ve PHEMA filmler üzerindeki örnek başına düşen ALP aktiviteleri, aralarında karşılaştırma yapabilmek amacıyla TCPS'e göre normalize edilmiştir (Şekil 36). Bu verilere göre, PHBV8 yüzeyini kimyasal olarak modifiye etmenin (Fb adzorplama, Ca-P kristalleri biriktirme) genel olarak işlenmemiş film yüzeyine oranla ALP aktivitesini büyük ölçüde arttırdığı, fakat genel olarak adzorplanmış Fb'nin Ca-P kristallerinden daha etkili olduğu görülmüştür (Şekil 36a). Film yüzeyine adzorplanmış Fb'nin tüm film çeşitlerinde (PHBV8, IPN ve PHEMA) işlenmemiş yüzeye göre ALP aktivitesini arttırdığı, ancak bu yöntemin PHBV8'e uygulandığında en yüksek değerlerin elde edilmesine olanak verdiği görülmüştür (Şekil 36b).



(a)

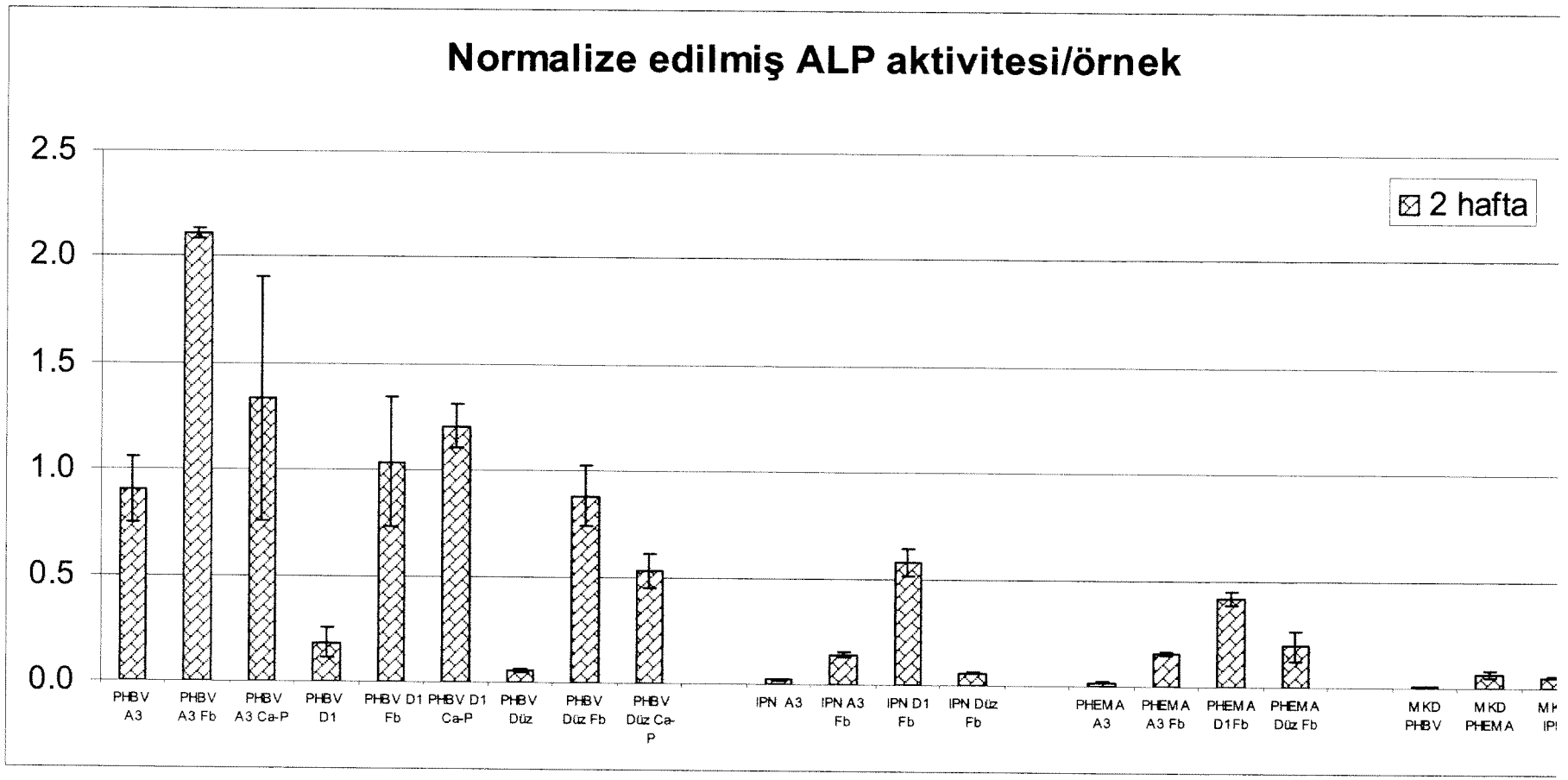


(b)

Şekil 36. İşlenmemiş ve yüzeyi kimyasal olarak modifiye edilmiş (Fb adzorplama, Ca-P kristalleri biriktirme) PHBV (a) ve işlenmemiş ve yüzeyine Fb adzorplanmış PHBV, IPN ve PHEMA (b) filmler

üzerindeki, karşılaştırma amaçlı TCPS'e göre normalize edilmiş örnek başına düşen ALP aktivitesi verileri (2 hafta). (film başına ekilen hücre sayısı: 15000, n=3)

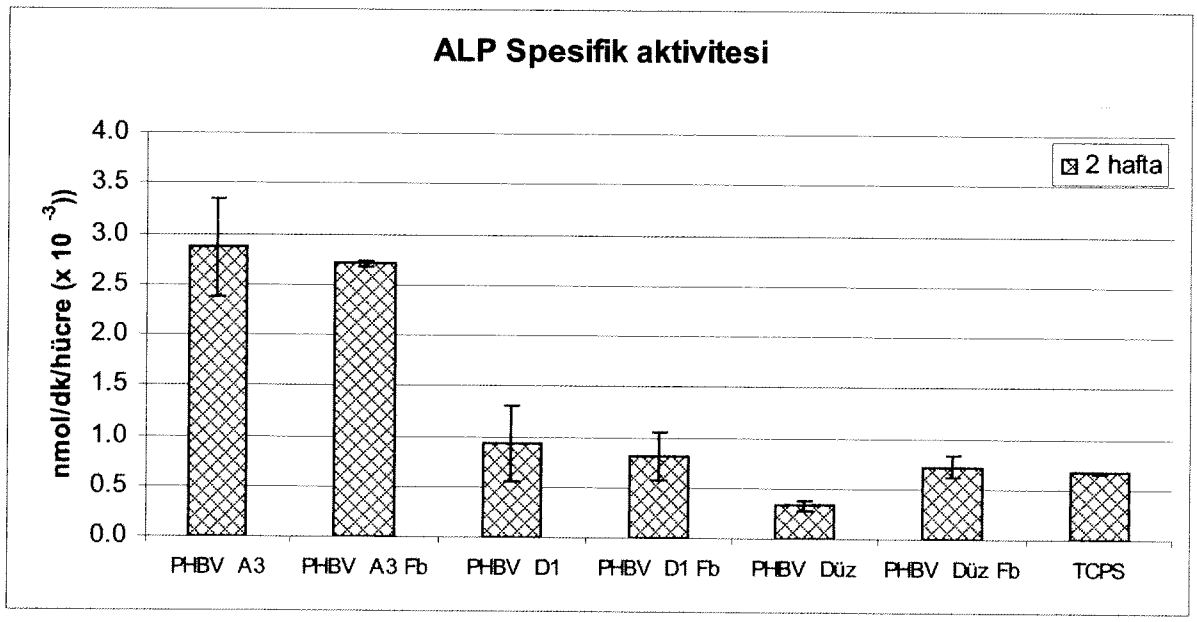
Tüm film çeşitlerini ve topografik ve kimyasal modifikasyonları içeren normalize edilmiş ALP aktivitesi grafiğine bakıldığında PHBV8, IPN, PHEMA ve MKD grupları arasında 2 haftalık süre sonunda en yüksek ALP aktivitesinin PHBV8 grubunda elde edildiği görülmektedir (Şekil 37). IPN ve PHEMA gruplarında en yüksek ALP aktivitesi değerine sahip film yüzeyine Fb adzorplanmış D1 olmuştur, ancak bu değerin PHBV8 grubunda en düşük değere sahip yüzeyine Fb adzorplanmış düz filmlerinkine eşdeğer olduğu saptanmıştır. Mikrokontak damgalama (MKD) yöntemiyle düz film yüzeylerine şeritler halinde transfer edilen Fb'nin PHBV8 yüzeyinde işlenmemiş filme oranla ALP aktivitesinde büyük bir düşüşe sebep olduğu, IPN filmlerde yüzeyine Fb adzorplanmış düz filmler kadar etkili olduğu ve PHEMA filmlerde ise yüzeyine Fb adzorplanmış düz filmlerinkinden daha düşük ALP aktivitesine sebep olduğu belirlenmiştir (Şekil 37). MKD ile düz film yüzeyine şeritler halinde transfer edilen Fb (iki boyutta kimyasal modidfikasyon) ile A3 üzerine adzorplanan Fb (üç boyutta kimyasal modifikasyon) ALP aktivitesine olan olumlu etkisi açısından karşılaştırılacak olursa, hem PHBV8'de, hem IPN'de, hem de PHEMA'da üç boyutta kimyasal modifikasyonun daha etkili olduğu söylenebilir (Şekil 37).



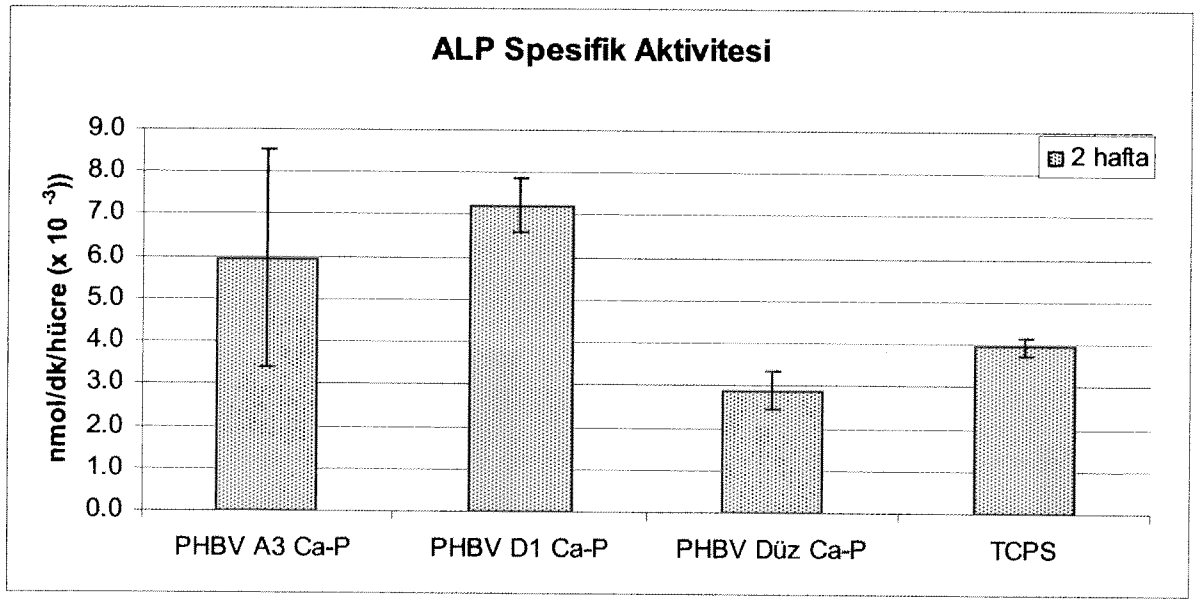
Şekil 37. Yüzeyine hücre ekilmiş tüm PHBV8, IPN ve PHEMA film çeşitleri üzerindeki normalize örnek başına düşen ALP aktivitesi verileri (2 hafta) . (film başına ekilen hücre sayısı: 15000, n=3)

Hücre şeklinin gen ekspresyonu üzerindeki etkisinin belirlenmesi için ALP aktivitesi hücre bazında (spesifik aktivite) da belirlenmiştir. PHBV8 filmleri arasında mikrokanallı (A3) filmler (fibrinojenli ya da fibrinojensiz) üzerindeki hücre başına düşen ALP aktivitesi mikrokuyucuklu (D1) ve düz PHBV8 filmler üzerindekine oranla oldukça yüksek bir değere ulaşmıştır, ki bu değer TCPS üzerindekinin en az dört katıdır (Şekil 38a). Bu sonuçlar, A3 Fb filmleri dikkate alındığında, yönlendirilmiş, hücre iskeleti kanal doğrultusuna paralel uzanan, osteoblast morfolojisinin hücre işlevinin arttırılması üzerindeki olumlu etkisinin bir göstergesi olarak yorumlanabilir. PHBV A3 (Fb'siz) üzerinde de aynı değerin elde edilmesi beklenmedik bir sonuç olmakla birlikte, bunun hücrelerin yüzeye tutunamayıp kendileri aralarında kemik nodülüne benzer yapılar oluşturarak sıkı bir hücre-hüre etkileşimine sahip olmalarından kaynaklanabileceği söylenebilir. Mikrokuyucuklu (D1) ve düz PHBV8 filmler üzerindeki ALP spesifik aktivitesi genel olarak TCPS üzerindekine yakın bir değere sahip olmuştur ve düz PHBV8 film üzerinde Fb varlığı ALP spesifik aktivitesinde az da olsa bir artışa neden olmuştur (Şekil 38a). PHBV8 film yüzeyine kovalent olarak ALP tutuklanması ve Ca-P kristallerinin biriktirilmesi ile elde edilen kimyasal modifikasyon sonucunda ise mikrokanallı (A3) ve mikrokuyucuklu (D1) PHBV8 üzerinde TCPS üzerindekinden daha yüksek, düz PHBV8'de ise daha düşük ALP spesifik aktivitesi saptanmıştır (Şekil 38b). Bu da yine film yüzeyinde mikron düzeyindeki desenlerin varlığının önemini vurgulamaktadır.

IPN yüzeyine adzorplanan Fb'nin işlenmemiş yüzeye göre hücre başına düşen ALP aktivitesini büyük oranda arttırdığı görülmüştür (Şekil 39). Hem IPN hem de PHEMA filmler arasında en yüksek ALP spesifik aktivitesi yüzeyine Fb adzorplanmış mikrokuyucuklu (D1) filmler üzerinde saptanmıştır ve bu değerler TCPS üzerindekinin oldukça üstündedir (Şekil 39). PHEMA filmlerde Fb varlığının önemi PHEMA A3 üzerindeki ALP spesifik aktivitesinin saptanamaması nedeniyle belirlenememiştir fakat Fb'li A3 ve D1 üzerindeki aktivitenin TCPS üzerindekinden yüksek çıkması yüzeydeki mikrodesen varlığının önemini vurgulamaktadır (Şekil 39).

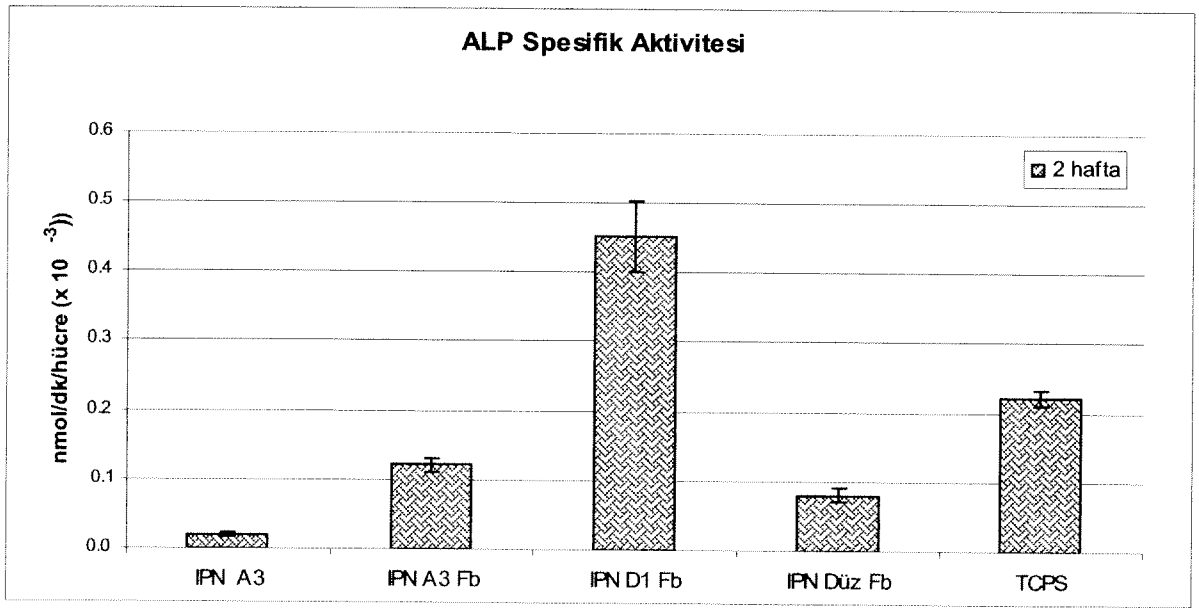


(a)

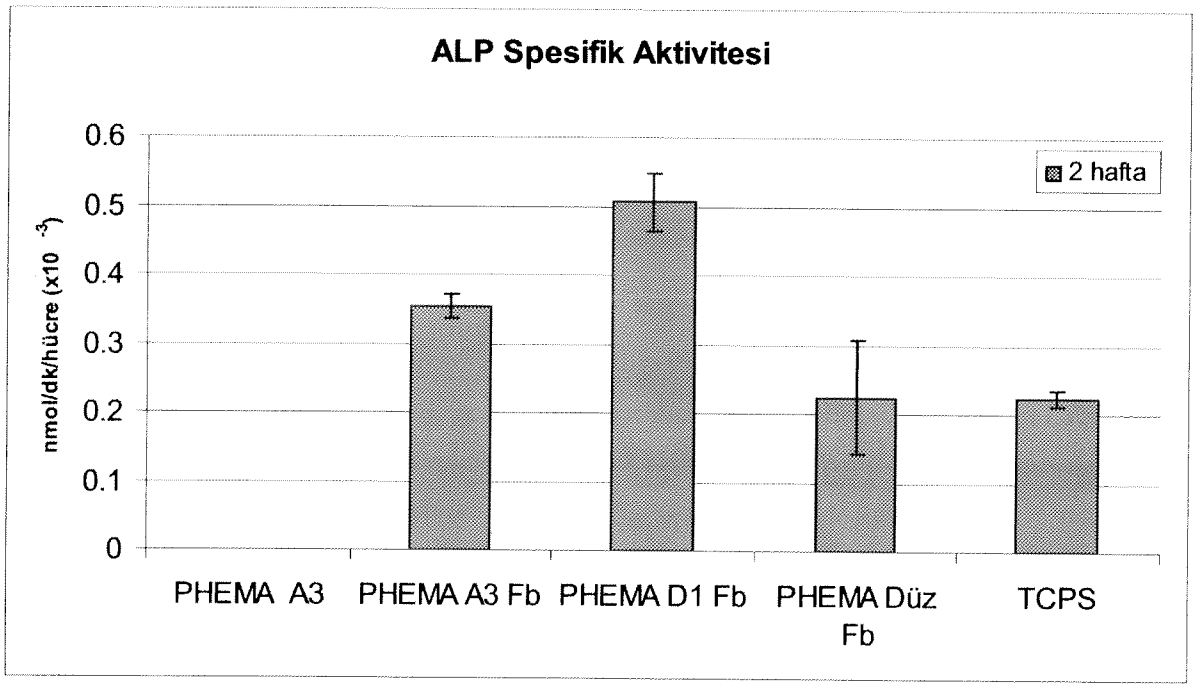


(b)

Şekil 38. PHBV8 filmler ve TCPS üzerindeki 2 haftalık hücre başına düşen ALP aktivitesi. a) İşlenmemiş ve yüzeyine Fb adzorplanmış filmler, ve b) yüzeyine kovalent olarak ALP tutuklanmış ve Ca-P kristalleri biriktirilmiş filmler üzerindeki ALP spesifik aktivitesi. (film başına ekilen hücre sayısı: 15000, n=3)



(a)

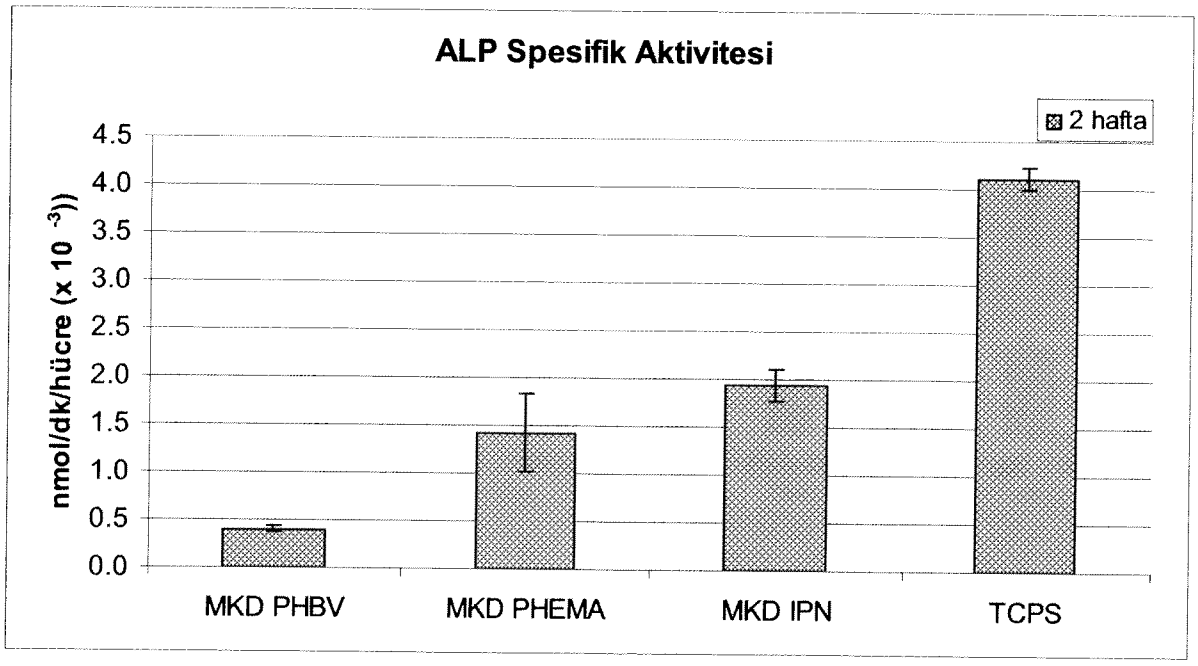


(b)

Şekil 39. IPN ve PHEMA filmler ve TCPS üzerindeki 2 haftalık hücre başına düşen ALP aktivitesi. a) İşlenmemiş ve yüzeyine Fb adzorplanmış IPN filmler, ve b) İşlenmemiş ve yüzeyine Fb adzorplanmış PHEMA filmler üzerindeki ALP spesifik aktivitesi. (film başına ekilen hücre sayısı: 15000, n=3)

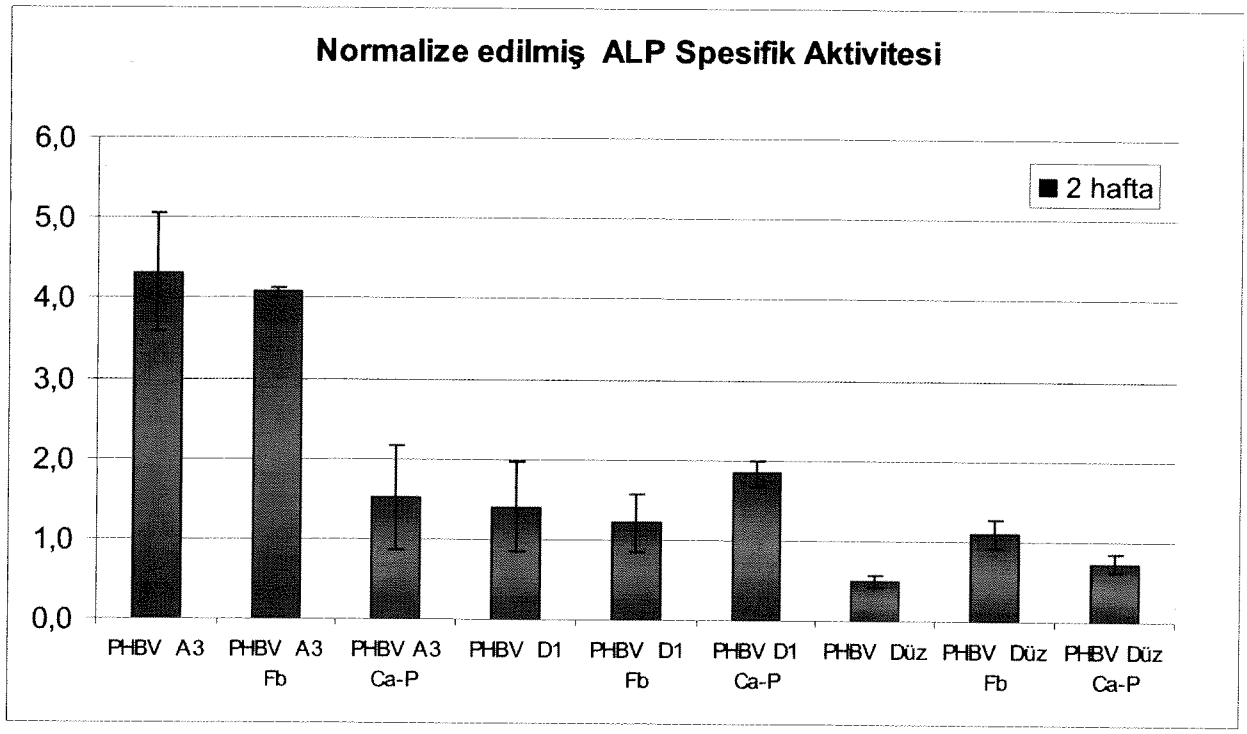
Mikrokontak damgalama (MKD) yöntemiyle düz PHBV8, IPN ve PHEMA filmler üzerine hücreleri yönlendirme amacıyla paralel şeritler halinde adzorplanan Fb, en yüksek ALP spesifik aktivitesinin PHEMA ve IPN üzerinde gerçekleşmesini sağlamıştır (Şekil 40). Bunun nedeni Fb'nin

PHEMA ve IPN'e PHBV'ye oranla daha iyi transfer edilebilmesi ve hücre-hücre etkileşiminin de mümkün kılınmış olması olabilir. Ancak bu yöntemle elde edilen en yüksek ALP spesifik aktivitesi bile TCPS üzerindeki aktiviteden düşük olarak saptanmıştır (Şekil 40).

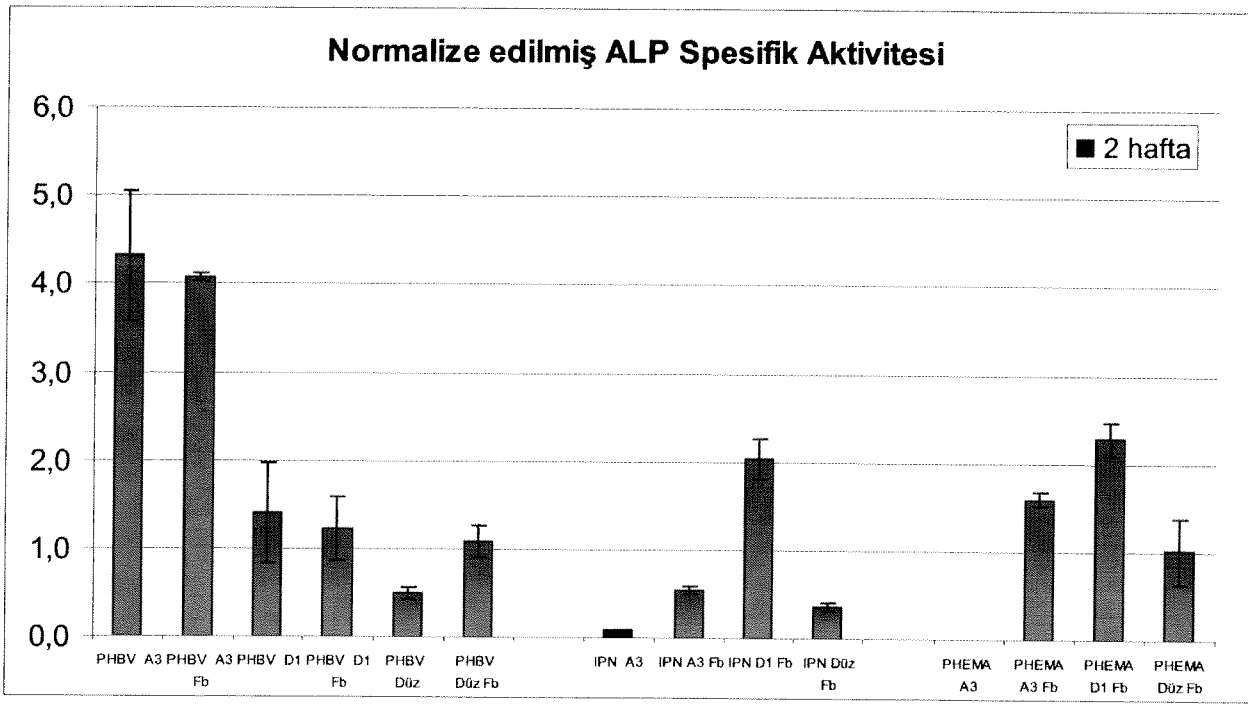


Şekil 40. Yüzeyine şeritler halinde mikrokontak damgalama yöntemiyle Fb adzorplanmış PHBV8, IPN e PHEMA filmler ve TCPS üzerindeki hücre başına düşen ALP aktivitesi (2 hafta). (film başına ekilen hücre sayısı: 15000, n=3)

Farklı topografi ve kimyasal modifikasyona sahip PHBV8, IPN ve PHEMA filmler üzerindeki hücre başına düşen ALP aktiviteleri, aralarında karşılaştırma yapabilmek amacıyla TCPS'e göre normalize edilmiştir (Şekil 41). Bu verilere göre, genel olarak tüm PHBV8 A3 filmler üzerinde diğer PHBV8 yüzeylere göre oldukça yüksek ALP spesifik aktiviteleri elde edilmiştir fakat tek istisna yüzeyinde Ca-P kristalleri biriktirilmiş PHBV8 A3 filmlerdir ki bu da osteoblastların bu filmler üzerinde yeterince yönlendirilememiş olmasıyla ve gerekli hücre-hücre etkileşiminin de sağlanamamış olmasıyla açıklanabilir (Şekil 41a). Tüm film çeşitleri (PHBV8, IPN ve PHEMA) değerlendirilerek yapılan kıyaslamada, PHBV grubunda en yüksek ALP spesifik aktivitesinin A3 ve A3 Fb üzerinde, IPN ve PHEMA gruplarında ise D1 Fb üzerinde elde edildiği görülmektedir (Şekil 41b).



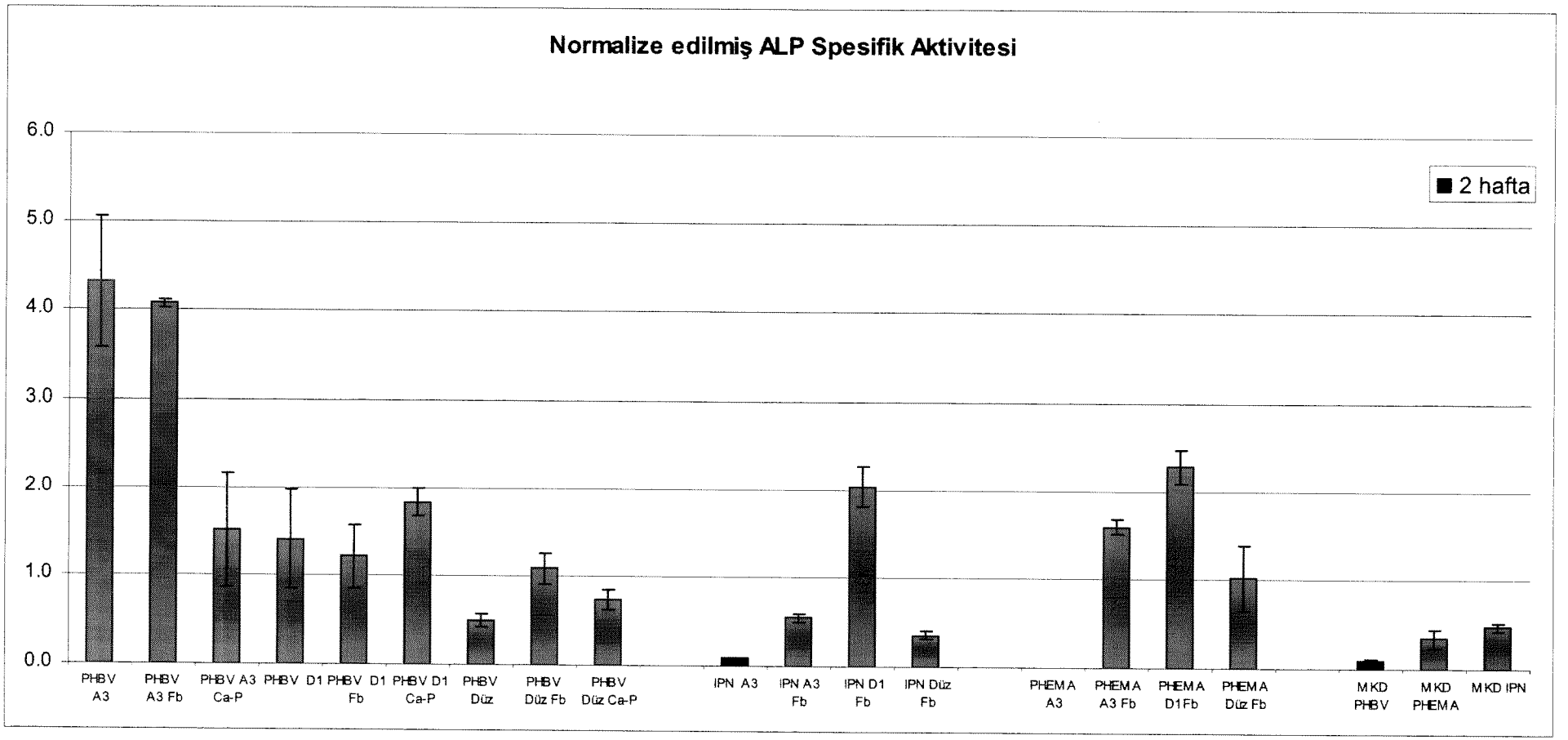
(a)



(b)

Şekil 41. İşlenmemiş ve yüzeyi kimyasal olarak modifiye edilmiş (Fb adzorplama, Ca-P kristalleri biriktirme) PHBV8 (a) ve işlenmemiş ve yüzeyine Fb adzorplanmış PHBV8, IPN ve PHEMA (b) filmler üzerindeki, karşılaştırma amaçlı TCPS'e göre normalize edilmiş hücre başına düşen ALP aktivitesi verileri (2 hafta). (film başına ekilen hücre sayısı: 15000, n=3)

Tüm film çeşitlerini ve topografik ve kimyasal modifikasyonları içeren normalize edilmiş ALP spesifik aktivitesi grafiğine bakıldığında PHBV8, IPN, PHEMA ve MKD grupları arasında 2 haftalık süre sonunda en yüksek ALP aktivitesinin PHBV8 grubunda elde edildiği görülmektedir (Şekil 42). Mikrokontak damgalama (MKD) yöntemiyle düz film yüzeylerine şeritler halinde transfer edilen Fb'nin PHBV8 yüzeyinde işlenmemiş filme oranla ALP aktivitesinde büyük bir düşüşe sebep olduğu, IPN filmlerde yüzeyine Fb adzorplanmış A3 filmler kadar etkili olduğu ve PHEMA filmlerde ise yüzeyine Fb adzorplanmış düz filmlerinkinden daha düşük ALP aktivitesine sebep olduğu belirlenmiştir (Şekil 42). MKD ile düz film yüzeyine şeritler halinde transfer edilen Fb (iki boyutta kimyasal modidfikasyon) ile A3 üzerine adzorplanan Fb (üç boyutta kimyasal modifikasyon) ALP spesifik aktivitesine olan olumlu etkisi açısından karşılaştırılacak olursa, hem PHBV8'de, hem de PHEMA'da üç boyutta kimyasal modifikasyonun daha etkili olduğu, IPN'de ise iki yöntemin eşdeğer olduğu söylenebilir (Şekil 42).



Şekil 42. Yüzeyine hücre ekilmiş tüm PHBV8, IPN ve PHEMA film çeşitleri üzerindeki normalize hücre başına düşen ALP spesifik aktivitesi verileri (2 hafta). (film başına ekilen hücre sayısı: 15000, n=3)

Sonuç

Bu çalışma biyomateryallerin doku mühendisliği alanı için yaşamsal önem taşıyan hücre taşıyıcılarla hücrelerin etkileşimi üzerine yapılmış çok kapsamlı bir temel bilim çalışmasıdır. Özellikle yüzey topografyasının ve kimyasal özelliklerinin hücre yapışma, çoğalma ve yönlenimi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Burada yüzey kimyası hem farklı taşıyıcılar kullanılarak hem de bir taşıyıcının yüzeyine başka moleküller (özellikle fibrinojen) tutturarak yapılmıştır. Çalışmamızda:

- Yüzey kimyasının önemli olduğu,

- Çok hidrofilik yüzeylerin az hidrofilik yüzeylere oranla hücre yapışmasına daha az uygun olduğu,

- Fibrinojenin yüzeylere adsorplanmasının hücre yapışmasını artırdığı,
- Yüzeyde oluşturulan kanalların boyutlarının hücre yönlenmesini sağladığı,
- Çalışmada kullanılan kanal derinlik, genişlik ve tepe yüksekliklerinin yapışma ve yönlenim için uygun olduğu ancak bu şablonların kanal boyutları arasındaki bir farkı gösteremeyecek kadar yakın olduğu,
- Kontak damga yönteminin fibrinojen aktarımı için özellikle hidrofilik yüzeylerde daha verimli olduğu,
- Yüzeyde kalsiyum fosfat varlığının osteoblast hücre yapışmasını artırdığı,
- Osteosarkoma hücrelerinin davranışlarının osteoblastlardan farklı olduğu

sonuçlarına varılmıştır.

Kaynaklar:

BHATIA S.N., Yarmush M.L., Toner M., Controlling cell interactions by micropatterning in cc cultures: hepatocytes and 3T3 fibroblasts, *J. Biomed. Mater. Res.*, 34, 189-99, (1997).

BHATIA S.N., Balis U.J., Yarmush M.L., Toner M., Probing heterotypic cell interactions: hepatocyt function in microfabricated co-cultures, *J. Biomater. Sci-Polym Ed.*, 9, 1137-60, (1998).

BHATIA S.N., Balis U.J., Yarmush M.L., Toner M., Microfabrication of hepatocyte/fibroblast co cultures:role of homotypic cell interactions, *Biotech. Prog.*, 14, 378-87, (1998).

BRUNETTE D.M., Kenner G.S., Gould T.R., Grooved titanium surfaces orient growth and migratio of cells from human gingival explants, *J. Dent. Res.*, 62(10), 1045-8, (1983).

BRUNETTE D.M., Chehroudi B., The effects of surface topography of micromachined titaniun sübstrata on cell behavior in vitro and in vivo, *J. Biomech. Eng.*, 121(1), 49-57, (1999).

CLARK P., Connoly P., Curtis A.S.G., Dow J.A.T., Wilkinson C.D.W., Cell guidance by ultrafin topography in vitro, *J. Cell Sci.*, 99, 73-7, (1991).

DESAI A.T., Micro- and nanoscale structures for tissue ngineering constructs, *Medical Eng. & Phys.* 22, 595-606, (2000).

MEYLE J., Gultig K., Wolburg H., Von Recum A.F., Anchorage to microtextured surfaces, *J Biomed. Mater. Res.*, 27, 1553-7, (1993).

MEYLE J., Gultig K., Nisch W., Variation in contact guidance by human cells on a microstructurec surface, *J. Biomed. Mater. Res.*, 29(1), 81-8, (1995).

RANIERI J. et al., Spacial control of neuronal cell attachment and differentiation on covalently patterned laminin oligopeptide sübstrates, *Int. J. Devl. Neurosci.*, 12(8), 725-35, (1994).

VACANTI J.P.,Terada S., Sato M., Sevy A., Tissue engineering in the twenty-first century, *Yonsei Med. J.*, 41(6), 685-691, (2000).

MILLER C., Shanks H., Witt A., Rutkowski G., Mallapragada S., Oriented Schwann cell growth on micropatterned biodegradable polymer sübstrates, *Biomaterials*, 22, 1263-1269, (2001).

TAN J., Saltzman M., Topographical control of human neutrophil motility on micropatterned materials with various surface chemistry, *Biomaterials*, 23, 3215-3225, (2002).

DALTON B.A., Walboomers X.F., Dziegielewski M., Evans M.D.M., Taylor S., Jansen J.A., Steele J.G., Modulation of epithelial tissue and cell migration by microgrooves, *J. Biomed. Mater. Res.*, 56, 195-207, (2001).

CLARK P., Connolly P., Curtis A.S.G., Dow J.A.T., Wilkinson C.D.W., Cell guidence by a ultrafine topography in vitro, *J. Cell Sci.*, 99, 73-77, (1991).

CLARK P., Britland S., Connoly P., Growth cone guidance and neuron morphology on micropatterned laminin surfaces, *J. Cell Sci.*, 105, 203-212, (1993).

DEN BRABER E.T., De Ruijter J.E., Ginsel L.A., Von Recum A.F., Jansen J.A., Quantitative analysis of fibroblast morphology on microgrooved surfaces with various groove and ridge dimensions, *Biomaterials*, 17, 2037-2044, (1996).

DEN BRABER E.T., De Ruijter J.E., Ginsel L.A., Von Recum A.F., Jansen J.A., Orientation of ECM protein deposition, fibroblast cytoskeleton, and attachment complex components on silicone microgrooved surfaces, *J. Biomed. Mater. Res.*, 40, 291-300, (1998).

DUNCAN A.C., Weisbuch F., Rouias F., Lazare S., Baquey Ch., Laser microfabricated model surfaces for controlled cell growth, *Biosenssors & Bioelectronics*, 17, 413-426, (2002).

EISENBARTH E., Linez P., Biehl V., Velten D., Breme J., Hildebrand H.F., Cell orientation and cytoskeleton organisation on groun titanium surfaces, *Biomolecular Engineering*, 19, 233-237, (2002).

GÜRSEL I., Balçık C., Arıca Y., Akkuş A., Akkaş N., Hasırcı V., Synthesis and mechanical properties of interpenetrating networks of polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate and polyhydroxyethylmetacrylate, *Biomaterials*, 19, 1137-43, (1998).

HASENBEIN M.E., Andersen T.T., Bizios R., Micropatterned surfaces modified with select peptides promote exclusive interactions with osteoblasts, *Biomaterials*, 23, 3937-3942, (2002).

ITO Y., Chen G., Imanishi Y., Micropatterned immobilization of epidermal growth factor to regulate cell function, *Bioconjugate Chem.*, 9, 277-282, (1998).

ITO Y.M., Micropattern immobilization of polysaccharide, *J. Inorganic Biochem.*, 79, 77-81, (2000).

KENAR, H., Desenli, Biyobozunur Polyester Blendler Üzerinde in vitro Kemik Doku Mühendisliği, (M.Sc. Tezi), Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Biyoteknoloji Bölümü, Ankara, (2003).

LU L., Kam L., Hasenbein M., Nyalakonda K., Bizios R., Gopferich A., Young J.F., Mikos A.G., Retinal pigment epithelial cell function on sübstrates with chemically micropatterned surfaces, *Biomaterials*, 20, 2351-2361, (1999).

MAGNANI A., Priamo A., Pasqui D., Barbucci R., Cell behavior on chemically structured surfaces, *Materials Sci. Eng.*, 1045, 1-14, (2003).

MATSUDA T., Sugawara T., Control of cell adhesion, migration, and orientation on photochemically microprocessed surfaces, *J. Biomed. Mater. Res.*, 12, 163-173, (1996).

MATSUZAKA K., Walboomers X.F., Ruijter J.E., Jansen J.A., The effect of poly-L-lactic acid with parallel surface microgroove on osteoblast-like cells in vitro, *Biomaterials*, 20, 1293-1301, (1999).

PERIZZOLO D., Lacefield W.R., Brunette D.M., Interaction between topography and coating in the formation of bone nodules in culture for hydroxyapatite-and titanium-coated micromachined surfaces, *J. Biomed. Mater. Res.*, 56, 494-503, (2001).

PETERSEN E.F., Spencer R.G.S., McFarland E.W., Microengineering Neocartilage Scaffolds, *Biotechnol. Bioeng.*, 78, 802-805, (2002).

SCOTCHFORD C.A., Ball M., Winkelmann M., Voros J., Csucs C., Brunette D.M., Danuser G., Textor M., Chemically patterned, metal-oxide-based surfaces produced by photolithographic techniques for studying protein- and cell- interactions. II: Protein adsorption and early cell interactions, *Biomaterials*, 24, 1147-1158, (2003).

WALBOOMERS X.F., Croes H.J.E., Ginsel L.A., Jansen J.A., Growth behavior of fibroblasts on microgrooved polystyrene, *Biomaterials*, 19, 1861-1868, (1998).

WALBOOMERS X.F., Croes H.J.E., Ginsel L.A., Jansen J.A.,Contact guidence of rat fibroblasts on various implant materials, *J. Biomed. Mater. Res.*, 46, 204-212, (1999).

WALBOOMERS X.F., Monaghan W., Curtis A.S.G., Jansen J.A., Attachment of fibroblasts on smooth and microgrooved polystyrene, *J. Biomed. Mat. Res.*, 46, 212-220, (1999).

WALBOOMERS X.F., Ginsel L.A., Jansen J.A., Early spreading events of fibroblasts on microgrooved sübstrates, *J. Biomed. Mater. Res.*, 51, 529-534, (2000).

WANG J.H.C., Grood E.S., Florer J., Wenstrup R., Alignment and proliferaion of MC3T3-E1 osteoblasts in microgrooved silicone sübstrata subjected to cyclic stretching, *Journal of Biomechanics*, 33, 729-735, (2000).

(37)

PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

1-70

Proje Kodu: TBAG 2288

Proje Başlığı: NANOTEKNOLOJİK YÖNTEMLERLE NEO-ORGAN ÜRETİMİNE YÖNELİK MİKRO DESENLİ POLİMERİK YÜZEY TASARLANMASI VE BUNLARIN KEMİK HÜCRELERİNİN ÇOĞALMA, FARKLILAŞMA VE YÖNLENMESİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Proje Yürütücüsü ve Yardımcı Araştırmacılar:
Proje Yürütücüsü: PROF. DR. VASIF HASIRCI
Yardımcı Araştırmacılar: PROF. DR. ATİLLA AYDINLI, YRD. DOÇ. AYŞEN TEZCANER, DR. İSA KIYAT
HALİME KENAR

Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:
Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü
Bilkent Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fizik Bölümü

Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:

Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 1 Ağustos 2003 - 1 Ağustos 2005

Öz (en çok 70 kelime) Proje litografik yöntemle hazırlanmış çeşitli desenli silisyum şablonların üzerinde polimerik filmler hazırlanması ve bu filmler üzerine sıçan kemik iliği kökenli kök hücreler ekerek hücre yönlendirmesine yüzey kimya ve topografyasının etkisini incelemeyi ve böylelikle biyomateryaller konusunda temel bilgi üretilmesini amaçlamaktaydı. Osteoblasta çevrilen kök hücrelerin poli(3-hidkroksibütirat-ko-3-hidroksivalerat) (PHBV), poli(hidroksietilmetakrilat) (PHEMA) ve bunların interpenetre karışımlarından (IPN) oluşan filmler üzerindeki desenler boyunca yönelimi mikroskopiyle, çoğalmaları ve başkalaşımları da hücre sayıları belirlenerek, ALP miktarı ölçülerek, kollajen tip I ve osteokalsin salmaları immün boyanarak incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Fotolitografi, biyomateryal, doku mühendisliği, osteoblast, başkalaşım (diferansiyasyon)

Projeden Kaynaklanan Yayınlar:

1. H. Kenar, I. Kiyat, A. Tezcaner, A. Aydinli, V. Hasirci, Design of Micropatterned Polymeric Surfaces for Neo-Organ Preparation Using Nanotechnological Approaches,11th International Biomedical Science and Technology Days, BIOMED 2004, Ankara

2. H. Kenar, I. Kiyat, A. Tezcaner, A. Aydinli, V. Hasirci, Micropatterned Polymeric Surfaces For Neo-Organ Preparation (Oral presentation), 6 th International Symposium on Frontiers in Biomedical Polymers, FBPS05, Granada, Spain

Bilim Dalı:

Doçentlik B. Dalı Kodu:

PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Kodu: TBAG 2288

Proje Başlığı: NANOTEKNOLOJİK YÖNTEMLERLE NEO-ORGAN ÜRETİMİNE YÖNELİK MİKRO DESENLİ POLİMERİK YÜZEY TASARLANMASI VE BUNLARIN KEMİK HÜCRELERİNİN ÇOĞALMA, FARKLILAŞMA VE YÖNLENMESİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Proje Yürütücüsü ve Yardımcı Araştırmacılar:
Proje Yürütücüsü: PROF. DR. VASIF HASIRCI
Yardımcı Araştırmacılar: PROF. DR. ATİLLA AYDINLI, YRD. DOÇ. AYŞEN TEZCANER, DR. İSA KIYAT
HALİME KENAR

Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:
Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü
Bilkent Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fizik Bölümü

Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:

Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 1 Ağustos 2003 - 1 Ağustos 2005

Öz (en çok 70 kelime) Proje litografik yöntemle hazırlanmış çeşitli desenli silisyum şablonların üzerinde polimerik filmler hazırlanması ve bu filmler üzerine sıçan kemik iliği kökenli kök hücreler ekerek hücre yönlendirmesine yüzey kimya ve topografyasının etkisini incelemeyi ve böylelikle biyomateryaller konusunda temel bilgi üretilmesini amaçlamaktaydı. Osteoblasta çevrilen kök hücrelerin poli(3-hidkroksibütirat-ko-3-hidroksivalerat) (PHBV), poli(hidroksietilmetakrilat) (PHEMA) ve bunların interpenetre karışımlarından (IPN) oluşan filmler üzerindeki desenler boyunca yönelimi mikroskopiyle, çoğalmaları ve başkalaşımları da hücre sayıları belirlenerek, ALP miktarı ölçülerek, kollajen tip I ve osteokalsin salmaları immün boyanarak incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Fotolitografi, biyomateryal, doku mühendisliği, osteoblast, başkalaşım (diferansiyasyon)

Projeden Kaynaklanan Yayınlar:

1. H. Kenar, I. Kiyat, A. Tezcaner, A. Aydinli, V. Hasirci, Design of Micropatterned Polymeric Surfaces for Neo-Organ Preparation Using Nanotechnological Approaches,11th International Biomedical Science and Technology Days, BIOMED 2004, Ankara

2. H. Kenar, I. Kiyat, A. Tezcaner, A. Aydinli, V. Hasirci, Micropatterned Polymeric Surfaces For Neo-Organ Preparation (Oral presentation), 6 th International Symposium on Frontiers in Biomedical Polymers, FBPS05, Granada, Spain

Bilim Dalı:

Doçentlik B. Dalı Kodu: