



# Duyu Nöronlarının Yönlendirilmiş Büyümesi İçin Altın Nanopartikül/kersetinle Modifiye Edilmiş ve Nano-kanallı SF/PLGA Film İskelelerinin Dizaynı

İlyas Özçiçek<sup>1\*</sup>

<sup>1\*</sup> İstanbul Medipol Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Biyoloji Anabilimdalı, İstanbul, Türkiye, (ORCID: 0000-0002-4495-7395), iozcicek@medipol.edu.tr

(İlk Geliş Tarihi 28 Kasım 2023 ve Kabul Tarihi 26 Mart 2024)

(DOI: 10.5281/zenodo.14180012)

**ATIF/REFERENCE:** Özçiçek, İ. (2024). Duyu Nöronlarının Yönlendirilmiş Büyümesi İçin Altın Nanopartikül/kersetinle Modifiye Edilmiş ve Nano-kanallı SF/PLGA Film İskelelerinin Dizaynı. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (54), 101-112.

## Öz

Dünya genelinde oldukça yaygın olan sinir hasarları, hastaların yaşam kaliteleri üzerinde çarpıcı düzeylerde etkilere sahiptir. Mevcut terapilerle oldukça kısıtlı düzeyde rejenerasyon sağlanabildiği için alternatif ve yenilikçi rejeneratif yaklaşımlara büyük ihtiyaç bulunmaktadır. Sinir doku mühendisliği sahasında, hasarlı aksonların lineer oryantasyonuna kılavuzluk edebilecek topografyaya sahip, biyoyumlu ve iletken sinir kılavuz kanallarının geliştirilmesi için yoğun bir çaba verilmektedir. Bu çalışmanın amacı, nano-kanallı topografyaya sahip ve kersetin konjuge edilmiş altın nanopartiküllerle (AuNP-Q) dekore edilmiş, hibrit yapıdaki SF/PLGA film iskelelerin geliştirilmesi sonrasında, bu malzeme üzerinde farelerden primer olarak izole edilmiş DRG (arka kök gangliyonu) duyu nöronlarının davranışlarının araştırılmasıdır. Hibrit yapıda iskele kullanılması malzemenin fiziksel ve mekanik özelliğini artırmıştır. Laminin kaplama hücresele adezyonu ve büyümeyi desteklemiştir. Nanopartikül modifiye edilmiş nano-kanallı iskeleler (SF/PLGA G<sub>0.5</sub>-AuNP<sub>83</sub>-Q) aksonal oryantasyonu yüksek düzeyde teşvik etmiştir. Geliştirilen biyomalzemenin, potansiyel *in vivo* sinir doku mühendisliği çalışmaları kapsamında, hücresele nöritlerin ve aksonların oryantasyonuna yardımcı olabileceği ve bir sinir hasarı bölgesine implantasyonu sonrasında rejenerasyonu destekleyebileceği değerlendirilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** İpek fibroin/PLGA, Nöral doku mühendisliği, Nano kanallar, Elektron demeti litografisi, Aksonal kılavuzluk.

## Design of Gold Nanoparticle/quercetin Modified, and Nano-channeled SF/PLGA Film Scaffolds for the Oriented Growth of Sensory Neurons

### Abstract

Nerve injuries, which are very common around the world, have dramatic effects on life quality of the patients. There is a great need for alternative and innovative regenerative approaches, since a very limited level of regeneration can be achieved with current therapies. In the field of nerve tissue engineering, intensive efforts are being made to develop biocompatible and conductive nerve guidance channels with topography that can guide the linear orientation of damaged axons. The aim of this study is to develop hybrid SF/PLGA film scaffolds with nano-channeled topography and decorated with quercetin-conjugated gold nanoparticles (AuNP-Q) and to investigate the behavior of DRG (dorsal root ganglion) sensory neurons primarily isolated from the mice on these materials. The using hybrid film scaffold increased the physical and mechanical properties of the material. The laminin coating promoted the cellular adhesion and growth. Nano-channeled scaffolds modified with nanoparticles (SF/PLGA G<sub>0.5</sub>-AuNP<sub>83</sub>-Q) highly promoted the axonal orientation. It was evaluated that the developed biomaterial could help the orientation of cellular neurites/axons and support regeneration after implantation in a nerve injury site, within the scope of potential *in vivo* nerve tissue engineering studies.

**Keywords:** Silk fibroin/PLGA, Neural tissue engineering, Nano-channels, Electron beam lithography, Axonal guidance.

\* Sorumlu Yazar: [iozcicek@medipol.edu.tr](mailto:iozcicek@medipol.edu.tr)

## 1. Giriş

Dünya genelinde milyonlarca insanı etkileyen nöral hasarlar, hastaların yaşam kaliteleri üzerinde önemli düzeylerde etkilere sahiptir. Bu travmalar genellikle istihdam edilebilir yaştaki gençleri ve erişkinleri etkilemekte olup, hastalarda kalıcı düzeylerde bozukluklara yol açmaktadır (Taylor vd., 2008; Asplund vd., 2009; Seddighi vd., 2016). Çevresel sinir sisteminde (ÇSS) rejenerasyon kapasitesi yüksek olsa da merkezi sinir sisteminin (MSS) spontan rejenerasyon düzeyi kendi inhibitör mikro-çevresi sebebiyle oldukça kısıtlıdır. MSS tedavisinde kullanılan ilaçlar sadece hastalığın ilerlemesini geciktirmekte olup, kan beyin bariyeri oral ve intravenöz ilaçların etkinliğini azaltmaktadır (Tam vd., 2014). Nöral doku mühendisliği kapsamında geliştirilecek implant adayları bir iskelelerin mekanik, biyokimyasal, topografik ve elektriksel özellikleri ile doğal ekstraselüler matris ortamının taklit edilebilmesi, sinir rejenerasyonu ve fonksiyonel kazanım açısından belirleyici parametrelerdir. Bahsi geçen tüm bu özellikler, akson ve nörit uzamasını, hücre yapışmasını, nöronal farklılaşmayı ve hücre göçünü etkileyecektir (Subramanian vd., 2009).

Bir sinir hasarı sonrasında, hücresel nöritlerin lineer bir hat boyunca yöneliminin sağlanması fonksiyonel bir rejenerasyonun sağlanması açısından kritiktir. Bu kapsamda geliştirilen biyomalzeme yüzeylerinde değişik desenleme tekniklerine başvurulmaktadır. Özellikle elektron demeti litografisi tekniğinin sunduğu yenilikçi yaklaşımlar sayesinde, oldukça kararlı ve hassas nano-desenlemeler biyomalzeme yüzeylerinde güvenle uygulanabilmektedir (Chen, 2015). Nöral hücrelerin elektriksel olarak bilgi taşıyan hücreler olması sebebiyle, dizayn edilecek iskelelerde farklı iletkenlik yaklaşımlarının kullanılması önemlidir. Uzun yıllardır kullanılan iletken polimerlere alternatif olarak altın nanopartiküller oldukça popüler bir hale gelmiştir. Üstün fizikokimyasal özellikleri, kolay sentezlenebilmeleri, istenilen şekilde yüzey modifikasyonu uygulanabilmesi, stabilite ve biyouyumlulukları avantajlı yönleridir (Ozcicek vd., 2021). Literatürde antioksidan, anti-inflamatuar ve antibakteriyel özellikleri daha önce gösterilen kersetin molekülünün, nanomalzemelerle konjuge bir şekilde kullanımın, rejeneratif tıp çalışmalarında büyük bir kullanım potansiyeli bulunmaktadır (Anand David vd., 2016; Azeem vd., 2023).

İpek fibroin (SF) biyoyumlu, biyo-bozunur, hücrelerle etkileşimi güçlü doğal bir polimer olarak son zamanlarda doku mühendisliği çalışmalarında sıklıkla tercih edilmektedir (Meinel vd., 2005; Wang vd., 2008). Diğer taraftan SF'in mekanik özelliklerinin zayıf olması göz önüne alındığında, sentetik polimerle hibrit şekilde kullanımı avantajlı olabilir. Bu kapsamda FDA onaylı, mekanik özellikleri güçlü, esnek, biyo-bozunur, hücre uyumlu ve kolay işlenebilen bir sentetik polimer olan polilaktik-glikolik asit (PLGA) doku mühendisliği alanında popüler hale gelmiştir (Zhou vd., 2004; Wang vd., 2006; Makadia ve Siegel, 2011).

Bu çalışmanın amacı, nano-kanallı topografyaya sahip ve kersetin konjuge edilmiş altın nanopartiküllerle dekore edilmiş, hibrit yapıdaki SF/PLGA film iskelelerin geliştirilmesi sonrasında, bu malzeme üzerinde farelerden primer olarak izole edilmiş DRG (arka kök gangliyonu) duyu nöronlarının davranışlarının araştırılmasıdır.

## 2. Materyal ve Metot

### 2.1. İpek Fibroinin Saflaştırılması

Bu amaçla *Bombyx mori* (ipek böceği) kozaları (Bursa Kozabirlik) açılarak larvalardan temizlenmiş ve sonra %0,5'lik sodyum bikarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ , Sigma) çözeltisinde 1 saat boyunca beher içinde kaynatılmıştır. 3 kez ılık distile su ile yıkandıktan sonra, oda sıcaklığında kurutulmuştur. Yapı içindeki serisini ayrıştırmak amacıyla bir çözelti hazırlanmıştır ( $\text{CaCl}_2$  (Sigma),  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  (Sigma) ve  $\text{H}_2\text{O}$ ; 1:2:8 molar oranda). Bu çözeltiden 100 mL alınarak 70 °C'de bekletilmiş, üzerine 7.6 g ipek ilave edilerek 3 saat daha inkübasyona devam edilmiştir. Daha sonra 7.000 rpm'de 5 dk. boyunca santrifüj (Thermo Scientific-Sorvall Biofuge Stratos) edilmiş, üstteki sıvı ayrılarak diyaliz poşetine (Sigma) doldurulmuştur. 3 gün süren diyaliz işlemi sonucunda, ipek fibroin proteini saf olarak elde edilmiştir. Saflaştırılan ipek fibroin; önce sıvı azot kullanılarak dondurulmuş, sonra liyofilizatöre (Christ, Alpha 1-2 LDplus) alınarak, 3 gün boyunca liyofilize edilmiştir. Elde edilen liyofilize ipek fibroinler, kullanılmaya kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir (Rockwood vd., 2011).

### 2.2. İpek Fibroin/PLGA Hibrit Polimer Çözeltisinin Eldesi

PLGA (%5 w/v, Mw: 66,000-107,000, 75:25 laktit/glikolit, Sigma-Aldrich) çözeltisi HFIP (Hekzafloroizopropanol, Merck) içinde çözülerek hazırlanmıştır. İpek fibroin (%10 w/v) çözeltisi yine HFIP içinde 4 saat karıştırılarak hazırlanmıştır. İpek fibroin/PLGA hibrit çözeltisi ise (1:1, v/v) eşit hacimsel oranda karıştırılarak elde edilmiştir.

### 2.3. Silikon Kalıpların Üretimi ve Karakterizasyonu

Nano-kanallı SF/PLGA film iskelelerin elde edilebilmesi için öncelikli olarak Si-kalıpların dizaynı ve üretimi elektron demeti litografisi tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kalıpta planlanan çatı genişliği 500 nm; kanal genişliği (G) 1 µm ve oluk yüksekliği (H) ise 1 µm'dir. Böylece 1 mikron periyotlarla tekrar eden, 500 nm kanal genişliğine sahip film iskeleler elde edilmiştir. Bu amaçla, silikon alttaşlar (4 inç) 1 cm x 1 cm'lik parçalar halinde kesilmiştir (Disco DAD 320 Otomatik Dicing Saw) ve ardından standart kalıp temizleme prosedürü uygulanmıştır. Kalıplar, PMMA elektron ışın direnci ile kaplandıktan sonra, desenleme işlemi elektron demeti litografi sistemi (Raith EBPG 100 kV) ile yapılmıştır. Üretilen kalıplar, önceden optimize edilmiş anizotropik kuru aşındırma sisteminde (Oxford PlasmaLAB System 100 ICP 300 Deep RIE)  $\text{SF}_6$ - $\text{C}_4\text{F}_8$  gaz karışımları ile muamele edildi. Yükseklikler bir yüzey profilometresi (KLA Tencor) ile ölçülüp doğrulanmıştır. Elektron demeti litografisi tekniğiyle mikro/nano desenleme işlemi uygulanan silikon kalıpların oluk, çatı genişliklerinin ve derinliklerinin taramalı elektron mikroskobu (SEM, Zeiss GeminiSEM 500) karakterizasyonları yapılmıştır ve planlanan hedeflerle örtüştüğü doğrulanmıştır.

## 2.4. Altın Nanopartiküllerin Sentezi, Kersetinle Yüzeysel Fonksiyonizasyonu ve Karakterizasyonu

Altın nanopartikül (AuNPs) olarak sitrat ile stabilize edilmiş, yaklaşık olarak 50 nm çapta ve negatif yüzeysel yüklü, yüksek monodispersiteye sahip nanomateryallerin sentezi için şu yöntem takip edilmiştir: İlk aşamada, yüksek monodispersiteye sahip yaklaşık 20 nm boyutundaki çekirdek altın nanopartiküller sentezlenip, ilerleyen aşamalarda yaklaşık 50 nm çaptaki altın nanopartiküllerin sentezinde kullanılmıştır. Çekirdek nanopartiküllerin sentezi Turkevich metodu biraz değiştirilerek gerçekleştirilmiştir (Turkevich vd., 1951). Çekirdek altın nanopartiküllerin sentezi için 100 mL, 0.25 mM konsantrasyonunda kloroaurik asit ( $H[AuCl_4]$ ) çözeltisi (Sigma) hazırlanmıştır. Kaynamakta olan çekirdek altın sentez çözeltisinin dönme hızı artırılarak, indirgeyici ajan olan trisodyum sitrat dihidrat (Sigma) çözeltisi, %0.033 konsantrasyonunda ilave edilmiştir. Yaklaşık 10 dakika daha karıştırılarak soğumaya bırakılmıştır. Sentezlenen çekirdek altın nanopartiküller 7000 g'de 1 kez 30 dakika santrifüj (Eppendorf-Santrifüj-5418 R) edilerek, ultra saf su içinde dağıtılmıştır. İkinci aşamada çekirdek-büyütme yöntemi kullanarak yaklaşık 50 nm boyutundaki orta boyuttaki altın nanopartiküller sentezlenmiştir (Perrault ve Chan, 2009). Bu amaçla 100 mL 0.25 mM kloroaurik asit çözeltisi hazırlanmış, 2.4 mL çekirdek altın nanopartikül eklenmiş ve orta hızda karıştırılmıştır. Daha sonra trisodyum sitrat 0.15 mM ve hidrokinon 0.25 mM (Sigma) konsantrasyonunda eklenip, 10 dakika boyunca karıştırılmıştır. Sentezlenen nanopartiküller 7000 g'de 30 dakika santrifüj edilerek, ultra saf su içinde dağıtılmıştır (Ozcecek vd., 2021).

Sentezlenen yaklaşık olarak 50 nm çapa sahip nanopartiküllerin kersetin ile yüzeysel modifikasyonları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla öncelikle kersetinin (Q) (Sigma-Aldrich) stok çözeltisi (10 mg Q/mL) DMSO (Sigma) içinde 30 dakika karıştırılarak hazırlanmıştır. Kersetin çözeltisi, sentezlenen orta boyuttaki altın nanopartikül çözeltisine ( $AuNP_{50}$ ) 10  $\mu$ g/mL konsantrasyonda eklenerek 40 dakika karıştırılmıştır. Elde edilen kersetin konjuge altın nanopartikül çözeltisi ( $AuNP_{83-Q}$ ) 10.000 rpm'de (10 °C) 40 dakika santrifüj edilerek ultra-saf su içinde dağıtılmıştır.

Hazırlanan altın nanopartikül çözeltilerindeki, altın miktarlarını kesin olarak kantifiye edebilmek amacıyla, indüktif olarak eşleştirilmiş plazma kütle spektrometresi (ICP-MS) ölçümü yapılmıştır (Perkin Elmer ICP-MS, Nexion 300X). Böylece her bir mililitredeki altın miktarı  $\mu$ g Au/mL cinsinden yüksek güvenilirlikle belirlenmiştir. Sonraki uygulamalarda kolaylık sağlaması için altın nanopartikül çözeltileri, 50  $\mu$ g/mL konsantrasyonda altın (Au) içerecek şekilde standardize edilerek +4 °C'de, karanlık koşullarda saklanmıştır. Hazırlanan altın nanopartiküller için taramalı elektron mikroskobu karakterizasyonları (SEM-Zeiss Geminisem 500), zeta-sizer (Zetasizer Ultra-Malvern) analizleri (ortalama Z-boyut, zeta potansiyel ve polidispersite indeksi), UV-görünür spektrofotometrik (Shimadzu UV-1800) ölçümleri (SPR pik dalga boyları) yapılmıştır.

## 2.5. SF/PLGA Film İskelelerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Daha önce hazırlanan (Kısım 2.2'de belirtilen) SF/PLGA hibrit polimer çözeltisi kullanılarak düz ve nano-kanallı film iskelelerin üretimi gerçekleştirilmiştir. Tüm film iskelelerin üretimi spin kaplama tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Düz yüzeysel (D) iskelelerin eldesi için, küçük düz tabanlı cam petri içinine 10 mL SF/PLGA hibrit çözeltisi kademe kademe homojen ve ince bir tabaka oluşturacak şekilde dökülerek, çeker ocak içinde 1 gece boyunca kurumaya bırakılmıştır. Filmler cam yüzeyden dikkatlice çıkartılarak serin ortamda muhafaza edilmiştir. Nano-kanallı (G) SF/PLGA film iskelelerin elde edilebilmesi için elektron demeti litografisi tekniği ile üretilmiş olan Si-kalıplar ve spin kaplama tekniği kullanılmıştır. Si-kalıplar öncelikle küçük cam tabanlı petrinin tam ortasına entegre edilmiş ve sonra petri spin kaplama sistemine dahil edilmiştir. Her bir petriye toplam 10 mL SF/PLGA çözeltisi damla damla ilave edilerek çeker ocak içinde 1 gece boyunca kurumaya bırakılmıştır. Ertesi gün nano-kanallı filmler, kalıplardan dikkatlice ayrılmış ve serin ortamda muhafaza edilmiştir.

$AuNP_{83-Q}$  nanomateryaller kullanılarak hazırlanan düz ve nano-kanallı SF/PLGA film iskelelerin yüzeysinin iletken hale getirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla nanopartikül çözeltisinin 100 mikrolitresi (50  $\mu$ g Au/mL) yavaş bir şekilde her bir film yüzeye damlatılarak, iskeleler laminar-akış kabini içinde kurumaya bırakılmıştır (Thermo Maxisafe 2020 Class II). Aynı zamanda herhangi bir iletkenlik yaklaşımı uygulanmayan film yüzeyler de çalışmalarda kullanılmıştır. Nöral hücresel adezyonu ve gelişimi sağlamaya yönelik biyomolekül kaplamaları gerçekleştirilmiştir. Poli-L-lizin (PLL, Sigma) kaplama için yüzeysel üzerine % 10'luk PLL çözeltisinden çok ince bir tabaka oluşturacak şekilde yüzeye kaplanmış ve kurutulmuştur. Sonrasında laminin çözeltisinden (Sigma) yine yüzeyde çok ince bir tabaka oluşturacak şekilde kaplama yapılmış ve kurutulmuştur. Tüm kaplamalar steril koşullarda gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan tüm SF/PLGA filmler, hücresel çalışmalara geçmeden önce 5 dakika %70 etanol (Ethanol, Sigma-Aldrich) ve UV maruziyeti (30 dakika) ile steril edilmiştir. Elde edilen tüm filmlerin, 4 nm kalınlığında Au/Pd sputter kaplamaları (Leica EM ACE200) sonrasında yüzeysel SEM karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda film iskele kalınlıkları kesitsel incelemelerle belirlenmiştir.

## 2.6. Duyu Nöronlarının İzolasyonu ve Kültürü

Duyu nöronlarının izolasyonu *Balb-c* ırkı dişi ve erkek farelerin arka kök ganglionlarının (DRG) diseksiyonu yoluyla gerçekleştirilmiştir. Hayvan temini için İstanbul Medipol Üniversitesi Deney Hayvanları Birimi olan MEDİTAM kullanılmıştır. Hayvan deneyleri için gerekli etik kurul izni alınmıştır (İMÜ-HADYEK, onay numarası: 56). Hücre izolasyonu amacıyla, 1 adet yetişkin *Balb-c* ırkı albino fare 1-2 dk süreyle, ön anestetik olarak fareyi sakinleştirmek amacıyla az miktar eter (Sigma) pamuğa emdirilerek farenin solunması sağlanmış ve daha sonra intraperitoneal olarak 2 mL ketalar (Bayer) verilmiştir. Anestezi etkisini gösterdikten sonra deney hayvanı straför üzerine iğne kullanılarak sabitlenmiş ve üzerine % 70'lik etanol sıkılmıştır. Deney hayvanı laminar kabin içerisine alınarak sırt derisi kaldırılmıştır (Thermo Maxisafe 2020 Class II). Makasla dekapitasyon işlemi uygulanmış ve uygun cerrahi malzemelerle, stereo mikroskop altında, arka kök ganglionları diseke edilmiştir (Zeiss Stereo Microscope Discovery V8). Arka kök ganglionlarının diseksiyonu yoluyla çıkarılan DRG'ler bekletilmeden % 1 glutamin (Sigma) ve % 1 antibiyotik (Sigma) içeren RPMI 1640 (Sigma) vasatının içine konulmuştur. RPMI 1640 vasatında bekleyen DRG'ler sonra; % 1

glutamin, % 1 antibiyotik ve % 2 B27 (Thermo Fisher-Invitrogen) de ihtiva eden NBA (Thermo Fisher-Invitrogen) vasatın içerisine aktarılmıştır. İçerisine tip IV kollajenaz (Sigma) eklenerek 40 dk. süreyle etüvde (Thermo Scientific HERACELL 150i) inkübe edilmiştir. Daha sonra Hank's (Sigma) solüsyonuyla 3 kez yıkama yapılmıştır. Üstüne NBA vasat ve tripsin (Sigma) enzimi konularak 15 dk. etüvde bekletilmiştir. Ardından kültür tirütü edilmiştir. Bunun için önce kesik uçlu mavi, mavi, sarı pipet uçları kullanılmış ve bir süre de ajitatörde bekletilmiştir. Sonra hücre süspansiyonu insülin enjektöründen geçirilmiştir. DNAaz (Sigma) enzimi eklenerek yarım saat daha hücreler etüvde inkübe edilmiş ve daha sonra hücreler 5 dk. süreyle 1000 rpm'de santrifüj edilmiş ve bu arada Percoll (Sigma) gradiyenti hazırlanmıştır. % 10'luk, % 35'lik ve % 60'lık olmak üzere 3 ayrı gradiyent oluşturulmuştur. Elde edilmek istenen hücreler % 60'lık tabakanın orta kısmında bulunmaktadır. Santrifüjden çıkan hücrelerin üstündeki sıvı çekildikten sonra; üzerine tripsin inhibitörü (Roche), FBS (Sigma) ve NBA vasat eklenmiştir. Sonra bu karışım percolün üzerine eklenmiş ve 1700 rpm'de 20 dk santrifüj edilmiştir. % 60'lık gradiyentin ortasından bir miktar hücre içeren sıvı çekilmiş ve ardından bol miktar NBA eklenerek, 5 dk. 1000 rpm'de santrifüj edilmiş ve böylece percolün etkisi ortadan kaldırılmıştır. Saflaştırılan duyu nöronları, hazırlanan iskelelere (kısım 2.5'te belirtilen) ve kontrol grubu olarak NBA varlığında, 1 gün önceden % 10'luk poli-L-lizin (Sigma) ve % 1'lik laminin (Sigma) kaplanmış cam tabanlı petrilere ekilmiştir. Hücreler NBA kültür vasatı (% 1 antibiyotik, % 1 glutamax ve % 2 B27 ihtiva eden) içinde, 37°C'de, % 95 hava, % 5 CO<sub>2</sub> ve % 21 O<sub>2</sub> koşullarında toplamda 3 gün boyunca inkübatörde kültür edilmişlerdir (Ozcicek vd., 2021).

## **2.7. SF/PLGA-D Film İskelelerin Hücresel Uyumluluk Çalışmaları**

Nöral hücresel davranış çalışmalarına geçmeden önce, üretilen SF/PLGA D iskele gruplarının (PCL/PLGA-D ve SF/PLGA-D-AuNP<sub>83</sub>-Q) biyouyumlulukları değerlendirilmiştir. Ayrıca kontrol grubu olarak cam tabanlı petriye ekilen hücreler kullanılmıştır. Canlılık analizleri 2, 24, 48 ve 72 saatlik zaman periyotları için belirlenmiştir. Ortalama hücre canlılığı yüzdesini hesaplayabilmek için, propidyum iyodür (PI- Thermo Fisher) boyası ve lazer taramalı konfokal mikroskobu (LSCM, Zeiss LSM 780) kullanılmıştır. Bu amaçla steril edilen film iskeleler cam tabanlı petri kaplarına yerleştirilmiş ve her bir nöral hücre grubu ayrı ayrı ekilerek (1000 hücre/iskele) NBA kültür vasatı içinde 72 saat inkübe edilmiştir (37 °C, % 95 hava, % 5 CO<sub>2</sub>, ve % 21 O<sub>2</sub>). PLL ve laminin kaplı cam petripler kontrol grubu olarak kullanılmıştır. PI boyasının ölü hücrelerin çekirdeğini kırmızıya boyamasından dolayı, hesaplamalar ölü hücreler üzerinden yapılmıştır. Bu amaçla her gruptaki DRG ve motor nöronlardan 20x objektifte ve T-PMT modda, konfokal mikroskopta rastgele 10 bölge seçilerek hesaplama yapılmış, ortalamaları alınmıştır. Böylece 2, 24, 48 ve 72. saat zaman dilimlerinde ortalama hücre canlılığı hesaplanmıştır. Sadece nöronlar hesaba katılmış, glial destek hücreler göz ardı edilmiştir. Nöronların çoğalmayan hücreler olmasından dolayı başlangıçtaki hücre canlılığı yüzdesi de en yüksektir. Böylece her bir petri bölgesi için, belli zaman noktasındaki ortalama canlı hücre yüzdesi hesaplanabilmiştir. Tüm gruplar için ortalama canlılık yüzdeleri elde edildikten sonra, istatistiksel analizlerde SPSS Statistics 22 kullanılmıştır. Gruplar arasındaki farkları ortaya koymak için ANOVA testi kullanılmış, her bir konsantrasyon kendi içinde değerlendirilerek, \*P<0.05 ise; kontrol grubuna kıyasla, ilgili grubun önemli düzeyde farklı olduğu kabul edilmiştir.

## **2.8. İmmünohistokimyasal Floresan Analizler**

Kısım 2.6'da belirtildiği şekilde SF/PLGA iskele gruplarına (SF/PLGA-D, SF/PLGA-D-AuNP<sub>83</sub>-Q, SF/PLGA-G<sub>0.5</sub>, SF/PLGA-G<sub>0.5</sub>-AuNP<sub>83</sub>-Q) ve kontrol grubu olarak cam tabanlı petriye ekilen duyu nöronlarının 72 saatlik inkübasyonu sonucunda immünohistokimyasal floresan analizleri ve LSCM görüntülemeleri gerçekleştirilmiştir. Bu boyamalar aynı zamanda aksonal yapıların ve nöritlerin davranışlarının kantifikasyonuna da olanak vermiştir. Yine değişik yüzey kaplamalarının akson, nörit ve hücre morfolojilerine olan etkisi de ortaya konulmuştur.

Hücrelerin immünohistokimyasal olarak boyanması amacıyla, öncelikle bloklayıcı çözelti ve antikor sulandırma çözeltisi hazırlanmıştır. Her iki çözelti de 1×PBS içerisinde hazırlanmış olup; 3/100 oranda sığır serum albümini (BSA, Sigma), 3/1000 oranda sodyum azit (Sigma) ve 1/100 oranda fetal keçi serumu (FCS, Sigma) içermektedir. Farklı olarak bloklayıcı çözeltide 1/1000 oranda Triton-X (Sigma), antikor sulandırma çözeltisinde ise 1/100 oranda Tween-20 (Sigma) bulunmaktadır. Hücrelerin üstündeki vasat çekildikten sonra hücreler, 3 kez PBS ile yıkanmıştır. Sonra % 4'lük paraformaldehit (PFA, Sigma) ile 15 dk. boyunca fikse edilmiştir. Yine PBS (Sigma) ile yıkandıktan sonra, her bir petriye 1mL blok solüsyonu eklenerek 30 dk. beklenmiştir. 100'er µL gerekli primer antikorlar (mouse beta-III-tubulin, abcam, 1:500; chicken neurofilament-200 kD, abcam, 1:500) eklenmiş ve 1 gece +4°C'de buzdolabında bekletilmiştir. Ertesi gün, primer antikorlar çekildikten sonra 3 kez PBS ile yıkanmıştır. Sonra uygun primer antikor kombinleri de düşünülerek, sekonder antikorlardan (Alexa Fluor 488 goat-anti-mouse (Invitrogen), 1:500; Alexa Fluor 594 goat-anti-chicken (Invitrogen), 1:500) 100 µL eklenerek, 3 saat +4°C'de bekletilmiştir. 3 kez PBS ile yıkandıktan sonra, 1 mL DAPI (Molecular Probes) mavisi eklenerek 5 dk beklenmiş ve sonra 3 kez daha PBS ile yıkama yapılmıştır. Hücreler DAPI mavisiyle çekirdek boyamaları yapıldıktan sonra, gerekli PBS yıkamalar yapılmıştır. Boyanmış hücre örneklerini taşıyan iskeleler; FluorSave (Sigma) reaktif ile Poli-L-lizin kaplı lamlara aktarılmış ve lamelle kapatılmıştır. Lazer taramalı konfokal mikroskopta hücresel yapılar görüntülenmiştir. Beta-III-tubulin, sinir sistemindeki nöronların mikrotübüllerinin majör bileşenidir. Nörofilament-200 kD protein ise, nöronların olgun aksonlarındaki nörofilamentlerin ağır zincirlerinin komponentidir (Ozcicek vd., 2021).

## **2.9. Akson Davranışlarının Kantifikasyonu**

İki farklı yüzey modifikasyonuna (iletken olmayan ve iletken) sahip SF/PLGA G<sub>0.5</sub> iskeleler (kanallı topografyada) üzerinde 72 saat boyunca kültür edilen duyu nöronlarının ICC floresan analizlerinden hareketle, hücresel davranışları analiz edilmiştir. DRG duyu nöronları için ortalama olarak aksonal sapmaları değerlendirmek için (NF-200 aksonal immün-floresan boyamaya ilişkin konfokal mikroskop görüntülerinden hareketle), aksonların kanallardan/lineer hattan sapma açısı dereceleri Image J programı kullanılarak hesaplanmıştır. Bu amaçla her bir grup için rastgele 10 LSCM görüntüsü seçilerek, ilgili alandaki tüm ışığıyan akson/nörit yapıları

programla incelenmiş ve ortalama açılmal sapma değeri elde edilmiştir. Böylece iletken olmayan grup, iletken grup ile karşılaştırılmıştır.

### 3. Araştırma Sonuçları ve Tartışma

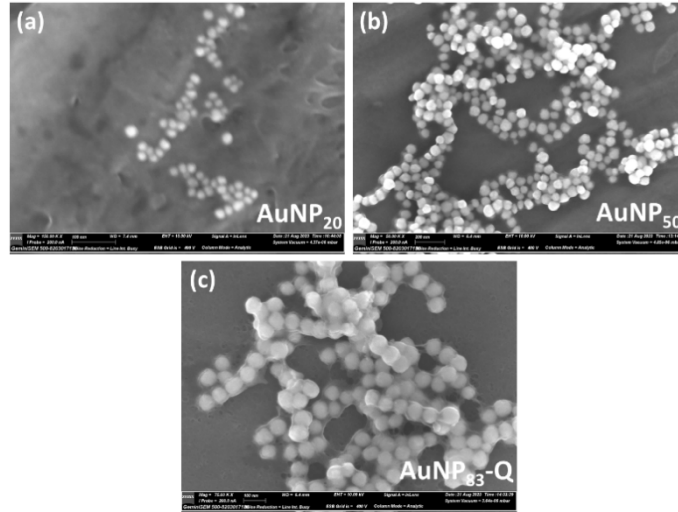
#### 3.1. Altın Nanopartiküllerin Karakterizasyon Sonuçları

Tablo 1’de sentezlenen altın nanopartikül gruplarının fizikokimyasal karakteristik özelliklerini gösteren veriler gösterilmiştir.

Tablo1. Sentezlenen altın nanopartikül gruplarının fizikokimyasal karakteristik özellikleri

Gruplar	Hidrodinamik çap (nm)	Polidispersite indeksi (PDI)	UV-vis. piki (nm)	Zeta potansiyel (mV)
AuNP <sub>20</sub>	20.07±0.3	0.11	523	-50.19
AuNP <sub>50</sub>	50.72±0.2	0.17	537	-54.52
AuNP <sub>83-Q</sub>	83.18±0.2	0.19	545	-21.87

Sentezlenen altın nanopartikül gruplarına ait genel nano-karakteristik özelliklerden hareketle, polidispersite indeksleri 0.2’nin altında kalarak oldukça monodispers yapı sergilemiştir. Çekirdek ve orta boy partiküllerdeki SPR pik dalga boyundaki değişimler, boyuta bağlı olarak gerçekleşmiştir. Aynı değişim Q yüzey modifikasyonu için izlenmiştir. Hedeflenen nanopartikül boyutlarına ulaşılmış olup, en son uygulanan Q kaplama sonucu partiküller ortalama 83 nm boyutuna kadar büyütülmüştür. Sentezlenen altın nanopartiküller ilk aşamada sitrat ile stabilize bir halde oldukları için negatif zeta potansiyel değerlerine sahiptirler. Kersetin molekülü ile kaplanmaları sonrasında negatif değerde bir miktar azalma olsa da yine de eksi (-) zeta potansiyel değeri korunmuştur. Şekil 1’de sentezlenen altın nanopartikül gruplarının SEM görüntüleri verilmiştir.

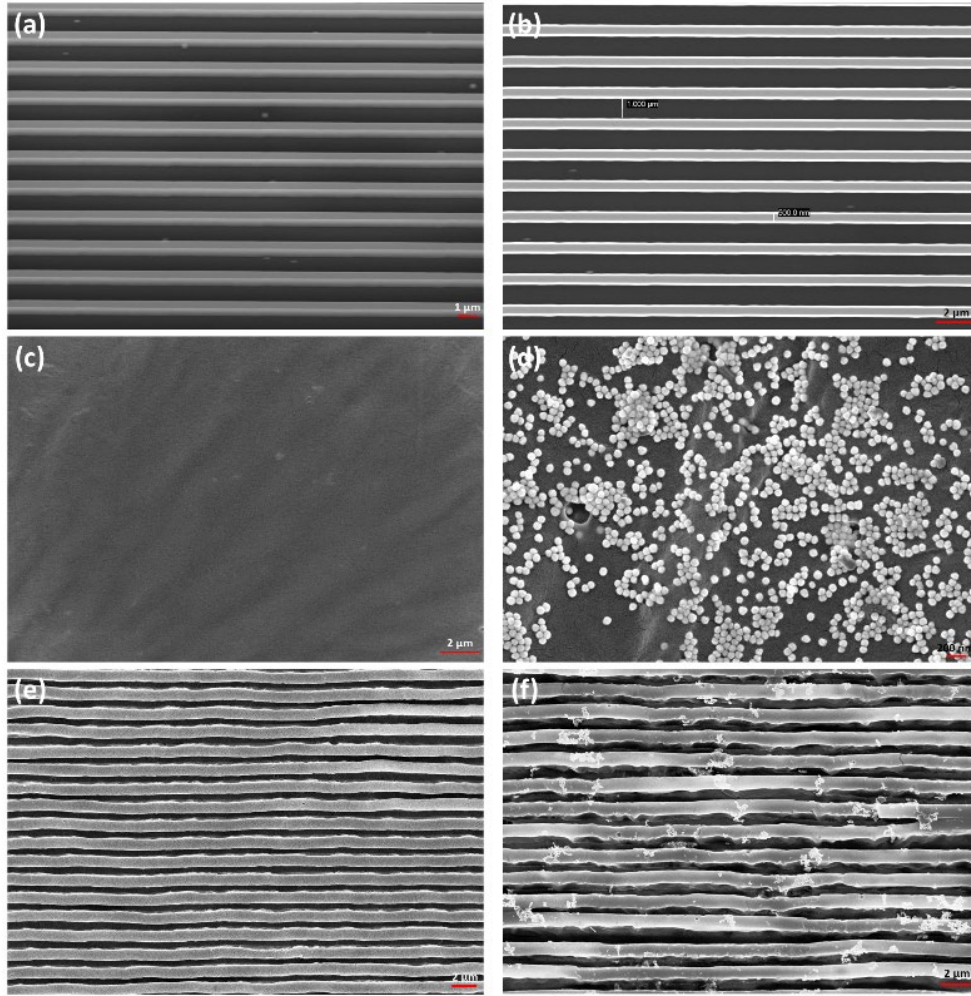


Şekil 1. Sentezlenen altın nanopartiküllerin (AuNPs) SEM görüntüleri. (a) AuNP<sub>20</sub>. (b) AuNP<sub>50</sub>. (c) AuNP<sub>83-Q</sub>.  
Figure 1. SEM images of the synthesized gold nanoparticles (AuNPs). (a) AuNP<sub>20</sub>. (b) AuNP<sub>50</sub>. (c) AuNP<sub>83-Q</sub>.

SEM analizleriyle (Şekil 1 a-b) yüksek düzeyde monodispers ve stabil nanopartiküllerin, oldukça kontrollü sentez yaklaşımı ile elde edildiği doğrulanmıştır. Kersetin yüzey modifikasyonu SEM resminde (Şekil 1 c) net bir şekilde görülmekte olup, aynı zamanda elektron mikroskopisi ile daha önce DLS ile ölçülen nanopartikül boyutları da doğrulanmıştır.

#### 3.2. Silikon Kalıplar ve SF/PLGA Film İskeleler

Şekil 2’de, elektron demeti litografisi tekniği kullanılarak üretilen silikon (Si) kalıpların ve elde edilen SF/PLGA film iskelelerin SEM görüntüleri verilmiştir.



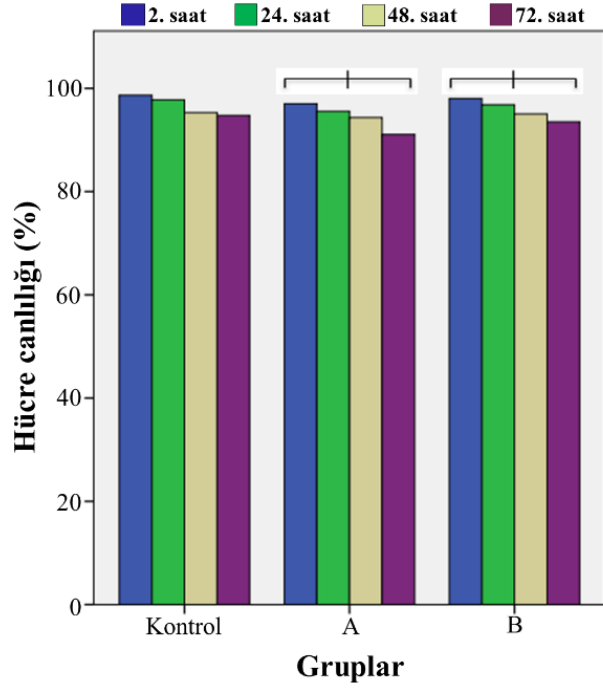
Şekil 2. Si-kalıpların ve SF/PLGA film iskelelerin SEM görüntüleri. (a) Kalıbın eğimli SEM görüntüsü kanal derinliğinin yaklaşık olarak 1  $\mu\text{m}$  olduğunu göstermektedir. (b) Si-kalıp (500 nm çatı genişliği, 1 mikron kanal genişliği). (c) SF/PLGA D. (d) SF/PLGA D-AuNP<sub>83</sub>-Q. (e) SF/PLGA G<sub>0.5</sub>. (f) SF/PLGA G<sub>0.5</sub>- AuNP<sub>83</sub>-Q. (SF: İpek fibroin, PLGA: Polilaktik-ko-glikolik asit, D: Düz yüzey, G: Kanallı yüzey, 0.5: 500 nm genişlik, AuNP: Altın nanopartikül, Q: Kersetin).

Figure 2. SEM images of the Si-molds and SF/PLGA film scaffolds. (a) Tilted SEM image showing the depth of the channels which was about 1  $\mu\text{m}$ . (b) Si-mold (500 nm ridge width, 1  $\mu\text{m}$  groove width). (c) SF/PLGA S. (d) SF/PLGA S-AuNP<sub>83</sub>-Q. (e) SF/PLGA G<sub>0.5</sub>. (f) SF/PLGA G<sub>0.5</sub>- AuNP<sub>83</sub>-Q. (SF: Silk fibroin, PLGA: Polylactic-co-glycolic acid, S: Smooth surface, G: Grooved surface, 0.5: 500 nm width, AuNP: Gold nanoparticle, Q: Quercetin).

Kalıplarda planlanan çatı genişlikleri (R) 500 nm; kanal genişliği 1  $\mu\text{m}$  ve oluk yüksekliği ise 1  $\mu\text{m}$ 'dir. Elektron demeti litografisi tekniğiyle mikro/nano desenleme işlemi uygulanan silikon kalıpların; kanal, çatı genişliklerinin ve derinliklerinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) karakterizasyonlarına göre planlanan hedeflerle birebir örtüştüğü doğrulanmıştır. Şekil 2-a ve b'de 500 nm çatı genişliğindeki, sırasıyla hafif eğimli olarak ve tam üstten alınan görüntüler verilmiştir. Kalıbın eğimli SEM görüntüsü kanal derinliğinin yaklaşık olarak 1  $\mu\text{m}$  olduğunu göstermektedir. Kalıp morfolojilerinin oldukça düzgün ve homojen bir mikro/nano desenleme yapısı sergilediği görülmektedir. Bu kalıplar üzerine polimerik çözelti dökülerek spin kaplama tekniğiyle film yapıda iskeleler elde edildiği için, filmlerdeki çatı genişlikleri (periyot) ve kanal yükseklikleri standart olarak 1  $\mu\text{m}$ ; kanal genişlikleri ise 500 nm'dir (Şekil 2 e-f). Düz yüzeyli SF/PLGA film yüzeyler genel olarak düzgün bir morfoloji sergilemiştir (Şekil 2 c-d). Altın nanopartiküllerin çoğunlukla kanallar içerisinde birikerek, büyük agregasyonlar oluşturmadan homojen bir şekilde dağılım sergiledikleri görülmektedir (Şekil 2 f). Film kalınlıkları yapılan kesitsel SEM ölçümlerine dayanarak ortalama 110  $\mu\text{m}$  olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak tüm film iskelelerde, planlanan yüzey modifikasyonları ve topografyalara başarılı bir şekilde ulaşılmıştır. Film iskelelerde mekanik ve fiziksel açıdan herhangi bir stabilite problemi ile karşılaşılması beklenmemiştir.

### 3.3. SF/PLGA Film İskelelerin Nöral Hücresel Toksikiteilerinin Değerlendirilmesi

Dizayn edilen SF/PLGA D film iskelelerin farklı zaman dilimleri için (2 saat, 24 saat, 48 saat ve 72 saat), DRG primer duyu nöronlarındaki hücresel canlılığa etkisine ilişkin veriler grafik halinde Şekil 3'te verilmiştir.



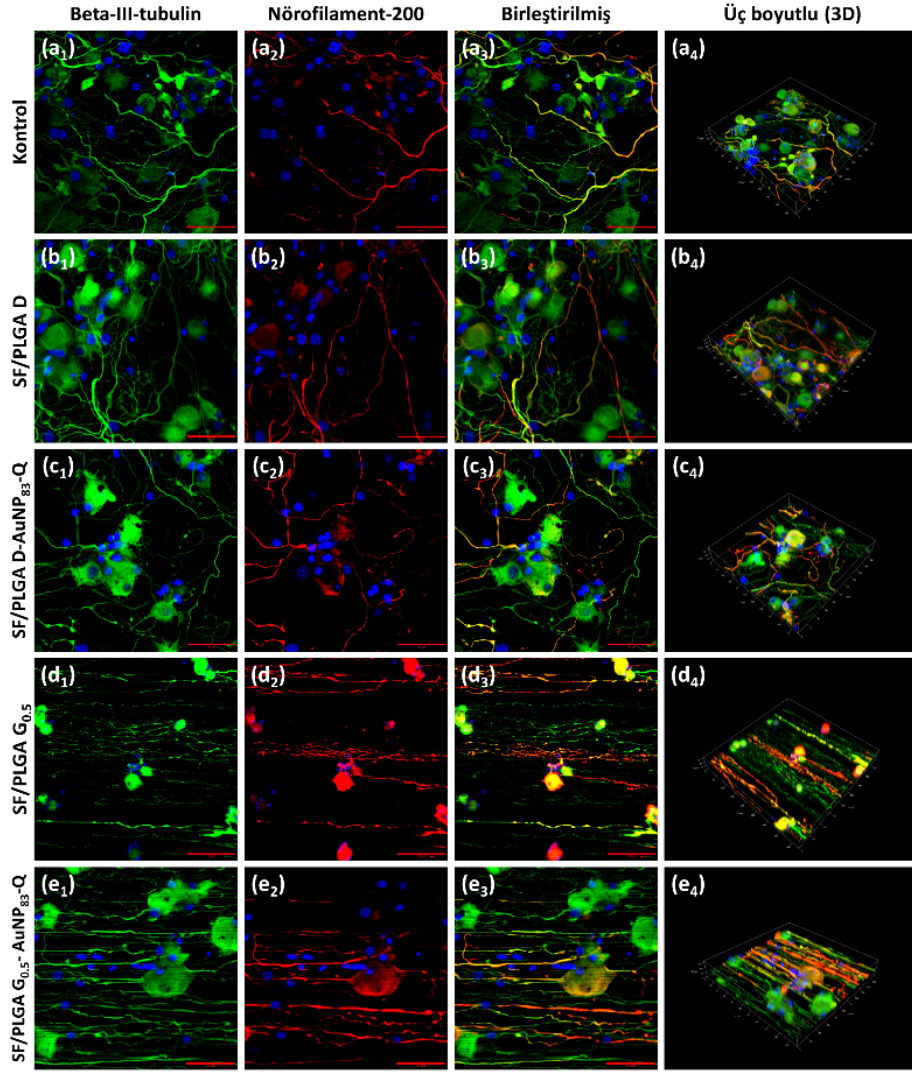
Şekil 3. Dizayn edilen SF/PLGA D film iskelelerin farklı zaman dilimlerinde (2 saat, 24 saat, 48 saat ve 72 saat) DRG primer duyu nöronlarındaki hücresel canlılığa etkisi. (A) SF/PLGA D. (B) SF/PLGA D-AuNP<sub>83</sub>-Q. \*Kontrol grubuna kıyasla anlamlı farklılık olduğunu göstermektedir,  $P < 0.05$ ,  $n = 3$ , veriler ortalama  $\pm$  SD olarak temsil edildi. Veriler SPSS one-way ANOVA ve Tukey post-hoc analizleri kullanılarak istatistiksel olarak analiz edildi. (SF: İpek fibroin, PLGA: Polilaktik-ko-glikolik asit, D: Düz yüzey, AuNP: Altın nanopartikül, Q: Kersetin).

Figure 3. Cell viability studies of the DRG sensory neurons on the designed SF/PLGA S film scaffold groups at different time points (2 h, 24 h, 48 h, 72 h). (A) SF/PLGA S. (B) SF/PLGA S-AuNP<sub>83</sub>-Q. \*Different from the control group  $P < 0.05$ ,  $n = 3$ , Data were represented as mean  $\pm$  SD. Data were analyzed by SPSS one-way ANOVA and Tukey post-hoc analysis. (SF: Silk fibroin, PLGA: Polylactic-co-glycolic acid, S: Smooth surface, AuNP: Gold nanoparticle, Q: Quercetin).

Toplam 72 saatlik periyot boyunca tüm gruplardaki canlılık oranı % 85'in üzerinde olup, kontrol grubuna kıyasla malzeme gruplarında önemli oranda nöronal canlılığı etkileyecek olumsuz bir sonuca ulaşılmamıştır. SF/PLGA'nın kendisi doku mühendisliği çalışmaları için oldukça biyoyumlu bir hibrit materyal olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca kersetin modifiye altın nanopartikül yüzey dekorasyonu da oldukça hücre-uyumlu olarak değerlendirilmiştir. Çalışmalarda herhangi bir kontaminasyon problemi yaşanmamıştır. Yine PLL ve laminin ile yüzeylerin önceden kaplanması, iskeleleri hücresel çalışmalar için oldukça hidrofilik hale getirmekte olup, adezyonu ve büyüme teşvik etmiştir.

### 3.4. SF/PLGA Film İskeleler Üzerindeki Nöral Hücrelerin LSCM Karakterizasyonları

Kontrol grubu ve farklı SF/PLGA film iskeleler üzerinde 72 saat kültür edilen DRG duyu nöronlarının, nöral hücre iskeleti bileşenlerini immün floresan boyama sonucu gösteren lazer taramalı konfokal mikroskop görüntüleri Şekil 4'te verilmiştir. Şekil 4-a'da, cam tabanlı petrideki (kontrol grubu), 72 saatlik DRG duyu nöronu kültürünün üçlü immün-floresan boyama (beta-III-tubulin, NF-200 ve DAPI) LSCM görüntüleri verilmiştir (yeşil ışımaya beta-III-tubulini, kırmızı ışımaya NF-200'ü ve mavi ışımaya DAPI'yi ifade etmektedir). Kontrol grubunda genel olarak, iyi düzeyde ve rastgele dağılmış bir aksonal ağ göze çarpmaktadır. Beta-III-tubulin'in hem gövdeyi ve dendritleri hem de ince ve kalın aksonları boyadığı görülmektedir. NF-200'ün ise çoğunlukla kalın aksonları boyadığı gözlenmektedir. Böylece izole edilen primer duyu nöronları öncelikle petride gerçekleştirilen kültür ve sonrasında ICC floresan analizlerle tanımlanmış ve konfokal mikroskopla gösterilmiştir. Düz yüzeyli film iskeleler üzerindeki nöral hücrelerde kontrol grubuna benzer sonuçlar elde edilmiştir. Adezyona ya da nöral hücre gelişime dair herhangi bir sorunla karşılaşılmaştır. Yine beklendiği gibi rastgele bir şekilde dağılmış aksonal morfolojiler tüm düz yüzeyli iskelelerde izlenmiştir. Yüzey iletkenlik yaklaşımı olarak kullanılan AuNP-Q modifikasyonu hücre morfolojilerinde ve nöronal iskelet proteinlerinde olumsuz bir etkiye yol açmamıştır (Şekil 4 b-c). Nano-kanallı topografyaya sahip iskeleler üzerinde kültür edilen duyu nöronlarında genel olarak oluklar boyunca bir oryantasyon izlenmiştir. Altın nanopartiküllerin kanallar boyunca iletken nanodiziler sağlaması sebebiyle bu grupta yüksek düzeyde bir aksonal oryantasyon gerçekleşmiştir. İletken olmayan yüzeylerde ise sapmalar gözlenmiştir (Şekil 4 d-e).



Şekil 4. Farklı SF/PLGA film iskeleler üzerinde 72 saat kültür edilen DRG duyu nöronlarının, nöral hücre iskeleti bileşenlerini immün floresan boyama sonucu gösteren lazer taramalı konfokal mikroskop (LSCM) görüntüleri. (a<sub>1</sub>-a<sub>4</sub>) Kontrol grubu. (b<sub>1</sub>-b<sub>4</sub>) SF/PLGA D. (c<sub>1</sub>-c<sub>4</sub>) SF/PLGA D-AuNP<sub>83-Q</sub>. (d<sub>1</sub>-d<sub>4</sub>) SF/PLGA G<sub>0.5</sub>. (e<sub>1</sub>-e<sub>4</sub>) SF/PLGA G<sub>0.5</sub>- AuNP<sub>83-Q</sub>. Skala bar (a, b, c, e) = 50 µm, Skala bar (d) = 100 µm. (SF: İpek fibroin, PLGA: Polilaktik-ko-glikolik asit, D: Düz yüzey, G: Kanallı yüzey, 0.5: 500 nm genişlik, AuNP: Altın nanopartikül, Q: Kersetin).

Figure 4. Immunofluorescence laser scanning confocal microscope (LSCM) images of DRG sensory neurons showing neural cell skeleton components incubated on different SF/PLGA film scaffolds for 72 h. (a<sub>1</sub>-a<sub>4</sub>) Control group. (b<sub>1</sub>-b<sub>4</sub>) SF/PLGA S. (c<sub>1</sub>-c<sub>4</sub>) SF/PLGA S-AuNP<sub>83-Q</sub>. (d<sub>1</sub>-d<sub>4</sub>) SF/PLGA G<sub>0.5</sub>. (e<sub>1</sub>-e<sub>4</sub>) SF/PLGA G<sub>0.5</sub>- AuNP<sub>83-Q</sub>. Scale bar (a, b, c, e) = 50 µm, Scale bar (d) = 100 µm. (SF: Silk fibroin, PLGA: Polylactic-co-glycolic acid, S: Smooth surface, G: Grooved surface, 0.5: 500 nm width, AuNP: Gold nanoparticle, Q: Quercetin).

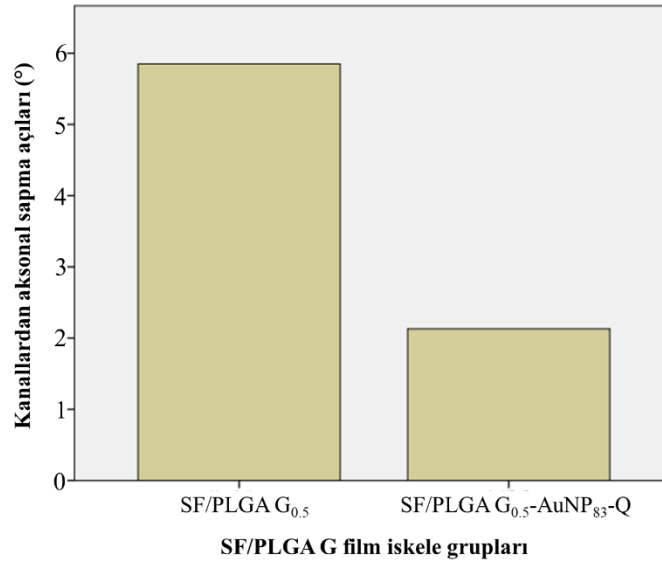
### 3.5. Oluklardan Aksonal Sapma Açısı Analizleri

Çeşitli yüzey dizaynlarına sahip nano-kanallı SF/PLGA film iskeleler üzerinde 72 saat inkübe edilen duyu nöronlarının, nano-kanallardan ortalama aksonal sapma açısı değerleri Şekil 5'te verilmiştir. Herhangi bir iletkenlik yaklaşımı içermeyen, nano-kanallı topografyaya sahip grupta belli düzeyde bir aksonal oryantasyon sağlansa da istenilen düzeyde değildir ve sapmalar mevcuttur. Diğer taraftan altın nanopartiküllerin oluklar boyunca iletken nanodiziler oluşturması, aksonal oryantasyonu yüksek düzeyde teşvik etmiştir. İletken olmayan grupla kıyaslandığında, altın nanopartikül modifikasyonu içeren grupta önemli oranda lineer hatlar boyunca aksonal kılavuzluk sağlanmıştır.

Nöral hücrelerin elektriksel olarak bilgi taşıyan hücreler olması sebebiyle, dizayn edilecek iskelelerde farklı iletkenlik yaklaşımlarının kullanılması önemlidir. Sinir doku mühendisliğine yönelik olarak literatürde iletken polimerler içeren malzemeler uzun yıllardır üzerinde çalışılan bir konudur. Diğer taraftan toksik özelliklerine dair sonuçlar da göz önüne alınarak alternatif yüzey iletkenlik yaklaşımlarına büyük ihtiyaç bulunmaktadır. Özellikle polipirrol (PPy) iletken bir polimer olarak uzun yıllardır biyomedikal sahada büyük ilgi uyandırmaktadır. Literatürde, polipirrolün iletken biyomateryal olarak kullanıldığı ilk zamanlardaki *in vitro* düzeydeki çalışmalarda; nöroendokrin hücreler, fibroblast hücreleri, endotelial hücreler, makrofajlar ve PC12 hücreleri gibi çeşitli



hücre tipleriyle, sitotoksosite ve hücresel davranışları belirlemeye yönelik araştırmalar yapılmıştır (Aoki vd., 1996; Jiang vd., 2002; Lia vd., 2004). Nöral hücre hattına yönelik iki çalışmada, polipirol malzemenin hücresel canlılık üzerinde olumsuz etkisinin olduğu gösterilmiştir (Lakard vd., 2004, 2005).



Şekil 5. Çeşitli yüzey dizaynlarına sahip nano-kanallı SF/PLGA film iskeleler üzerinde 72 saat kültür edilen DRG duyu nöronlarının, oluklardan ortalama aksonal sapma açısı değerleri. Tüm kantitatif veriler NF-200 ICC LSCM görüntülerine dayanarak, Image J programı kullanılarak elde edilmiştir. n = 3, veriler ortalama ± SD olarak temsil edilmiştir. (SF: İpek fibroin, PLGA: Polilaktik-ko-glolik asit, G: Kanallı yüzey, 0.5: 500 nm genişlik, AuNP: Altın nanopartikül, Q: Kersetin).

Figure 5. The mean values for axonal deviation angles from the nano-channels of the DRG sensory neurons cultured on the SF/PLGA film scaffolds with different surface designs for 72 h. All the quantitative data were obtained using Image J program based on the NF-200 ICC staining LSCM images. n = 3, Data were represented as mean ± SD. (SF: Silk fibroin, PLGA: Polylactic-co-glycolic acid, G: Grooved surface, 0.5: 500 nm width, AuNP: Gold nanoparticle, Q: Quercetin).

İletken polimerlerden kaynaklı muhtemel toksik etkiler göz önüne alındığında, alternatif iletkenlik yüzey dekorasyonu olarak kullanılan altın nanopartiküller oldukça optimize sonuçlar vermiştir. Hücresel toksisite açısından da olumsuz bir sonuca yol açmamıştır. Literatürde, sinir doku mühendisliğine yönelik olarak altın nanopartiküllerle modifiye edilmiş silikon dioksit yüzeyler, PCL-jelatin nanofiberler ve fibroin nanofiber yüzeyler gibi değişik malzemeler; primer nöronlar, kortikal nöronlar ve PC12 hücreleriyle birlikte araştırıldığında; nöral hücre farklılaşmasını teşvik ettiği, akson ve nörit gelişimine önemli düzeylerde katkılar sağladığı bildirilmiştir (Gilles vd., 2012; Cohen-Karni vd., 2012; Baranes vd., 2016). Altın nanopartiküllerin yüzeylerine konjuge edilen kersetinin büyük bir kullanım potansiyeli bulunmaktadır. Daha önceki çalışmalarda kersetin molekülünün önemli farmakolojik özellikleri (antioksidan, anti-inflamatuvar, antikanser ve antibakteriyel etkiler gibi) gösterilmiştir (Anand David vd., 2016; Salvamani vd., 2014; Sultana ve Anwar, 2008). Bununla birlikte kersetinin hidrofobik yapısı, zayıf çözünürlüğü, instabilitesi, düşük biyoyararlanımı ve kısıtlı doku-bariyer geçişi gibi dezavantajlı yönleri bulunmaktadır (Aluani vd., 2017). Dolayısıyla kersetinin mikro ve nano materyallerle birlikte konjuge bir şekilde kullanılması, bahsi geçen dezavantajlı yönlerin üstesinden gelebilir (Azeem vd., 2023). Oksidatif stres çoğu nörodejeneratif hastalığın patogeneğinde önemli rol oynayan bir husustur (Butterfield vd., 2007). Polifenolik bir biyoflavonoid molekül olan kersetinin oksidatif dengeyi sağlayan çok güçlü bir antioksidan yönü bulunmaktadır. Bu profilin sağlanmasında kersetinde bulunan hidroksil gruplarının majör bir rolü bulunmaktadır (Xu vd., 2019). Nöral doku iskelesi geliştirmeye yönelik çalışmaların nihai hedefi implante edilebilir bir biyomalzeme dizaynı olduğundan, bu çalışmada kullanılan kersetinle modifiye edilmiş altın nanopartiküllerle dekore edilmiş film iskelelerin gelecekte önemli kullanım potansiyeli olduğu değerlendirilmiştir. Böylece hem biyoyumlu iletken nanodiziler sağlanmış hem de antibakteriyel ve antioksidan etkinliğe sahip bir yüzey dekorasyonu oluşturulmuştur.

Bu çalışmada elektron demeti litografisi tekniğinin sunduğu yüksek düzeyde hassas ve güvenilir desenlemeler sonucunda elde edilen, 500 nm kanal genişliğindeki topografya, duyu nöronları için yüksek düzeyde aksonal oryantasyonun sağlanmasını teşvik etmiştir. Diğer taraftan ideal oluk genişliği kullanılan hücre tipine göre değişkenlik gösterebilen bir parametredir. Literatürdeki nöral doku mühendisliğine yönelik geliştirilen mikro-kanallı topografyaya sahip çeşitli iskele yüzeyler üzerinde, farklı hücre tiplerinin davranışları incelendiğinde; genel olarak daha dar oluk çaplarına sahip topografyaların aksonal kılavuzluğu ve lineer hatlar boyunca nörit gelişimini daha fazla teşvik ettiği gösterilmiştir (Gomez vd.,2007; Reis vd., 2010; Chua vd., 2014; Yang vd., 2014).

Doku mühendisliği yaklaşımlarıyla nöral hasarların rejenerasyonuna yönelik terapilerde; doğal polimerler, sentetik polimerler ya da hibrit biyomalzemeler tercih edilebilmektedir (Willerth ve Sakiyama-Elbert, 2007). SF'in de dahil olduğu doğal polimer grupları, biyolojik hücre dışı matriksi daha iyi taklit ederek çeşitli hücre gruplarıyla daha yüksek düzeyde etkileşime geçebilmektedir. Sentetik polimerlerin ise fiziksel ve mekanik özellikleri çok daha güçlüdür (Subramanian vd., 2009). Dolayısıyla, bu çalışmada hibrit yapıdaki

polimerin (SF/PLGA) kullanılması sonucunda, fiziksel ve mekanik açıdan herhangi bir stabilite problemi ile karşılaşılmağıdır. Her iki polimerin de avantajlı yönleri biyomalzemeye yansımıştır. Hem mekanik özellikleri güçlü ve esnek, aynı zamanda hücrelerin adezyonunu ve gelişimini teşvik eden hibrit bir biyomalzeme kullanılmıştır. Doku mühendisliği alanında oldukça popüler bir doğal polimer olan SF'in kullanıldığı çeşitli çalışmalarda hem nanofiber yapıda hem de desenlenmiş film yapıdaki biyomalzemelerle çalışılmıştır. Bu çalışmalarda mikro/nano desenlenmiş SF malzemenin, nöronların hayatta kalmasını teşvik ettiği, hücre adezyonunu ve gelişimini desteklediği, aksonların nöritlerin uzamasını ve yönelimini teşvik ettiği gösterilmiştir (Yang vd., 2007; Madduri vd., 2010; Zhang vd., 2012; White vd., 2015). Yine sentetik ve FDA onaylı bir polimer olan PLGA'nın nöral doku mühendisliği kapsamında yaygın kullanımı mevcuttur. PLGA'nın *in vitro* düzeydeki bazı literatür çalışmalarında; film yapıdaki iskele, sıralı mikro/nano fiberler, poröz iskeleler gibi değişik formlarda kullanımları bulunmaktadır. Bu malzemeler üzerinde değişik nöral hücre tiplerinin davranışları araştırıldığında; özellikle daha dar kanalların nörit uzamasını ve yönelimini önemli düzeyde teşvik ettiği, sıralı fibröz iskelelerin aksonal kılavuzluğu, nöral hücre farklılaşmasını artırdığı gösterilmiştir (Yao vd., 2009; Binder vd., 2013; Choi vd., 2013; Zamani vd., 2014; Raspa vd., 2016).

Tüm bu literatür verileri ve bu çalışma kapsamında elde edilen ümit vaat edici sonuçlar birlikte ele alındığında, sinir doku mühendisliği alanında yenilikçi iletkenlik tasarımlarına sahip, antibakteriyel/antioksidan etkinlikler gösteren yüzey kimyasında, uygun mikro/nano desenlemelere sahip, mekanik özellikleri güçlü, hücrelerin gelişimine uygun yapıda alternatif biyomalzeme dizaynlarına büyük bir ihtiyaç olduğu sonucuna varılmıştır. Bu çalışmada geliştirilen nano-kanallı topografyada, kersetin konjuge altın nanopartiküllerle dekore edilmiş ve laminin kaplı hibrit SF/PLGA film doku iskelelerinin, gelecekte tübüler hale getirilerek bir sinir hasarı bölgesine implantasyonu sonucunda hasarı minimize ederek, aksonların sıralı hatlar boyunca rejenerasyonuna destek verebileceği ve bu alandaki yeni çalışmalar için yol gösterici olabileceği sonucuna varılmıştır.

#### 4. Sonuç

Bu çalışma kapsamında, elektron demeti litografisi tekniği kullanılarak, 1 mikron periyotlarla tekrar eden, 500 nm oluk genişliğine, 1 mikron oluk yüksekliğine sahip nano-kanallı topografyada, yüzeyleri kersetin konjuge edilmiş altın nanopartiküllerle modifiye edilmiş, hibrit SF/PLGA film iskeleleri başarıyla dizayn edilmiştir. Ayrıca farelerden izole edilen DRG primer duyu nöronlarının davranışları incelenmiştir. Hibrit yapıda iskele kullanılması malzemenin fiziksel ve mekanik özelliğini artırmıştır. Laminin kaplama hücresel adezyonu ve büyümeyi desteklemiştir. Nanopartikül modifiye edilmiş nano-kanallı iskeleler (SF/PLGA G<sub>0.5</sub>-AuNP<sub>83</sub>-Q) aksonal oryantasyonu yüksek düzeyde teşvik etmiştir. Geliştirilen biyomalzemenin, potansiyel *in vivo* sinir doku mühendisliği çalışmaları kapsamında, hücresel nöritlerin ve aksonların oryantasyonuna yardımcı olabileceği ve bir sinir hasarı bölgesine implantasyonu sonrasında rejenerasyonu destekleyebileceği değerlendirilmiştir.

#### Kaynakça

- Aluani, D., Tzankova, V., Yordanov, Y., Kondeva-Burdina, M., & Yoncheva, K. (2017). In vitro protective effects of encapsulated quercetin in neuronal models of oxidative stress injury. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 31(5), 1055-1063. <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1347523>
- Anand David, A. V., Arulmoli, R., & Parasuraman, S. (2016). Overviews of Biological Importance of Quercetin: A Bioactive Flavonoid. *Pharmacogn Rev*, 10(20), 84-89. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.194044>
- Aoki, T., Tanino, M., Sanui, K., Ogata, N., & Kumakura, K. (1996). Secretory function of adrenal chromaffin cells cultured on polypyrrole films. *Biomaterials*, 17(20), 1971-1974. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(96\)00015-4](https://doi.org/10.1016/0142-9612(96)00015-4)
- Asplund, M., Nilsson, M., Jacobsson, A., & von Holst, H. (2009). Incidence of Traumatic Peripheral Nerve Injuries and Amputations in Sweden between 1998 and 2006. *Neuroepidemiology*, 32(3), 217-228. <https://doi.org/10.1159/000197900>
- Azeem, M., Hanif, M., Mahmood, K., Ameer, N., Chughtai, F. R. S., & Abid, U. (2023). An insight into anticancer, antioxidant, antimicrobial, antidiabetic and anti-inflammatory effects of quercetin: a review. *Polym Bull (Berl)*, 80(1), 241-262. <https://doi.org/10.1007/s00289-022-04091-8>
- Baranes, K., Shevach, M., Shefi, O., & Dvir, T. (2016). Gold Nanoparticle-Decorated Scaffolds Promote Neuronal Differentiation and Maturation. *Nano Letters*, 16(5), 2916-2920. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.5b04033>
- Binder, C., Milleret, V., Hall, H., Eberli, D., & Lühmann, T. (2013). Influence of micro and submicro poly(lactic-glycolic acid) fibers on sensory neural cell locomotion and neurite growth. *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials*, 101(7), 1200-1208. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.32931>
- Butterfield, D. A., Reed, T., Newman, S. F., & Sultana, R. (2007). Roles of amyloid  $\beta$ -peptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(5), 658-677. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.05.037>
- Chen, Y. (2015). Nanofabrication by electron beam lithography and its applications: A review. *Microelectronic Engineering*, 135, 57-72. <https://doi.org/10.1016/j.mee.2015.02.042>
- Choi, S. K., Park, J. K., Lee, K. M., Lee, S. K., & Jeon, W. B. (2013). Improved neural progenitor cell proliferation and differentiation on poly(lactide-glycolide) scaffolds coated with elastin-like polypeptide. *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials*, 101(8), 1329-1339. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.32950>
- Chua, J. S., Chng, C. P., Moe, A. A. K., Tann, J. Y., Goh, E. L. K., Chiam, K. H., & Yim, E. K. F. (2014). Extending neurites sense the depth of the underlying topography during neuronal differentiation and contact guidance. *Biomaterials*, 35(27), 7750-7761. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.06.008>
- Cohen-Karni, T., Jeong, K. J., Tsui, J. H., Reznor, G., Mustata, M., Wanunu, M., Graham, A., Marks, C., Bell, D. C., Langer, R., & Kohane, D. S. (2012). Nanocomposite gold-silk nanofibers. *Nano Lett*, 12(10), 5403-5406. <https://doi.org/10.1021/nl302810c>

- Dos Reis, G., Fenili, F., Gianfelice, A., Bongiorno, G., Marchesi, D., Scopelliti, P. E., Borgonovo, A., Podestà, A., Indrieri, M., Ranucci, E., Ferruti, P., Lenardi, C., & Milani, P. (2010). Direct Microfabrication of Topographical and Chemical Cues for the Guided Growth of Neural Cell Networks on Polyamidoamine Hydrogels. *Macromolecular Bioscience*, 10(8), 842-852. <https://doi.org/10.1002/mabi.200900410>
- Gilles, S., Winter, S., Michael, K. E., Meffert, S. H., Li, P. G., Greben, K., Simon, U., Offenhäusser, A., & Mayer, D. (2012). Control of Cell Adhesion and Neurite Outgrowth by Patterned Gold Nanoparticles with Tunable Attractive or Repulsive Surface Properties. *Small*, 8(21), 3357-3367. <https://doi.org/10.1002/sml.201200465>
- Gomez, N., Lu, Y., Chen, S. C., & Schmidt, C. E. (2007). Immobilized nerve growth factor and microtopography have distinct effects on polarization versus axon elongation in hippocampal cells in culture. *Biomaterials*, 28(2), 271-284. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.07.043>
- Jiang, X. P., Marois, Y., Traoré, A., Tessier, D., Dao, L. H., Guidoin, R., & Zhang, Z. (2002). Tissue reaction to polypyrrole-coated polyester fabrics: An study in rats. *Tissue Engineering*, 8(4), 635-647. <https://doi.org/10.1089/107632702760240553>
- Lakard, S., Herlem, G., Propper, A., Kastner, A., Michel, G., Vallès-Villarreal, N., Gharbi, T., & Fahys, B. (2004). Adhesion and proliferation of cells on new polymers modified biomaterials. *Bioelectrochemistry*, 62(1), 19-27. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2003.09.009>
- Lakard, S., Herlem, G., Valles-Villareal, N., Michel, G., Propper, A., Gharbi, T., & Fahys, B. (2005). Culture of neural cells on polymers coated surfaces for biosensor applications. *Biosensors & Bioelectronics*, 20(10), 1946-1954. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.09.001>
- Lia, C., Neoh, K. G., Li, Y. L., & Kang, E. T. (2004). Assessment of in vitro bioactivity of hyaluronic acid and sulfated hyaluronic acid functionalized electroactive polymer. *Biomacromolecules*, 5(6), 2238-2246. <https://doi.org/10.1021/bm040048v>
- Madduri, S., Papaloizos, M., & Gander, B. (2010). Topographically and topographically functionalized silk fibroin nerve conduits for guided peripheral nerve regeneration. *Biomaterials*, 31(8), 2323-2334. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.11.073>
- Makadia, H. K., & Siegel, S. J. (2011). Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers (Basel)*, 3(3), 1377-1397. <https://doi.org/10.3390/polym3031377>
- Meinel, L., Hofmann, S., Karageorgiou, V., Kirker-Head, C., McCool, J., Gronowicz, G., Zichner, L., Langer, R., Vunjak-Novakovic, G., & Kaplan, D. L. (2005). The inflammatory responses to silk films in vitro and in vivo. *Biomaterials*, 26(2), 147-155. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.02.047>
- Ozcicek, I., Aysit, N., Cakici, C., & Aydeger, A. (2021). The effects of surface functionality and size of gold nanoparticles on neuronal toxicity, apoptosis, ROS production and cellular/suborgan biodistribution. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 128, 112308. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112308>
- Perrault, S. D., & Chan, W. C. W. (2009). Synthesis and Surface Modification of Highly Monodispersed, Spherical Gold Nanoparticles of 50-200 nm. *Journal of the American Chemical Society*, 131(47), 17042-+. <https://doi.org/10.1021/ja907069u>
- Raspa, A., Marchini, A., Pugliese, R., Mauri, M., Maleki, M., Vasiat, R., & Gelain, F. (2016). A biocompatibility study of new nanofibrous scaffolds for nervous system regeneration. *Nanoscale*, 8(1), 253-265. <https://doi.org/10.1039/c5nr03698d>
- Rockwood, D. N., Preda, R. C., Yucel, T., Wang, X. Q., Lovett, M. L., & Kaplan, D. L. (2011). Materials fabrication from Bombyx mori silk fibroin. *Nature Protocols*, 6(10), 1612-1631. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.379>
- Salvamani, S., Gunasekaran, B., Shaharuddin, N. A., Ahmad, S. A., & Shukor, M. Y. (2014). Antiatherosclerotic effects of plant flavonoids. *Biomed Res Int*, 2014, 480258. <https://doi.org/10.1155/2014/480258>
- Seddighi, A., Nikouei, A., Seddighi, A. S., Zali, A. R., Tabatabaei, S. M., Sheykhi, A. R., Yourdkhani, F., & Naeimian, S. (2016). Peripheral Nerve Injury: A Review Article. *International Clinical Neuroscience Journal*, 3(1), 1-6. <https://doi.org/10.22037/icnj.v3i1.12016>
- Subramanian, A., Krishnan, U. M., & Sethuraman, S. (2009). Development of biomaterial scaffold for nerve tissue engineering: Biomaterial mediated neural regeneration. *Journal of Biomedical Science*, 16. <https://doi.org/10.1081/Art.10810.1186.1423-0127-16-108>
- Sultana, B., & Anwar, F. (2008). Flavonols (kaempferol, quercetin, myricetin) contents of selected fruits, vegetables and medicinal plants. *Food Chem*, 108(3), 879-884. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.053>
- Tam, R. Y., Fuehrmann, T., Mitrousis, N., & Shoichet, M. S. (2014). Regenerative Therapies for Central Nervous System Diseases: a Biomaterials Approach. *Neuropsychopharmacology*, 39(1), 169-188. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.237>
- Taylor, C. A., Braza, D., Rice, J. B., & Dillingham, T. (2008). The incidence of peripheral nerve injury in extremity trauma. *Am J Phys Med Rehabil*, 87(5), 381-385. <https://doi.org/10.1097/PHM.0b013e31815e6370>
- Turkevich, J., Stevenson, P. C., & Hillier, J. (1951). A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold [10.1039/DF9511100055]. *Discussions of the Faraday Society*, 11(0), 55-75. <https://doi.org/10.1039/DF9511100055>
- Wang, Y., Rudym, D. D., Walsh, A., Abrahamsen, L., Kim, H. J., Kim, H. S., Kirker-Head, C., & Kaplan, D. L. (2008). In vivo degradation of three-dimensional silk fibroin scaffolds. *Biomaterials*, 29(24-25), 3415-3428. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.05.002>
- Wang, Z. Y., Zhao, Y. M., Wang, F., & Wang, J. (2006). Syntheses of poly(lactic acid-glycolic acid) serial biodegradable polymer materials via direct melt polycondensation and their characterization. *Journal of Applied Polymer Science*, 99(1), 244-252. <https://doi.org/10.1002/app.22468>
- White, J. D., Wang, S. R., Weiss, A. S., & Kaplan, D. L. (2015). Silk-tropoelastin protein films for nerve guidance. *Acta Biomaterialia*, 14, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.11.045>
- Willerth, S. M., & Sakiyama-Elbert, S. E. (2007). Approaches to neural tissue engineering using scaffolds for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(4-5), 325-338. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.03.014>
- Xu, D., Hu, M. J., Wang, Y. Q., & Cui, Y. L. (2019). Antioxidant Activities of Quercetin and Its Complexes for Medicinal Application. *Molecules*, 24(6). <https://doi.org/10.3390/molecules24061123>

- Yang, K., Jung, H., Lee, H. R., Lee, J. S., Kim, S. R., Song, K. Y., Cheong, E., Bang, J., Im, S. G., & Cho, S. W. (2014). Multiscale, Hierarchically Patterned Topography for Directing Human Neural Stem Cells into Functional Neurons. *Acs Nano*, 8(8), 7809-7822. <https://doi.org/10.1021/nn501182f>
- Yang, Y. M., Chen, X. M., Ding, F., Zhang, P. Y., Liu, J., & Go, X. S. (2007). Biocompatibility evaluation of silk fibroin with peripheral nerve tissues and cells in vitro. *Biomaterials*, 28(9), 1643-1652. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.12.004>
- Yao, L., Wang, S. G., Cui, W. J., Sherlock, R., O'Connell, C., Damodaran, G., Gorman, A., Windebank, A., & Pandit, A. (2009). Effect of functionalized micropatterned PLGA on guided neurite growth. *Acta Biomaterialia*, 5(2), 580-588. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.09.002>
- Zamani, F., Amani-Tehran, M., Latifi, M., Shokrgozar, M. A., & Zaminy, A. (2014). Promotion of spinal cord axon regeneration by 3D nanofibrous core-sheath scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 102(2), 506-513. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34703>
- Zhang, Q., Zhao, Y. H., Yan, S. Q., Yang, Y. M., Zhao, H. J., Li, M. Z., Lu, S. Z., & Kaplan, D. L. (2012). Preparation of uniaxial multichannel silk fibroin scaffolds for guiding primary neurons. *Acta Biomaterialia*, 8(7), 2628-2638. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.03.033>
- Zhou, S. B., Deng, X. M., Li, X. H., Jia, W. X., & Liu, L. (2004). Synthesis and characterization of biodegradable low molecular weight aliphatic polyesters and their use in protein-delivery systems. *Journal of Applied Polymer Science*, 91(3), 1848-1856. <https://doi.org/DOI 10.1002/app.13385>