

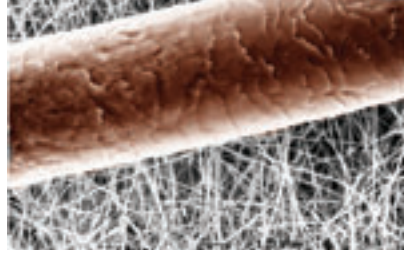
NANOTEKNOLOJİ VE

Yirmibirinci yüzyıla girilmesiyle birlikte stratejik bir önem kazanmış olan nanoteknoloji; “nano” boyuttaki (1-100 nanometre, nm) maddelerin atomik veya moleküler düzeydeki üstün özelliklerinden yararlanan yapıların, devrelerin ve sistemlerin geliştirilmesini kapsıyor. Bir “nanometre”nin metrenin milyarda biri olduğunu hemen ekleyelim. Tek bir saç telimizin 100 bin nanometre kalınlığında olduğunu düşündüğümüzde “nano” boyutu canlandırmak ve önemini kavramak kolaylaşacaktır.

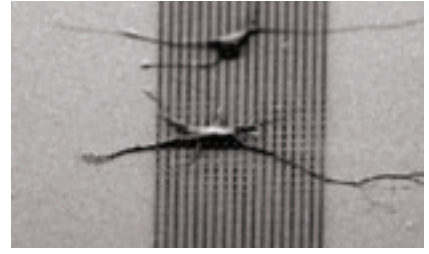
Günümüzde nanoteknoloji bir gerçektir. Nanoteknoloji ile ilginç molekülleri sentezleyecek nanoölçekte montaj aygıtları geliştirilebilir. Kanser hücrelerini bulup öldürecek mini makineler inşa edilebilir. Işık, asit veya çok düşük düzeylerdeki zehirli metalleri tayin edecek moleküler ölçekte sensörler (algılayıcılar) üretilebilir. Nanoteknolojinin biyoteknoloji ile bütünleşmesi ile karşımıza çıkan nanobiyoteknoloji, çok sayıda disiplinin (malzeme bilimi, kimya, mühendislik, optik, elektronik, tıp, eczacılık vb.) ortak çabaları ile birbirinden ilginç ürünler sergiliyor. Bu açıdan bakıldığında nanobiyoteknolojinin en gözde dalı “nanotıp” olarak düşünülebilir. Nanotıp, insan vücudundaki biyolojik sistemlerin moleküler düzeyde nanomalzemeler ve nanocihazlar kullanılarak gözlenmesi, kontrolü ve tedavi edilmesidir. Uygulamalar için öncelikle nanotıbbın hedef yaklaşımı seçilir. Ardından bu hedefi bulacak ve onun işlevini kontrol edecek ya da düzeltecek nanocihaz üretilir.

Hastalık veya kazalar nedeniyle işlev göremez hale gelmiş doku ya da orga-

Nanoteknolojik tekniklerle atom veya moleküllerden çıkılarak çeşitli malzemeler üretilmektedir.

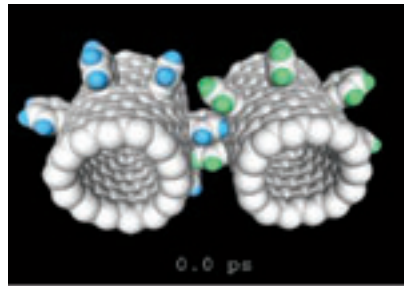


Saç telimiz nanofilmlerden binlerce kat daha kalın.



Karbon nanotüpler üzerinde sinir hücreleri.

nın yerine yenisinin oluşturulması, canlı yaşamının normal bir biçimde devam etmesi açısından kuşkusuz çok önemli. Günümüzde doku mühendisliği yaklaşımı ile doku onarımı ya da üretimi hedefleniyor. Bu hedefe ulaşmak için insan vücudunun son derece karmaşık yapıdaki sistemlerini taklit etmek gerekiyor; ki bu da ancak son derece ileri bir teknoloji ile mümkün. Sistemleri taklit eden

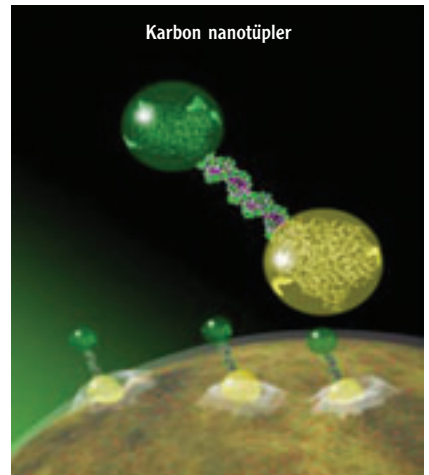


Karbon nanotüplerin yoğunluğu çok düşük, ama çelikten 10 kat sertler.

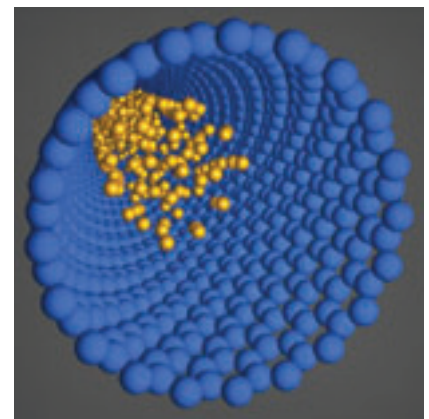
bilmek için öncelikle onları gözlemlemek ve özelliklerini öğrenmek gerekiyor. Nanoteknolojideki son gelişmelerle biyolojik olayları çeşitli şekillerde gözlemlemek ve karakterize etmek mümkün. Vücut içindeki hücre davranışları nanoteknoloji-destekli floresan problemlerle, örneğin kuantum noktaları (quantum dots, QD) ile gözlemlenebiliyor. Kuantum noktaları, boyutları 1 ila 10 nm arasında değişen ve ışığı yansıtabilen nanoparçacıklar. Taramalı prob mikroskop (SPM) tekniğiyle biyolojik olaylar atomik ve moleküler düzeylerde incelenebiliyor. Bu teknikler arasında doku mühendisliği uygulamalarında en yaygın kullanılanı atomik kuvvet mikroskobu (AFM). AFM, hücrelerin hücre dışı matris (ECM) ile etkileşimi konusunda çok yararlı bilgiler sunuyor.

Doku mühendisliğinde istenilen dokuyu oluşturabilecek işlevselliğe sahip hücreler uygun bir malzemeden hazırlanan doku iskeleleri ile birleştirilerek hibrid sistemler oluşturuluyor. Doku iskelesi, hücrelerin organize olarak işlevsel bir dokuya dönüşebilmelerinde gerekli desteği sağlıyor. Doku iskelelerinde hücrelerin pozisyonunun ve işlevlerinin kontrol edilebilmesi, hazırlanan yapının başarılı olmasındaki kritik noktalar. Doku iskelelerinin hazırlanmasında gerek malzeme geliştirilmesi, gerekse bu malzemeden istenilen geometrik, topografik ve işlevsel özelliklere sahip yapıların tasarımında nanoteknolojik yaklaşımlar giderek önem kazanmakta.

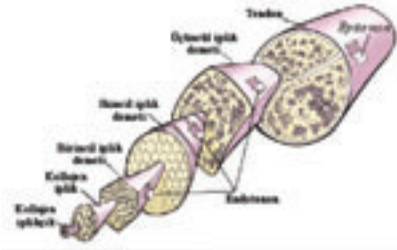
Nanoölçekteki fabrikasyon tekniklerinin kullanımı sonucu, nanoboyuttaki özelliklerin hücresel davranışlar ve do-



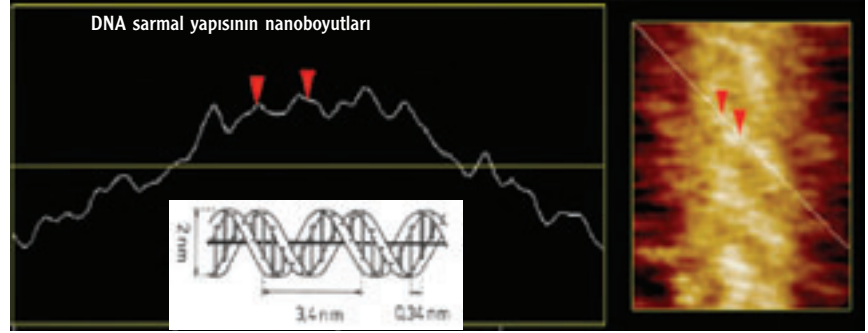
Karbon nanotüpler



DOKU MÜHENDİSLİĞİ



Tendonun hiyerarşik yapısı nanoboyutun (kollajen iplikçikler) gerekliliğini vurguluyor.



ku organizasyonundaki önemi konusundaki bilgilerimiz artmıştır. Nanofabrikasyon teknikleriyle ECM'yi en iyi biçimde taklit edebilecek doku iskeleleri geliştirilirken doğal ECM'nin en temel yapıtaşı olan kollajen iplikçikler temel alınıyor. Bu noktadan yola çıkılarak nanoboyuttaki iplikçiklerden doku iskeleleri hazırlanıyor. Elektroegirme ve peptidlerin kendiliğinden-düzenlenmesi

(self-assembly), kullanılan temel yöntemler. Ayrıca çeşitli nanolitografik desenleme teknikleriyle (nanobaskılama, kazıma, elektron demet litografisi) doku iskelelerinde kontrollü nanoyapılar oluşturulabiliyor. Bu malzemelerle gerçekleştirilen laboratuvar çalışmaları nanotopografinin doku oluşumundaki etkinliğini ortaya koymuş durumda.

Nanoparçacıklar kullanarak biyo-

uyumlu implantların üretimi, doku oluşumunu destekleyecek biyolojik ajanların salımı ve hücre saflaştırılması, doku mühendisliği uygulamalarındaki diğer nanoteknolojik yaklaşımlar. Diğer bir yaklaşım olarak ise, "biyona-no yüzey teknolojisi" kullanılarak hücre tabakalarının (cell sheet) üretimi ve bu tabakalardan doku oluşumu sayılabilir.

DOKU MÜHENDİSLİĞİ

Doku mühendisliği, hiç kuşkusuz günümüz biyotibbının en popüler alanını oluşturuyor. Doku mühendisliğinin temel hedefi, doku ve/veya organ hasarı veya kaybı durumunda kullanılmak üzere laboratuvar koşullarında organ veya doku oluşturmak. Böylelikle, yakın bir gelecekte, mühendislik harikası dokular sayesinde organ nakline gerek kalmayacak. Hücrelerin kültür ortamında dokuları oluşturacak şekilde geliştirilmesi, birkaç saniye sürebileceği gibi haftalarca uzayabilen bir işlem de olabilir. Bu da, dokunun tipiyle ve boyutlarıyla yakından ilişkili. 0,0001 cm'den 10 cm'ye kadar değişebilen boyutlarda doku üretilmesi mümkün.

"Doku mühendisliği" terimi ilk olarak 1987'de California Üniversitesi'nden (San Diego) Dr. Y.C. Fung tarafından NSF'nin (National Science Foundation) bir toplantısında dile getirilmiş. Bilimsel çevrelerin "doku mühendisliği" konusuna odaklanmasında ise 2 makale çok etkili olmuş. Bunlardan biri Nerem tarafından 1991'de "hücre mühendisliği" konusunda, diğeri ise Langer ve Vacanti tarafından 1993'te Science dergisinde "doku mühendisliği" başlığı altında yayınlanmıştır. Temel bilimciler, malzeme bilimcileri, mühendisler, hücre biyologları ve klinisyenlerin ortak çabalarıyla günümüzde doku mühendisliği bütünüyle disiplinlerarası bir alan haline gelmiştir. Şu anda doku mühendisliğinde doğum aşaması geride bırakılıp klinikte kullanılabilecek çeşitli ürünlerin üretilabileceği aşamaya gelinmiştir. Doku mühen-

disliğinin ilk ticari ürünü olarak nitelendirebileceğimiz deri dokusu, içlerinde ABD ve İngiltere'nin de yer aldığı pek çok ülkenin market raflarında yerini almıştır. Kıkırdak, geçici karaciğer-destek sistemleri ve pankreas konusunda klinik çalışmalar halen devam etmekte. Kemik, karaciğer, kornea, sinir, kalp kapakçıkları, boşaltım sistemi, damarlar ve diğer birçok yumuşak doku ile araştırmacılar yoğun biçimde çalışmalarını sürdürüyorlar.

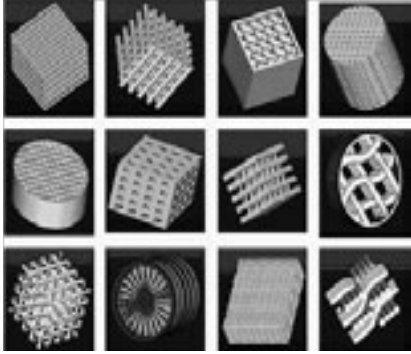
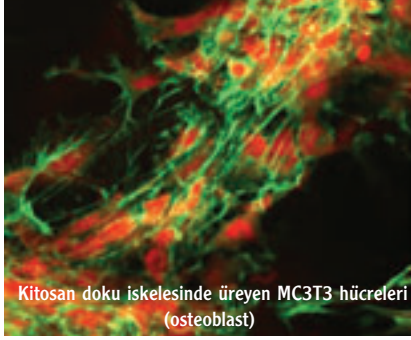
Doku mühendisliği için değişik tanımlamalar yapılmakta. Ancak, en kabul gören tanım şu: Biyomalzeme, hücre ve biyosinyal moleküllerini tek başlarına veya birlikte kullanarak canlı dokuların tamiri veya yeniden yapılması için biyoloji, kimya ve mühendislik ilkelerinin uygulanmasıdır. Bu tanıma göre doku mühendisliği için 4 yaklaşım mevcut. Birinci yaklaşım yeni dokunun oluşumu için yalnızca biyomalzeme kullanırken, "hücre nakli" olarak adlandırılan ikinci yaklaşım yalnızca hücreleri kullanarak tedaviyi gerçekleştirmeyi amaçlıyor. Hücreler, canlı dokulardan yalıtılan hücreler olabileceği gibi, genetik olarak işlem



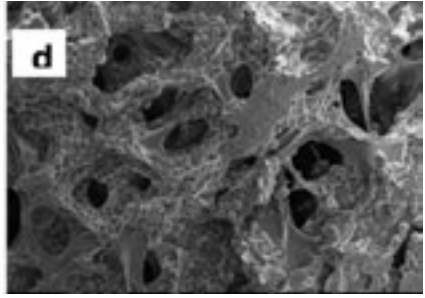
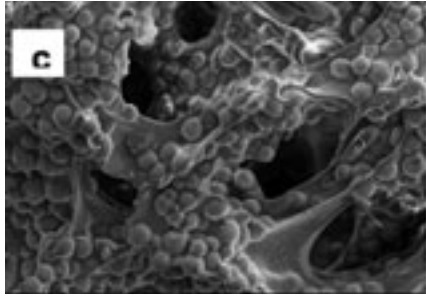
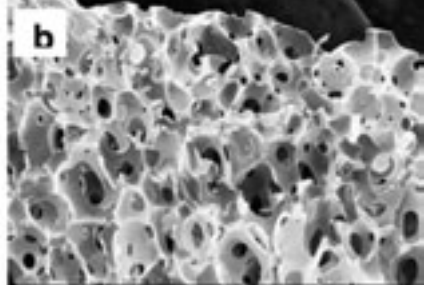
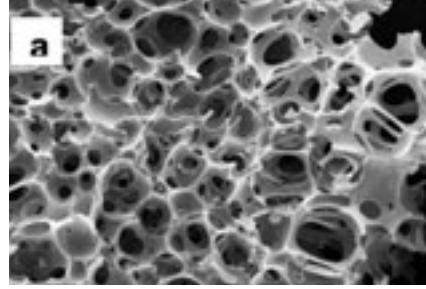
görmüş hücreler de (bu durum gen tedavisi olarak adlandırılır) olabilir. Üçüncü yaklaşım, biyomalzeme ile biyosinyal moleküllerini (yapışma ve büyüme faktörleri) kullanıyor. Dördüncü yaklaşım (ki, bu üzerinde en çok çalışılan yaklaşımdır) biyomalzeme, hücre ve biyosinyal moleküllerinin üçünün bir arada kullanarak doku oluşturmayı hedefler. Hücre üremesini yeni doku veya organları oluşturacak şekilde yönlendirmek ve gerekli mekanik desteği sağlamak için biyomalzemelerden 3-boyutlu doku iskeleleri (tissue scaffold) üretilir. Ayrıca gerçek doku mikroçevresindeki mekanik kuvvetlere benzer etkilerin sağlanabilmesi için çeşitli biyoreaktörler kullanılır. Dolayısıyla doku mühendisliği için 4 temel bileşenin gerekli olduğunu söyleyebiliriz: Doku iskelesi, işlevsel hücreler, biyosinyal moleküller ve dinamik kuvvetler.

Çok yakın bir zamana kadar gerçek boyutta organ sistemlerini oluşturmak üzere doku mühendisliği çalışmaları yalnızca "makro ölçekte" gerçekleştirilmiştir. Hücrelerimiz genelde 10 mikrondan (μm ; $1 \mu\text{m}=1000 \text{ nanometre, nm}$) büyük boyuttadır ve doku iskeleleri de 100 μm üzerindeki boyutsal ayrıntılara sahiptir. Fakat dokunun işlevsel birimlerini oluşturmak için hücresel boyutun altında yapılar (0.1-10 μm arası) ve nanoyapılar (1-100 nm) gereklidir. Böylelikle hücresel çevre, hücre-hücre ve hücre-molekül etkileşimleri kontrol edilebilir. Nanoteknolojiyi kullanarak biyolojik ve fiziksel özellikleri kolayca tahmin edilebilen doku mühendisliği ürünleri üretilir. Bu nedenle, doku mühendisliğinin nanoteknolojik boyutta gerçekleştirilebilmesi büyük önem taşıyor.

Nerem RM, Cellular Engineering. Ann.Biomed.Eng. 19, 1991.
Langer R, Vacanti JP, Tissue Engineering. Science 260, 1993.



teknik, stereolitografi (SLA), eriterek birikim modellemesi (fused deposition modeling, FDM) ve lazerle kalıplama (selective laser sintering, SLS) tekniklerini içeriyor. SLS teknolojisiyle, polimer parçacıklarının lazer ışını yardımıyla istenilen şekilde ve tabakalarda birleştirilmesi sağlanıyor. Bu teknolojinin en önemli dezavantajları kullanılacak malzemenin toz halinde olma zorunluluğu ve yüksek sıcaklıkta işlemenin gerekli oluşudur. FDM teknolojisiyle, bir enjektörden basılan eriyik halindeki polimer veya seramikler, tabakalar halinde üst üste eklenerek üç-boyutlu iskele oluşumu sağlanmakta. Doğal polimerler için uygun olmadığı gibi, yüksek sıcaklık nedeniyle doku iskelesinin biyomoleküllerle etkileşimine de fırsat vermiyor. SLA teknolojisi ise bir fotopolimerizasyon tekniği. Her üç teknikteki dezavantajları (yüksek sıcaklık, fotobaslatıcı gereksinimi) ortadan kaldıran teknik, üç-boyutlu



Süpergözenekli hidrojel doku iskeleleri (a,b) ve hidroksiapatit ile hazırlanmış kompozitleri (c,d) (kaynak no.2)

baskı tekniği. Bu teknikte inkjet baskı makinesinden, toz haldeki polimer tabakalarının üzerine bağlayıcı püskürtülerek 3-boyutlu doku iskelesi hazırlanır. Ayrıca hızlı prototipleme tekniklerinin mikrokapsülasyon teknolojisiyle birleştirilmesiyle geliştirilen “hücre baskılama” (cell printing) tekniğinde çok hücreli sistemleri oluşturmak üzere hücreler tabakalar halinde üst üste dizilir. Ancak, bu işlem henüz çok yeni olup optimizasyonu için üzerinde çalışılması gerekmektedir. Diğer bir strateji ise “organ baskı” (organ printing) tekniği olup, hücre kümelerinin birbirine yakın biçimde yerleştiklerinde disk veya tüp formunda doku oluşturdıkları varsayımına dayanır.

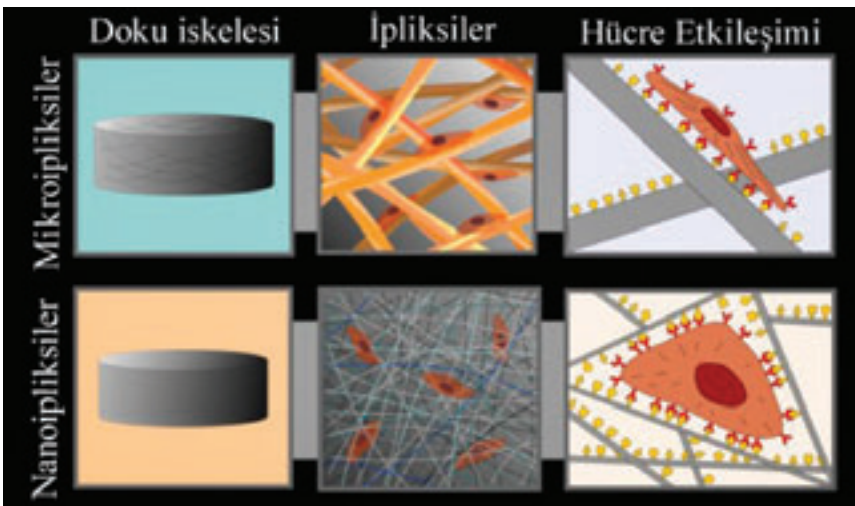
Makro/mikro fabrikasyon teknikleriyle mikron boyutunda gözeneklere sahip üç-boyutlu doku iskeleleri üretilebilmektedir. Ancak, işlenmiş sentetik polimerlerin yaklaşık 10-50 µm’lik mikrolifleri birçok hücre ile (~ 5-30 µm çapında) aynı boyuttadır. Bu nedenle bu mikrolifler üzerine yapışan hücrelerin de 2-boyutlu çevrede yer aldıkları söylenebilir. Bunun yanı sıra lifler arası gözeneklerin boyutları da sinyal moleküllerin boyutlarından yaklaşık 1.000-10.000 kat daha büyüktür. Bu durum biyomoleküllerin iskeleden kolaylıkla difüzyonuna neden olmakta ve moleküler bir yoğunluk farkının oluşmasını engellemektedir. Oysa ki moleküler yoğunluk farkı, biyolojik farklılaşma, hücre kaderinin belirlenmesi, organ oluşumu, sinirsel bilgi geçişi ve diğer birçok biyolojik

süreçte önemli rol oynuyor. Gerçek bir üç-boyutlu çevrede, doku iskelesinin iplikçikleri ve gözenekleri hücrelerden daha küçük olmalı. Bu durumda hücreler doku iskelesi ile sarılabilmekte ve böylece ECM’ye benzer bir çevre sağlanabilmektedir. İşte bu gereksinimler doğrultusunda araştırmacılar doku iskelesi üretiminde “nanofabrikasyon yöntemleri”ni kullanmaya yönelmişler.

Nano Fabrikasyonla Doku İskelesi

Nano fabrikasyon teknikleri ECM’yi daha iyi taklit edebilecek nano yapıları doku iskelelerinin üretimine olanak sağlıyor. Halen araştırma aşamasında olan iki farklı yaklaşım mevcut. Her ikisinde de ECM’nin kollajen iplikçiklerine benzer yapıları sahip doku iskeleleri üretilebiliyor. İlk yaklaşım, nanoteknolojinin “yukarıdan-aşağıya yaklaşımı” (top-down approach). Bu yaklaşımda nanofabrikasyon teknikleri kullanılarak sentetik polimerik malzemelerden nanoboyutlu iplikçikler üretiliyor. Elektrostatik-eğirme (electrospinning) yöntemi, üzerinde en çok çalışılanı. İkinci yaklaşım olan “aşağıdan-yukarıya yaklaşımı” nda (bottom-up approach) ise, kısa peptid molekülleri kendiliğinden düzenlenerek nanolifler oluşturuluyor. Nanofabrikasyon işlemleriyle 1-1000 nm aralığında çapa ve çok yüksek yüzey alanına sahip lifler üretilmekte. Örneğin 100 nm çapındaki 1 gram nanolifin yüzey alanı 1000 m². Bu nanoliflerden hazırlanan gözenekli doku iskeleleri, kusursuz yapısal ve mekanik özelliklere sahipler. Yüksek gözeneklilik (>70), değişebilen gözenek boyutu, yüksek yüzey/hacim oranı, doku iskelelerinin önemli avantajları.

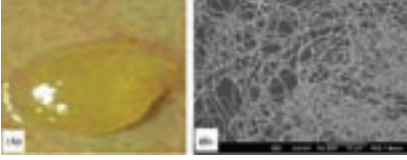
Nanolifli ve mikrolifli doku iskelelerinin karşılaştırılması. Nanolifler 3-boyutlu mikroçevre oluşturuyor.



Kaynaklar:

1. R.S. Tıglı, A. Karakeçili, M. Gümüşderelioglu, In-vitro characterization of chitosan scaffolds: influence of composition and deacetylation degree, J.Materials Science:Materials in Medicine, 2007; 18, 1665-1674.
- 2.T.T. Demirtaş, A. Karakeçili, M. Gümüşderelioglu, Hydroxyapatite containing superporous hydrogel composites: synthesis and in-vitro characterization, J.Materials Science:Materials in Medicine, 2007.
- 3.W.Yeong, C.Chua, K.Leong, M.Chandrasekaran, Rapid prototyping in tissue engineering: challenges and potential, Trends in Biotechnology, 2004; 22, 12, 643-652.

PEPTİD TEMELLİ NANODOKU İSKELELERİ



Peptid amfifil çözeltisine hücre kültür ortamı eklenmesiyle oluşan jel yapısının ışık mikroskobu fotoğrafı, b) Kendiliğinden düzenlenen peptid amfifil nanoliflerinin SEM fotoğrafı.

Peptidler az sayıda (en fazla 20 civarında) amino asitin kovalent bağlarla (ki bu bağlar peptid bağları olarak adlandırılır) bağlanması sonucu oluşan kısa zincirli yapılar. Doğada bulunan 20 amino asitin birkaçı bir araya gelerek farklı özelliklerdeki peptid zincirlerini oluştururlar. Peptidler, çeşitli biyolojik moleküllerle etkileşebilecek işlevselliğe sahip yapıları oluşturabilmek amacıyla kendiliğinden düzenlenebilmekteler (self-assembly). “Kendiliğinden-düzenlenme” yaşamımızın anahtarı. Lipid moleküllerinin su içinde yağ damlacıklarını oluşturması, dört adet hemoglobin polipeptidinin işlevsel hemoglobin proteinini oluşturması, ribozomal proteinlerin ve RNA’nın işlevsel ribozomları oluşturması, doğada sıkça rastlanan “kendiliğinden-düzenlenme” örneklerinden yalnızca birkaçı. Ayrıca, hücre zarının temel bileşeni olan fosfolipidler sulu çözeltelerde kendiliğinden-düzenlenerek miseller, kesecikler (veziküller) ve tübüller gibi farklı yapılar oluşturmaktalar.

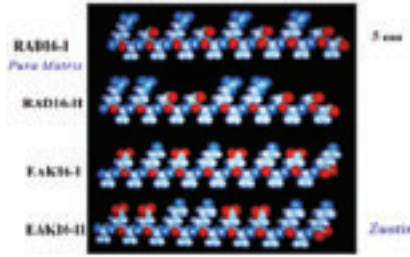
Moleküler kendiliğinden-düzenlenme; hidrojen bağları, iyonik bağlar (elektrostatik etkileşimler), hidrofobik etkileşimler ve van der Waals etkileşimleri ile gerçekleşmekte. Tek başlarına önemsiz sayılabilecek bu bağlar bir araya geldiklerinde tüm biyolojik makromoleküllerin yapısal düzenlenmelerini yönetmekte ve diğer moleküller ile etkileşimlerini artırmaktalar. Nanoteknoloji, doğadaki bu “kendiliğinden-düzenlenme” özelliğini, çok çeşitli malzemelerin (film, çift tabaka, zar, nanoparçacık, misel, kapsül, lif vb.) üretiminde kullanıyor.

Peptid amfifiller (hem su-sever, hem de su-sevmez gruplara sahip peptidler) sulu ortamlarla karşılaştığında, yapılarındaki hidrofobik (su-sevmez) gruplar sudan kaçmakta; hidrofilik (su-sever) kısımlar ise su ile yakın temasta bulunacak şekilde bir düzene girmekteler. Tıpkı lego parçaları gibi birbirine geçen çıkıntı ve oyuklara sahip kısımlardan oluşan bu yapılar “moleküler lego” olarak adlandırılıyor.

MIT’den (Massachusetts Institute of Technology, ABD) moleküler biyolog Zhang ve Hong Kong Üniversitesi’ndeki arkadaşları peptid amfifillerin lego özelliklerini kullanarak kendiliğinden-düzenlenen nanoyapılı çeşitli malzemeler sentezlediler. Farklı uygulamalara yönelik olarak sentezledikleri bu yapıların bir grubu, doku üretmek amacıyla destek malzeme (doku iskelesi) hazırlanması içindi.

Kendiliğinden-düzenlenen bir peptid, tuz çö-

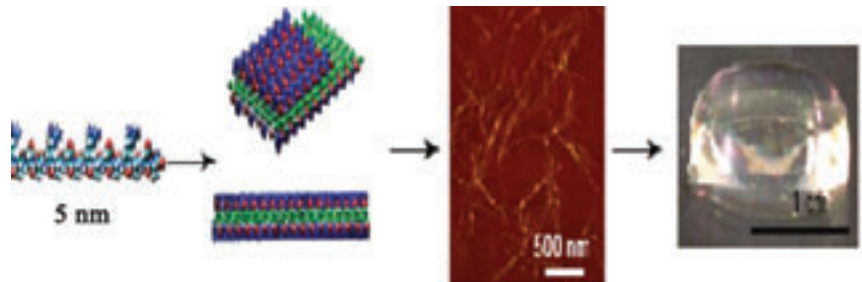
zeltisi ya da fizyolojik ortamla etkileştirildiğinde 3-boyutlu peptid doku iskelelerinin oluşması son yılların en gözde çalışma konularından birisi. Tarımsal elektron mikroskobu (SEM) ve atomik kuvvet mikroskobu (AFM) görüntüleri, bu şekilde hazırlanan iskelelerin 10 nm çapında liflerden oluştuğunu ve lifler arasında da 5-200 nm boyutunda gözeneklere sahip olduğunu göstermiştir. Kendiliğinden-düzenlenen peptidlerden oluşan doku iskeleleri %99’dan fazla su içeriğine sahiptir, yani jel özelliği (jöle benzeri yapı) göstermektedir. Tüm peptid amfifiller asitleşme mekanizması sonucu jel oluşturabilmekteler. Ancak, jel içerisindeki nanoliflerin uzunluğu ya da jel sertliği, peptid kimyasıyla değişiyor. Asitleşmenin vücut içerisinde jel oluşturmak için uygun bir yöntem olmaması nedeniyle biliminsanları farklı jelleşme mekanizmaları arayışına girmişler. Bu arayışın bir sonucu olarak çift değerlikli katyonların (Ca^{2+} gibi) ortama eklenmesiyle jelleşmenin gerçekleşebi-



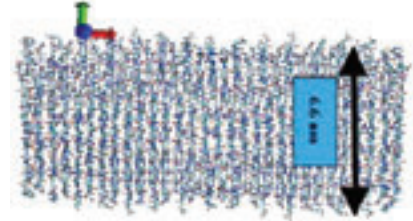
Çeşitli peptid amfifillerin (RADA16-I, RADA16-II, EAK16-I ve EAK16-II) moleküler modelleri.

leceği gösterilmiş. Özellikle hücre kültür ortamındaki katyonlar, peptid amfifiller arasındaki itici güçlerin maskelenmesinde önemli rol oynamakta ve böylelikle kendiliğinden-düzenlenmeyi teşvik etmekteler.

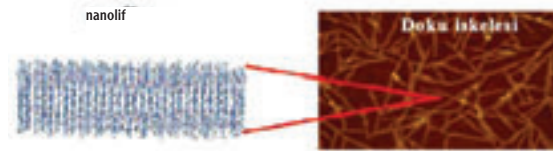
Kendiliğinden-düzenlenen peptidler sınıfının ilk molekülü, Zuotin adı verilen bir maya proteininin 16 amino asitten oluşan EAK16-II (AEAEAKAEAEAKAK) segmenti. PC12 hücreleriyle yapılan çalışmada bu peptidten hazırlanan doku iskelesinin hücreler üzerinde zehirli etkisi olmadığı görülmüş. Bunun yanında RADA 16-I (RADARADARADA) ve RADA 16-II (RARADADARA-



Peptid Lego®. 16 amino asitten oluşuyor, yaklaşık 5 nm boyutunda ve ardışık hidrofilik-hidrofobik yapıya sahip. Hidrofobik kısımlar içe yönelir (yeşil), pozitif yüklü (mavi) ve negatif yüklü (kırmızı) kısımlar ise birbirini tamamlayan iyonik etkileşimlere girerler. Böylece kendiliğinden-düzenlenmeyle nanolifler oluşur (soldan 3. şekil). Bu nanolifler %99,5’un üzerinde yüksek su içeriğine sahip jel yapısındadırlar (en sağdaki şekil) ve doku iskelesi üretiminde kullanılırlar.



Nanoliflerden yüksek su içeriği ve gözenekliliğe sahip doku iskeleleri üretiliyor.



RADADADA gibi peptid yapıları da tasarlanmış ve bu yapılarda, tuzlarla kontrol edilebilen doku iskelesi oluşumu tanımlanmış.

Yapılan çalışmalarda birçok peptid doku iskelesinin hücre bağlanması, hücre canlılığı ve farklılaşmasını artırdığı gösterilmiş. Hücre yapıştırıcı tripeptid RGD (arjinin-glisin-aspartik asit) ile işlevsel hale getirilmiş peptid amfifil nanolifler kemik matrisinin önemli bir elemanı olan hidroksiapatit doğrudan mineralizasyonu için kullanılmış ve bu şekilde oluşturulan kompozit malzemenin kök hücrelerin yapışmasını, çoğalmasını ve kemiğe farklılaşmasını artırdığı gözlemlenmiş. Lamininin IKVAV epitopu ile işlevsel hale getirilen peptid-amfifil nanolifler ise öncül sinir hücrelerinin kapsülasyonunda kullanılmış ve bu sayede öncül hücrelerin nöronlara (sinir hücrelerine) farklılaşması sağlanmış.

Kısa peptidlerin tasarım ve sentezinin kolay olması, bu yapıları biyolojik kendiliğinden-düzenleme çalışmaları için kusursuz bir model sistem haline getirmekte. Doku iskelelerinin eldesinde kullanılabilen bu peptidler kimyasal olarak sentezlenebilmekteler. Bunun yanı sıra homojen olmaları ve büyük ölçekte üretilibilmeleri de avantajları arasında yer almakta. Ayrıca peptid amfifil çözeltileri vücuda enjekte edilebilmekte; bu sayede canlı içerisinde jel oluşumu mümkün hale gelmektedir. Böylelikle ameliyata gerek duyulmadan

Doku İskelelerinin Hazırlanışı

Nanopeptid temelli doku iskelelerinin hazırlanışı son derece kolay. Zhang ve grubu hazırladıkları farklı yapılarıdaki peptidlerin bileşimini açıklamamakta ve bunları çeşitli kodlarla tanımlamaktalar. Örneğin RADA 16-I kodlu toz halindeki peptid içerikli malzeme, otoklavda sterillemiş ultra saf su içerisinde çözülüyor, 5 dakika sonikasyona tabi tutuluyor ve ardından süzül-

hasar gören dokunun yeniden yapılanması mümkün olmaktadır. Kendiliğinden-düzenlenme sonrası oluşan nanoiplikçikler, sentetik polimer iplikçiklerinden 1000 kat daha küçük olduklarından hücreleri sarmakta ve bu yönüyle ECM'ye benzer bir yapı göstermektedir. Kısa zincirli peptid amfifillerle hazırlanan doku iskelelerinin en önemli dezavantajı ise mekanik dayanımlarının yetersiz oluşu. Çözüm olarak, 200'ün üzerinde amino asitten oluşan daha uzun zincirli peptidler sentezlenmiş. Bu peptidlerden hazırlanan doku iskelelerinin

yor. Değişik miktarlarda toz malzeme kullanılarak 1, 2, 3 ve 4 ağırlık/hacim oranlarında çözeltiler hazırlanmaktadır. Bu çözeltiler de NHS-1, NHS-2 gibi çeşitli kodlarla tanımlanmıştır. Hazırlanma süresi malzemenin etkinliğini değiştirmiyor. Ayrıca, çözelti oda sıcaklığında 3 yıl saklandığında bile yeni hazırlanmış çözelti ile aynı etkinliğe sahip olduğu görülmüştür. İşlemin son basamağı, hazırlanan çözeltiyi hasarlı dokuya enjekte etmek. Enjeksiyonun ardından kendiliğinden-düzenlenme mekanizmasıyla nanolifli doku iskelesi oluşuyor.

90°C'nin üzerindeki sıcaklıklara bile dirençli olduğu görülmüştür.

Kanamayı Durduran Peptid Jeller

Peptid amfifil doku iskelelerinin merkezi sinir sistemi rejenerasyonunda (yenilenmesinde) kullanımını sırasında ilginç bir durumla karşılaşılmıştır. Hamsterlerin beyinlerindeki hasarlı bölgeye enjekte edilen ve orada doku iskelesi oluşturan malzemenin aynı zamanda kanamayı da durdurduğu

saptanmıştır. Mekanizması tam olarak anlaşılamayan bu yöntem sayesinde kanama 15 saniyeden kısa bir sürede durdurulabilmektedir. Normal hemostaz (hasara uğramış kan damarlarından kan akışının engellenmesi) mekanizmasında bu sürenin 1-2 dakika olduğu bilinir. Bu buluşla, çok hızlı biçimde geliştirilerek ameliyat sırasındaki kan ihtiyacı minimuma indirilebilir. Ameliyat süresinin yüzde 50'sinin kanamayı azaltmak ya da kontrol altına almak için yaranın sarılmasında harcadığı düşünülürse bu buluşun önemi çok daha iyi anlaşılır. Geliştirilen malzemenin teknolojiye de çığır açacağı ve gerek ameliyat, gerekse travmalardaki kanama kontrolünde devrim yaratacağı düşünülmektedir. Ancak, malzemenin güvenli olduğu ve iyi çalıştığına gösterilmesi için daha ayrıntılı klinik araştırmalara ihtiyaç duyuluyor. Araştırmacılar gelecek 3-5 yıl içinde, insanlar ile yapılacak çalışmaların sonuçlarını almayı ümit etmektedirler.

Kaynaklar:

1. X. Zhao, S. Zhang Fabrication of molecular materials using peptide construction motifs. Trends in Biotechnology 2004; 22 (9): 470-476.
2. M. Gümüşderelioğlu, Kanamayı Durduran Nanojel, Popüler Bilim, Şubat 2007; 156, 36-40.

KARBON NANOTÜPLER VE DOKU MÜHENDİSLİĞİ

Karbon, doğada kristalin olarak üç formda bulunuyor: Grafit, elmas ve buckminsterfullerene (adını, söz konusu formu keşfeden R. Buckminster Fuller'den alıyor). Bu üçüncüye "bucky topları" da deniyor. Bunlar, 60 karbon atomunun bir araya gelmesiyle oluşmuş, yüzeyi tıpkı bir futbol topu gibi beşgen ya da altıgenlerden oluşan doğal küreler. Nanotüpler işte bu "fullerene" ailesine aittir. Tüp şeklindeki moleküller ilk olarak 1991'de elektron mikroskobu uzmanı Sumia Lijima'nın ark-buharlaşması ile fulleren sentezi sırasında katta biriken malzemeyi araştırmasıyla bulunmuş. Temel olarak, bir karbon nanotüpü, tüpün içine girecek şekilde kıvrılmış karbon atomlarından oluşuyor ve nanometre çapa sahip olan silindirlere (boyu>100 nm) şeklinde. Tüpler iki değişik biçimde olabiliyor: Tek silindirden oluşan tek duvarlı nanotüp ve eş merkezli karbon silindirlere oluşan çok duvarlı nanotüpler.

Karbon nanotüpler 3 ayrı yöntemle sentezlenebilmekteler: ark-buharlaşma tekniği, lazer yöntemi ve kimyasal buhar çöktürmesi. Üçüncü teknik, karbon nanotüp üretiminde en yaygın olarak kullanılanı. Bu üretimde, hidrokarbon hammadde

bir metal katalizörün (genellikle nikel) varlığında yüksek sıcaklıkta (>700°C) ayrıştırılarak karbon nanotüpler üretiliyor. Tepkime koşullarına bağlı olarak çeşitli uzunluklarda (nanometreden milimetreye) ve çapta (1-100 nm) karbon nanotüpler üretmek mümkün. Ancak işlem sırasında metal katalizör kullanılması nanotüplerde zehirlilik özelliğine neden olmaktadır. Bundan dolayı karbon nanotüpler tıbbi uygulamalarda kullanılmadan önce saflaştırılmalıdır. Saflaştırma işlemi çeşitli şekillerde yapılabilir, ancak nitrik asit gibi oksitleyici bir asit içerisinde nanotüplerin yerleştirilmesiyle gerçekleştirilen işlem en çok tercih edileni.

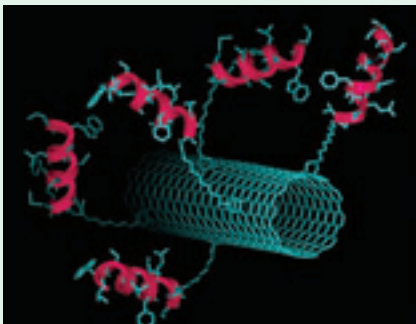
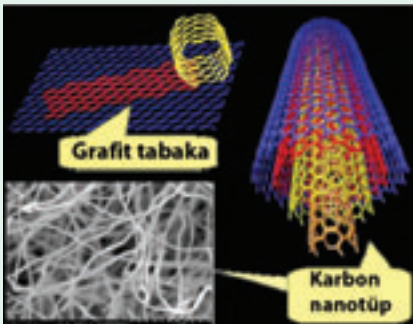
Nanotüpler çelikten daha sert ve plastik kadar esnekler. Tek duvarlı nanotüpler, polimerlerin yapısına katılarak otomobillerdeki plastik aksamı güçlendirmekte ve ayrıca normalde yalıtkan olan malzemeleri iletken hale getirmekte. Çok yakın bir gelecekte plastik şirketlerinden yarı iletken şirketlerine kadar ileri malzemelerle uğraşan tüm şirketlerin karbon nanotüpleri kullanacakları ileri sürülmektedir. Bilgisayar ve televizyon üreticileri ekran maliyetini düşürmek amacıyla karbon nanotüpleri kullanacaklar. Gelecek on yıl içerisinde iş-

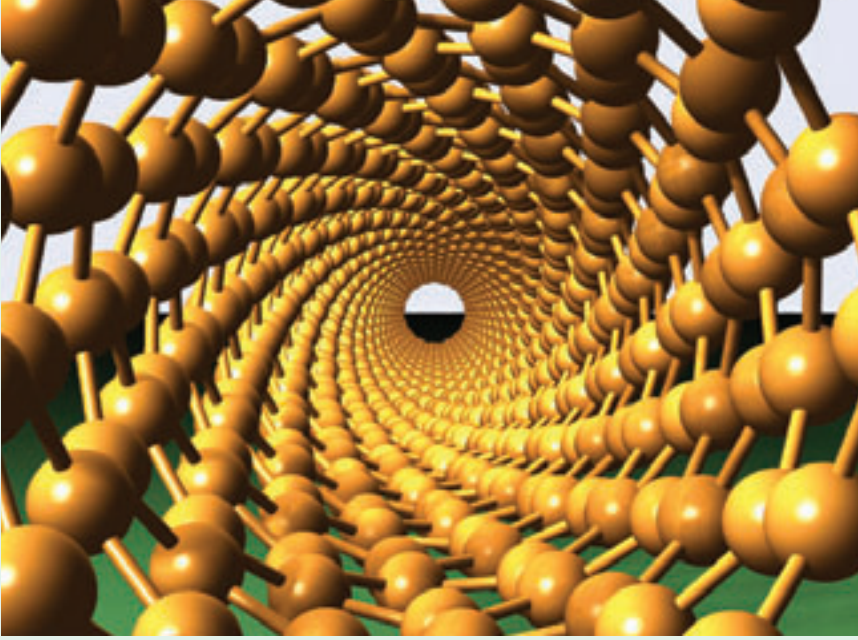
lemcileri ve bellekleri oluşturan transistörlerdeki silikonun yerini nanotüplerin alması bekleniyor.

Karbon nanotüplerin doku mühendisliği uygulamalarındaki kullanımı üç gruba ayrılabilir: hücresel davranışların algılanması, hücresel davranışların geliştirilmesi ve doku iskelelerinin güçlendirilmesi.

Hücresel davranışların algılanması: Hücrelerin işaretlenerek hücresel mikroçevre içerisinde görüntülenmesi ile yalnızca hücrelerin nasıl hareket edip yer değiştirdikleri anlaşılabilmektedir. Bu yaklaşım, başarılı bir doku oluşturmak için yeterli değildir. İyon taşınımı, enzim/kofaktör etkileşimleri, protein ve metabolitlerin salımı ve hücrelerin yapışması gibi davranışların algılanabilmesi, yeni ve gerçek dokuya yakın yapının oluşturulmasında kuşkusuz çok önemli konulardır. Nanoalgılayıcılar, hücrenin göstermiş olduğu bu davranışların algılanmasında kullanılan en önemli araçlardır. Minyatür ölçekli algılayıcı cihazlar üretmenin özellikle hücresel tepkilerin algılanması için şart olduğu ortadadır. Nanoölçekli ve hücreye yakın temasta bulunan bir algılayıcı, hücre yüzeyi ile algılayıcı arasında çok az mesafe olacağı için incelenmek istenen maddeyi çok daha hassas, dolaysız ve hızlı biçimde algılayacaktır. Elektriksel özellikleri, geniş yüzey alanı, DNA ve diğer proteinleri immobilize edebilme (hapsetme) gibi özellikleri, nanotüpleri ideal nanoalgılayıcılar haline getirmektedir. Karbon nanotüp esaslı nanoalgılayıcılar birçok biyolojik faktörün ölçülmesi için geliştirilmiştir.

Hücresel davranışların geliştirilmesi: Karbon nanotüplerin kullanıldığı ikinci alan, doku oluşumu için gerekli önemli bileşenlerin (büyüme faktörleri gibi) salımı veya üretiminin kontrolüne dayanıyor. Karbon nanotüpler, ilaç salım sistem-





lerinde ve gen aktarımında kullanılmaktalar.

Karbon nanotüplerin küresel nanoparçacıklara göre en büyük avantajı, işlevselleştirilmelerinin mümkün olması. Karbon nanotüplerin uç kısımları ve duvar kısımları farklı kimyasal reaktivitelere sahip. Örneğin, amin grubu içeren antikorlar gibi hedeflenmiş ajanlar nanotüplerin uç kısımlarına, ilaçlar ise biyobozunur bir bağlayıcı molekül ile duvar kısımlarına bağlanabilir. İlaç, nanotüplerle istenilen hedefe ulaştığında nanotüpten ayrılarak ortama salınır.

Karbon nanotüpler genetik malzemenin salınımı için de eşsiz malzemeler. Gen tedavisi, genetik malzemenin hücre içine taşınarak, istenilen proteinin hücreye ürettirilmesi esasına dayanır. Bu genetik tedavi yöntemi için çeşitli yaklaşımlar mevcut. DNA'nın hücre içerisine taşınması viral vektörlerle veya polimer ve organik katyonlar gi-

bi viral olmayan vektörlerle gerçekleştirilmekte. Fakat her iki yaklaşımda da dezavantajlar mevcut. Viral vektörlerle DNA'nın hücre içerisine taşınması çok yüksek oranda başarı sağlamasına rağmen bağışıklık sistemi tepkisi ve patojen (hasatlık yapıcı) olmasından dolayı tercih edilmemektedir. Viral olmayan vektörlerde ise DNA'nın hücre içine taşınmasındaki başarı çok düşük ve aynı zamanda hücre içi zehir etkisi görülmektedir. Karbon nanotüpler bu sistemlere kıyasla üstünlük taşıyorlar. DNA veya RNA'yı elektrostatik etkileşimlerle veya kovalent yolla nanotüplere bağlamak mümkün.

Doku iskelelerinin güçlendirilmesi: Doku iskelesi, doku mühendisliğinde kritik bir rol oynamakta. Doku iskelesi üretiminde çeşitli sentetik, doğal polimerler veya bunların oluşturduğu kompozitler kullanılmakta. Ancak, mevcut malzemelerin

disliğindeki başarılı uygulamalarını gösteren çok sayıda çalışma var. Kalp ve kan damarlarıyla ilgili hasarların gideriminde de doku mühendisliğinden çok şey bekleniyor. Biyobozunur doku iskeleleri kullanarak damar greftleri (yamaları) oluşturmak yaklaşımlardan biri. Greftin trombojenik etki göstermemesi (yani kan pıhtılaşmasına neden olmaması) için endotel hücrelerle kaplanması gerekiyor. Ancak, sentetik malzemeler kullanıldığında endotel hücrelerin yüksek hassasiyetinden dolayı kararlı bir endotel kaplama elde etmek hayli güç. Araştırmacılar elektroerilmiş poli (L-laktik asit-kaprolakton) nanolif iskelelerde endotel hücre ve düz kas hücrelerini 7 gün boyunca kültüre etmişler. Her iki hücre de matrise yapışıp yayılmış. Çapları yaklaşık 100 nm olan poli (kaprolakton) nanolif matrisler üzerinde kardiyomisitler 5-7 gün boyunca kültür edilmişler, oluşan tabakaların 5 tanesi üst üste yerleştirilmiş ve 14 gün süresince kültür edilmiş. Başlangıçta zayıf ve senkronizasyonu bozuk büzülüp-gevşemeler görülürken, ilerleyen zamanlarda kuvvetli ve senkronize atımlar gözlenmiş. Nanolifli doku iskelelerinin kemik, ligament ve kırık dokularının üretiminde de başarıyla kullanılabileceği düşünülmüştür.

Karbon nanotüplerin çeşitli polimerik yapıdaki doku iskelesine katılmasıyla elde edilen nanokompozit malzemelerin özellikle ortopedik uygulamalarda ve sinir doku rejenerasyonunda başarılı bir biçimde kullanılabileceğine yönelik bulgular elde edilmiş.

Nanoteknolojide kullanılan yüzey-fabrikas-

pek çoğu yeterli mekanik dayanıma ve reaktif gruplara sahip değildir. Bu açıdan bakıldığında karbon nanotüplerin doku iskelelerinin yetersizliklerinin aşılmasında etkin biçimde kullanılabilecekleri söylenebilir. Tek olumsuz yanları biyobozunur özelliğe sahip olmamaları. Ancak, temel bileşenleri karbon olduğundan hücrelere toksik etki göstermezler ve vücuttan atılabilme özelliğine sahiptirler.

Karbon nanotüplerin çok az miktarının polimer içinde dağıtılmasıyla mekanik olarak dayanıklı doku iskeleleri üretmek mümkün oluyor. Laboratuvar ortamında yürütülen çalışmalarda farklı tipteki hücrelerin karbon nanotüpler veya nanokompozit yapılar üzerinde rahatlıkla üreyebildikleri görülmüş. Örnek olarak, tek duvarlı karbon nanotüplerin katkısıyla hazırlanmış kollajen doku iskelelerinde düz kas hücrelerinin kolaylıkla üredikleri gözlenmiş. Karbon nanotüp içeren desenli yüzeyler üzerinde sinir hücrelerinin kendiliğinden organize olarak sıkı bir ağ yapı oluşturdukları belirlenmiş. Bu ağ yapının taramalı elektron mikroskop görüntüleri, sinir hücreleri ve glia hücrelerinin tercihli olarak karbon nanotüp kaplı bölgeler üzerinde düzenlenmiş geometride ürediklerini göstermiş. Fotoğraflar, sinir hücrelerinin karbon yüzeyler üzerine doğrudan yapıştığını göstermiş. Ayrıca, karbon nanotüpler üzerinde büyüyen sinir hücrelerinin elektrik iletkenliğinin de çok yüksek olduğu bildirilmiştir.

Kaynaklar:

1. B.S. Harrison, A. Atala, Carbon nanotube applications for tissue engineering, *Biomaterials*, 2007; 28, 344-353.
2. W. Wei, R.J. Narayan ve ark. Biological properties of carbon nanotubes, *J. Nanoscience and Nanotechnology*, 2007; 7, 1-14.

GÜNÜMÜZ ve GELECEK

Nanoteknolojinin doku mühendisliğindeki uygulamaları henüz başladı. Bunların pek çoğu halen düşünce aşamasında. Şu ana kadar yapılmış çalışmaların bazılarını kısaca göz atalım.

Doku mühendisliği için en uygun hücre kaynağını oluşturan kök hücrelerin nanolifli doku iskeleleriyle etkileşimi konusundaki çalışmalarda ilginç bulgular elde edilmiş. Kendiliğinden-düzenlenen nanolifli peptid amfilif doku iskelelerinin sinir öncül hücrelerini kapsülleyerek hücrelerin istenilen biçimde farklılaşmasını sağladığı gösterilmiş. Hücreler 22 gün boyunca canlı kalmışlar ve nöronlara (sinir hücrelerine) farklılaşmışlar. Bir diğer çalışmada elektroerime ile hazırlanan nanolif matrislerde insan mezenkimal kök hücreleri ile çalışılmış. Matris, hücrelerin yapışmasını ve değişik hücrelere farklılaşmasını desteklemiş. Matris, polikaprolakton temelli olup yaklaşık 700 nm çaplı liflerin gelişigüzel yerleştirilmesiyle hazırlanmış. Araştırmacılar bu matris üzerinde farklı birleşimlerdeki kültür ortamlarına yerleştirilen hücrelerin kırık dokuları, kemik ve yağ dokusu-na farklılaştıklarını göstermişler.

Merkezi sinir sisteminin işlevlerini yeniden harekete geçirme konusunda "sinir doku mühendisliği" en ümit verici yaklaşım olarak görülmektedir. Nanolifli doku iskelelerinin sinir doku mün-

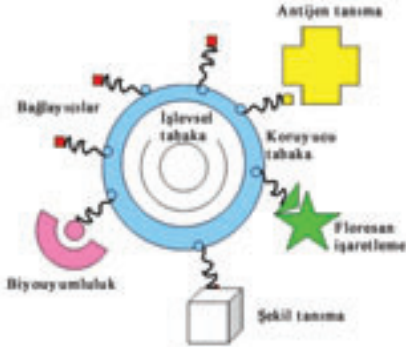
yon teknikleri (nanolitografik teknikler) ile nano yapılar, özgül kimyasal ve topografik desenleri olan yüzeylerin geliştirilmesi; hücresel işlevlerin doğal mikroçevrelerine çok benzer ortamlarda düzenlenmesine ve incelenmesine olanak sağlamış. Elde edilen bulgular vakit geçirilmeden doku mühendisliği uygulamalarına aktarılmıştır.

Biyonano yüzey teknolojisi ile sıcaklık-duyarlı kültür kapları hazırlanmış ve çeşitli hücreler tabakalar halinde üretilmiş. Bu tabakalar uygun düzende birleştirilerek mesane, kalp dokusu, diş çevre dokusu ve oküler yüzey geliştirilmesinde uygulanmış. Klinik düzeydeki çalışmalar halen devam ediyor.

Nanoparçacıklar, nanoteknolojinin ticari bütüt kazanmış ürünleri. Doku mühendisliğinde de hücre saflaştırılmasından büyüme faktörlerinin kontrollü salınımına, nanokompozitlerin ve nanomalayıcıların geliştirilmesine kadar pek çok uygulamada nanoparçacıkların kullanıldığını görüyoruz.

Milimetrenin milyonda biri ölçeğine inerek malzemelerin yapısının değiştirildiği nanoteknoloji ile gelecek 10 yıl içinde günlük hayatımızda gerçekleşecek değişimlerin en önemlileri hiç kuşkusuz doku mühendisliğindeki uygulamalarla olacak. Vücudumuzdaki hasarlı ya da kayıp organ ve dokuların onarımı ya da yeniden yapılanmasını hedefleyen doku mühendisliği, nanoteknolojik yaklaşımları ile yakın bir gelecekte insanlığın yaşam kalitesinin artırılmasına damgasını vuracağı benziyor.

DOKU MÜHENDİSLİĞİNDE NANOPARÇACIKLAR



Tıbbi ve biyolojik uygulamalarda kullanılan nanoparçacıklar.

Tıp ve elektronik alanında yaygın kullanıma sahip olan nanoparçacıklar, doku mühendisliğinde kullanılan nanoyapıların da başında geliyor. Boyutları 100 nm'den küçük olan bu yapılar kan dolaşımında çökelmeden hareket edebiliyor ve mikrovasküler yapılardan rahatlıkla geçebiliyor. Bu özelliklerinden dolayı, doku mühendisliği çalışmalarında, büyüme faktörlerinin taşınması ve salımında sıklıkla tercih ediliyor. Yine boyutlarından dolayı, hücre içine çok kolay alınabildiklerinden, hücrelerin işaretlenmesinde de nanoparçacıklar kullanılıyor. Yapılacak çalışmanın amacına göre, geniş yüzey alanına sahip bu yapıların çeşitli malzemelerle kaplanarak yüzey özelliklerinin değiştirilmesi ve seçilen antikör ya da peptid yapılarının yüzeye bağlanması söz konusu olabiliyor. Böylece nanoparçacıkların sadece hedeflenen hücre ve dokularla etkileşmesi sağlanıyor.

İnorganik malzeme veya polimerden oluşan bir merkezi kısma sahip olan nanoparçacıkların şekilleri çoğunlukla küresel, fakat silindirik veya diğer şekillerde de olabilirler. Miseller, lipozomlar, dendrimerler, polimerik kapsül ve küreler tipik örnekler. Nanoparçacıkların birçok karakteristik özelliğinden biri olan boyutu, biyolojik uygulamalar için tek başına yeterli olmamakta. Bu nedenle, nanoparçacıklar, optik, manyetik ve tanıyıcı özellikler kazanmak üzere modifiye edilmekte ve ayrıca biyoyoumlu hale getirilebilmekteler. Bu amaçla her iki ucunda reaktif gruplar bulunan bağlayıcı moleküller kullanılıyor. Uçların biri nanoparçacık yüzeyine bağlanırken, diğerleriyle amaca uygun moleküllerin (örneğin biyoyoumlu gruplar, antikörler, floroforlar vb.) yüzeye bağlanması gerçekleşiyor.

Nanoparçacıklarla Kemik Doku

Kemik dokunun yenilenmesi ile ilgili çalışmalar doku mühendisliği alanındaki araştırmaların büyük bir kısmını oluşturuyor. Bu çalışmalar temel olarak üç faktörün bir araya getirilmesi ile gerçekleştiriliyor: hücre dışı matrisi sentezleyen

parenkimal ya da progenitor hücreler, hücrelerin tutunması ve büyümesi için geçici bir zemin oluşturan doku iskeleleri ve kemik oluşumunu uyaran büyüme faktörleri. Ancak oluşturulan doku iskelelerinin yeterli mekanik dayanıma sahip olmaması ve osteojenik (kemik dokunun oluşumu) farklılaşmayı uyaran büyüme faktörlerinin yeterli miktarlarda sentezlenememesi bu çalışmaların başlıca eksikliklerini oluşturuyor. Bu noktada, eksikliklerin üstesinden gelmek için, nanoparçacık teknolojisi ile doku mühendisliği tekniklerinin birleştirilmesi gündeme geliyor.

Kemik İmplantlarında

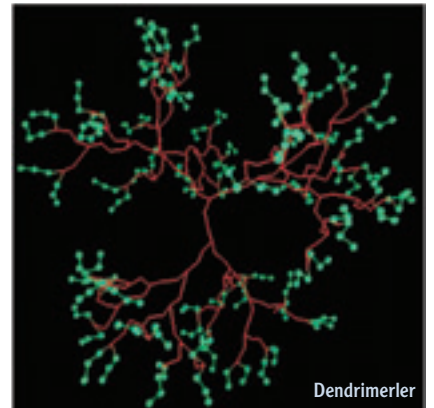
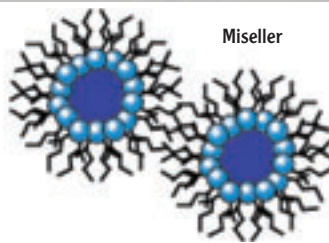
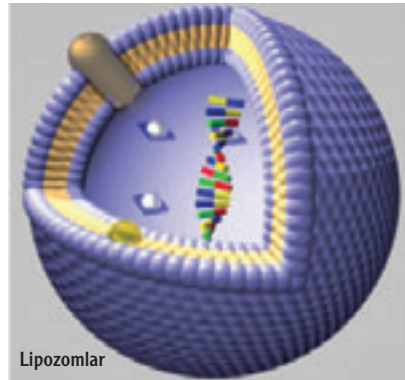
Kemik, kollajen içerikli organik matris içinde bulunan hidroksiapatit (HA) kristallerinden oluşan bir malzeme. Mekanik olarak sert ve aynı zamanda plastik, böylelikle mekanik müdahaleler karşısında kendini iyileştirebilmekte. Doğal kemik yüzeyinde yaklaşık 100 nm büyüklüğünde pürüzler bulunmakta. Kemik doku hasarlarında yaygın olarak kullanılan kemik implantların yüzeylerinde bu tür nano ayrıntıların yer alması çok önemli. İmplant yüzeyi pürüzsüz olursa, vücut implantı reddetmeye çalışacaktır. Çünkü pürüzsüz yüzey, olasılıkla implant yüzeyini kaplayan ipliksel doku üretimini tetikleyecek ve oluşan bu tabaka kemik-implant etkileşimini azaltarak implantın dayanımının azalmasına ve ileri aşamada enfeksiyona neden olabilecektir. Kalça ve diz protezlerinin yüzeyinde nano büyüklükte parçacıkların oluşturulmasıyla, vücudun implantları reddetme riskinin azaltıldığı ve ayrıca osteoblast (kemik büyümesini ve gelişimini sağlayan hücreler) üretiminin teşvik edildiği bilimsanlarınca kanıtlanmıştır.

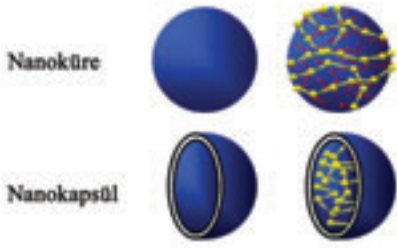
Titanyum, ortopedide ve dişçilikte yaygın biçimde kullanılan ve iyi bilinen bir kemik onarıcı malzeme. Yüksek kırılma dayanımına, işlenebilme özelliğine ve yüksek ağırlık/dayanım oranına sahip. Ne yazık ki, yeterli biyoaktiviteye sahip olmadığından hücre yapışmasını ve büyümesini destek-

lemiyor. Öte yandan apatit kaplamaların biyoaktif olduğu ve kemiğe bağlandığı biliniyor. Bu bilgi ışığında, titanyum üzerine apatit kaplama yapmak üzere birkaç teknik kullanılmış. Ancak bu kaplamalar kalın oluşları, homojen dağılmayı, zayıf yapışma ve düşük mekanik dayanım gibi dezavantajlar içermekteler. Başarılı bir yaklaşım, vücut-benzeri sıvı (synthetic body fluid, SBF) ile etkileştirilen titanyum yüzeyinde nano yapıli apatit filminin büyütülmesiyle gerçekleştirilmiş. 60 nm boyutlu kristallerden oluşan film kararlı bir nano yapı sergilemiş ve biyoaktivite göstermiş. Bu şekilde hazırlanan apatit kaplamalar yalnızca implant malzemelerin iyileştirilmesinde değil, kemik dokusunun oluşumunda kullanılan doku iskelelerinin geliştirilmesinde de etkinler.

Nanoparçacık/Polimer Kompozit Doku İskeleleri

Kemik doku mühendisliğinde sıklıkla tercih edilen biyobozunur polimer ya da seramik malzemeler osteokondaktif (kemik doku oluşumunu destekleyen) ve biyoyoumlu özelliklerinin yanında yeterli mekanik dayanıma sahip olmayabiliyorlar. Son yıllarda yapılan çalışmalarda bu malzemelerin mekanik dayanımının artırılmasında nanoparçacıklar kullanılıyor. Nanoparçacıkların tercih edilme nedenlerinin başında bu yapıların hücresel ve moleküler bileşenlerle aynı boyut aralığına sahip olması geliyor. Canlı organizmalar genellikle 10 mikron boyutundaki hücrelerden oluşmaktalar. Hücreyi oluşturan yapıların büyüklüğü ise mikron alt birimleri mertebesinde. Boyutları yalnızca 5 nm civarında olan proteinler, insan yapımı en küçük nanoparçacıklar ile karşılaştırılabilir. Aynı zamanda nanoparçacıkların kullanılması, kemik dokuda bulunan organik ve inorganik minerallerin de nanoyapıda olması nedeniyle, vücut içindeki ortamın daha iyi taklit edilmesine olanak veriyor. Uygun bir yüzey geometrisi ve mekanik dayanım



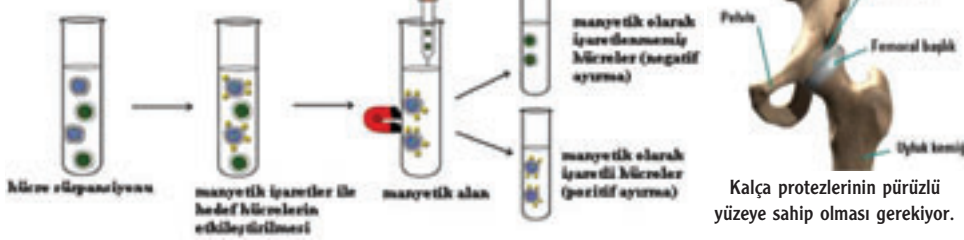


Nanoparçacıklar; nanoküre veya nanokapsül şeklinde olabiliyor.

sağlayan bu yapılar malzeme ile çevre doku arasındaki etkileşimi destekliyor.

Hidroksiapatit (HA) ve trikalsiyumfosfat gibi biyoseramiklerin kemik doku mühendisliğindeki kullanımı uzun yıllar önce gündeme gelmiş. Bu yapılar kemik dokuda bulunan doğal minerallerle kimyasal ve yapısal açıdan oldukça benzerlik gösteriyor. Bu nedenle biyoseramikler, osteoblastların çoğalmasını ve buna bağlı olarak osteojenik farklılaşmayı uyarıyor. Ancak bu malzemelerin kırılma olmaları, işlenmelerindeki zorluklar, yavaş bozunma hızları kullanımlarını sınırlandırıyor. Bu nedenle HA nanoparçacıkların, polimerler ile birleştirilmesi konusunda çalışılmaya başlanmış. Böylece HA'nın osteokondaktivitesi ile polimerin biyobozunur özelliği birleştirilmiş. Polimer doku iskelesinin içerisine katılan HA nanoparçacıkların, malzemenin yapısındaki gözeneklerin morfolojisini değiştirerek protein emilimini daha uygun hale getirdikleri belirlenmiş. Bu alanda gerçekleştirilen çalışmalarda, doğal kemik dokusunda bulunan HA boyunun (kemikteki HA parçacıkların eni 2-5 nm arasında, boyu ise yaklaşık 50 nm) taklit edilmesiyle elde edilen üç boyutlu doku iskelelerinin, yeterli mekanik dayanıma sahip olmasının yanında hücre yapışmasını ve göçünü de desteklediği tespit edilmiş.

Manyetik parçacıklarla hücre izolasyonu.



Kalça protezlerinin pürüzlü yüzeye sahip olması gerekiyor.

Manyetik Nanoparçacıklar

Manyetik yöntemler doku mühendisliği çalışmalarında bir süredir dolaylı olarak kullanılıyor. Doku mühendisliği çalışmalarının yürütülmesi için gerekli basamakların başında, istenilen hücrelerin yeterli miktarda ve saflıkta elde edilmesi geliyor. Bu aşamada manyetik ayırma işlemleri devreye giriyor. Manyetik ayırma geleneksel yöntemlerle karşılaştırıldığında oldukça basit, hızlı ve ucuz bir yöntem. Ayrıca bu yöntemle hücreler, herhangi bir değişikliğe uğramadan ve yüksek canlılık oranında elde edilebiliyor. Hücrelerin manyetik olarak işaretlenmesinde genellikle manyetit (Fe3O4) ya da maghemit (Fe2O3) demiroksit parçacıkları kullanılıyor. Bu manyetik nanoparçacıkların yüzeyi işlevsel hale getirilmek üzere polimerik yapılar ile kaplanıyor. Aynı zamanda yapıla-

rın hücreler üzerindeki toksik etkisi de engellenmiş oluyor. Daha sonra manyetik parçacık yüzeyine hedef hücreye özgü antikorlar bağlanıyor ve manyetik işaretler hücre süspansiyonu ile etkileştiriliyor. Bu etkileşim sonucu hedef hücreler, manyetik işaretler üzerindeki özgül antikorlara bağlanıyor. Manyetik alan yardımı ile manyetik olarak işaretlenmiş hedef hücreler hücre süspansiyonundan ayrılıyor. Son olarak manyetik işaretler uzaklaştırıldıktan (enzimatik ya da mekanik işlemlerle) sonra hücreler istenilen çalışmalarda kullanılıyor.

Manyetik nanoparçacıkların çeşitli doku mühendisliği çalışmalarında doğrudan kullanılması ise son zamanlarda gündeme gelen bir konu. Yeni doku mühendisliği uygulamalarında hücrelerin nanoparçacıklar ile işaretlenmesi ve daha sonra da manyetik bir alan kullanılarak istenilen şekilde yönlendirilmeleri için çalışılıyor. Bu amaçla gerçekleştirilen çalışmaların birinde epidermisin ana hücresi olan

malarında büyüme faktörlerinin kullanımı zorunlu hale geliyor. Ancak bu faktörlerin implante edilecek doku iskelesinin yüzeyine doğrudan enjekte edilmesi durumunda, kararsız kimyasal yapıları, yarı ömürlerinin kısa olması ve doku içerisine yeterince alınamamalarından dolayı, etkin sonuçlar elde edilemiyor. Bu nedenle büyüme faktörlerinin taşıyıcılara yerleştirilerek, kontrolü ve uzun süreli salımı gündeme geldi. Bu amaçla; biyoyoumlu, biyobozunur, sentetik veya doğal polimerlerden (kollajen, kitosan, aljinat) ya da inorganik malzemelerden (HA, trikalsiyumfosfat) elde edilen taşıyıcılar kullanılıyor. Ayrıca, büyüme faktörlerini kodlayan gen bölgelerini taşıyan nanoparçacıklar da taşıyıcı sistemler arasında yer alıyor.

Nanoparçacıklarla Gen Taşınımı

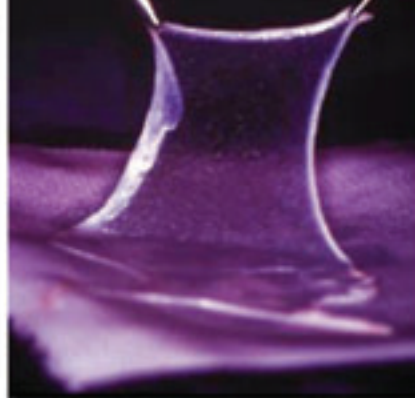
Taşıyıcı sistemlerde DNA'yı taşıyan vektörlerin boyu kritik öneme sahip. Hedef hücre ve dokuya kolayca tutunacak, aynı zamanda da endozom-lizozom sürecinden kurtularak DNA'nın parçalanmasını engelleyecek boyutta olmaları nanoparçacıkları uygun taşıyıcılar haline getiriyor. Viral vektörlerle karşılaştırıldığında bağışıklık cevabı oluşturmamaları, enfeksiyon riski taşımamaları ve bo-yutlarına göre farklı konsantrasyonlarda DNA moleküllerinin yüklenmesine olanak vermeleri, bu yapıların diğer avantajları arasında sayılıyor.

Büyüme faktörlerinin yanında kemik dokunun yeniden yapılanması için gerekli bir diğer önemli parametre de kan damarlarının oluşumudur. Bu alanda yapılan bir çalışmada VEGF sentezinden sorumlu gen bölgesini taşıyan plazmid DNA, polimerik nanoparçacık taşıyıcılara yüklenmiş. Biyobozunur özellikteki nanoparçacıkların kalp kası hücrelerine başarıyla tutundukları ve hücre çekirdeğine ulaştıkları görülmüş. Ayrıca, artan kılcal damarlarla, anjiyogenezin (yeni kan damarlarının oluşumu) uyarıldığı belirlenmiş.

Kaynaklar:

- 1.O.V. Salata, Applications of nanoparticles in biology and medicine, <http://www.jnanobiotechnology.com/content/2/1/3>.
- 2.K. Kim, J. P. Fisher, Nanoparticle technology in bone tissue engineering, Journal of Drug Targeting, 2007, 15(4), 241-252.

BİYONANO YÜZEY TEKNOLOJİSİ İLE DOKU TABAKALARININ ÜRETİMİ



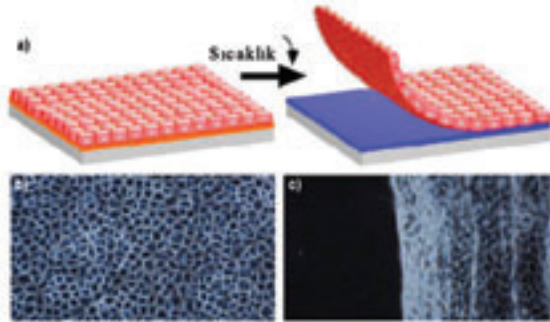
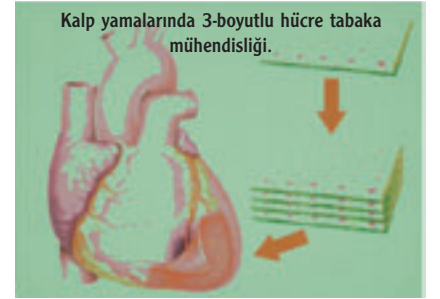
Sıcaklık-duyarlı polimerle kaplı kültür kabında üretilmiş hücre tabakası (solda) ve yüzeyden kaldırıldığında görüntüsü (sağda).

Doku iskelesi kullanarak doku ve/veya organ oluşumu, “birinci nesil doku mühendisliği” olarak tanımlanıyor. Bu yaklaşımda dokuyu oluşturan sağlıklı hücreler, gerçek doku mikroçevresini taklit eden üç-boyutlu bir iskele üzerine yerleştiriliyor. Doku iskelesi, yoğunlukla bozulan yapıda bir polimerden üretiliyor ve doku hasarına uygun biçimde, bilgisayar teknolojilerine uygun tekniklerle şekillendiriliyor. Ayrıca, hücre üremesini ve işlevlerini gerçekleştirmek üzere çeşitli yapışma ve büyüme faktörleriyle zenginleştiriliyor. Doku iskelesi-hücreler-büyüme faktörlerinden oluşan bu malzeme, canlı vücudunda doku oluşumunun istenildiği bölgeye yerleştiriliyor. Hücreler iskele üzerinde ürerken, iskele de parçalanıp yok oluyor. Bu işlem haftalarca veya aylarca sürebiliyor. İskelelerin parçalanması ile oluşan boşlukta çoğalan hücreler ve hücre dışı matris (ECM) ile doluyor. Ancak, dokuda ECM birikimi sıklıkla fibröz (ipliksi) doku oluşumuna neden oluyor; ki bu da patolojik bir durum. Ayrıca doku iskelelerinin çeşitli özellikleri bazı dokular için sakıncalı olabiliyor. Örneğin oftalmolojik (gözle ilgili) uygulamalar için doku iskelelerinin opak oluşu, kalp dokusunun yapılandırılmasında ise iskelelerin esnek olmayışı gibi. İşte tüm bu olası dezavantajlar “ikinci nesil doku mühendisliği” yaklaşımını gündeme getirmiş. İlk olarak, Tokyo Kadınlar Tıp Üniversitesi’nden Oka-

no ve grubu tarafından 2004 yılında öne sürülen bu yaklaşım; doku oluşumunu tek hücreler yerine hücre tabakalarından oluşturma fikrine dayanıyor ve “hücre tabaka mühendisliği” (cell sheet engineering) olarak adlandırılıyor. Fikrin esası, temel biyoloji bilgisi: “Vücudumuzdaki her organ üç farklı hücre tabakasından oluşmuştur: endoderm, mezoderm ve ektoderm. Organ oluşumu bu 3 tabakanın etkileşimiyle gerçekleşir.” Hücre tabaka mühendisliği’nde bu bilgi nasıl uygulanıyor? İnceleyelim.

Hücre kültürlerinde hücreler kültür kabının yüzeyine yapışır, yayılır ve ürerler. Yüzeyi tam olarak kapladıklarında artık o yüzey üzerinde daha fazla üreyemeyecekleri için yüzeyden kaldırılmaları gerekir. Yüzeyden kaldırma işlemi, tripsin ve dispaz gibi protein zincirlerini kıran (proteolitik) enzimlerin kullanımıyla gerekli kılar. Bu enzimler, hücre yapışma moleküllerini ve hücreler arasındaki matrisi (ECM) hücrelerden ayırırlar. Böylelikle işlem sonrasında tek tek hücreler elde edilir. Acaba hücreleri tabaka halinde yüzeyden kaldırabilmek mümkün olabilir mi? Bu soruya yanıt arayan araştırmacılar, “sıcaklık-duyarlı polimerleri” kullanmışlar. Sıcaklık-duyarlı polimerler içinde en çok kullanılan poli (N-izopropil akrilamid)’i seçmişler. Bu polimer, en düşük kritik çözünme sıcaklığı (LCST) olan 32°C’nin üzerindeki sıcaklık-

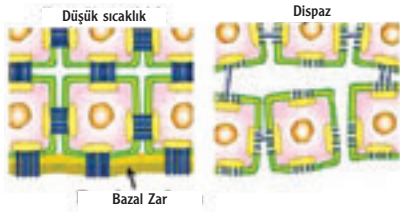
larda yapısındaki suyu kaybederek büzülür. 32°C’nin altındaki sıcaklıklarda ise yapısına tekrar su alarak şişer. İşte bu noktadan sonra uygulamaya geçebilmek için “nanoteknoloji” devreye giriyor. “Biyonano yüzey teknolojisi” kullanılarak, organik malzemelerin yüzeyine elektron bombardımanı ile herhangi bir polimeri kaplamak mümkün. Bu teknoloji ile polimer, nanometre (nm) kalınlığında ve pürüzsüz bir şekilde plastik malzemeler üzerine kaplanabilmekte. Okano ve grubu, biyonano yüzey teknolojisini kullanarak, polistiren doku kaplarının yüzeyine poli (N-izopropil akrilamid)’i kaplamışlar. Uygulamadaki kritik nokta kaplamanın kalınlığı. 20-30 nm kalınlıktaki polimer tabakası, kültür ortamının sıcaklığının değiştirilmesiyle hücrelerin kap yüzeyine yapışmasına ve yüzeyden kopmasına izin vermektedir. 37°C’de yani pek çok hücrenin üreyebildiği sıcaklıkta kültür kabının yüzeyi hidrofobiktir, yani su moleküllerini iter. Bu sıcaklıkta hücreler yüzeye yapışır, yayılır ve çoğalırlar. Hücre üremesi tamamlandığında, yani kap yüzeyinin tamamı hücrelerle kaplandığında sıcaklık 32°C’nin altına düşürülür ve yüzey hidrofilik (suyu seven) hale gelir. Böylelikle, şişen yüzey üzerinden herhangi bir enzime gerek duyulmadan hücreler kalkar. Hücre-hücre bağlantıları ve hücreler arasında birikmiş matris (ECM) bozunmadığından, hücreler tabaka halinde elde edilir. Canlı olan bu hücre tabakası diğer bir kültür kabına veya vücut içindeki doku yüzeyine aktarılabilir. Ayrıca, hücre tabakaları, birbiri üzerine yerleştirilerek 3-boyutlu yapılar da elde edilebilir. Bu yöntem, farklı hücre tabakalarını birleştirerek yeni bir organ oluşturmaya izin



Sıcaklık düşürülerek hücreler tabaka halinde kültür kabının yüzeyinden kaldırılıyor (a); Endotel hücre tabakasına ait optik fotoğraf (b); Endotel tabakanın yüzeyden kaldırılması (c).

Poli(izopropil akrilamid) (PIPAAm) kaplı doku kültür kabında sıçandan elde edilen hücrelerle kalp kası hücreleri tabakaları oluşturuluyor. Üst üste konulan tabakalar damar oluşumunu destekleyecek büyüme faktörleri ya da bu faktörü salacak ilgili gen veya hücre varlığında biyoreaktöre yerleştiriliyor. Yeterli mekanik etkiye maruz kalmış doku, kalp üzerine yama yapılıyor.

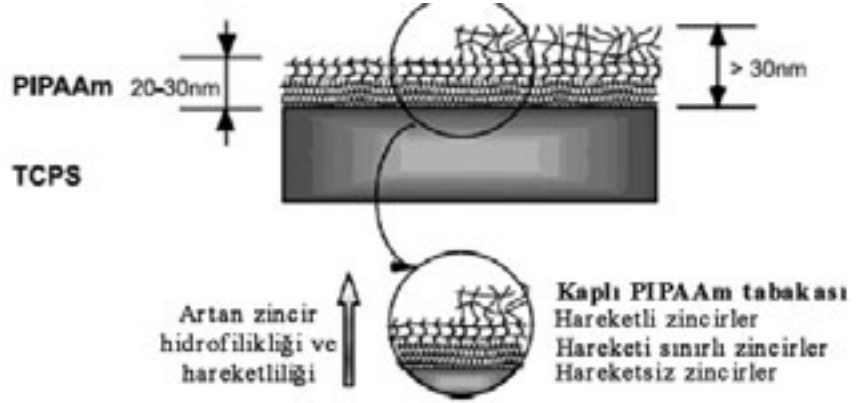




Sıcaklık düşürüldüğünde hücreler arasındaki bağlantılar tamamen korunurken, dispaz enzimi ile hücreler yüzeyden kaldırıldığında hücreler arası bağlantılar kopuyor.

veren şu andaki tek yöntemdir.

Yukarıda kaplama kalınlığının yöntemin başarısı için kritik nokta olduğunu söylemiştik. Bu durum, yüzeydeki polimer yoğunluğuna bağlı olarak polimer zincirlerinin hidrofilikliğinin ve hareketliliğinin değişmesinden kaynaklanıyor. Artan kalınlıkta zincir hidrofilitesi ve hareketliliği artmakta. Zincir hareketinin minimum olduğu 20 nm'nin altındaki kalınlıklarda hücreler yüzeye yapışıp üreyebiliyor ancak sıcaklığın düşürülmesiyle yüzeyden kaldırılamıyorlar. Tabaka kalınlığı 30 nm'den fazla olduğunda ise artan zincir hareketliliği nedeniyle hücreler yüzeye yapışmıyorlar. Sonuç olarak her iki durumda da hücre tabakası üretmek mümkün olmuyor.



Doku kültür kabı (TCPS) yüzeyindeki ideal kaplama (PIPAAm) kalınlığı 20-30 nm olmalı.

Hücre tabakalarıyla doku/organ oluşumu pek çok avantaja sahip. Örneğin, klinikteki ilk uygulama olan, sıcaklık-duyarlı kültür kaplarında hazırlanan insan epidermal hücre tabakaları yaralara çok iyi yapışmış. Böylelikle hastaya nakledilen dokuların ameliyat ıplıkları ile tutturulmasına gerek kalmıyor. Birden fazla ve değişik özellikteki hücre tabakaları üst üste dizilerek 3-boyutlu dokular hazırlanabiliyor. Göz hastalıklarının tedavisinde, dişle ilgili hastalıklarda, kalp yamalarında ve me-

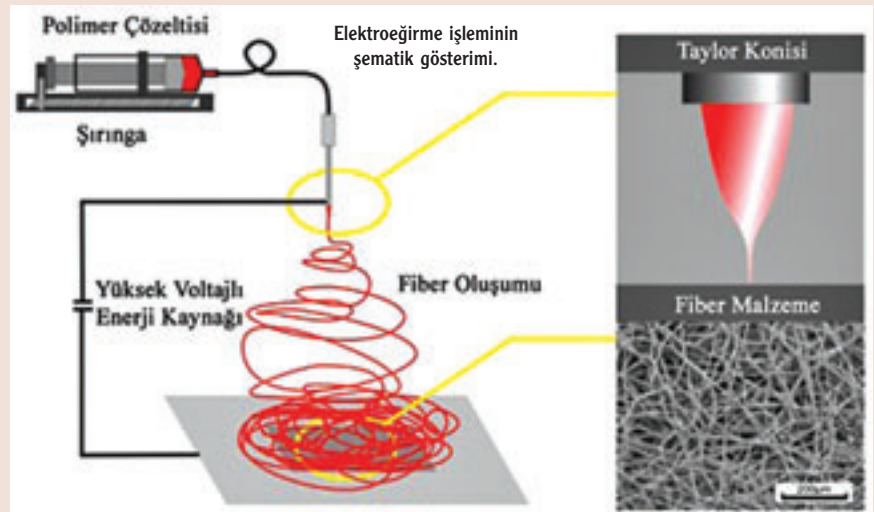
sane oluşturulmasında hücre tabakalarıyla başarılı sonuçlar alınmış.

Kaynaklar:

- 1.A. Kikuchi, T. Okano, Nanostructured designs of biomedical materials: applications of cell sheet engineering to functional regenerative tissues and organs, J. Controlled Release, 101, 2005.
- 2.M. Gümüşderelioglu, T. T. Demirtaş, Hücre tabakaları ile doku üretimi, Bilim ve Teknik Dergisi, 62-64, 2005.
- 3.A. Karakeçili, C. Satriano, M. Gümüşderelioglu, G. Marletta, Thermoresponsive and bioactive poly (vinyl ether)-based hydrogels photochemically immobilized by RGD, Radiation Physics and Chemistry, 2007.

ELEKTROEĞİRME VE NANOLİFLER

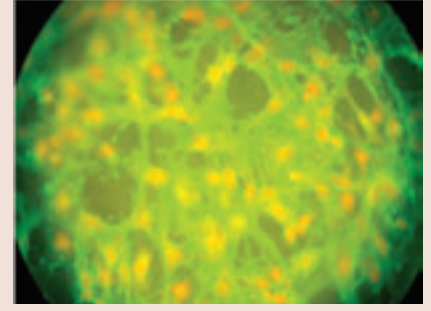
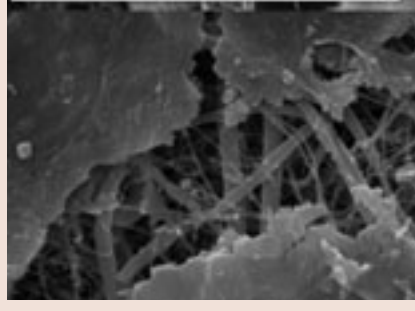
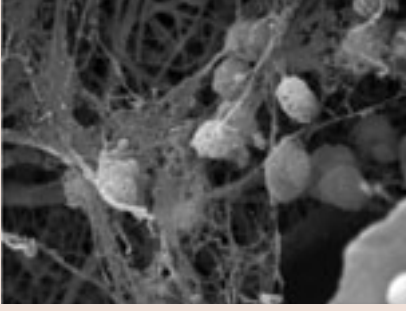
Elektroeğirme (electrospinning), doku mühendisliğine uygun nanoyapılı iskelelerin üretimi için umut veren, kolay uygulanabilir ve ekonomik bir yöntem olarak karşımıza çıkıyor. Elektroeğirme işleminde, bir şırıngaya takılı iğnenin ucunda asılı durmakta olan polimer çözelti damlacığına elektrik alanı uygulanır. İğne ucuna beslenen polimer çözeltisinin akış hızı bir pompa yardımıyla kontrol edilir ya da yerçekimiyle damlacık oluşmasına izin verilir. Elektrot ya polimer çözeltisine batırılır ya da iğnenin ucuna bağlanır. Damlacığa elektrik potansiyel uygulandığında, damlacık birkaç karşıt kuvvetin etkisi altında kalır. Bir grup kuvvet (yüzey gerilimi ve viskoelastik kuvvetler) damlacığın yarıkürsel şeklini korumaya çalışırken, uygulanan elektrik alanından kaynaklanan diğer bir grup kuvvet, damlacığı 'Taylor Konisi' olarak adlandırılan konik şekle girmeye zorlar. Sınır gerilim değeri aşıldığında, damlacıktaki elektrik kuvvetler baskın hale gelir ve Taylor konisinin ucundan dar ve yüklü bir polimer jeti fışkırır. Bu noktada jetin şeklini koruyabilmesi polimer çözeltisinin akmaazlığıyla (viskozite) bağlantılıdır. Eğer çözeltinin akmaazlığı düşürülürse, jet 'elektropüskürtme' süreciyle zerrelere ayrılır. Daha yüksek akmaazlık değerlerine sahip polimer çözeltiğinde ise fışkıran jet topraklanmış toplaca doğru düz bir hatta bir süre hareket eder. Fakat hareketi boyunca jet içindeki ters yüklerden kaynaklanan itici kuvvetin etkisiyle 'kararsızlık noktasına' erişir. Bu noktadan sonra kararsız jet, üç boyutta bükülen, dola-



nan, sarmalanan ve halkalanan bir hatta ileri geri kıvrılır. Bu süreç sırasında, polimer jetinin sürekli gerilerek esnemesine bağlı olarak liflerde önemli bir inceltme meydana gelir.

Elektroeğirme yönteminin temel esaslarının araştırıldığı kapsamlı çalışmalarla, bu yöntemle üretilmiş liflerin biçimini ve çaplarını kontrol eden değişkenler ve çeşitli polimerlerden lif üretim koşulları belirlenmiştir. Bu çalışmalar, elektroeğirme yönteminin esnekliğini çok net olarak göstermiştir. Farklı fiziksel, kimyasal ve mekanik

özelliklere sahip polimerlerden üretilen nanolif doku iskeleleri bu özellikleri sayesinde farklı dayanımlara, farklı yüzey kimyalarına, çözünme örüntülerine ve fiziksel özelliklere sahip olabilmekteler. Elektroeğirme süreci aynı zamanda iki ve üç farklı polimerin birlikte eğrilmesine de olanak tanıyarak, oluşan iskelelerin özelliklerini kontrol etmenin yollarını arttırır. Elektroeğirme yönteminin bir diğer avantajı da polimerik nanoliflerin içlerine çözünmeyen ilaç veya biyoaktif moleküllerin yerleştirilebilmesidir.



MC3T3 hücrelerinin (osteoblast) apatit-kaplı PCL nanolif yapıda üremesi (a) ve matris oluşumunu gösteren taramalı elektron mikroskop (SEM) fotoğrafları (b); Floresan-boyanmış hücrelerin nanoliflerde dağılımı. Kırmızılar hücre çekirdeğini, yeşiller ise aktin filamentleri gösteriyor.

Elektroeğirme Sürecini Etkileyen Değişkenler

Elektroeğirme sürecini etkileyen değişkenlerin belirlenmesi için kapsamlı çalışmalar gerçekleştirilmektedir. Sistem değişkenleri; polimerin doğası (kimya ve yapı), molekül ağırlığı ve molekül ağırlığı dağılımından oluşurken, çözelti özellikleri; polimer çözeltisinin akmaçlık, elastikiyet, iletkenlik ve yüzey gerilimi özellikleriyle belirlenir. Uygulanan gerilim, polimer çözeltisinin akış hızı ve polimer derişimi, kapiler uç ve toplaç arası uzaklık, ortam değişkenleri (çözelti sıcaklığı, eğirme hücresi içindeki nem oranı ve hava akış hızı) ve toplaç hareketleri ise “süreç değişkenleri” başlığı altında toplanabilir.

Düşük molekül ağırlığındaki polimerin eğilmesiyle liften çok boncuk şeklinde yapılar oluşmuştur. Düşük polimer derişimlerinde boncuklu nanolifler gözlenirken, derişimin artırılması boncuk oluşum olasılığını önemli miktarda azaltmıştır. Derişimdeki artış elde edilen liflerin çaplarını da artırmaktadır. Elektroeğirme sırasında uygulanan gerilimin de lif biçim ve çapına çok büyük bir etkisi olduğu gözlenmiştir. Belli bir gerilim değeri kadar eğrilen liflerin çapları azalıyor olmakla beraber, eşik değerin geçilmesiyle lif çaplarında bir artış eğilimi gözlenmektedir. Eğirme geriliminin aynı zamanda boncuk oluşumuyla da

bağlantısı vardır. Araştırmacılar artan gerilimle lifler boyunca boncuk oluşumunun artabildiğini göstermiştir.

Polimer derişiminin ve uygulanan gerilimin değiştirilmesinin yanı sıra, elektroeğirme çözeltisine yapılan çeşitli ilavelerle de polimer nanoliflerin çapları ve biçimleri değiştirilebilmektedir. Polimer çözeltisine yapılacak olan iyonik tuz ilaveleri boncuk oluşumunu önemli ölçüde azaltırken, daha ince çapta liflerin oluşumuna da olanak vermektedir.

Nanoliflerden Doku İskelelerinin Hazırlanması

Elektroeğirmeyle hazırlanan nanoliflerin hareketsiz bir toplaçla gelişigüzel bir düzende yerleştirilmesi sonucu “dokunmamış matrisler” (nonwoven matrices) üretilmektedir. Liflerin belli bir yöneline göre düzene getirilebilmesiyle lifli yapı özelliklerinde belirgin iyileştirmelerin sağlanabileceği açıktır. Böylesi bir dizilime izin verecek olan bir üretim tekniği, özel bir mimariye sahip doku iskelelerinin gerekli olduğu doku mühendisliği uygulamalarında ayrıca önem taşımaktadır. Ancak, elektroeğirme yöntemiyle oluşturulan liflerin hizalanması, elektroeğirme sürecinde oluşan jetin düz bir hat yerine, 3-boyutlu ve son derece karmaşık bir bükülme hattı izlemesinden

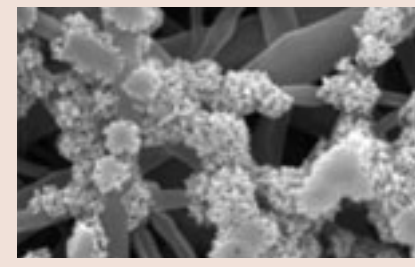
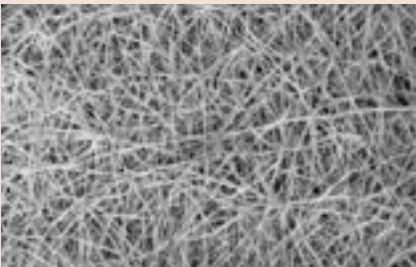
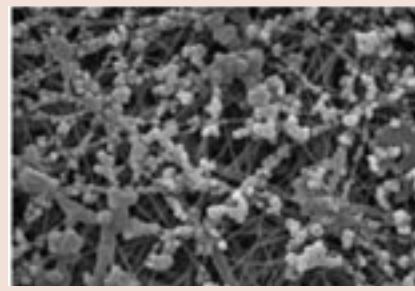
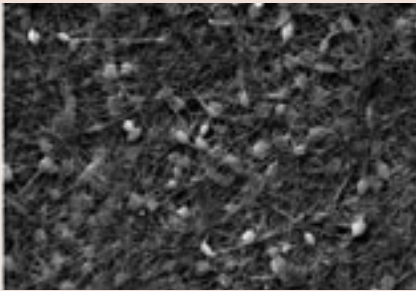
dolayı oldukça zordur. Elektroeğirmeyle üretilen lifleri hizalama konusunda birçok girişim olmuştur. İlk denemeler hızla dönmekte olan bir silindire toplaç kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bir başka denemede ise normal olarak uygulanan gerilimden kaynaklı elektrik alanına yardımcı bir elektrik alanı oluşturularak, hizalamada önemli bir iyileştirme sağlanmıştır. Bir başka başarılı yaklaşımda ise toplaç olarak, keskin kenarlı ince bir tekerlek kullanılmıştır.

Elektroeğirme süreci ‘iyi huylu’ bir üretim yöntemidir. Bu özelliği sayesinde biyomedikal uygulamalara yönelik yapıların geliştirilmesinde cazip bir yöntem haline gelmiştir. Çalışmalar elektroeğirme süreci sırasında liflerin içerisine yerleştirilmiş biyomoleküllerin biyolojik etkinliklerinin korunmasında elektroeğirilmiş liflerin önemli bir rolü olduğunu göstermiştir. Çeşitli enzimlerin biyolojik aktivitelerini nanolif yapısı içinde korudukları görülmüştür.

Dokunmamış nanolif matrislerin mekanik özellikleri incelenmiştir. Örneğin, PLGA (polilaktid-ko-glikolid) nanoliflerinin çekme dayanımlarının doğal derininkine yakın olduğu bulunmuştur. Olasılıkla lif yoğunluğundaki artıştan dolayı, aynı malzemeden yapılmış olan nanolif matrisler mikrolif matrislere göre daha iyi mekanik özellikler gösterebilmektedir. Hizalanmış nanolif matrislerde ise özelliklerin ölçme yönüne bağlı olarak, farklı yönlerde farklı değerlerin ölçüldüğü görülmüştür. Hizalanmış poliüretan lifli matrislerin en yüksek dayanım kuvvetinin (3520 ± 30 kPa), gelişigüzel eğrilmiş lif matrislerinkinden (1130 ± 21 kPa) önemli ölçüde yüksek olduğu belirlenmiştir.

Elektroeğirme yöntemi ile 15 nm’den 10 μ m’ye kadar değişen çaplarda lifler hazırlanabiliyor. Aslında 70 yıllık geçmişi olan bir teknik. Ancak tıbbi uygulamalarda ilk kez 1978 yılında kullanılmış. 1990’dan beri elektroeğirme ile yüzlerce değişik bileşimde doğal ve sentetik polimerden ince lifler hazırlanmış. Bu liflerden de genellikle dokunmamış örgü biçiminde doku iskeleleri üretiliyor. Hazırlama işlemi sırasında kullanılan çözücünün hücrelere etkisi henüz netlik kazanmış olmamakla birlikte tamamlanmış çalışmalar, elektroeğirme ile üretilen doku iskelelerinin avantajlarını sergiliyor.

Kaynaklar:
1.C.C.S.R. Kumar (ed) Tissue, Cell and Organ Engineering, Wiley-VCH, 2006.
2.B.Maviş, T. T. Demirtaş, M. Gümüşderelioğlu, G. Gündüz and Ü. Çolak, Bonelike apatitic calcium phosphate sandwiched between electrosprayed polycaprolactone nanofiber mats: synthesis, characterization and osteoblastic activity. ECERS 10, Temmuz 2007.



Elektroeğirme işlemiyle hazırladığımız polikaprolakton (PCL) nanolifler. PCL derişimi %8 olduğunda boncuklu oluşumlar gözleniyor. Derişim %12 olduğunda düzgün şekilli nanolifler oluşuyor (kaynak no.2).

Sentetik vücut sıvısı (SBF) ile etkileştirilen PCL nanoliflerde apatit-benzeri yapılar oluşuyor. Hazırladığımız bu kompozit doku iskelelerini kemik doku mühendisliği uygulamaları için kullanmaktayız (kaynak no.2).

NANOLİTOGRAFIK TEKNİK

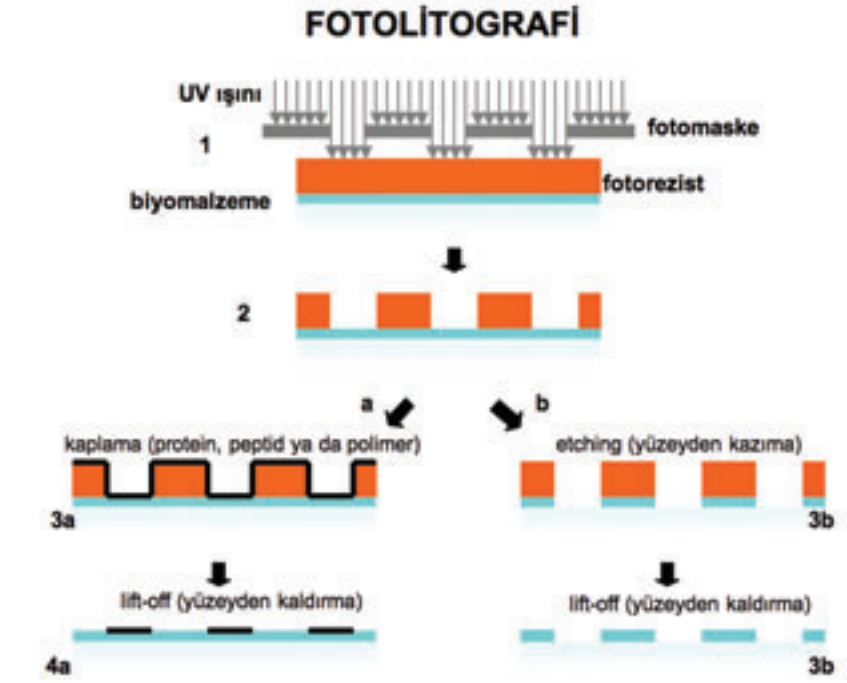
Doku mühendisliği yaklaşımı ile tasarlanan biyomalzemelerde, hücre-malzeme etkileşimlerinin tam olarak anlaşılması son derece önemli bir basamak. Hücrelere yapısal destek sağlayan doku iskelelerinde hücrenin pozisyonunun ve işlevlerinin yalnızca kimyasal olarak değil, fiziksel olarak da kontrol edilebilmesi, doğal mikro-çevrenin in-vitro koşullarda uygulanması açısından kritik bir gereklilik. Hücreler, doğal ortamlarında, besin maddeleri ve iyonlar gibi birçok farklı molekülle, yüzey üzerindeki proteinlerle ve diğer hücrelerle etkileşim halindedir. Geleneksel hücre kültüründe tüm bu faktörler homojen olarak biyomalzeme yüzeyine dağılmış durumda. Fakat in-vivo ortamdaki gerçek koşullar bu şekilde değil. Mikroelektronik teknolojisinden faydalanarak geliştirilen yüzey-desenleme teknikleri (mikrolitografik teknikler), hücresel işlevleri etkileyen biyosinyal moleküllerinin (yapışma ve büyüme faktörleri) kontrollü bir geometride biyomalzeme yüzeyine yerleştirilmesine ve in-vivo ortama benzer şekilde biyometik olarak tasarlanabilmesine olanak sağlamakta. Böylelikle hücre şeklinin ve yayılmasının kontrolü, üreme, farklılaşma ve hücre göçü gibi hücresel işlevler yönetilebilmekte. Topografinin mikro ya da nano ölçeğe oluşu da önemli. Bu nedenlerle doku üretiminde kullanılacak yüzeylerin biyolojik işlevli desenlerin yanı sıra nanotopografik desenlere sahip olacak şekilde tasarlanmasında nanolitografik teknikler gündeme geliyor.

“Litografi”nin sözlük anlamı “taş bas-kı”. Kireç taşı üzerine yağlı mürekkeple çizilmiş şekil ve yazıların basım sanatı litografi olarak adlandırılıyor ve kullanımı tarihin eski çağlarına kadar uzanıyor. Bu sanatın teknolojikteki ilk uygulaması “fotolitografi” tekniği.

Fotolitografi

Fotolitografi tekniğinde, bir maske üzerinde bulunan geometrik şekiller ultraviyole (UV) ışık kullanılarak malzeme yüzeyine aktarılır. Kullanılan maskeler deseni oluşturan bölgelerde UV ışını geçirmeyen ince krom tabakayla kaplı kuartz plakalardır.

Fotolitografi tekniği ilk olarak yarı iletken özelliğe ve düz yüzeye sahip silikon malzemelerin fabrikasyonunda kullanılmış. Biyolojik uygulamalarda ise kuartz veya cam gibi sert malzemeler tercih edilir. Desenleme için, istenilen desene uy-



Fotolitografi işlemi: 1. Fotorezist ile kaplanmış olan biyomalzeme yüzeyi üzerine bir maske varlığında ultraviyole uygulanır; 2. UV uygulaması sonucu yüzeyde tutunmayan fotorezist yıkama işlemi ile uzaklaştırılır. Bu basamaktan sonra işlem iki şekilde devam edebilir: 3a. Biyoaktif moleküllerin (protein ya da peptid) yüzeye kaplanması ve ardından lift-off işlemi ile yüzeyle etkileşmeyen moleküllerin uzaklaştırılması (4a). İkinci bir yol: 3b. Fotorezist tabakayı bir maske gibi kullanarak malzeme yüzeyinde bulunan metal oksit tabakanın yüzeyden kazınması (etching) ve lift-off ile desenlenmiş malzeme yüzeyinin elde edilmesi (4b).

gun biçimde özel olarak tasarlanmış kuartz-krom maskeler kullanılır. Maskedeki desenlerin malzeme yüzeyine naklinden önce yüzeyin UV ışınlarına duyarlı olan ve fotorezist (FR) olarak adlandırılan ince bir polimer tabakası ile kaplanması gerekir. Kaplama işleminden sonra malzeme yüksek sıcaklıkta fırınlanarak fotorezistteki çözücüler uzaklaştırılır. Daha sonra fotorezist kaplı malzeme, maskenin özel olarak yerleştirildiği bir sistem içinde maske ile bir araya getirilir (mask-aligner system). Bu sistemde bir UV ışık kaynağı bulunmaktadır ve malzeme ile maske uygun olarak hizalandığında ışık kaynağı aktif hale getirilir. Fotorezist kaplama pozitif özellik gösteriyorsa maskenin altında UV ışını gören bölgelerde (kuartz bölgeleri) fotorezist çözünür hale gelir ve yıkama işlemi ile yüzeyden uzaklaştırılır. Negatif özellik gösteren fotorezist kaplamaları ise UV ışınının etkisiyle çözünmez hale gelirler, böylelikle yüzey üzerinde maskenin negatif görüntüsü elde edilir. Yıkama işleminin ardından yüzey üzerinde desenlerin oluşturduğu ve malzeme yüzeyinin görüldüğü pencereler elde edilir. Malzemenin diğer kısımları FR polimer ile kaplıdır. Bu noktada organik çözücüler

ile yüzeyden sıyırma ya da yüzeyden kazıma (etching) gibi farklı kimyasal yöntemler kullanılarak yüzey üzerinde desenler elde edilir.

Fotolitografi, homojen desenlerin elde edilmesinde kullanılan en etkin yöntem. Bununla birlikte uygulamada temiz-oda koşullarına ihtiyaç duyulması ve kullanılan kimyasalların polimer temelli çoğu malzemenin ve biyolojik moleküllerin yapısını bozması, yöntemin en temel kısıtlamaları olarak karşımıza çıkıyor.

Nanolitografi

Nanoaletler kullanılarak molekül ve atom düzeyindeki malzemelerin bir yüzey üzerine biriktirilmesi veya yüzeyden uzaklaştırılması yaklaşımına nanolitografi deniliyor. Bu teknikte çok kısa dalga boylu ışınlar kullanılarak 100 nm'nin altında şekiller elde etmek mümkün. Oysa geleneksel optik litografi teknikleriyle 30 nm'nin altına inmek ekonomik değil. Nanolitografi yarı iletken entegre devreler veya nano elektromekanik sistemlerin üretiminde kullanılıyor. 2006 yılında hem ülkemizde, hem de yurtdışında bu konudaki akademik çalışmaların hız kazandığını görüyoruz. Elektron demet litografisi

LER VE NANODESENLEME

si nanoyapı üretiminde en yaygın kullanılan teknik.

Elektron Demeti Litografisi

Elektron demeti litografisi, desenlenmek istenen yüzeyler üzerine elektron demeti gönderilmesi ile yüzeylerin üzerinde nano boyutta desenlerin oluşturulmasında kullanılan en önemli tekniktir. Elektron dalga boyunun 0,1-1 nm mertebesinde olması sayesinde elektron demetlerini nanometre boyutlarında odaklamak teorik olarak mümkün. Bu şekilde odaklanmış elektron demeti ile uygun fotorezist malzemeleri kullanarak nanoboyutta desenler elde etmek mümkün olmaktadır.

Teknikte öncelikle silikon tabakalar üzerine polimer kaplanır ve elektron ışınları yüzeyi tarar. Bilgisayar kontrollü ışın demetlerinin kullanıldığı uygulamalarda, ışınların yüzeyi taraması elektrostatik ve manyetik lensler ile kontrol altında tutulur. Polimer matris ve elektron ışınları arasındaki etkileşimler sonucu elektron ışınlarına maruz kalan bölgelerde polimer parçalara ayrılır ve fotolitografideki benzer yıkama işlemi ile yüzeyden uzaklaştırılır. Böylelikle yüzeyler üzerinde desenli bölgeler elde edilir. Tekniğin uygulanması sırasında maskeleme işlemine gerek yoktur. Bununla birlikte kullanılan ışık kaynağı litografi tekniklerine göre çok daha pahalıdır. Elektron ışınları ile litografinin gerçekleştirildiği ticari uygulamalarda kullanılan sistemlerin maliyeti milyon dolarları bulabiliyor. Fakat araştırma amaçlı yapılan çalışmalarda daha düşük maliyetlerle (~100 bin dolar) bir elektron mikroskobunun litografi sistemi olarak kullanılması mümkün. Bu tip dönüştürülmüş sistemlerde 10 nm ve daha düşük çözünürlükte desenler elde edilebilir.

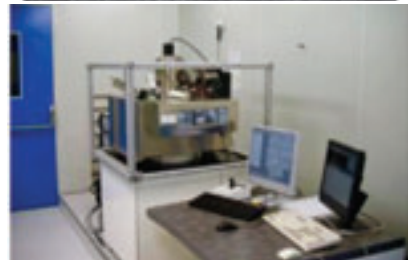
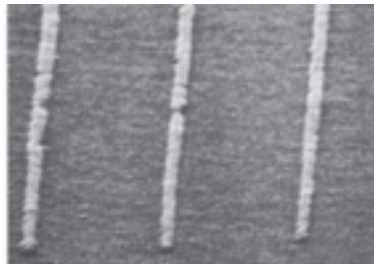
Dip Pen Nanolitografi

Dip pen nanolitografi (DPN), atomik kuvvet mikroskobu (AFM) kullanılarak yüzeyler üzerinde nano boyutta desenlerin elde edilebildiği bir teknik. Teknikte atomik kuvvet mikroskobunun iğnesinin ucunda bulunan moleküller bir sıvı sütunu içinden yüzey üzerine nakledilir. DPN tekniğinde atomik kuvvet mikroskobunun iğnesini bir "tükenmez kalem" gibi düşünebiliriz. Yüzeye desenlenecek olan ve iğnenin ucunda bulunan moleküller "mürekkep", desenlenmek istenen yüzey ise

"kağıt" olarak düşünülebilir. Teknikte moleküllerin nanoölçekte malzeme yüzeyine transferi sağlanır ve elde edilen desenlerin çözünürlüğü 5 nm'ye kadar düşebilir. Tekniğin en önemli avantajlarından biri de litografi işleminin yapıldığı sistemin aynı zamanda desenleri görüntülemek için de kullanılmasıdır. DPN tekniği protein moleküllerinin nano-düzenlenmesi ve biyolojik moleküllerin nano-desenlenmesi uygulamaları için kullanılabilecek tek basamaklı bir tekniktir.

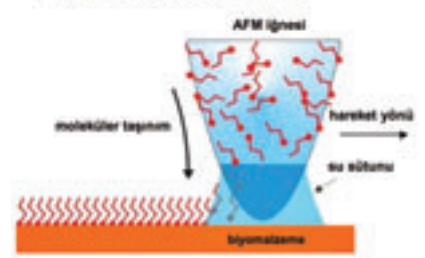
Plazma Litografisi

Plazma maddenin iyonize gaz halidir. Plazma için gerekli parametreler uygun olduğunda polimerlerin ince bir film halinde (nanometreden mikrometreye kadar değişen kalınlıklarda) yüzeyler üzerine kaplanması mümkündür. Bu kaplama işlemi sırasında malzeme yüzeyine, üzerinde mikro/nano pencerelerin bulunduğu bir maske yerleştiriliyor ve plazma polimer sadece bu pencerelerin boşluklarında yüzeye kaplanıyor. Böylelikle yüzey üzerinde farklı özelliklere sahip iki bölge elde edilir. Plazma ile yapılan çalışmalarda ilgi çekici gelişmelerden biri de, plazma ile kaplanan yüzeylerin daha sonra klasik fo-



Elektron demeti ile litografi tekniği kullanılarak elde edilen nano desenler ve tekniğin uygulandığı sistem.

DIP PEN NANOLİTOGRAFI



Dip pen nanolitografi tekniği, atomik kuvvet mikroskobu kullanılarak tek basamakta biyomalzeme yüzeyinde nano desenlerin elde edilebildiği bir tekniktir.

tolitografi ile desenlenmesidir. Plazma litografide en önemli avantaj, farklı karakterdeki birçok polimerin plazma ortamında yüzeylere kaplanabilmesidir. Bununla birlikte kararlı bir kaplama elde etmek oldukça zordur. En uygun koşulların saptanması zaman alabileceğinden ıslak kimya ile gerçekleştirilen yöntemler uygulamaya da bağlı olarak daha çekici gelebilir. Ayrıca plazma litografinin biyolojik moleküllerin desenlenerek yüzey kimyasının değiştirilmesinde gelişmiş bir teknik olduğunu söylemek mümkün değildir.

Polimer Karışımları

Bu yöntem geniş nanotopografik yüzeylerin düşük maliyetle ve yüksek verimde elde edilmesini sağlar. İki farklı polimerin karıştırılarak eğirme yöntemi ile silikon yüzeylere kaplandığı bu yöntemde farklı yükseklik ve derinliğe sahip organize topografik yapılar (kabartılar veya adacıklar) elde edilmektedir. Karışımdaki polimerlerin oranı ve derişimleri değiştirilerek topografik şekiller ve boyutları kontrol edilebilir. Polistiren ve poli(4-bromostiren) karışımının kullanıldığı bir çalışmada farklı polimer oranları ve derişimlerinde yapılar hazırlanmış ve elde edilen değişik topografilerde endotel ve fibroblast hücrelerin davranışı incelenmiştir. 13 nm yükseklikte adacıklara sahip yüzeylerdeki hücre yapışması ve üremesinin 95 nm yükseklikteki adacıklara sahip yüzeylere oranla daha fazla olduğu bulunmuş ve hücre iskeletinin şekillenmesinin, lamella oluşumunun ve üremeye ait genlerin ekspresyonunun nano boyuttaki topografiden etkilendiği ortaya konmuştur.

Kaynaklar:

1. D. Falconnet, G. Csucs, M. Grandin, M. Textor, Surface engineering approaches to micropattern surfaces for cell-based assays, Biomaterials, 2006, (27), 3044-3063.
2. A. Karakeçili, T. T. Demirtaş, C. Satriano, M. Gümüşderelioğlu, G. Marletta, Evaluation of L929 fibroblast attachment and proliferation on RGDS-immobilized chitosan in serum-containing/serum-free cultures, J Biosci. Bioeng., 2007, (104), 111-119.

1 YILLIK ABONELİK

e-dergi:

25 YTL

Yurtdışı: 15 Euro - 18 USD



Basılı dergi:

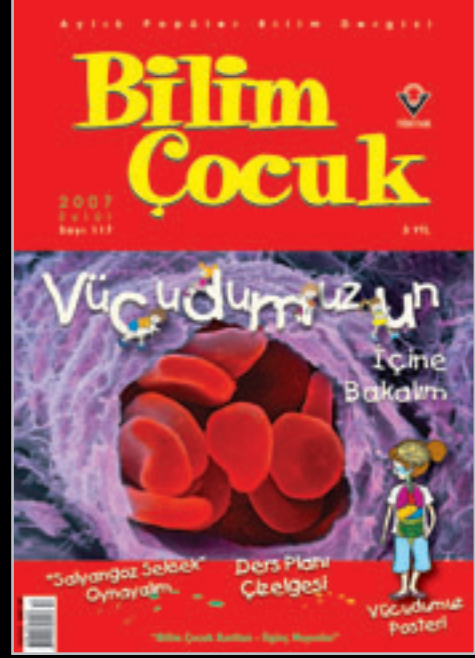
35 YTL

Yurtdışı: 40 Euro - 50 USD

e-dergi:

20 YTL

Yurtdışı: 12 Euro - 14 USD



Basılı dergi:

30 YTL

Yurtdışı: 40 Euro - 50 USD

Değerli Bilim ve Teknik / Bilim Çocuk okurları

Hem bize daha kolay, daha çabuk ve daha ucuza erişebilmenizi sağlamak, hem de daha geniş kitlelere ulaşabilmek için yeni bir hizmete karşınızdayız. Artık "e-dergi" aboneliği seçeneğini kullanarak dergilerinizi İnternet üzerinden de izleyebileceksiniz. Bu seçenek de, tıpkı basılı dergiye abonelik gibi sizleri şimdiye kadar çıkmış tüm dergilerimize erişme hakkına kavuşturuyor. Ama, o taze mürekkep kokusundan vazgeçemeyen, dergiyi koltuğuna kurularak okumanın tadına alışmış, koleksiyonlarının kesintiye uğramasını istemeyen okurlarımız da basılı dergi seçeneğini tıklayarak aynı ayrıcalıklara sahip olacaklar.

e-dergi uygulamasını aynı zamanda, posta maliyetlerinin yüksekliği ve iletim süresinin uzunluğu nedeniyle yeterince ulaşamadığımız yurtdışındaki büyük vatandaş kitlemiz ve Türk Cumhuriyetleri'ndeki soydaşlarımıza da erişebilmek için başlattık.

Dergilerimize abone olmak isteyen okurlarımız <http://www.biltek.tubitak.gov.tr/> adresindeki e-dergi sembolü üzerine tıklayacaklar. Ulaştıkları sayfadaki seçeneğin üzerine tıkladıklarında karşlarına çıkan formları doldurup gönderecekler ve kendilerine birer kullanıcı adı ve şifre verilecek. Bunlarla dergilerimizin yeni sayılarına ve arşivine ulaşacaklar.

Ailemizin yeni üyelerini sevgiyle kucaklıyoruz...