ANKARA ÜNİVERSİTESİ

BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GRAFEN TABANLI MALZEMELERİN İNSAN MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİ NÖRONLARA FARKLILAŞTIRMA POTANSİYELİ

Döndü Tuğçe Şahin

Danışman Öğretim Üyesi

Doç. Dr. Açelya Yılmazer Aktuna

Ocak

2020

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağlı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Döndü Tuğçe Şahin

ONAY

Doç. Dr. Açelya Yılmazer Aktuna danışmanlığında Döndü Tuğçe Şahin tarafından hazırlanan bu çalışma 06/01/2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Dr. Öğr. Üyesi Nihal TERZİ ÇİZMECİOĞLU İmza:

Üye: Doç. Dr. Açelya YILMAZER AKTUNA İmza:

Üye: Doç. Dr. Bala GÜR DEDEOĞLU İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Grafen Tabanlı Malzemelerin İnsan Mezenkimal Kök Hücreleri Nöronlara Farklılaştırma Potansiyeli

Döndü Tuğçe Şahin

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Doç. Dr. Açelya Yılmazer Aktuna

Grafen; mekanik özellikleri, elektrik iletkenliği, yüzey alanı, kimyasal kararlılığı gibi olağanüstü birçok özelliğinin keşfi ile son zamanlarda bilim camiasında büyük ilgi gören bir malzeme olmuştur. Elektronikten biyomedikale, rejeneratif tıptan biyosensörlere çalışma alanı çok geniş olan grafenin henüz anlaşılamayan biyolojik özellikleri mevcut olduğu için araştırılmaya devam edilmesi gerekmektedir. Rejeneratif özelliği çok kısıtlı olan nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde grafen tabanlı malzemelerin tasarımı büyük umut vaat etmektedir. Canlı sistemlerde güvenle kullanılabilmesi için materyalin sitotoksik özelliğe sahip olmaması ve biyouyumluluğu araştırmalarda önemli kriterler arasındadır.

Bu tez çalışmasında insan adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin (hASC) farklı derişimlerdeki grafen türevi olan grafen nanoşeritler (GNR) ve grafen oksit (GO) ile muamelesi sonucunda nöral hücrelere farklılaşma potansiyeli incelenmiştir. *İn vitro* koşullarda iki boyutlu (2D) kültür ortamında yetiştirilen hASC için 3 farklı besiyeri kullanılmıştır. Sonuç olarak, seçilen grafen tabanlı malzemelerin (GNR-PEO ve sGO) farklı derişim ve besiyerlerinde kültüre edilmesi hASC'nin nöral hücrelere farklılaşması üzerinde etkisi olmuştur. Hücrelerde zaman çizelgesinin belirli noktalarında nöral hücrelerin erken evrelerindeki belirteçleri ifade olmuştur. Elde edilen analizler sonucu iki malzeme arasından sGO daha başarılı olmuştur. Yapılan bu tez çalışması, *in vivo* çalışmalar ve sinir hasarlarının tedavisinde yeni yaklaşımlar geliştirebilmek açısından büyük önem taşımaktadır.

2020, 100 sayfa

Anahtar kelimeler: mezenkimal kök hücre, grafen, nöron, farklılaşma

ABSTRACT

MSc Thesis

The Potential of Graphene-Based Materials in Human Mesenchymal Stem Cell Differentiation into Neurons

Dondu Tugce Sahin

Ankara University Biotechnology Institute

Assoc. Prof. Dr. Açelya Yılmazer Aktuna

Graphene has been attracted great interest due to its outstanding properties such as mechanical strength, electrical conductivity, surface area, and chemical stability. Although it has been used in wide range of applications like electronics, biomedical, regenerative medicine, and biosensors, the biological properties of graphene remains still unknown. The design of graphene-based materials is highly promising in the treatment of neurodegenerative diseases whose regenerative properties are limited. The biocompatibility and non-cytotoxicity of the material are the most important criteria which are needed for safely usage in living systems.

The present study investigates the potential of differentiation on neural cells with a treatment of human adipose-derived mesenchymal stem cells (hASC) using graphene nanoribbons (GNR) and graphene oxide (GO), which derived from different concentrations of graphene. Three different media were used *in vitro* for hASC which were grown in two-dimensional (2D) culture media. The culturing of different concentrations of graphene-based materials (GNR-PEO and sGO) in a different media shows differentiation of hASC into neural cells. At a certain points of the timeline in the cells expressed markers in the early stages of the neural cells. As a result of the analysis, sGO was more successful among the two materials. With this, the thesis underlines the importance of *in vivo* studies to develop new approaches for the treatment of nerve damages.

2020, 100 pages

Keywords: mesenchymal stem cell, graphene, neuron, differentiation

TEŞEKKÜR

Kariyerimin önemli basamaklarından biri olan yüksek lisans eğitimimi Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü'nde yapmış olmaktan büyük bir mutluluk ve gurur duymaktayım. Aldığım eğitim boyunca bilgi birikimini paylaşıp her türlü imkanı bizlere sunmaya çalışan kıymetli hocalarıma teşekkür ediyorum.

Bu süreçte engin bilgi ve tecrübesi ile emin adımlarla yol almamı sağlayan; akademik bilgisinin yanı sıra öğrencilerine her zaman manevi değerlerinde önemini hatırlatan saygıdeğer danışmanım Doç. Dr. Açelya YILMAZER AKTUNA hocama en büyük teşekkürü bir borç bilirim. Bilim yolunda bana bu fırsatı sunarak, çok değerli ekibinde çalışmış olmaktan onur duymaktayım.

Tez çalışmam boyunca Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu'nun 315S102 numaralı Flag-Era projesi ile gerekli maddi desteği sağlamış olmasından dolayı ve laboratuvar ortamında sunduğu imkanlar için Ankara Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği'ne teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca desteğini eksik etmeyen başta çok değerli ekip arkadaşım Cansu GÜRCAN olmak üzere tüm ekip arkadaşlarıma teşekkür ediyorum. Tez çalışmam için gerekli olan grafen tabanlı malzemelerin tedariğini sağlayan, çalışmalarını Manchester Üniversitesi'nde sürdüren Prof. Dr. Kostas Kostareles ve Shanghai Jiao Tong Üniversitesi'nden Prof. Dr. Yiyong Mai'ye teşekkürlerimi iletiyorum.

Bugünlere gelmemde en büyük katkısı bulunan, zor günlerimde sevgisi ile beni ayağa kaldıran, üzerimdeki emeklerini asla ödeyemeceğim canım annem Nurdan AYDIN ve babam Mehmet AYDIN'a teşekkür ederim. Canlarım, biricik kardeşlerim Ayça AYDIN ve Gökçe AYDIN'a da hep yanımda oldukları için çok teşekkür ederim.

Hayatımda olduğu için çok şanslı hissettiğim, her zaman yanımda durarak beni cesaretlendiren ve yüksek lisansa başlamamda en büyük katkısı bulunan sevgili kocam M. Mustafa ŞAHİN'e sabrı, desteği ve bana olan inancı için minettarım. İyi ki varsın hayat arkadaşım…

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN i

ONAY ii

ÖZET iii

ABSTRACT iv

TEŞEKKÜR v

İÇİNDEKİLER vi

ŞEKİLLER DİZİNİ ix

ÇİZELGELER DİZİNİ xii

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ xiii

1. GİRİŞ 1

2. KURAMSAL TEMELLER 2

2.1. SİNİR DOKUSU NEDİR? 2

2.1.1. NÖRON VE İŞLEVLERİ 2

2.1.2. GLİA HÜCRELERİ VE İŞLEVLERİ 5

2.2. GRAFEN VE KULLANIM ALANLARI 6

2.3. GRAFEN TABANLI MALZEMELER 8

2.3.1. GRAFEN OKSİT 9

2.3.2. GRAFEN NANOŞERİTLER 9

2.4. NÖROBİLİMDE GRAFEN VE KÖK HÜCRE UYGULAMALARI 10

2.4.1. GRAFEN VE NÖRAL KÖK HÜCRELER 10

2.4.2. GRAFEN VE MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER 13

2.4.3. GRAFEN VE PLURİPOTENT KÖK HÜCRELER 15

3. GEREKÇE VE AMAÇ 17

4. MATERYAL VE YÖNTEM 19

4.1. MATERYAL 19

4.2. YÖNTEM 21

4.2.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ 21

4.2.1.1. Hücre Çözdürme ve Kültürün Hazırlanması 21

4.2.1.2. Hücre Kültürünün Pasajlanması 22

4.2.1.3. Hücre Sayımı ve Ekimi 24

4.2.1.4. Hücre Kültürünü Grafen Tabanlı Malzemeler İle Muamele Etme 25

4.2.2. RNA İZOLASYONU 26

4.2.3. cDNA SENTEZİ 27

4.2.4. EŞ ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (qRT-PCR) 27

4.2.5. İMMÜNOFLORESAN BOYAMA 28

4.2.6. AKIM SİTOMETRİSİ 29

4.2.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ 30

5. ARAŞTIRMA BULGULARI 31

5.1. ADİPOZ KÖKENLİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN GNR-PEO VE sGO İLE MUAMELE EDİLDİKTEN SONRA GÖRÜNTÜLENMESİ 31

5.2. GNR-PEO ve sGO MUAMELESİNİN ADİPOZ KÖKENLİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ANALİZ EDİLMESİ 37

5.3. FARKLILAŞAN İNSAN ADİPOZ KÖKENLİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNDE NÖRAL PROTEİN İFADELERİNİN İMMÜNOFLORESAN BOYAMA TEKNİKLERİ İLE BELİRLENMESİ 46

5.4. PROTEİN İFADE ANALİZİ İÇİN ÇOK RENKLİ AKIM SİTOMETRİSİ 49

6. TARTIŞMA VE SONUÇ 52

6.1. TARTIŞMA 52

6.2. SONUÇ 55

KAYNAKLAR 57

EKLER 65

EK-1 65

ÖZGEÇMİŞ 66

TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR 66

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Nöronun morfolojik yapısı 3

Şekil 2.2. Nöral soy için kullanılan belirteçler 4

Şekil 2.3. Tek tabakalı grafenin görünümü 7

Şekil 2.4. Grafen oksitin yapısı 9

Şekil 2.5. Grafen nanoşeritlerin yapısı 10

Şekil 3.1. Tez çalışması için planlanan deney düzeneği..... 18

Şekil 4.1. Pasajlama öncesi hASC'nin görünümü (10X) 23

Şekil 4.2. Pasajlama sonrası hASC'nin görünümü (10X)..... 24

Şekil 5.1. DMEM yüksek glikozlu besiyerinde kültüre edilen insan adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin görüntüleri (10X) 32

Şekil 5.2. DMEM yüksek glikozlu kültür ortamında (A) sGO-100 µg/ml ve (B) farklılaşmamış kontrol grubunun ters ışık mikroskobunda görüntüleri (10X)..... 33

Şekil 5.3. DMEM/F-12 besiyerinde kültüre edilen insan adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin görüntüleri (10X)..... 34

Şekil 5.4. DMEM/F-12 kültür ortamında (A) sGO-100 µg/ml ve (B) farklılaşmamış kontrol grubunun ters ışık mikroskobunda görüntüleri (20X) 35

Şekil 5.5. DMEM düşük glikozlu besiyerinde kültüre edilen insan adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin görüntüleri (10X) 36

Şekil 5.6. 14 gün boyunca DMEM yüksek glikozlu kültür ortamında sGO ve GNR-PEO muamelesinden sonra alınan örneklerin Nestin geni için eş zamanlı PCR analizi..... 38

Şekil 5.7. 14 gün boyunca DMEM yüksek glikozlu kültür ortamında sGO ve GNR-PEO muamelesinden sonra alınan örneklerin β-III-Tubulin geni için eş zamanlı PCR analizi... 39

Şekil 5.8. 14 gün boyunca DMEM/F-12 kültür ortamında sGO ve GNR-PEO muamelesinden sonra alınan örneklerin Nestin geni için eş zamanlı PCR analizi..... 40

Şekil 5.9. 14 gün boyunca DMEM/F-12 kültür ortamında sGO ve GNR-PEO muamelesinden sonra alınan örneklerin β-III-Tubulin geni için eş zamanlı PCR analizi... 41

Şekil 5.10. 7 gün boyunca AF ile kaplı DMEM yüksek glikozlu kültür ortamında sGO ve GNR-PEO muamelesinden sonra alınan örneklerin Nestin geni için eş zamanlı PCR analizi 42

Şekil 5.11. 7 gün boyunca AF ile kaplı DMEM yüksek glikozlu kültür ortamında sGO ve GNR-PEO muamelesinden sonra alınan örneklerin β-III-Tubulin geni için eş zamanlı PCR analizi 42

Şekil 5.12. 7 gün boyunca AF ile kaplı DMEM/F-12 kültür ortamında sGO ve GNR-PEO muamelesinden sonra alınan örneklerin Nestin geni için eş zamanlı PCR analizi..... 43

Şekil 5.13. 7 gün boyunca AF ile kaplı DMEM/F-12 kültür ortamında sGO ve GNR-PEO muamelesinden sonra alınan örneklerin β-III-Tubulin geni için eş zamanlı PCR analizi... 44

Şekil 5.14. 14 gün boyunca AF ile kaplı DMEM düşük glikozlu kültür ortamında sGO ve GNR-PEO muamelesinden sonra alınan örneklerin Nestin geni için eş zamanlı PCR analizi 45

Şekil 5.15. 14 gün boyunca AF ile kaplı DMEM düşük glikozlu kültür ortamında sGO ve GNR-PEO muamelesinden sonra alınan örneklerin β-III-Tubulin geni için eş zamanlı PCR analizi 45

Şekil 5.16. DMEM yüksek glikozlu kültür ortamında 100 µg/ml derişime sahip GNR-PEO #1 ve sGO muamelesindeki hücrelerin immünofloresan görüntüsü 47

Şekil 5.17. DMEM/F-12 kültür ortamında 100 µg/ml derişime sahip GNR-PEO #1 ve sGO muamelesindeki hücrelerin immünofloresan görüntüsü 48

Şekil 5.18. DMEM düşük glikozlu 100 µg/ml derişime sahip GNR-PEO #1 ve sGO muamelesindeki hücrelerin immünofloresan görüntüsü 49

Şekil 5.19. Nöral belirteçlerin DMEM yüksek glikozlu kültür ortamındaki hücreler için akım sitometrisinde ifadeleri 50

Şekil 5.20. Nöral belirteçlerin DMEM/F-12 kültür ortamındaki hücreler için akım sitometrisinde ifadeleri 51

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Nöral kök hücreler ve grafen tabanlı malzemeler ile yapılan çalışmalar 11

Çizelge 2.2. Mezenkimal kök hücreler ve grafen tabanlı malzemeler ile yapılan çalışmalar 14

Çizelge 2.3. Pluripotent kök hücreler ve grafen tabanlı malzemeler ile yapılan çalışmalar 16

Çizelge 4.1. Tez çalışması için kullanılan materyaller 19

Çizelge 4.2. Nöral farklılaşma için hazırlanan kültür ortamları 25

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	Santigrat derece
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
qRT-PCR	Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
2D	İki boyutlu
3D	Üç boyutlu
AF	Bağlanma faktörü (Attachment Factor)
ATCC	Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
BBB	Kan-beyin bariyeri
BDNF	Beyin-türevli Nörotrofik Faktör
b-FGF	Bazik-Fibroblast Büyüme Faktörü
BSA	Sığır Serum Albümini (Bovine Serum Albumin)
C	Karbon
cDNA	Tamamlayıcı Deoksiribonükleik asit
cm^2	Santimetrekare
CO_2	Karbondioksit
Cu	Bakır
CVD	Kimyasal Buhar Biriktirme
dk	Dakika
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMEM/F-12	Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12
DPBS	Dulbecco’s Phosphate Buffered Saline
ECM	Ekstrasellüler matriks
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
ELF-EMF	Son derece düşük frekanslı elektromanyetik alanlar
ESC	Embriyonik kök hücreler
FBS	Fetal Sığır Serumu (Fetal Bovine Serum)
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
G	Grafen
GNR	Grafen nanoşeritler
GNR-PEO	Poli(etilen oksit) ile fonksiyonlaştırılmış grafen nanoşeritler
GO	Grafen oksit
hβ-NGF	İnsan β-Sinir Büyüme Faktörü
hASC	İnsan adipoz kökenli mezenkimal kök hücreler
hMSC	İnsan mezenkimal kök hücreleri
hNPC	İnsan nöral progenitör hücreler
hNSC	İnsan nöral kök hücreler
IFNγ	İnterferon-γ
LIF	Lösemi inhibe edici faktör
LPS	Lipopolisakkarit
mg	Miligram

ml	Mililitre
MSC	Mezenkimal kök hücreler
mm	Milimetre
ng	Nanogram
NGF	Sinir Büyüme Faktörü
NGLC	Nanokristal cam benzeri karbon filmi
NGO	Nanoboyutlu grafen oksit
nm	Nanometre
NPC	Nöral progenitör hücre
NSC	Nöral kök hücreler
O	Oksijen
PADM	Domuz aselüler dermal matriksi
PCL	Polikaprolakton
PDGF	Trombosit kökenli büyüme faktörü
PDMS	Polidimetilsiloksan
PEDOT	Poli (3,4-etilendioksitiyofen)
Pen-Strep	Penisilin/Streptomisin
PU	Poliüretan
RA	Retinoik asit
rDNase	Rekombinant deoksiribonükleaz
RNA	Ribonükleik asit

rGO	İndirgenmiş grafen oksit
SDIA	Stromal hücre kaynaklı indükleme aktivitesi
sGO	Küçük (small) grafen oksit
siNP	Silika nanopartiküller
TCPS	Doku kültürlü polistiren
TiO_2	Titanyumdioksit
uPK	Uyarılmış pluripotent kök hücreler

1. GİRİŞ

Nörodejeneratif hastalıklar veya nöronal bozukluklar hala dünyadaki insan ölüm ve sakatlıklarının önde gelen nedenlerinden biridir (1). Geleneksel tedaviler, özellikle merkezi sinir sistemi hastalıkları için bir takım zorluklar çıkarmaktadır (2). Mevcut klinik tedavilerin oldukça sınırlı olması sebebiyle de bu hastalıklardan etkilenen insan sayısı her yıl sürekli olarak artmaktadır (3). Modern tıp ve sinirbiliminin de temel amacı, son teknolojiden faydalanarak daha iyi performans gösteren yeni araçlar geliştirerek görüntüleme, ilaç verme, nöronal rejenerasyon ve elektriksel saptama sağlamaktır (2).

Kontrol edilebilir yüzey morfolojisi, esneklik, hidrofilik yapı, elektriksel iletkenlik ve bazı durumlarda şeffaflık gibi eşsiz kimyasal ve topoğrafik özelliklere sahip olan grafen, rejenere olabilen sinirler arasında bir köprü oluşturabilecek umut verici iskele görevindedir (4). Son zamanlarda yapılan çalışmalar ile nöron rejenerasyonunu destekleyebilecek iskelelerin tasarımında grafen tabanlı malzemeler büyük ilgi görmüştür. Daha önemlisi, iletken bir substrat olan grafen, hasarlı sinir uçları arasındaki elektriksel iletimin devam etmesine izin vermektedir.

2. KURAMSAL TEMELLER

Günümüzde henüz birincil tedavi yöntemi bulunamamış önemli sağlık sorunlarının başında nörodejeneratif hastalıklar gelmektedir. Bu hastalıkların tedavisindeki zorlukların sebebi ise, sinir sisteminde yer alan hücrelerin rejeneratif özelliğinin kısıtlı olmasıdır. Bu yüzden sinir tedavisindeki önemli ölçütler arasında sinir rejenerasyonunun, rejenerasyon üzerindeki olumsuz etkilerin ve yapısal özelliklerinin iyi anlaşılması yer almaktadır (5). Günümüzde yapılan çalışmalar, nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde yenilikçi nanoteknolojik tabanlı yaklaşımların büyük ümit vaat ettiğini göstermektedir.

2.1. SİNİR DOKUSU NEDİR?

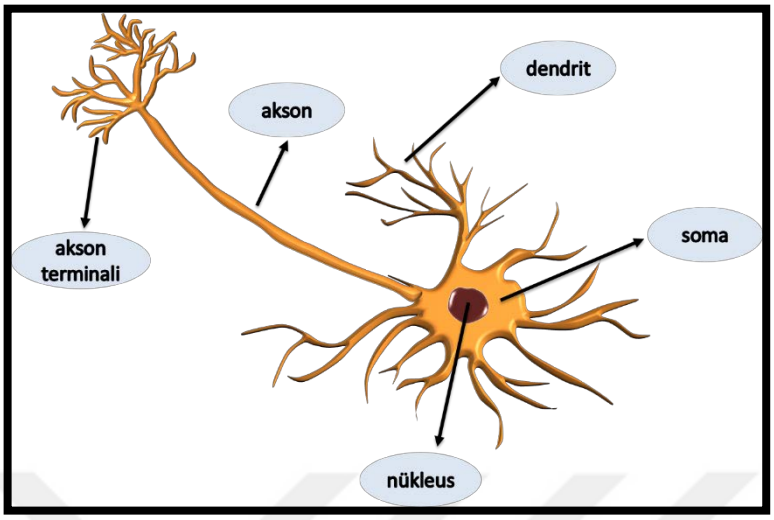
Sinir sistemi, anatomik ve fizyolojik olarak karmaşık bir yapıda düzenlenen sinyallerden oluşan bir ağdır. Beyin ile vücut arasındaki uyumu ve iletişimi sağlayan sinir sistemi birimleri merkezi ve periferik sinir sistemi olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (6). Omurilik ve beyinden oluşan merkezi sinir sistemi bilgiyi alır, organize eder, analizini yapar ve periferik sinir sistemine bilgi gönderir. Merkezi sinir sistemi ayrıca görme, koku alma ve işitsel sistemleri de kapsamaktadır. Periferik sinir sistemi ise merkezi sinir sistemi dışındaki sinirler, duyu reseptörleri ve gangliyonların bir topluluğudur (7). Merkezi sinir sisteminde sinirler çoğunlukla kendini rejenere edemezken periferik sinir sisteminde tam tersidir. Vücutta bir hasar oluşması durumunda periferik sinir sisteminde lokal etki görülürken, merkezi sinir sisteminde büyük ölçekli etkiye neden olmaktadır. Ayrıca periferik sinir sisteminde oldukça uzun (~1 metre) sinir liflerinden merkezi sinir sisteminde ise ince, ve daha kısa uzantılardan oluşmaktadır (8).

Duygu ve düşüncenin oluştuğu, hayati işlevleri kontrol eden ve hala araştırılması tamamlanamamış kompleks bir ağ olan sinir sistemini oluşturan yapı sinir dokusu olarak adlandırılmaktadır. Sinir dokusunu ise nöronlar ve glia hücreleri kapsamaktadır (9,10).

2.1.1. NÖRON VE İŞLEVLERİ

Sinir sisteminin temel birimi olan nöronlar, membranlarında yer alan potasyum, sodyum, klorür, kalsiyum gibi iyonların derişim farkını kullanan iyon pompaları sayesinde elektrikle uyarılma potansiyeline sahip olan hücrelerdir. Elektrik iletimi ise dopamin, serotonin, asetilkolin gibi nörotransmitter adı verilen kimyasallar tarafından sağlanır (11).

Nöron, morfolojik olarak soma, dendrit, akson ve akson terminali olmak üzere 4 bölümden oluşmaktadır (Şekil 2.1) (6).

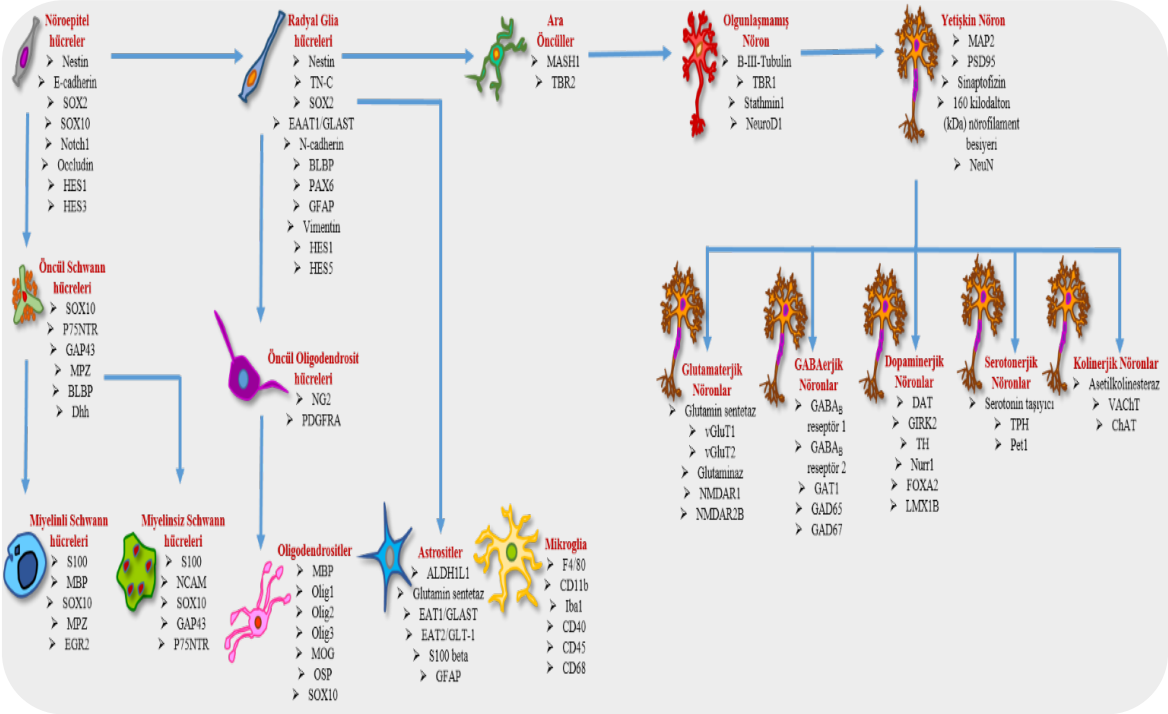


Şekil 2.1. Nöronun morfolojik yapısı

Altman ve Das'ın 1960'larda erişkin kemirgen beynindeki yeni nöronların varlığına ilişkin çığır açıcı bulgusu nedeniyle (12), kalıcı nöronal oluşum insanlar dahil tüm memelilerde gösterilmiştir (13,14). Sağlam yetişkin memeli merkezi sinir sisteminde iki ayrı nörojenik bölge olan hipokampüsün dentat girusunda ve yaşam boyunca lateral ventriküllerin subventriküler bölgesinde yeni nöronlar sürekli olarak üretilerek aktif nörojenez gerçekleşmektedir. Bu yeni nöronların kökeninin, multipotent yetişkin nöral kök hücrelerinden geldiğine inanılmaktadır (15).

Günümüzde yetişkin nörojenezi genellikle yetişkin öncül sinir hücrelerinin proliferasyonu ve hücre kaderinin belirlenmesi, daha sonraki farklılaşmaları, olgunlaşmaları, belirli yöne yönlenmesi ve mevcut nöronal ağlara işlevsel olarak birleşmesi aktif bir süreç olarak kabul edilmektedir (13). Yetişen bu nöral soyların her evresinde ifade analizi için farklı belirteçler kullanılmaktadır (Şekil 2.2) (16).

Yapılan çalışmalar, bu yeni oluşan nöronların öğrenme, hafıza, koku alma ve ruh hali modülasyonu gibi spesifik beyin fonksiyonlarında önemli rol oynadığını göstermektedir. Yeni metodolojilerin yardımıyla, sinir kök hücrelerinin karakterizasyonunda ve yetişkin beyindeki gelişiminde önemli ilerleme kaydedilmiştir (15).



Şekil 2.2. Nöral soy için kullanılan belirteçler

Yetişkin nöronlar glutamaterjik, GABAerjik, dopaminerjik, serotonerjik ve kolinerjik nöronlar olmak üzere tamamen farklılaşmış 5 nöron tipini oluşturmaktadır.

Glutamaterjik nöronlar: Glutamik asit (glutamat) biyolojik sistemlerde, özellikle merkezi sinir sisteminde bol miktarda bulunan glikozun bir amino asit türevidir. Glutamat, aynı zamanda, memeli merkezi sinir sistemindeki başlıca uyarıcı nörotransmitterdir. Ayrıca, fazla glutamat aşırı derecede nörotoksiktir ve ekstrasellülar glutamat konsantrasyonu, nöronal hasarı önlemek için çok düşük tutulmalıdır (17).

GABAerjik nöronlar: Memeli görme korteksinde ana inhibisyon kaynağı, GABA'yı nörotransmitter olarak kullanan nöronlar tarafından sağlanır. Bu nöronlar morfolojik olarak piramidal hücrelerden farklıdır ve tüm kortikal nöronların % 15-25'ini oluşturur (18).

Dopaminerjik nöronlar: Orta beyindeki dopaminerjik nöronlar, memeli merkezi sinir sisteminde dopaminin ana kaynağıdır. Dopaminerjik nöronlar orta beyin bölgesinde bulunur. Bunların yokluğu en belirgin insan nörolojik bozukluklarından biri olan Parkinson hastalığı ile ilişkilidir. Sayıları az olmasına rağmen, bu dopaminerjik nöronlar, gönüllü hareketler ve ruh hali, ödül, bağımlılık ve stres gibi çok çeşitli davranışsal süreçler de dahil olmak üzere çoklu beyin fonksiyonlarının kontrolünde önemli bir rol oynamaktadır (19).

Serotonerjik nöronlar: Medulladaki merkezi solunum kemoseptörleridir. Ayrıca nöral dokuların homeostazında rol oynadığı öne sürülmektedir (20).

Kolinerjik nöronlar: Hayvan hayatı nöronlar tarafından kontrol edilir ve bu ortamda kolinerjik nöronlar önemli bir rol oynar. Kolinerjik nöronlar ACh nörotransmitterini salgılar. Böylece, organizmanın hayatta kalma ve ruh halini koruma ve optimize etmek için iç ve dış uyaranlara yanıt verir. Kolinerjik nörotransmisyonun bloke edilmesini hemen ölüm takip etmektedir. Bununla birlikte, nöronlara bakılmaksızın bakteri, yosun, protozoa, sünger, ilkel bitkiler ve mantarlar gibi ilkel organizmalarda yaşamın başından itibaren kolinerjik iletişim kurulmuştur (21).

2.1.2. GLİA HÜCRELERİ VE İŞLEVLERİ

Sinir sisteminde nöronlara göre çok daha fazla bulunan destek hücrelerine glia hücreleri olarak adlandırılmaktadır. Glia hücreleri,

- Beynin homeostazi metabolizmasında ve bu sürecin sürdürülmesinde
- Nöronun gelişiminde ve hayatta kalmasında
- Sinaptik iletimin gelişiminde ve modülasyonunda
- Sinir impulslarının dağıtılmasında
- Merkezi sinir yapısının belirlenmesinde ve diğer birçok fizyolojik süreçlerde rol oynar (9).

Bazı zihinsel hastalıklar, epilepsi ve nörodejeneratif hastalıklar dahil olmak üzere sinir sisteminin birçok patolojisinde glia hücrelerinin rolü bulunmaktadır. Glia hücreleri; astrositler, oligodendrositler, Schwann hücreleri, mikroglia, ependimal hücreler ve satellite hücrelerini kapsamaktadır (22). Merkezi sinir sisteminde bulunan glia hücre tipleri astrositler, oligodendrositler, mikroglia ve ependimal hücreler iken; periferik sinir sisteminde bulunan glia hücreleri Schwann ve satellite hücreleridir.

Astrositler; nöronlar, kan damarları ve sinir sisteminin birçok yapısı ile etkileşime girmektedir (9). Merkezi sinir sistemi homeostazisinde önemli rolü bulunmaktadır (6). Sahip olduğu nörotransmitter reseptörleri ile çevresindeki nöronları taşıma özellikleri bakımından düzenlemektedir (23). Rejeneratif özelliğe sahip nöritleri engelleme mekanizmasında rol almaktadır (24).

Oligodendrositler, merkezi sinir sisteminde bulunan akson boyunca iletim hızını sağlayan miyelinlerin üretilmesinde görev almaktadır. Bu hücreler besleyici destek sağlar ve aksonların yapısını etkilemektedir (25,26).

Mikroglia, çeşitli patojenik faktörlere karşı nöron korumasını sağlayan merkezi sinir sisteminin immün hücreleridir (25,27).

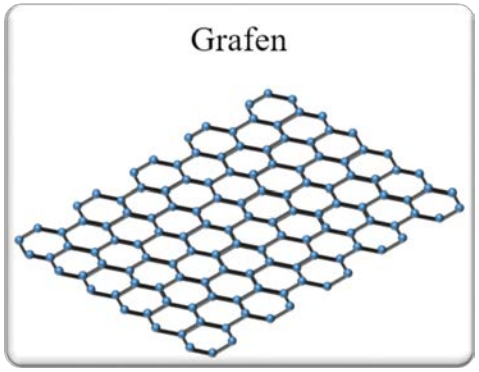
Beyin ventriküllerinin duvarında bulunan ependimal hücreleri, beyin homeostazisinde etkilidir. Ayrıca beyin-omurilik sıvısının taşınmasında önemli rol oynar ve kök hücre olarak işlev gördüğü öne sürülmüştür (28).

Periferik sinir sisteminde bulunan Schwann hücreleri oligodendrositler gibi miyelin kılıfların üretilmesinde görev alır ayrıca nöronların büyümesine yardımcı olmaktadır (29). Periferik sinir (30) ve aksonal rejenerasyonda önemli görevleri bulunmaktadır (31).

Satellite hücreleri, dorsal kök gangliyon nöronlarının somasını sarmalarının yanı sıra birincil duyusal nöronlar için besleyici destek sağlarlar. Hücre dışı alanda nörotransmitter seviyelerini düzenleyen taşıyıcıları ifade eder ve bir astroglial belirteç olan glial fibril asidik proteininin ifadesini arttırmaktadır (32).

2.2. GRAFEN VE KULLANIM ALANLARI

Grafen (G), sadece 0.34 nanometre (nm) kalınlığa sahip, bal peteği şeklinde sıkıca paketlenmiş karbon atomlarının sp^2-hibritleşmesi yaptığı bir veya birkaç tabakalı yapıdır (Şekil 2.3). Karbon nanopartiküllerin 0 boyutlu hali fulleren, 1 boyutlu hali karbon nanotüp ve 2 boyutlu (2D) hali ise grafen olarak adlandırılmaktadır (33). Grafenin her bir karbon atomu, aynı düzlemde 3μ bağı ve komşu atomla bağlanabilen düzlem dışı bir π bağına sahiptir (34).



Şekil 2.3. Tek tabakalı grafenin görünümü

2004 yılında Novoselov ve Geim yaptıkları çalışmada, elektrik alan etkisinden faydalanarak grafit malzemesinden tek atom kalınlığındaki grafeni elde etmiştir (35). Bu bilim insanları, uzun zamandır süregelen 2D kristallerin termodinamik olarak kararsız olduğu ve bu yüzden var olamayacakları kanısını yıkarak 2010 yılında Nobel ödülünü almaya hak kazanmıştır (36).

Grafen katmanları Van der Waals bağları ile birbirlerine bağlanarak grafiti oluşturmaktadır. Bu, grafenin doğal olarak mevcut olmadığı anlamına gelir; daha ziyade, grafitin bir parçasıdır. Grafen elde etmek için kullanılabilecek çeşitli teknikler vardır. Mekanik olarak pul pul dökülme veya kimyasal buhar biriktirme (CVD) olarak da bilinen viski bant yöntemi bu yöntemler arasındadır. Kaliteli grafen elde etmek, kullanılan teknik ne olursa olsun çok zordur (4).

Grafenin hafif, esnek, saydam, hem elektriksel hem de termal olarak yüksek iletkenliğe sahip olması gibi çeşitli özellikleri onu birçok alanda çekici kılmıştır (37,38). Eşsiz özelliklere sahip bu malzemenin kullanım alanlarına örnek olarak: süper kapasitörler (39,40), esnek elektronik (41), basılabilir mürekkepler (42,43), piller (44), optik ve elektrokimyasal sensörler (45-47), enerji depolama (48-50), doku mühendisliği (51,52) ve tıp (38,53,54) verilebilir.

Özellikle, son zamanlarda grafen ve türevlerinin biyomedikal uygulamalarda (55); ilaç ve gen taşınımı, hastalık teşhisi, kanser tedavisi, biyo-algılama, biyo-görüntüleme, fototermal tedavi, antibakteriyel substratlarda ve hücre kültüründe iskele olarak kullanım potansiyeli ortaya koyulmaktadır (56-59).

Farklı bileşimlere ve yapılara sahip olan grafen ve türevleri, tamamen farklı biyolojik tepkiler ortaya çıkardıklarından dolayı biyomedikal uygulamaları planlarken dikkate

alınması gereken çok çeşitli özelliklere sahiptir. Bu nedenle, G materyalleri ile planlanan biyolojik deneylerde yaygın bir etkisi olan "tekrarlanabilirlik" eksikliğinin üstesinden gelmek için, kullanılan malzemenin doğru bir şekilde tanımlanması ve karakterize edilmesi esastır (37).

Karbon ile ilgili materyallerin geliştirilmesinden bu yana, nanoteknoloji dâhil olmak üzere bir dizi uygulama güçlü bir şekilde etkilenmiştir (37):

- Kan-beyin bariyerini (BBB) geçerek hasarlı beyin bölgelerine ulaşmak için ilaç, gen ve protein taşınımı
- Hasar üzerinde hücre-hücre iletişimini iyileştirmek için nöral hücreler ile iki (2D) veya üç (3D) boyutlu iskelelerin kullanıldığı nöro-rejeneratif teknikler
- *İn vivo* çalışmalarda hücre etiketleme vasıtasıyla hastalık biyo-belirteçlerini algılama, biyolojik olarak aktif moleküllerin gerçek zamanlı izlenmesi için son derece spesifik ve güvenilir tanı araçları
- Nöronal aktiviteyi izleme ve değiştirmede, kayıt için yüksek hassasiyetli elektrotlar ve elektriksel yerel uyartılar için grafen tabanlı platformların kullanımı

Grafen aracılı hücresel modifikasyona yönelik sayısız rapora rağmen, farklı alan boyutlarına sahip grafenin biyolojik özellikleri tam olarak anlaşılamamıştır (60). Ayrıca, grafen üzerindeki hücre davranışı değerlendirilirken; grafenin kalitesi, tabakalarının sayısı ve grafen ile substrat yüzeyinin kaplanması ile ilgili de kesin bir kontrol yoktur (61).

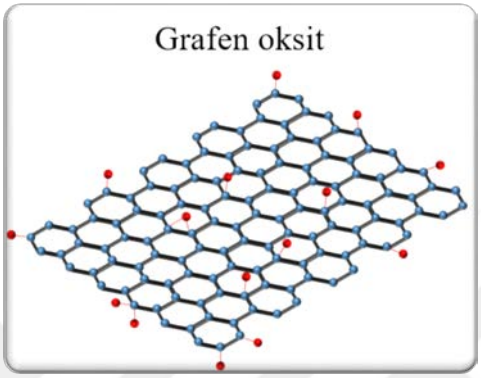
2.3. GRAFEN TABANLI MALZEMELER

Birçok kullanım alanı olan grafenin türevleri araştırmacılara geniş bir yelpazede sunulmaktadır. Grafen tabanlı malzemelere: tek ve az katmanlı G (1-10 kat), grafen oksit (GO; tek katman, 1:1 C/O oranı), indirgenmiş grafen oksit (rGO), küçük (small) grafen oksit (sGO), grafit nano- ve mikro-pulcuklar (10'dan fazla katman, kalınlığı <100 nm ve sırasıyla ortalama yanal boyutu nm ve μm), G ve GO kuantum noktaları, çeşitli melezleştirilmiş G nanokompozitler ve grafen nanoşeritler dahildir (62-65).

Grafen pahalı ve üretilmesi nispeten zor olduğu için, grafen türevlerini veya ilgili malzemeleri yapmak ve kullanmak için etkili fakat ucuz yollar bulmak için büyük çaba harcanmaktadır.

2.3.1. GRAFEN OKSİT

Grafen oksit, oksijen içeren grupların bağlanması ile elde edilmiş oksitlenmiş bir grafen şeklidir (Şekil 2.4). GO'nun iki önemli özelliği vardır: ilk olarak maliyet-etkin kimyasal yöntemler karşılaştırıldığında yüksek verimde hammadde olarak ucuz grafit kullanılarak üretilebilir. İkinci olarak ise, yüksek derecede hidrofiliktir ve su gibi çözücülerde dağılabilmektedir (66).

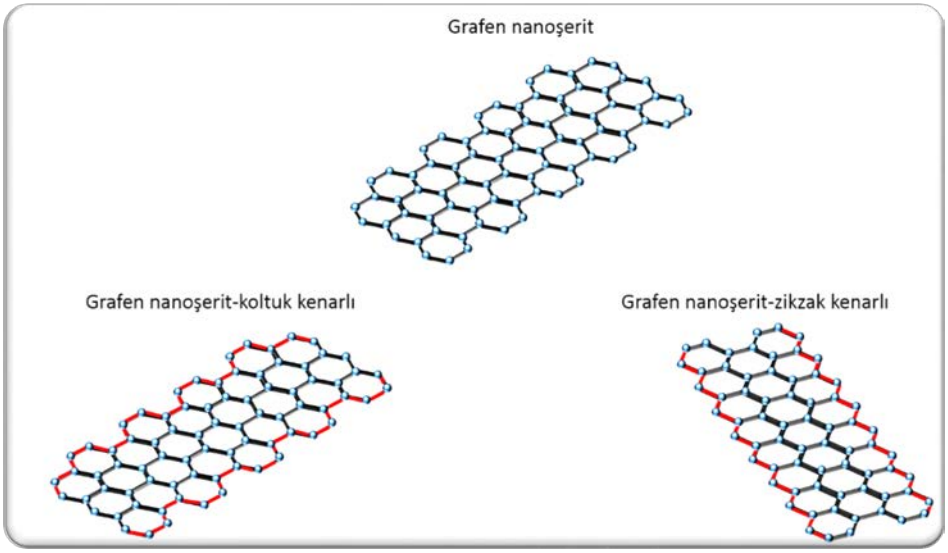


Şekil 2.4. Grafen oksitin yapısı

Grafen oksidin en önemli kimyasal dönüşümü grafen benzeri maddelere indirgenmesidir. Bu kimyasal dönüşüm termal veya elektrokimyasal olarak güçlü indirgeyici maddelerinin (hidrazin veya sodyum borohidrid gibi) kullanılmasıyla başarılabilir. Elde edilen ürün bozulmamış grafene çok benzer ayrıca fizik ve mühendislik uygulamalarında olan çok çeşitli malzemeler için kullanılmaktadır. GO'nun indirgenmesine ek olarak, mekanik, termal ve/veya elektronik özellikler kazandırılarak fonksiyonelleştirilmiş grafen pulcukların imalatı için kullanışlı bir platformdur (67).

2.3.2. GRAFEN NANOŞERİTLER

Grafen nanoşeritler (GNR), yarı iletken bant boşluklarından oluşan, zengin çeşitlilikte elektronik özelliklere sahip petek yapılı iki boyutlu yapılardır (68). Grafen nanoşeritlerin, koltuk ve zikzak kenarlı olmak üzere iki farklı çeşidi bulunmaktadır (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Grafen nanoşeritlerin yapısı

GNR sahip oldukları genişlik ve kenar özellikleri sayesinde nanoelektronik alanında yeni ve ilgi çekici bir malzeme sınıfı olmuştur (69). Spesifik olarak, zikzak kenarlı GNR metalik ve spin polarizasyon durumlarını (70-72), koltuk kenarlı GNR ise genişliğe bağlı yarı iletken bant aralığını göstermektedir (73-75). GNR tabanlı cihazların performansını etkileyebilecek yönlerden birisi de yük taşıyıcılarının oluşumu ve taşınmasıdır. Ancak GNR ile ilgili bu tür mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır (68).

2.4. NÖROBİLİMDE GRAFEN VE KÖK HÜCRE UYGULAMALARI

Nöral doku rejenerasyonu amacıyla, grafen tabanlı malzemeler çeşitli hücre kaynaklarıyla test edilmiştir. Bunların arasında ise günümüzde terapötik stratejilerde en çok ilgi gören kök hücreler yer almaktadır (10). Çeşitli grafen tabanlı malzemelerin sadece polimerler veya farklılaşma faktörleriyle değil aynı zamanda elektriksel veya manyetik alan altında birleştirildiği çalışmalarda bulunmaktadır (76,77).

2.4.1. GRAFEN VE NÖRAL KÖK HÜCRELER

Nöral kök hücreler (NSC), yetişkin merkezi sinir sisteminde yer almaktadır. Multipotent orjinli olan bu hücreler kendilerini yenileyebilme özelliğine sahiptir. Aynı zamanda yeni glial hücrelerine veya nöronlara farklılaşabilmektedir. Birçok nörolojik hastalığın (omurilik hasarı, Alzheimer…) tedavisinin temel kaynağı olarak bu hücreler görülmektedir. Ancak NSC'nin farklılaşmasında bazı zorluklar bulunmaktadır. Bu hücrelerin nöronlara doğru farklılaşmasını sağlayan faktörleri açıklama ve bunları optimize etme bu sorunların en önemlisidir (78).

Nöral kök hücreler ile çeşitli grafen tabanlı malzemeler çalışılmıştır (Çizelge 2.1). Bir ekstrasellüler matriks (ECM) proteini olan laminin ile kaplı grafen substratları üreten Park ve arkadaşları NSC'nin nöral hücrelere doğru farklılaşmasının arttığını gözlemiştir (79). Laminin proteinin, nöron ve nörit gelişiminde olumlu etkiye sahip en iyi bileşenler arasında olduğu bilinmektedir (80,81). Çalışmalarda, laminin gibi ECM proteinlerinin yanı sıra çeşitli farklılaşma faktörleride dahil edilmiştir (79,82). Yapılan bir çalışmada 3D grafen süngerin çeşitli büyüme faktörleri varlığında, NSC'nin çoğalmasını arttırdığını, astrositlere ve özellikle nöronlara karşı farklılaşmalarını arttırdığını göstermiştir (83). Ayrıca 3D hibrit sistemlerin çalışıldığı bir başka çalışmada, tek fazlı elektrik stimülasyonunun 3D grafen yapı iskelelerindeki nöral progenitör hücre (NPC) nörojenezini arttırdığı da gösterilmiştir (76).

Çizelge 2.1. Nöral kök hücreler ve grafen tabanlı malzemeler ile yapılan çalışmalar

Grafen Türevleri	**Kullanılan Malzemeler/Faktörler**	**Bulgular**	**Referans**
Grafen substratı	+bazik-Fibroblast büyüme faktörü (b-FGF) +Epidermal büyüme faktörü (EGF) +Laminin	İnsan nöral kök hücrelerinin (hNSC) laminin kaplı grafen filmler ile uzun süre kültüre edilmesi nöral farklılaştırmayı arttırmaktadır.	(79)
GO nanotabaka	+300 nm silika nanopartiküller (siNP) +ECM protein deseni +b-FGF +EGF +Laminin	Yetişkin hNSC'nin büyümesi, farklılaşması ve akson hizalanmasında bu grafen-nanopartikül hibrit yapısı başarılı olmuştur.	(82)
3D grafen sünger	+FGF-2 +EGF	Üç boyutlu bu gözenekli yapı, NSC çoğalmasını iyileştirmiştir. Nöral kök hücrelerin astrositlere ve özellikle nöronlara farklılaşması artmıştır.	(83)
rGO	+Flaşlı foto uyarımı +rGO/Titanyumdioksit (TiO_2)	hNSC, grafen/TiO_2 heterojonksiyonlu film üzerinde yer alan flaşlı foto uyarımı ile muamelesi sonucu nöral/glia	(84)

	heterojonksiyonlu film	hücre oranında ~23 katlık bir artış gözlenmiştir.	
2D ve 3D grafen materyalleri	+Doku kültürlü polistiren (TCPS) +Lipopolisakkarit (LPS) +FGF-2 +EGF	Mikroglia'da 3D grafen 2D grafenden daha az nöroinflamasyona neden olur. Nöral onarım ve nörogenez için 3D grafen konusundaki çalışmalar arttırılmalıdır.	(85)
GO	+Polikaprolakton (PCL) nanolifler	Nöral kök hücreler elektrostatik PCL nanolifler ile kaplı GO tabakalar üzerine ekilmiştir. GO-nanolif hibrit iskelesi oligodendrosit soy hücrelerine farklılaşmada etkili olmuştur.	(86)
GO/PEDOT nanokompozit filmler	+Poli (3,4-etilendioksitiyofen) (PEDOT) +Trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF) +İnterferon-γ (IFNγ)	PDGF ve IFNγ nöral ve oligodendrosit soylarına farklılaşmayı desteklemiştir. GO/PEDOT terapötik potansiyeli geliştirmek için özelleştirilebilir.	(87)
Nanoyapılı rGO mikrolifler	+b-FGF +EGF +Poli-D-Lizin	Nanoyapılı rGO mikroliflerinin, nöral kök hücrelerin yapışmasında ve çoğalmasında 2D grafen film ve doku kültürü plakasından daha başarılı olduğu gösterilmiştir.	(88)
3D baskılama grafen iskelesi	+3D basıcı +Poliüretan (PU)	Grafen-poliüretan kompozit hidrojel, nöral kök hücrelerin nöral farklılaşmasını ve oksijen metabolizmasını arttırmıştır.	(89)
3D grafen iskele	+Nörobazal besiyeri +Tek fazlı akım uyarımı	Uyarılmış pluripotent kök hücrelerden (uPK) türetilmiş insan nöral progenitör hücreler (hNPC) kullanılmıştır. NPC'nin nörogenezini arttırmak için elektrik uyarımı umut vericidir. Bu yüzden tedavinin daha fazla araştırılması önerilmiştir.	(76)

2.4.2. GRAFEN VE MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER

Hayvan ve insandan elde edilebilen mezenkimal kök hücreler (MSC) yetişkin kök hücre sınıfında yer almaktadır. İlk kez kemik iliği kaynaklı insan mezenkimal kök hücreler (hMSC) bildirilmiştir. MSC kaynakları arasında kemik iliği, adipoz doku, amniyotik sıvı, amniyotik membran, diş dokuları, endometrium, adet kanı, periferik kan, plasenta ve fetal membran, tükürük bezi, cilt ve sünnet derisi, sinoviyal sıvı ve sub-amniyotik göbek kordonu zarı bulunmaktadır. Bu hücrelerin osteosit, nöron, kondrosit ve adiposit gibi çeşitli hücrelere farklılaşabilme yeteneği bulunmaktadır (90).

Mezenkimal kök hücreler ve grafen tabanlı malzemelerinde nöral rejenerasyon üzerindeki etkisinin araştırıldığı çalışmalar bulunmaktadır (Çizelge 2.2). İnsan adipoz kökenli mezenkimal kök hücreler (hASC) 3D domuz aselüler dermal matriks (PADM) üzerinde yetiştirildiğinde ektodermal hücrelere, özellikle büyüme faktörlerinin etkisiyle nöronlara farklılaşma gözlenmiştir (91). Öte yandan, bu gibi faktörlerin yokluğunda bile farklılaşmayı bildiren çalışmalar bulunmaktadır. Florlanmış grafen üzerine basılmış polidimetilsiloksan (PDMS) kanal dizilerinin tasarlandığı bir sistemde büyüme veya farklılaşma faktörlerinin yokluğunda bile hücre hizalanması gerçekleşmiş ve nöral indüksiyon artmıştır (92).

NSC çalışmalarına benzer şekilde, 3D baskılama ile MSC üzerinde de çalışılmıştır. 2015 yılında, 3D baskılı poliaktid-glikolid içeren grafen yapı iskeleleri üzerinde MSC inkübe edildiğinde, *in vitro* çalışmalarda farklılaşma faktörlerinin yokluğunda glial ve nöronal genlerin belirgin bir şekilde artışıyla nörojenik farklılaşma göstermiştir. *In vivo* çalışmalar ise, 3D baskılı yapı iskelelerinin en az 30 gün boyunca umut verici biyouyumluluk gösterdiğini ortaya koymuştur (93). Elektriksel uyarılma, grafen bazlı substratlarda MSC'lerin farklılaşmasını geliştirmektedir. Lee ve arkadaşları son derece düşük frekanslı elektromanyetik alanlara maruz kalmanın sinerjik olarak grafen kaplı substratlar üzerinde büyütülmüş hMSC'nin nöronal farklılaşmasının biyolojik etkinliğini arttırdığını bildirmiştir (77).Yakın zamanda yapılan bir başka çalışmada, 1 adım ve 2 adımda büyütülen grafeninin kemik iliği kaynaklı insan mezenkimal kök hücrelerinin nöronal farklılaşmasında etkili olduğu gösterilmiştir (60).

Çizelge 2.2. Mezenkimal kök hücreler ve grafen tabanlı malzemeler ile yapılan çalışmalar

Grafen Türevleri	**Kullanılan Malzemeler/Faktörler**	**Bulgular**	**Referans**
GO	+PDMS dizileri	Florlanmış grafen üzerinde basılı PDMS kanal dizileri kullanılarak yapılan hücre hizalanması, büyüme/farklılaşma faktörlerinin yokluğunda bile hMSC'nin nöral-indüksiyonunu artmıştır.	(92)
Nanoboyutlu grafen oksit (NGO) (100nm)	+b-FGF +Sinir Büyüme Faktörü (NGF) + BDNF +3D PADM	Izgara desenli NGO üzerinde hASC ektodermal hücre çeşidi olan nöronlara farklılaşmıştır.	(91)
3D baskılı grafen	+Poliaktid-glikolid	*In-vitro* çalışmalar, farklılaşma faktörlerinin yokluğunda glial ve nöronal genlerin anlamlı şekilde artması ile nörojenik farklılaşma göstermiştir. *In-vivo* çalışmalar, 3D baskılı iskelelerin en az 30 gün boyunca umut verici şekilde biyouyumluluk gösterdiği ileri sürülmüştür.	(93)
Grafen substrat	+Forskolin +İnsülin +Valproik asit +Son derece düşük frekanslı elektromanyetik alanlar (ELF-EMF) +Hidrokortizon	ELF-EMF'ye maruz kalma, grafen ile kaplı substrat üzerinde yetiştirilen hMSC'nin nöronal farklılaşmasının biyolojik etkinliğini sinerjik olarak arttırmıştır.	(77)
Tek tabakalı grafen	+hMSC'nin 3D sferoid kültürü	Tek tabakalı grafen, hMSC'nin nörogenezini ayrıca nöritlerin büyümesini teşvik ederek, hücrelerin substratları veya hücre-hücre arayüzlerindeki etkileşimleri düzenlemiştir.	(1)

rGO mikrolifler rGO-PEDOT hibrit mikrolifler	+PEDOT +b-FGF +Elektriksel uyarım	Triboelektrik tarafından üretilen elektrik sinyali indüklenmiştir. Nanogenerator, MSC'nin nöral farklılaşmasını önemli ölçüde geliştirmiştir.	(94)
rGO nanotabakalar	+PADM iskele	rGO eklenmiş PADM iskele, hücre ekiminden 7 gün sonra MSC'nin nöronal hücrelere farklılaşmasını arttırdı.	(95)
1 ve 2 adımda büyütülen grafen	+35 milimetre (mm) kalınlığındaki bakır (Cu) folyolar	1 ve 2 adımda büyütülen grafen, kemik iliği kökenli insan mezenkimal kök hücrelerinin nöronal farklılaşmasında etkili olmuştur.	(60)

2.4.3. GRAFEN VE PLURİPOTENT KÖK HÜCRELER

Pluripotent kök hücreler, uyarılmış pluripotent ve embriyonik kök hücreler (ESC) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Yeniden programlama özelliğine sahip faktörlerin sentezlenerek ifade olması sonucu uPK, embriyonun blastosist evresindeki iç hücre kitlesinden de ESC üretilmektedir (96-98). Nöral rejenerasyon amacıyla grafen tabanlı malzemelerin pluripotent hücreler ile birlikte kullanıldığı çalışmalar listelenmiştir (Çizelge 2.3).

Grafen ve uPK hücrelerini içeren bir çalışmada grafen ve GO yüzeylerinde kendiliğinden ektodermal ve mezodermal soylarına farklılaşan fare uPK kültüre edilmiştir. Sonuç olarak bu materyallerin pluripotent kök hücre kültürü için farklılaşma protokolü olarak umut verici bir strateji olabileceğini bildirmiştir (99).

Fare ESC stromal hücre kaynaklı indükleme aktivitesi altında grafen veya GO yüzeylerine ekildiğinde, yalnız grafen ile muamele edilmiş hücrelere veya negatif kontrol gruplarına kıyasla, sadece GO etkin bir şekilde dopamin nöronlarına karşı fare embriyonik kök hücre farklılaşmasını desteklemiştir (100).

Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, transgenik fare embriyoları nanokristal cam benzeri karbon filmleri içeren grafen pulları üzerinde kültürlenerek önemli dopaminerjik hücreleri elde etmek için kullanılmıştır. Sonuçlar nöronal yetenek göstermiş ve filmlerin kalınlığı ile hücre olgunlaşması arasında doğrudan bir ilişki olduğu bulunmuştur (101).

Çizelge 2.3. Pluripotent kök hücreler ve grafen tabanlı malzemeler ile yapılan çalışmalar

Grafen Türevleri	Kullanılan Malzemeler/Faktörler	Bulgular	Referans
Grafen ve grafen oksit substrat	+Lösemi inhibe edici faktör (LIF)	Hem grafen hem de GO yüzeylerinde kültürlenen fare uPK, ektodermal ve mezodermal soylarına kendiliğinden farklılaşmıştır.	(99)
Grafen ve grafen oksit	+Stromal hücre kaynaklı indükleme aktivitesi (SDIA)	Grafen ile muamele edilmiş hücrelere veya kontrol grubuna kıyasla, sadece GO etkili bir şekilde fare embriyonik kök hücreleri dopamin nöronlarına farklılaşmıştır.	(100)
Grafen pulları	+Bir amorf karbon matriksi ile birleştirilmiş kavisli grafen pullarından oluşan nanokristal cam benzeri karbon filmi (NGLC)	Beyindeki substantia nigra bölgesindeki dopaminerjik hücreler, transgenik fare embriyolarından elde edilmiştir. NGLC'de kültür yapmak bir dereceye kadar nöral yetenek göstermiştir. Filmlerin kalınlığı ve hücre olgunlaşması arasında doğrudan bir ilişki vardır.	(101)

3. GEREKÇE VE AMAÇ

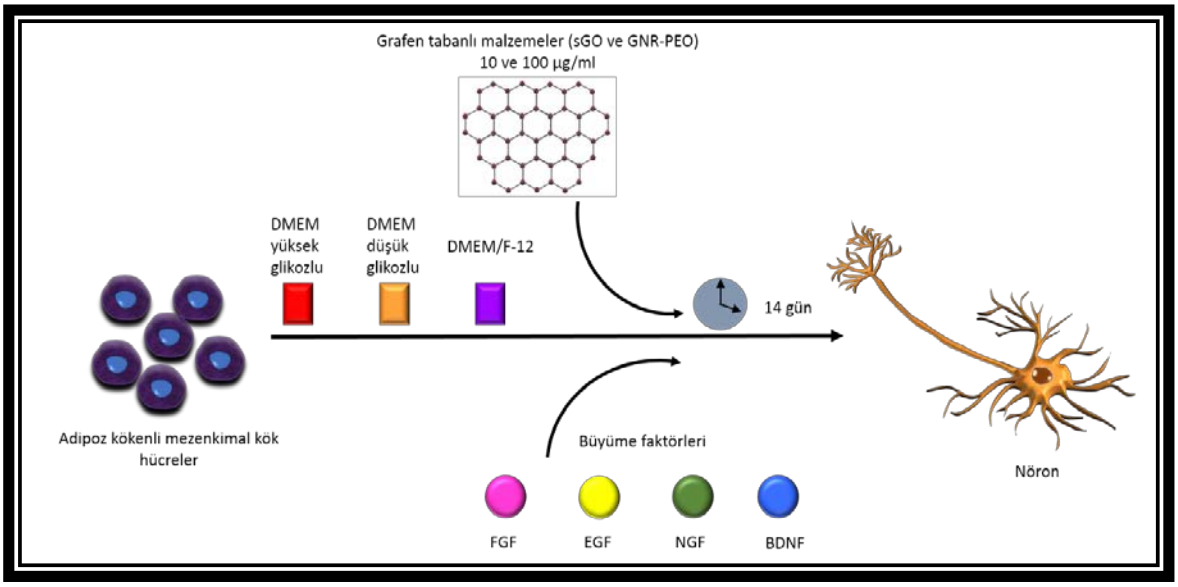
Grafen üstün fiziksel ve kimyasal özellikleri sayesinde keşfedildiği günden bu zamana kadar araştırmalarda ivme kazanarak çalışılan bir malzeme olmuştur. Biyomedikal, elektrokimyasal sensörler, tıp ve esnek elektronik gibi birbirinden çok farklı alanlarda bile çalışılabilen bu malzemenin literatüre bakıldığında nörobilimde de birçok araştırması bulunmaktadır. Özellikle sahip olduğu elektriksel özellikleri sayesinde henüz tedavisi bulunamamış nörodejeratif hastalıklar için umut vaat etmektedir.

Grafen süspansiyon yada substrat olarak çalışılabilen bir malzemedir. Literatür taramasında nöral rejenerasyon için genellikle grafenin substrat olarak kullanıldığı görülmüştür (77,99). Ancak grafenin substrat ve süspansiyon şeklinde kullanılması aynı biyolojik tepkiye ve biyolojik olarak uygunluğa sahip değildir (4). İnsan mezenkimal kök hücrelerinin *in vitro* koşullarda grafen ve gözenekli grafen oksit süspansiyon bazlı kök hücre kültürlerinde yetiştirilmesi sonucu yeni kıkırdak doku gelişimi açısından verimli sonuçlar alındığı ve hücrelerin uyarıldığı sonucuna varılmıştır. Böylece doku mühendisliğinde kullanılabileceği öne sürülmüştür (102). Bu tez çalışmasında ise, süspansiyon bazlı grafen ve grafen nanoşeritlerin kök hücre tabanlı bir çalışma ile nöral farklılaşma üzerinde etkisine bakılmak istenmiştir. Ayrıca nöral rejenerasyonda kullanılması planlanan grafen türevli grafen oksit ve grafen nanoşeritlerin karşılaştırılmasının yapıldığı bir çalışma bulunmamaktadır.

Elde edilen bilgiler tez çalışması için gerekçe olarak sunularak, insan adipoz kökenli mezenkimal kök hücreler sGO ve GNR malzemelerinin süspansiyon halinde bulunduğu kültür ortamlarında yetiştirilmiştir.

Bu tez çalışmasında kök hücre tiplerinden adipoz kökenli mezenkimal kök hücreler seçilmiştir. Bu tez çalışması için planlanan deney gidişatı Şekil 3.1'de gösterilmiştir. Elde edilen örneklerin proliferasyonu ve nörona farklılaşma potansiyelinin tespiti amaçlanmıştır.

Bu tez çalışması, nöral rejenerasyon çalışmalarına yenilikçi bir biyomalzeme sunularak, bu alandaki çalışmalara yeni bir bakış açısı kazandıracaktır. Sinir sistemini etkileyen hasarların tedavisi için, grafenin ve kök hücrelerin eşsiz özelliklerinden faydalanarak yeni yaklaşımlar geliştirebilmek açısından büyük önem taşımaktadır.



Şekil 3.1. Tez çalışması için planlanan deney düzeneği

Bu tez çalışmasının hipotezi, insan adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin grafen tabanlı malzemelerle muamele edilmesi nörona farklılaşmasını sağlamaktadır.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. MATERYAL

Bu tez çalışması için kullanılan materyallerin listesi Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Tez çalışması için kullanılan materyaller

Materyalin Kullanıldığı Yöntemler	Materyal Adı ve Katalog Numarası
Hücre Kültürü **Deneme 1**	DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium (1X) +GlutaMAX (+ 4.5 g/L D-Glucose, - Pyruvate, - HEPES) (Cat. No. 61965-026. Gibco), FBS Fetal Sığır Serumu (Fetal Bovine Serum) (Cat. No. 10500-064. Gibco), Pen-Strep Penisilin/Streptomisin (Cat. No. 15140-148. Gibco), DPBS (1X) Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Cat. No. 14190-094. Gibco Life Technologies), %0.05 Trypsin-EDTA (1X) (Cat. No. 25300-054. Gibco), FGF Fibroblast Büyüme Faktörü (Recombinant Human Fibroblast Growth Factor-Basic) (Cat. No. PHG0264. Gibco), BDNF Beyin-türevli Nörotrofik Faktör (Human Brain-Derived Neurotrophic Factor) (Cat. No. 3897S. Cell Signaling), hβ-NGF İnsan β-Sinir Büyüme Faktörü (Human β-Nerve Growth Factor) (Cat. No. #5221SF. Cell Signaling), EGF Recombinant Human Epidermal Growth Factor (Cat. No. PHG0313. Gibco), AF Bağlanma Faktörü (Attachment Factor) 1X (Cat. No. S-006-100. Gibco Life Technologies), sGO (Nanomedicine Lab, Manchester University), GNR-PEO #1, #2 ve #3 (School of Chemistry and Chemical Engineering, Shanghai Jiao Tong University)
Hücre Kültürü **Deneme 2**	DMEM/F-12 Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (1:1) (1X) +GlutaMAX (Cat. No. 31331-028. Gibco), FBS Fetal Sığır Serumu (Fetal Bovine Serum) (Cat. No. 10500-064. Gibco), Pen-Strep Penisilin/Streptomisin (Cat. No. 15140-148. Gibco), DPBS (1X) Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Cat. No. 14190-094. Gibco Life Technologies), %0.05 Trypsin-EDTA (1X) (Cat. No. 25300-054. Gibco), FGF Fibroblast Büyüme Faktörü (Recombinant Human Fibroblast Growth Factor-Basic) (Cat. No. PHG0264. Gibco), BDNF Beyin-türevli Nörotrofik Faktör (Human Brain-Derived Neurotrophic Factor) (Cat. No. 3897S. Cell Signaling), hβ-NGF İnsan β-Sinir Büyüme Faktörü (Human β-Nerve Growth Factor) (Cat. No. #5221SF. Cell Signaling), EGF Recombinant Human Epidermal Growth Factor (Cat. No. PHG0313. Gibco), 2- Mercaptoethanol (Cat. No. 31350-010. Gibco), N2 Supplement (Cat. No. 17502-048. Gibco), Insulin Human Recombinant Solution (Cat. No. 12585-014. Gibco), AF Bağlanma Faktörü (Attachment Factor) 1X (Cat. No. S-006-100.

	Gibco Life Technologies), sGO (Nanomedicine Lab, Manchester University), GNR-PEO #1, #2 ve #3 (School of Chemistry and Chemical Engineering, Shanghai Jiao Tong University)
Hücre Kültürü **Deneme 3**	DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium (1X) (+ 1g/L D-Glucose, L Glutamine, + Pyruvate) (Cat. No. 31885-023. Gibco), FBS Fetal Sığır Serumu (Fetal Bovine Serum) (Cat. No. 10500-064. Gibco), Pen-Strep Penisilin/Streptomisin (Cat. No. 15140-148. Gibco), DPBS (1X) Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Cat. No. 14190-094. Gibco Life Technologies), %0.05 Trypsin-EDTA (1X) (Cat. No. 25300-054. Gibco), FGF Fibroblast Büyüme Faktörü (Recombinant Human Fibroblast Growth Factor-Basic) (Cat. No. PHG0264. Gibco), BDNF Beyin-türevli Nörotrofik Faktör (Human Brain-Derived Neurotrophic Factor) (Cat. No. 3897S. Cell Signaling), hβ-NGF İnsan β-Sinir Büyüme Faktörü (Human β-Nerve Growth Factor) (Cat. No. #5221SF. Cell Signaling), EGF Recombinant Human Epidermal Growth Factor (Cat. No. PHG0313. Gibco), AF Bağlanma Faktörü (Attachment Factor) 1X (Cat. No. S-006-100. Gibco Life Technologies), sGO (Nanomedicine Lab, Manchester University), GNR-PEO #1 (School of Chemistry and Chemical Engineering, Shanghai Jiao Tong University)
Ribonükleik asit (RNA) İzolasyonu	NucleoSpinRNA Mini Kit (Cat. No. 740955.50. Macherey-Nagel), 2-Mercaptoethanol (Cat. No. 31350-010. Gibco)
Tamamlayıcı Deoksiribonükleik asit (cDNA) Sentezi	iScript™ cDNA Synthesis Kit (Cat. No. #170-8891. BIORAD)
Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR)	Sso Advanced™ Universal SYBR® Green Supermix (Cat. No. #172-5271. BIO-RAD)
İmmünofloresan Boyama	BSA Sığır Serum Albümini (Bovine Serum Albumin Protease Free) (Lot. No. OK18665. BioShop®), TRITON® X-100 (Cat. No. 1L22885. BioShop®), DPBS (1X) Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Cat. No. 14190-094. Gibco Life Technologies), Anti-beta-III-Tubulin antibody (ab18207. Abcam), Anti-Nestin antibody [196908] (ab6320. Abcam), FITC (Goat Anti-Mouse IgG H&L) (ab6785. Abcam), AF594 (Goat Anti-Rabbit IgG H&L) (ab150080. Abcam), Fluoroshield Mounting Medium with DAPI (ab104139. Abcam)

Akım Sitometrisi	%0.05 Trypsin-EDTA (1X) (Cat. No. 25300-054. Gibco), Methanol (Lot. No. #SHBF0179V. SIGMA-ALDRICH), DPBS (1X) Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Cat. No. 14190-094. Gibco Life Technologies), TRITON® X-100 (Cat. No. 1L22885. BioShop®), BSA Sığır Serum Albümini (Bovine Serum Albumin Protease Free) (Lot. No. OK18665. BioShop®), Anti-beta-III-Tubulin antibody (ab18207. Abcam), Anti-Nestin antibody [196908] (ab6320. Abcam), FITC (Goat Anti-Mouse IgG H&L) (ab6785. Abcam), AF594 (Goat Anti-Rabbit IgG H&L) (ab150080. Abcam)

4.2. YÖNTEM

Bu tez çalışması için planlanan materyal seçimi ve deneyler Ankara Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği Bölümü, Kök Hücre ve Rejeneratif Tıp Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışma, 315S102 numaralı 'Grafenin İmmün Etkilerinin Omik Yöntemler ve Genotoksik Analizler ile Karakterize Edilmesi' (G-IMMUNOMICS) adlı TÜBİTAK projesi ile desteklenmiştir. Tez çalışması için gerekli olan grafen tabanlı malzemelerden sGO Manchester Üniversitesi Nanomedicine Laboratuvarı'ndan Prof. Dr. Kostas Kostareles tarafından, GNR-PEO ise Shanghai Jiao Tong Üniversitesi Kimya ve Kimya Mühendisliği Bölümü'nden Prof. Dr. Yiyong Mai tarafından temin edilmiştir.

4.2.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ

4.2.1.1. Hücre Çözdürme ve Kültürün Hazırlanması

Tez çalışması için Amerika Tipi Kültür Koleksiyonu'ndan (American Type Culture Collection) (ATCC) satın alınmış olan insan adipoz kökenli mezenkimal kök hücreler (hASC) kullanılmıştır. Kullanılan hASC ile ilgili bilgiler aşağıdadır:

- Hücre adı: insan adipoz kökenli mezenkimal kök hücreler (hASC)
- Pasaj numarası:2
- Ortam içeriği: DMEM, %10 FBS, %1 Pen-Strep, 10 nanogram/mililitre (ng/ml) FGF

Temin edilen hücreler, kullanılmadığı süre boyunca sıvı nitrojen tankında uygun koşullar altında saklanmaktadır. Hücre kültüre edileceği zaman hızlı bir şekilde hareket edilmelidir.

Sıvı nitrojen tankından alınan cryovial tüp içerisindeki hASC, su banyosunda tüpün ortasında buz parçası kalana kadar eritilmiştir. Daha sonra tüp kurulanıp, etanolle silinmiştir. Tüp, steril bir ortam olan Laminar sınıf II kabinine alınmıştır. Cryovial tüp içerisindeki hASC, 15 ml'lik falkon tüpe koyulmuştur. Önceden su banyosunda 37 santigrat derece (°C)'de ısıtılmış mezenkimal besiyerinden (DMEM, %10 FBS, %1 Pen-Strep, 10 ng/ml FGF) 1 ml alınarak cryovial tüpte kalan hücreler yıkanmaktadır. Daha sonra, 4-5 ml mezenkimal besiyerinden damla damla falkon tüpe eklenmiştir. Falkon tüp, 260xg'de 5 dakika (dk) boyunca santrifüj edilmişir. Tüpteki süpernatant aspire edilmiştir. Hücre pelletine nazikçe vurularak çözdürülmüştür. Üzerine yavaş yavaş 15 ml taze mezenkimal besiyerinden eklenilerek hücre süspansiyonu T-75 santimetrekare (cm^2) kültür kabına alınmıştır. Kültür kabı %5 karbondioksit (CO_2) ve 37°C sıcaklık koşullarına sahip olan inkübatöre kaldırılmıştır.

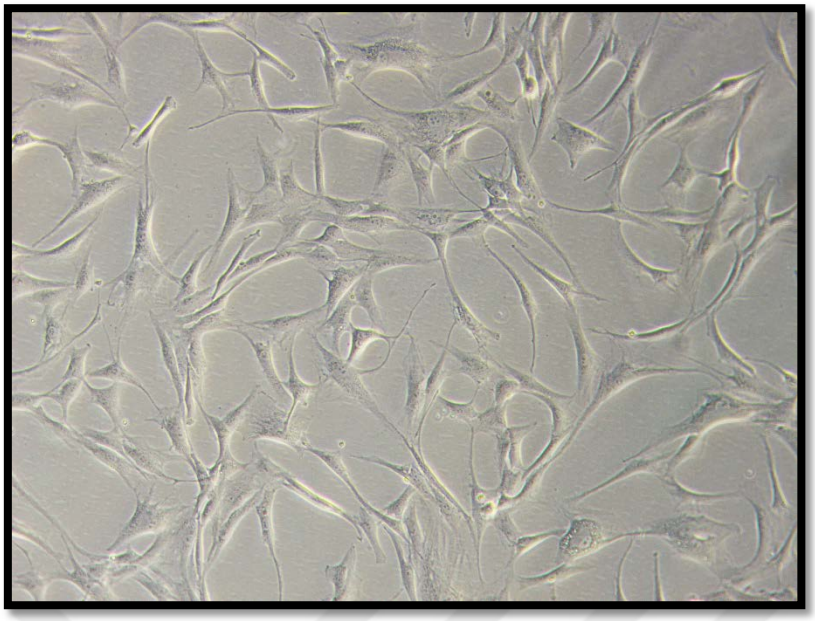
Bu tez çalışması için 3 farklı kültür ortamı denenmiştir:

- DMEM yüksek glikozlu kültür ortamında, hücreler DMEM (1X) +GlutaMAX (+ 4.5 g/L D-Glucose, - Pyruvate, - HEPES), %10 FBS, %1 Pen-Strep, 10 ng/ml FGF içeriğe sahip ortamda 7-10 gün boyunca büyütülmüştür.
- DMEM düşük glikozlu kültür ortamında, hücreler ilk 3 gün DMEM (1X) +GlutaMAX (+ 4.5 g/L D-Glucose, - Pyruvate, - HEPES), %10 FBS, %1 Pen-Strep, 10 ng/ml FGF içeriğe sahip ortamda büyütülmüştür. Sonraki 7 gün boyunca ise, DMEM (1X) (+ 1g/L D-Glucose, L Glutamine, + Pyruvate), %10 FBS, %1 Pen-Strep, 10 ng/ml FGF içeren besiyerinde büyütülmüştür.
- DMEM/F-12 kültür ortamında, hücreler ilk 3 gün DMEM (1X) +GlutaMAX (+ 4.5 g/L D-Glucose, - Pyruvate, - HEPES), %10 FBS, %1 Pen-Strep, 10 ng/ml FGF içeriğe sahip ortamda büyütülmektedir. Sonraki 7 gün boyunca ise, DMEM/F-12 (1:1) (1X) +GlutaMAX, %10 FBS, %1 Pen-Strep, %0.1 2-Mercaptoethanol, 10ng/ml FGF ve EGF) indüksiyon besiyerinde büyütülmüştür.

4.2.1.2. Hücre Kültürünün Pasajlanması

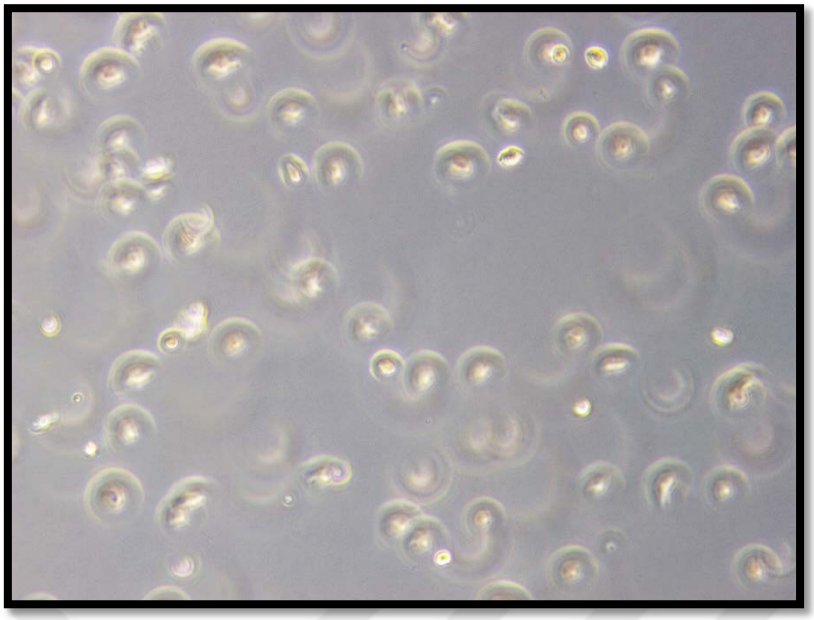
Pasajlama işlemi, hücrenin metabolik atıklarını bertaraf etmek ve yaşamsal faaliyetlerini devam ettirebilmesi için yapılmaktadır.

İnkübatörde kültüre edilen hücrelerin yoğunluğu %70-80'e ulaşınca pasajlama işleminin yapılması gerekmektedir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Pasajlama öncesi hASC'nin görünümü (10X)

Öncelikle kültür kaplarındaki eski besiyeri aspire edilerek uzaklaştırılmıştır. Hücreler metabolik atık, ölü hücreler ve serumdan arınması amacıyla 6-7 ml DPBS (1X) ile yıkanmıştır. DPBS aspire edildikten sonra 1,5 ml tripsin-EDTA ile kültür kabının tüm yüzeyi kaplanmıştır. Kültür kabı inkübatörde 1-2 dk inkübe edilmiştir. İnkübatörden alınan kültür kabındaki hücrelerin yüzeyden tamamen kalkması için kaba hafifçe vurulmaktadır. Hücrelerin yüzeyden kalkıp kalkmadığı ters ışık mikroskobunda da kontrol edilmiştir. Daha sonra hücrelere tripsinin aktivasyonunu durdurmak amacıyla 4,5 ml besiyeri (tripsin-EDTA'nın 3 katı) eklenerek dikkatlice pipetaj yapılmıştır. Homojen hale gelen hücre süspansiyonu hücrelerin yoğunluğuna göre belirlenen miktarda bırakılmıştır. Kalan hücre süspansiyonu ihtiyaca göre yeni bir kültür kabına ekilmiş veya atılmıştır. Kültür kabındaki hücre süspansiyonunun üzerine 12-13 ml yeni besiyeri eklenmiştir (Şekil 4.2). Kültür kabının üzerine tarih, hücre adı, pasaj sayısı ve pasaj oranı mutlaka not edilmelidir. Son olarak kültür kabı 37°C ve %5 CO_2 şartlarındaki inkübatöre kaldırılmıştır.



Şekil 4.2. Pasajlama sonrası hASC'nin görünümü (10X)

4.2.1.3. Hücre Sayımı ve Ekimi

Hücre sayımı, yapılan çalışmalarda uygun hücre miktarının tespiti için yapılmaktadır. Bu işlem için, manuel olarak sayım yapılan hemositometre kullanılmaktadır. Hemositometre, 2 bölmeye ayrılmış 1x1 mm boyutunda 9 kareden oluşan bir metotdur. Sayım sonunda çıkan hücre sayısı 10^6 ile çarpılarak 1 ml'deki hücre derişimini vermektedir. Ekim işlemi için ne kadar hücre ekilmek isteniliyorsa miktarı buna göre hesaplanmaktadır.

Hücre sayımında öncelikle hücreler pasajlanır. Hemositometre ve lamel ilk önce saf su sonra etanolle silinir. Hemositometre üzeri lamel ile örtülür. Hücre süspansiyonuna pipetleme yapılarak homojen olmasına dikkat edilmelidir. Hemositometre'ye 10 mikrolitre (µl) hücre süspansiyonu eklenmelidir. Hücre sayımı ters ışık mikroskobunda yapılmıştır.

Bu tez çalışmasında, hücre ekiminde kullanılacak plakaların hem AF ile kaplandığı hem de AF ile kaplanmadığı denemeler yapılmıştır. AF ile kaplama şu şekildedir:

Hücrelerin ekiminden önce 6 kuyucuklu plakalar için 1.5-2 ml; 24 kuyucuklu plakalar için ise 500 µl AF eklenilip, 30 dk boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra AF ortamdan uzaklaştırılıp ve plakalar hücre ekimine hazır hale gelmiştir.

Yapılan ön denemeler sonucu 6 kuyucuklu plakalar için 10.000, 24 kuyucuklu plakalar için 1.000 hücre ekimi uygun görülmüştür. Plakalar, yapılan hesaplamalar sonucu belirlenen miktardaki besiyerleri eklenerek inkübatörde (37°C ve 5% CO_2) hazır bekletilmiştir. Daha

sonra da gerekli hücre süspansiyonu eklenilmiştir. Plakalar nazikçe sağa sola çevrilmiştir. Ardından plaka üzerindeki kapak örtülüp ve kapağa sertçe vurulmuştur. Bu yapılanlar hücrelerin daha eşit dağılmasını sağlamaktadır. Vurma sırasında hücre süspansiyonunun kapağa yada plakanın başka yerine sıçramamasına dikkat edilmiştir. Plakalar inkübatöre (37°C ve %5 CO_2) kaldırılmıştır.

4.2.1.4. Hücre Kültürünü Grafen Tabanlı Malzemeler İle Muamele Etme

İnsan adipoz kökenli mezenkimal kök hücreler 6 ve 24 kuyucuklu plakalara ekildikten 24 saat sonra grafen tabanlı malzemelerle muamele edilmiştir. Bu tez çalışmasında, grafen tabanlı malzeme olarak; küçük (small) grafen oksit (sGO) ve poli(etilen oksit) ile fonksiyonlaştırılmış grafen nanoşeritler (GNR-PEO) kullanılmıştır. Ana stok derişimi 2,4 mg/ml olan sGO'nun 10 mikrogram (µg)/ml ve 100 µg/ml derişimleri ile çalışılmıştır. Çalışmada 3 farklı boyutta bulunan GNR-PEO denenmiştir. GNR-PEO #1 20 nm, GNR-PEO #2 70 nm ve GNR-PEO #3 105 nm boyutuna sahiptir. Ana stok derişimi 0,5 mg/ml olan her bir GNR-PEO içinde 10 µg/ml ve 100 µg/ml derişimleri kullanılmıştır. Kullanılacak olan besiyerine göre büyüme faktörleri de eklenmiştir. Ana stok derişimi 0,1 mg/ml olan BDNF, NGF, EGF ve FGF için 10 ng/ml derişim hazırlanmıştır. Nöral farklılaşma için hazırlanan 3 farklı kültür ortamı Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Nöral farklılaşma için hazırlanan kültür ortamları

Besiyeri çeşidi	Ortam içeriği
DMEM yüksek glikozlu besiyeri	DMEM (1X) +GlutaMAX (+ 4.5 g/L D-Glucose, -Pyruvate, -HEPES), %10 FBS, %1 Pen-Strep, 10 ng/ml FGF,EGF, NGF ve BDNF
DMEM düşük glikozlu besiyeri	DMEM (1X) (+ 1g/L D-Glucose, L Glutamine, + Pyruvate), %10 FBS, %1 Pen-Strep, 10 ng/ml FGF, EGF, NGF ve BDNF
DMEM/F-12 besiyeri	DMEM/F-12 (1:1) (1X) +GlutaMAX, %10 FBS, %1 Pen-Strep, %1 N2 Supplement, %0.1 2-Mercaptoethanol, 10ng/ml EGF, NGF ve BDNF

Her biri için ayrı ayrı etiketlenmiş falkon tüpler içerisine farklılaşma faktörleri eklenmiş bu 3 farklı kültür ortamı ve derişimi hesaplanan sGO ve GNR-PEO #1, #2 ve #3 eklenmiştir.

6 ve 24 kuyucuklu plakalarda yer alan eski besiyeri aspire edilmiştir. Farklılaşmamış kontrol grubu olarak seçilen kuyucuklara mezenkimal besiyeri, farklılaşmış kontrol grubu olarak belirlenen kuyucuklara ise grafen tabanlı malzemeler içermeyen 3 farklı kültür ortamından eklenmiştir. 6 kuyucuklu plakaya 1 ml, 24 kuyucuklu plakaya da 500 µl sGO ve GNR-PEO içeren besiyeri verildikten sonra 4 saat boyunca inkübatöre kaldırılmıştır. Süre dolduktan sonra malzemeli besiyerleri uzaklaştırılmıştır. 6 kuyucuklu plakaya 1 ml, 24 kuyucuklu plakaya ise 500 µl DPBS (1X) eklenmiş daha sonra aspire edilmiştir. Ardından 6 kuyucuklu plakaya 1,5 ml; 24 kuyucuklu plakaya ise 750 µl yeni besiyeri eklenmiştir.

4.2.2. RNA İZOLASYONU

RNA izolasyonu için Macherey-Nagel marka NucleoSpinRNA Mini Kit kullanılmıştır. Kit içerisinden çıkan liziz solüsyonu (25 ml) içerisine 250 µl 2-Merkaptoetanol eklenmiştir.

GNR-PEO ve sGO muamelesinin 7. ve 14. günlerinin sonunda hücrelerin besiyerleri 6 kuyucuklu plakalardan aspire edilmiştir. Daha sonra her bir kuyucuk yaklaşık 2 ml DPBS (1X) ile yıkanmış ardından 350 µl liziz solüsyonu eklenmiştir. 1000 µl pipet ucu kullanılarak önce yatay daha sonra dikey çizgiler olacak şekilde tüm yüzey kazınmıştır. Mukus gibi bir yapı elde edilince liziz solüsyonu plakaların her yerine değecek şekilde yıkanmıştır. Böylece tüm hücreler yüzeyden kaldırılmış ve etiketlenen tüplerle -20°C'ye kaldırılmıştır.

Liziz edilen hücrelerden NucleoSpinRNA Mini Kit içerisinde yer alan protokole göre RNA izolasyonu yapılmıştır. Protokole göre;

- Önceden liziz edilmiş hücreler mor renkli kolonlu tüplerde 11.000xg'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
- 350 µl %70'lik etanol eklenmiş ve vortekslenmiştir. Daha sonra açık mavi renkli kolonlu tüplerde 11.000xg'de 30 saniye santrifüj edilmiştir.
- 350 µl MDB eklenmiştir ve 11.000xg'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
- 95 µl rekombinant deoksiribonükleaz (rDNase) reaksiyon karışımı eklenmiştir ve oda sıcaklığında 15 dk inkübe edilmiştir. Son 1 dakikasında ise 11.000xg'de santrifüj edilmiştir.
- Yıkama ve kurutma aşamasında ilk olarak 200 µl RAW2 ile yıkanarak 11.000xg'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Daha sonra 600 µl RA3 eklenmiş ve 11.000xg'de 30

saniye santrifüj edilmiştir. En son olarak ise 250 µl RA3 eklenerek 11.000xg'de 2 dk santrifüj edilmiştir.

- RNA izolasyonun son aşaması olarak açık mavi renkli kolonun altında kalan sıvıya 50 µl RNase-free su eklenerek 11.000xg'de 1 dk santrifüj edilmiştir. İzolasyondan daha çok verim alabilmek için bu işlem 2 kez yapılmıştır.

Elde edilen RNA örnekleri etiketlenmiş tüplere alınarak -20°C'ye kaldırılmıştır.

4.2.3. cDNA SENTEZİ

İki farklı besiyerinde 14 gün boyunca büyütülen insan adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin RNA izolasyonu yapılmıştır. İzolasyonu yapılan örneklerin NanoDrop cihazında derişim ve saflık ölçümü yapılmıştır. RNA miktarı, 500 ng/ölçüm sonucu çıkan derişim miktarı şeklinde hesaplanmaktadır. Elde edilen RNA örnekleri için ticari olarak tedarik edilen iScript cDNA Synthesis Kit kullanılmıştır. Kit içerisinde bulunan reaksiyon karışımından örnek başına 4 µl, enzimden ise 1 µl eklenmiştir. 15 µl'den hesaplanan RNA miktarı çıkarılarak eklenecek olan RNase-free su miktarı bulunmaktadır. Her örnek bu şekilde toplam 20 µl hacime sahip olmaktadır. Bio-Rad CFX Connect Real Time System cihazında yer alan iScript cDNA Synthesis Kit'ine ait protokole göre inkübe edilmiştir. İnkübasyon işlemi:

5dk 25°C ⟶ 30dk 42°C ⟶ 5dk 85°C ⟶ 5dk 4°C'de tamamlanmıştır.

İnkübe işlemi sonrası sentezlenen cDNA'lara 20 µl daha RNase-free su ekleyerek seyreltilmiştir. Örnekler -20°C ortam koşullarında saklanmıştır.

4.2.4. EŞ ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (qRT-PCR)

Tezde kullanılan primerler Oligomer (β-III-Tubulin ve Nestin primerleri) ve Macrogen (MAPK1 primeri) firmalarından satın alınmıştır. Primer dizin bilgisi Ek-1'de yer almaktadır.

Her bir örnek için hazırlanacak olan karışımın miktarı şu şekildedir:

- SYBR Green: 10 µL
- dH_2O: 6 µL
- İleri (Forward) Primer: 1 µL
- Geri (Reverse) Primer: 1 µL

Yukarıdaki karışım qRT-PCR'ın gerçekleşmesini sağlayacak reaksiyon karışımıdır. Hazırlanan bu karışımdan 96-kuyucuklu plakada her bir kuyucuğa 18µl eklenmiştir. cDNA örneklerinden ise ilgili kuyucaklara 2µl eklenmiştir. Bu şekilde her bir kuyucuğun toplam hacmi 20 µl olmaktadır. Bio-Rad CFX Connect Real Time System cihazında yer alan SSO Advanced SYBR'a ait protokole göre inkübe edilmiştir. İnkübasyon işleminde her bir döngü:

30sn 95°C ⟶ 10sn 95°C ⟶ 30sn 60°C şeklinde tamamlanmıştır. Bu basamaklar sırasıyla denatürasyon, primer bağlanması ve uzama şeklindedir. Reaksiyonda, primer bağlanması ve uzama basamakları 40 döngüde gerçekleşmektedir.

Veri analizi için Delta-Delta Ct Metodu (Yaklaşım Metodu) kullanılmıştır. Seçilen referans gen ile örnekler üzerinde bakılacak olan genler arasındaki fark alınmıştır. Elde edilen veri, ΔCt değerini vermektedir. ΔΔCt değeri ise, örneklerin ΔCt değerinden kontrol grubunun ΔCt değerlerinin ortalaması çıkarılarak bulunmuştur. Analiz sonuçlarına ise, 2^-ΔΔCt değeri hesaplanarak ulaşılmıştır.

4.2.5. İMMÜNOFLORESAN BOYAMA

24 kuyucuklu plakada DMEM/F-12, DMEM yüksek ve düşük glikozlu besiyerlerinde büyütülen hASC önceden metanol ile sabitlenmiştir. Bu sabitleme işleminin aşamaları şu şekildedir: eski besiyeri uzaklaştırılmıştır. Kuyucuklar DPBS (1X) ile yıkanmıştır sonrasında aspire edilmiştir. Her bir kuyucuğa 500 µl -20°C'den çıkartılmış soğuk metanol eklenilmiş ve 15 dk boyunca -20°C'de inkübe edilmiştir. Metanol kuyucuklardan aspire edildikten sonra güvenlik kabini içerisinde kalan metanolün uçması beklenilmiştir. 24 kuyucuklu plaka -20°C'de saklanmıştır. Bu sabitleme işleminden sonra immünofloresan boyama için aşağıdaki basamaklar izlenmiştir. Öncelikle DPBS (1X) eklenmiştir. Kuyucuklarda 5 dk bekletildikten sonra aspire edilmiştir. Özgül olmayan bağlanmaları engellemek için 50 ml DPBS içerisine %1 BSA eklenmiştir ve vortekslenmiştir. Daha sonra çözeltiye %0,1 Triton X-100 eklenmiş ve tamamen homojen bir görüntü elde edene kadar vortekslenmiştir. Hazırlanan çözeltiden her kuyucuğa 1 ml eklenmiş ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Çözelti aspire edildikten sonra DPBS ile yıkanmıştır. Boyama için birincil antikor olarak nörona spesifik olan β-III-Tubulin (1:50, ab18207) ve Nestin (1:100, ab6320) kullanılmıştır. DPBS içerisinde çözünmüş %1 BSA ve %0,1 Triton X-100 solüsyonunda antikorlar derişimlerine göre seyreltilmiştir. Her bir kuyucuğa 100 µl

birincil antikor eklenerek +4°C'de bir gece boyunca inkübe edilmiştir. Ertesi gün DPBS ile 3 kez yıkanmıştır. İkincil antikor olarak FITC (1:1000, ab6785) ve AF594 (1:500, ab150080) seçilmiştir. Bu antikorlarda derişimlerine göre DPBS içerisinde çözünmüş %1 BSA ve %0,1 Triton X-100 solüsyonunda seyreltilmiştir. İkincil antikorlarda her bir kuyucuğa 100 µl olacak şekilde eklendikten sonra karanlık bir ortamda oda sıcaklığında 1,5 saat boyunca inkübe edilmiştir. Kontrol grubu olarak seçilen kuyucuğa birincil antikor eklemeden sadece ikincil antikor eklenmiştir. İnkübasyon süresi dolduktan sonra her bir kuyucuk yine 3 kez DPBS ile yıkanmıştır. Hücre çekirdeğini boyayabilmek amacıyla DAPI boyasından eklenmiştir. Boyanan örnekler EVOS markalı floresan mikroskobu altında gözlemlenmiştir.

4.2.6. AKIM SİTOMETRİSİ

14 gün boyunca GNR-PEO ve sGO malzemeleri ile muamele edilen adipoz kökenli kök hücrelerin besiyerleri aspire edilmiştir. 6 kuyucuklu plakaların her biri 1 ml DPBS (1X) ile yıkanmıştır. Hücrelerin üzerine 250 µl tripsin eklenmiştir. %5 CO_2 ve 37°C koşullarında 5 dk inkübe edilmiştir. 750 µl besiyeri eklendikten sonra pipetaj yapılmıştır. Plakalarda aynı grupta olan örnekler 15 ml falkon tüpte birleştirilmiştir. Tüpler 260xg'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmış ve pellete dikkatlice vurularak çözdürülmüştür. Her bir gruba 2 ml DPBS (1X) eklenerek, 1 ml olacak şekilde eppendorf tüplere bölünmüştür. Tüpler 260xg'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmış ve pellete dikkatlice vurularak çözdürülmüştür. Tüpler vortekslenirken, 500 µl %70'lik soğuk etanol damla damla eklenmiştir. Daha sonra 5 dk boyunca -20°C'de inkübe edilmiştir. 260xg'de 5 dk santrifüj edilip, süpernatant uzaklaştırılmış ve pellet parmakla hafifçe vurularak çözdürülmüştür. Her bir tüpe 100 µl olacak şekilde %1 BSA ve %0.1 Triton-X-100 içeren DPBS (1X) eklenmiştir. Oda sıcaklığında 20 dk inkübe edilmiştir. Süre dolduktan sonra 260xg'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Üstte kalan süpernatant uzaklaştırılmış ve pellete dikkatlice vurularak çözdürülmüştür. 500 µl %1 BSA içeren DPBS (1X) ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Tüpler 260xg'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra yine süpernatant uzaklaştırılmış ve pelletler çözdürülmüştür. Boyanmamış grup olarak seçilen tüplere 100 µl %1 BSA içeren DPBS (1X) eklenmiştir. Bu gruplar çalışmada kontrol grubu olacaktır. Boyanmış gruplar ise, 100 µl birincil antikorları içeren %1 BSA eklenmiş DPBS (1X) ile muamele edilmiştir. Bu tez çalışmasında akım sitometrisi için birincil antikorlar olarak β-III-Tubulin (1:100, ab18207) ve Nestin (1:100, ab6320)

kullanılmıştır. Tüpler oda sıcaklığında 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. 260xg'de 5 dk santrifüj işleminden sonra süpernatant uzaklaştırılmış ve pellet çözdürülmüştür. Hücreler iki kez 500 µl %1 BSA içeren DPBS (1X) ile yıkanmıştır. Bütün gruplar 100 µl ikincil antikorları içeren %1 BSA eklenmiş DPBS (1X) ile muamele edilmiştir. Bu tez çalışmasında akım sitometrisi için ikincil antikorlar olarak ise AF594 (1:2000, ab150080) ve FITC (1:500, ab6785) kullanılmıştır. Hücreler karanlıkta ve oda sıcaklığı ortamında 30 dk boyunca inkübe edilmiştir. Ardından 260xg'de 5 dk santrifüj edilmiş, süpernatant pelletten uzaklaştırılmış ve pellete hafifçe vurularak çözdürülmüştür. İki kez 500 µl %1 BSA içeren DPBS (1X) ile hücreler yıkanmıştır. Hücreler 5 dk boyunca 260xg'de santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Tüplere %1 BSA içeren DPBS (1X) eklenmiştir. Hafifçe vurularak hücrelerin homojen olarak çözündüğünden emin olunmalıdır. Daha sonra hücrelerin BD Accuri C6 Plus markalı akım sitometrisi cihazında ölçümleri yapılmıştır.

4.2.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Tez çalışmasında, GraphPad Prism yazılımındaki (5.00 sürümü) İki Yönlü ANOVA (iki yönlü varyans analizi) ve Bonferroni testi kullanılarak istatistiksel analizler yapılmıştır.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

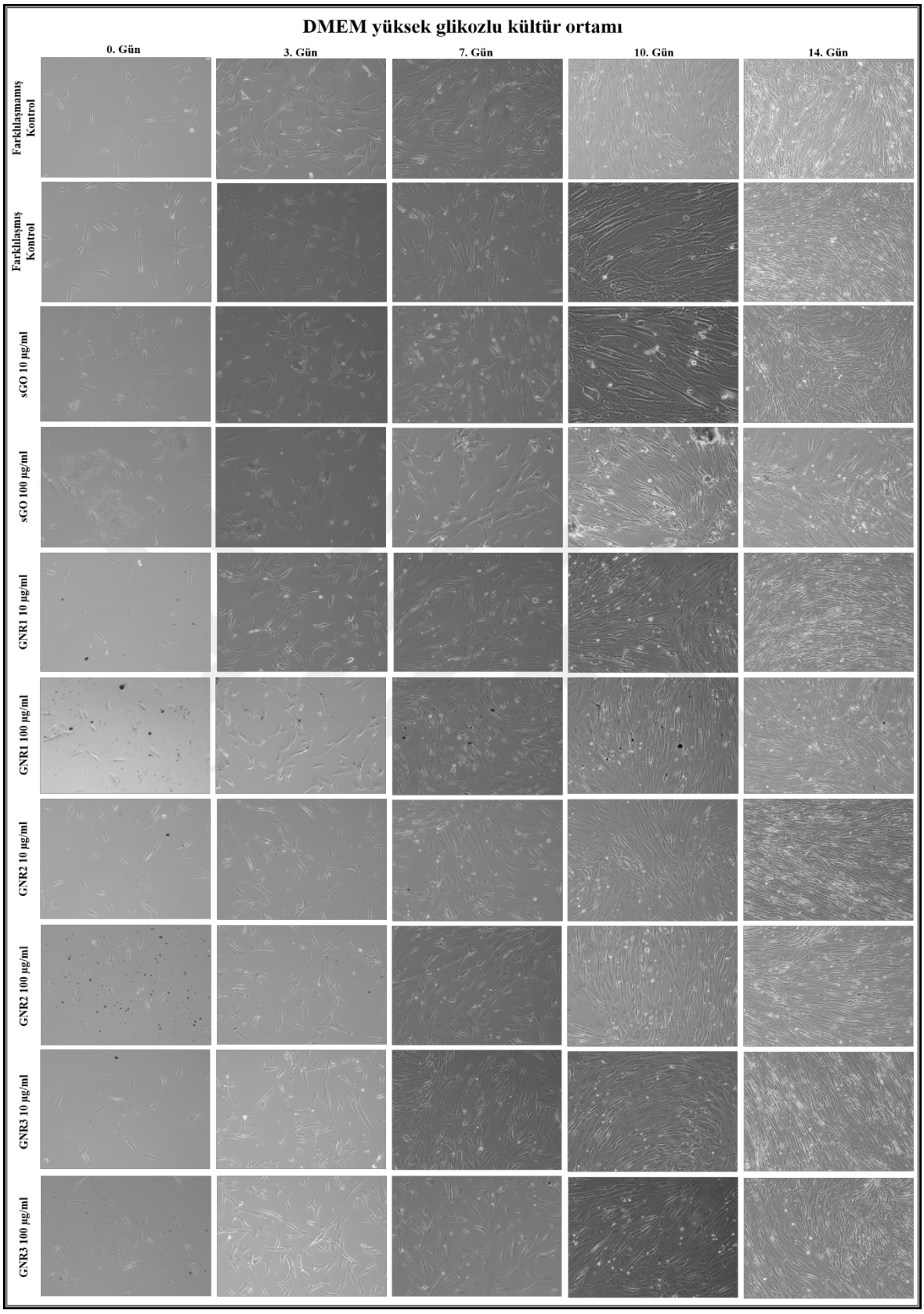
5.1. ADİPOZ KÖKENLİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN GNR-PEO VE sGO İLE MUAMELE EDİLDİKTEN SONRA GÖRÜNTÜLENMESİ

İnsan adipoz kökenli mezenkimal kök hücreler, nöral farklılaşma için grafen tabanlı malzemeler ile 3 farklı besiyerinde kültüre edilmiştir. Bu kültür ortamları:

- DMEM yüksek glikozlu besiyeri: DMEM (1X) +GlutaMAX (+ 4.5 g/L D-Glucose, -Pyruvate, -HEPES), %10 FBS, %1 Pen-Strep, 10 ng/ml FGF,EGF, NGF ve BDNF
- DMEM düşük glikozlu besiyeri: DMEM (1X) (+ 1g/L D-Glucose, L Glutamine, + Pyruvate), %10 FBS, %1 Pen-Strep, 10 ng/ml FGF, EGF, NGF ve BDNF
- DMEM/F-12 besiyeri: DMEM/F-12 (1:1) (1X) +GlutaMAX, %10 FBS, %1 Pen-Strep, %1 N2 Supplement, %0.1 2-Mercaptoethanol, 10ng/ml EGF, NGF ve BDNF şeklindedir.

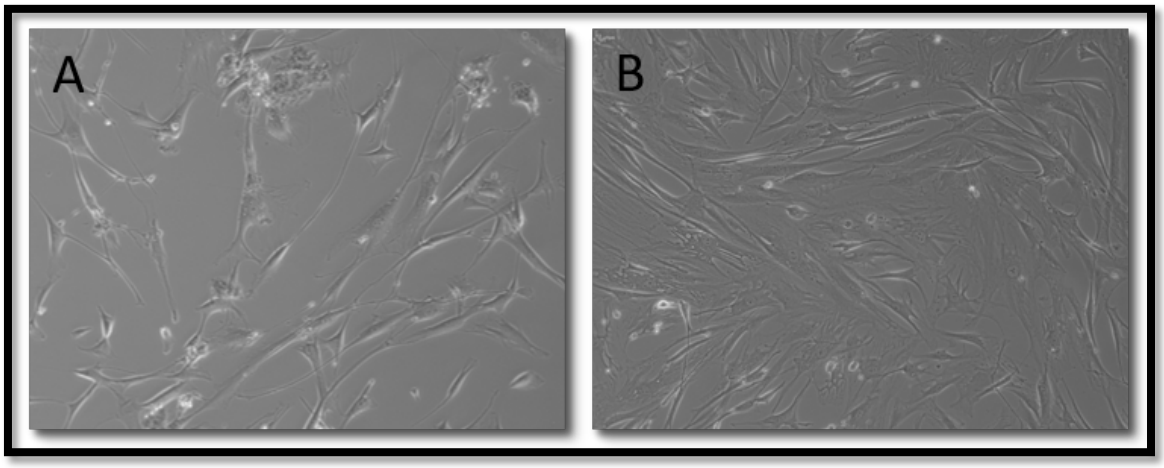
Bu tez çalışmasında, hASC üzerinde nöral farklılaşma için etkisi araştırılan grafen tabanlı malzemelerin (GNR-PEO ve sGO) iki farklı derişimi (10 ve 100 µg/ml) kullanılmıştır. Hücreler 14 gün boyunca 37°C sıcaklık ve %5 CO_2 ortam koşullarında inkübe edilmiştir. 3-4 günde bir eski besiyerleri aspire edilip, taze besiyeri eklenmiştir. GNR-PEO ve sGO ile muamele edilen hücrelerin ters ışık mikroskobunda 0,3,7,10 ve 14'üncü günlerde görüntüleri alınmıştır.

DMEM yüksek glikozlu besiyerinde sGO ve GNR-PEO ile muamele edilen hücreler 14 gün boyunca gözlenmiştir (Şekil 5.1). 100 µg/ml sGO grubunda 3. günün sonunda bazı hücrelerde farklılaşma görülmeye başlanmıştır. 7. günde hücrelerde incelmeler gözlenmiştir. 14. güne yaklaşırken ise hücre gövdeleri küçülmeye ve dallanmalar oluşmaya başlamıştır. Morfolojik olarak farklılaşma en çok sGO'nun 100 µg/ml derişime sahip olduğu grupta gözlenmiştir. 100 µg/ml GNR-PEO grupları (#1, #2, #3) ve 10 µg/ml sGO ortamlarındaki hücreler morfolojik olarak birbirine benzerlik göstermiştir. Bu gruplardaki hücrelerde 7-10'uncu günlerin arasında hücre uzantılarında incelmeler meydana gelmiştir. Ancak hücre gövdesinde küçülme ve dallanmalar ortamdaki bazı hücrelerde görülerek genele yayılmamıştır. 10 µg/ml derişime sahip GNR-PEO gruplarının hücreleri nörona farklılaştırma üzerinde gözle görünür bir fark yaratacak etkisi gözlenememiştir. Kültüre edilen bütün grupların plakaları 14. günde hücreler ile tamamen dolmuştur.



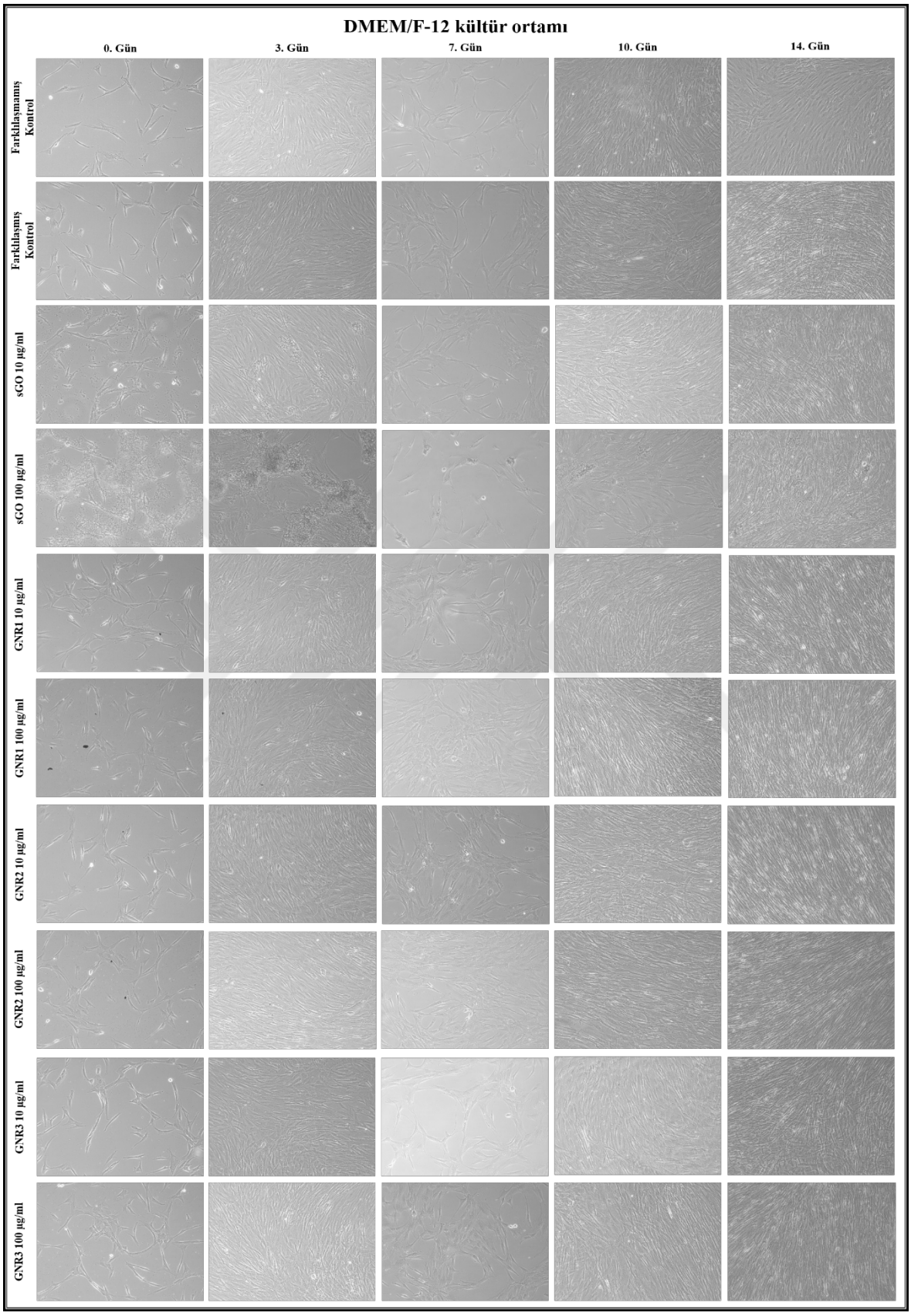
Şekil 5.1. DMEM yüksek glikozlu besiyerinde kültüre edilen insan adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin görüntüleri. GNR-PEO ve sGO ile farklı derişimlerde muamele edilen hücrelerin 0, 3, 7, 10 ve 14'üncü günlerinde ters ışık mikroskobunda görüntüleri (10X)

sGO-100µg/ml grubunun farklılaşmamış kontrol grubuna göre hücrelerde incelme gözlenmiştir. İki grup arasındaki morfolojik fark daha ayrıntılı Şekil 5.2.'de gösterilmiştir.



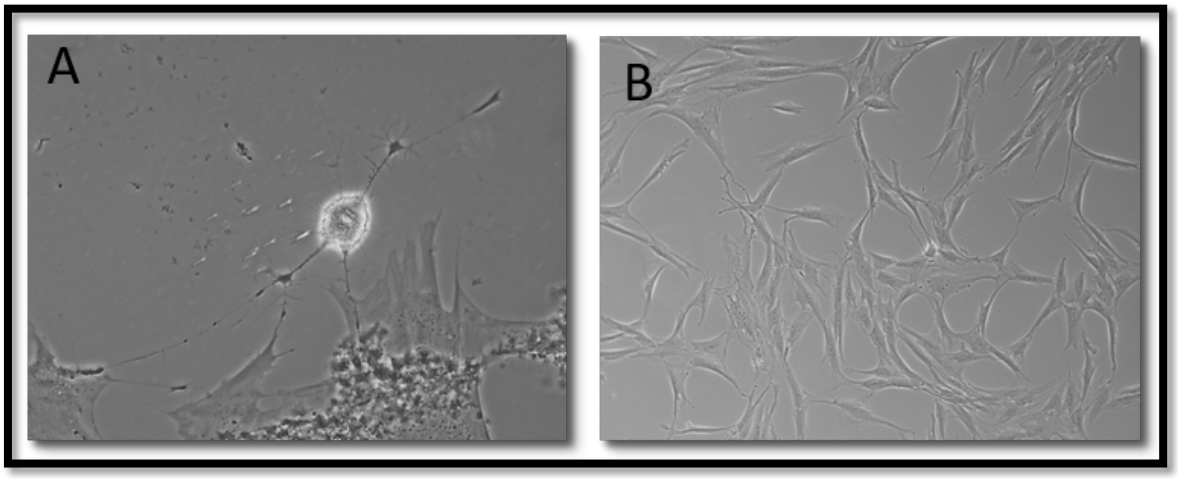
Şekil 5.2. DMEM yüksek glikozlu kültür ortamında (A) sGO-100 µg/ml ve (B) farklılaşmamış kontrol grubunun ters ışık mikroskobunda görüntüleri (10X)

DMEM/F-12 besiyerinde iki farklı derişimdeki sGO ve GNR-PEO ile muamele edilen hücreler 14 gün boyunca gözlenmiştir (Şekil 5.3). DMEM/F-12 besiyerinde hücrelerin proliferasyonu çok hızlı gerçekleşmiştir. 3. gün sonunda plakalar hücreler ile tamamen dolmuştur. Bu yüzden 4. günde plakalardaki hücreler tripsin ile kaldırılarak pasajlanmıştır. 7. günde sGO 100 µg/ml derişimdeki hücrelerin sayısı diğer gruplara göre belirgin bir şekilde azdır. Ancak hücrelerde incelme ve gövdede küçülmede en çok yine bu grupta gözlenmiştir. 7. günde 100 µg/ml sGO dışındaki diğer malzemeli gruplardaki hücreler birbirine benzemektedir. 10 ve 14'üncü günlerde hücre proliferasyonu yine çok fazla olduğu için hücreler net gözlenememiştir. Malzemeli olan gruplarda her geçen gün malzemelerin görülmesi azalmıştır. 14. günün sonunda plakalar hücreler ile tamamen dolmuştur.



Şekil 5.3. DMEM/F-12 besiyerinde kültüre edilen insan adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin görüntüleri. GNR-PEO ve sGO ile farklı derişimlerde muamele edilen hücrelerin 0, 3, 7, 10 ve 14'üncü günlerinde ters ışık mikroskobunda görüntüleri alınmıştır (10X)

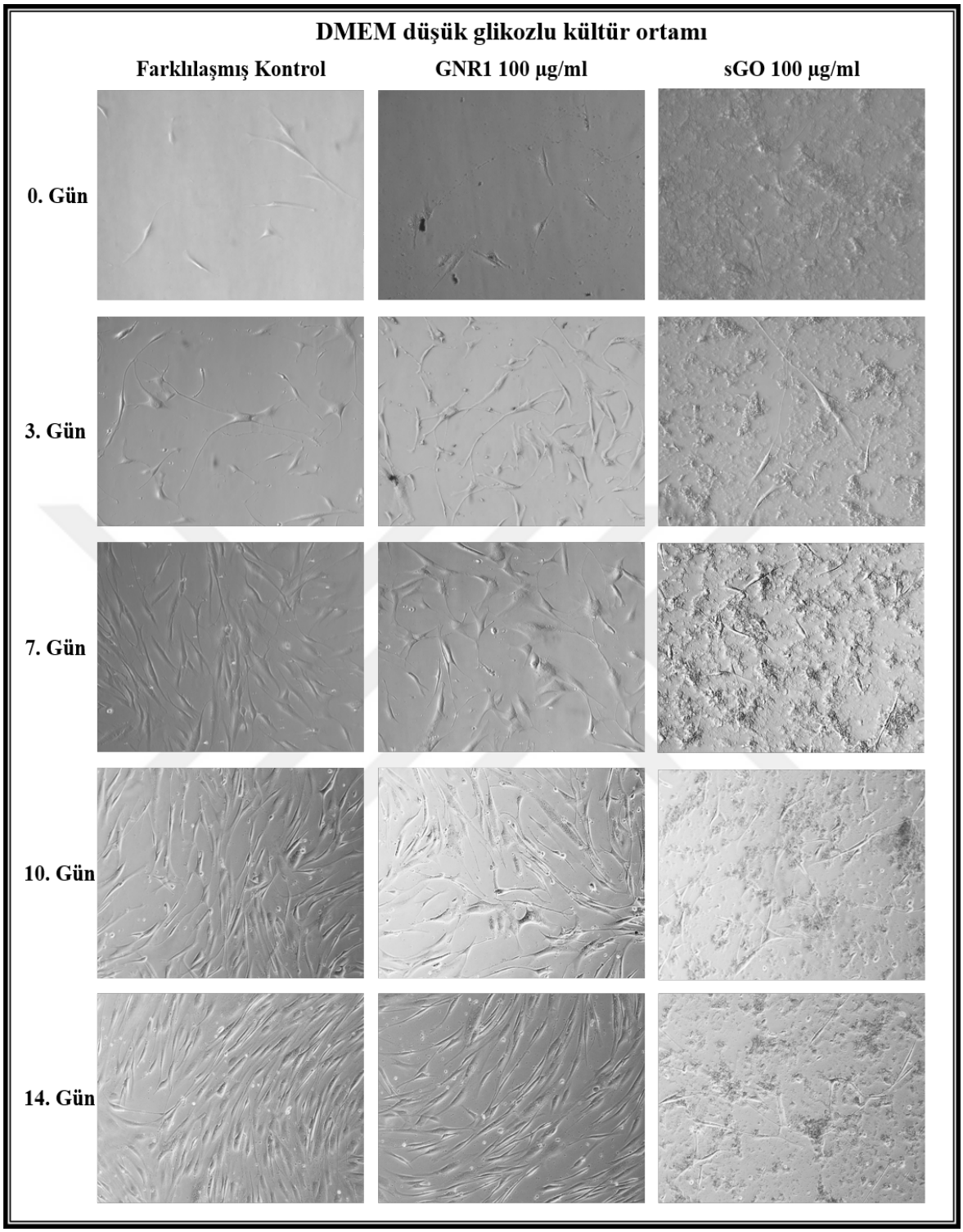
DMEM/F-12 kültür ortamında sGO-100µg/ml grubuna ait hücrelerdeki dallanmalar, hücre gövdesinde küçülme ve incelmeler Şekil 5.4'de net bir şekilde gözlenmektedir.



Şekil 5.4. DMEM/F-12 kültür ortamında (A) sGO-100 µg/ml ve (B) farklılaşmamış kontrol grubunun ters ışık mikroskobunda görüntüleri (20X)

Öncesinde DMEM yüksek glikozlu ve DMEM/F-12 kültür ortamlarında yapılan gözlemler doğrultusunda incelenecek olan gruplar azaltılmıştır. Burada seçilen gruplar hücrelerin malzeme eklenmeden sadece büyüme faktörleri ile büyütüldüğü farklılaşmış kontrol grubu ve malzemeli gruplardan hücrelerde farklılaşmanın en çok görüldüğü gruplar olmuştur. Bu yüzden plakaların AF ile kaplandığı DMEM düşük glikozlu kültür ortamında kontrol, 100 µg/ml derişime sahip GNR1 ve sGO grupları denenmiştir.

DMEM düşük glikozlu besiyerinde hücreler kültür edilmeden önce 6 ve 24 kuyucuklu plakalar AF ile kaplanmıştır. DMEM düşük glikozlu kültür ortamında hücreler 14 gün boyunca gözlenmiştir (Şekil 5.5). 100 µg/ml sGO 3. günden itibaren hücrelerde incelme görülmüştür. 10. günde hücre gövdelerinde dallama görülmeye başlanmıştır. 14. güne gelindiğinde hücre sayısı azalmıştır. GNR1-100 µg/ml grubundaki gözlemler, 3. günde hücrelerin uzantılarında dallanma, 7. günde ise hücre gövdesine doğru küçülme olduğu gözlenmiştir. 14. günde diğer kültür ortamlarına göre hücre proliferasyonu geride kalmıştır.



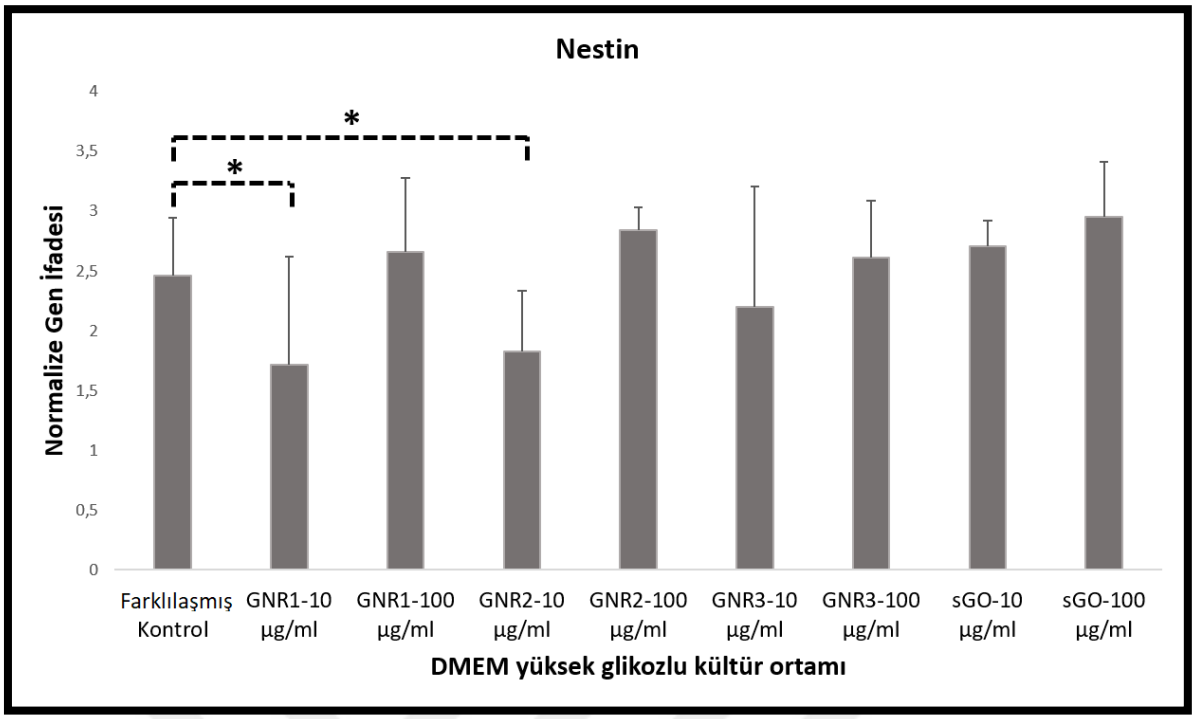
Şekil 5.5. DMEM düşük glikozlu besiyerinde kültüre edilen insan adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin görüntüleri. 100 µg/ml derişimde GNR-PEO #1 ve sGO ile muamele edilen hücrelerin 0, 3, 7, 10 ve 14'üncü günlerinde ters ışık mikroskobunda görüntüleri alınmıştır (10X)

5.2. GNR-PEO ve sGO MUAMELESİNİN ADİPOZ KÖKENLİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ANALİZ EDİLMESİ

İnsan adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin, GNR-PEO ve sGO içeren 3 farklı besiyerinde kültüre edilmesinin hücre üzerindeki etkisinin araştırmasında gen ifade seviyelerinin tespiti için eş zamanlı PCR analizi yapılmıştır. Analizlerde, VI tipi ara filament protein geni olan Nestin ve olgunlaşmamış nöronlarda ifade edilen bir gen olan β-III-Tubulin seçilmiştir. Bu iki gen, referans gen olarak seçilen MAPK1'e göre analiz edilmiştir.

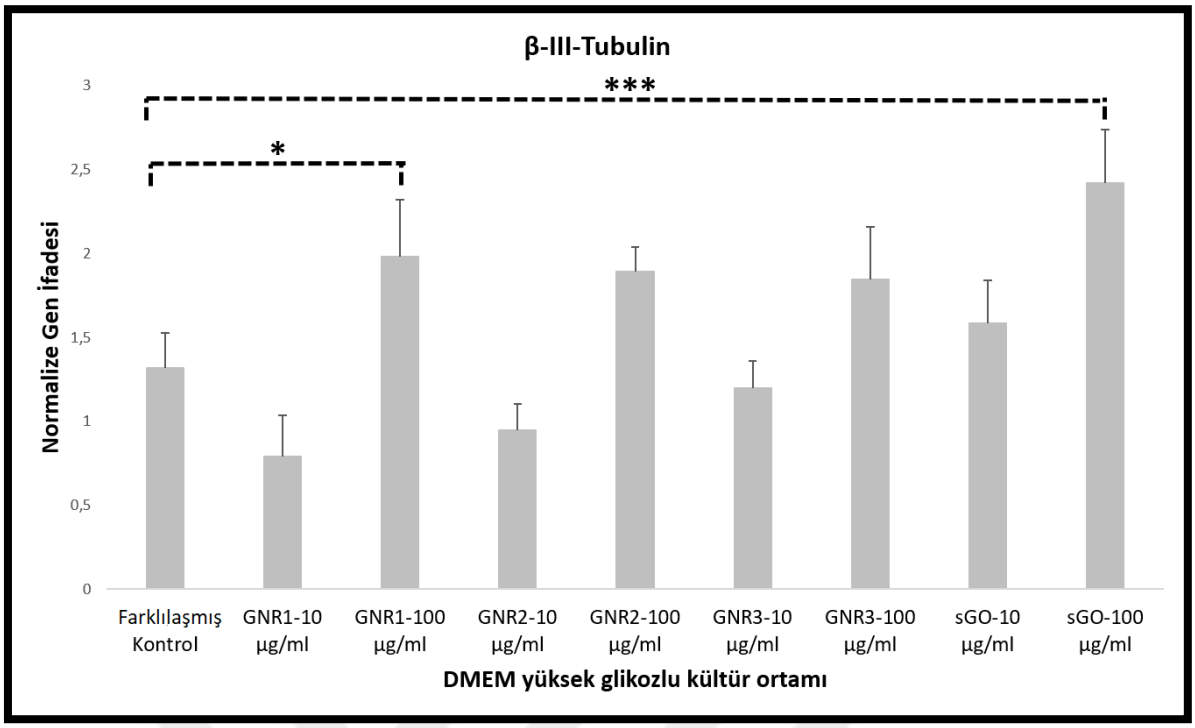
14 gün boyunca DMEM yüksek glikozlu ve DMEM/F-12 kültür ortamlarına eklenmiş iki farklı derişime sahip GNR-PEO ve sGO ile muamele edilen örneklerden öncelikle RNA izole edilmiştir. İzolasyonu yapılan örneklere cDNA sentezi yapılmıştır. Son olarak ise bu örneklerin β-III-Tubulin ve Nestin geni ifadelerine bakılması amacıyla eş zamanlı PCR analizi yapılmıştır. Sadece mezenkimal besiyerinde kültüre edilmiş olan hASC farklılaşmamış kontrol grubu olarak seçilmiştir. Gen ifadeleri analiz edilirken bu kontrol grubuna göre normalizasyon yapılmıştır. Malzemenin eklenmediği sadece büyüme faktörlerini barındıran kültür ortamları ise farklılaşmış kontrol grubu olarak adlandırılmıştır.

DMEM yüksek glikozlu besiyerinde kültüre edilen hücrelerin 14 günün sonundaki eş zamanlı PCR analizinde Nestin geni için sonuçları (Şekil 5.6): sGO-100 µg/ml grubu en çok artışı göstererek ilk sırada yer almıştır. Bu artışı 10 µg/ml sGO grubu takip etmiştir. Ancak bu iki grup için yapılan analizler istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır. GNR-PEO gruplarında ise, 100 µg/ml derişimde bulunan GNR2 ve GNR1 gruplarının gen ifadesindeki artışı yine istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı bulunamamıştır. Malzemenin yokluğunu temsil eden farklılaşmış kontrol grubu ile kıyaslanan 10 µg/ml derişimdeki GNR-PEO #1 ve #2 gruplarının gen ifadesindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.



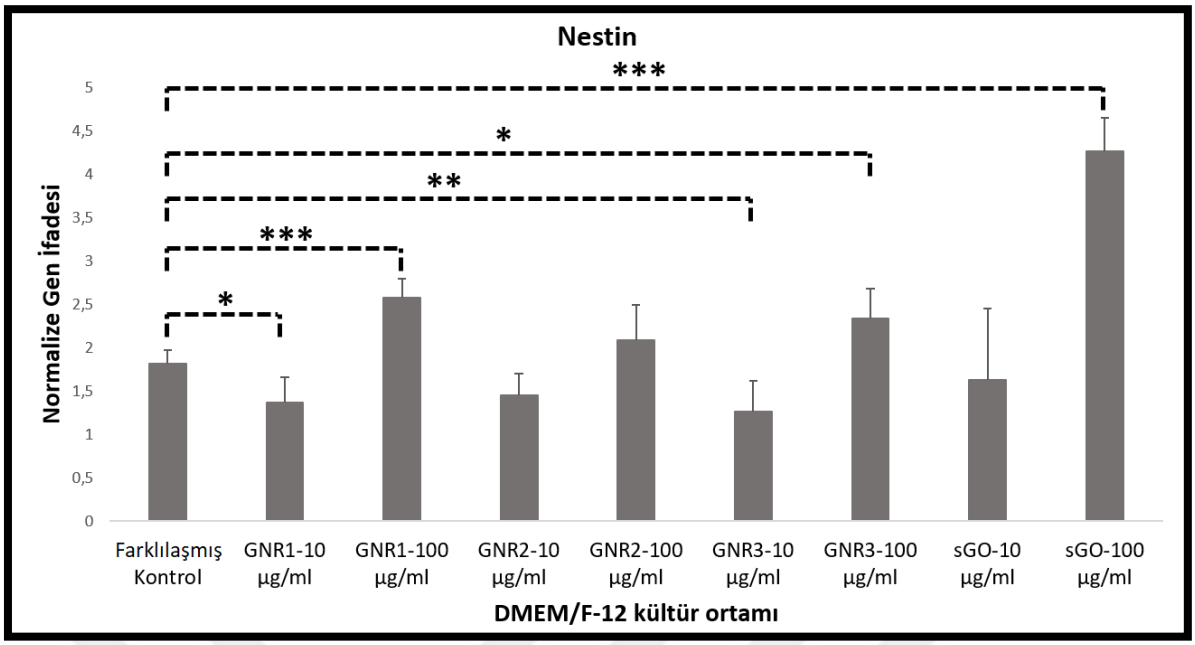
Şekil 5.6. 14 gün boyunca DMEM yüksek glikozlu kültür ortamında sGO ve GNR-PEO muamelesinden sonra alınan örneklerin Nestin geni için eş zamanlı PCR analizi. İki farklı derişimde bulunan sGO ve GNR-PEO ile muamele edilen hASC'ye eş zamanlı PCR analizi yapılmıştır. Gen ifade analizi hASC'nin mezenkimal besiyerinde yetiştirildiği farklılaşmamış kontrol grubuna göre normalize edilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlılık derecesine göre p değerleri; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

DMEM yüksek glikozlu besiyerinde kültüre edilen hücrelerin 14 günün sonundaki eş zamanlı PCR analizinde β-III-Tubulin geni sonuçları ise şu şekildedir (Şekil 5.7): En çok artış Nestin sonucundaki gibi 100 µg/ml derişimdeki sGO'da gözlemlenmiştir. Bu sonuç istatistiksel olarak değerlendirildiğinde çok yüksek düzeyde anlamlı çıkmıştır. GNR-PEO çeşitleri arasında ise GNR1 100 µg/ml en fazla artışı göstermiştir. Bu gruptaki artışta istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. 10 µg/ml derişimdeki örnekler kontrol grubuna göre geride kalmıştır. Bu örneklerin azalmaları istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır.



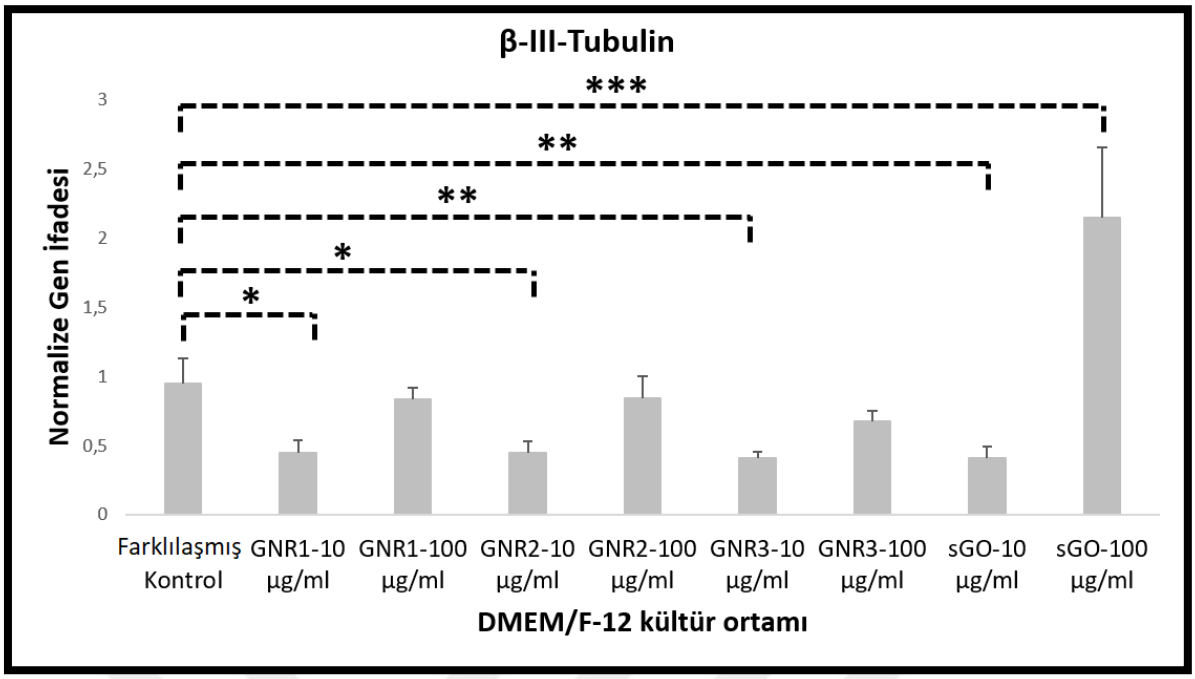
Şekil 5.7. 14 gün boyunca DMEM yüksek glikozlu kültür ortamında sGO ve GNR-PEO muamelesinden sonra alınan örneklerin β-III-Tubulin geni için eş zamanlı PCR analizi. İki farklı derişimde bulunan sGO ve GNR-PEO ile muamele edilen hASC'ye eş zamanlı PCR analizi yapılmıştır. Gen ifade analizi hASC'nin mezenkimal besiyerinde yetiştirildiği farklılaşmamış kontrol grubuna göre normalize edilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlılık derecesine göre p değerleri; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

DMEM yüksek glikozlu besiyerinde iki farklı derişimdeki sGO ve GNR-PEO malzemeleriyle muamele edilen hASC, 14 gün boyunca ortam içeriği daha farklı olan DMEM/F-12 besiyerinde yine iki farklı derişime sahip sGO ve GNR-PEO ile muamele edilmiştir. 14 gün boyunca DMEM/F-12 besiyerinde kültüre edilen hücrelerin eş zamanlı PCR analizindeki Nestin geni sonuçları (Şekil 5.8): 100 µg/ml derişimde bulunan sGO en çok artışı gösteren grup olmuştur. sGO'dan sonra GNR-PEO çeşitleri arasından GNR1-100 µg/ml grubu artış göstermiştir. Bu iki grubunda artışı istatistiksel olarak çok yüksek düzeyde anlamlı bulunmuştur. GNR3-100 µg/ml grubunda da anlamlı bir artış gözlenmiştir. 10 µg/ml derişime sahip GNR1 ve GNR2 gruplarında ise sadece büyüme faktörlerinin bulunduğu farklılaşmış kontrol grubuna göre kıyaslandığında gen ifadelerinde azalma gözlenmiştir. İstatistiksel olarak GNR1-10µg/ml grubunda anlamlı, GNR3-10 µg/ml grubunda ise yüksek düzeyde anlamlı bir azalış mevcuttur.



Şekil 5.8. 14 gün boyunca DMEM/F-12 kültür ortamında sGO ve GNR-PEO muamelesinden sonra alınan örneklerin Nestin geni için eş zamanlı PCR analizi. İki farklı derişimde bulunan sGO ve GNR-PEO ile muamele edilen hASC'ye eş zamanlı PCR analizi yapılmıştır. Gen ifade analizi hASC'nin mezenkimal besiyerinde yetiştirildiği farklılaşmamış kontrol grubuna göre normalize edilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlılık derecesine göre p değerleri; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

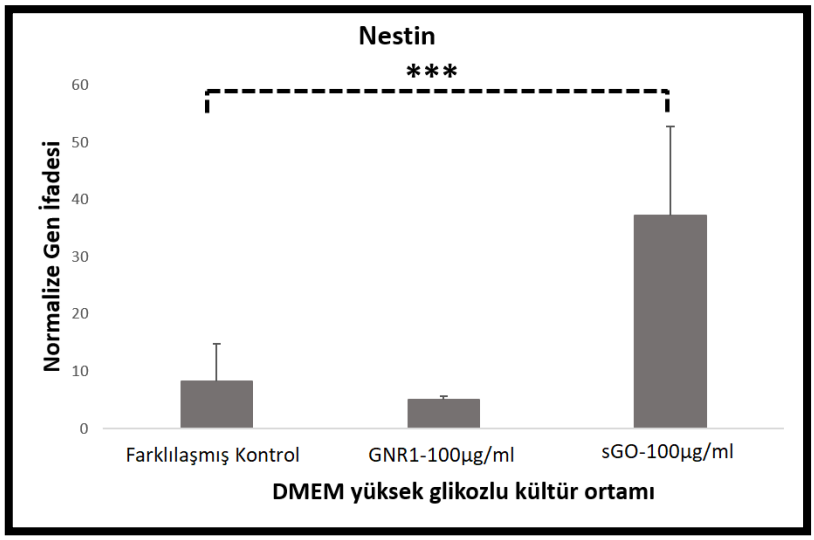
14 gün boyunca DMEM/F-12 besiyerinde kültüre edilen hücrelerin eş zamanlı PCR analizindeki β-III-Tubulin geni sonuçları ise şu şekildedir (Şekil 5.9): Artış sadece sGO 100 µg/ml grubunda olmuştur ve istatistiksel anlamda çok yüksek düzeyde anlamlı bulunmuştur. Diğer gruplardaki β-III-Tubulin seviyesi düşük kalmıştır. Azalma gösteren 10 µg/ml derişime sahip GNR1 ve GNR2 istatistiksel olarak anlamlı, 10 µg/ml derişime sahip GNR3 ve sGO ise yüksek düzeyde anlamlı bulunmuştur.



Şekil 5.9. 14 gün boyunca DMEM/F-12 kültür ortamında sGO ve GNR-PEO muamelesinden sonra alınan örneklerin β-III-Tubulin geni için eş zamanlı PCR analizi. İki farklı derişimde bulunan sGO ve GNR-PEO ile muamele edilen hASC'ye eş zamanlı PCR analizi yapılmıştır. Gen ifade analizi hASC'nin mezenkimal besiyerinde yetiştirildiği farklılaşmamış kontrol grubuna göre normalize edilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlılık derecesine göre p değerleri; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

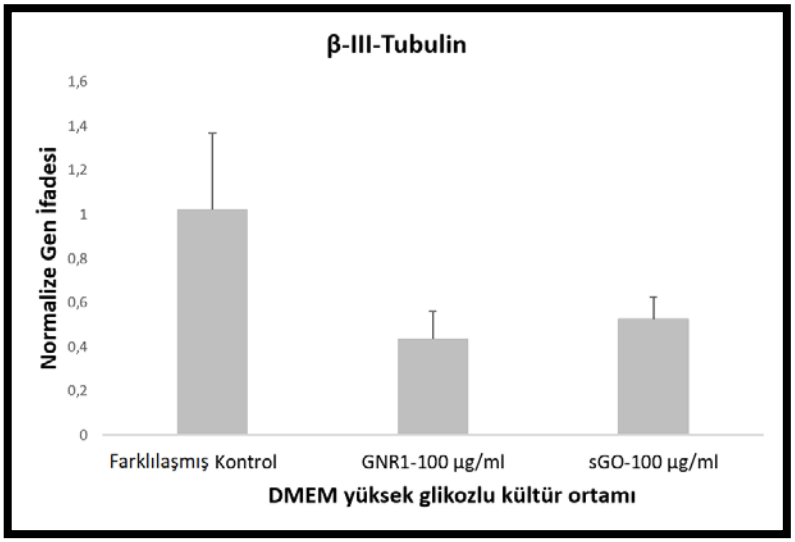
14 gün boyunca DMEM yüksek glikozlu ve DMEM/F-12 kültür ortamlarında farklı derişimlerdeki grafen tabanlı malzemelerle muameleye maruz kalan hASC'nin gen ifade analizinde yukarıdaki sonuçlar elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda 6 kuyucuklu plakalar AF ile kaplanarak 7 gün boyunca aynı koşullar uygulanmıştır. Ayrıca yine elde edilen sonuçlara göre 100 µg/ml derişimdeki GNR-PEO #1 ve sGO grupları seçilmiştir. Seçilen gruplardan yine RNA izole edilmiş daha sonra cDNA sentezi yapılmıştır. Gen ifadesi analizinde yine β-III-Tubulin ve Nestin genlerine bakmak için eş zamanlı PCR analizi yapılmıştır. Sadece mezenkimal besiyerinde kültüre edilmiş olan hASC farklılaşmamış kontrol grubu olarak seçilmiştir. Gen ifadeleri analiz edilirken bu kontrol grubuna göre normalizasyon yapılmıştır. Malzemenin eklenmediği sadece büyüme faktörlerini barındıran kültür ortamları ise farklılaşmış kontrol grubu olarak adlandırılmıştır.

7 gün boyunca DMEM yüksek glikozlu kültür ortamında AF ile kaplı plakalarda kültüre edilen hASC'nin eş zamanlı PCR analizinde Nestin geni sonuçları (Şekil 5.10): sGO-100µg/ml grubu bütün eş zamanlı PCR analizleri boyunca en fazla artışı bu şartlar altında göstermiştir. İstatistiksel olarak da çok yüksek düzeyde anlamlı çıkmıştır.



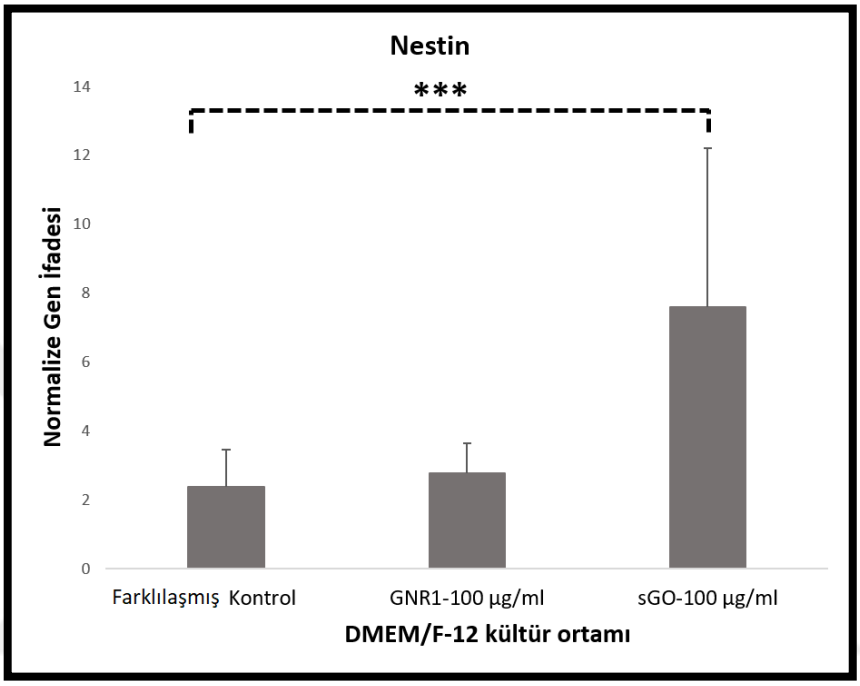
Şekil 5.10. 7 gün boyunca AF ile kaplı DMEM yüksek glikozlu kültür ortamında sGO ve GNR-PEO muamelesinden sonra alınan örneklerin Nestin geni için eş zamanlı PCR analizi. 100 µg/ml derişimdeki sGO ve GNR-PEO ile muamele edilen hASC'ye eş zamanlı PCR analizi yapılmıştır. Gen ifade analizi hASC'nin mezenkimal besiyerinde yetiştirildiği farklılaşmamış kontrol grubuna göre normalize edilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlılık derecesine göre p değerleri; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

7 gün boyunca DMEM yüksek glikozlu kültür ortamında AF ile kaplı plakalarda kültüre edilen hASC'nin eş zamanlı PCR analizinde β-III-Tubulin geni sonuçları (Şekil 5.11): 3 grup içinde β-III-Tubulin gen ifadesi seviyesi düşük kalmıştır. Bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.



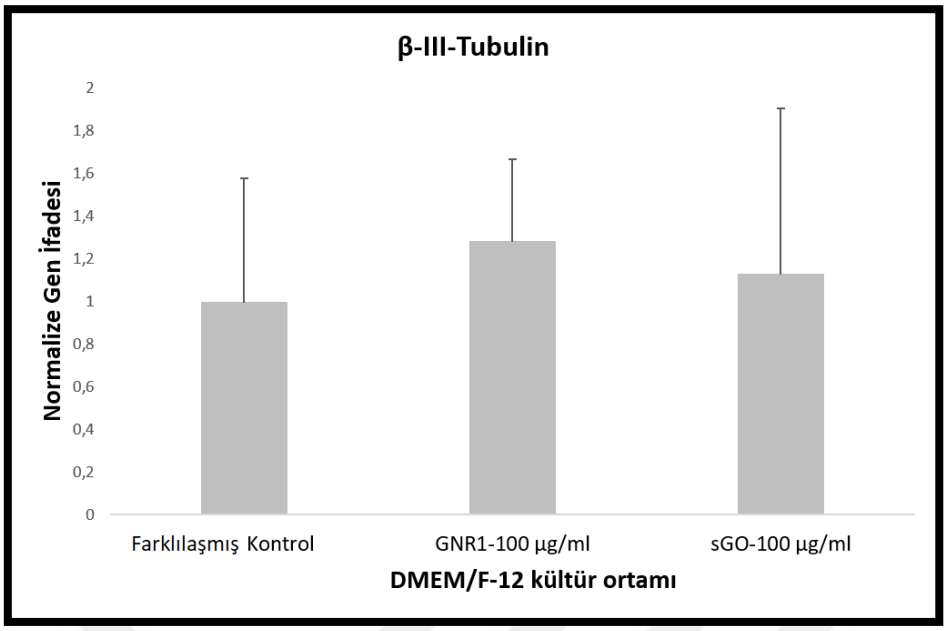
Şekil 5.11. 7 gün boyunca AF ile kaplı DMEM yüksek glikozlu kültür ortamında sGO ve GNR-PEO muamelesinden sonra alınan örneklerin β-III-Tubulin geni için eş zamanlı PCR analizi. 100 µg/ml derişimdeki sGO ve GNR-PEO ile muamele edilen hASC'ye eş zamanlı PCR analizi yapılmıştır. Gen ifade analizi hASC'nin mezenkimal besiyerinde yetiştirildiği farklılaşmamış kontrol grubuna göre normalize edilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlılık derecesine göre p değerleri; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

7 gün boyunca DMEM/F-12 kültür ortamında AF ile kaplı plakalarda kültüre edilen hASC'nin eş zamanlı PCR analizinde Nestin geni sonuçları (Şekil 5.12): Bu kültür ortamında elde edilen sonuçlar 7 günlük DMEM yüksek glikozlu kültür ortamındaki alınan sonuçlar sıralamasına benzemektedir. Bu kültür ortamında da, sGO-100µg/ml en fazla artışı çok yüksek düzey anlamlılıkla gösteren grup olmuştur. GNR1-100 µg/ml grubunda da artış gözlenmiş; ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.



Şekil 5.12. 7 gün boyunca AF ile kaplı DMEM/F-12 kültür ortamında sGO ve GNR-PEO muamelesinden sonra alınan örneklerin Nestin geni için eş zamanlı PCR analizi. 100 µg/ml derişimdeki sGO ve GNR-PEO ile muamele edilen hASC'ye eş zamanlı PCR analizi yapılmıştır. Gen ifade analizi hASC'nin mezenkimal besiyerinde yetiştirildiği farklılaşmamış kontrol grubuna göre normalize edilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlılık derecesine göre p değerleri; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

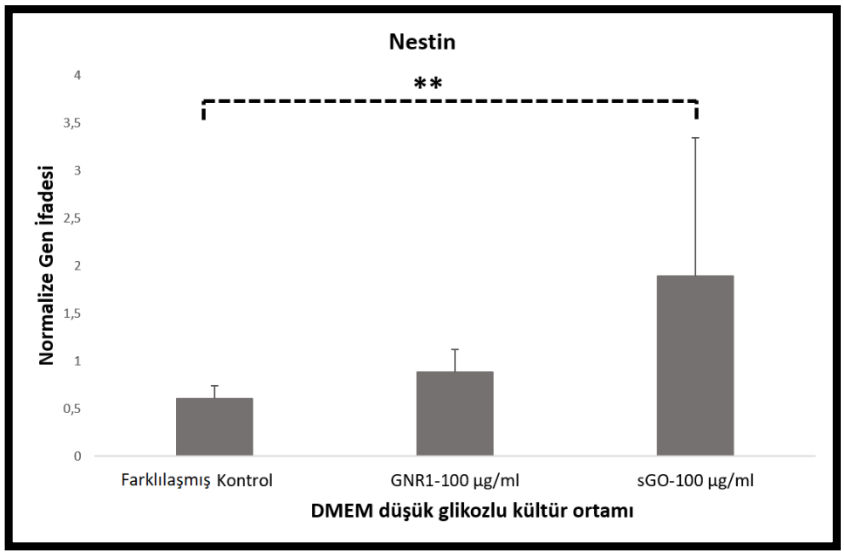
7 gün boyunca DMEM/F-12 kültür ortamında AF ile kaplı plakalarda kültüre edilen hASC'nin eş zamanlı PCR analizinde β-III-Tubulin geni sonuçları (Şekil 5.13): Bu kültür ortamında da 3 grupta β-III-Tubulin geni seviyesi düşüktür. Yapılan analizler istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır.



Şekil 5.13. 7 gün boyunca AF ile kaplı DMEM/F-12 kültür ortamında sGO ve GNR-PEO muamelesinden sonra alınan örneklerin β-III-Tubulin geni için eş zamanlı PCR analizi. 100 µg/ml derişimdeki sGO ve GNR-PEO ile muamele edilen hASC'ye eş zamanlı PCR analizi yapılmıştır. Gen ifade analizi hASC'nin mezenkimal besiyerinde yetiştirildiği farklılaşmamış kontrol grubuna göre normalize edilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlılık derecesine göre p değerleri; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

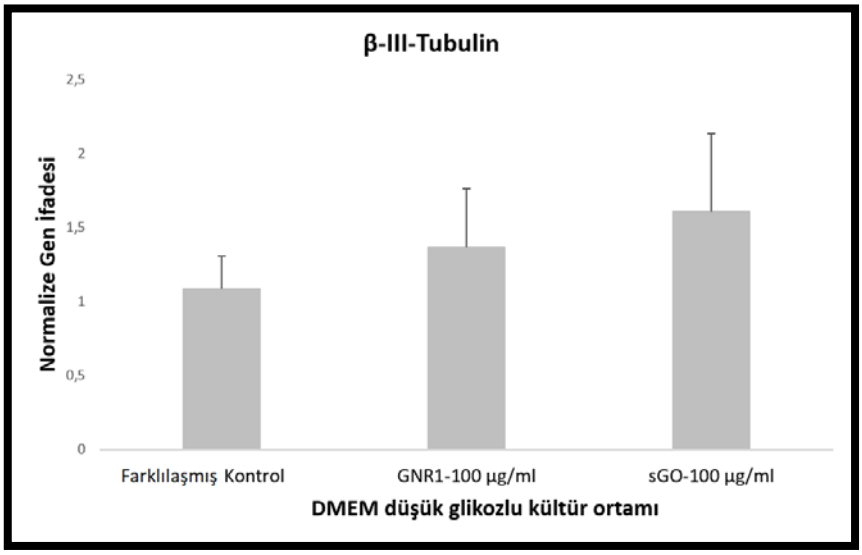
Plakaların AF ile kaplanmasından sonra alınan sonuçlar doğrultusunda 14 gün boyunca AF ile kaplı plakalarda DMEM düşük glikozlu kültür ortamında da hASC yetiştirilmiştir. Bu kültür ortamı içinde 100µg/ml derişimdeki GNR-PEO #1 ve sGO grupları seçilmiştir. Örneklere RNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapılmıştır. Nöral hücrelerde ifade olan Nestin ve β-III-Tubulin genlerine bakmak için eş zamanlı PCR analizi yapılmıştır. Sadece mezenkimal besiyerinde kültüre edilmiş olan hASC farklılaşmamış kontrol grubu olarak seçilmiştir. Gen ifadeleri analiz edilirken bu kontrol grubuna göre normalizasyon yapılmıştır.

14 gün boyunca DMEM düşük glikozlu kültür ortamında AF ile kaplı plakalarda kültüre edilen hASC'nin eş zamanlı PCR analizinde Nestin geni sonuçları (Şekil 5.14): Kontrol ve GNR1-100µg/ml gruplarında artış gözlenmezken sGO-100µg/ml örneğinde yüksek düzeyde anlamlı bir artış gözlenmiştir.



Şekil 5.14. 14 gün boyunca AF ile kaplı DMEM düşük glikozlu kültür ortamında sGO ve GNR-PEO muamelesinden sonra alınan örneklerin Nestin geni için eş zamanlı PCR analizi. 100 µg/ml derişimdeki sGO ve GNR-PEO ile muamele edilen hASC'ye eş zamanlı PCR analizi yapılmıştır. Gen ifade analizi hASC'nin mezenkimal besiyerinde yetiştirildiği farklılaşmamış kontrol grubuna göre normalize edilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlılık derecesine göre p değerleri; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

14 gün boyunca DMEM düşük glikozlu kültür ortamında AF ile kaplı plakalarda kültüre edilen hASC'nin eş zamanlı PCR analizinde β-III-Tubulin geni sonuçları (Şekil 5.15): Bu kültür ortamında seçilen 3 grupta β-III-Tubulin geni seviyesi düşüktür. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak da anlamlı bulunmamıştır.



Şekil 5.15. 14 gün boyunca AF ile kaplı DMEM düşük glikozlu kültür ortamında sGO ve GNR-PEO muamelesinden sonra alınan örneklerin β-III-Tubulin geni için eş zamanlı PCR analizi. 100 µg/ml derişimdeki sGO ve GNR-PEO ile muamele edilen hASC'ye eş zamanlı PCR analizi yapılmıştır. Gen ifade analizi hASC'nin mezenkimal besiyerinde yetiştirildiği farklılaşmamış kontrol grubuna göre normalize edilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlılık derecesine göre p değerleri; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

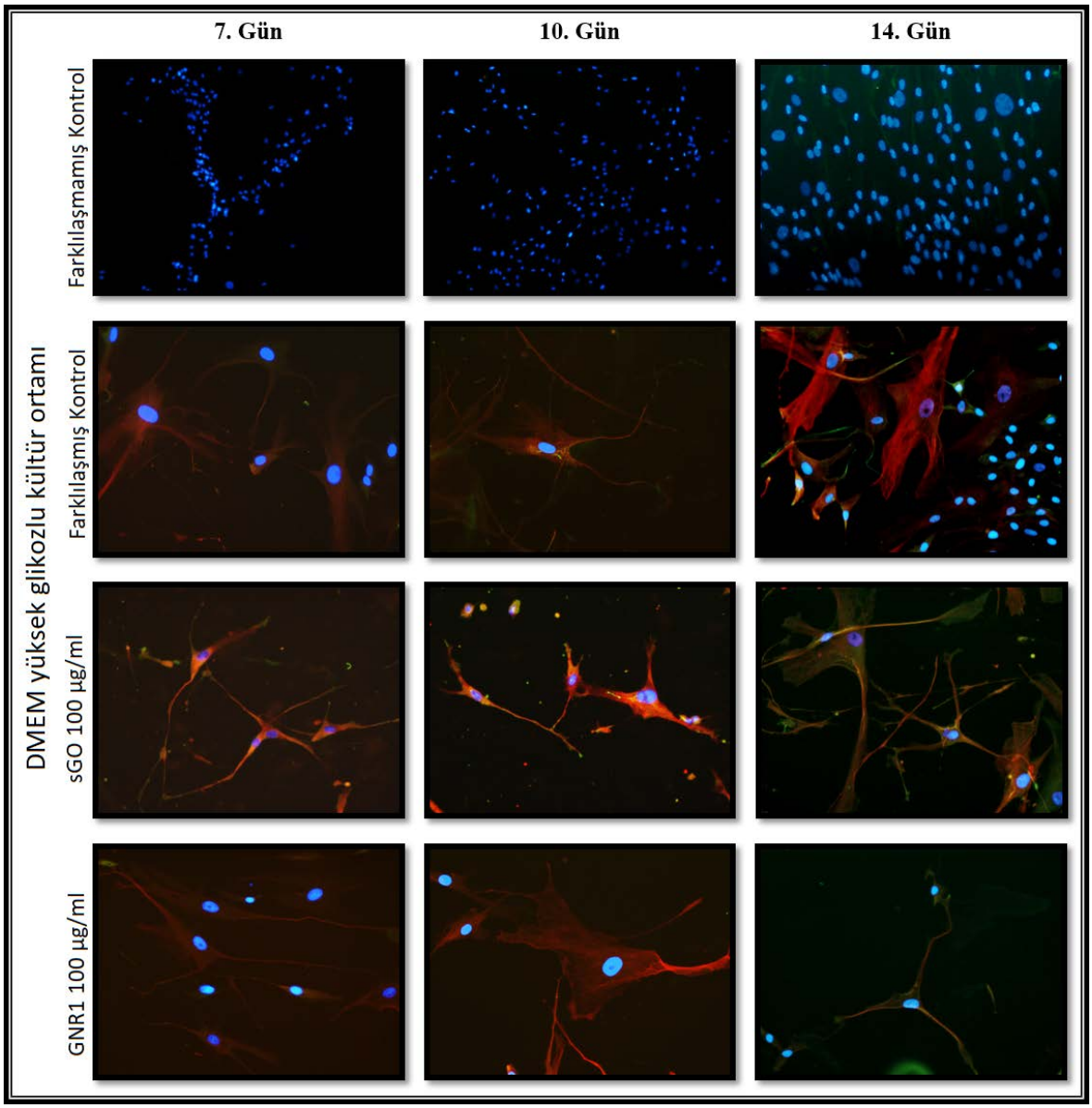
5.3. FARKLILAŞAN İNSAN ADİPOZ KÖKENLİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNDE NÖRAL PROTEİN İFADELERİNİN İMMÜNOFLORESAN BOYAMA TEKNİKLERİ İLE BELİRLENMESİ

Gen ifade analizinden sonra elde edilen sonuçları desteklemek amacıyla nöral belirteç olan Nestin ve β-III-Tubulin antikorları ile immünofloresan boyama yapılmıştır. GNR-PEO çeşitleri ve sGO için gen ifadesi sonuçlarına göre 10 µg/ml derişim elenerek 100 µg/ml derişim seçilmiştir. GNR-PEO çeşitleri arasından da GNR-PEO #1 grubunun daha etkili sonuçlar verdiği düşünülerek 3 grup arasından bu seçilmiştir. Malzeme içermeyen sadece büyüme faktörlerinin eklendiği grup farklılaşmış kontrol, hASC'nin mezenkimal besiyerinde büyütüldüğü grup ise farklılaşmamış kontrol olarak adlandırılmıştır.

24 kuyucuklu plakalara ekilmiş olan hücreler 7,10 ve 14. günlerin sonunda metanol ile sabitlenmiştir. Anti-Nestin ve anti-β-III-Tubulin antikorları ile birincil boyamalar, FITC ve AF594 etiketli antikorlar kullanılarak ikincil boyamalar yapılmıştır. Hücre çekirdeklerini boyamak için ise DAPI kullanılmıştır. Anti-Nestin için uygun sekonder antikor FITC, anti-β-III-Tubulin için ise AF594 kullanılmıştır. İmmünofloresan boyamada Anti-Nestin yeşil, anti-β-III-Tubulin kırmızı ve DAPI mavi renge boyanmıştır. Hücre içinde β-III-Tubulin sitoplazma ve hücre iskeletine, Nestin belirteci ise ara filamentlere ve sitoplazmaya yerleşmektedir.

DMEM yüksek glikozlu besiyerinde kültüre edilen hücrelerin immünofloresan boyama sonuçları (Şekil 5.16):

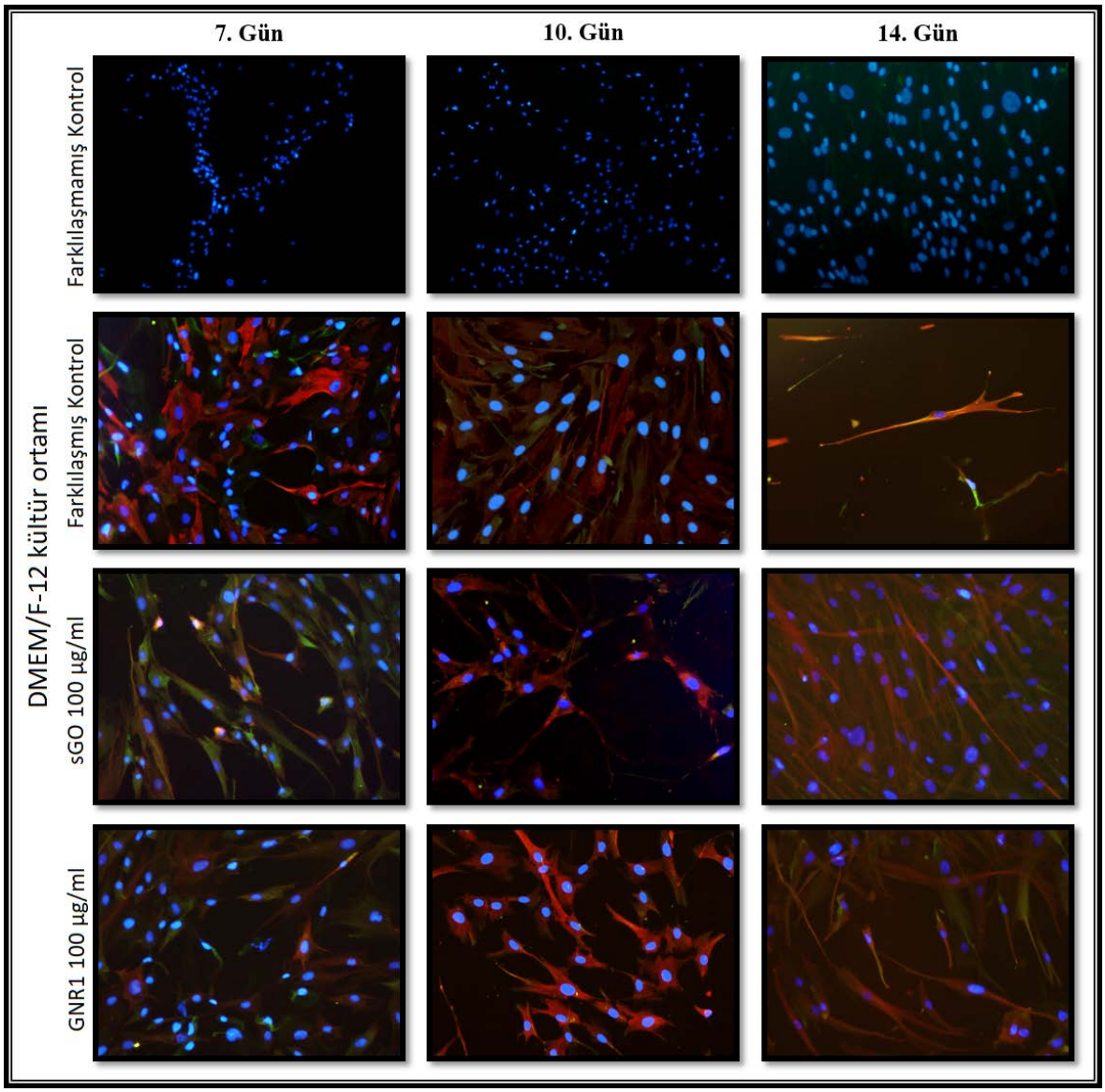
- Malzeme olmaksızın sadece büyüme faktörlerinin eklendiği farklılaşmış kontrol grubunda hücre somasında küçülmez gözlenmezken, 14 gün boyunca iki antikorun birlikte ifade olduğu gözlenmemiştir.
- 100 µg/ml sGO, boyamada en iyi sonucu veren grup olmuştur. 7. ve 10. günlerde ince uzantılar ve β-III-Tubulin antikoru ile boyandığı görülmektedir. 14. günde ise hücrelerin somasında küçülme ve dallanmalar mevcuttur. Ayrıca hem Nestin (yeşil) hem de β-III-Tubulin (kırmızı) birlikte belirgin bir şekilde ifade olup turuncu renk ortaya çıkarak boyanmıştır.
- 100 µg/ml GNR1, 10. günde hücrelerin gövdesinde küçülme görülmemiştir ve sadece β-III-Tubulin ifade olmuştur. 14. günde ise Nestin ve β-III-Tubulin birlikte ifade olmuştur; ancak boyama çok belirgin değildir.



Şekil 5.16. DMEM yüksek glikozlu kültür ortamında 100 µg/ml derişime sahip GNR-PEO #1 ve sGO muamelesindeki hücrelerin immünofloresan görüntüsü

DMEM/F-12 besiyerinde kültüre edilen hücrelerin immünofloresan boyama sonuçları (Şekil 5.17):

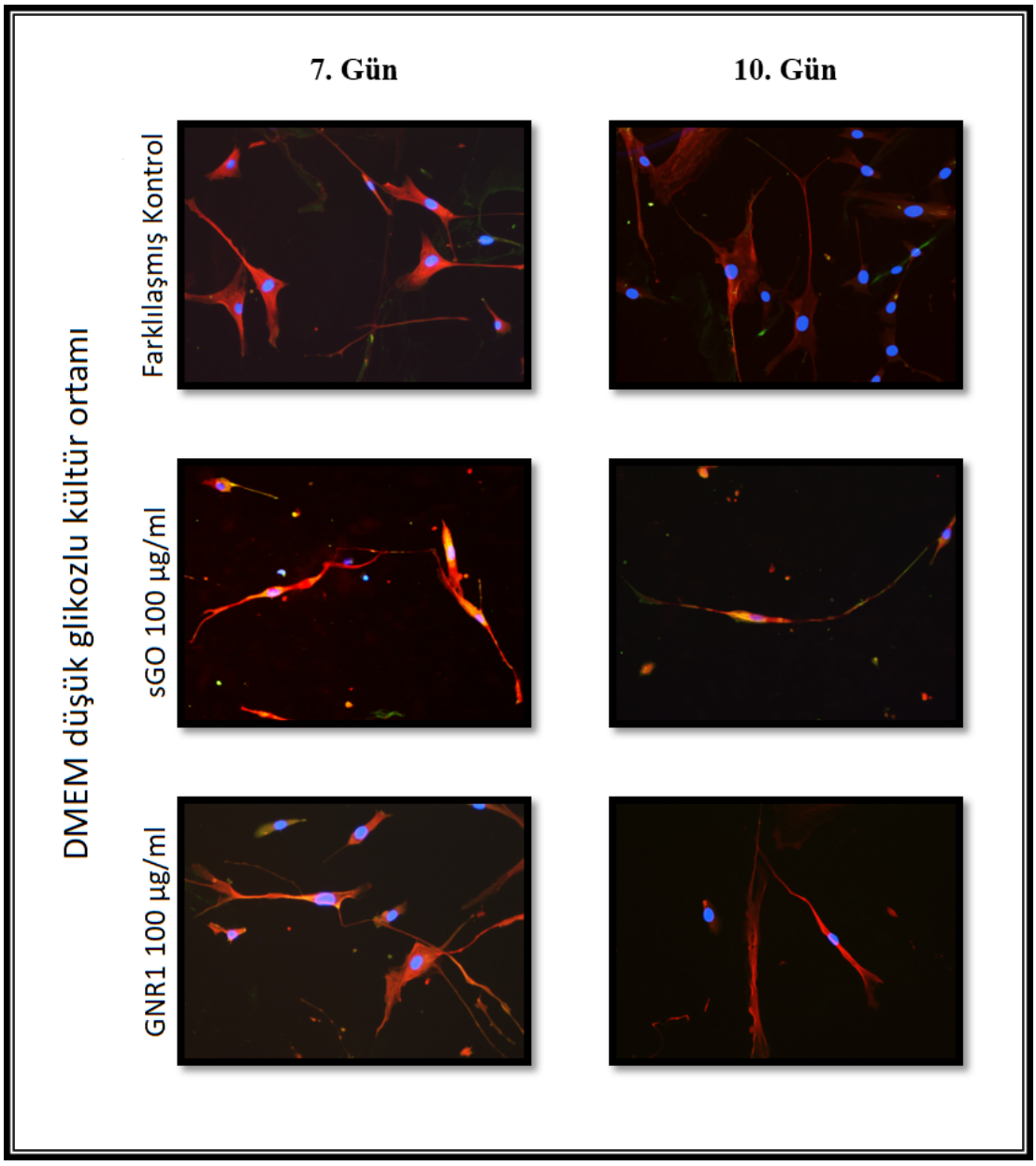
- Malzeme olmaksızın sadece büyüme faktörlerinin eklendiği farklılaşmış kontrol grubunda 14. günde hücrelerde dallanma gözlenmiştir. Hem Nestin hem de β-III-Tubulin ifadesi bulunmaktadır.
- 100 µg/ml sGO ve GNR1 gruplarında, 7. günde Nestin (yeşil) antikorunun ifadesi yüksekken, 10. gün β-III-Tubulin ifadesi artmıştır.
- 100 µg/ml derişimdeki sGO ve GNR1 muamele edilen hücrelerin 14. günde gövdelerinde küçülüp incelmeler görülmüştür.



Şekil 5.17. DMEM/F-12 kültür ortamında 100 µg/ml derişime sahip GNR-PEO #1 ve sGO muamelesindeki hücrelerin immünofloresan görüntüsü

AF ile kaplı DMEM düşük glikozlu besiyerinde kültüre edilen hücrelerin immünofloresan boyama sonuçları (Şekil 5.18):

- Malzeme olmaksızın sadece büyüme faktörlerinin eklendiği farklılaşmış kontrol grubunda hücre somasında küçülme olmazken, 100 µg/ml derişime sahip sGO ve GNR1 gruplarındaki hücrelerin somasında küçülme ve hücre uzantılarında incelmeler gözlenmiştir.
- 100 µg/ml sGO, hücrelerde Nestin ve β-III-Tubulin boyamalarının gözlendiği grup olmuştur.



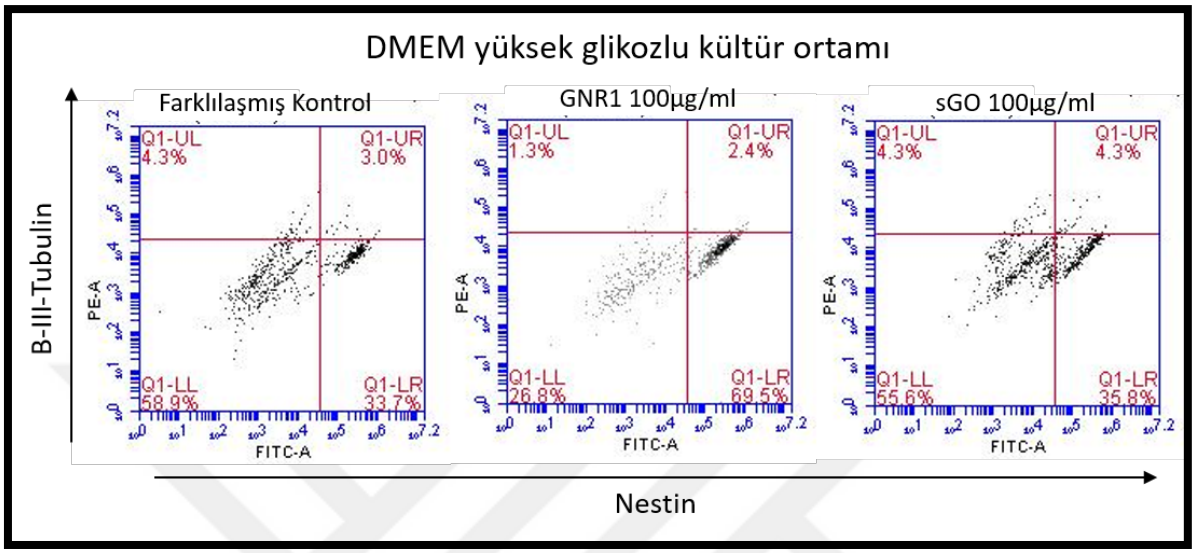
Şekil 5.18. DMEM düşük glikozlu 100 µg/ml derişime sahip GNR-PEO #1 ve sGO muamelesindeki hücrelerin immünofloresan görüntüsü

5.4. PROTEİN İFADE ANALİZİ İÇİN ÇOK RENKLİ AKIM SİTOMETRİSİ

Nöron hücrelerinin farklı evrelerinde ifade edildiği bilinen Nestin ve β-III-Tubulin belirteçlerine bir de akım sitometrisinde bakılmıştır. Bu analiz ile immünofloresan boyama tekniği kalitatif ve kantitatif olarak desteklenmiştir.

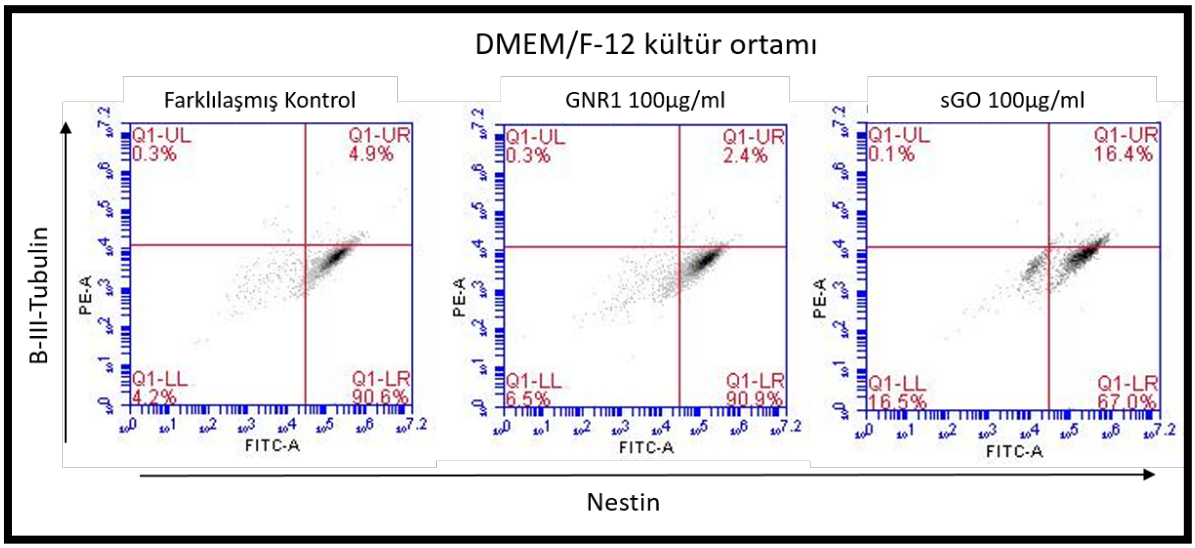
14 gün boyunca 6 kuyucuklu plakalardaki DMEM yüksek glikozlu kültür ortamında β-III-Tubulin pozitif/Nestin negatif için: kontrol grubunda %4,3 oranında bulunan hücre populasyonu, GNR1-100µg/ml grubunda %1,3 oranına düşerken, sGO grubunda %4,3 çıkmıştır. Nestin pozitif/β-III-Tubulin negatif'de ise kontrol grubunda %33,7 iken GNR1-

100µg/ml grubunda hücre populasyonu %69,5 oranına yükselmiştir. sGO-100µg/ml grubunda ise %35,8 olmuştur. İki belirtecinde ifade olduğu β-III-Tubulin pozitif/Nestin pozitif hücre populasyonu ise kontrolde %3,0'den GNR1-100µg/ml grubunda %2,4'e düşmüş, sGO'da %4,3 oranına kadar yükselmiştir (Şekil 5.19).



Şekil 5.19. Nöral belirteçlerin DMEM yüksek glikozlu kültür ortamındaki hücreler için akım sitometrisinde ifadeleri. Kontrol, GNR1-100µg/ml ve sGO-100µg/ml grupları için β-III-Tubulin ve Nestin belirteçlerinin ortak ifadeleri akım sitometrisinde analiz edilmiştir.

14 gün boyunca 6 kuyucuklu plakalardaki DMEM/F-12 kültür ortamında β-III-Tubulin pozitif/Nestin negatif için: farklılaşmış kontrol grubu ve GNR1-100µg/ml grubu için %0,3 çıkarken sGO-100µg/ml grubunda %0,1'e düşmüştür. Nestin pozitif/β-III-Tubulin negatif hücre populasyonu ise oranları birbirine yine yakın olan farklılaşmış kontrolde %90,6 ve GNR1-100µg/ml grubunda %90,9'dur. sGO grubunda ise %67,0 oranına gerilemiştir. İki belirtecinde ifade olduğunu gösteren β-III-Tubulin pozitif/Nestin pozitif hücre populasyonunda kontrol grubunda %4,9, GNR1-100µg/ml grubunda %2,4 ve sGO-100µg/ml grubunda artış göstererek 16,4'e çıkmıştır (Şekil 5.20).



Şekil 5.20. Nöral belirteçlerin DMEM/F-12 kültür ortamındaki hücreler için akım sitometrisinde ifadeleri. Kontrol, GNR1-100µg/ml ve sGO-100µg/ml grupları için β-III-Tubulin ve Nestin belirteçlerinin ortak ifadeleri akım sitometrisinde analiz edilmiştir.

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

6.1. TARTIŞMA

Grafenin ve türevlerinin sitotoksisitesini ve biyouyumluluğunu detaylandıran az sayıda araştırma olduğundan, bu malzemelerin doku rejenerasyonu ve ilişkili hücre yanıtları için destekleyici substratlar olarak kullanımını değerlendirmek için sıkı araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır (103).

İnsan adipoz kökenli mezenkimal kök hücreler 4 saat grafen tabanlı malzemeler ile muamele edildikten sonra 14 gün boyunca 3 farklı kültür ortamında yetiştirilmiştir.

GO'nun nanopartikül süspansiyonu şeklinde, kök hücre farklılaşmasını desteklemek için bir ilaç taşıyıcı ve uyarıcı olarak kullanılabildiği bilinmektedir. GO'yu nanopartiküller süspansiyonun formunu etkileyen en önemli parametre hücre içi yerleşimidir. Nanopartiküllerin hücre zarını kolayca geçerek sitoplazma veya çekirdeğe yerleşmesi ile hücresel sinyal yollarını değiştirebildiğini gösteren birkaç makale bildirilmiştir. Bununla birlikte, nanopartiküllerin hücre içi yerleşimi, partikül boyutundan kuvvetli bir şekilde etkilenir. Örneğin, mikro ölçekli boyuttaki GO, hücre zarını geçemez ve sadece hücre zarına yapışmaktadır (104). Bu bilgiden yola çıkarak tez çalışması için kullanılacak süspansiyon şeklinde kullanılacak GNR-PEO için 3 farklı boyuttaki hali seçilmiştir. 20,70 ve 105 nm boyutlarında bulunan GNR-PEO türevlerinin nöral farklılaştırma üzerinde etkisi olduğu düşünülmektedir. Ayrıca süspansiyon şeklinde bulunan sGO'nun da kök hücreleri nöral soylara farklılaştırması üzerindeki etkisine bakılmıştır.

Nöronlara spesifik olduğu bilinen belirteçler bulunmaktadır. Bunlar arasından çalışma için β-III-Tubulin yada diğer adıyla TuJ1 (78,82) ve Nestin (105) seçilmiştir. Tüm nöronların üretiminden sorumlu öncül hücreler olan radyal glia hücrelerinin belirteci olan Nestindir. Nestin'den (nöral öncül belirteci) daha sonra ifade olan henüz olgunlaşmamış nöronların bulunduğu evredeki belirteçlerden biri ise β-III-Tubulin'dir (erken evre nöral belirteci) (Şekil 2.2). Bu iki belirtecin hücre içinde yerleşimi Nestin ara filamentlere ve sitoplazmaya, β-III-Tubulin ise sitoplazma ve hücre iskeletine olacak şekildedir. Nöral soylara farklılaşmada kullanılan belirteçlerin ifade olma sıralamasını kanıtlar nitelikte 14 günlük süreç boyunca yapılan gen ifadesi analizinde 7. günde Nestin seviyesinin yüksek olduğu (Şekil 5.10, Şekil 5.12), β-III-Tubulin seviyesinin düşük olduğu (Şekil 5.11, Şekil 5.13); 14. güne gelindiğinde ise β-III-Tubulin seviyesinin arttığı (Şekil 5.7, Şekil 5.9) ve

Nestin seviyesinin düştüğü gözlenmiştir (Şekil 5.6, Şekil 5.8). Eş zamanlı PCR sonuçlarını ise immünofloresan boyamalar desteklemiştir (Şekil 5.17).

DMEM yüksek glikozlu besiyerine ait kültür ortamında yetişen hücreler sGO 100 µg/ml derişimine maruz kaldığında hücre gövdesinde küçülme ve dallamalar artmıştır. Ayrıca immünofloresan boyamalarda nörona spesifik olan belirteçlerin ifadesi de bu hücre grubunda artmıştır (Şekil 5.16). Gen ifadesi analizinde 7 günlük kültürdeki Nestin ve 14 günlük kültürdeki β-III-Tubulin seviyesindeki artışlar çok yüksek düzeyde anlamlı bulunmuştur (Şekil 5.7, Şekil 5.10). GNR-PEO türevlerinin bulunduğu gruplar incelendiğinde yapılan analizler sonucunda GNR-PEO #1 grubunun #2 ve #3'e göre en iyi sonuçları verdiği gözlenmiştir (Şekil 5.7). GNR-PEO #1 grubundaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Derişimin azalması ile adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin nörona farklılaşma üzerindeki etkisinin geride kaldığı belirlenmiştir. Gen ifadesi analizinde sGO'nun derişimi 10 µg/ml iken bile GNR-PEO 100 µg/ml gruplarına yakın sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 5.6). Ancak, 10 µg/ml sGO'nun gen ifadesindeki artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Akım sitometrisinde seçilen GNR1 grubu Nestin pozitif/β-III-Tubulin negatif hücre populasyonunda farklılaşma %69,5 artış göstermiştir. Ancak sGO grubuna baktığımızda %35,8 hücre populasyonuna düştüğü gözlenmiştir. Bu sonuç gen ifade analizlerini ve immünofloresan görüntülerini destekler nitelikte değildir. Sebebinin ise malzeme kaynaklı sinyaller olabileceği düşünülmektedir (Şekil 5.19). Bu yüzden grafen tabanlı malzemelerin akım sitometrisi için iyi optimize edilmesi gerekmektedir. DMEM yüksek glikozlu kültür ortamı için yapılan analizler doğrultusunda sGO malzemesinin GNR-PEO'ya göre hücreleri nörona farklılaştırmada daha başarılı olduğu düşünülmektedir.

DMEM/F-12 kültür ortamında yetişen hASC'nin proliferasyonu çok hızlı gerçekleşmiştir bu yüzden pasajlanma ihtiyacı duyulmuştur. Ancak 14 gün içerisinde arada böyle pasajlanma yapılmasının hücre gelişimi üzerindeki etkisi düşündürücü olmuştur. Daha az hücre ekimi yoluna da gidilmiştir fakat bu da sonucu çok etkilememiş ve kısa sürede 6 ve 24 kuyucuklu plakalarda yine hücre proliferasyonu hızlı olmuştur. Hücrelerin çok yoğun olduğu günlerde ters ışık mikroskobunda hücreler net gözlenememiştir. Malzemeli olan gruplarda da hücrelerin yoğunluğundan kaynaklı her geçen gün malzemelerin görülmesi azalmıştır. Ters ışık mikroskobu sGO-100 µg/ml grubunun hücrelerde incelme ve gövdede küçülmeye başlama ve dallanmalar gözlenmiştir (Şekil 5.4). DMEM/F-12 kültür ortamı

için gen ifade analizi, immünofloresan boyama sonuçları birbirini destekler niteliktedir. Sonuç olarak, DMEM yüksek glikozlu kültür ortamı ile benzerlik taşımaktadır. Derişimin düşük olması bu kültür ortamında da nörona farklılaştırma potansiyelini azaltmıştır (Şekil 5.9). Derişimin 100 µg/ml seçildiği sGO grubunun yapılan gen ifade analizleri boyunca en etkili grup olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.8, Şekil 5.9, Şekil 5.12). İstatistiksel analizlerde de çok yüksek düzeyde anlamlı bulunmuştur. GNR-PEO grupları arasında ise en fazla artışı GNR-PEO #1 göstermiştir ve çok yüksek düzeyde anlamlı bulunmuştur (Şekil 5.8). İmmünofloresan boyama sonuçlarına baktığımızda DMEM/F-12 kültür ortamında heterojen bir yapı görülmektedir. 7. ve 10. günlerde kimi hücreler yeşile boyanırken kimilerinin kırmızıya boyandığı gözlenmiştir. Bu sonuçta immünofloresan boyamanın eş zamanlı PCR'a göre daha doğru bir sonuç verdiğini düşündürmektedir (Şekil 5.17). Akım sitometrisinde GNR1-100 µg/ml grubunda Nestin pozitif/β-III-Tubulin negatif için %90,9 oranında hücrelerde farklılaşma gözlenmiştir. Ancak bu değere çok yakın bir oranda kontrol grubunda da farklılaşma olmuştur. Burada GNR-PEO malzemesinin etkisi düşündürücü olurken, sGO-100 µg/ml grubunda ise hücre populasyonu %67'ye düşmüştür (Şekil 5.20). İki belirtecin birlikte en fazla ifade olduğu grup ise 100 µg/ml derişime sahip sGO grubunda %16,4 olmuştur. Akım sitometrisinde çıkan sonuçlar DMEM yüksek glikozlu kültür ortamındaki gibi gen ifade analizi ve immünofloresan boyamaları desteklememiştir.

DMEM düşük glikozlu kültür ortamında hücreler AF ile kaplı plakalarda yetiştirilmiştir. Diğer kültür ortamlarında çıkan sonuçlara göre bu besiyerinde sadece kontrol, 100 µg/ml derişime sahip sGO ve GNR-PEO #1 grupları seçilmiştir. Ters ışık mikroskobunda gözlem yapılırken hücre proliferasyonu diğer kültür ortamlarına göre daha geri kaldığı için hücre morfolojisi daha iyi incelenebilmiştir. Mikroskopta 14 gün boyunca gözlemlenen hücrelerde gövdede küçülme, incelmeler ve dallanmalar net gözlenmiştir. Ancak, hücre sayısı gittikçe azalmış ve 14. günün sonunda çok az hücre kalmıştır (Şekil 5.5). Hücre proliferasyonunun bu kadar geri kalması besiyerinin içeriğindeki glikozun düşük olmasına bağlanmıştır. Hücre sayısının az olması yapılan analizleri de etkilediği düşünülmektedir. Gen ifade analizlerine bakıldığında sadece 100 µg/ml sGO grubunda Nestin'de az bir artış olduğu söylenebilir (Şekil 5.14); β-III-Tubulin ifadesi düşüktür (Şekil 5.15). İmmünofloresan boyamalarda da sGO grubunun hücre gövdesinde küçülme ve incelmeler gözlenmiştir (Şekil 5.18). GNR1-100µg/ml'de ise Nestin ve β-III-Tubulin genlerinin ifadesi yoktur (Şekil 5.14, Şekil 5.15). GNR-PEO #1 için gen ifadesi analizinde istatistiksel

olarak hiçbir sonuç anlamlı bulunmamıştır. 14 gün boyunca bu kültür ortamında yetiştirilen hücrelerin nörona farkılaşma potansiyeli en geride kalan kültür ortamı olduğu düşünülmektedir.

Tez çalışmasında son olarak hücrelerin kültür kabında yüzeye tutunmasını kolaylaştıracak ve farklılaşmayı destekleyebileceği düşünülen AF eklenmiştir. Plakaların AF ile kaplandığı DMEM yüksek glikozlu ve DMEM/F-12 kültür ortamlarının 7 günlük gen ifadesi analizlerine bakıldığında özellikle Nestin geninin ifadesinin yüksek olduğu gözlenmiştir (Şekil 5.10, Şekil 5.12).

Literatürde mezenkimal kök hücreleri nöral hücreye farklılaştırma potansiyeli için grafen tabanlı malzemelerden GNR-PEO ve sGO'nun karşılaştırılması bulunmamaktadır. Yapılan tüm analizler sonucunda ise sGO'nun GNR-PEO'ya göre nörona farklılaştırma potansiyeli çok daha yüksek çıkmıştır. GNR-PEO'nun boyut olarak sGO'dan çok daha küçük olması; süspansiyon halinde GNR'nin kenar özellikleri sayesinde hücre zarı ve çekirdeği ile doğrudan temas halinde bulunmasının (106) nöral farklılaştırmada sGO'dan daha verimli olmasını sağlayamadığı düşünülmektedir.

6.2. SONUÇ

İnsan adipoz kökenli mezenkimal kök hücreleri, farklı derişimlerde grafen tabanlı malzemeler (GNR-PEO ve sGO) ile muamele edildikten sonra 3 farklı besiyerinde 14 gün boyunca kültüre edilerek nörona farklılaşma potansiyeli araştırılmıştır.

Bu tez çalışmasında grafen tabanlı malzemelerin süspansiyon şeklinde bulunduğu 3 farklı kültür ortamı bulunmaktadır. Yapılan analizlere bakıldığında DMEM yüksek glikozlu kültür ortamında yetişen hASC'nin nörona farklılaşma potansiyelinin daha yüksek olduğu görülmüştür. DMEM düşük glikozlu kültür ortamında yetiştirilen hücrelerin ise nörona farklılaşmadığı düşünülmektedir. DMEM/F-12 ortamı ise DMEM yüksek glikozlu ortama göre geride kalmıştır. Ancak bu kültür ortamında da hASC'nin nörona farklılaşma potansiyeli bulunmaktadır.

Grafen tabanlı malzemelerin iki türevi olan sGO ve GNR-PEO iki farklı derişimde (10µg/ml ve 100 µg/ml) incelenmiştir. Gen ifadesi analizi ve immünofloresan boyama sonuçlarına bakıldığında 100 µg/ml derişimin hücreleri nörona farklılaştırmada daha başarılı olduğu belirlenmiştir. Derişimi 10µg/ml olan sGO grubu, 100 µg/ml derişimdeki

GNR-PEO gruplarına benzerlik göstermektedir. 10µg/ml derişimdeki GNR-PEO gruplarının hücreleri farklılaştırmada bir etkisi olduğu düşünülmemektedir. Yani grafen tabanlı malzemelerde derişimin artması farklılaşma sonuçlarını etkilemektedir.

Tez çalışması için GNR-PEO malzemesinin 3 farklı boyutu kullanılmıştır. 20 nm boyutu #1, 70 nm boyutu #2 ve 105 nm boyutu #3 olarak numaralandırılmıştır. Yapılan analizler doğrultusunda GNR-PEO malzemesinin en küçük boyutu olan 20 nm'nin hücreler üzerinde daha etkili olduğu görülmüştür. Bu yüzden çalışmanın ilerleyen bölümlerinde sadece GNR-PEO #1 ile devam edilmiştir. Seçilen diğer bir grafen tabanlı malzeme olan sGO'nun ise çalışmadaki bütün analizler boyunca nörona farklılaştırma potansiyeli açısından GNR-PEO türevlerine göre büyük bir farkla daha başarılı olmuştur.

Hücrelerin kültüre edildiği plakaların AF ile kaplanmasının analiz sonuçlarını etkilediği düşünülmektedir. 7 gün boyunca AF ile kaplanmış plakadaki DMEM/F-12 ve özellikle DMEM yüksek glikozlu kültür ortamındaki sGO-100µg/ml grubunda gen ifadesi analizinde Nestin seviyesi oldukça yüksek çıkmıştır. Bu sonuçların istatistiksel analizinde sGO'da artış çok yüksek düzeyde anlamlı bulunmuştur.

Gen ifade analizleri ve immünofloresan sonuçları ile 7. günde Nestin seviyesinin yüksek olduğu β-III-Tubulin seviyesinin düşük olduğu, 14. günde ise 7. güne göre β-III-Tubulin seviyesinin arttığı ve Nestin seviyesinin azaldığı gösterilmiştir.

Çok renkli akım sitometrisi analizinde 14 gün boyunca DMEM/F-12 ve DMEM yüksek glikozlu kültür ortamlarında yetiştirilen hücreler için kullanılan nöral belirteçlerin sonuçları gen ifade analizi ve immünofloresan boyamaları destekler nitelikte olmamıştır. GNR-100 µg/ml grubunda Nestin için artışlar gözlenmiştir. sGO-100 µg/ml grubunda ise gen ifade analizi ve immünofloresan boyamaların aksine bir azalış mevcuttur. Bunun sebebinin ise malzeme kaynaklı sinyaller olabileceği düşünülmüştür. Bu sebeple, grafen tabanlı malzemeleri akım sitometrisinde kullanmak için iyi bir optimizasyon gerekmektedir.

Sonuç olarak, malzeme çeşidinin, derişim miktarının ve farklı kültür ortamlarının zamana bağlı değerlendirildiği bu tez çalışması nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde yeni yaklaşımlar geliştirebilmek açısından önem taşımaktadır. Grafenin ve kök hücrelerin eşsiz özelliklerinden faydalanıldığı bu çalışmada ilerideki *in vivo* çalışmalar için de yol gösterici nitelikte olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Kim J, Park S, Kim YJ, Jeon CS, Lim KT, Seonwoo H, et al. Monolayer graphene-directed growth and neuronal differentiation of mesenchymal stem cells. Journal of biomedical nanotechnology. 2015;11(11):2024-33.

2. Baldrighi M, Trusel M, Tonini R, Giordani S. Carbon nanomaterials interfacing with neurons: an in vivo perspective. Frontiers in neuroscience. 2016;10:250.

3. Delcroix GJ-R, Schiller PC, Benoit J-P, Montero-Menei CN. Adult cell therapy for brain neuronal damages and the role of tissue engineering. Biomaterials. 2010;31(8):2105-20.

4. Rodriguez-Losada N, Aguirre JA. The impact of graphene on neural regenerative medicine. Neural regeneration research. 2017;12(7):1071.

5. Austin TO, Matamoros AJ, Friedman JM, Friedman AJ, Nacharaju P, Yu W, et al. Nanoparticle delivery of fidgetin siRNA as a microtubule-based therapy to augment nerve regeneration. Scientific reports. 2017;7(1):9675.

6. Gardin C, Piattelli A, Zavan B. Graphene in regenerative medicine: focus on stem cells and neuronal differentiation. Trends in biotechnology. 2016;34(6):435-37.

7. Tian L, Prabhakaran MP, Ramakrishna S. Strategies for regeneration of components of nervous system: scaffolds, cells and biomolecules. Regenerative biomaterials. 2015;2(1):31-45.

8. www.pediaa.com Difference Between Central and Peripheral Nervous System (2017) [Internet]. 2019 [cited 2019 Nov 26]. Available from: https://pediaa.com/difference-between-central-and-peripheral-nervous-system/.

9. Shaimardanova AA, Solovyeva VV, Chulpanova DS, James V, Kitaeva KV, Rizvanov AA. Extracellular vesicles in the diagnosis and treatment of central nervous system diseases. Neural regeneration research. 2020;15(4):586.

10. Shah S, Solanki A, Lee K-B. Nanotechnology-based approaches for guiding neural regeneration. Accounts of chemical research. 2015;49(1):17-26.

11. Shin SR, Li Y-C, Jang HL, Khoshakhlagh P, Akbari M, Nasajpour A, et al. Graphene-based materials for tissue engineering. Advanced drug delivery reviews. 2016;105:255-74.

12. Altman J, Das GD. Post-natal origin of microneurones in the rat brain. Nature. 1965;207(5000):953-56.

13. Ming G-l, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. Annu Rev Neurosci. 2005;28:223-50.

14. Alvarez-Buylla A, Lim DA. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. Neuron. 2004;41(5):683-86.

15. Duan X, Kang E, Liu CY, Ming G-l, Song H. Development of neural stem cell in the adult brain. Current opinion in neurobiology. 2008;18(1):108-15.

16. www.abcam.com Neural markers (2016) [Internet]. 2019 [cited 2019 Nov 30]. Available from: https://www.abcam.com/neuroscience/neural-markers-guide.

17. Hertz L, Dringen R, Schousboe A, Robinson SR. Astrocytes: glutamate producers for neurons. Journal of neuroscience research. 1999;57(4):417-28.

18. Gonchar Y, Burkhalter A. Three distinct families of GABAergic neurons in rat visual cortex. Cerebral cortex (New York, NY: 1991). 1997;7(4):347-58.

19. Chinta SJ, Andersen JK. Dopaminergic neurons. The international journal of biochemistry & cell biology. 2005;37(5):942-46.

20. Severson CA, Wang W, Pieribone VA, Dohle CI, Richerson GB. Midbrain serotonergic neurons are central pH chemoreceptors. Nature neuroscience. 2003;6(11):1139.

21. Wessler I, Kirkpatrick C. Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. British journal of pharmacology. 2008;154(8):1558-71.

22. Giordano-Santini R, Linton C, Hilliard MA, editors. Cell-cell fusion in the nervous system: alternative mechanisms of development, injury, and repair. Seminars in cell & developmental biology; 2016: Elsevier.

23. Nedergaard M. Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells. Science. 1994;263(5154):1768-71.

24. Zhou K, Nisbet D, Thouas G, Bernard C, Forsythe J. Bio-nanotechnology approaches to neural tissue engineering. Tissue Engineering. 2010:459-83.

25. von Bernhardi R, Eugenín-von Bernhardi J, Flores B, León JE. Glial cells and integrity of the nervous system. Glial Cells in Health and Disease of the CNS: Springer; 2016. p. 1-24.

26. Liu S, Qu Y, Stewart TJ, Howard MJ, Chakrabortty S, Holekamp TF, et al. Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2000;97(11):6126-31.

27. Akhmetzyanova E, Mukhamedshina YO, Zhuravleva M, Galieva L, Kostennikov A, Garanina E, et al. Transplantation of microglia in the area of spinal cord injury in an acute period increases tissue sparing, but not functional recovery. Frontiers in cellular neuroscience. 2018;12:507.

28. Spassky N, Merkle FT, Flames N, Tramontin AD, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. Journal of Neuroscience. 2005;25(1):10-18.

29. Amoh Y, Li L, Campillo R, Kawahara K, Katsuoka K, Penman S, et al. Implanted hair follicle stem cells form Schwann cells that support repair of severed peripheral nerves. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2005;102(49):17734-38.

30. Frostick SP, Yin Q, Kemp GJ. Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration. Microsurgery: Official Journal of the International Microsurgical Society and the European Federation of Societies for Microsurgery. 1998;18(7):397-405.

31. Sedaghati T, Yang SY, Mosahebi A, Alavijeh MS, Seifalian AM. Nerve regeneration with aid of nanotechnology and cellular engineering. Biotechnology and applied biochemistry. 2011;58(5):288-300.

32. Scholz J, Woolf CJ. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. Nature neuroscience. 2007;10(11):1361.

33. Talukdar Y, Rashkow JT, Lalwani G, Kanakia S, Sitharaman B. The effects of graphene nanostructures on mesenchymal stem cells. Biomaterials. 2014;35(18):4863-77.

34. Geim AK. Graphene: status and prospects. Science. 2009;324(5934):1530-34.

35. Novoselov KS, Geim AK, Morozov SV, Jiang D, Zhang Y, Dubonos SV, et al. Electric field effect in atomically thin carbon films. Science. 2004;306(5696):666-69.

36. Geim AK, Novoselov KS. The rise of graphene. Nat Mater. 2007;6(3):183-91. Epub 2007/03/03. doi: 10.1038/nmat1849. PubMed PMID: 17330084.

37. Bramini M, Alberini G, Colombo E, Chiacchiaretta M, DiFrancesco ML, Maya-Vetencourt JF, et al. Interfacing graphene-based materials with neural cells. Frontiers in systems neuroscience. 2018;12:12.

38. Novoselov KS, Fal'ko VI, Colombo L, Gellert PR, Schwab MG, Kim K. A roadmap for graphene. Nature. 2012;490(7419):192-200. Epub 2012/10/13. doi: 10.1038/nature11458. PubMed PMID: 23060189.

39. Hess LH, Jansen M, Maybeck V, Hauf MV, Seifert M, Stutzmann M, et al. Graphene transistor arrays for recording action potentials from electrogenic cells. Advanced Materials. 2011;23(43):5045-49.

40. Sahoo S, Bhattacharya P, Dhibar S, Hatui G, Das T, Das CK. Graphene/poly (aniline-co-pyrrole) nanocomposite: potential candidate for supercapacitor and microwave absorbing applications. Journal of nanoscience and nanotechnology. 2015;15(9):6931-41.

41. Eda G, Fanchini G, Chhowalla M. Large-area ultrathin films of reduced graphene oxide as a transparent and flexible electronic material. Nature nanotechnology. 2008;3(5):270.

42. Zhu C, Han TY-J, Duoss EB, Golobic AM, Kuntz JD, Spadaccini CM, et al. Highly compressible 3D periodic graphene aerogel microlattices. Nature communications. 2015;6:6962.

43. Bonaccorso F, Bartolotta A, Coleman JN, Backes C. 2D-crystal-based functional inks. Advanced Materials. 2016;28(29):6136-66.

44. Hassoun J, Bonaccorso F, Agostini M, Angelucci M, Betti MG, Cingolani R, et al. An advanced lithium-ion battery based on a graphene anode and a lithium iron phosphate cathode. Nano letters. 2014;14(8):4901-06.

45. Pumera M. Electrochemistry of graphene: new horizons for sensing and energy storage. The Chemical Record. 2009;9(4):211-23.

46. Du D, Zou Z, Shin Y, Wang J, Wu H, Engelhard MH, et al. Sensitive immunosensor for cancer biomarker based on dual signal amplification strategy of graphene sheets and multienzyme functionalized carbon nanospheres. Analytical chemistry. 2010;82(7):2989-95.

47. Kang X, Wang J, Wu H, Liu J, Aksay IA, Lin Y. A graphene-based electrochemical sensor for sensitive detection of paracetamol. Talanta. 2010;81(3):754-59.

48. El-Kady MF, Kaner RB. Scalable fabrication of high-power graphene micro-supercapacitors for flexible and on-chip energy storage. Nature communications. 2013;4:1475.

49. Bonaccorso F, Colombo L, Yu G, Stoller M, Tozzini V, Ferrari AC, et al. Graphene, related two-dimensional crystals, and hybrid systems for energy conversion and storage. Science. 2015;347(6217):1246501.

50. Ambrosi A, Pumera M. Electrochemically exfoliated graphene and graphene oxide for energy storage and electrochemistry applications. Chemistry–A European Journal. 2016;22(1):153-59.

51. Bouzid T, Sinitskii A, Lim JY. Graphene platform for neural regenerative medicine. Neural regeneration research. 2016;11(6):894.

52. Menaa F, Abdelghani A, Menaa B. Graphene nanomaterials as biocompatible and conductive scaffolds for stem cells: impact for tissue engineering and regenerative medicine. Journal of tissue engineering and regenerative medicine. 2015;9(12):1321-38.

53. Kostarelos K, Vincent M, Hebert C, Garrido JA. Graphene in the design and engineering of next-generation neural interfaces. Advanced Materials. 2017;29(42):1700909.

54. Reina G, González-Domínguez JM, Criado A, Vázquez E, Bianco A, Prato M. Promises, facts and challenges for graphene in biomedical applications. Chemical Society Reviews. 2017;46(15):4400-16.

55. Shi S, Chen F, Ehlerding EB, Cai W. Surface engineering of graphene-based nanomaterials for biomedical applications. Bioconjugate chemistry. 2014;25(9):1609-19.

56. Zhang H, Gruener G, Zhao Y. Recent advancements of graphene in biomedicine. Journal of Materials Chemistry B. 2013;1(20):2542-67.

57. Feng L, Wu L, Qu X. New horizons for diagnostics and therapeutic applications of graphene and graphene oxide. Advanced Materials. 2013;25(2):168-86.

58. Shen H, Zhang L, Liu M, Zhang Z. Biomedical applications of graphene. Theranostics. 2012;2(3):283.

59. Perán M, García MA, López-Ruiz E, Bustamante M, Jiménez G, Madeddu R, et al. Functionalized nanostructures with application in regenerative medicine. International journal of molecular sciences. 2012;13(3):3847-86.

60. Lee YJ, Seo TH, Lee S, Jang W, Kim MJ, Sung JS. Neuronal differentiation of human mesenchymal stem cells in response to the domain size of graphene substrates. Journal of Biomedical Materials Research Part A. 2018;106(1):43-51.

61. Lee JS, Lipatov A, Ha L, Shekhirev M, Andalib MN, Sinitskii A, et al. Graphene substrate for inducing neurite outgrowth. Biochemical and biophysical research communications. 2015;460(2):267-73.

62. Cheng C, Li S, Thomas A, Kotov NA, Haag R. Functional graphene nanomaterials based architectures: biointeractions, fabrications, and emerging biological applications. Chemical reviews. 2017;117(3):1826-914.

63. Wick P, Louw-Gaume AE, Kucki M, Krug HF, Kostarelos K, Fadeel B, et al. Classification framework for graphene-based materials. Angewandte Chemie International Edition. 2014;53(30):7714-18.

64. Bianco A. Graphene: safe or toxic? The two faces of the medal. Angewandte Chemie International Edition. 2013;52(19):4986-97.

65. Rizzo DJ, Veber G, Cao T, Bronner C, Chen T, Zhao F, et al. Topological band engineering of graphene nanoribbons. Nature. 2018;560(7717):204.

66. Pei S, Cheng H-M. The reduction of graphene oxide. Carbon. 2012;50(9):3210-28.

67. Dreyer DR, Park S, Bielawski CW, Ruoff RS. The chemistry of graphene oxide. Chemical society reviews. 2010;39(1):228-40.

68. Silva GG, Junior LAR, Junior MLP, de Almeida Fonseca AL, de Sousa Júnior RT, e Silva GM. Bipolaron Dynamics in Graphene Nanoribbons. Scientific reports. 2019;9(1):2909.

69. Martini L, Chen Z, Mishra N, Barin GB, Fantuzzi P, Ruffieux P, et al. Structure-dependent electrical properties of graphene nanoribbon devices with graphene electrodes. Carbon. 2019;146:36-43.

70. Son Y-W, Cohen ML, Louie SG. Half-metallic graphene nanoribbons. Nature. 2006;444(7117):347.

71. Nakada K, Fujita M, Dresselhaus G, Dresselhaus MS. Edge state in graphene ribbons: Nanometer size effect and edge shape dependence. Physical Review B. 1996;54(24):17954.

72. Yazyev OV, Katsnelson M. Magnetic correlations at graphene edges: basis for novel spintronics devices. Physical Review Letters. 2008;100(4):047209.

73. Yang L, Park C-H, Son Y-W, Cohen ML, Louie SG. Quasiparticle energies and band gaps in graphene nanoribbons. Physical Review Letters. 2007;99(18):186801.

74. Barone V, Hod O, Scuseria GE. Electronic structure and stability of semiconducting graphene nanoribbons. Nano letters. 2006;6(12):2748-54.

75. Raza H, Kan EC. Armchair graphene nanoribbons: Electronic structure and electric-field modulation. Physical Review B. 2008;77(24):245434.

76. Nguyen AT, Mattiassi S, Loeblein M, Chin E, Ma D, Coquet P, et al. Human Rett-derived neuronal progenitor cells in 3D graphene scaffold as an in vitro platform to study the effect of electrical stimulation on neuronal differentiation. Biomedical Materials. 2018;13(3):034111.

77. Lee Y-J, Jang W, Im H, Sung J-S. Extremely low frequency electromagnetic fields enhance neuronal differentiation of human mesenchymal stem cells on graphene-based substrates. Current Applied Physics. 2015;15:S95-S102.

78. Solanki A, Shah S, Memoli KA, Park SY, Hong S, Lee KB. Controlling differentiation of neural stem cells using extracellular matrix protein patterns. Small. 2010;6(22):2509-13.

79. Park SY, Park J, Sim SH, Sung MG, Kim KS, Hong BH, et al. Enhanced differentiation of human neural stem cells into neurons on graphene. Advanced materials. 2011;23(36):H263-H67.

80. Rogers SL, Letourneau PC, Palm SL, McCarthy J, Furcht LT. Neurite extension by peripheral and central nervous system neurons in response to substratum-bound fibronectin and laminin. Developmental biology. 1983;98(1):212-20.

81. Manthorpe M, Engvall E, Ruoslahti E, Longo FM, Davis GE, Varon S. Laminin promotes neuritic regeneration from cultured peripheral and central neurons. The Journal of cell biology. 1983;97(6):1882-90.

82. Solanki A, Chueng STD, Yin PT, Kappera R, Chhowalla M, Lee KB. Axonal alignment and enhanced neuronal differentiation of neural stem cells on graphene-nanoparticle hybrid structures. Advanced Materials. 2013;25(38):5477-82.

83. Li N, Zhang Q, Gao S, Song Q, Huang R, Wang L, et al. Three-dimensional graphene foam as a biocompatible and conductive scaffold for neural stem cells. Scientific reports. 2013;3:1604.

84. Akhavan O, Ghaderi E. Flash photo stimulation of human neural stem cells on graphene/TiO 2 heterojunction for differentiation into neurons. Nanoscale. 2013;5(21):10316-26.

85. Song Q, Jiang Z, Li N, Liu P, Liu L, Tang M, et al. Anti-inflammatory effects of three-dimensional graphene foams cultured with microglial cells. Biomaterials. 2014;35(25):6930-40.

86. Shah S, Yin PT, Uehara TM, Chueng STD, Yang L, Lee KB. Guiding stem cell differentiation into oligodendrocytes using graphene-nanofiber hybrid scaffolds. Advanced materials. 2014;26(22):3673-80.

87. Weaver CL, Cui XT. Directed neural stem cell differentiation with a functionalized graphene oxide nanocomposite. Advanced healthcare materials. 2015;4(9):1408-16.

88. Guo W, Qiu J, Liu J, Liu H. Graphene microfiber as a scaffold for regulation of neural stem cells differentiation. Scientific reports. 2017;7(1):5678.

89. Huang C-T, Shrestha LK, Ariga K, Hsu S-h. A graphene–polyurethane composite hydrogel as a potential bioink for 3D bioprinting and differentiation of neural stem cells. Journal of Materials Chemistry B. 2017;5(44):8854-64.

90. Ullah I, Subbarao RB, Rho GJ. Human mesenchymal stem cells-current trends and future prospective. Bioscience reports. 2015;35(2).

91. Kim T-H, Shah S, Yang L, Yin PT, Hossain MK, Conley B, et al. Controlling differentiation of adipose-derived stem cells using combinatorial graphene hybrid-pattern arrays. ACS nano. 2015;9(4):3780-90.

92. Wang Y, Lee WC, Manga KK, Ang PK, Lu J, Liu YP, et al. Fluorinated graphene for promoting neuro-induction of stem cells. Advanced Materials. 2012;24(31):4285-90.

93. Jakus AE, Secor EB, Rutz AL, Jordan SW, Hersam MC, Shah RN. Three-dimensional printing of high-content graphene scaffolds for electronic and biomedical applications. ACS nano. 2015;9(4):4636-48.

94. Guo W, Zhang X, Yu X, Wang S, Qiu J, Tang W, et al. Self-powered electrical stimulation for enhancing neural differentiation of mesenchymal stem cells on graphene–poly (3, 4-ethylenedioxythiophene) hybrid microfibers. Acs Nano. 2016;10(5):5086-95.

95. Guo W, Wang S, Yu X, Qiu J, Li J, Tang W, et al. Construction of a 3D rGO–collagen hybrid scaffold for enhancement of the neural differentiation of mesenchymal stem cells. Nanoscale. 2016;8(4):1897-904.

96. Chin MH, Mason MJ, Xie W, Volinia S, Singer M, Peterson C, et al. Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. Cell stem cell. 2009;5(1):111-23.

97. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell. 2006;126(4):663-76.

98. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science. 1998;282(5391):1145-47.

99. Chen G-Y, Pang D-P, Hwang S-M, Tuan H-Y, Hu Y-C. A graphene-based platform for induced pluripotent stem cells culture and differentiation. Biomaterials. 2012;33(2):418-27.

100. Yang D, Li T, Xu M, Gao F, Yang J, Yang Z, et al. Graphene oxide promotes the differentiation of mouse embryonic stem cells to dopamine neurons. Nanomedicine. 2014;9(16):2445-55.

101. Rodriguez-Losada N, Romero P, Estivill-Torrús G, de Villoria RG, Aguirre JA. Cell survival and differentiation with nanocrystalline glass-like carbon using substantia nigra dopaminergic cells derived from transgenic mouse embryos. PloS one. 2017;12(3):e0173978.

102. Kenry LW, Loh KP, Lim CT. When stem cells meet graphene: opportunities and challenges in regenerative medicine. Biomaterials. 2018;155:236-50.

103. Kumar S, Chatterjee K. Comprehensive review on the use of graphene-based substrates for regenerative medicine and biomedical devices. ACS applied materials & interfaces. 2016;8(40):26431-57.

104. Halim A, Luo Q, Ju Y, Song G. A mini review focused on the recent applications of graphene oxide in stem cell growth and differentiation. Nanomaterials. 2018;8(9):736.

105. Ma W, Tavakoli T, Derby E, Serebryakova Y, Rao MS, Mattson MP. Cell-extracellular matrix interactions regulate neural differentiation of human embryonic stem cells. BMC developmental biology. 2008;8(1):90.

106. Akhavan O, Ghaderi E. Differentiation of human neural stem cells into neural networks on graphene nanogrids. Journal of Materials Chemistry B. 2013;1(45):6291-301.

EKLER

EK-1 EŞ ZAMANLI PCR İÇİN KULLANILAN PRİMER DİZİLERİ

Gen Adı	**Primer Dizisi**
MAPK1-F	5' – TCC CAA ATG CTG ACT CCA AAG – 3' (21mer)
MAPK1-R	5' – CAT GTC GAA CTT GAA TGG TGC – 3' (21 mer)
β-III-Tubulin-139bp-F	5' – GTG AAA ACT GCG ACT GCC TG – 3' (20 mer)
β-III-Tubulin-139bp-R	5' – ACG ACG CTG AAG GTG TTC AT – 3' (20 mer)
Nestin-64bp-F	5' – GGG AAG AGG TGA TGG AAC CA – 3' (20 mer)
Nestin-64bp-R	5' – AAG CCC TGA ACC CTC TTT GC – 3' (20 mer)

ÖZGEÇMİŞ

ADI SOYADI: DÖNDÜ TUĞÇE ŞAHİN

DOĞUM YERİ: ANKARA

DOĞUM TARİHİ: 30.06.1993

MEDENİ HALİ: EVLİ

YABANCI DİL: ALMANCA, İNGİLİZCE

EĞİTİM DURUMU

- Lise: Antalya Lisesi (Anadolu), Antalya (2007-2011)
- Lisans: Hacettepe Üniversitesi, Ankara, Eğitim Fakültesi, Biyoloji Eğitimi (Almanca) (2011-2017)

İŞ TECRÜBESİ

- Kurumu: Başkent Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği Bölümü
  "Omurga Diskektomi Ameliyatları İçin Plazma Tabanlı Cerrahi Alet Tasarımı Ve Gerçeklemesi"
  Görevi: TÜBİTAK 116E144 no'lu 1001 projesi bursiyeri
  Yılları: 09.11.2018-31.12.2018
- Kurumu: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
  "Kanda Dolaşan Tümör Hücrelerinin Kuvars Akord Çatalı Tabanlı İmmünosensörle Tayini"
  Görevi: TÜBİTAK 118S614 no'lu 1001 projesi bursiyeri
  Yılları: 15.01.2019-15.10.2019

TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

Aydin T, Gurcan C, Taheri H, Yilmazer A. Graphene Based Materials in Neural Tissue Regeneration. Cell Biology and Translational Medicine, Volume 3: Springer; 2018. p. 129-42.

MAKALELER

Yilmazer A, Taheri H, Gurcan C, **Aydin T**, Delogu LG, Kostarelos K. Exposing human adipose stem cells to graphene oxide suspension changes the differentiation potential towards neural lineage without long-term toxicity. *BBA-Molecular Cell Research* (gönderildi)

KONGRE-TOPLANTI BİLDİRİLER

Uluslarası Kongrelerde Sunulan Poster Bildirileri

Gurcan C, Taheri H, **Aydin T**, Delogu LG, Kostarelos K, Yilmazer A. Graphene Oxide Treatment Changes the Differentiation Potential of Human Adipose Stem Cells Towards Neural Lineage, 24th International Biomedical Science&Technology Symposium (BIOMED), 17-20 Oct 2019, İzmir,Turkey.

Adv Exp Med Biol – Cell Biology and Translational Medicine
https://doi.org/10.1007/5584_2018_221
© Springer International Publishing AG, part of Springer Nature 2018

Graphene Based Materials in Neural Tissue Regeneration

Tugce Aydin, Cansu Gurcan, Hadiseh Taheri, and Açelya Yilmazer

Abstract

Due to its extraordinary features such as large surface area, high electrical conductivity, chemical stability and mechanical properties, graphene attracts great interest in various fields of biomedical sciences including biosensors, cancer therapy, diagnosis and regenerative medicine. The use of graphene-based materials has been of great interest for the design of scaffolds that can promote neural tissue regeneration. Recent studies published over the last few years clearly show that graphene and graphene based materials promote adhesion, proliferation and differentiation of various cells including embryonic stem cells (ESC), neural stem cells (NSC), mesenchymal stem cells (MSC) and induced pluripotent stem cells (iPSC). Therefore graphene based materials are one of the promising nanoplatforms in regenerative medicine for neural tissue injury. With its unique topographic and chemical properties, graphene is used as a scaffold that could provide a bridge between regenerating nerves. More importantly, as a conductive substrate, graphene allows the continuation of electrical conduction between damaged nerve ends. The integration of supportive cells such as glial, neural precursor or stem cells in such a scaffold shows higher regeneration when compared to currently used neural autografts and nerve conduits. This review discusses the details of such studies involving graphene based materials with a special interest on neural stem cells, mesenchymal stem cells or pluripotent stem cells.

Keywords

Graphene oxide · Mesenchymal stem cells · Neural stem cells · Pluripotent stem cells

T. Aydin and C. Gurcan
Biotechnology Institute, Ankara University, Tandogan/Ankara, Turkey

Engineering Faculty, Biomedical Engineering Department, Ankara University, Tandogan/Ankara, Turkey

H. Taheri
Engineering Faculty, Biomedical Engineering Department, Ankara University, Tandogan/Ankara, Turkey

A. Yilmazer (✉)
Engineering Faculty, Biomedical Engineering Department, Ankara University, Tandogan/Ankara, Turkey

Stem Cell Institute, Ankara University, Balgat/Ankara, Turkey
e-mail: ayilmazer@ankara.edu.tr

Abbreviations

2D	Two dimentional
3D	Three dimentional
1 step-G	One-step growth
2 step-G	Two-step growth
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
b-FGF	Basic fibroblast growth factor
CNS	Central nervous system
Cu	Copper
ECM	Extracellular matrix
EGF	Epidermal growth factor
ELF-EMF	Extremely low frequency electromagnetic fields
ESCs	Embryonic stem cells
FGF-2	Fibroblast growth factor 2
G	Graphene
GO	Graphene oxide
hADMSCs	Human adipose-derived mesenchymal stem cells
hMSCs	Human mesenchymal stem cells
hNPCs	Human neural progenitor cells
hNSCs	Human neural stem cells
IFNγ	Interferon-γ
iPSCs	Induced pluripotent stem cells
LIF	Leukemia inhibitory factor
LPS	Lipopolysaccharide
MSCs	Mesenchymal stem cells
NGLC	Nanocrystalline glass-like carbon film
NGF	Nerve growth factor
NGO	Nanosized graphene oxide
NPCs	Neural progenitor cells
NSCs	Neural stem cells
PADM	Porcine acellular dermal matrix
PCL	Polycaprolactone
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDMS	Polydimethylsiloxane
PEDOT	Poly (3,4-ethylenedioxythiophene)
PEG	Poly (ethylene glycol)
PN	Peripheral nerve
PNI	Peripheral nerve injury
PNS	Peripheral nervous system
PU	Polyurethane
rGO	Reduced graphene oxide
SCI	Spinal cord injury
SCs	Schwann cells
SDIA	Stromal cell-derived inducing activity
siNPs	Silica nanoparticles
TBI	Traumatic brain injury
TCPS	Tissue culture polystyrene
TiO_2	Titanium dioxide

1 Introduction

The mammalian brain is an extraordinary organic machine that has fascinated scientists and clinicians for hundreds of years. A complex network of chemical and biochemical components of more than a dozen million neurons leads to the emergence of thought, emotion, memory and life. In contrast, fine imbalances or damage to this system can cause serious complications in physical, motor, psychological, and cognitive functions. Furthermore, the loss of inevitable nerve tissue due to degenerative diseases and traumatic injuries is destructive due to the limited regenerative ability of the central nervous system (Shah et al. 2016).

Currently, there are nanotechnology-based approaches developed to direct neural differentiation and regeneration. Among these approaches, stem cell based regenerative medicine shows the greatest hope for repairing and regenerating damaged nerve tissue. However, the establishment of controlled and reliable methodologies (e.g, neurons and oligodendrocytes) that direct stem cell differentiation to specialized cells has been a major problem in the field.

2 Graphene and Its Properties

Graphene is a two-dimensional crystal formed by sp2 hybridization of carbon atoms arranged in the form of a honeycomb and composed of single atomic layers of graphite (Bitounis et al. 2013; de Lázaro et al. 2014; Novoselov 2011). Even though the existence of single grafic plates is theoretically debated (Slonczewski and Weiss 1958), the presence of two-dimensional

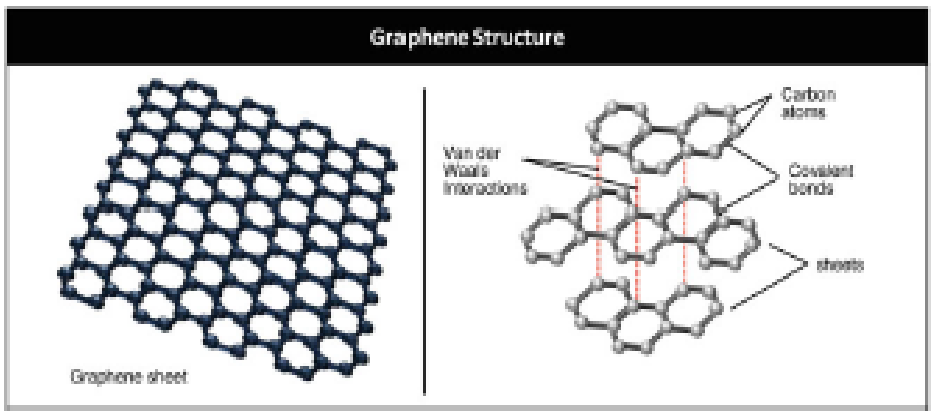


Fig. 1 Graphene structure: Graphene is an allotrope of carbon consisting of a single layer of carbon atoms arranged in a hexagonal lattice. Graphite is composed of stacked layers of graphene sheets, which are held together by the weak Van der Waals interactions

atomically fine crystalline materials was considered physically impossible (Venables et al. 1984). For the first time in 2004, Novoselov and Geim isolated and characterized a single graphene layer by 'Scotch Tape' method (Novoselov et al. 2004). Novoselov and Geim were awarded the Nobel Prize in 2010 for their discovery of this new carbon allotrope (Geim 2011; Novoselov 2011). The simple planar arrangement of the carbon atoms within the single layer of graphene and the covalent bonding between these carbon atoms give graphene unique properties (Fig. 1).

The generation of novel or improved graphene based biomaterials has had a major impact on nanotechnology. Due to its two-dimensional structure, high surface area, high electrical conductivity, chemical stability and bendable properties, graphene attracts great interest in various fields of biomedical sciences including biosensors, cancer therapy, diagnosis and regenerative medicine (Okan et al. 2016; Saner et al. 2010). All these features provide the ability to immobilize many substances such as metals, drugs, biomolecules, fluorescent probes and cells on graphene surface (Reina et al. 2014).

The application of graphene based materials in cell biology and physiology allows targeted interactions at the basic molecular level. In neuroscience, for example, it requires specific interactions with neurons, glial cells or other neuronal cells. Exemplary investigations include development of advanced molecular imaging technologies, engineering hybrid materials used in neural regeneration and developing technologies designed for targeted delivery of drugs and small molecules to blood-brain barrier and neuroprotection (Silva 2006).

2.1 Biocompatibility of Graphene Based Materials

Numerous studies have been conducted to improve the use of graphene in the biomedical field and to understand the toxicity profile in preclinical studies. By engineering surface chemistry, colloidal properties, water solubility and size, graphene-based biomaterials can become more biocompatible (Bussy et al. 2013). The toxicity profile of graphene based materials has been studied extensively in both in vitro and in vivo systems and there are promising results suggesting that these materials will be able to translated into clinical settings in the future (Seabra et al. 2014). In vitro studies have shown that when oxidised (referred to as graphene oxide-GO), or surface functionalized (with biodegradable polymers), toxicity related to graphene could

be abolished (Ali-Boucetta et al. 2013). Supporting cell culture studies, animal models have also shown that graphene-based materials which are small and single layer or conjugated to polymers such as PEG can be eliminated from living systems (Bussy et al. 2013). Therefore, considering such studies, it is possible to produce biocompatible biomaterials which will not cause toxicity.

3 The Nervous System

The nervous system is a network of signals that allows the brain and other parts of the body to function simultaneously. Neurons are electrically excitable cells which are using a concentration gradient of various ions (sodium, potassium, calcium, chloride etc.) and provide electrical conduction through the release neurotransmitters such as acetylcholine. Since neurons do not have division capabilities (suspended in G0 phase), it is of great importance to establish new treatment options for neural diseases by using the ability of stem cells to differentiate into neuronal cells (Fraczek-Szczypta 2014; Shin et al. 2016).

Glial cells are the most abundant cell type in the nervous system. Virchow first explained that there were cells present in neural tissue other than neurons. The first characterization of glial cells is a result of microscopic studies and metallic impregnation techniques developed by Ramon y Cajal and Rio Hortega in particular. Using gold impregnation, astrocytes; a few years later, oligodendrocytes and microglia, using silver carbonate impregnation were named (del Rio-Hortega 1921, 1928).

Figure 2 summarizes the different types of cells present in CNS and PNS (Amoh et al. 2005; Frostick et al. 1998; Gardin et al. 2016; Liu et al. 2000; Nedergaard 1994; Ramírez-Jarquín et al. 2014; Scholz and Woolf 2007; Sedaghati et al. 2011; Spassky et al. 2005; Zhou et al. 2010)

The most common injuries affecting the nervous system are peripheral nerve injuries (CNS), spinal cord injury (SCI), and traumatic brain injury (TBI) (Gardin et al. 2016). The incidence of peripheral nerve injury (PNI) is estimated to be between 13 and 23 per 100,000 people per year in developed countries and causes partial or complete loss of motor, sensory and autonomic function in the relevant segments of the body. On the other hand, spinal cord injuries with an incidence of 750 out of every 1,000,000 people in the world are seriously threatening life (Wyndaele and Wyndaele 2006).

Most of the peripheral nerve injuries are repaired using nerve autografts, but they are limited to the source of donor nerves and may cause morbidity of the donor site (Zhou et al. 2010). Typically, axons in the micro perimeter of the peripheral nerve (PN) may be self-regulating at a relatively short distance (not greater than 5 mm). Regeneration of PN begins with the separation of Schwann cells (SCs) from axons, occurs as a result of incision of myelin sheaths and is phagocytozed by glial cells. SCs that break from the axons can multiply and enhance axonal guidance (Terenghi 1999). On the other hand, the cell loss during spianl cord injury can not be replaced by the body itself, and thus the spinal cord function is permanently lost. Due to the limited internal regenerative abilities, experts from different fields are encouraged to seek new ways to regenerate damaged or diseased nervous system, such as many pharmacological approaches, stem cell treatments, delivery of neurotrophic factors and biomaterial use (Lee-Kubli and Lu 2015).

4 Graphene in Regenerative Medicine

Ding and colleagues stated that a Web of Science search for "graphene" and "tissue engineering" showed that the majority of studies with graphene-based materials were based on bone and neural tissue regeneration (Ding et al. 2015). This trend clearly demonstrates the global importance of the graphene and the increase in interest of scientists in this field. In short, novel biomaterial platforms that can be used in regenerative medicine.

As confirmed by the increase in the number of publications, it is not surprising that the graphene has shown great interest in nanomedicine and

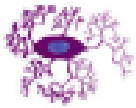
Types of cells in nervous system	Functions
Astrocytes 	• have functional neurotransmitter receptors, modulating the conduction properties of neighbouring neurons (Nedergaard 1994) • feature inhibition mechanisms to the regenerating neurites (Zhou et al. 2010) • have important roles in the homeostasis of the CNS (Gardin et al. 2016)
Ependymal cells 	• Provide the transport of cerebrospinal fluid and in brain homeostasis (Spassky et al. 2005)
Microglial cells 	• are macrophages of the CNS and permanent cells in the brain's immune system (Gardin et al. 2016)
Neurons 	• are the most common cell type in the CNS and PNS (Ramirez-Jarquín et al. 2014) • manipulate information to communicate neural networks (Gardin et al. 2016)
Oligodendrocytes 	• produce myelin and myelinated host axons in the central nervous system (CNS) (Liu et al. 2000) • provide axonal regeneration in CNS.
Satellite cells 	• encompass the cell bodies of dorsal root ganglia neurons (Scholz and Woolf 2007) • enhance the expression of glial fibrillary acidic protein (Scholz and Woolf 2007)
Schwann cells 	• support neuron regrowth (Amoh et al. 2005) • form myelin sheaths surrounding axons (Amoh et al. 2005) • provide regeneration of peripheral nerve (Frostick et al. 1998) • are important in axonal regeneration because they secrete neurotrophic factors (Sedaghati et al. 2011)

Fig. 2 Cells in the nervous system: Neurons and various types glial cells are found in the nervous system

biomedical applications. Recent studies published over the last few years clearly show that graphene and graphene based materials promote adhesion, proliferation and differentiation of various cells such as embryonic stem cells (ESC), neural stem cells (NSC), mesenchymal stem cells (MSC) and induced pluripotent stem cells (iPSC) and thus graphene based materials are known to be one of the promising nanoplatforms in regenerative medicine (Bressan et al. 2014).

Currently, there are various preclinical applications of graphene-based biomaterials showing bone tissues regeneration (Lee et al. 2011; Nayak et al. 2011), partial repair of muscle mass and loss of function (Kenry et al. 2018), usage in cardiac therapies (Park et al. 2014), regeneration of adipose tissue (Gomillion and Burg 2006). Due to the complexity of the anatomy and physiology of the nervous system compared to the other tissues, the repair and regeneration of injured and malfunctioning neural tissue via graphene based materials still need to be investigated further (Pinzaek-Szczypta 2014).

5 Graphene, Neurons and Glia Cells

Recently, the use of graphene-based materials has been of great interest for the design of scaffolds that can promote neuron regeneration. With its unique topographic and chemical properties, graphene is a promising scaffold that could provide a bridge between regenerating nerves. More importantly, as a conductive substrate, graphene allow the continuation of electrical conduction between damaged nerve ends. The integration of supportive cells such as glial and neural precursor cells in such a scaffold can enhanec regeneration when compared to currently used neural autografts and nerve conduits.

Differentiation of stem cells to neurons or neuronal cells for neural regeneration is a critical step while developing stem cell based therapies. Several types of graphene scaffolds have been studied which supported significant stem cell differentiation.

Park et al. used a graphene scaffold as an inducer to differentiate human neural stem cells (NSCs) into neurons (Park et al. 2011). Wang et al. showed that human MCS underwent more neuronal differentiation on fluorine-functional graphene sheets compared to pristine graphene material (Wang et al. 2012). Selective differentiation of stem cells to neurons or oligodendrocytes for regeneration of central nervous system is a highly preferred situation and Shah et al. showed that even in the absence of growth factors, NSCs can differentiate into oligodendrocytes by using only GO-coated cell culture surfaces (Shah et al. 2014).

One of the greatest advantages of using graphene in nerve tissue damage, which also makes it more preferred than other conventional biomaterials, is the ability to create functional neural network connectivity. For, example, when embryonic neural progenitor cells were cultured on three dimentional GO-layers, it was observed that there were not only neurons and glial cells differentiated on these layers, but also a neural network rich in dendrites, axons and synaptic connections (Serrano et al. 2014).

6 Graphene and Neural Tissue Injuries

Currently, there is no cure for spinal cord injury (SCI), however, various scientific studies have recently begun to investigate the potential use of stem cells for SCI. In these cases, stem cell therapies focus on the introduction of neurons and oligodendroglia cells at the injury site in order to create a good microenvironment for the regenerating cells (Salewski et al. 2010). In this regard, mesenchymal stem cells, Schwan cells, glia cells and neurons from olfactory mucosa, neural stem cell and progenitor cells and embryonic stem cells have been used (Schroeder et al. 2016).

In spinal cord injury, there are two potential approaches in which stem cells are used: transplantation of stem cells into the injury site or use of neural precursor cells at the damaged spinal cord. Transplantation of stem cells is a risky task and

requires a precise surgical procedure, and there is a possiblity that the immune system may reject new cells (in cases of embryonic and neural stem cell use). The enhancement of the treatment potential with the help of biomaterials such as graphene has been suggested in various studies. According to these, when graphene-based materials are applied together with stem cells or neural precursor cell, they induce the differentiation towards neurons, oligodendroglia and astrocytes (Barnabé-Heider and Frisén 2008; Nayak et al. 2011; Park et al. 2011; Wang et al. 2012).

In addition to the two dimentional stem cell culture system, there are studies involving three dimentional graphene based materials which better mimic the in vivo microenvironment. Li et al. has shown that they can achieve proliferation and differentiation of neural stem cells using a 3D graphene scaffold (Li et al. 2013; Nayak et al. 2011). In another study, 3D graphene oxide scaffolds were tested in spinal cord injury-induced rats, and an increase in tissue repair was observed (López-Dolado et al. 2015). However, in this study even though no local or systemic toxicity was observed, the use of diisocyanate-containing cross-linkers which was involved during the long-term production processes graphene, increases the toxicity risks of this application. In addition, the researchers have only investigated one type of graphene and the effects of different surface chemistry and derivatives with topography have not been investigated and the mechanism of tissue repair has not been explained.

7 Graphene and Stem Cells

With the purpose of neural tissue regeneration, graphene based materials have been tested with various cell sources and mostly with neural stem/progenitor cells and other stem cells including mesenchymal, embryonic or induced pluripotent stem cells. Various graphene based materials have been combined not only with polymers or differentiation factors but also under electrical or magnetic field. This review will discuss the details of studies performed with neural stem cells, mesenchymal stem cells or pluripotent stem cells.

7.1 Neural Stem Cells

Neural stem cells are multipotent in origin and they are present in the adult central nervous system. They can renew themselves and give rise to new neurons and supporting neuronal cells. Activation of NSCs or their transplantation into areas of central nervous system injury can lead to regeneration in animal models (Barkho and Zhao 2011). Various graphene based materials and hybrid systems have been studied with neural stem cells (Table 1). In 2011, Park et al. generated laminin coated graphene substrates and following NSC seeding, authors observed enhanced neural differentiation (Park et al. 2011). Laminin coatings have been combined with graphene based materials in various studies. It has been suggested that it improves cell seeding and survival on the biomaterial substrates. In addition to extracellular proteins such as laminin, researchers have included differentiation factors such as b-FGF, EGF, PDGF or NGF to improve the differentiation protocol (Park et al. 2011; Solanki et al. 2013).

In hybrid systems, graphene has been combined with nanofibers or other nanoparticles. For examples, graphene and Silica based nanoparticle hybrid structures successfully aligned axons, the differentiation and growth of adult hNSCs (Solanki et al. 2013). In another study, titanium oxide combined reduced GO (rGO) substrates were produced and their flash photo stimulation resulted in a ~ 23-fold increase in the neural to glial cell ratio (Akhavan and Ghaderi 2013).

Another study used GO sheets coated with PCL nanofibers which were generated by electrospinning. When NSCs were seeded on these hybrid srufaces oligodendrocyte differentiation was improved (Shah et al. 2014). Weaver et al. showed that GO-poly (3,4-ethylenedioxythiophene) nanocomposite films can also induce oligondendrocyte differentiation (Weaver and Cui 2015). In another microfiber study, nanostructured rGO poly-D-lysine microfibers were demonstrated to be more successful in adhesion and proliferation of NSCs than 2D graphene film and tissue culture plate (Guo et al. 2017).

Table 1 Graphene based hybrid systems have been studied with neural stem cells

Types of graphene	Additional materials or factors	Main findings	Reference
Graphene substrates	+ Laminin + b-FGF + EGF	Long term culturing of hNSCs on laminin coated graphene films enhanced neural differentiation	Park et al. (2011)
GO nanosheets	+ ECM protein patterning + 300 nm SiNPs + Laminin + b-FGF + EGF	The graphene-nanoparticle hybrid structures successfully aligned axons, the differentiation and growth of adult hNSCs	Solanki et al. (2013)
3D graphene foams	+ EGF + FGF-2	Foams improved proliferation of NSCs and enhanced the NSCs differentiation towards astrocytes and especially neurons	Li et al. (2013)
rGO	+ rGO/TiO2 heterojunction film + Flash photo stimulator	Flash photo stimulation of human neural stem cells on graphene/TiO2 heterojunction resulted in a ~ 23-fold increase in the neural to glial cell ratio	Akhavan and Ghaderi (2013)
2D- and 3D-graphene materials	+ LPS + TCPS + EGF + FGF-2	3D graphene causes less neuroinflammation in microglia than 2D graphene For neural repair and neurogenesis, the studies on the 3D graphene topic should be increased	Song et al. (2014)
GO	+ PCL nanofibers	NSCs were seeded on GO sheets coated with electrospunned PCL nanofibers GO-nanofiber hybrid scaffolds showed enhanced differentiation into oligodendrocyte lineage cells	Shah et al. (2014)
GO/PEDOT nanocomposite films	+ PEDOT + IFNγ + PDGF	PDGF and IFNγ supported neuronal and oligodendrocyte lineage differentiation GO/PEDOT can be customized to develop therapeutic potential	Weaver and Cui (2015)
Nanostructured rGO microfibers	+ poly-D-lysine + EGF + b-FGF	Nanostructured rGO microfibers were demonstrated to be more successful in adhesion and proliferation of NSCs than 2D graphene film and tissue culture plate	Guo et al. (2017)
3D printed graphene scaffolds	+ PU + 3D printing	Graphene–polyurethane composite hydrogel enhanced the oxygen metabolism and neural differentiation of NSCs	Huang et al. (2017)
3D Graphene scaffolds	+ monophasic current stimulation + Neurobasal media	iPSC-derived hNPCs were used Electrical stimulation to enhance NPCs neurogenesis was promising and suggested further investigation of the therapy	Nguyen et al. (2018)

2D two dimensional, *3D* three dimensional, *b-FGF* basic fibroblast-growth factor, *ECM* extracellular matrix, *EGF* epidermal growth factor, *FGF-2* fibroblast growth factor 2, *GO* graphene oxide, *hNPCs* human neural progenitor cells, *hNSCs* human neural stem cells, *IFNγ* interferon-γ, *iPSCs* induced pluripotent stem cell, *LPS* lipopolysaccharide, *NSCs* neural stem cells, *NPCs* neural progenitor cells, *PCL* polycaprolactone, *PDGF* platelet-derived growth factor, *PEDOT* poly (3,4-ethylenedioxythiophene), *PU* polyurethane, *rGO* reduced graphene oxide, *siNPs* silica nanoparticles, *TCPS* tissue culture polystyrene, TiO_2 titanium dioxide

In addition to the above reports with 2-dimentional (2D) graphene based materials, there are also studies performed in 3-dimention (3D). One of the first studies showed that, in the presence of FGF-2 and EGF, 3D graphene foams improved the proliferation of NSC and enhanced their differentiation towards astrocytes and especially neurons (Li et al. 2013). In another comparison study between 2D and 3D graphene based materials, Song et al. suggested that 3D graphene causes less neuroinflammation in microglia than 2D graphene (Song et al. 2014). Furthermore, monophasic electrical stimulation was also shown to enhance NPCs neurogenesis on 3D graphene scaffolds (Nguyen et al. 2018). Recently, 3D printing technologies have been also combined with graphene based substrates and Huang et al. reported that 3D printed graphene–polyurethane composite hydrogel enhanced the oxygen metabolism and neural differentiation of NSC (Huang et al. 2017).

7.2 Mesenchymal Stem Cells

Mesenchymal stem cells (MSCs) which are having multipotent differentiation potential, can be obtained from bone marrow or fat tissue. MSCs are currently being investigated preclinically for the treatment of various diseases and are being tested in clinical trials (Ullah et al. 2015). Similar to NSCs, MSCs have been also investigated with different graphene based materials in order to test their efficacies for neural tissue regeneration (Table 2). When GO was combined with porcine acellular dermal matrix, human adipose derived mesenchymal stem cells (hADMSCs) showed differentiation to ectodermal cells, especially neurons in the presence of differentiation factors (Kim et al. 2015b). On the other hand, there were studies which reported enhanced differentiation even in the presence of such factors. For examples, cell alignment using printed PDMS channel arrays on fluorinated graphene enhanced the neuro-induction of hMSCs in the absence of growth or differentiation factors (Wang et al. 2012).

Similar to NSC studies, 3D printing was also combined with MSCs. In 2015, when MSCs were incubated on 3D printed graphene polylactide-co-glycolide scaffolds, in vitro studies showed neurogenic differentiation with significant upregulation of glial and neuronal genes in the absence of differentiation factors. In vivo studies suggested that 3D printed scaffolds showed promising biocompatibility over the course of at least 30 days (Jakus et al. 2015). In another recent study, 1 step- and 2- step growth graphene were shown to be effective at neuronal differentiation of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells (Lee et al. 2018)

Electrical stimulation also improves the MSCs differenation on graphene based substrates. For examples, Lee et al. reported that extremely low frequency electromagnetic fields exposure synergistically increased biological efficacy of neuronal differentiation of hMSCs grown on graphene-coated substrates (Lee et al. 2015). Later, in 2016, electric pulses generated by the triboelectric nanogenerator were shown to induce neural differentiation of MSCs when cells were grown on rGO- Poly (3,4-ethylenedioxythiophene) hybrid microfibers (Guo et al. 2016b).

7.3 Pluripotent Stem Cells

Pluripotent stem cells are classified in two categories, embryonic and induced pluripotent. Embryonic stem cells (ESCs) are derived from the inner cell mass of a blastocyst whereas induced pluripotent stem cells (iPSCs) are generated from somatic cells following forced expression of reprogramming factors (Chin et al. 2009; Takahashi and Yamanaka 2006; Thomson et al. 1998). In one of the first studies involving graphene and pluripotent stem cells (Table 3), mouse iPSCs were cultured on both graphene or GO surfaces spontaneously differentiated into ectodermal and mesodermal lineages, and authors reported that these materials could be a promising strategy to use in differentiation protocols in pluripotent stem cell cultures (Chen et al. 2012).

Table 2 Graphene based hybrid systems have been studied with mesenchymal stem cells

Types of graphene	Additional materials or factors	Main findings	Reference
GO	+ PDMS arrays	Cell alignment using printed PDMS channel arrays on fluorinated graphene enhanced the neuro-induction of hMSCs even in the absence of growth or differentiation factors	Wang et al. (2012)
NGO (100 nm)	+ 3D PADM + b-FGF + BDNF + NGF	hADMSCs were differentiated to ectodermal cells (neuron) on NGO grid patterns	Kim et al. (2015b)
3D printable graphene	+ polylactide-co-glycolide	In vitro studies showed neurogenic differentiation with significant upregulation of glial and neuronal genes in the absence of differentiation factors In vivo studies suggested that 3D printed scaffolds showed promising biocompatibility over the course of at least 30 days	Jakus et al. (2015)
Graphene substrate	+ ELF-EMF + Hydrocortisone + Forskolin + Valproic acid + Insulin	ELF-EMF exposure synergistically increased biological efficacy of neuronal differentiation of hMSCs grown on graphene-coated substrate	Lee et al. (2015)
Graphene monolayers	+ 3D spheroid cultures of hMSCs	Graphene monolayers regulated the interactions at cell-substrate or cell–cell interfaces, consequently promoting the neurogenesis of hMSCs as well as the outgrowth of neurites	Kim et al. (2015a)
rGO microfibers rGO-PEDOT hybrid microfibers	+ PEDOT + Electrical stimulation + b-FGF	By inducing electric pulses generated by the triboelectric Nanogenerator, neural differentiation of MSCs was dramatically improved	Guo et al. (2016b)
rGO nanosheets	+ PADM scaffold	rGO-assembled PADM scaffold enhanced the differentiation of MSCs into neuronal cells 7 days after seeding	Guo et al. (2016a)
1 step-G and 2 step-G Graphene	+ 35-mm-thick Cu foils	1 step- and 2- step growth graphene were effective at neuronal differentiation of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells	Lee et al. (2018)

1 step-G one-step growth, *2 step-G* two-step growth, *3D* three dimensional, *ADSCs* adipose derived stem cells, *BDNF* brain-derived neurotrophic factor, *b-FGF* basic fibroblast growth factor, *Cu* copper, *ELF-EMF* extremely low frequency electromagnetic fields, *GO* graphene oxide, *hADMSCs* human adipose-derived mesenchymal stem cells, *hMSCs* human mesenchymal stem cells, *MSCs* mesenchymal stem cells, *NGF* nerve growth factor, *NGO* nanosized graphene oxide, *PADM* porcine acellular dermal matrix, *PDMS* polydimethylsiloxane, *PEDOT* poly (3,4-ethylenedioxythiophene), *rGO* reduced graphene oxide

Later in 2012, when mouse embryonic stem cells were seeded on graphene or graphene oxide surfaces under stromal cell-derived inducing activity, only GO effectively promoted mouse embryonic stem cell differentiation towards dopamine neurons compared to only graphene treated cells or negative control groups (Yang et al. 2014). In a recent study, transgenic mouse embryos were used to derive substantia nigra dopaminergic cells which were then cultured on graphene flakes containing nanocrystalline glass-like carbon films. The results demonstrated neuronal capability and there was a direct relationship between the thickness of the films and cell maturation (Rodriguez-Losada et al. 2017).

Table 3 Graphene based hybrid systems have been studied with pluripotent stem cells

Types of graphene	Additional materials or factors	Main findings	Reference
Graphene and graphene oxide substrates	+LIF	Mouse iPSCs cultured on both G and GO surfaces spontaneously differentiated into ectodermal and mesodermal lineages	Chen et al. (2012)
Graphene and graphene oxide	+SDIA	Only GO effectively promoted mouse embryonic stem cell differentiation towards dopamine neurons compared to graphene treated cells or control group	Yang et al. (2014)
Graphene flakes	+ NGLC composed of curved graphene flakes joined by an amorphous carbon matrix	Substantia nigra dopaminergic cells were derived from transgenic mouse embryos Culturing on NGLC demonstrated neuronal capability to a certain extent There was a direct relationship between the thickness of the films and cell maturation	Rodriguez-Losada et al. (2017)

ESCs embryonic stem cells, *G* graphene, *GO* graphene oxide, *iPSCs* induced pluripotent stem cells, *LIF* leukemia inhibitory factor, *NGLC* nanocrystalline glass-like carbon film, *SDIA* stromal cell-derived inducing activity

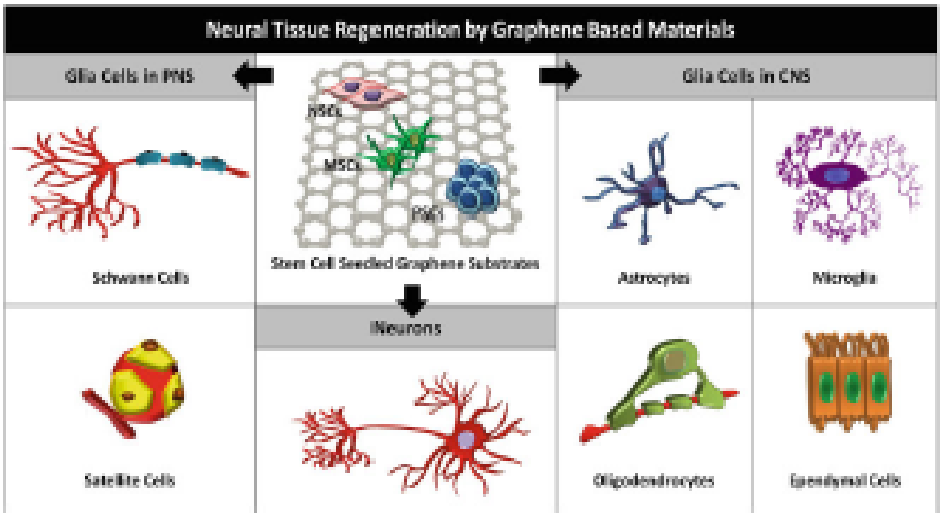


Fig. 3 Neural tissue regeneration by graphene based materials: Seeding neural stem cells, mesenchymal stem cells or pluripotent stem cells on graphene based scaffolds results in the differentiation towards neurons and glial cells

8 Conclusion an Future Perspectives

Graphene has a tremendous interface and a very conductive path for the conduction of electricity (Chen et al. 2011). Neurons in this count are electro-active and electrical stimulation can affect the behavior of stem cells (Chang et al. 2011; Ghasemi-Mobarakeh et al. 2011). For this reason, graphene has been used in various neural tissue regeneration studies which are summarized in Fig. 3. With the development of graphene derivatives, more specific needs for injury repair can be met. Most of the studies have examined the differentiation potential of Schwann cells, oligondendrocytes or neurons, however more detailed experiments are needed to understand the effect of graphene based materials on differentiation of other glial cells such as astrocytes, microglia or ependymal cells, since a healthy microenvironment would be needed for efficient neural tissue repair.

In addition to the development of novel graphene derivatives, 3D printing technologies are getting improved. As seen from the above Tables, there are already reports in literature which involves printing of graphene with additional polymers and growth factors. Most of the time, following the production of these 3D printed scaffolds, cells are seeded on their surface to evaluate differentiation potential. With the help of advanced bioprinting technologies, researchers will be able to print cells and materials together which can anatomically and histologically mimic the healthy neural tissue.

Acknowledgement AY, HT and CG acknowledge support by the Scientific and Technological Research Council of Turkey and FlagEra Graphene Project G-IMMUNOMICS (TUBITAK, grant number 315S202).

References

Akhavan O, Ghaderi E (2013) Flash photo stimulation of human neural stem cells on graphene/TiO 2 heterojunction for differentiation into neurons. Nanoscale 5:10316–10326

Ali-Boucetta H, Bitounis D, Raveendran-Nair R, Servant A, Van den Bossche J, Kostarelos K (2013) Purified graphene oxide dispersions lack in vitro cytotoxicity and in vivo pathogenicity. Adv Healthc Mater 2:433–441

Amoh Y, Li L, Campillo R, Kawahara K, Katsuoka K, Penman S, Hoffman RM (2005) Implanted hair follicle stem cells form Schwann cells that support repair of severed peripheral nerves. Proc Natl Acad Sci U S A 102:17734–17738

Barnabé-Heider F, Frisén J (2008) Stem cells for spinal cord repair. Cell Stem Cell 3:16–24

Bitounis D, Ali-Boucetta H, Hong BH, Min DH, Kostarelos K (2013) Prospects and challenges of graphene in biomedical applications. Adv Mater 25:2258–2268

Bressan E, Ferroni L, Gardin C, Sbricoli L, Gobbato L, Ludovichetti FS, Tocco I, Carraro A, Piattelli A, Zavan B (2014) Graphene based scaffolds effects on stem cells commitment. J Transl Med 12:296

Bussy C, Ali-Boucetta H, Kostarelos K (2013) Safety considerations for graphene: lessons learnt from carbon nanotubes. Acc Chem Res 46:692–701

Chang K-A, Kim JW, a Kim J, Lee S, Kim S, Suh WH, Kim H-S, Kwon S, Kim SJ, Suh Y-H (2011) Biphasic electrical current stimulation promotes both proliferation and differentiation of fetal neural stem cells. PLoS One 6:e18738

Chen G-Y, Pang D-P, Hwang S-M, Tuan H-Y, Hu Y-C (2012) A graphene-based platform for induced pluripotent stem cells culture and differentiation. Biomaterials 33:418–427

Chen Z, Ren W, Gao L, Liu B, Pei S, Cheng H-M (2011) Three-dimensional flexible and conductive interconnected graphene networks grown by chemical vapour deposition. Nat Mater 10:424

Chin MH, Mason MJ, Xie W, Volinia S, Singer M, Peterson C, Ambartsumyan G, Aimiuwu O, Richter L, Zhang J (2009) Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. Cell Stem Cell 5:111–123

de Lázaro I, Yilmazer A, Kostarelos K (2014) Induced pluripotent stem (iPS) cells: a new source for cell-based therapeutics? J Control Release 185:37–44

del Río-Hortega P (1921) Estudios sobre la neuroglia. La glía de escasas radiaciones (oligodendroglia). Bol Real Soc Esp Hist Nat 21:63–92

del Río-Hortega P (1928) Tercera aportación al conocimiento morfológico e interpretación funcional de la oligodendroglía. Mem Real Soc Esp Hist Nat 14:5–122

Ding X, Liu H, Fan Y (2015) Graphene-based materials in regenerative medicine. Adv Healthc Mater 4:1451–1468

Fraczek-Szczypta A (2014) Carbon nanomaterials for nerve tissue stimulation and regeneration. Mater Sci Eng C 34:35–49

Frostick SP, Yin Q, Kemp GJ (1998) Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration. Microsurgery 18:397–405

Gardin C, Piattelli A, Zavan B (2016) Graphene in regenerative medicine: focus on stem cells and neuronal differentiation. Trends Biotechnol 34:435–437

Geim AK (2011) Nobel lecture: random walk to graphene. Rev Mod Phys 83:851

Ghasemi-Mobarakeh L, Prabhakaran MP, Morshed M, Nasr-Esfahani MH, Baharvand H, Kiani S, Al-Deyab SS, Ramakrishna S (2011) Application of conductive polymers, scaffolds and electrical stimulation for nerve tissue engineering. J Tissue Eng Regen Med 5:e17

Gimble JM, Bunnell BA, Guilak F (2006) Stem cells and adipose tissue engineering. Biomaterials 27:6052–6063

Guo W, Qiu J, Liu J, Liu H (2017) Graphene microfiber as a scaffold for regulation of neural stem cells differentiation. Sci Rep 7:3678

Guo W, Wang S, Yu X, Qiu J, Li J, Tang W, Li Z, Mou X, Liu H, Wang Z (2016a) Construction of a 3D rGO–collagen hybrid scaffold for enhancement of the neural differentiation of mesenchymal stem cells. Nanoscale 8:1897–1904

Guo W, Zhang X, Yu X, Wang S, Qiu J, Tang W, Li L, Liu H, Wang ZL (2016b) Self-powered electrical stimulation for enhancing neural differentiation of mesenchymal stem cells on graphene–poly (3, 4-ethylenedioxythiophene) hybrid microfibers. ACS Nano 10:5086–5095

Huang C-T, Shrestha LK, Ariga K, Hsu S-h (2017) A graphene–polyurethane composite hydrogel as a potential bioink for 3D bioprinting and differentiation of neural stem cells. J Mater Chem B 5:8854–8864

Jakus AE, Secor EB, Rutz AL, Jordan SW, Hersam MC, Shah RN (2015) Three-dimensional printing of high-content graphene scaffolds for electronic and biomedical applications. ACS Nano 9:4636–4648

Kenry LWC, Loh KP, Lim CT (2018) When stem cells meet graphene: opportunities and challenges in regenerative medicine. Biomaterials 155:236–250. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.10.004

Kim J, Park S, Kim YJ, Jeon CS, Lim KT, Seonwoo H, Cho S-P, Chung TD, Choung P-H, Choung Y-H (2015a) Monolayer graphene-directed growth and neuronal differentiation of mesenchymal stem cells. J Biomed Nanotechnol 11:2024–2033

Kim T-H, Shah S, Yang L, Yin PT, Hossain MK, Conley B, Choi J-W, Lee K-B (2015b) Controlling differentiation of adipose-derived stem cells using combinatorial graphene hybrid-pattern arrays. ACS Nano 9:3780–3790

Lee-Kubli CA, Lu P (2015) Induced pluripotent stem cell-derived neural stem cell therapies for spinal cord injury. Neural Regen Res 10:10

Lee WC, Lim CHY, Shi H, Tang LA, Wang Y, Lim CT, Loh KP (2011) Origin of enhanced stem cell growth and differentiation on graphene and graphene oxide. ACS Nano 5:7334–7341

Lee Y-J, Jang W, Im H, Sung J-S (2015) Extremely low frequency electromagnetic fields enhance neuronal differentiation of human mesenchymal stem cells on graphene-based substrates. Curr Appl Phys 15:595–5102

Lee YJ, Seo TH, Lee S, Jang W, Kim MJ, Sung JS (2018) Neuronal differentiation of human mesenchymal stem cells in response to the domain size of graphene substrates. J Biomed Mater Res A 106:43–51

Lin N, Zhang Q, Gao S, Song Q, Huang R, Wang L, Liu L, Dai J, Tang M, Cheng G (2013) Three-dimensional graphene foam as a biocompatible and conductive scaffold for neural stem cells. Sci Rep 3:1604

Liu S, Qu Y, Stewart TJ, Howard MJ, Chakrabortty S, Holekamp TF, McDonald JW (2000) Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation. Proc Natl Acad Sci 97:6126–6131

López-Dolado E, González-Mayorga A, Portolés MT, Feito MJ, Ferrer ML, del Monte F, Gutiérrez MC, Serrano MC (2015) Subacute tissue response to 3D graphene oxide scaffolds implanted in the injured rat spinal cord. Adv Healthc Mater 4:1861–1868

Nayak TR, Andersen H, Makam VS, Khaw C, Bae S, Xu X, Ee P-LR, Ahn J-H, Hong BH, Pastorin G (2011) Graphene for controlled and accelerated osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. ACS Nano 5:4670–4678

Nedergaard M (1994) Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells. Science 263:1768–1771

Nguyen AT, Mattissi S, Loeblein M, Chin E, Ma D, Coquet P, Vinuesa V, Teo EHT, Goh EL, Yim EK (2018) Human Reti-derived neuronal progenitor cells in 3D graphene scaffold as an in vitro platform to study the effect of electrical stimulation on neuronal differentiation. Biomed Mater 13:034111

Novoselov KS (2011) Graphene: materials in the flatland (Nobel Lecture). Angew Chem Int Ed 50:6986–7002

Novoselov KS, Geim AK, Morozov SV, Jiang D, Zhang Y, Dubonos SV, Grigorieva IV, Firsov AA (2004) Electric field effect in atomically thin carbon films. Science 306:666–669

Okan BS, Marcet A, Seyyal Monfared Zanjani J, Sut PA, Sen O, Çulha M, Menceloglu Y (2016) Thermally exfoliated graphene oxide reinforced fluorinated pentablock poly (l-lactide-co-ε-caprolactone) electrospun scaffolds: insight into antimicrobial activity and biodegradation. J Appl Polym Sci 133 (22):43490

Park J, Park S, Ryu S, Bhang SH, Kim J, Yoon JK, Park YH, Cho SP, Lee S, Hong BH (2014) Graphene–regulated Cardiomyogenic differentiation process of mesenchymal stem cells by enhancing the expression of extracellular matrix proteins and cell signaling molecules. Adv Healthc Mater 3:176–181

Park SY, Park J, Sim SH, Sung MG, Kim KS, Hong BH, Hong S (2011) Enhanced differentiation of human neural stem cells into neurons on graphene. Adv Mater 23:H263

Ramírez-Jarquín UN, Lazo-Gómez R, Tovar-y-Romo LB, Tapia R (2014) Spinal inhibitory circuits and their role in motor neuron degeneration. Neuropharmacology 82:101–107

Reina G, Tamburri E, Orlanducci S, Guy S, Matassa R, Guglielmotti V, Lavecchia T, Letizia Terranova M, Rossi M (2014) Nanocarbon surfaces for biomedicine. Biomatter 4:e28537

Rodriguez-Losada N, Romero P, Estivill-Torrús G, de Villoria RG, Aguirre JA (2017) Cell survival and differentiation with nanocrystalline glass-like carbon using substantia nigra dopaminergic cells derived from transgenic mouse embryos. PLoS One 12:e0173978

Salewski RP, Ellekhanpour E, Fehlings MG (2010) Are induced pluripotent stem cells the future of cell-based regenerative therapies for spinal cord injury. J Cell Physiol 222:515–521

Sarer B, Oksay F, Yildirim Y (2010) Utilization of multiple graphene layers in fuel cells. 1. An improved technique for the exfoliation of graphene-based nanosheets from graphite. Fuel 89:1903–1910

Scholz J, Woolf CJ (2007) The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. Nat Neurosci 10:1361

Schroeder GD, Kepler CK, Vaccaro AR (2016) The use of cell transplantation in spinal cord injuries. J Am Acad Orthop Surg 24:266–275

Seabra AB, Paula AJ, de Lima R, Alves OL, Durán N (2014) Nanotoxicity of graphene and graphene oxide. Chem Res Toxicol 27:159–168

Sedaghati T, Yang SY, Mousavi A, Alavijeh MS, Seifalian AM (2011) Nerve regeneration with aid of nanotechnology and cellular engineering. Biotechnol Appl Biochem 58:288–300

Serrano M, Patiño J, García-Rama C, Ferrer M, Fierro J, Tamayo A, Collazos-Castro J, Del Monte F, Gutierrez M (2014) 3D free-standing porous scaffolds made of graphene oxide as substrates for neural cell growth. J Mater Chem B 2:5698–5706

Shah S, Solanki A, Lee KB (2016) Nanotechnology-based approaches for guiding neural regeneration. Acc Chem Res 49:17–26. https://doi.org/10.1021/acs.accounts.5b00345

Shah S, Yin PT, Uehara TM, Chueng STD, Yang L, Lee KB (2014) Guiding stem cell differentiation into oligodendrocytes using graphene-nanofiber hybrid scaffolds. Adv Mater 26:3673–3680

Shin SR, Li YC, Jang HL, Khoshakhlagh P, Akbari M, Nasajpour A, Zhang YS, Tamayol A, Khademhosseini A (2016) Graphene-based materials for tissue engineering. Adv Drug Deliv Rev 105:255–274. https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.03.007

Silva GA (2006) Neuroscience nanotechnology: progress, opportunities and challenges. Nat Rev Neurosci 7:65

Slonczewski J, Weiss P (1958) Band structure of graphite. Phys Rev 109:272

Solanki A, Chueng STD, Yin PT, Kappera R, Chhowalla M, Lee KB (2013) Axonal alignment and enhanced neuronal differentiation of neural stem cells on graphene-nanoparticle hybrid structures. Adv Mater 25:5477–5482

Song Q, Jiang Z, Li N, Liu P, Liu L, Tang M, Cheng G (2014) Anti-inflammatory effects of three-dimensional graphene foams cultured with microglial cells. Biomaterials 35:6930–6940

Spassky N, Merkle FT, Flames N, Tramontin AD, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2005) Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. J Neurosci 25:10–18

Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 126:663–676

Terenghi G (1999) Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. J Anat 194:1–14

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 282:1145–1147

Ullah I, Subbarao RB, Rho GJ (2015) Human mesenchymal stem cells-current trends and future prospective. Biosci Rep 35:e00191

Venables J, Spiller G, Hanbucken M (1984) Nucleation and growth of thin films. Rep Prog Phys 47:399

Wang Y, Lee WC, Manga KK, Ang PK, Lu J, Liu YP, Lim CT, Loh KP (2012) Fluorinated graphene for promoting neuro-induction of stem cells. Adv Mater 24:4285–4290

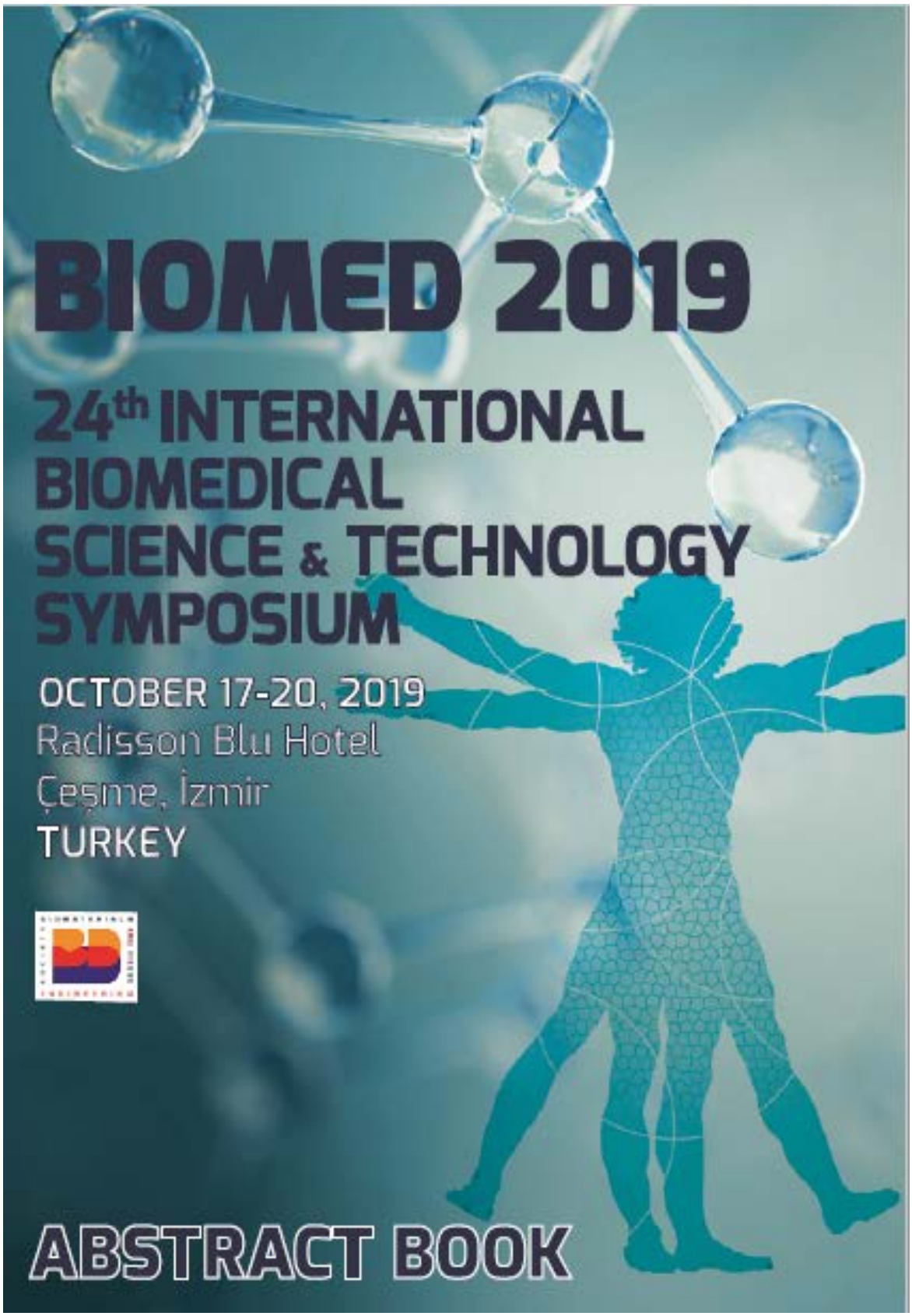
Weaver CL, Cui XT (2015) Directed neural stem cell differentiation with a functionalized graphene oxide nanocomposite. Adv Healthc Mater 4:1408–1416

Wyndaele M, Wyndaele J-J (2006) Incidence, prevalence and epidemiology of spinal cord injury: what learns a worldwide literature survey? Spinal Cord 44:523

Yang D, Li T, Xu M, Gao F, Yang J, Yang Z, Le W (2014) Graphene oxide promotes the differentiation of mouse embryonic stem cells to dopamine neurons. Nanomedicine 9:2445–2455

Barkho BZ, Zhao X (2011) Adult neural stem cells: response to stroke injury and potential for therapeutic applications. Curr Stem Cell Res Ther 6:327–338

Zhou K, Nisbet D, Thomas G, Bernard C, Forsythe J (2010) Bio-nanotechnology approaches to neural tissue engineering. In: Tissue engineering. InTech, Rijeka


BIOMED 2019
24th INTERNATIONAL BIOMEDICAL SCIENCE & TECHNOLOGY SYMPOSIUM
OCTOBER 17-20, 2019
Radisson Blu Hotel
Çeşme, İzmir
TURKEY
ABSTRACT BOOK

P-25
GRAPHENE OXIDE TREATMENT CHANGES THE DIFFERENTIATION POTENTIAL OF HUMAN ADIPOSE STEM CELLS TOWARDS NEURAL LINEAGE

CANSU GÜRCAN[1,2], HADISEH TAHERI[1], TUĞCE AYDIN[1], LUCIA GEMMA DELOGU[3], KOSTAS KOSTARELOS[4], AÇELYA YILMAZER[1,2]

[1] DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING, FACULTY OF ENGINEERING, ANKARA UNIVERSITY, TURKEY
[2] STEM CELL INSTITUTE, ANKARA UNIVERSITY, BALGAT, 06520 ANKARA, TURKEY
[3] INSTITUTE OF PEDIATRIC RESEARCH, UNIVERSITY OF PADUA, 35129 PADUA, ITALY
[4] NANOMEDICINE LAB, THE UNIVERSITY OF MANCHESTER, MANCHESTER M13 9PT, UK

INTRODUCTION

Guiding the differentiation of hMSCs by using current technologies is still not efficient and needs weeks to months of culturing protocols for the generation of desired cells[1] . There are also studies which showed that surface chemistry, topography and mechanical properties of biomaterials can also play an important role in MSC differentiation[2-4] . Numerous studies have reported that, nanostructures, microstrcutures, micro/nano-patterning or hybrid materials are novel inducers of stem cell differentiation. For example, graphene, is a 2-dimentional nanoplatform consisting of hexagonally coordinated carbon atoms, with extraordinary physical and mechanical properties. Thanks to these properties, graphene family materials have been extensively applied in many different fields [5-8]. For example, graphene oxide (GO), has been considered in various biomedical research such as drug delivery, tissue engineering, biological imaging, and cancer therapy[7-8]. Recently, graphene has wildly been used for cell growth and modulated cell fate such as differentiation.

In this study, we aimed to investigate the effects of graphene oxide on mesenchymal stem cell fate transformation and toxicity.

MATERIALS AND METHODS

In this study, Human Adipose Derived Stem Cells (hASCs) line was used. The cultured cells were treated with two different concentrations of graphene oxide. After 4 hours of incubation, the medium was renewed and treateds cells were followed for 10 days. Graphene oxide (GO) in suspension form was used throughout the study. Following GO exposure, toxicity and genotoxicity were analyzed through LDH test, apoptosis and cell cycle analyses, AP DNA damage and repair tests. To observe cell differentiation, RNA was isolated from GO treated cells and qRT-PCR analysis was performed for key lineage and differentiation markers.

RESULTS AND DISCUSSION

As a result, Results suggested that exposure to GO suspension is safer to use at lower doses. At higher doses, the toxicity and genotoxicity, which were observed at early time points, can be eliminated at later time points. When compared to naive ASCs, GO exposure upregulated the expression of ectoderm lineage and early neural progenitor markers these markers. When combined with a neural differentiation protocol, cells were able to co-express neuron makers compared to naïve or only growth factor treated cells. These results suggested that exposing ASCs with suspension GO could change the differentiation potential towards neural lineage without long-term toxicity.

CONCLUSION

The study showed that GO could be used to change the differentiation potential of stem cells. Future studies should focus on the ability of different graphene family materials to induce ASC differentiation towards neurons or glial cells including astrocytes or Schwann cells. It would be important to evaluate which properties of these materials are involved during differentiation processes of these different cell types.

REFERENCES

1. Pittenger, M. F. et al., Science 284, 143-147 1999.
2. Dalby, M. J. et al., Nature materials 13, 558-569, 2014.
3. Treiser, M. D. et al., PNAS 107, 610-615, 2010.
4. Kilian, K. A. et al., PNAS 107, 4872-4877, 2010.
5. Chung, C. et al. Accounts of chemical research 46, 2211-2224, 2013.
6. Novoselov, K. S. et al., Nature 490, 192-200,2012.
7. Stankovich, S. et al., Nature 442, 282-286, 2006.
8. Liu, S. et al., ACS nano 5, 6971-6980, 2011.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the support by the FLAG-ERA Joint Transnational Call on Graphene, under the project named as "G-IMMUNOMICS for providing financial support to this project.