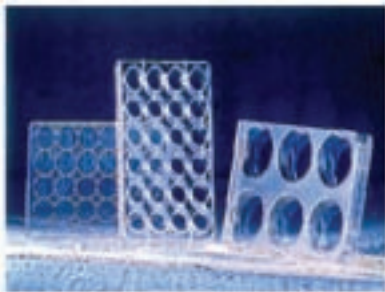


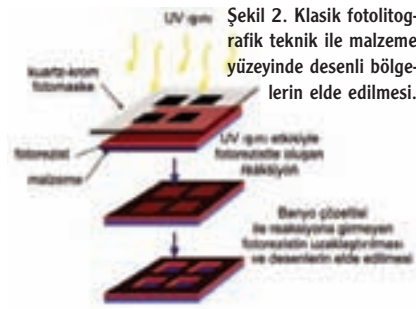
HÜCRELERİN NANODÜNYASI

Hücreler ile malzemeler arasındaki etkileşimlerin anlaşılması, biyolojik uygulamalarda kullanılacak yeni malzemelerin geliştirilmesindeki en önemli basamak. Ne var ki, bu etkileşimlerin anlaşılabilmesi için yapılan çalışmalarda hücreler buldukları ortamdan uzaklaştırılarak, doğal fiziksel ve kimyasal çevrelerine hiç de benzemeyen ortamlarda üretiliyor (hücre kültürleri). Bu nedenle, normal işlevlerinde kayıplar ya da değişiklikler meydana gelebiliyor. Doğal mikroçevrede gerçekleşen olaylar zinciri hücrenin fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerini, kısaca fenotipini ve işlevini nasıl etkiliyor? İşte bu soruların cevaplarına yönelik araştırmalar hücreyi daha iyi anlamamızı ve özellikle yapay doku ve organların geliştirilmesi için yaklaşımlarda bulunmamızı sağlayacak. Son yıllarda nanoteknoloji konusundaki ilerlemeler bu araştırmalara önemli katkıda bulunuyor. Nanoteknolojide kullanılan yüzey-fabrikasyon teknikleri ile nanoyapılara sahip, özgül kimyasal ve topografik desenleri olan yüzeylerin geliştirilmesi, hücresel işlevlerin doğal mikroçevrelerine çok benzer ortamlarda düzenlenmesine ve incelenmesine olanak sağlıyor.

Günümüzde doku mühendisliği yaklaşımı ile gerçekleştirilen yapay sistemlerde izlenen strateji, hücrelerin doğal ya da sentetik bir malzemeden hazırlanmış bir iskelet yapı ile birleştirilerek hibrid sistemlerin oluşturulmasıdır. Doku iskelesi olarak adlandırılan bu yapı, hücrelerin organize olarak işlevsel bir dokuya dönüşebilmelerinde yapısal bir destek sağlar. Doku iskelelerinde canlılığını sürdüren ve çoğalan hücrelerin



Şekil 1. Polistirenden üretilmiş hücre kültür kapları (a) ve atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ile alınan topografik görüntüsü (b).



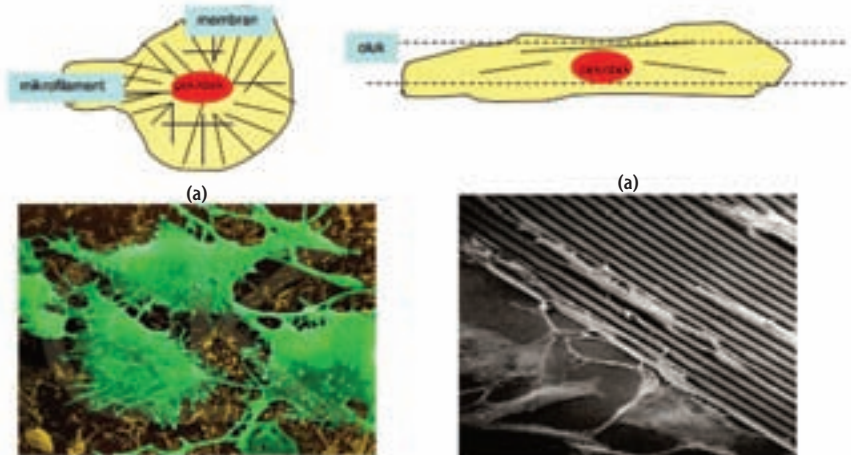
Şekil 2. Klasik fotolitografik teknik ile malzeme yüzeyinde desenli bölgelerin elde edilmesi.

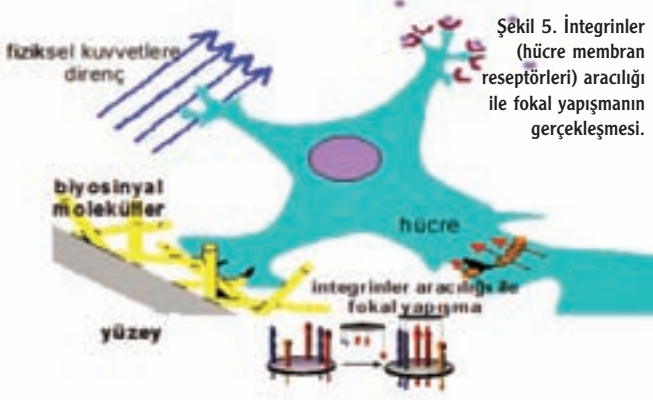
pozisyonlarının ve işlevlerinin kontrol edilebilmesi, hazırlanan yapının başarılı olmasındaki kritik noktalar. İşte bu nedenle bilim adamları hücrelerin buldukları mikroçevre ile olan etkileşimlerinin hücresel işlevleri ve davranışları nasıl etkilediğini açığa çıkarmak için ça-

ba sarf ediyorlar.

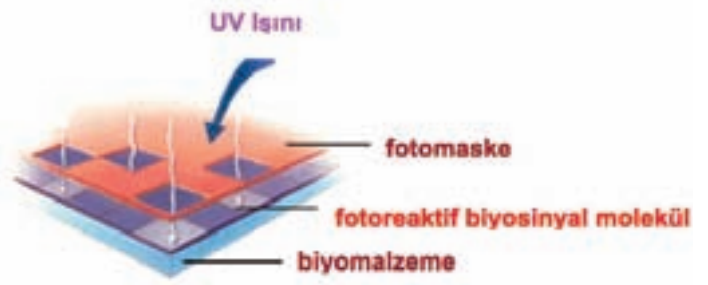
Hücreler doğal ortamlarında, çevrelerini saran hücre dışı matris, büyüme faktörleri, sitokinler ve diğer hücrelerle birlikte karmaşık ve dinamik bir mikroçevrede bulunuyorlar. Hücre yapışması, hücre dışı matris proteinleri ve özgül hücre-yüzey reseptörleri arasındaki fiziksel etkileşimle başlar. İntegrinler, hücre iskeleti ile hücre dışı matrisi birbirine bağlayan zar (membran) almaçlarıdır (reseptör). İntegrinlerin hücre dışı matriste ki ligandlara bağlanmasıyla etkin yapışma (fokal yapışma) meydana gelir. Bu aşamadan sonra, hücre içi sinyaller devreye girer ve üreme, göç ve farklılaşma gibi hücresel işlevler oluşur. Doku oluş-

Şekil 3. (a) Düz bir yüzey üzerinde yayılan hücreler ve bunlara ait hücre iskeletinin şematik görünümü, (b) oluklu bir yüzeyde mikrofilamentlerin yeniden şekillenmesi ve epitenon (tendon) hücrelerinin 14µm aralıklarla desenlenmiş, 7µm genişliğinde ve 3µm derinliğinde oluklar üzerinde sıralanmaları (Wilkinson ve ark., 2002).



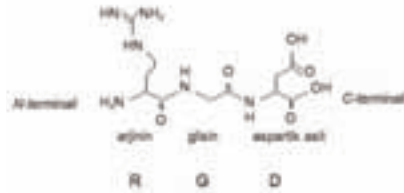


Şekil 5. İntegrinler (hücre membran reseptörleri) aracılığı ile fokal yapışmanın gerçekleşmesi.



Şekil 6. Fotokimyasal mikrofabrikasyon ile biyosinyal moleküllerin mikrodesezneli olarak kontrollü bir geometride malzeme yüzeyine tutuklanması.

turmak için, doku iskelesi varlığında da bu aşamaların hepsinin gerçekleşmesi gerekiyor. İşte bu noktada hem yüzey topografisi, hem de yüzeydeki biyolojik moleküllerin varlığı hücre davranışlarını etkiliyor. Şimdi sırasıyla bu faktörlerin etkisini inceleyelim.



Şekil 4. RGD peptid dizilimi.

Yüzey Topografisinin Etkisi

Hücreler çevrelerine karşı son derece duyarlıdır. Bu hassasiyet kat kat çarşafın altındaki küçük bir bezelye tanesini hissedebilen masal prensesininkinden de fazla. Vücudumuzdaki hücreler genellikle 10 mikron boyutundadır. Buldukları ortamda kendilerinden 1000 ila 5000 kat daha küçük olan, yaklaşık 5 nanometrelik (nm) yapılara bile tepki gösterebiliyorlar. Kültürlenmek üzere doğal ortamlarından uzaklaştırıldıklarında ya da yapay bir doku iskelesine yerleştirildiklerinde, hücreler hiç de aşına olmadıkları, doğal ortamlarına ters, nanodetaayların karmaşık ve gelişigüzel bulunduğu bir nanodünya ile karşılaşılıyorlar. Örneğin, hücre kültürlerinde yaygın olarak kullanılan ve çıplak gözle baktığımızda düzgün bir yüzeye sahip olarak algıladığımız polistiren hücre kültür kaplarının atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ile incelenmesi, yüzeyinde yaklaşık 10 nm yüksekliğinde kabartılar bulunduğunu göstermiş bulunuyor.

Peki hücreler bu nanoboyuttaki yapılardan etkilenirler mi? Bu sorunun yanıtı nanodesenli topografiye sahip yüzeylerin hazırlanması ve çeşitli hücre türleriyle etkileşimlerinin incelenebilmesine kadar açıklık kazanmamıştı. Geçtiğimiz 20 yılda, silikon mikroelettronik endü-

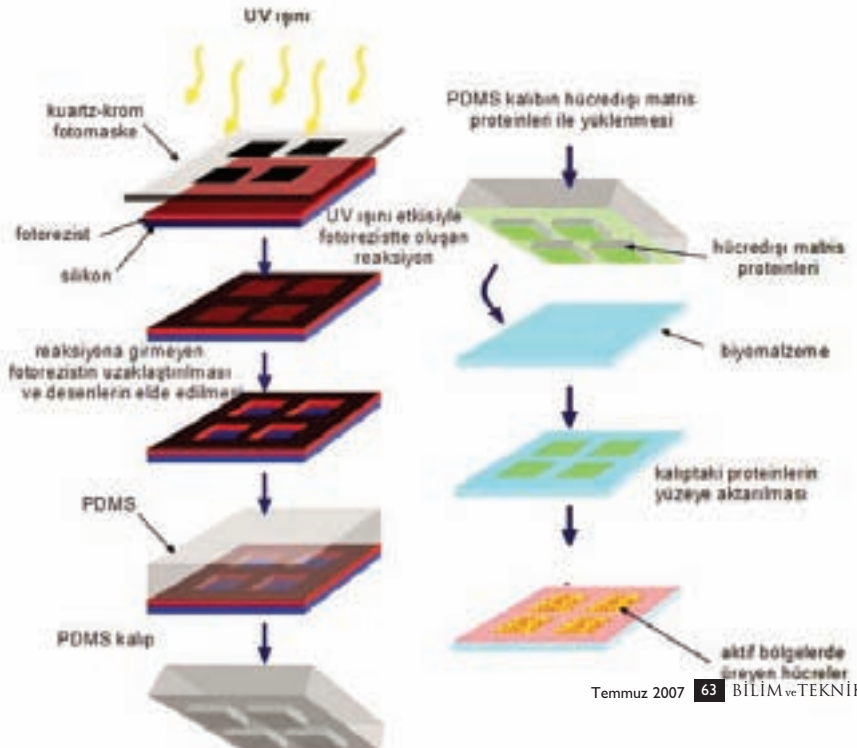
strisinde kullanılan litografi (baskılama) ve yüzeyden kazıma (etching) tekniklerinin bu alanda uygulanması fikri, daha detaylı ve sistematik çalışmaların önünü açtı. Topografik desenlere sahip yüzeylerin hazırlanmasında kullanılan başlıca teknikler, elektron ışın radyasyonu, fotolitografi (ışıkla baskılama) ve kalıpların kullanıldığı litografi (soft litografi) teknikleri. Ne var ki, klasik fotolitografide kullanılan kimyasallar (fotorezistler) birçok polimerik malzeme için -özellikle doku iskelesi olarak kullanılan biyobozunur polimerler için- uygun değil. Böyle bir durumda, öncelikle silika yüzey üzerinde fotolitografi kullanılarak topografik desenler elde edilebilir. Daha sonra eriyik halindeki polimer bu kalıbın üzerine dökülerek soğutulur ve desenler (oluklar ya da kabartmalar) polimer yüzeyine transfer edilmiş olur.

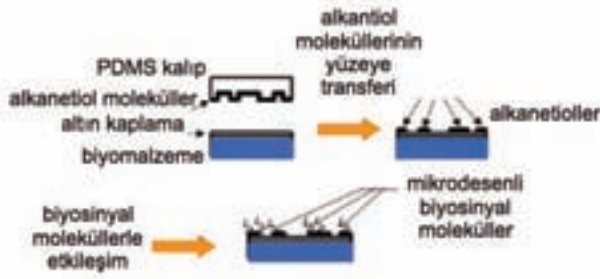
Çoğu hücre tipi yüzey üzerinde bulunan mikron boyutundaki oluklu yapılardan etkileniyor. Şekillerini değiştirerek ve oluk yönünde uzayarak hizaya giriyorlar. Bu sıralanma oluşun derinliğine ve bazı durumlarda genişliğine de bağlı.

Hücrelerin bu davranış biçimi, Şekil 4'de göreceğimiz gibi hücre iskeletinin yeniden şekillenmesi ile açıklanabilir.

Hücrelerin nanodesenli yüzeylerdeki davranışlarına bakacak olursak, yüzeyinde 300 nm aralıklarla 100 nm'lik dikey kabartmalar bulunan polikaprolakton (biyoyoumlu ve biyobozunur bir polimer) ile yapılan bir çalışmada, epitenon (tendon) hücrelerinin nano-yapılara sahip bu yüzeyi tercih etmediği ve hücrelerin yüzeye yaklaşmalarına rağmen yüzeyle temaslarının gerçekleşmediği gözlemlenmiştir. Bu sonuç stentler ve yapay damar sistemleri gibi özellikle hücre yapışmasının istenmediği implantların geliştirilmesinde oldukça önemli. Tabii ki ilk akla gelen soru, hücrelerin nano-yapılara niçin bu şekilde cevap verdikleri. Bu sorunun cevabı nano topografiye sahip yüzeylerde hücre yapışması için gerekli kuvvetli etkileşimin sağlanamaması ya da daha az bir ihtimalle, nano topografinin yüzey kimyasını da etkilemiş olması olarak düşünülebilir de henüz kesinlik kazanmış değil.

Şekil 7. Soft-litografik tekniğin şematik gösterimi (mikrokontakt baskılama). Teknikte kullanılan PDMS kalıp klasik fotolitografik ile hazırlanır. Hücre dışı matris proteinleri veya aktif biyosinyal moleküller ile yüklenen mikrodeseznelere sahip olan kalıp hücreler için uygun olan biyomalzeme ile etkileştirilir ve kalıptaki aktif moleküller kontrollü bir geometride biyomalzeme yüzeyi üzerine aktarılır.





Şekil 8. Mikrokontakt baskılama ile mikrodeseleme tekniğinin şeması.



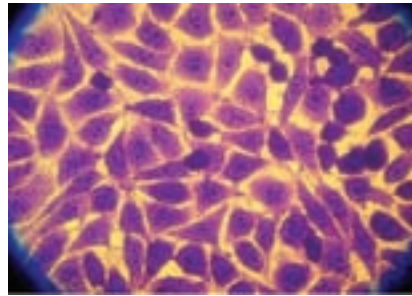
Şekil 9. Mikroakış kanalları ile mikrodeseleme tekniğinin şematik görünümü.

Yüzey Kimyasının Etkisi

Hücreler için buldukları ortamın topografisi ve fiziksel mikroçevresi kadar yüzey kimyası da önemli. Hücre dışı matriste bulunan ve hücre yapışmasını destekleyen arjinin-glisin-aspartik asit (RGD) gibi peptid dizilerinin sentetik malzemeler ile birleştirilerek yüzeylerin hücre yapışması için çekici hale getirilmesi mümkün. RGD peptidi, bir yüzey üzerine tutuklandığında ligand görevi görür ve hücre üzerindeki reseptörler (integrinler) ile etkileşimi sağlar. Hücrenin yüzeye tutunmasıyla başlayan bu etkileşim, hücrenin yayılması ve hücre iskeletinin organizasyonu ile devam eder ve sonuçta etkin yapışma (fokal yapışma) gerçekleşir.

Sentetik malzemeler ile birleştirildiğinde hücre davranışlarını etkileyen

bir diğer biyosinyal molekül grubu ise büyüme faktörleri. Dokuların büyüme ve gelişiminden sorumlu olan oligopeptid yapısındaki bu moleküller, hücre yüzeyindeki almaçlara bağlanarak hücre bölünmesi ve farklılaşmasını doğrudan harekete geçirirler. Hücrelere yayılabilen bu moleküller yüzeylere üzerine tutuklanarak kontrollü bir şe-



Şekil 10. Hücre kültür kabında yayılmış olan L929 fare fibroblast hücrelerin Giemsa ile boyanarak elde edilmiş olan mikroskop görüntüsü.

kilde ortama salınmaları sağlanabilir. Literatürde tanımlanmış olan 130 adet büyüme faktörünün içinde üzerinde en çok araştırma yapılan büyüme faktörlerinden biri de epidermal büyüme faktörü (EGF). EGF'nün embriyonik ve doğumu izleyen aşamada dişlerin çıkması, gözlerin açılması ve deri oluşumundaki etkilerinin yanısıra, özellikle epitel hücreler üzerinde pekçok etki gösterdiği bilinmektedir. Sözü geçen bu biyolojik molekül gruplarının sentetik veya doğal malzemeler ile birarada kullanılmaları durumunda hücrelerin doğal mikroçevresindeki kimyasal özellikler yapay ortamlara taşınabilir ve hücre yapışması ve üremesi kontrol edilebilir.

Ne var ki, biyolojik moleküllerin malzeme yüzeyine tutuklanmasında kullanılan klasik yöntemlerle, bu moleküllerin yüzey üzerindeki dağılımlarını

Yüzeylerin Mikro/Nano Desenlenmesinde Kullanılan Teknikler

Fotolitografi

Fotolitografi, mikroelektronik endüstrisinde yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Temel olarak, ışığa duyarlı bir malzemenin (fotorezist) yüzey üzerine kaplanması ve daha sonra deseni önceden belirlenmiş bir fotomaske üzerinden ultraviyole ışını (UV) uygulanmasıyla, maske deseninin yüzey üzerinde elde edilmesi esasına dayanmaktadır. Oluşturulan desenli yüzey üzerine biyolojik moleküllerin kaplanmasıyla biyodesenli yüzeyler elde edilir. Hücreler, yüzeyler ile etkileştiklerinde biyodesenli bölgeleri tercih ederler ve böylelikle yüzeyler üzerinde desenlenmiş hücreler elde edilir. Yüzeylerin mikrodeselelenmesinde kullanılan oldukça gelişmiş bir teknik olmasına rağmen, "temiz oda" koşullarına ihtiyaç duyulması beraberinde bazı dezavantajları getirmektedir. Biyolojik çözeltiler, mikroelektronik teknolojisi için hazırlanan temiz oda koşullarını bozmaktadır. Ayrıca desenlerin elde edilmesinde kullanılan kimyasallar, hücreler için toksik özellik göstermekte ve pek çok malzemenin yığın yapısına da zarar vermektedir. Kullanılan maskeler mikroelektronik teknolojisi için özel olarak geliştirilen kuantz-krom maskelerdir.

Fotokimyasal Mikrofabrikasyon

Bu teknikte, yüzeylere tutuklanacak biyolojik moleküller öncelikle fotoreaktif özellik taşıyan bir molekül ile reaksiyona sokulur. Yüzeylere tutuklama işlemi klasik fotolitografide kullanılan ku-

artz-krom fotomaske varlığında UV ışını kullanılarak gerçekleştirilir. Maskenin altında yüzeyin ışın gören bölgelerinde (kuartz bölgeler) reaksiyon oluşur ve biyosinyal moleküllerin aktif olarak yüzeye tutuklanması litografik olarak gerçekleşir.

Soft Litografi

Fotolitografik tekniklerin dezavantajlarını ortadan kaldırmak amacıyla geliştirilmiş olan tekniklerdir. Yüzeylerde mikrodeseleli bölgelerin oluşturulmasında yumuşak, biyoyumlu ve optik geçirgenlik özelliklerine sahip polidimetil siloksan (PDMS) kalıplar kullanılmaktadır. Klasik fotolitografi kullanılarak hazırlanan mikrodeseleli bu kalıplar biyolojik moleküllerin yüzeye mikrodeseleli olarak aktarılmasını sağlamaktadır. Soft litografik teknikler uygulamadaki farklılıklarına göre başlıca iki grupta toplanır: mikrokontakt baskılama ve mikroakış kanalları.

Uygulamada en sık karşılaşılan mikrokontakt baskılama tekniği, PDMS kalıpların ve yüzey üzerinde kendiliğinden organize olabilen moleküllerin (self-assembling monolayers) kullanıldığı tekniklerdir. Moleküllerin yüzey ile etkileşebilmesi için, kullanılacak malzeme yüzeyi önce altın ile kaplanmaktadır. Yüzey üzerinde tek tabaka halinde organize olan ve aktif gruplar oluşturan moleküller ise alkanetiol molekülleridir. Mikrodeseleli PDMS kalıplara emdirilmiş olan bu moleküller altın kaplı yüzeye temas ettirildiğinde tiol uçları sadece kalıbın mikrodeselelerinin bulundu-

ğu kısımlarda yüzeydeki altın ile etkileşir. Bu yöntemle elde edilen mikrodeseleli aktif gruplar üzerine biyolojik moleküller tutturularak biyodesenli yüzeyler hazırlanır.

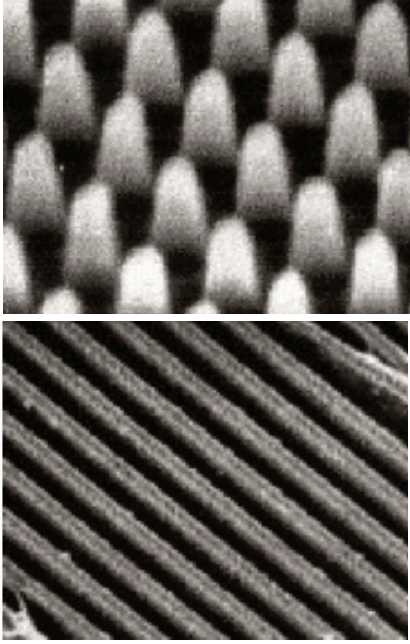
Mikroakış kanalları ile desenleme yönteminde ise; üç boyutlu mikrodeseleli PDMS kalıp malzeme yüzeyi ile temas ettirilir ve yüzey ile kalıp arasında mikrokanalların oluşturulması sağlanır. Yüzey üzerine mikrodeseleli olarak yerleştirilmek istenen biyolojik moleküllerden oluşan çözelti, bu mikroakış kanallarından geçirilir ve yüzeye temas ettiği mikrokanal bölgelerinde yüzeye tutuklanma gerçekleşir.

Lazer Işınları ile Desenleme

Bu teknikte biyomalzeme olarak kullanılacak yüzey üzerine bakırdan hazırlanan ve mikrodeselelere sahip bir maske yerleştirilir. UV-lazer ışınlarının maske üzerinden uygulandığı bölgelerde yüzeyden moleküller düzeyde kopmalar meydana gelmekte ve böylelikle yüzey üzerinde farklı topografiye sahip mikrodeseleli bölgeler elde edilmektedir.

Plazma İle Desenleme

Plazmanın (maddenin 4. hali, yani iyonlaşmış gaz hali) kullanıldığı mikrodeseleme çalışmalarında, yüzey üzerinde farklı topografi ve kimyasal özelliklere sahip mikrodeseleli bölgelerin elde edilmesi amacıyla plazma uygulaması nikel bir maske varlığında gerçekleştirilir.

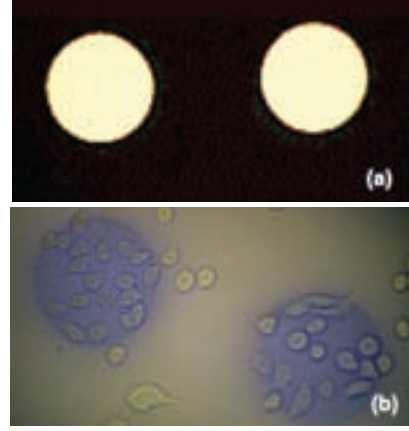


Şekil 11. Hücrenin yapışma ve yayılmasını etkileyecek mikro/nanodesenlere örnekler, (a) silikon yüzey üzerinde 80 nm eninde, 180 nm yüksekliğindeki kabartılar, (b) 7 µm genişliğinde ve 3 µm derinliğinde oluklar.

kontrol edemiyoruz. Mikrofabrikasyon teknolojisinin ve nanoteknolojinin sunduğu teknikler ya da bunlardan esinlenerek geliştirilen yöntemler yardımıyla, biyolojik molekülleri kontrolü bir geometride yüzeyler üzerine yerleştirmek ve dolayısıyla hücre davranışlarını kontrol etmek mümkün. Sentetik veya doğal polimerlerin topografik olarak desenlenmesinde kullanılan fotokimyasal tekniklerin, bu yüzeylerin biyosinyal moleküllerle desenlenmesinde de kullanılabileceğini görüyoruz. Klasik fotolitografik teknikle kıyaslandığında, polimerin yığın yapısına zarar verebilecek kimyasalların kullanılmaması ve kolay uygulanabilmesi, fotokimyasal mikrofabrikasyon tekniği için önemli avantajlar.

Yarı iletken endüstrisinde kullanılan mikrofabrikasyon teknolojilerinden yola çıkarak geliştirilen teknikler arasında önemli yeri olan diğer teknikler soft-litografik tekniklerdir. Soft-litografik teknikler, birçok doku kültür malzemesine uygulanabilen kolay tekniklerdir. Klasik fotolitografi ile kıyaslandığında, biyomalzeme üzerindeki uygulamanın kolay olması, biyolojik molekülleri etkileyecek kimyasalların kullanılmaması ve maliyetlerin düşük olması gibi avantajlara sahip tekniklerdir.

Biyolojik moleküllerin desenlenmesindeki en önemli potansiyel avantaj, yüzey üzerinde hücre tipine özgü bölgeler oluşturulabilmesi ve yüzeyler üzerinde çoklu hücre sistemlerinin hazırlanabilmesi. Dezavantaj ise, hücrelerin bu bölgeler üzerine tutunduktan sonra proteolitik enzimler (protein ya-



Şekil 12. (a) Fotokimyasal mikrofabrikasyon tekniğinde kullanılan fotomaske. Açık renk bölgeler UV ışının geçtiği 100 µm çapındaki kuartz bölgeler, koyu renk ise maskenin kromla kaplı bölgeleridir, (b) Fotokimyasal mikrofabrikasyon tekniği kullanılarak hücre yapışmasını arttıran RGDS biyosinyal moleküllerinin kitosan yüzeylere mikrosesneli biçimde tutuklanması (koyu renk bölgeler) ve RGDS tutuklanmış bu bölgelerde L929 fare fibroblast hücrelerinin yapışma davranışı. Hücreler biyosinyal moleküllerin bulunduğu mikrosesnelere yapışmayı tercih etmiş ve bu bölgeler üzerinde yoğunlaşmıştır (A. Karakeçili, Doktora Tezi, 2006).

pısını parçalayan) gibi çeşitli proteinleri salgılamaları ve biyolojik desenlerin bu salgılardan etkilenerek ortadan kalkması, yani topografik desenlere göre ömrünün kısa olması.

Britland isimli bilim adamı tarafından 1996 yılında yapılan bir çalışmada, hücrelerin kimyasal ya da topografik yapılara olan cevaplarının karşılaştırılması olarak incelenmesi amacıyla hücre kültürleri hem topografik, hem de biyolojik desenler içeren silikon yüzeylerde gerçekleştirilmiş. 500 nm'den küçük olan oluk derinliklerinde hücre davranışına biyolojik moleküllerin etkileri hakim olurken, daha büyük derinliklerde topografik etkiler üstün gelmiş.

Desenli yüzeyler üzerinde gerçekleştirilen çeşitli araştırmalarda hücrenin yayılma davranışının üreme ve farklılaşma davranışlarını etkilediği gözlenmiştir. Mezenkimal kök hücreleri ile yapılan çalışmalarda, desenli yü-

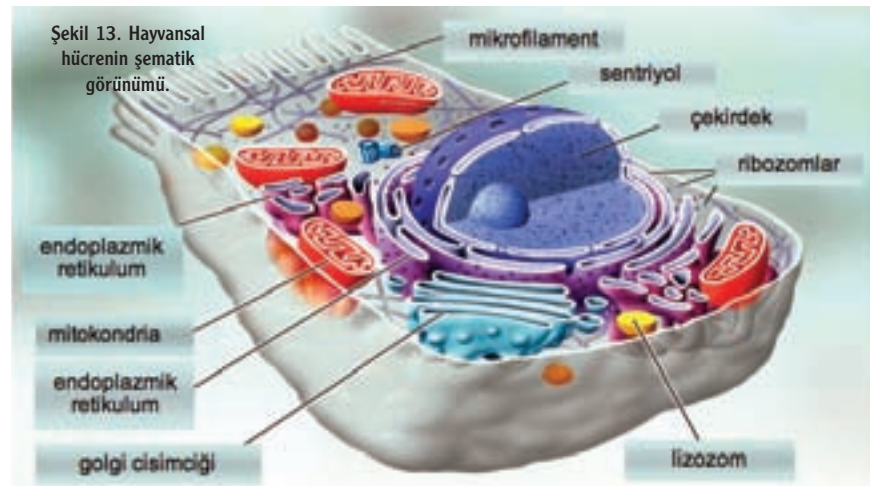
zeylerde hücre yapışma ve yayılma geometrisinin kontrol edilmesi ile farklılaşma gösteren kök hücreler kemik, yağ, kas ve kıkırdak gibi değişik dokulara dönüşmüş. Hücre şekline ya da yayılmasına verilen bu farklı hücresel cevapların hücre iskeletindeki kuvvetler ve hücre dışı matris etkileşimleri ile değiştiği sonucuna varılmıştır. Tüm bu araştırmalar, hücrenin yapışma davranışı ile hücre içi mekanik yapı arasında anlaşılması güç bir bağ olduğunu gösteriyor. Hücrenin yüzey üzerindeki şeklinin kontrolü en çok üreme ve farklılaşmayı etkilese de, protein salımı üzerinde de etkili olduğu kesin. Hücre şekli gibi fiziksel parametreler ile biyokimyasal prosesler arasında nasıl bir ilişki olabileceğini ortaya çıkarmak, araştırma dünyasının öncelikle odaklandığı bir konu. Bu noktada nanoteknoloji ve biyoloji biliminin bir araya gelmesi ile pek çok soru cevap buluyor.

Mikrofabrikasyon teknikleri hücrelerin yapışma davranışları ve hücre yapışması sırasındaki olaylar zincirinin aydınlatılmasında çok yararlı olmakla birlikte, bu tekniklerin kullanımı biyoteknoloji alanında nanotopografinin farklı uygulamalarına da ışık tutacak.

Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioglu
Dr. Ayşe Karakeçili
Hacettepe Üniv., Kimya Mühendisliği Bölümü

Kaynaklar:

1. A. Karakeçili, Mikrosesneli Biyoaktif Malzemelerin Dizaynı, Karakterizasyonu ve Doku Mühendisliği'ndeki Uygulamaları. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, 2006.
2. A. Karakeçili, T. T. Demirtaş, C. Satriano, M. Gümüşderelioglu, G. Marletta, Evaluation of L929 Fibroblast Attachment and Proliferation On RGDS-Immobilized Chitosan in Serum-Containing/Serum-Free Cultures, Journal of Bioscience and Bioengineering, 2007.
3. W. Liu, C. Chen, Engineering Biomaterials To Control Cell Function, Materials Today, 2005.
4. A. Curtis, C. Wilkinson, Nanotechniques and Approaches in Biotechnology, Trends in Biotechnology, 2001.



Şekil 13. Hayvansal hücrenin şematik görünümü.