



Nöral Doku Mühendisliği Uygulamalarına Yönelik Mikro-oluklu İpek Fibroin/Polietilen Oksit Film İskelelerin Geliştirilmesi

İlyas Özçiçek^{1*}

^{1*} 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 31 Mayıs 2022 ve Kabul Tarihi 20 Kasım 2022)

(DOI: 10.31590/ejosat.1123769)

ATIF/REFERENCE: Özçiçek, İ. (2022). Nöral Doku Mühendisliği Uygulamalarına Yönelik Mikro-oluklu İpek Fibroin/Polietilen Oksit Film İskelelerin Geliştirilmesi. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (41), 343-348.

Öz

Nöral doku mühendisliği alanında, nanoteknolojinin ve biyomalzeme biliminin sunmuş olduğu yeni tekniklerle birlikte, alternatif sinir kılavuz kanalları geliştirmek için yoğun bir şekilde çalışılmaktadır. Fakat doğal ekstraselüler matriksi taklit edebilecek özellikte, intralüminal kanallı yapıda, uygun mikro/nano desenlemelere sahip, nöral hücreleri destekleyecek ve onlara kılavuzluk sağlayabilecek ideal bir nöral iskele henüz tam olarak geliştirilememiştir. Bu çalışmanın amacı; nöral doku mühendisliği uygulamalarına yönelik çeşitli kanal genişliklerine (1 µm, 5 µm ve 10 µm) sahip mikro-oluklu ipek fibroin/polietilen oksit (SF/PEO) film iskelelerin elde edilebilmesi için elektron demeti litografisi tekniğinin kullanımına ilaveten, dizayn edilen biyomalzemenin mekanik özelliğinin ve stabilitesinin geliştirilmesidir. Planlanan oluk genişliklerine başarıyla ulaşılmış olup, özellikle glutaraldehit buharına maruz bırakılan filmlerde stabilitenin optimal olarak sağlandığı gözlenmiştir. Yine yapıya PEO ilavesinin, filmlerin esnekliğini artırdığı görülmüştür. Geliştirilen biyomalzemenin, potansiyel nöral doku mühendisliği çalışmaları kapsamında; hücresel nöritlerin ve aksonların lineer hatlar boyunca ilerlemesine kılavuzluk etmesine yardımcı olabileceği ve bir sinir hasarı bölgesine implantasyonu sonrasında rejenerasyonu destekleyebileceği değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: İpek fibroin, Nöral doku mühendisliği, Mikro-oluklar, Elektron demeti litografisi, Aksonal kılavuzluk.

Development of Micro-grooved Silk Fibroin/Polyethylene Oxide Film Scaffolds for Neural Tissue Engineering Applications

Abstract

In the field of neural tissue engineering, intensive work is being done to develop alternative nerve guide channels with the new techniques offered by nanotechnology and biomaterials science. However, an ideal neural scaffold capable of mimicking the natural extracellular matrix, having an intraluminal channel structure, have suitable micro/nano patterns, can support neural cells and guide them has not been fully developed yet. The aim of this study is the use of electron beam lithography technique to obtain micro-grooved silk fibroin/polyethylene oxide (SF/PEO) film scaffolds with various channel widths (1 µm, 5 µm and 10 µm) for neural tissue engineering applications. In addition, it is also aimed to improve the mechanical properties and stability of the designed biomaterial. The planned groove widths were successfully achieved, and it was observed that the stability was optimally achieved, especially in films exposed to glutaraldehyde vapor. It has also been observed that the addition of PEO to the structure increases the flexibility of the films. It was concluded that it can help guide the progression of cellular neurites and axons along linear lines, within the scope of future potential neural tissue engineering studies of the developed biomaterial. It has also been evaluated that the material can promote regeneration after implantation at a nerve injury site.

Keywords: Silk fibroin, Neural tissue engineering, Micro-grooves, Electron beam lithography, Axonal guidance.

* Sorumlu Yazar: iozcicek@medipol.edu.tr

1. Giriş

Merkezi sinir sisteminde (MSS) hasar sonrasındaki rejenerasyon süreci, kendi inhibitör çevresinden dolayı ve aynı zamanda oluşan glial skar dokusu sebebiyle oldukça kısıtlı düzeydedir. Gelişen kist ve skar dokusu, rejenerasyonun önünde önemli bir bariyer olduğundan, nöritler hedeflere yeterince ulaşamamaktadır (Buss vd., 2004; Tucker ve Mearow 2008; Tabesh vd., 2009). Oluşan sinir hasarı sonrasında fonksiyonel yeniden kazanımı sağlamak için aksonların/nöritlerin lineer hatlar boyunca ilerlemelerini teşvik edecek biyomalzemelerin dizaynı, nöral doku mühendisliği alanında oldukça önemlidir. Bu noktada, bazı litografi teknikleri (elektron demeti litografisi, fotolitografi, plazma litografi, nano litografi ve kimyasal litografi vb.) kullanılmaktadır (Wade vd., 2014; Dalamagkas vd., 2016). Özellikle elektron demeti litografisi tekniğinin sunduğu yenilikçi yaklaşımlar sayesinde, oldukça yüksek hassasiyette ve çözünürlük düzeyinde, kararlı ve güvenilir mikro/nano desenlemeler; biyomalzemelerde ve çeşitli kalıp yüzeylerinde uygulanabilmektedir (Chen, 2015).

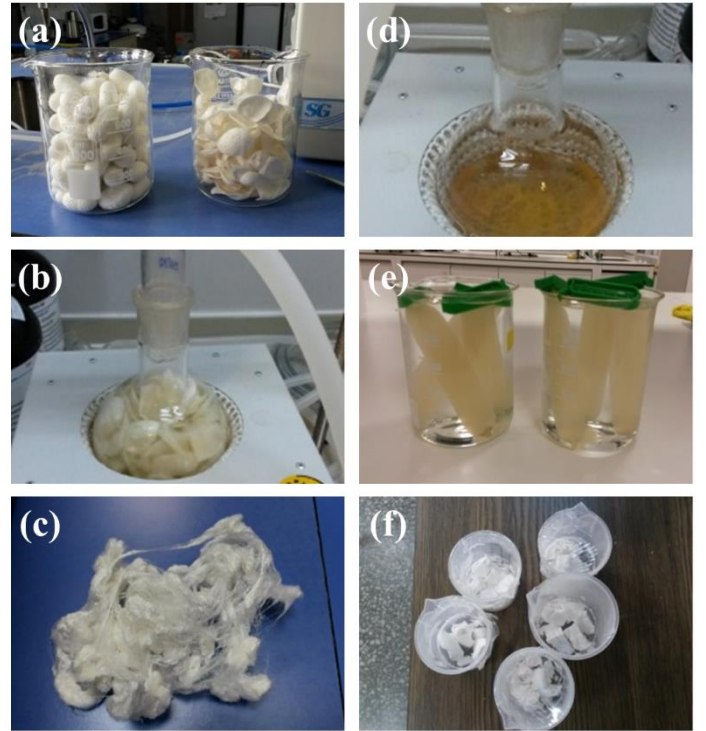
Hücre iskelesi materyali olarak kullanılabilen ipek fibroin, *Bombyx mori* (ipek böceği) kozaları kullanılarak oldukça yüksek verimle saflaştırılabilmektedir. Henüz işlenmemiş olan ipek materyali, fibroin (SF, %70) ve serisin (%30) olmak üzere 2 ana bileşenden oluşmaktadır. Serisinin immün yanıt oluşturmaya sebebiyle, kimyasal işlemlerle ayrıştırılması gerekmektedir. İpek fibroin biyoyumlu, biyobozunur, biyolojik ortamda iyi tolere edilebilen, mekanik özellikleri güçlü doğal yapılı bir proteindir. İhtiva ettiği yan gruplar (amin, fenol, tiyol, karboksil vb.) sayesinde biyomoleküllerle yüzey modifikasyonu yapılabilmektedir. Bu üstün özellikleri sayesinde doku mühendisliği uygulamalarında popüler bir biyomalzeme haline gelmiştir (Sofia vd., 2001; Altman vd., 2003; Meinel vd., 2005; Wang vd., 2008). İpek fibroinin nöral doku mühendisliği kapsamında, film/fiber yapıda biyomalzeme olarak kullanıldığı çalışmalarda; özellikle primer olarak elde edilen nöral hücrelerde canlılığı desteklediği, lineer hatlar boyunca aksonal yönelmeyi/göçü teşvik ettiği ve oldukça biyoyumlu olduğu gösterilmiştir (Yang vd., 2007; Madduri vd., 2010; Zhang vd., 2012; White vd., 2015).

Bu çalışmanın amacı; nöral doku mühendisliği uygulamalarına yönelik çeşitli kanal genişliklerine (1 μm , 5 μm ve 10 μm) sahip mikro-oluklu ipek fibroin/polietilen oksit (SF/PEO) film iskelelerin elde edilebilmesi için elektron demeti litografisi tekniği ile Silikon (Si) kalıpların dizaynı sonrasında, spin kaplama tekniği kullanılarak ince film yapıdaki stabil düz ve mikrodeseanlı iskelelerin eldesidir. SF/PEO hibrit yapıdaki biyomalzemeyi stabil ve mekanik açıdan güçlü hale getirebilmek amacıyla çeşitli yöntemler uygulanmış ve sonuçlar ortaya konularak karakterizasyonlar gerçekleştirilmiştir. Dolayısıyla hem yüzey mikrotopografyası açısından hem de kimyasal stabilizasyon işlemleri olarak farklı teknikler SF/PEO biyomalzeme için uygulanmıştır. Biyomalzeme, nanoteknoloji ve doku mühendisliğindeki gelişmelerle birlikte bazı ticari ürünler piyasada yer alsa da, buna rağmen nöral rejenerasyonu yeterli düzeyde destekleyebilecek nitelikte, ideal implant klinik ürünler henüz bulunmamaktadır. Geliştirilen film iskeleler kolaylıkla tübüler hale de getirilebilmekte olup, sonraki süreçte hem nöral hücreler için hem de özellikle MSS'deki hasarlar için aksonal kılavuzluğu sağlayabilecek potansiyel bir biyomalzeme olarak kullanılabilir yapıdadır.

2. Materyal ve Metot

2.1. İpek Fibroinin Saflaştırılması

İpekten fibroin proteininin saflaştırılması amacıyla, *Bombyx mori* (ipek böceği) kozaları (Bursa Kozabirlik) açılarak içindeki larvalardan temizlenmiş ve daha sonra %0,5'lik sodyum bikarbonat (NaHCO_3 , Sigma) çözeltisinde 1 saat boyunca kaynatılmıştır. Kaynayan ve yumuşayan kozalar 3-4 kez ılık distile su ile yıkandıktan sonra, 1 gün süreyle oda ısısında kurutulmuştur. İpek fibroini yapışkan ve toksik olan serisinden ayırmak için bir CaCl_2 (Sigma), $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (Sigma) ve H_2O (1:2:8 molar oranda) çözeltisi hazırlanmıştır. Bu sıvıdan 100 mL yuvarlak balona alınıp, 60-70 °C'de inkübe edilmiş, üzerine 7.6 g ipek ilave edilerek 2-3 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. İpek materyali distile su içinde 3 gün boyunca diyaliz edilerek, fibroin bütün safsızlıklarından arındırılmıştır. Ortamdan uzaklaşan Ca^{+2} iyonunun tayini, %5'lik (w/v) AgNO_3 (Sigma) çözeltisi ile yapılmıştır. AgNO_3 , Ca^{+2} iyonunun indikatörü olduğundan, ortamdaki Ca^{+2} varlığında beyaz bir çökelek oluşturmaktadır.



Şekil 1. İpek fibroinin saflaştırma aşamaları. (a) Larvalarından arındırılmış ipek kozaları. (b) %0,5'lik NaHCO_3 çözeltisinde kaynatılmış ipek. (c) Kurutulmuş ipek materyali. (d) Serisinin kaynatılarak uzaklaştırılması. (e) Fibroinin diyaliz işlemi ile saflaştırılması. (f) Liyofilize edilmiş ve kullanıma hazır olan ipek fibroin.

Figure 1. Purification steps of silk fibroin. (a) Silk cocoons free of larvae. (b) Silk boiled in 0.5% NaHCO_3 solution. (c) Dried silk material. (d) Removal of sericin by boiling. (e) Purification of fibroin by dialysis. (f) Silk fibroin lyophilized and ready to use.

Fibroin proteini safsızlıklardan ayrıldıkça daha şeffaf bir renk almaktadır. Saflaştırılan ipek fibroin; önce sıvı azot kullanılarak dondurulmuş, sonra liyofilizatöre (Christ, Alpha 1-2 LDplus) alınarak, 72 saat boyunca liyofilize edilmiştir. Elde edilen liyofilize ipek fibroinler, kullanılabildiği kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir (Rockwood vd., 2011) modifiye edilerek. İpek fibroin proteininin saflaştırma süreci ve basamakları görsel olarak Şekil 1'de verilmiştir.

2.2. Silikon Kalıpların Üretimi

Mikro-oluklu SF/PEO film iskelelerin elde edilebilmesi için öncelikli olarak Si-kalıpların dizaynı ve üretimi yapılmıştır. Üç farklı çatı genişliğine sahip Si-kalıplar, elektron demeti litografisi tekniği kullanılarak üretilmiştir. Elektron demeti litografisi tekniğinin sunduğu yeni yaklaşımlar sayesinde; oldukça yüksek hassasiyette ve çözünürlük düzeyinde, kararlı ve güvenilir desenlemeler yapılabilmektedir (Chen, 2015). Kalıplarda planlanan çatı genişlikleri (R) 1, 5 ve 10 µm; oluk genişliği (G) 1 µm ve oluk yüksekliği (H) ise 1 µm'dir. Kalıpların hazırlanmasında kısaca, planlanan mikrodeseinler silisyum yonga üzerine 1.4 µm fotorezist serilerek standart fotolitografi ile kanallar sisteme tanımlanmıştır. Daha sonra induktif olarak eşleştirilmiş plazma kuru aşındırıcı (ICP-RIE-Bilkent Üniversitesi-Sentech SI 500 Dry Etching System) ile SF₆ gazı kullanılarak istenilen derinlikteki aşındırmalar sağlanmıştır. Mikrokanalların oluşturulmasında elektron ışınları kullanılmıştır. Son olarak Silisyum yüzeydeki fotorezist temizlenmiştir. Elektron demeti litografisi tekniğiyle mikrodeseinleme işlemi uygulanan Si-kalıpların; oluk, çatı genişliklerinin ve derinliklerinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) karakterizasyonları yapılmıştır (Zeiss EVO HD 15) ve planlanan hedeflerle örtüşmeler incelenmiştir.

2.3. Düz Yüzeyle SF/PEO Film İskelelerin Hazırlanması ve Stabilizasyonu

Düz yüzeyle (S) SF/PEO film iskelelerin üretimi için öncelikle, liyofilize ipek fibroin formik asit (Sigma) içinde, 5 saat süreyle karıştırılarak %10'luk (w/v) fibroin çözeltisi hazırlanmıştır. Diğer taraftan polietilen oksit (PEO) (Sigma, Mw: 900.000) distile su içinde 60-70°C'de 24 saat çözüldükten sonra %5'lik (w/v) çözeltisi hazırlanmıştır. Sonra fibroin çözeltisi 7:3 (v/v) oranında, PEO çözeltisi ile karıştırılarak homojen SF/PEO hibrit polimer çözeltisi hazırlanmıştır. Spin kaplama tekniği kullanılarak, öncelikle küçük düz tabanlı cam petri için 5 mL SF/PEO çözeltisi kademe kademe homojen ve ince bir tabaka oluşturacak şekilde dökülerek, çeker ocak içinde 1 gece boyunca kurumaya bırakılmıştır. Filmler cam yüzeyden dikkatlice çıkartılarak, yüzey kimyası analizleri kapsamında FTIR (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi) spektral ölçümleri gerçekleştirilmiştir (Pelkin Elmer Spectrum Two equipped ATR apparatus).

İlk hazırlanan SF/PEO S film iskelelerin, sonraki çalışmalarda hücre kültürü vasat ortamını taklit edecek şekilde PBS veya distile su içine konulduğunda, fiziksel bütünlüklerini hemen kaybettikleri gözlenmiştir. Bu mekanik açıdan zayıflığın fibroin amorf yapısından kaynaklandığı bilinmektedir. Dolayısıyla bu amorf yapının kristal yapıya dönüşmesi ya da çapraz bağlarla yapının daha stabil hale getirilmesi amacıyla farklı yöntemler denenmiştir. İlk olarak SF/PEO filmler %90'lık metanolla (Sigma) yarım saat muamele edilerek fibroindeki amorf yapıların kristal yapıya dönüştürülmesi amaçlanmıştır (Liu vd., 2011). Farklı olarak filmler %25'lik gluteraldehit

(Sigma) içinde 30 dk. bekletilerek veya %25'lik gluteraldehit buharına 3 saat maruz bırakılarak veya başlangıçtaki SF çözeltisine %1'i oranında gluteraldehit ya da genipin (Sigma) eklenerek çapraz bağların oluşturulması sağlanarak filmlerin stabilitesi artırılmaya çalışılmıştır. (Wang vd., 2013, Wang vd., 2014) modifiye edilerek. Daha sonra elde edilen SF/PEO filmler, 37°C'deki dH₂O içinde, 72 saat boyunca etüvde bekletilerek mekanik bütünlüklerini muhafaza edip etmedikleri gözlenmiştir.

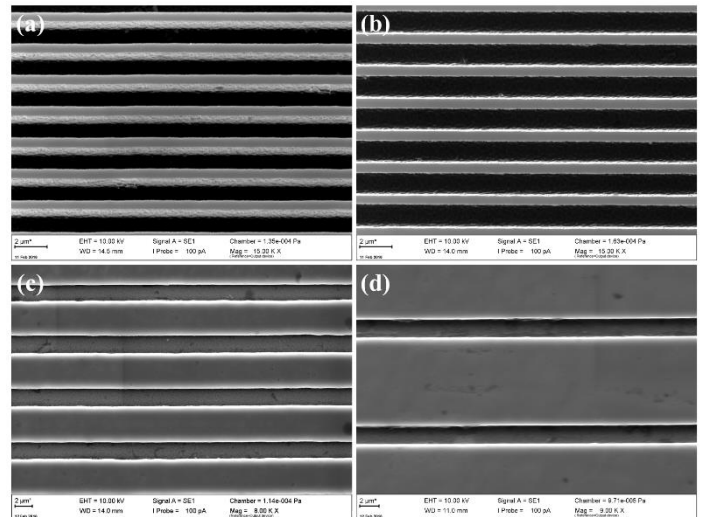
2.4. Mikro-oluklu SF/PEO Film İskelelerin Hazırlanması

Mikro-oluklu (G) SF/PEO film iskelelerin elde edilebilmesi için elektron demeti litografisi tekniği ile üretilmiş olan Si-kalıplar ve spin kaplama tekniği kullanılmıştır. Bu amaçla voltaj/dönüş süreleri ve kullanılan polimer çözeltisinin hacimleri deneyerek optimize edilmiştir. 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/PEO çözeltisi damla damla ilave edilerek çeker ocak içinde 1 gece boyunca kurumaya bırakılmıştır. Ertesi gün mikro-oluklu filmler, kalıplardan dikkatlice ayrılmış ve oda sıcaklığında saklanmıştır. SF/PEO S filmler için gözlemlenen en uygun stabilizasyon yaklaşımı olan %25'lik gluteraldehit buharına 3 saat maruz bırakma işlemi, tüm SF/PEO G film iskeleler için de uygulanmıştır. Elde edilen tüm filmlerin, 4 nm kalınlığında Au/Pd sputter kaplamaları (Leica EM ACE200) sonrasında yüzey SEM analizleri gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda film iskele kalınlıkları kesitsel incelemelerle belirlenmiştir.

3. Araştırma Sonuçları ve Tartışma

3.1. Elektron Demeti Litografisi Yöntemiyle Üretilen Silikon Kalıplar

Elektron demeti litografisi yöntemiyle üretilen Si-kalıpların SEM görüntüleri Şekil 2'de verilmiştir.



Şekil 2. Elektron demeti litografisi tekniğiyle üretilmiş Si-kalıpların SEM görüntüleri. (a) G1R1 kalıbın eğik görüntüsü. (b) G1R1 kalıp. (c) G1R5 kalıp. (d) G1R10 kalıp. (G: Oluk genişliği, R: Çatı genişliği, 1: 1µm genişlik, 5: 5 µm genişlik, 10: 10 µm genişlik).

Figure 2. SEM images of Si-molds produced by electron beam lithography technique. (a) Tilted view of G1R1 mold. (b) G1R1 mold. (c) G1R5 mold. (d) G1R10 mold. (G: Groove width, R: Roof width, 1: 1µm width, 5: 5 µm width, 10: 10 µm width).

Tablo. Si-kalıplara ait planlanan ve üretim sonrasında elde edilen oluk-çatı genişlik değerleri.

Table. Groove-roof width values of Si-molds planned and obtained after production.

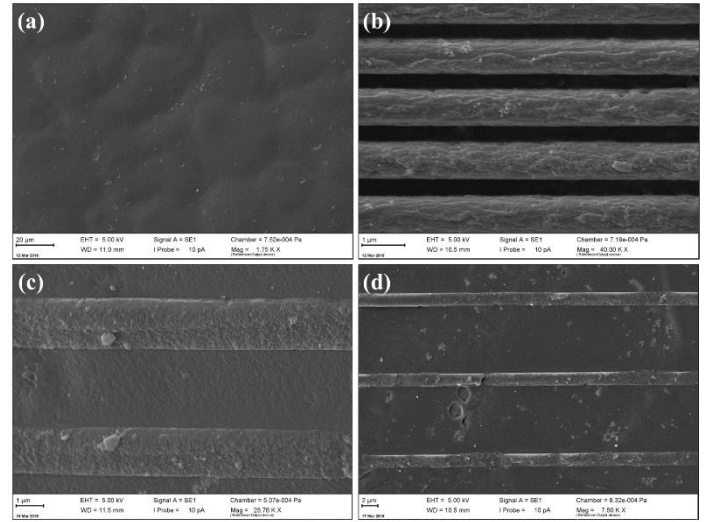
Si-Kalıp Grupları	Planlanan Kalıp Değerleri		
	Oluk Genişliği	Oluk Yüksekliği	Çatı Genişliği
G1R1	1 µm	1 µm	1 µm
G1R5	1 µm	1 µm	5 µm
G1R10	1 µm	1 µm	10 µm
Si-Kalıp Grupları	Üretim Sonrası Ölçülen Kalıp Değerleri		
	Oluk Genişliği	Oluk Yüksekliği	Çatı Genişliği
G1R1	1.2 µm	900 nm	800 nm
G1R5	1.8 µm	900 nm	4.5 µm
G1R10	1.8 µm	900 nm	9.5 µm

Tabloda ise planlanan oluk-çatı genişlikleri ile SEM karakterizasyonu sonucu elde edilen yaklaşık değerler verilmiştir. Si-kalıplarda çatı genişliği (R) 1, 5 ve 10 µm; oluk genişliği (G) ve yüksekliği (H) ise 1'er µm olarak planlanmıştır. Üretim sonrası elde edilen Si-kalıpların çatı genişliği G1R1, G1R5 ve G1R10 kalıpları için sırasıyla 800 nm, 4.5 µm ve 9.5 µm olarak ve aynı örnekler için oluk genişlikleri sırasıyla 1.2, 1.8, 1.8 µm olarak SEM ile ölçülmüştür. Yine oluk yüksekliği yaklaşık olarak 900 nm'dir. Ölçülen değerlerin hedeflenen değerlere oldukça yakın olduğu gözlenmiştir. Özellikle Si-kalıplardaki çatı genişlikleri, film dökümünde tam tersine oluk genişliğine karşılık geleceği için SF/PEO film iskelelerdeki oluk genişliği gruplarına oldukça yaklaşılmış olacaktır. Elde edilen Si-kalıplarda oluk ve çatıların oldukça düzgün morfolojide oldukları gözlenmiştir.

3.2. Düz ve Mikro-oluklu SF/PEO Film İskeleler

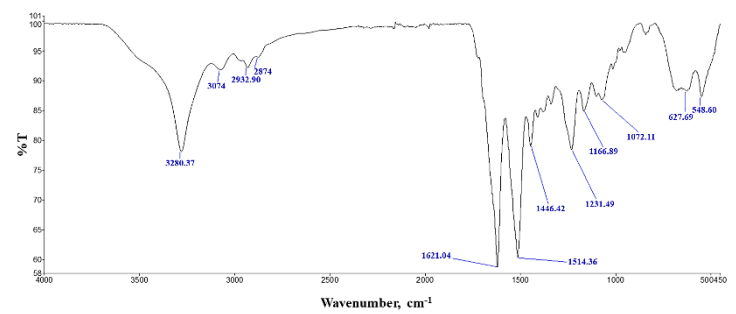
Üretilen düz ve mikro-oluklu SF/PEO film yapıdaki iskelelerin SEM görüntüleri Şekil 3'de verilmiştir. Düz yüzeyli filmlerin oldukça homojen ve düzgün bir dağılım gösteren yüzey morfolojisi sergiledikleri görülmektedir (Şekil 3-a). SF/PEO iskelelerin stabilizasyonunu sağlamak amacıyla bir grup örnek %90'lık metanol içinde 30 dk. bekletilmiş, bir grubu %25'lik gluteraldehit içinde 30 dk. tutulmuş, diğer bir grup ise %25'lik gluteraldehit buharına 3 saat maruz bırakılmıştı. Bazı örnekler ise başlangıçtaki SF çözeltisinin %1'i oranında gluteraldehit çözeltisi veya genipin eklenmişti. SF/PEO filmlerin %90'lık metanolla yarım saat muamele edilmesi, yapıdaki amorf karakterdeki fibroin proteinlerin kristal yapıya dönüşmesini sağlamaya yöneliktir. Diğer taraftan filmlerin gluteraldehit ve genipin ile muamele edilmesi ise yapıya çapraz bağlar katarak, dayanıklılığı sağlamaya yöneliktir. Tüm bu uygulanan işlemlerde ipek iskelelerin sulu çözelti içerisinde mekanik bütünlüğünü muhafaza ederek, 72 saat boyunca stabil kalması hedeflenmiştir. Mekanik stabilizasyona yönelik bu yaklaşımlar içinde, morfolojik gözlemlere dayalı olarak en optimal sonuç, %25'lik gluteraldehit buharına 3 saat boyunca maruz kalan filmlerden alınmıştır. Bunun haricindeki diğer işlemlerde, 72. saat sonunda SF/PEO iskelelerin dağıldıkları ve bütünlüklerini kayb ettikleri gözlenmiştir. Yine SF biyomateryale PEO katılması kırılğan yapıdaki ipek fibroini daha esnek bir hale getirmiştir.

SF/PEO filmlerin FTIR spektroskopi analiz sonuçları (Şekil 4) incelendiğinde, 3280 cm⁻¹ bandındaki pik N-H gerilme titreşimini ifade etmekte olup, ayrıca primer amin fonksiyonel grubunu doğrulamaktadır. Yine 3074 cm⁻¹, 2932 cm⁻¹ ve 2874 cm⁻¹'deki gerilme titreşimleri ise C-H bağlarına aittir; ilaveten 1621 cm⁻¹ bandındaki titreşim ise N-H bağı olup, primer amini doğrulamaktadır (Zhang vd., 2012; Ling vd., 2014).



Şekil 3. Spin kaplama tekniği ile hazırlanan SF/PEO film iskelelerin SEM görüntüleri. (a) SF/PEO S film yüzey. (b) SF/PEO G1 film yüzey. (c) SF/PEO G5 film yüzey. (d) SF/PEO G10 film yüzey. (SF: İpek fibroin, PEO: Polietilen oksit, S: Düz, G: Oluk genişliği, 1: 1µm genişlik, 5: 5 µm genişlik, 10: 10 µm genişlik).

Figure 3. SEM images of SF/PEO film scaffolds prepared by spin coating technique. (a) SF/PEO S film surface. (b) SF/PEO G1 film surface. (c) SF/PEO G5 film surface. (d) SF/PEO G10 film surface. (SF: Silk fibroin, PEO: Polyethylene oxide, S: Smooth, G: Groove width, 1: 1µm width, 5: 5 µm width, 10: 10 µm width).



Şekil 4. SF/PEO film iskele biyomateryalin FTIR spektroskopi analizi. (SF: İpek fibroin, PEO: Polietilen oksit, FTIR: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi).

Figure 4. FTIR spectroscopy analysis of SF/PEO film scaffold biomaterial. (SF: Silk fibroin, Polyethylene oxide, FTIR: Fourier-transform infrared spectroscopy).

Nöral doku mühendisliği kapsamındaki çalışmalarda hücresel çalışmalar da önemli olmakla birlikte, özellikle bu tür biyomalzeme dizaynlarının nihai hedefi üç boyutlu, tübüler ve implante edilebilir bir biyomateryal geliştirilmesidir. Dolayısıyla SF/PEO iskeleleri gluteraldehit buharına maruz bırakmak, yapıya ilave çapraz bağlar katarak mekanik stabiliteye yardımcı

olmuştur. PEO ilavesi ise yapıya esneklik sağlamıştır. Literatürdeki bir çalışmada, elektrospin tekniğiyle hazırlanan ipek fibroin/jelatin nanofiberleri, glüteraldehit buharına maruz bırakmanın, malzemeye çapraz bağlar sağlayarak stabilitesini ve mekanik özelliklerini artırdığı gösterilmiştir (Mohammadzadehmoghadam vd., 2019). Yine başka bir çalışmada glüteraldehid çapraz bağlı ipek fibroin film malzemelerde, esnekliğin ve stabilitenin yükseldiği bildirilmiştir (Wang vd., 2014).

Mikro-oluklu SF/PEO iskeleler başarılı bir şekilde spin kaplama sistemi ile Si-kalıplar üzerinde elde edilmiştir (Şekil 3 b-d). SEM görüntülerinden filmlerdeki planlanmış oluk genişliklerine oldukça yaklaşıldığı (1, 5 ve 10 µm) görülmektedir. Oldukça lineer paralel hatlara sahip ve periyodik olarak tekrar eden mikro-kanalların, nöral doku mühendisliği kapsamındaki çalışmalarda büyük bir kullanım potansiyeli bulunmaktadır. Özellikle bu çalışma kapsamında farklı oluk genişliği varyasyonlarının oluşturulması, değişik hücre tipleri ve hayvan modelleri düşünüldüğünde, aksonal kılavuzluk sağlayarak optimal sonuca ulaşılabilmesi bakımından önemlidir. Nöral doku onarımı ve rejenerasyon stratejileri, doğrudan hastaların yaşam kalitelerini etkilediği için üzerinde oldukça yoğun olarak çalışılan bir alandır (Gu vd., 2015; Seddighi vd., 2016). Sinir hasarlarının doku mühendisliği yaklaşımlarıyla tedavisinde kullanılan biyomalzemeler; sentetik, doğal ya da her ikisinin belirli oranlarda karışımıyla elde edilen hibrit yapılar şeklinde olabilmektedir (Willerth vd., 2007). Doğal polimerlerin en büyük avantajı ekstraselüler matriks ortamını daha iyi taklit edebilmeleri ve hücrelerle daha iyi etkileşime geçebilmeleridir. Sentetik polimerlerin ise mekanik özellikleri daha iyi kontrol edilebilmektedir. Hidrofil ve biyobozunur olmaları, elastikiyeti ve mekanik açıdan güçlü olmaları sentetik polimerlerin avantajlarından bazılarıdır (Subramanian vd., 2009). Dolayısıyla bu çalışma kapsamında geliştirilen stabil, esnek, biyobozunur, mekanik açıdan güçlü ve aksonal kılavuzluğu sağlayabilecek özelliklere sahip SF/PEO G film iskeleler, hem doğal polimerin hem de sentetik polimerin avantajlarını taşımaktadır. Elektron demeti litografisi tekniğinin sunduğu yaklaşımlar sayesinde, oldukça güvenilir ve yüksek hassasiyette mikro-desenlemeler başarılı bir şekilde Si-kalıp yüzeylere uygulanarak, mikro-oluklu film iskeleler elde edilmiştir.

Nöral doku mühendisliği kapsamında, ipek fibroin kullanılarak elde edilen nanofiber ve film yapıdaki iskelelerin kullanıldığı *in vitro* çalışmalarda; DRG primer duyu nöronları, Schwann hücreleri ve primer hipokampus nöronları kullanılmıştır. Mikro/nano desenli ipek fibroin yapının; nöronlarda canlılığı desteklediği, aksonal uzamayı ve oryantasyonu teşvik ettiği, hücre yapışmasını ve göçünü artırdığı, yüksek düzeyde biyoyumlu olduğu gösterilmiştir (Yang vd., 2007; Madduri vd., 2010; Zhang vd., 2012; White vd., 2015). İpek fibroinin tübüler sinir kanalı halinde kullanıldığı ve sıçanlarla yapılan implantasyon çalışmalarında ise siyatik sinir hasarında 1 cm'lik boşluğu tamir ettiği, omuriliğin toraksik kısmındaki yarı-kesim bölgesindeki (T8-T10 ve T11) hasarlı nöronların rejenerasyonunu önemli düzeyde teşvik ettiği ve fonksiyonel geri kazanıma yardımcı olduğu gösterilmiştir (Yang vd., 2007; Wang vd., 2011; Wei vd., 2011; Wang vd., 2016; Xu vd., 2016; Jiao vd., 2017). Tüm bu literatür verileri ve bu çalışma kapsamında biyomalzeme tasarımına dair elde edilen sonuçlar birlikte ele alındığında, nöral doku mühendisliği alanında alternatif ve yenilikçi biyomalzeme dizaynlarına büyük

bir ihtiyaç olduğu değerlendirilmiştir. Bu çalışma kapsamında geliştirilen film iskelelerin, sonraki süreçteki nöral hücre sel davranışları araştırmaya ve *in vivo* sinir rejenerasyonunu desteklemeye yönelik yeni çalışmalar için yol gösterici olabileceği sonucuna varılmıştır.

4. Sonuç

Bu çalışma kapsamında, elektron demeti litografisi tekniği kullanılarak, periyodik olarak tekrar eden üç farklı kanal genişliğine (1, 5 ve 10 µm) sahip ipek fibroin/polietilen oksit mikro-oluklu film yapıdaki iskeleler dizayn edilmiştir. Malzemenin mekanik özelliğini ve stabilitesini geliştirmek için farklı yaklaşımlar uygulanarak, en optimal sonuçlar glüteraldehit buharına maruz bırakma yoluyla elde edilmiştir. Yine yapıya PEO ilavesinin, filmlerin esnekliğini artırdığı görülmüştür. Geliştirilen biyomalzemenin, potansiyel nöral doku mühendisliği çalışmaları kapsamında; hücre sel nöritlerin ve aksonların lineer hatlar boyunca ilerlemesine kılavuzluk etmesine yardımcı olabileceği ve bir sinir hasarı bölgesine implantasyonu sonrasında rejenerasyonu destekleyebileceği değerlendirilmiştir.

5. Teşekkür

Bu çalışma TÜBİTAK (BİDEB-2211-C) öncelikli alanlara yönelik doktora teşvik bursu ile desteklenmiştir. Bu çalışmanın yapılmasına katkı sağladığı için TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Kaynakça

- Altman, G. H., Diaz, F., Jakuba, C., Calabro, T., Horan, R. L., Chen, J., Lu, H., Richmond, J., & Kaplan, D. L. (2003). Silk-based biomaterials. *Biomaterials*, 24(3), 401–416. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(02\)00353-8](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(02)00353-8)
- Buss, A., Brook, G. A., Kakulas, B., Martin, D., Franzen, R., Schoenen, J., Noth, J., & Schmitt, A. B. (2004). Gradual loss of myelin and formation of an astrocytic scar during Wallerian degeneration in the human spinal cord. *Brain*, 127, 34–44. <https://doi.org/10.1093/brain/awh001>
- Chen, Y. F. (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>
- Dalamagkas, K., Tsintou, M., & Seifalian, A. (2016). Advances in peripheral nervous system regenerative therapeutic strategies: A biomaterials approach. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 65, 425–432. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.04.048>
- Gu, X. S. (2015). Progress and perspectives of neural tissue engineering. *Frontiers of Medicine*, 9(4), 401–411. <https://doi.org/10.1007/s11684-015-0415-x>
- Jiao, G. L., Pan, Y. Q., Wang, C. C., Li, Z. X., Li, Z. Z., & Guo, R. (2017). A bridging SF/Alg composite scaffold loaded NGF for spinal cord injury repair. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 76, 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.02.102>
- Ling, S. J., Qi, Z. M., Watts, B., Shao, Z. Z., & Chen, X. (2014). Structural determination of protein-based polymer blends with a promising tool: combination of FTIR and STXM spectroscopic imaging. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 16(17), 7741–7748. <https://doi.org/10.1039/c4cp00556b>

- Liu, H. F., Li, X. M., Zhou, G., Fan, H. B., & Fan, Y. B. (2011). Electrospun sulfated silk fibroin nanofibrous scaffolds for vascular tissue engineering. *Biomaterials*, 32(15), 3784-3793. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.02.002>
- Madduri, S., Papaloizos, M., & Gander, B. (2010). Trophically 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>
- 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>
- Mohammadzadehmoghadam, S., & Dong, Y. (2019). Fabrication and Characterization of Electrospun Silk Fibroin/Gelatin Scaffolds Crosslinked With Glutaraldehyde Vapor. *Frontiers in Materials*, 6. <https://doi.org/ARTN9110.3389/fmats.2019.00091>
- 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>
- 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>
- Sofia, S., McCarthy, M. B., Gronowicz, G., & Kaplan, D. L. (2001). Functionalized silk-based biomaterials for bone formation. *Journal of Biomedical Materials Research*, 54(1), 139-148. [https://doi.org/Doi10.1002/1097-4636\(200101\)54:1<139::Aid-Jbm17>3.0.Co;2-7](https://doi.org/Doi10.1002/1097-4636(200101)54:1<139::Aid-Jbm17>3.0.Co;2-7)
- 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/Artn10810.1186/1423-0127-16-108>
- Tabesh, H., Amoabediny, G., Nik, N. S., Heydari, M., Yosefifard, M., Siadat, S. O. R., & Mottaghy, K. (2009). The role of biodegradable engineered scaffolds seeded with Schwann cells for spinal cord regeneration. *Neurochemistry International*, 54(2), 73-83. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2008.11.002>
- Tucker, B. A., & Mearow, K. M. (2008). Peripheral Sensory Axon Growth: From Receptor Binding to Cellular Signaling. *Canadian Journal of Neurological Sciences*, 35(5), 551-566. <https://doi.org/Doi10.1017/S0317167100009331>
- Wade, R. J., & Burdick, J. A. (2014). Advances in nanofibrous scaffolds for biomedical applications: From electrospinning to self-assembly. *Nano Today*, 9(6), 722-742. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2014.10.002>
- Wang L., Wang Y., Qu J., Hu Y., You R. and Li M. (2013). The Cytocompatibility of Genipin-Crosslinked Silk Fibroin Films. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 4(3), 213-221. doi: 10.4236/jbnb.2013.43026
- Wang, C. Y., Zhang, K. H., Fan, C. Y., Mo, X. M., Ruan, H. J., & Li, F. F. (2011). Aligned natural-synthetic polyblend nanofibers for peripheral nerve regeneration. *Acta Biomaterialia*, 7(2), 634-643. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.09.011>
- Wang, T. G., Xu, J., Zhu, A. H., Lu, H., Miao, Z. N., Zhao, P., Hui, G. Z., & Wu, W. J. (2016). Human amniotic epithelial cells combined with silk fibroin scaffold in the repair of spinal cord injury. *Neural Regeneration Research*, 11(10), 1670-1677. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.193249>
- Wang, Y. X., Qin, Y. P., Kong, Z. J., Wang, Y. J., & Ma, L. (2014). Glutaraldehyde Cross-linked Silk Fibroin Films for Controlled Release. *Advances in Materials and Materials Processing Iv, Pts 1 and 2*, 887-888, 541-546. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.887-888.541>
- 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>
- Wei, Y. J., Gong, K., Zheng, Z. H., Wang, A. J., Ao, Q., Gong, Y. D., & Zhang, X. F. (2011). Chitosan/silk fibroin-based tissue-engineered graft seeded with adipose-derived stem cells enhances nerve regeneration in a rat model. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, 22(8), 1947-1964. <https://doi.org/10.1007/s10856-011-4370-z>
- 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, Y. Q., Zhang, Z. H., Chen, X. Y., Li, R. X., Li, D., & Feng, S. Q. (2016). A Silk Fibroin/Collagen Nerve Scaffold Seeded with a Co-Culture of Schwann Cells and Adipose-Derived Stem Cells for Sciatic Nerve Regeneration. *Plos One*, 11(1). <https://doi.org/ARTN10.1371/journal.pone.0147184>
- 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>
- Yang, Y., Chen, X., Ding, F., Zhang, P., Liu, J., & Gu, X. (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>
- Yang, Y., Ding, F., Wu, H., Hu, W., Liu, W., Liu, H., & Gu, X. (2007). Development and evaluation of silk fibroin-based nerve grafts used for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials*, 28(36), 5526-5535. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.09.001>
- Zhang, H., Li, L. L., Dai, F. Y., Zhang, H. H., Ni, B., Zhou, W., Yang, X., & Wu, Y. Z. (2012). Preparation and characterization of silk fibroin as a biomaterial with potential for drug delivery. *Journal of Translational Medicine*, 10. <https://doi.org/Artn11710.1186/1479-5876-10-117>
- 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>