

# **Biyoaktif Yapay Matrislerle Korneal Stroma Rejenerasyonu**

**Proje No: 110s454**

Doç. Dr. Bahri Aydın

Prof. Dr. Kamil Bilgihan

Doç. Dr. Necat Yılmaz

Doç. Dr. Ahmet Hondur

Haziran 2013

ANKARA

## ÖNSÖZ

Bu çalışmada, korneal stroma hasarlarında kullanılacak ve stromanın doğal yapısının rejenere olmasını tetikleyen peptit nanofiberlerden oluşan bir ortam geliştirilmiştir. Bu amaçla, hücreler arası ortamda bulunan önemli peptit dizilerinden esinlenilerek peptit amfifil molekülleri sentezlenmiş; fiziksel ve kimyasal karakterizasyonları yapılmıştır. Hücre kültürü çalışmalarında korneal stroma hücreleri (HTK hücre hattı) kullanılarak hücresel davranışlar gözlenmiş ve *in vivo* çalışmalarda tavşan model organizma olarak kullanılmıştır. Çalışmada canlılık ve çoğalma testleri ve immün boyamalarla hücre metabolizmaları *in vitro* ortamda saptanmış ve *in vivo* deneylerde kornea kesitleri üzerinde histolojik ve immün boyamalar ile rejenerasyon tayin edilmiştir. Yapılan hayvan deneyleri ile peptitlerden oluşan hidrojellerin stroma rejenerasyonuna destek olduğu ve keratosit göçünü sağladığı belirlenmiştir.

Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu tarafından 110s454 nolu proje kapsamında desteklenmiştir.

|                                                                                                                                                                                                                                                      |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>ABSTRACT .....</b>                                                                                                                                                                                                                                | <b>7</b>  |
| <b>GİRİŞ.....</b>                                                                                                                                                                                                                                    | <b>8</b>  |
| <b>GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>                                                                                                                                                                                                                          | <b>10</b> |
| <b>2.1 Gereçler.....</b>                                                                                                                                                                                                                             | <b>10</b> |
| <b>2.2 Yöntemler.....</b>                                                                                                                                                                                                                            | <b>10</b> |
| 2.2.1 Amfifilik Peptit (PA) Sentezi .....                                                                                                                                                                                                            | 10        |
| 2.2.2 Fiziksel ve Kimyasal Karakterizasyon .....                                                                                                                                                                                                     | 10        |
| 2.2.2.1 Atomik Kuvvet Mikroskopu (Atomic Force Microscopy (AFM)) .....                                                                                                                                                                               | 11        |
| 2.2.2.2 Taramalı Elektron Mikroskopu (Scanning Electron Microscopy (SEM)).....                                                                                                                                                                       | 11        |
| 2.2.2.3 Geçirmeli Elektron Mikroskopu (Transmission Electron Microscopy (TEM))...11                                                                                                                                                                  |           |
| 2.2.2.4 Dairesel dikroizm (CD) Spektroskopi Ölçümü.....                                                                                                                                                                                              | 11        |
| 2.2.3 Hücre Kültürü Çalışmaları.....                                                                                                                                                                                                                 | 12        |
| 2.2.3.1 Canlılık ve Çoğalma Deneyleri .....                                                                                                                                                                                                          | 12        |
| 2.2.3.2 Hücre-Yüzey Etkileşimi .....                                                                                                                                                                                                                 | 12        |
| 2.2.4 <i>In vivo</i> Çalışmalar .....                                                                                                                                                                                                                | 13        |
| 2.2.4.1 Histolojik İnceleme .....                                                                                                                                                                                                                    | 13        |
| 2.2.4.2 Immunohistokimyasal Boyama.....                                                                                                                                                                                                              | 15        |
| 2.2.5 İstatistiksel Analiz .....                                                                                                                                                                                                                     | 15        |
| <b>BULGULAR VE TARTIŞMA .....</b>                                                                                                                                                                                                                    | <b>16</b> |
| Şekil 1. a) YIGSR-PA, b) KKRGD-PA, c) K-PA ve d) E-PA kimyasal yapıları .....                                                                                                                                                                        | 16        |
| Şekil 2. YIGSR-PA'in LC-MS'de 220 nm'de absorbands-zaman grafiği ve RP-HPLC kromatogram grafiği; $[M+H]^+$ (gözlemlenen): 1230.81, $[M+H]^+$ (hesaplanan): 1230.81, $[M+2H]/2^{2+}$ (gözlemlenen): 615.92, $[M+2H]/2^{2+}$ (hesaplanan): 615.92..... | 17        |
| Şekil 3. KKRGD-PA'in LC-MS'de 220 nm'de absorbands-zaman grafiği ve RP-HPLC kromatogram grafiği; $[M+H]^+$ (observed): 1110.90, $[M+H]^+$ (calculated): 1110. 39, $[M+2H]/2^{2+}$ (observed): 556, $[M+2H]+2/2$ (calculated): 556. ....              | 18        |
| Şekil 4. K-PA'in LC-MS'de 220 nm'de absorbands-zaman grafiği ve RP-HPLC kromatogram grafiği; $[M+H]^+$ (observed): 654.49, $[M+H]^+$ (calculated): 654.49, $[2M+H]^+$ (observed): 1307.97, $[2M+H]^+$ (calculated): 1307.97. ....                    | 18        |

Şekil 5. E-PA'nın LC-MS'de 220 nm'de absorbans-zaman grafiği ve RP-HPLC kromatogram grafiği; [M-H]<sup>-</sup> (observed): 654.41, [M-H]<sup>-</sup> (calculated): 654.41, [M-2H]/2<sup>-2</sup> (observed): 326.69, [M-2H]/2<sup>-2</sup> (calculated): 326.69, [2M-H]<sup>-</sup> (observed): 1309.80, [2M-H]<sup>-</sup> (calculated): 1309.80.19

Şekil 6. *In vitro* çalışmalarda kullanılan PA moleküllerinin ve karışımları ile elde edilen nanofiberlerin ikincil yapısını gösteren dairesel dikroizm analizi..... 20

Şekil 7. *In vivo* çalışmalarda kullanılan PA moleküllerinin ve karışımları ile elde edilen nanofiberlerin ikincil yapısını gösteren dairesel dikroizm analizi..... 20

Şekil 8. *In vitro*'da kullanılan PA nano yapılarının mikroskopik karakterizasyonu. (a-c) YIGSR-PA ve E-PA, (d-f) KKRGD-PA ve E-PA, (g-i) K-PA gel ve E-PA'nın sırsıyla SEM, TEM ve AFM görüntüleri..... 21

Şekil 9. *In vivo*'da kullanılan PA nano yapılarının mikroskopik karakterizasyonu. (a-c) YIGSR-PA ve KS, (d-f) KKRGD-PA ve KS'in sırsıyla SEM, TEM ve AFM görüntüleri ..... 22

Şekil 10. PA nanofiberlerinin kornea fibroblast hücrelerinin canlılığına olan etkisi ..... 23

Şekil 11. PA nanofiberlerinin kornea fibroblast hücrelerinin çoğalmasına olan etkisi ..... 23

Şekil 12. (a) YIGSR-PA, (b) KKRGD-PA, (c) K-PA ve (d) kollajen kaplı yüzeylerde kornea fibroblastlarının tutunma profilleri ..... 24

Şekil 13. (a) YIGSR-PA, (b) KKRGD-PA, (c) K-PA ve (d) kollajen kaplı yüzeylerde hücrelerin morfolojileri ve yayılma davranışları. (kırmızı: TRITC-konjuge falloidin, mavi: vimentin, yeşil: TO-PRO<sup>®</sup>-3)..... 25

Şekil 14. Kornea hasarı oluşturulması ve PA enjeksiyonunun temsili resimleri. a,b) Korneada teşrihçi ile hasar oluşturulması, c)KKRGD-PA enjeksiyonu. (Hasarlı bölge yıldız ile, jel ok ile gösterilmiştir. .... 26

Şekil 15. a) 3. haftada ve b) 7. haftada kornea kalınlıkları ..... 26

Şekil 16. Tavşan kornealarının işlemden 3 hafta sonraki histolojik ve immünohistokimyasal incelemeleri. (a-d) YIGSR-PA enjekte edilmiş, (b-h) KKRGD-PA enjekte edilmiş, (i-l) hasarlı kornea. Yıldızlar hasarlı alanı, oklar ise PA jellerini göstermektedir ..... 28

Şekil 17. Tavşan kornealarının işlemden 7 hafta sonraki histolojik ve immünohistokimyasal incelemeleri. (a-d) YIGSR-PA enjekte edilmiş, (b-h) KKRGD-PA enjekte edilmiş, (i-l) hasarlı kornea. Yıldızlar hasarlı alanı, oklar ise PA jellerini göstermektedir ..... 29

Şekil 18. İşlem yapılmayan doğal korneaların H&E ve vimentin boyama görüntüleri 29

**SONUÇ..... 30**

**KAYNAKÇA ..... 32**

**Tablo 1.** Hematoksilen ve eozin boyaması için kullanılan prosedür

**Tablo 2.** İmmünohistokimyasal boyamanın dehidrasyon basamağında takip edilen ptorokol

## ÖZET

Travma veya maküler distrofi ve keratokonus gibi hastalıkların neden olduğu kornea stroma hasarları görme kaybına neden olmaktadır. Bu tür hastalıkların tedavisi için yeni tedavi tekniklerinin geliştirilmesi önemlidir. Bu çalışmada, kornea doku rejenerasyonu için kullanılabilecek biyoaktif peptit nanofiber sistemler geliştirilmiştir. Bu nanofiberler, laminin ve fibronektinden esinlenilen peptit sekanslarını içeren ve kendiliğinden düzenlenme özelliğine sahip peptit amfifil molekülleri ile oluşturulmuştur. Bu peptit nanofiber sistemlerin biyouyumluluğu, insan kornea keratosit hücre hattı olan HTK hücrelerinin *in vitro* kültürleri ile gösterilmiştir. Laminin-mimetik peptit nanofiberler üzerinde kültürlen HTK hücreleri karakteristik morfolojilerini sergilemiş ve bu yüzeyler üzerindeki hücrelerin çoğalması fibronektin benzeri nanofiberler üzerinde çoğaltılan hücrelere kıyasla artmıştır. Bu nanofiberler tavşan kornealarına enjekte edildiğinde de laminin-mimetik nanofiberler yara bölgesine keratosit göçünü artırmış ve stroma rejenerasyonunu sağlamıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar, enjekte edilebilir laminin-mimetik peptit nanofiberlerin kornea doku rejenerasyonu için umut vaat eden sentetik bir doku iskelesi sistemi olduğunu göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Kornea stroma rejenerasyonu, YIGSR, RGD, peptit amfifil

## **ABSTRACT**

Defects in corneal stroma caused by trauma or diseases such as macular corneal dystrophy and keratoconus can be detrimental for vision. Development of therapeutic methods to enhance corneal regeneration is essential for treatment of these defects. Here, we report a bioactive peptide nanofiber scaffold system for corneal tissue regeneration. These nanofibers are formed by self-assembling peptide amphiphile molecules, which contain laminin and fibronectin inspired peptide sequences. The biocompatibility of these peptide nanofiber systems were examined by culturing human corneal keratocyte (HTK) cells. The HTK cells cultured on laminin-mimetic peptide nanofibers exhibited their characteristic morphology and their proliferation was enhanced compared to cells cultured on fibronectin-mimetic nanofibers. When these nanofibers were injected into damaged rabbit corneas, laminin-mimetic nanofibers increased keratocyte migration and supported stroma regeneration. Our results suggest that laminin-mimetic peptide nanofibers provide a promising injectable, synthetic scaffold system for cornea tissue regeneration.

**Key words:** Cornea stroma regeneration, YIGSR, RGD, peptide amphiphile

## GİRİŞ

Kornea gözün ön kısmında bulunan ve gözü dış etkilerden koruyan saydam bir dokudur. Bu doku ışığın kırılmasından sorumlu olduğu için yapısında damar bulunmamaktadır (Griffith et al. 1999). Dıştan içe epitelyum, stroma ve endotelyum denen 3 temel tabakadan oluşmaktadır ve özellikle stroma tabakasının kalınlığı korneanın saydam olmasında önemlidir (Griffith et al. 1999; Morishige et al. 2006; Torbet et al. 2007) . Dünyada yılda yaklaşık 10 milyon kişi inflamasyon, travma, ya da korneal distrofiler nedeniyle kornea opaklaşmasına ve dolayısıyla kısmi ya da kalıcı körlüğe maruz kalmaktadır. Bu durum için en yaygın tedavi yöntemi ise kornea naklidir (Whitcher et al. 2001; Whitcher et al. 2002). Kornea nakline ihtiyacı olan hasta sayısı gün geçtikçe artsa da ihtiyacı karşılayabilecek miktarda donör bulunamamaktadır.

Korneanın saydam olmasında ve ışığı kırmasında, kan damarı içermemesinin yanı sıra stroma tabakasındaki kollajen fiberlerinin paralel ve düzenli organizasyonu önemlidir. Bu yapı içinde keratosit olarak adlandırılan sessiz fibroblastlar yer almaktadır (Hay ve Meier 1976). Keratokonus hastalığında olduğu gibi korneanın bu düzenli yapısının kaybolması, korneanın fonksiyonunu yerine getirememesiyle sonuçlanmaktadır. Dolayısıyla tedavi amaçlı yaklaşımlarda korneanın doğal ortamının sağlanması hem hücreler hem de korneanın fonksiyonelliği açısından önem arz etmektedir. Bu nedenle doku mühendisliği yaklaşımı kornea hasarlarından kaynaklanan hastalıklarda umut vaat eden bir yaklaşım olarak ortaya çıkmaktadır (Germain et al. 2000). Bugüne kadar kollajen (Orwin et al. 2000; Liu et al. 2008), fibrin-agaroz (Alaminos et al. 2006) ve hücreleştirilmiş kornea (Hashimoto et al. 2010) gibi materyaller bu amaçla denenmiştir. Çalışmalarda kullanılan malzemelerin korneaya eski işlevini kazandırması kadar biyouyumlu, immün yanıtı neden olmayan ve hücreler üzerinde toksik etki yaratmayan yapıda olmaları önemlidir (Carlsson et al. 2003).

Peptit amfifil (PA) molekülleri son yıllarda öne çıkan ve doku mühendisliği çalışmaları için önem arz eden moleküller sınıfına girmekte olup yapılarında temel olarak hidrofobik bir alkil grubu,  $\beta$ -yaprağı ve biyoaktif peptit dizisi içeren, kendiliğinden oluşumlu nanofiber yapılarıdır. Nanofiber yapıları arasında oluşan interaksiyonlar içerisinde suyu tutarak 3 boyutlu jel yapısı oluştururlar ve böylece hücreler arası ortamı taklit eden bir yapı iskelesine dönüşürler. Bununla beraber yapılarında bulunan ve amaca uygun olarak dizayn edilebilen biyoaktif aminoasit dizileri sayesinde bu yapay hücreler arası ortama istenen sinyaller eklenebilmektedir (Toksoz et al. 2011). Sahip oldukları çok yönlü fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri sayesinde kıkırdak (Shah et al. 2010), kemik (Mata et al. 2010), nöron rejenerasyonu (Silva et al. 2004) ve anjiyogenez (Chow et al. 2011) gibi yollarda sentetik hücreler arası ortam görevini görmektedir. Bugüne kadar kollajen, laminin, fibronektin gibi

hücreler arası ortam proteinlerinin hücre fonksiyonu ve canlılığı üzerinde önemli olduğu görülen birçok peptit dizisi tanımlanmıştır. Bu dizilerden laminin proteininin  $\beta$  zincirinde bulunan YIGSR, integrinler üzerinden hücre tutunmasında rol oynamaktadır (Massia et al. 1993; Boateng et al. 2005). YIGSR'den başka fibronektinde bulunan RGD dizisinin de hücreler üzerinde benzer bir etki yarattığı bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda RGD dizisi içeren peptitler yüzey olarak kullanıldığında hücre tutucu etki yaptığı gözlenmiştir (Saiki et al. 1989). Bu karakteristik dizilerin biyolojik aktiviteleri araştırıldığında hücre zarı üzerindeki reseptörlere bağlanarak hücre içi yolları aktive ya da inaktive ederek hücresel yanıtın oluşmasını sağladığı görülmüştür (Walker et al. 2001). Bu özellikli dizilerin taklit edilip hücresel ortamın yeniden düzenlenmesinde önemli rol oynayacağının düşünülmesinin diğer bir nedeni ise kısa olmalarıdır. Böylelikle aynı amaç için bütün bir proteinin kullanımı ortadan kalkmakta ve dahası güdümlmeleri daha kolay hale gelmektedir. Proteinlerin işlevselliklerinin korunabilmesi için 3 boyutlu yapılarının sabit kalmaları şarttır. Sadece özellikli dizilerin taklit edildiği durumlarda ise 3 boyutlu yapı tüm proteine göre daha uzun süre sabit kalmaktadır (Marletta et al. 2005). Bu nedenle de bu tip yapıların farmasötik ve klinik uygulamalarda kullanımları daha elverişli hale gelmektedir. Sonuç olarak değiştirilebilir fonksiyonel gruplara sahip peptit amfifiller; kolay uygulanabilirlikleri ve kendiliğinden oluşumlu yapıları nedeniyle kornea doku mühendisliği çalışmaları için umut verici biyomateryaller sınıfına girmektedir.

Bu çalışmada YIGSR veya RGD biyoaktif dizilerini içeren peptit amfifil molekülleri kullanılarak kornea stroma tabakası yenilenmesi hedeflenmiştir. Korneal hasarın yenilenmesi, hasarlı bölgedeki hücrelerin çoğalma, farklılaşma, apoptoz ve göç etme dengelerine bağlıdır (Klenkler ve Sheardown 2004). Dolayısıyla hücrelerin bulunduğu doğal ortamın taklit edilebilmesi ile korneanın normal fonksiyonunun geri kazanılmasına olanak sağlayacağı düşünülmektedir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1 Gereçler

9- Florenilmetoksikarbonil (Fmoc) ve tert- butoksikarbonil (Boc) korunumlu amino asitler, [4-[(2',4'-dimetoksikarbonil)Fmoc-aminometil]fenoksi]asetamidonorleucyl-MBHA resin (Rink amide MBHA resin), 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU) ve diizopropiletilamin (DIEA) NovaBiochem ve ABCR'den satın alınmıştır. Hücre kültürü çalışmaları için kullanılan DMEM besi yeri, fetal bovine serum (FBS), L-glutamin ve penicilin/streptomisin Invitrogen'den satın alınmıştır.

### 2.2 Yöntemler

#### 2.2.1 Amfifilik Peptit (PA) Sentezi

Pozitif yüklü K-PA, YIGSR-PA, KKRGD-PA ve negatif yüklü E-PA katı faz peptit sentezi metoduyla MBHA amid reçene üzerinde sentezlenmiştir. Temelden tepeye (*bottom-up*) sentezlenen peptitler, MBHA reçene, Fmoc koruma gruplu aminoasitler, HBTU ve DIEA 1:2:1,95:3 oranında dimetilformamid (DMF) içerisinde karıştırılarak her aminoasit tek tek eklenmiştir. Bir sonraki amino asidin eklenmesi öncesinde Fmoc koruma gruplarını ayırmak için %20 piperidin içeren DMF çözeltisi kullanılmıştır. Sekanstaki son aminoasit eklendikten sonra peptidin amfifilik özelliğini sağlayan lorik asit aynı yöntemle eklenmiştir. Sentez sonunda peptitleri reçeneden koparmak için TFA:TIS:distile su 95:2,5:2,5 oranında karıştırılarak sentezin gerçekleştiği reaksiyon kabının içerisinde 2 saat boyunca çalkalanmıştır. Karışımda fazla miktarda bulunan solüsyonlardan kurtulmak için döner buharlaştırıcı kullanılmıştır. Elde edilen amfifilik peptidin çöktürülmesi için soğuk dietil eter kullanılmış, santrifüj ile dietil eterden kurtulunmuştur. Distile suda çözülen peptitler liyofilize edilerek toz haline getirilmiştir. Elde edilen ürünlerin karakterizasyonu sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi (LC-MS) ile yapılmıştır. Spektrum için Zorbax SB-C8 4,6 mm x 100 mm kolonu bağlanmış Agilent LC-MS kullanılmıştır. Değişim derecesi olarak pozitif yüklü PA için (a) su (%0,1 formik asit) ve (b) asetonitril (%0,1 formik asit); negatif yüklü PA için (a) su (%0,1 amonyum hidroksit) ve (b) asetonitril (%0,1 amonyum hidroksit) kullanılmıştır. Peptit saflaştırılması için, Zorbax prepHT 300CB-C8 kolonu takılı sıvı kromatografi (HPLC) cihazı kullanılmıştır. Mobil faz olarak; pozitif PA için %0,1 TFA içeren su ve asetonitril kullanılırken negatif yüklü PA için %0,1 amonyum hidroksit içeren su ve asetonitril kullanılmıştır.

#### 2.2.2 Fiziksel ve Kimyasal Karakterizasyon

*In vitro* çalışmalarda peptit nanofiber jeller, pozitif yüklü YIGSR-PA, KKRGD-PA ve K-PA molekülleri ile negatif yüklü ve biyoaktif olmayan E-PA karıştırılarak elde edilmiş ve karakterize edilmiştir. *In vivo* çalışmalarda ise E-PA yerine kondroitin sülfat (KS) kullanılmıştır. Bunun nedeni, doğal ortamda kornea içerisinde de yoğun miktarda kondroitin sülfat bulunmasıdır. Ayrıca *in vivo* çalışmalarda peptit molekülleri 0,25 M süktroz çözeltisinde çözünerek kullanılmıştır.

#### **2.2.2.1 Atomik Kuvvet Mikroskopisi (Atomic Force Microscopy (AFM))**

AFM örnekleri, suda %0,05 (w/v) YIGSR-PA, KKRGD-PA ve K-PA solüsyonlarının 2:1 oranında %0,05 (w/v) E-PA ile karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. *In vivo* ortamı taklit etmek içinse suda %0,05 (wt/v) YIGSR-PA veya KKRGD-PA, %0,1 KS ile hacimce 7:1 oranında karıştırılmıştır. Sükroz çözeltisinin kuruma sonrası yapışkan özellikte olması nedeniyle görüntü alınamamıştır. Bu nedenle sadece AFM karakterizasyonuna özgü olarak PA molekülleri 0,25 M sükroz çözeltisi yerine steril ddH<sub>2</sub>O içerisinde çözünmüştür. Silikon tabaka üzerinde 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilen jeller, daha sonra AFM ile görüntülenmiştir. AFM görüntüleri, Asylum Research MFP-30 model mikroskop kullanılarak 250-350 kHz frekans, 1024×512 çözünürlük, 1,0–1,5 Hz tarama hızıyla çekilmiştir.

#### **2.2.2.2 Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscopy (SEM))**

Peptit nanofiber jelin 3-boyutlu ağ yapısını incelemek için Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) kullanılmıştır. *In vitro* karakterizasyon için %1'lik PA solüsyonları 2:1 oranında E-PA ile karıştırılmıştır. Doğal ortamı taklit etmek amacıyla YIGSR-PA/KS ve KKRGD-PA/KS karışımı jeller hacimce 9:1 oranında karıştırılarak oluşturulmuştur. Oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilen jeller, içlerindeki suyun uzaklaştırılması amacıyla artan konsantrasyonlarda etil alkol içerisinde 2 dakika bekletilmiştir. Kritik nokta kurutucusu (Tousimis Autosamdri- 815 B, Series C critical point dryer) ile kurutulan jeller 6 nm altın-paladyum ile kaplanarak SEM (FEI Quanta 200 FEG) ile görüntülenmiştir.

#### **2.2.2.3 Geçirmeli Elektron Mikroskopisi (Transmission Electron Microscopy (TEM))**

TEM örnekleri Lacey karbon kaplı 300 kare ızgaralı bakır sistemler üzerinde hazırlanmıştır. Peptid solüsyonlarından 10 µL ızgara üzerine damlatılmış ve 3 dakika boyunca kurumaya bırakılmıştır. Fazla gelen solüsyon kağıt peçete yardımıyla alındıktan sonra örnekler, nanoyapıların boyanması için %2 uranil asetat ile muamele edilmişlerdir. Örnekler FEI Tecnai G2 F30 cihazı yardımıyla görüntülenmişlerdir.

#### **2.2.2.4 Dairesel dikroizm (CD) Spektroskopisi Ölçümü**

Peptit nanofiberlerin sekonder yapıları, dairesele dikroizm spektroskopisi (JASCO J815 CD spektrapolarimetre) kullanılarak incelenmiştir. *In vitro* çalışmalardaki PA solüsyonları su içerisinde %0,01 (ağırlık/hacim) konsantrasyonda kullanılırken *in vivo* çalışmalarda 0,25 M sükroz içerisinde çözünen PA solüsyonları kullanılmıştır. Jelleştirme amaçlı kullanılan kondroitin sülfat ise su içinde %0,02 (wt/v) oranında çözündürülmüştür. Ölçümler için amfifilik peptit solüsyonları 300 nm'den 190 nm'ye 100 nm/dak tarama hızıyla ölçülmüştür. Bütün ölçümler üç ölçümün ortalamasıyla, D.I.T. 1 sn seçilerek, 1 mm bant genişliğinde standart duyarlılıkta yapılmıştır. Her örnek için 3 tarama sonucunun ortalaması alınmıştır.

### 2.2.3 Hücre Kültürü Çalışmaları

Sunulan çalışmada, daha önce Jester ve ark. ları tarafından geliştirilen insan kornea fibroblast hücre hattı (HTK) kullanılmıştır (Jester et al. 2003). Hücreler, 75 cm<sup>2</sup>'lik kültür kaplarında ve %10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) içinde kültüre edilmiştir. Hücreler, kültür kaplarının %80'ini kapladığında pasajlanmıştır.

Hücre kültürü çalışmalarında K-PA/E-PA, YIGSR-PA/E-PA, KKRGD-PA/E-PA, pozitif kontrol olarak kollajen ve hücre kontrolü olarak da doku kültür kapları (TCP) olmak üzere 6 grup kullanılmıştır. PA'lar son konsantrasyonda %0,2 w/v olacak şekilde hazırlanmıştır. Kontrol grubu, sadece hücre ve hücre kültür ortamından oluşmaktadır. Bununla beraber biyoaktif özelliği olmayan K-PA negatif, kollajen (%0.01 w/v) ise pozitif kontrol olarak seçilmiştir. PA moleküllerinin jel oluşturmada 2 zıt yüklü molekülün karıştırılması esas alınmıştır. Bu amaçla negatif yüklü E-PA, pozitif yüklü olan K-PA, YIGSR-PA ve KKRGD-PA ile son yükleri nötr olacak şekilde hazırlanmıştır. Jelleştirme aşamasından sonra laminar akımlı kabin içerisinde kurutulup, UV ile sterilizasyonları sağlanmıştır.

#### 2.2.3.1 Canlılık ve Çoğalma Deneyleri

Deneyde kullanılan peptit jellerin hücre canlılığı üzerindeki etkileri Alamar mavisi testi ile incelenmiştir. Alamar mavisi toksik olmayan ve hücre içine girebilen bir resazurin bileşiğidir. Normal koşullarda floresans özelliği taşımayan bu bileşik, hücre içine girdiği zaman refurine indirgenerek floresans ışımı yapmaktadır. Alamar mavisi, hücrelerin metabolik aktivitesine göre cevap veren bir yöntem olduğu için sağlıklı hücrelerden gelen sinyal diğerlerine göre daha fazla olmaktadır.

İlk olarak 96 kuyucuklu mikrolaka, %0,2'lik peptit solüsyonları ile 100 µL/kuyucuk olacak şekilde kaplanmış ve kurutulduktan sonra kuyucuk başına 3000 hücre ekilmiştir. 20 saatlik inkübasyonun ardından hücreler üzerine hücre kültür ortamının 1/10'u kadar Alamar mavisi eklenerek 4 saat daha inkübe edilmişlerdir. Ardından 560EX nm/590EM nm filtre ayarlarında floresans değerleri ölçülmüştür.

PA'lerin hücre çoğalması üzerine etkilerinin incelenmesi amacıyla Alamar mavisi yöntemiyle 72 saat sonunda analiz yapılmıştır.

#### 2.2.3.2 Hücre-Yüzey Etkileşimi

Hücrelerin farklı peptit molekülleri ile kaplanan yüzeyler ile etkileşimini göstermek amacıyla hücre morfolojileri incelenmiştir. Hücreler F-aktine bağlanan *TRITC-konjuge falloidin*, DNA'ya bağlanan TO-PRO<sup>®</sup>-3 iyodür ve bir keratosit markörü olan vimentine bağlanan anti-vimentin antikoru ile işaretlenmiştir. Yukarıda belirtilen koşullar ile 24 kuyucuklu mikrolakalar üzerinde gerçekleştirilen deneyde kuyucuk başına 2x10<sup>4</sup> hücre ekilmiş ve 24 saat

inkübasyon sonucunda hücreler %4 paraformaldehit ile 15 dakika fikse edilmişlerdir. Hücrelerin geçirgenliği %1 BSA ve %0,1 Triton-X-100 içeren fosfat tampon solüsyonu ile sağlanmış ve ardından hücrelere özgü olmayan boyanmaları engellemek amacıyla bloklama solüsyonu ile 2 saat boyunca muamele edilmişlerdir. Örnekler sırasıyla 20'şer dakika *FITC-falloidin* (1:500) ve TO-PRO®-3 iyodür (1:1000) ile işaretlenmiş ve Zeiss LSM 510 konfokal mikroskobu ile görüntülenmişlerdir.

Hücre-yüzey etkileşimlerinin mikro ölçekteki incelemeleri ise elektron mikroskobuyla gerçekleştirilmiştir. Cam, PA ya da kollajen kaplı yüzeyler üzerine ekilip 24 saat inkübe edilen hücreler sırasıyla %2,5 gluteraldehit ve %1 osmiyum tetroksit (OsO<sub>4</sub>) ile fikse edilmişlerdir. Ardından örneklerin su içeriğini uzaklaştırmak için kademeli artan alkol serilerinden geçirilmişlerdir. Son aşamada %100 alkol içerisinde kritik nokta kurutucu ile kurutulan örnekler 4 nm Au/Pd ile kaplandıktan sonra yüksek vakum altında ETD dedektörlü FEI Quanta 200 FEG taramalı elektron mikroskobu ile görüntülenmişlerdir.

#### **2.2.4 In vivo Çalışmalar**

*In vivo* çalışmalar için 15 adet New Zealand albino tavşan (2,5 - 3 kg) kullanılmıştır. Tavşanlar *ad libitum* beslenmiş olup, gün döngüleri 12 saat aydınlık 12 saat karanlık olacak şekilde belirlenmiştir. Tüm hayvan çalışmaları, Mersin Üniversitesi Hayvan Çalışmaları Etik Kurul Komitesi tarafından onaylanmıştır.

Tavşanlar 50 mg/kg ketamin hidroklorid ve 5 mg/kg ksilazin hidrokloridin intramüsküler enjeksiyonu ile uyutulmuşlar ve alceine ile topikal anestezileri gerçekleştirilmiştir. Ardından, teşrih bıçağı yardımı ile kornealara cep açılmış ve açılan cepten kornealar tahrip edilmiştir. Açılan cepten daha önce %1 olarak hazırlanan ve UV altında sterilize edilen peptit solüsyonları (YIGSR-PA ve KKRGD-PA) enjekte edilip suture yardımıyla cep kapatılmıştır. Negatif kontrol olarak tavşan kornealarında cep oluşturulmuş ve giriş kısmı suture ile dikilmiştir. Bu grup "hasarlı kornea" olarak isimlendirilmiştir. İşlem sonrası 0,1 mL dexametazon/netilmisin subkonjunktival olarak enjekte edilirken, haftada 4 kez de topikal olarak uygulanmıştır. Çalışma boyunca gözler kornea berraklığı ve inflamasyon yada enfeksiyon riskine karşı klinik olarak muayene edilmişlerdir. 3 ve 7 hafta sonunda kornealar çıkarılmış ve 100 mg/kg sodyum pentobarbital ile hayvanlar ötenazi edilerek deney sonlandırılmıştır. Kornea kalınlıkları peptit enjeksiyonu öncesinde, sonrasında ve kornea çıkarılması öncesi pakimetre ile ölçülmüştür (Her bir ölçüm için n=5).

##### **2.2.4.1 Histolojik İnceleme**

Kornealar çıkarıldıktan sonra fiksasyon işlemi için 1x PBS'de hazırlanan %4 paraformaldehit (PFA) içinde 20 saat boyunca +4 °C'de bekletilmişlerdir. Bu süre sonunda PFA'den çıkarılan dokularda doku takibi yapılmıştır. Doku takibinde öncelikle dereceli dehidrasyon yapılmıştır.

Bu amaçla dokular sırasıyla %70, %80, %95 ve %100 (v/v) etanol içinde birer saat ve her basamak 2 kez tekrarlanacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Dokular şeffaflaşmaları için ksilen içinde her biri 1 saat olmak üzere 2 kez ve 1,5 saat sıvı parafin içerisinde inkübe edildikten sonra bloklanmışlardır.

Histolojik inceleme için dokular hematoksilin ve eozin (H&E) ile boyanmıştır. Bu amaçla, parafine gömülen dokulardan mikrotom yardımıyla 5 µm'lik kesitler alınmış ve doku etrafındaki parafin 58 °C'de eritilmiştir. Akabinde Tablo 1'deki protokol izlenmiş ve işlem sonunda ışık mikroskobuyla görüntü alınmıştır.

**Tablo 1.** Hematoksilin ve Eozin boyaması için kullanılan prosedür

| <b>Tekrar / malzeme</b>                                      | <b>Zaman</b>           |
|--------------------------------------------------------------|------------------------|
| 2 x ksilen                                                   | Her biri 10 dk         |
| 2 x saf alkol                                                | Her biri 5 dk          |
| %95 alkol                                                    | 2 dk                   |
| %70 alkol                                                    | 2 dk                   |
| ddH <sub>2</sub> O                                           | 10 kez batırıp-çıkarma |
| Mayer hematoksilin solüsyonunda boyama                       | 8 dk                   |
| Musluk suyunda yıkama                                        | 10 dk                  |
| ddH <sub>2</sub> O                                           | 10 kez batırıp-çıkarma |
| % 95 alkol                                                   | 10 kez batırıp-çıkarma |
| Eozin Y solüsyonu                                            | 50 sn                  |
| 2 x % 95 alkol                                               | Her biri 5 dk          |
| 2 x saf alkol                                                | Her biri 5 dk          |
| 2 x ksilen                                                   | Her biri 5 dk          |
| Ksilen bazlı yapıştırma solüsyonu ile lamellerin kapatılması |                        |

#### 2.2.4.2 İmmünohistokimyasal Boyama

Parafin bloklara gömülen ve kesitleri alınan dokuların H&E'nin yanı sıra kollajen tip I ve vimentin antikorları ile de boyamaları gerçekleştirilmiştir. Bunun için aşağıdaki Tablo 2'de gösterilen protokol takip edilmiştir.

**Tablo 2.** İmmünohistokimyasal boyamanın dehidrasyon basamağında takip edilen protokol

|                            |       |
|----------------------------|-------|
| Ksilen                     | 10 dk |
| Ksilen                     | 10 dk |
| Ksilen 1:1 EtOH            | 5 dk  |
| %100 EtOH                  | 10 dk |
| %100 EtOH                  | 10 dk |
| %95 EtOH                   | 5 dk  |
| %70 EtOH                   | 5 dk  |
| %50 EtOH                   | 5 dk  |
| ddH <sub>2</sub> O         | 5 dk  |
| Akan musluk suyunda yıkama |       |

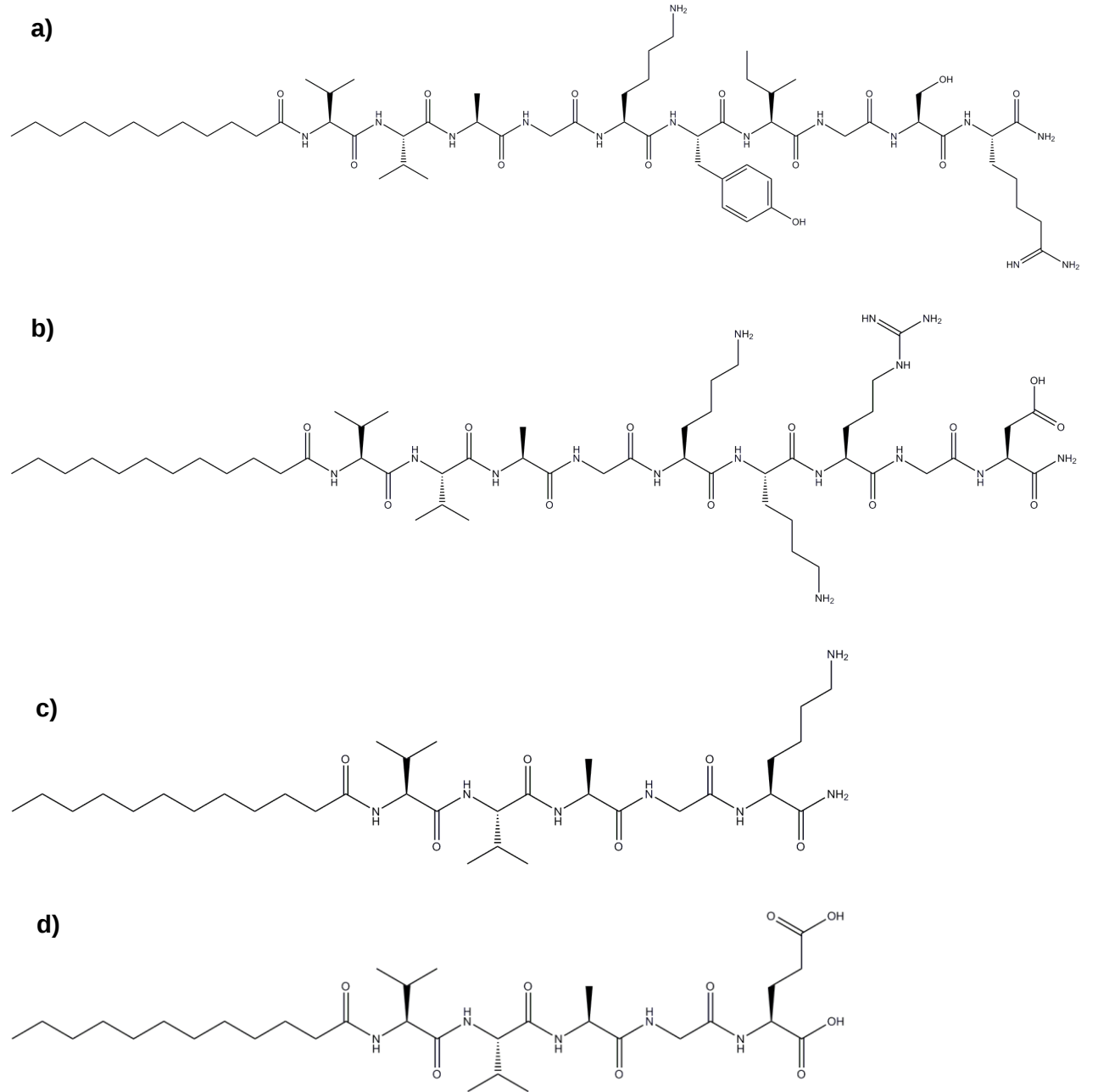
Bu basamakların ardından örnekler pepsin enzimi ile 10 dakika muamele edilmiş ve %0,025 Triton X-100 içeren tris tuz tamponu (TBS) ile yıkanarak bloklama solüsyonunda (%10 normal serum ve %1 sığır serum albümin içeren TBS) 2 saat oda sıcaklığında inkübe edilmişlerdir. Ardından örnekler gece boyunca +4 °C'de birincil antikor ile muamele edilmiştir. Ertesi gün %0,025 Triton X-100 içeren tris tuz tamponu (TBS) ile yıkanarak Cy2-florofor-konjuge edilmiş ikincil antikor ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonunda örnekler TBS ile yıkanarak floresanı soldurmayan yapıştırıcı ile lamellere yapıştırılmışlar ve konfokal mikroskobuyla görüntülenmişlerdir.

#### 2.2.5 İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler GraphPad Prism 5 programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Canlılık ve çoğalma testlerinde tek-yönlü ANOVA ve Bonferroni çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. Hata çubukları ortalama standart hata baz alınarak çizilmiş olup ve p değerlerinin 0,05'ten küçük olduğu değerler anlamlı kabul edilmiştir.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

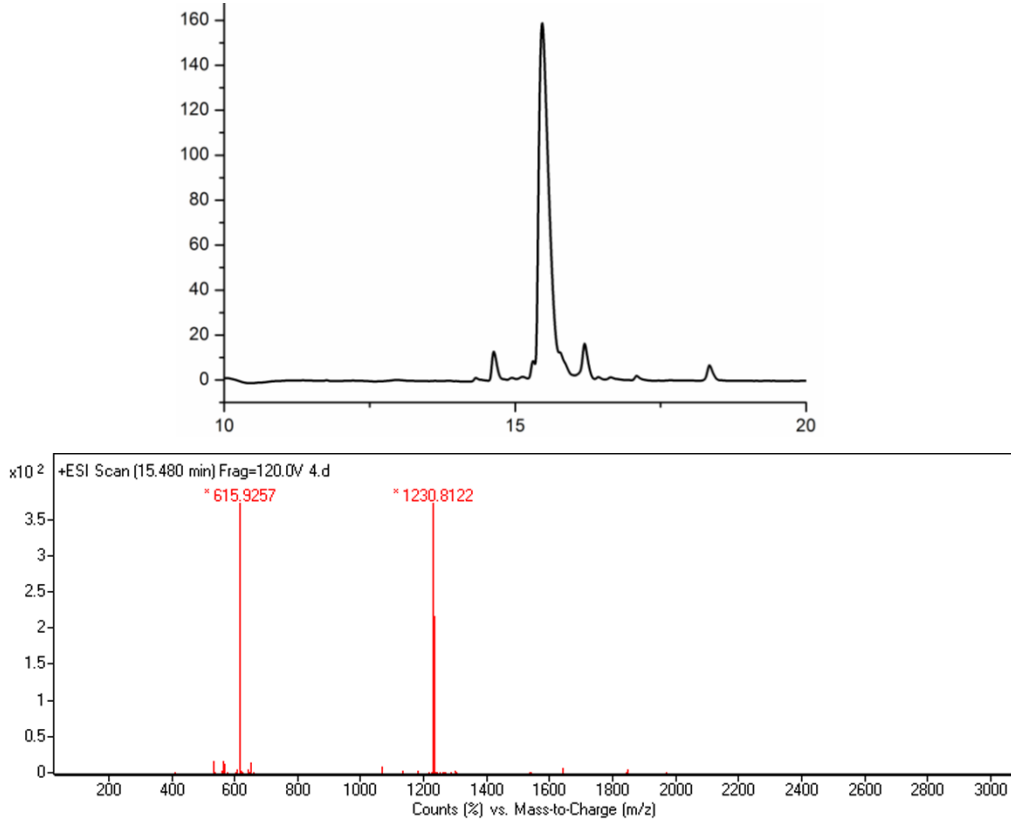
Sunulan çalışmanın amacı, biyoaktif peptit dizileri içeren PA moleküllerinin *in vitro* ve *in vivo* ortamda kornea stroma hücreleri üzerindeki etkilerinin araştırılmasıdır. Bunun için, YIGSR ya da RGD dizilerini içeren amfilil yapısındaki peptit molekülleri sentezlenmiştir. Hücreler arası ortamı taklit eden bu moleküllerin yapıları Şekil 1’de gösterilmiştir.



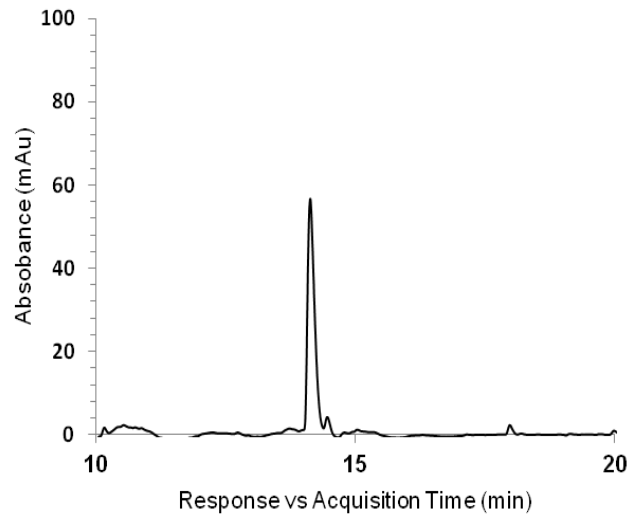
**Şekil 1.** a) YIGSR-PA, b) KKRGD-PA, c) K-PA ve d) E-PA kimyasal yapıları

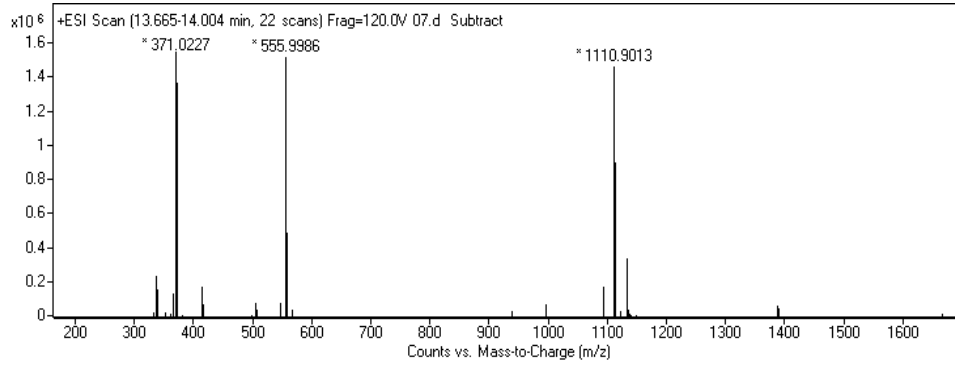
Yöntem bölümünde anlatıldığı üzere peptitler, katı faz peptit sentezi tekniğiyle sentezlenmiştir. Sentezlenen bu moleküllerin saflığı ve ağırlıkları, LC-MS ile belirlenmiştir. PA

moleküllerinin sıvı kromatografi-kütle spektrofotometresi (LC-MS) sonuçları sırasıyla Şekil 2, 3, 4 ve Şekil 5'te gösterilmiştir.

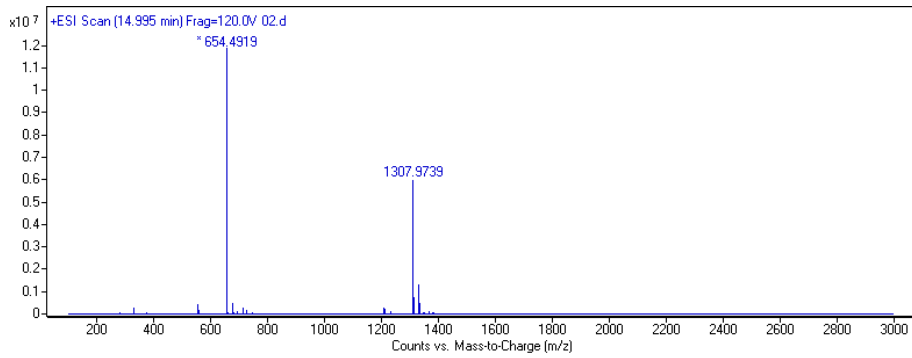
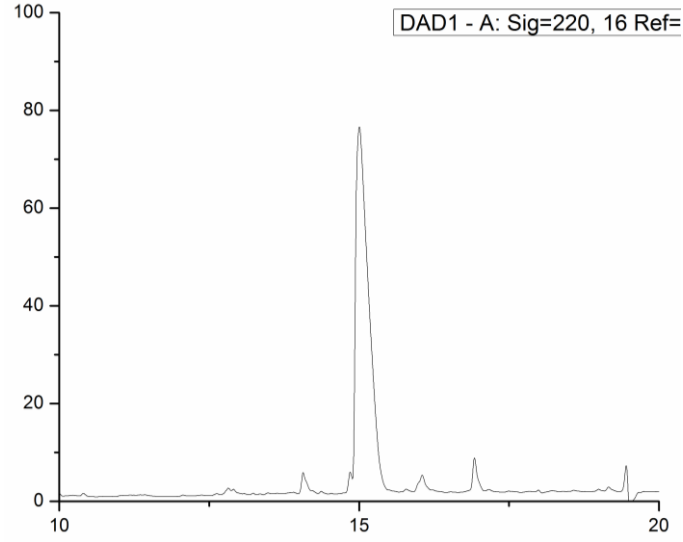


**Şekil 2.** YIGSR-PA'nın LC-MS'de 220 nm'de absorbans-zaman grafiği ve RP-HPLC kromatogram grafiği;  $[M+H]^+$  (gözlemlenen): 1230,81,  $[M+H]^+$  (hesaplanan): 1230,81,  $[M+2H]^{2+}/2$  (gözlemlenen): 615,92,  $[M+2H]^{2+}/2$  (hesaplanan): 615,92.

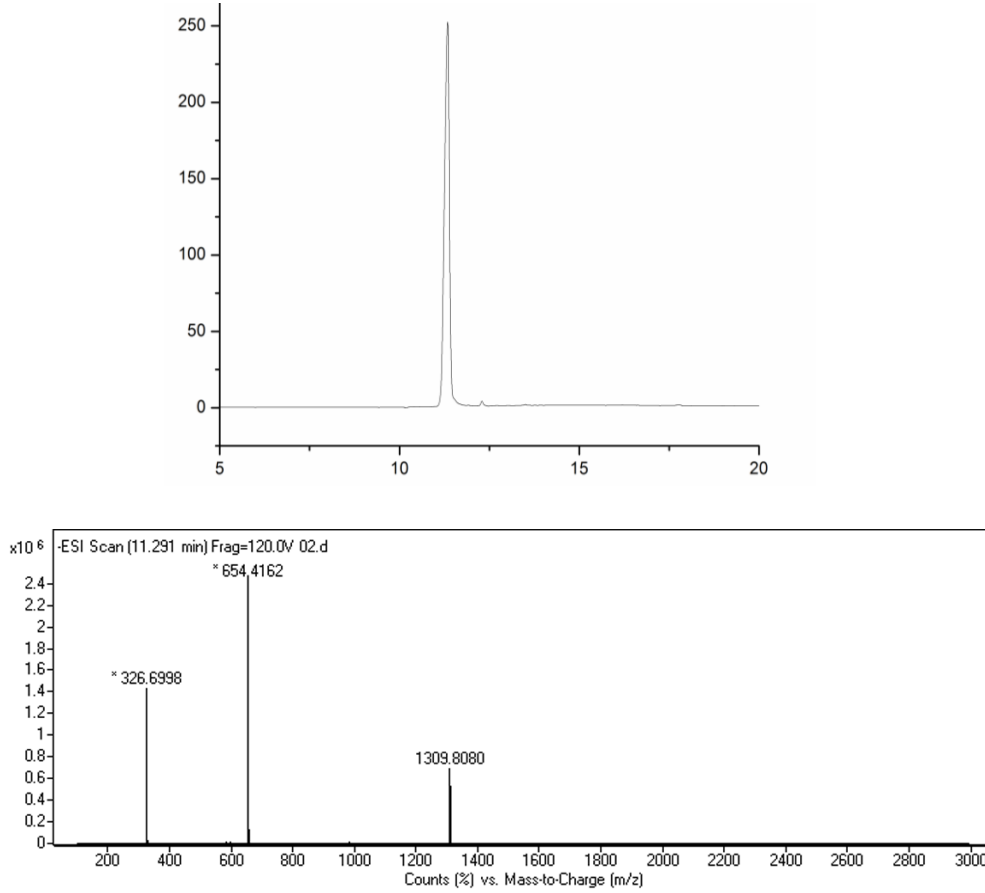




**Şekil 3.** KKRGD-PA'nın LC-MS'de 220 nm'de absorbands-zaman grafiği ve RP-HPLC kromatogram grafiği;  $[M+H]^+$  (observed): 1110,90,  $[M+H]^+$  (calculated): 1110,39,  $[M+2H]^{2+}$  (observed): 556,  $[M+2H]^{2+}$  (calculated): 556.



**Şekil 4.** K-PA'nın LC-MS'de 220 nm'de absorbands-zaman grafiği ve RP-HPLC kromatogram grafiği;  $[M+H]^+$  (observed): 654,49,  $[M+H]^+$  (calculated): 654,49,  $[2M+H]^+$  (observed): 1307,97,  $[2M+H]^+$  (calculated): 1307,97.

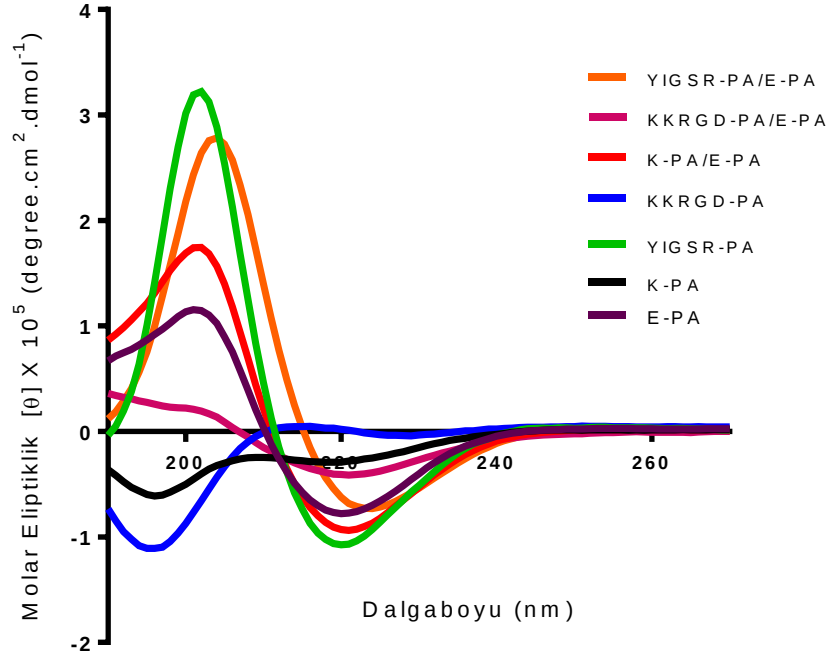


**Şekil 5.** E-PA'nın LC-MS'de 220 nm'de absorbands-zaman grafiği ve RP-HPLC kromatogram grafiği;  $[M-H]^-$  (observed): 654,41,  $[M-H]^-$  (calculated): 654,41,  $[M-2H]/2^{-2}$  (observed): 326,69,  $[M-2H]/2^{-2}$  (calculated): 326,69,  $[2M-H]^-$  (observed): 1309,80,  $[2M-H]^-$  (calculated): 1309,80.

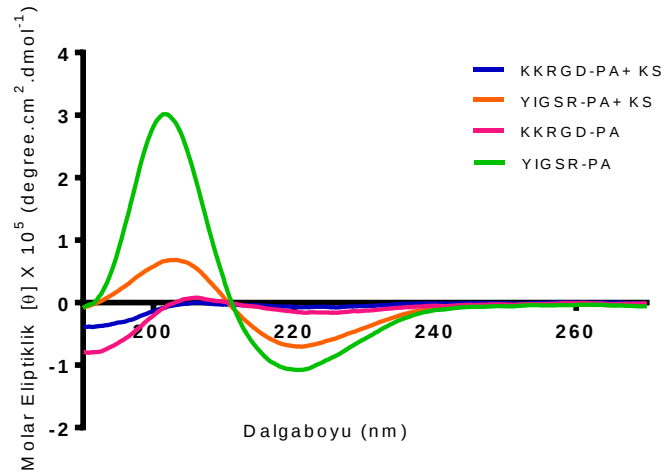
LC-MS sonuçlarından görüldüğü üzere moleküllerin sentezinde sorun olmayıp, malzemeler, teorik olarak hesaplanan molekül ağırlığına sahiptir. Ayrıca saflıkları incelendiğinde, moleküllerin hücre kültürü çalışmalarında kullanılabilecek niteliklere sahip oldukları görülmüştür.

PA jellerinin dairesel dikroizm (CD) spektrası, karışım içerisindeki amfifilik peptit nanofiberlerinin ikincil yapı olarak beta yaprağı (beta-sheet) formunu oluşturduğunu göstermiştir (Şekil 6). Beta yaprağı CD spektrumunda 218 nm'de negatif çukur noktasını vererek beta yaprağının yoğunluğunu, 195 nm'de pozitif tepe noktasını vererek beta-yaprağı oluşum sıklığını belirtmekte olup, ölçümlerimizde aynı profil gözlenmiştir. Daha önce de belirtildiği gibi bu çalışmanın *in vitro* kısmında pozitif yüklü (YIGSR-PA, KKRGD-PA ve K-PA) PA molekülleri, negatif yüklü olan E-PA ile karıştırılarak jel elde edilmiştir. Ancak korneanın kendi doğal yapısında bulunan kondroitin sülfat, dermatan sülfat gibi ajanlar negatif yüklü olduğu için *in vivo* çalışmalarda E-PA'ya ihtiyaç duyulmamıştır. Dolayısıyla yöntem kısmında

belirtildiği gibi *in vivo* karakterizasyon için PA molekülleri kondroitin sülfat (KS) ile jelleştirilmiştir (Şekil 7)



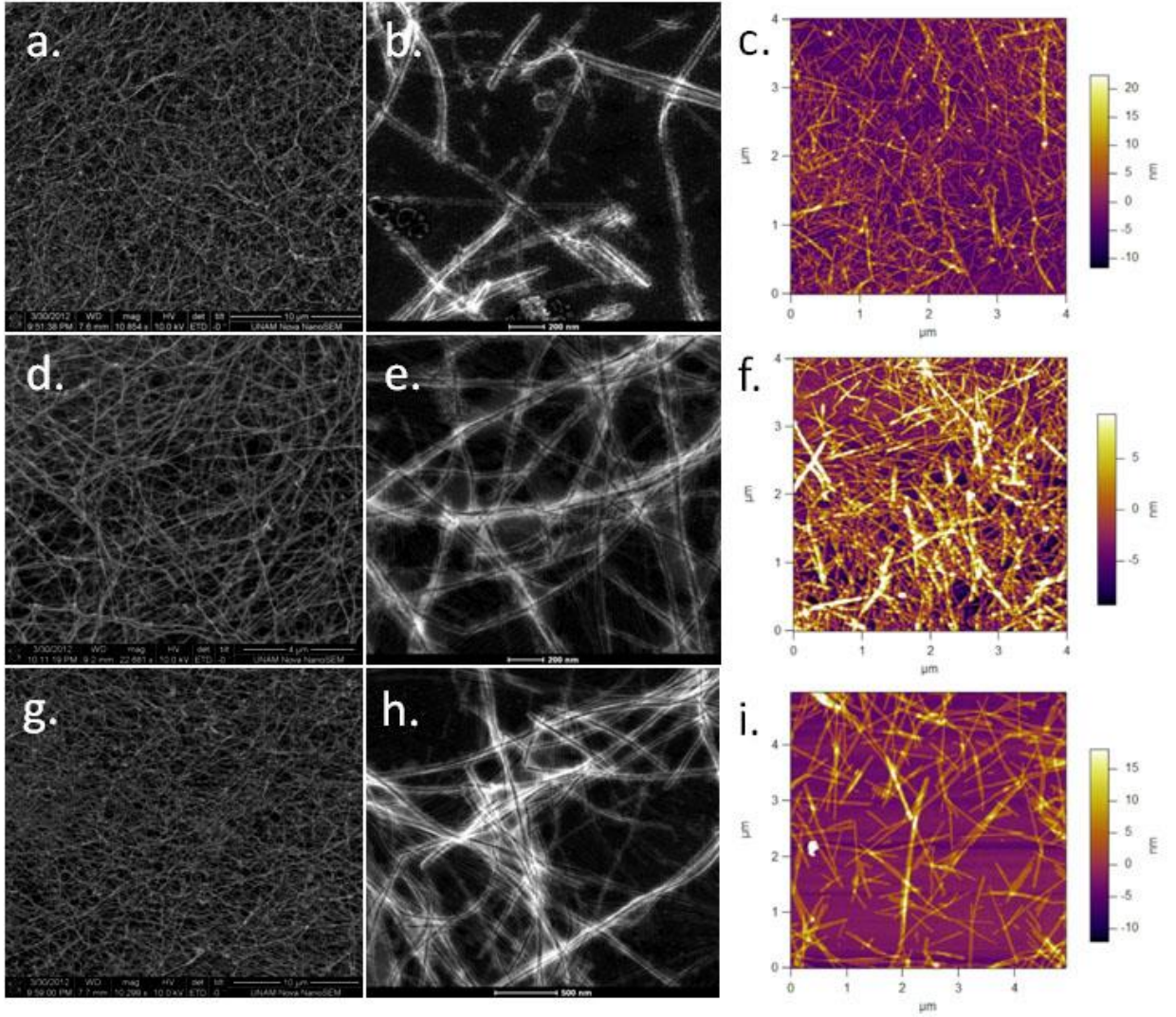
**Şekil 6.** *In vitro* çalışmalarda kullanılan PA moleküllerinin ve karışımları ile elde edilen nanofiberlerin ikincil yapısını gösteren dairesel dikroizm analizi



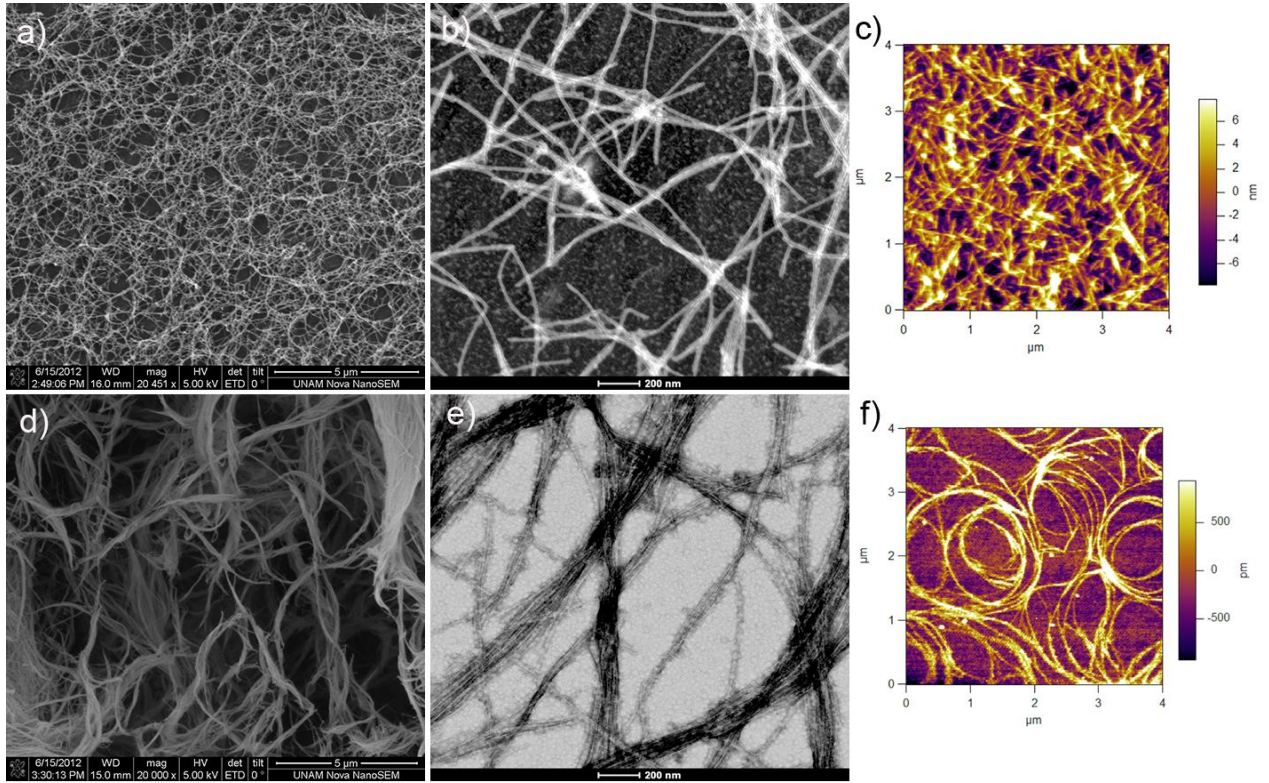
**Şekil 7.** *In vivo* çalışmalarda kullanılan PA moleküllerinin ve karışımları ile elde edilen nanofiberlerin ikincil yapısını gösteren dairesel dikroizm analizi

Hücreler arası ortam, hücrelere tutunma ve göç etme gibi fizyolojik işlevleri sağlayan bir yapıdır. Dolayısıyla doku iskelesi olarak kullanılacak olan materyallerin de hücrelere benzer konforu sağlaması oldukça önemlidir. Sentezlenen biyomalzemelerin, genel olarak hücrelere mekanik destek sağlamaları ve hücrelerin ortamdaki bileşenlere rahatlıkla erişebilmelerini

sağlayan porlu bir yapıya sahip olmaları aranan özelliklerdir. Doğal hücrelerarası matris, protein nanofiberler, glikozaminoglikanlar ve diğer yapısal biyomoleküllerin bir araya gelmesiyle oluşturduğu nanofiber ağlardan meydana gelmektedir. Bu amaçla çalışmada kullanılan olan moleküllerin hücreler arası ortamla yapısal benzerliği TEM, SEM ve AFM görüntülemeleri ile araştırılmıştır. TEM ve AFM görüntülemeleri ile peptitlerin nanofiber yapıları tanımlanmış olup SEM görüntülemesi ile de yapıların hücrelere mekanik destek verebilecek, madde ve hücre göçünü kolaylaştırıcı boşluklu bir yapıya sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 8 ve 9).



**Şekil 8.** *In vitro*'da kullanılan PA nano yapılarının mikroskopik karakterizasyonu. (a-c) YIGSR-PA ve E-PA, (d-f) KKRGD-PA ve E-PA, (g-i) K-PA gel ve E-PA'nın sırasıyla SEM, TEM ve AFM görüntüleri

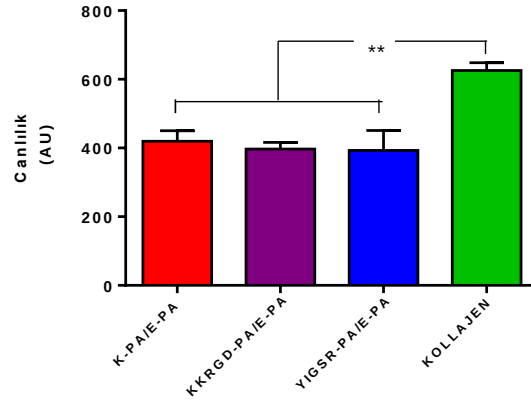


**Şekil 9.** *In vivo*'da kullanılan PA nano yapılarının mikroskopik karakterizasyonu. (a-c) YIGSR-PA ve KS, (d-f) KKRGD-PA ve KS'in sırasıyla SEM, TEM ve AFM görüntüleri

Karakterizasyon çalışmalarının ardından PA moleküllerinin *in vitro* koşullardaki etkileri incelenmiştir. *In vitro* çalışmalarda temel olarak 3 özelliğe bakılmıştır:

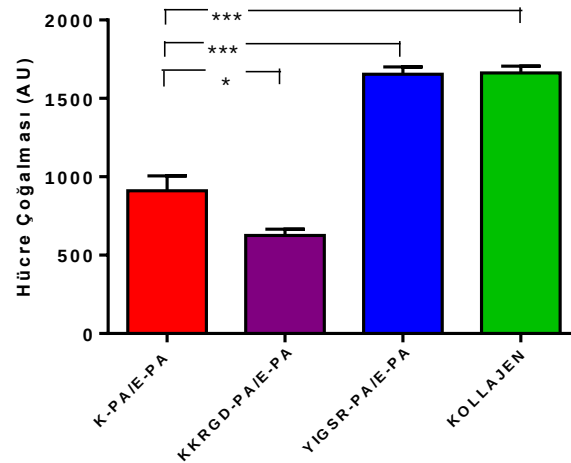
1. Elde edilen jellerin biyoyumluluğunun incelenmesine yönelik canlılık testi.
2. Doku iskelesi olarak kullanılacak jellerin HTK hücrelerinin çoğalması üzerine etkisi.
3. HTK hücrelerinin jeller üzerine yapışması ve hücrelerin morfolojilerinin incelenmesi.

Hücrelerin canlılığı, HTK hücre hattı ile 24 saat sonunda incelenmiştir. Elde edilen veriler, biyoaktif olmayan K-PA ile biyoaktif PA grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını göstermiştir. Bununla birlikte, pozitif kontrol olarak kullanılan kollajen kaplama üzerinde diğer gruplara kıyasla hücre canlılığında önemli bir artış görülmektedir (Şekil 10). Bunun nedeninin, kollajenin doğal hücreler arası matris içinde bulunan önemli bir protein olması ve hücre canlılığı için önemli olan birçok biyolojik ve mekanik özellikleri üzerinde barındırması olarak düşünülmektedir.



**Şekil 10.** PA nanofiberlerinin kornea fibroblast hücrelerinin canlılığına olan etkisi

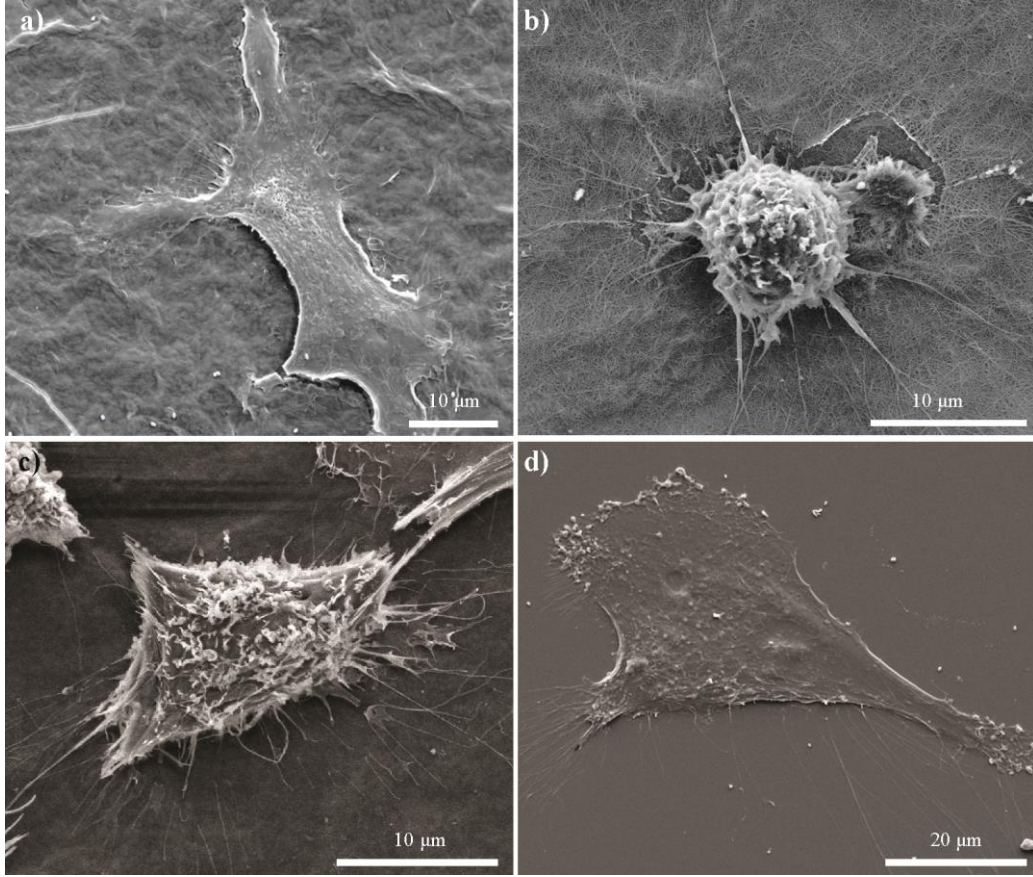
Hücre çoğalmasının belirlenmesine yönelik 72 saat sonunda yapılan Alamar mavisi boyamasının sonuçları Şekil 11’de gösterilmiştir. YIGSR-PA/E-PA kaplı yüzeylerde büyütülen hücrelerde, 72 saat sonunda kollajen ile benzer bir çoğalma görülmüştür. Elde edilen sonuçlar, diğer gruplara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Diğer yandan, KKRGD-PA/E-PA üzerindeki hücrelerde, kontrol nanofiberlerle karşılaştırıldığında daha yavaş çoğalma görülmüştür.



**Şekil 11.** PA nanofiberlerinin kornea fibroblast hücrelerinin çoğalmasına olan etkisi

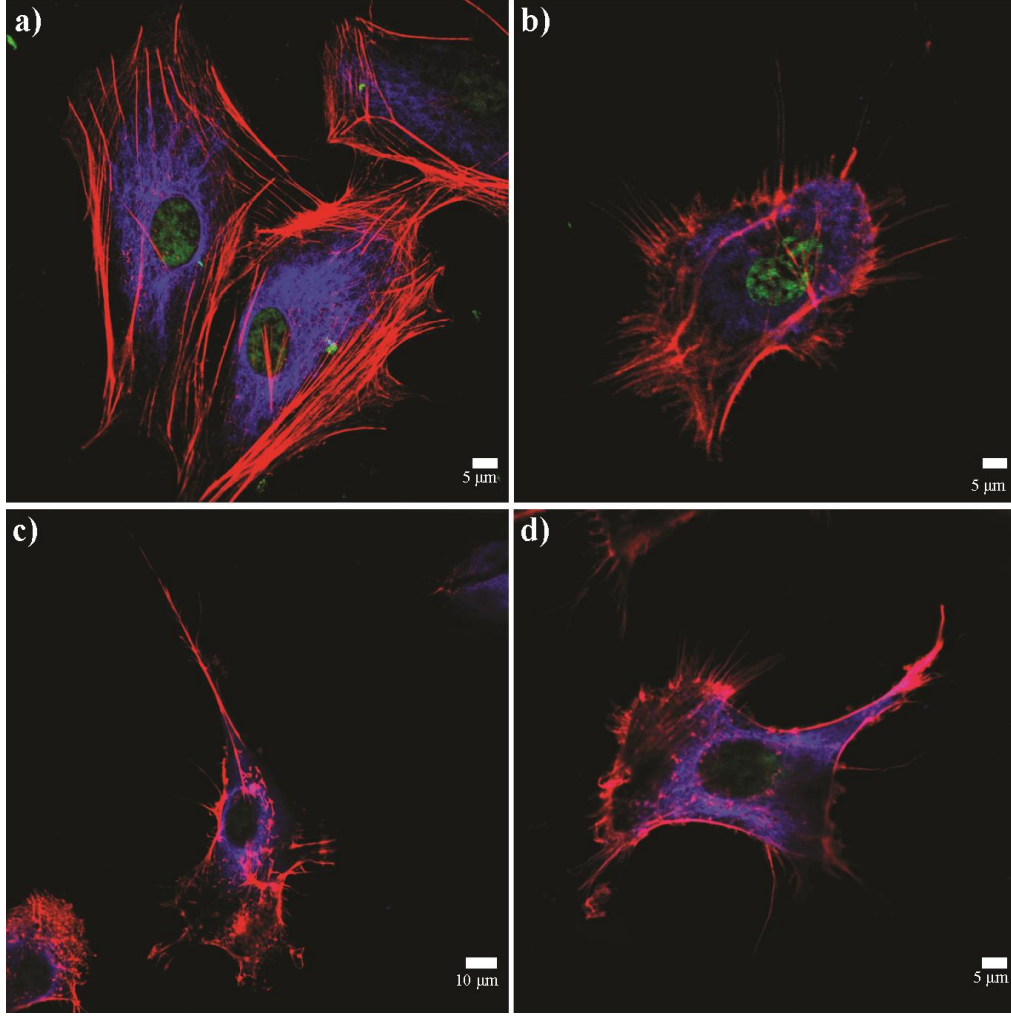
Doğal ortamlarında hücreler, hücreler arası matrise yapışarak yayılma, göç etme, çoğalma ve farklılaşma gibi hücreler için önemli yaşamsal faaliyetleri sürdürme eğilimindedirler. HTK hücrelerinin YIGSR-PA/E-PA ve KKRGD-PA/E-PA üzerinde yapışmaları, yayılmaları ve morfolojileri SEM görüntülemesi ile incelenmiştir (Şekil 12). Pozitif

kontrol olarak kollajen kaplı yüzeyler kullanılmıştır. YIGSR-PA nanofiber üzerindeki hücreler, kollajen üzerindeki hücrelere benzer bir morfoloji sergilemiştir. Bu sonuç, çoğalma testinden elde edilen verilerle uyumlu bulunmuştur. KKRGD-PA fiberler üzerinde büyütülen hücreler ise negatif kontrol olarak kullanılan ve biyoaktif özelliği olmayan K-PA ile benzer bir morfoloji göstermiştir.



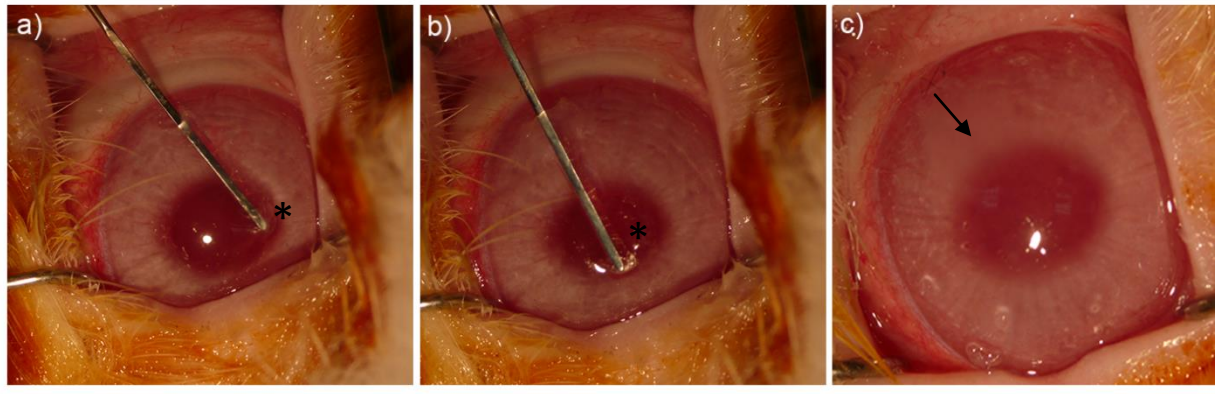
**Şekil 12.** (a) YIGSR-PA, (b) KKRGD-PA, (c) K-PA ve (d) kollajen kaplı yüzeylerde kornea fibroblastlarının tutunma profilleri

Vimentin, keratositler için ana yapısal proteinlerden biri olup hücrelerin, sentezlenen malzemeler üzerinde fonksiyonel bir farklılık oluşturup oluşturmadığını test etmek amacıyla kullanılmıştır. Yapılan immünohistokimyasal boyama sonucunda, hücrelerin yayılma profillerinin SEM görüntüleri ile benzer olduğu görülmüştür. Ayrıca, malzemelerin hücre fonksiyonelliğinde herhangi bir olumsuz etkisi olmadığı bulunmuştur (Şekil 13).



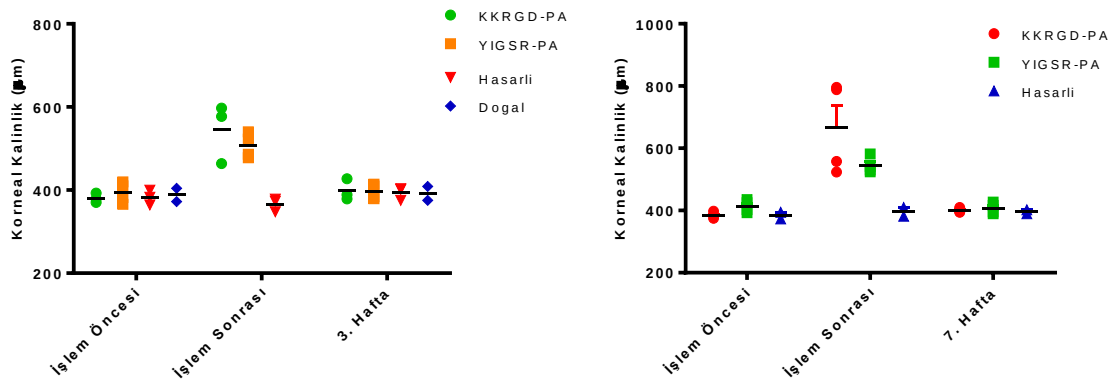
**Şekil 13.** (a) YIGSR-PA, (b) KKRGD-PA, (c) K-PA ve (d) kollajen kaplı yüzeylerde hücrelerin morfolojileri ve yayılma davranışları. (kırmızı: TRITC-konjuge falloidin, mavi: vimentin, yeşil: TO-PRO®-3)

Hücre kültürü çalışmalarının ardından PA jellerin kornea iyileşmesi üzerine etkileri tavşan stroma hasarı modeliyle incelenmiştir. Daha önce Gereçler ve Yöntem kısmında anlatıldığı gibi tavşan kornealarına ameliyatla zarar verilmiş ve oluşan ceplere YIGSR-PA veya KKRGD-PA enjekte edilmiştir (Şekil 14). Herhangi bir enjeksiyonun yapılmadığı hasarlı kornealar negatif kontrol olarak kullanılmış, rejenerasyon miktarının karşılaştırılması için işlem yapılmamış sağlıklı kornealar kullanılmıştır.



**Şekil 14.** Kornea hasarı oluşturulması ve PA enjeksiyonunun temsili resimleri. a,b) Korneada teşrihçi ile hasar oluşturulması, c)KKRGD-PA enjeksiyonu. (Hasarlı bölge yıldızla, jel ok ile gösterilmiştir.

Daha önce belirtildiği üzere korneadaki en kalın tabaka stroma olup, stromanın kalınlığı ve yapısındaki kollajen fiber/keratosit diziliminin paralel olması korneanın kırıcılığını etkileyen en önemli parametrelerdir. Bu nedenle, sunulan çalışmada tavşan kornealarının merkez kalınlıkları da dikkate alınmıştır. Kornea kalınlığı, PA solüsyonu enjeksiyonu öncesi, sonrası ve 3 veya 7 hafta sonra dokular çıkarılmadan önce pakimetre ile ölçülmüştür (Şekil 15). Enjeksiyon sonrası YIGSR-PA enjekte edilen grup kornealarında ortalama 100  $\mu\text{m}$ 'lik artış görülürken KKRGD-PA enjekte edilen grupta 200  $\mu\text{m}$ 'lik bir artış görülmüştür. Ancak yapılan incelemelerde, 3. ve 7. hafta sonunda gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Bu sonuç, PA nanofiberlerin kornea kalınlıkları üzerine olumsuz bir etkisi olmadığını göstermiştir.



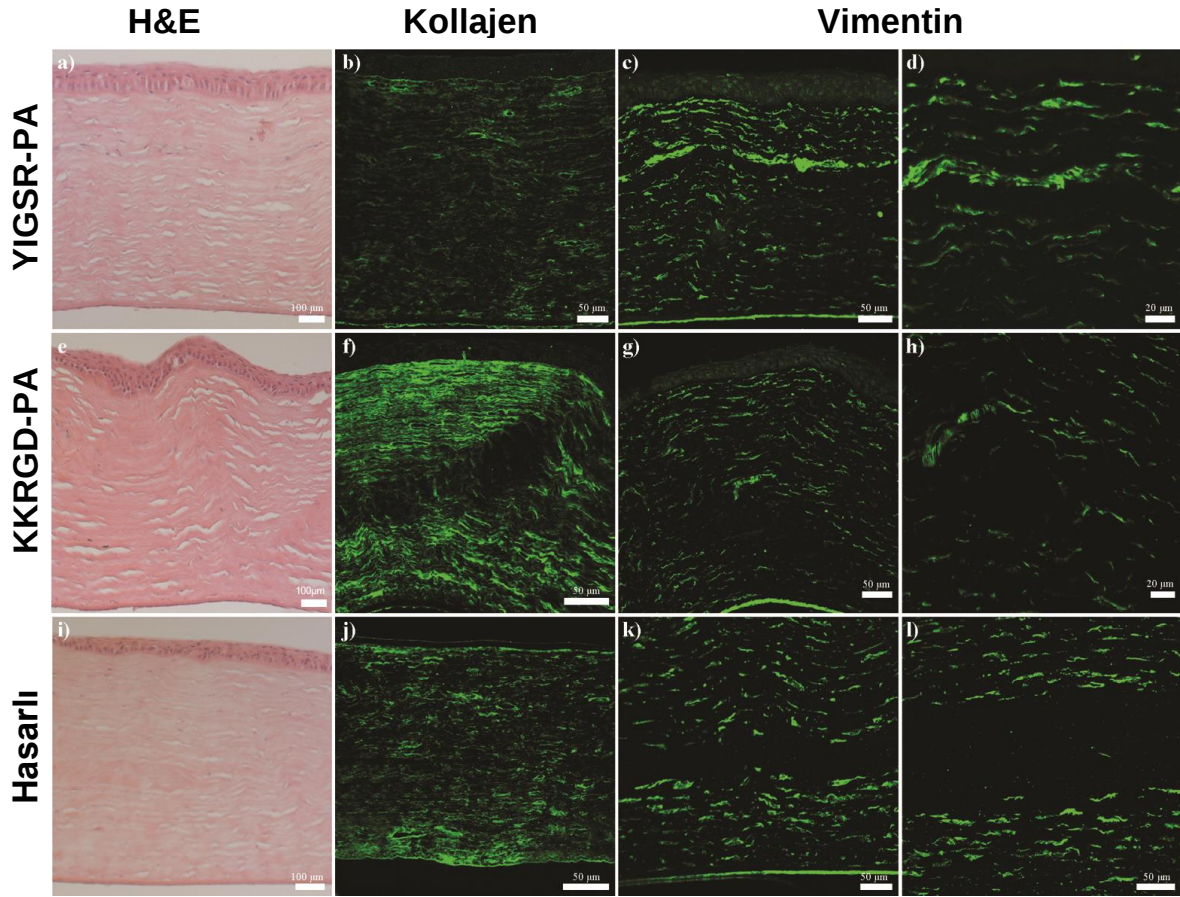
**Şekil 15.** a) 3. haftada ve b) 7. haftada kornea kalınlıkları

PA enjekte edilen grupların ve kontrol gruplarının rejenerasyonlarının incelenmesi için histolojik ve immünohistokimyasal boyamalar yapılmıştır. Korneadaki morfolojik değişikliklerin ve stromaya hücre göçünün incelenmesi için 3 hafta sonunda çıkarılan dokular

hematoksilen ve eozin (H&E) ile boyanmıştır (Şekil 16a). Sonuçlar incelendiğinde, YIGSR-PA enjekte edilen kornealarda hasarlı bölgeye keratosit göçü artmış ve kornea morfolojisi doğal korneaya (Şekil 18a) benzer görülmüştür. Ancak KKRGD-PA enjekte edilen kornealarda yapısal morfolojide bozukluklar görülmüştür (Şekil 16e). Ayrıca KKRGD-PA grubunda ve hasarlı kornealarda (Şekil 16i) stromanın hasarlı bölgesine hücre göçünün olmadığı görülmüştür.

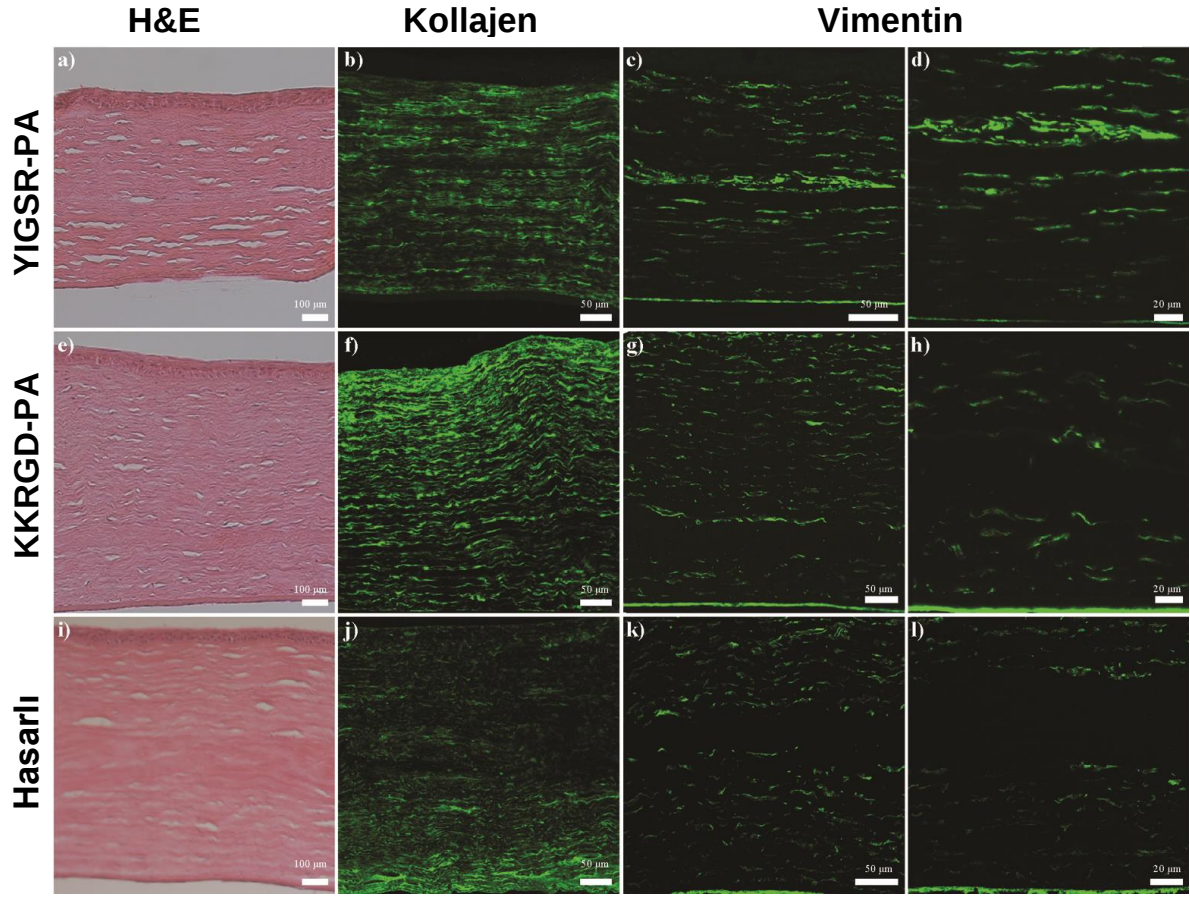
İmmüno histokimyasal boyamalarda stroma yapısının incelenmesi için kollajen I'e yönelik anti-kollajen I boyaması yapılmış, keratositlerin görüntülenmesi için de anti-vimentin boyaması yapılmıştır. Kornea stromasının organik içeriğinin %80'ini kollajen oluşturmakta olup en fazla bulunan kollajen çeşidi ise kollajen tip I'dir. Hasarlı korneanın rejenerasyonu için de kollajen I sentezi ve düzenli organizasyonu oldukça önemlidir. Bu nedenle 3. hafta örneklerinde kollajen I varlığı ve organizasyonu incelenmiştir. Kollajen I'in organizasyonu YIGSR-PA, hasarlı ve doğal kornealarda benzer görülse de KKRGD-PA örneklerinde dalgalı bir yapı belirlenmiştir (Şekil 16b, f ve j). Hasarlı grupta da görülen kollajen I'in, çevre yapılardan hasarlı bölgeye doğru şişme ve yayılma nedeniyle görüldüğü düşünülmektedir. Keratositlerin hasarlı bölgeye göçleri ise vimentin boyaması ile incelenmiştir. Sonuçlar, YIGSR-PA jeller üzerine yoğun bir hücre göçünün olduğunu göstermiştir (Şekil 16c, d). Ancak KKRGD-PA enjekte edilen bölgeye ve "hasarlı" örneklerde hasarlı bölgeye hücre göçünün olmadığı belirlenmiştir.

Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar, 3 hafta sonunda YIGSR-PA'in keratosit göçünü ve kollajen I sentezini arttırdığını göstermiştir. Hasar verildikten sonra enjeksiyon yapılmayan "Hasarlı" kornealarda kollajen I sentezi görülmesine karşın o bölgede hücre tespit edilememiştir. Bu durum, o bölgenin rejenere olamadığının göstergesi olarak alınmıştır. Benzer bir durum KKRGD-PA enjekte edilen gruplarda da görülmüştür. Sonuç olarak, PA nanofiberler üzerindeki biyoaktif epitopun kornea rejenerasyonunda büyük bir öneme sahip olduğu belirlenmiştir.

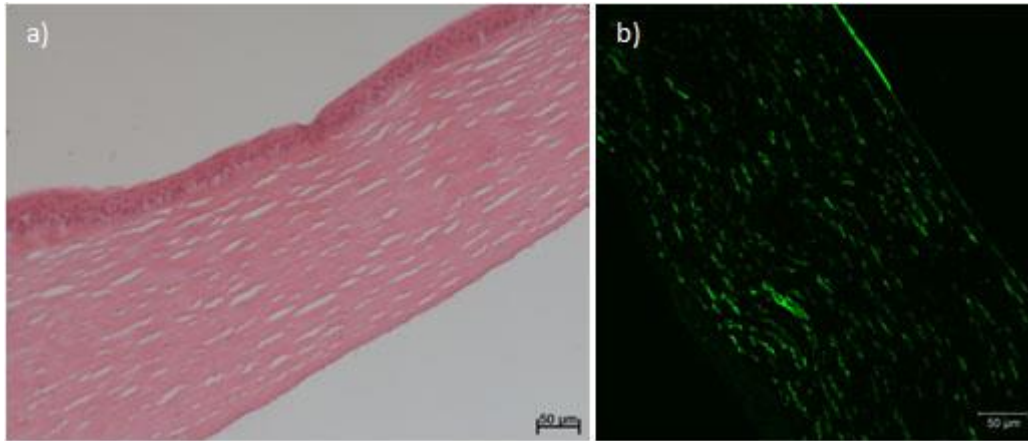


**Şekil 16.** Tavşan kornealarının işleminden 3 hafta sonraki histolojik ve immünohistokimyasal incelemeleri. (a-d) YIGSR-PA enjekte edilmiş, (b-h) KKRGD-PA enjekte edilmiş, (i-l) hasarlı kornea. Yıldızlar hasarlı alanı, oklar ise PA jellerini göstermektedir

Stroma rejenerasyonunun daha geç evrelerinin incelenmesi için 7 hafta sonunda da tavşan korneaları çıkarılmış ve 3. hafta örnekleri ile aynı boyamalar yapılmıştır. YIGSR-PA enjekte edilen gruplar, 7 hafta sonunda da H&E boyaması, anti-kollajen I boyaması ve anti-vimentin boyaması açısından benzer bir iyileşme profili sergilemiştir (Şekil 17a-d). Kornea morfolojisi doğal kornea gibi düzenli bir yapıda görülmüş; hücre göçü ve kollajen I sentezinin oldukça yoğun olduğu belirlenmiştir. “Hasarlı” örneklerde 7 hafta sonunda halen hücre göçü gözlenmemiştir (Şekil 17i-l). KKRGD-PA enjekte edilen örneklerde ise 3. hafta örneklerine kıyasla farklı bir durum görülmüş, korneanın yapısının daha düzenli olduğu ve kollajen organizasyonunun daha düzenli olduğu belirlenmiştir. Ancak 7 hafta sonunda halen hasarlı bölgeye hücre göçü görülmemiştir (Şekil 17c-h).



**Şekil 17.** Tavşan kornealarının işlemden 7 hafta sonraki histolojik ve immünohistokimyasal incelemeleri. (a-d) YIGSR-PA enjekte edilmiş, (b-h) KKRGD-PA enjekte edilmiş, (i-l) hasarlı kornea. Yıldızlar hasarlı alanı, oklar ise PA jellerini göstermektedir



**Şekil 18.** İşlem yapılmayan doğal korneaların H&E ve vimentin boyama görüntüleri

## SONUÇ

Bu çalışmada peptit nanoyapıların insan kornea fibroblast hücre canlılığı ve metabolizması üzerindeki etkileri araştırıldıktan sonra hayvan deneyleri ile doğal ortamdaki etkileri incelenmiştir. Kullanılan peptit amfifil molekülleri katı faz peptit sentez yöntemiyle kontrollü bir şekilde sentezlenmiş ve moleküllerin yapısal karakterizasyonları taramalı elektron mikroskobu (SEM), geçirgenli elektron mikroskobu (TEM) ve atomik kuvvet mikroskobu (AFM); kimyasal ve fiziksel karakterizasyonları ise sıvı kromatografi-kütle spektroskopisi ile dairesel dikroizm (CD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yapılan karakterizasyon çalışmaları sonucunda, SEM, TEM ve AFM görüntüleri peptitlerin nanofiber yapısında olduklarını ve ECM benzeri morfolojide olduklarını göstermiştir. Jellerin ve moleküllerin ikincil yapılarının belirlenmesi için yapılan CD analizi sonucunda bu moleküllerin beta yaprağı şeklinde olduğu belirlenmiştir.

Peptit nanofiberlerin *in vitro* koşullardaki etkisi, insan kornea fibroblast hücre hattı olan HTK hücreleriyle incelenmiştir. İlk olarak 24 saat sonunda yapılan canlılık testi ile PA moleküllerinin hücre canlılığı üzerinde olumsuz bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Hücre çoğalması, Alamar mavi boyaması ile 72 saat sonunda test edilmiş ve elde edilen veriler, YIGSR-PA/E-PA jelinin pozitif kontrol olarak kullanılan kollajene benzer şekilde hücre çoğalmasını artırdığını göstermiştir. KKRGD-PA/E-PA jellerde böyle bir artış görülmemiş, biyoaktif özelliği bulunmayan ve negatif kontrol olarak kullanılan K-PA/E-PA jellere benzer bir sonuç elde edilmiştir. Daha sonra hücre-matriks ilişkisini incelemek için SEM ve konfokal görüntülemeleri yapılmış, hücrelerin yayılması, morfolojileri ve fonksiyonellikleri incelenmiştir. YIGSR-PA jeller üzerindeki hücreler yayılırken KKRGD-PA üzerindeki hücrelerin çok yayılmadığı görülmüştür. Bunun nedeninin, RGD epitopunun PA fiberler üzerinde hücreler için yeterli sinyali sağlayamamasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Hücre iskeletinin, çekirdeklerinin ve keratosit markörü olan vimentinin boyanmasından sonra alınan konfokal görüntüleri de hücre yayılması hakkında benzer sonuçları göstermiştir. Vimentin boyaması incelendiğinde ise YIGSR-PA jel üzerinde büyüyen hücrelerin daha çok yayıldığı ve daha fazla vimentin ekspresyonu olduğu belirlenmiştir. Benzer sonuç kollajen üzerinde büyütülen hücrelerde de görülmüştür. Ancak K-PA ve KKRGD-PA üzerindeki hücrelerde vimentin boyaması görülmesine rağmen diğer iki grup kadar fazla ekspresyon görülmemiştir.

Hücre kültürü çalışmasından sonra *in vivo* çalışmalar gerçekleştirilmiş ve model organizma olarak 2,5-3 kg ağırlığında *Yeni Zelanda* beyaz tavşanlar kullanılmıştır. Tavşanların kornea stromalarına disektör ile hasar verilmiş ve 0,25 M sükröz çözeltisi içinde çözünen YIGSR-PA ve KKRGD-PA solüsyonları enjekte edilmiştir. Şırınganın girdiği bölge sütur ile dikilmiştir. Bu moleküller pozitif yüklü oldukları için oldukça yoğun bir negatif iç yüke sahip stroma içine

enjekte edildikleri anda jelleşme gerçekleşmiştir. Hasar verilen ve verilmeyen sağlıklı kornealar negatif ve pozitif kontrol grupları olarak kullanılmışlardır. Enjeksiyon öncesi, sonrası ve 3 veya 7 hafta sonra dokular alınmadan önce korneaların kalınlıkları pakimetre ile ölçülmüş, enjeksiyon sonrası jel oluşumuna bağlı olarak kornea kalınlıklarında artış görülürken 3 ve 7 hafta sonunda tüm kornealar yakın kalınlıkta ölçülmüştür. Bu sonuç, enjekte edilen moleküllerin hücre incelmeye ya da kalınlaşmasına neden olmadığını göstermiştir. Doku rejenerasyonunun belirlenmesi için belirlenen haftalarda tavşanlardan kornealar çıkarılmış ve parafine emdirilerek bloklanmışlardır. Kesitleri alınan örneklerin H&E ve immünohistokimyasal boyamaları yapılmıştır. 3. hafta sonunda YIGSR-PA enjekte edilen korneaların yapılarının düzenli olduğu, kollajen I sentezinin olduğu ve hücre göçünün arttığı belirlenmiştir. Benzer durum 7. hafta sonunda da gözlenmiştir. KKRGD-PA içeren gruplarda ise 3. hafta sonunda kornea yapısının lineer yerine dalgalı olduğu görülmüştür. H&E sonuçları, kollajen I boyaması ile de doğrulanmıştır. Bu durum 7 hafta sonunda düzelmiş olmasına rağmen hasarlı bölgede hücre varlığı ne 3. haftada ne de 7. haftada gözlenmemiştir. Negatif kontrol grubu olan “Hasarlı” grupta ise kornea yapısı her iki zaman diliminde de düzenli olmasına rağmen bu örneklerde de hücre göçü görülmemiştir. Bu sonuçlar, YIGSR-PA’nın kornea rejenerasyonu için önemli olan düzenli bir stroma organizasyonu ve hücre göçünün sağlanmasında etkili bir molekül olduğu belirlenmiştir. YIGSR sekansı içeren peptit amfifil molekülleri hem HTK hücreleri üzerinde hem de *in vivo* çalışmalarda keratosit hücreleri üzerinde olumlu sonuçlar göstermiştir. RGD sekansı içeren KKRGD-PA grubu beklenildiği kadar iyi sonuç vermemiştir. *In vitro* çalışmalarda da, KKRGD-PA’nın biyoaktif epitop bulundurmeyen K-PA ile benzer sonuçlar verdiği görülmüştür. Bu durum, sentezlenen KKRGD-PA molekülünün üzerindeki biyoaktif RGD epitopunun hücreler tarafından algılanamamış olduğunu düşündürmüştür. Bu nedenle hücreler de beklenen cevabı vermemiş ve matriksle gerekli etkileşimi kuramamıştır.

Sonuç olarak bu çalışmada YIGSR ve RGD sekanslarını içeren peptit bazlı doku iskelelerinin kornea stroma rejenerasyonundaki etkileri araştırılmıştır. Bildiğimiz kadarıyla ilk kez bu çalışmada, peptit amfifil molekülleri kornea rejenerasyonu için kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar ışığında, YIGSR-PA’nın kornea stroma rejenerasyonunda hidrojel iskele olarak kullanılmak üzere umut vaat eden bir molekül olduğu belirlenmiştir.

## KAYNAKÇA

ALAMINOS M.,SÁNCHEZ-QUEVEDO M. D. C.,MUÑOZ-ÁVILA J. I.,SERRANO D.,MEDIALDEA S.,CARRERAS I. and CAMPOS A., Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold, *Investigative ophthalmology & visual science*, 47, 3311-7, (2006)

BOATENG S. Y.,LATEEF S. S.,MOSLEY W.,HARTMAN T. J.,HANLEY L. and RUSSELL B., RGD and YIGSR synthetic peptides facilitate cellular adhesion identical to that of laminin and fibronectin but alter the physiology of neonatal cardiac myocytes, *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 288, C30-C8, (2005)

CARLSSON D. J.,LI F.,SHIMMURA S. and GRIFFITH M., Bioengineered corneas: how close are we?, *Current opinion in ophthalmology*, 14, 192-7, (2003)

CHOW L. W.,BITTON R.,WEBBER M. J.,CARVAJAL D.,SHULL K. R.,SHARMA A. K. and STUPP S. I., A bioactive self-assembled membrane to promote angiogenesis, *Biomaterials*, 32, 1574-82, (2011)

GERMAIN L.,CARRIER P.,AUGER F. A.,SALESSE C. and GUÉRIN S. L., Can we produce a human corneal equivalent by tissue engineering?, *Progress in retinal and eye research*, 19, 497-527, (2000)

GRIFFITH M.,OSBORNE R.,MUNGER R.,XIONG X.,DOILLON C. J.,LAYCOCK N. L.,HAKIM M.,SONG Y. and WATSKY M. A., Functional human corneal equivalents constructed from cell lines, *Science*, 286, 2169-72, (1999)

HASHIMOTO Y.,FUNAMOTO S.,SASAKI S.,HONDA T.,HATTORI S.,NAM K.,KIMURA T.,MOCHIZUKI M.,FUJISATO T. and KOBAYASHI H., Preparation and characterization of decellularized cornea using high-hydrostatic pressurization for corneal tissue engineering, *Biomaterials*, 31, 3941-8, (2010)

HAY E. D. and MEIER S., Stimulation of corneal differentiation by interaction between cell surface and extracellular matrix: II. Further studies on the nature and site of transfilter "induction", *Developmental biology*, 52, 141-57, (1976)

JESTER J. V.,HUANG J.,FISHER S.,SPIEKERMAN J.,CHANG J. H.,WRIGHT W. E. and SHAY J. W., Myofibroblast differentiation of normal human keratocytes and hTERT, extended-life human corneal fibroblasts, *Investigative ophthalmology & visual science*, 44, 1850-8, (2003)

KLENKLER B. and SHEARDOWN H., Growth factors in the anterior segment: role in tissue maintenance, wound healing and ocular pathology, *Experimental eye research*, 79, 677-88, (2004)

LIU W.,MERRETT K.,GRIFFITH M.,FAGERHOLM P.,DRAVIDA S.,HEYNE B.,SCAIANO J. C.,WATSKY M. A.,SHINOZAKI N. and LAGALI N., Recombinant

human collagen for tissue engineered corneal substitutes, *Biomaterials*, 29, 1147-58, (2008)

MARLETTA G., CIAPETTI G., SATRIANO C., PAGANI S. and BALDINI N., The effect of irradiation modification and RGD sequence adsorption on the response of human osteoblasts to polycaprolactone, *Biomaterials*, 26, 4793-804, (2005)

MASSIA S., RAO S. and HUBBELL J., Covalently immobilized laminin peptide Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR) supports cell spreading and co-localization of the 67-kilodalton laminin receptor with alpha-actinin and vinculin, *Journal of Biological Chemistry*, 268, 8053-9, (1993)

MATA A., GENG Y., HENRIKSON K. J., APARICIO C., STOCK S. R., SATCHER R. L. and STUPP S. I., Bone regeneration mediated by biomimetic mineralization of a nanofiber matrix, *Biomaterials*, 31, 6004-12, (2010)

MORISHIGE N., PETROLL W. M., NISHIDA T., KENNEY M. C. and JESTER J. V., Noninvasive corneal stromal collagen imaging using two-photon-generated second-harmonic signals, *Journal of cataract and refractive surgery*, 32, 1784, (2006)

ORWIN E. J. and HUBEL A., In vitro culture characteristics of corneal epithelial, endothelial, and keratocyte cells in a native collagen matrix, *Tissue engineering*, 6, 307-19, (2000)

SAIKI I., MURATA J., IIDA J., SAKURAI T., NISHI N., MATSUNO K. and AZUMA I., Antimetastatic effects of synthetic polypeptides containing repeated structures of the cell adhesive Arg-Gly-Asp (RGD) and Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR) sequences, *British journal of cancer*, 60, 722, (1989)

SHAH R. N., SHAH N. A., LIM M. M. D. R., HSIEH C., NUBER G. and STUPP S. I., Supramolecular design of self-assembling nanofibers for cartilage regeneration, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 3293-8, (2010)

SILVA G. A., CZEISLER C., NIECE K. L., BENIASH E., HARRINGTON D. A., KESSLER J. A. and STUPP S. I., Selective differentiation of neural progenitor cells by high-epitope density nanofibers, *Science*, 303, 1352-5, (2004)

TOKSOZ S., MAMMADOV R., TEKINAY A. B. and GULER M. O., Electrostatic effects on nanofiber formation of self-assembling peptide amphiphiles, *Journal of colloid and interface science*, 356, 131-7, (2011)

TORBET J., MALBOUYRES M., BUILLES N., JUSTIN V., ROULET M., DAMOUR O., OLDBERG Å., RUGGIERO F. and HULMES D. J., Orthogonal scaffold of magnetically aligned collagen lamellae for corneal stroma reconstruction, *Biomaterials*, 28, 4268-76, (2007)

WALKER J.,ALTMAN E. and ROTH J., An in vivo study of novel bioactive peptides that inhibit the growth of Escherichia coli, *The Journal of Peptide Research*, 58, 380-8, (2001)

WHITCHER J. P.,SRINIVASAN M. and UPADHYAY M. P., Corneal blindness: a global perspective, *Bulletin of the World Health Organization*, 79, 214-21, (2001)

WHITCHER J. P.,SRINIVASAN M. and UPADHYAY M. P., Prevention of corneal ulceration in the developing world, *International ophthalmology clinics*, 42, 71-7, (2002)

**TÜBİTAK**  
**PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

|                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|-----------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Proje Yürütücüsü:                       | Yrd. Doç. Dr. BAHRİ AYDIN                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Proje No:                               | 110S454                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Proje Başlığı:                          | Yapay biyoaktif matrislerle korneal stroma rejenerasyonu                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Proje Türü:                             | Araştırma                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Proje Süresi:                           | 24                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Araştırmacılar:                         | ŞAKİR NECAT YILMAZ,<br>AHMET MURAD HONDUR,<br>MUSTAFA KAMİL BİLGİHAN                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Danışmanlar:                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: | İSTANBUL MEDENİYET Ü. TIP F. GÖZTEPE EĞİTİM HASTANESİ                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:  | 01/05/2011 - 01/05/2013                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Onaylanan Bütçe:                        | 149960.0                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Harcanan Bütçe:                         | 109570.83                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Öz:                                     | <p>Travma veya maküler distrofi ve keratokonus gibi hastalıkların neden olduğu kornea stroma hasarları görme kaybına neden olmaktadır. Bu tür hastalıkların tedavisi için yeni tedavi tekniklerinin geliştirilmesi önemlidir. Bu çalışmada, kornea doku rejenerasyonu için kullanılabilecek biyoaktif peptit nanofiber sistemler geliştirilmiştir. Bu nanofiberler, laminin ve fibronektinden esinlenilen peptit sekanslarını içeren ve kendiliğinden düzenlenme özelliğine sahip peptit amfifil molekülleri ile oluşturulmuştur. Bu peptit nanofiber sistemlerin biyoyumluluğu, insan kornea keratosit hücre hattı olan HTK hücrelerinin in vitro kültürleri ile gösterilmiştir. Laminin-mimetik peptit nanofiberler üzerinde kültürlen HTK hücreleri karakteristik morfolojilerini sergilemiş ve bu yüzeyler üzerindeki hücrelerin çoğalması fibronektin benzeri nanofiberler üzerinde çoğaltılan hücrelere kıyasla artmıştır. Bu nanofiberler tavşan kornealarına enjekte edildiğinde de laminin-mimetik nanofiberler yara bölgesine keratosit göçünü artırmış ve stroma rejenerasyonunu sağlamıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar, enjekte edilebilir laminin-mimetik peptit nanofiberlerin kornea doku rejenerasyonu için umut vaat eden sentetik bir doku iskelesi sistemi olduğunu göstermiştir.</p> |
| Anahtar Kelimeler:                      | Kornea stroma rejenerasyonu, YIGSR, RGD, peptit amfifil                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:  | Hayır                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |