

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NÖRAL DOKU MÜHENDİSLİĞİ İÇİN
BİYOAKTİF DOKU İSKELELERİNİN
GELİŞTİRİLMESİ VE KÖK HÜCRELER
ÜZERİNDE BİYOLOJİK ETKİLERİN
İNCELENMESİ

Betül MUTLU ÖZÇINAR

DOKTORA TEZİ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Biyomühendislik Programı

Danışman

Prof. Dr. Rabia ÇAKIR

Temmuz, 2025

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NÖRAL DOKU MÜHENDİSLİĞİ İÇİN BİYOAKTİF DOKU
İSKELELERİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE KÖK HÜCRELER
ÜZERİNDE BİYOLOJİK ETKİLERİN İNCELENMESİ**

Betül MUTLU ÖZÇINAR tarafından hazırlanan tez çalışması 09.07.2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı, Biyomühendislik Programı **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Rabia ÇAKIR
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Rabia ÇAKIR, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Cem Bülent ÜSTÜNDAĞ, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Mehmet Burçin PİŞKİN, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Serap YEŞİLKIR BAYDAR, Üye
İstanbul Gelişim Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Songül ULAĞ, Üye
Marmara Üniversitesi

Danışmanım Prof. Dr. Rabia ÇAKIR sorumluluğunda tarafımca hazırlanan “Nöral Doku Mühendisliği İçin Biyoaktif Doku İskelelerinin Geliştirilmesi Ve Kök Hücreler Üzerinde Biyolojik Etkilerin İncelenmesi” başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Betül MUTLU ÖZÇINAR

İmza



Bu çalışma, “Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü’nün FDK-2022-4849” numaralı projesi ile desteklenmiştir.



Aileme
ve
eşime

TEŞEKKÜR

Öncelikle tez çalışmam boyunca gösterdiği destek, rehberlik ve değerli yorumları için danışmanım değerli Hocam Sayın Prof. Dr. Rabia ÇAKIR' a içten teşekkürlerimi sunmak istiyorum. Kendisi bana güvenerek çok sayıda çalışmada yer almamı sağladı ve hem akademik hayatıma hem de kişisel hayatıma büyük anlamlar kattı. Onun teşviki ve desteği olmadan bu süreci tamamlamam mümkün olmazdı. Tezimin her aşamasında desteğine başvurduğum, laboratuvarının imkanlarını büyük bir özveriyle kullanmama izin veren çok değerli hocam Prof. Dr. Cem Bülent ÜSTÜNDAĞ' a teşekkürlerimi sunmak isterim. Tez izleme sürecinde desteğini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Serap YEŞİLKIR BAYDAR' a teşekkürlerimi sunarım. Biyomühendislik Bölümünün tüm imkanlarını kullanmama izin veren Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. Mehmet Burçin PİŞKİN'e teşekkürlerimi sunarım. Her türlü teknik ve laboratuvar desteğini sağlayan, değerli arkadaşlarım Dr. Öğr. Üyesi Benan İNAN ve Dr. Anıl Tevfik KOÇER'e, Dr. Emre KARADUMAN'a ve Dr. Damla GÖKKAYA ÖZBURUN'a ayrıca şükranlarımı sunuyorum. Akademik ve kişisel hayatımda çok önemli bir yeri olan, her türlü zorluğu beraber aşamaya çalıştığımız, Arş. Gör. Ayça ASLAN ARAS'a teşekkürlerimi ayrıca sunmak istiyorum. Bana her ihtiyacım olduğunda yardım edip ve beni motive eden, beni her konuda destekleyen sevgili eşim Dr. Berk ÖZÇINAR'a sonsuz teşekkürler. 6 yıllık bu uzun süreçte sevgili aileme maddi ve manevi destekleri ve sabırları için teşekkür etmek istiyorum.

Ayrıca doktora programına başlamamı ve burs desteğini sağlayan 100/2000 Doktora Burs Programı için Yükseköğretim Kurulu Başkanlığına ve bursiyeri olduğum 2211/A Yurtiçi Doktora Burs Programı için TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı'na (BİDEB) teşekkürlerimi sunarım.

Betül MUTLU ÖZÇINAR

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	x
KISALTMA LİSTESİ	xi
ŞEKİL LİSTESİ	xii
TABLO LİSTESİ	xiv
ÖZET	xv
ABSTRACT	xvii
1 GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı	6
1.3 Hipotez	7
2 GENEL BİLGİLER	9
2.1 Nöral sistemin Yapısı ve Rejenerasyon Yeteneği	9
2.1.1 Sinir Sistemi	9
2.1.2 Periferik ve Merkezi Sinir Sisteminde Rejenerasyon	11
2.1.3 Sinir Hasarlarında Mevcut Tedaviler	15
2.2 Nöral Doku Mühendisliği	16
2.2.1 Nöral Doku Mühendisliği için Doku İskeleleri	17
2.2.2 Nanofibröz Doku İskeleleri	22
2.2.3 Fonksiyonelleştirilmiş Nanofibröz İskeleler	26
2.3 Sinir Doku Mühendisliğinde Kullanılan Hücre Kaynakları	30
2.3.1 Adipoz Dokusu Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler	32
2.4 Biyoaktif Moleküller	33
2.4.1 2-aminoetansülfonik asit, Taurin	33
2.4.2 Tenasin C Türevli VSWRAPTA Biyoaktif Peptiti	33
3 DENEYSEL YÖNTEMLER	37

3.1	Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler.....	37
3.1.1	Kullanılan Cihazlar	37
3.1.2	Kullanılan Kimyasallar	37
3.1.3	Kullanılan Hücreler	38
3.2	Taurine Eklenmiş PVA/Kitosan Nanofibröz Doku İskelelerinin Üretimi .	38
3.2.1	Elektroeğirme Çözeltilerinin Hazırlanması	38
3.2.2	Taurin Yüklü Poli (Vinil Alkol)/Kitosan Nanofiberlerinin Üretimi	39
3.2.3	PVA/Kts/Trn Elektroeğrilmiş Nanofiböz Doku İskelelerinin Mikro Yapısı	39
3.2.4	Kimyasal Yapı İncelemesi	40
3.2.5	Yüzey Hidrofilitesi ve Şişme Özelliklerinin Belirlenmesi	40
3.2.6	Mekanik Özellikler	40
3.2.7	Taurin Sitoksisitesi ve Nanofibröz İskelelerin Sitouyumluluğu	41
3.2.8	Nanofibröz İskelelerin Hücre Proliferasyonu Üzerindeki Etkisi	42
3.3	Peptit ile Yüzey Fonksiyonelleştirilmiş Nanofibröz Doku İskelelerin Üretimi ve Karakterizasyonu	42
3.3.1	VSWRAPTA Biyoaktif Peptiti ile PVA/Kts ve PVA/Kts/Trn Nanofibröz Doku iskelelerinin Fonksiyonelleştirilmesi	42
3.3.2	Fonksiyonelleştirilen Nanofibröz Doku iskelelerindeki Peptit Miktarının Belirlenmesi	43
3.3.3	Peptit ile Fonksiyonelleştirilmiş Nanofibröz Doku İskelelerin Karakterizasyonu	44
3.4	Fonksiyonelleştirilmiş Nanofibröz Doku İskelelerinin Kök Hücreler Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi	44
3.4.1	Mezenkimal Kök Hücre Kültürü	45
3.4.2	Biyoaktif Maddelerin Sitotoksisitesinin İncelenmesi	45
3.4.3	Biyoaktif Maddelerin Hücre Göçü Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi (Çizik Testi)	45
3.4.4	Mezenkimak Kök Hücrelerin Nöral Farklılaştırılması ve Biyoaktif Maddelerin Farklılaşmaya Etkisi	46

3.4.5 İmmunohistokimyasal Boyama	47
3.4.6 Fonksiyonelleştirilmiş İskelelerinin AD-MKH'ler için Sitouyumluluğu ve Proliferasyona Etkileri	47
3.4.7 Hücre Yapışmasının İncelenmesi	48
4 BULGULAR VE TARTIŞMA	49
4.1 Taurin Yüklü PVA/Kts Doku İskelelerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu	49
4.1.1 Nanofibröz İskelelerin Mikro Yapısı	49
4.1.2 FT-IR Spektroskopisi ile Kimyasal Yapı Analizi	51
4.1.3 Taurin Yüklü Nanofibröz İskelelerin Islanabilirlik ve Şişme Özellikleri	52
4.1.4 Nanofibröz İskelelerin Mekanik Özellikleri	53
4.1.5 Taurin ve İskelelerin Sitouyumluluğu	54
4.1.6 Nanofibröz İskelelerin Hücre Proliferasyonu Üzerindeki Etkileri	56
4.2 Peptit ile Yüzey Fonksiyonelleştirilmiş Nanofibröz Doku İskelelerinin Üretimi ve Karakterizasyonu	57
4.2.1 Fonksiyonelleştirilmiş İskelelerin Mikro Yapısı	57
4.2.2 Nanofibröz İskelelere Bağlanan Peptit Miktarları	61
4.2.3 FT-IR ile Kimyasal Etkileşimler	62
4.2.4 Şişme ve Biyobozunma Özellikleri	63
4.3 Kök Hücreler Üzerindeki <i>In Vitro</i> Etkiler.....	64
4.3.1 Peptit Sitotoksitesi	64
4.3.2 Taurin ve Peptitin Hücre Göçü Üzerindeki Etkileri	65
4.3.3 AD-MHK'lerin Nöral Farklılaşma Potansiyelleri ve Aktif Maddelerin Farklılaşmaya Etkileri	66
4.3.4 İmmunohistokimyasal Analiz	68
4.3.5 Fonksiyonelleştirilen İskelelerin Sitouyumluluğu	71
4.3.6 Fonksiyonelleştirilen İskelelerin Hücre Çoğalması Üzerindeki Etkileri	

4.3.7 Hücre Tutunması	72
5 SONUÇ	74
KAYNAKÇA	76
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	91



SİMGE LİSTESİ

cm ⁻¹	Dalga sayısı
°C	Derece santigrat
g	Gram
h/h	Hacim/hacim
CO ₂	Karbondiyoksit
MPa	Megapaskal
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
Mw	Molekül ağırlık
M	Molar
nm	Nanometre
cm	Santimetre
cm ²	Santimetre kare
NaOH	Sodyum hidroksil
%	Yüzde

KISALTMA LİSTESİ

AD-MHK	Adipoz Doku Mezenkimal Kök Hücreleri
ATRA	All Trans Retinoik Asit
ATTC	Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
BCA	Bisinkoninik asit
BSA	Sığır Serum Albumin
DAPI	6-diamidino-2-fenilindol
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
EDC	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid
ESM	Ekstraselüler matris
FBS	Fetal Sığır Serumu
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Infrared Spektroskopisi
Kts	Kitosan
MHK	Mezenkimal Kök Hücre
NHS	N-Hidroksisüksinimid
NHK	Nöral Kök Hücre
PVA	Polivinil alkol
RGD	Arg-Gly-Asp
SD	Standart Sapma
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SVZ	Subventriküler zone
TnC	Tenascin C
TS	Tensile strength

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	Sinir sisteminde hücre tipleri.....	10
Şekil 2.2	Yaralanmalardan sonra rejenerasyon mekanizmaları a) PSS’de nörorejenerasyon b) MSS’de nörorejenerasyon.....	13
Şekil 2.3	Nöral doku mühendisliğinin temel bileşenleri	16
Şekil 2.4	a) Elektroegirme düzeneğinin şematik gösterimi b) Taylor koni oluşumunun şematik gösterimi	23
Şekil 2.5	Kitosan (Kts) ve polivinil alkol (PVA) polimer zincirleri arasındaki moleküller arası hidrojen bağlar	25
Şekil 2.6	Tenascin C protein yapısı a) TnC altıkollu yapısı b) VSWRAPTA peptiti kimyasal yapısı	35
Şekil 3.1	Doku analizatör cihazında uygulanan çekme testi	41
Şekil 3.2	PVA/Kts nanofibröz iskelelerin VSWRAPTA peptite ile işlevselleştirilmesi a) EDC/NHS ile peptit bağlanma reaksiyonu b) Doku iskelelerinin peptit ile inkübasyonu c) İnkübasyon sonrası doku iskeleleri.....	43
Şekil 3.3	AD-MKH’lerin nöral farklılaştırma süreci.....	46
Şekil 4.1	Farklı miktarlarda taurin içeren PVA/Kts nanofibröz doku iskelelerinin SEM görüntüleri (a) PVA/Kts (b) PVA/Kts/Trn1% (c) PVA/Kts/Trn5% (d) PVA/Kts/ Trn10% (e) PVA/Kts/ Trn20%.....	50
Şekil 4.2	Taurin ve nanofibröz matların FT-IR spektrumları.....	52
Şekil 4.3	PVA/Kts nanofibröz matların ıslanabilirlik ve şişme özellikleri. a) Nanofibröz matların yüzey temas açısı. b) Nanofibröz matların şişme derecesi	53
Şekil 4.4	Taurinin SH-SY5Y hücreleri üzerindeki sitotoksitesi.....	55
Şekil 4.5	Taurin yüklü nanofibröz matların SH-SY5Y hücreleri üzerindeki dolaylı sitotoksik aktivitesi	56
Şekil 4.6	Taurin yüklü nanofibröz matların SH-SY5Y çoğalması üzerindeki etkisi	57
Şekil 4.7	NaOH ile nötralizasyon sonrası nanofiber morfolojisi a) PVA/Kts b) PVA/Kts/Trn	58
Şekil 4.8	PVA/Kts-VSWRAPTA nanofibröz doku iskelelerinin mikroyapıları a) PVA/Kts çagraz bağı c) Peptit modifikasyonu sonrası mikroyapı (b) ve (d) 20000 büyütmedeki görüntüler.....	59

Şekil 4.9	PVA/Kts/Trn-VSWRAPTA nanofibröz doku iskelelerinin mikroyapıları a) PVA/Kts çağraz bağlı b) Peptit modifikasyonu sonrası mikroyapı.....	60
Şekil 4.10	Fonksiyonelleştirme sonrası ortalama fiber çapı boyut dağılımları ...	60
Şekil 4.11	VSWRAPTA peptinin konsantrasyon eğrisi.....	61
Şekil 4.12	İşlevselleştirilen nanofibröz iskelelerdeki peptit miktarı	62
Şekil 4.13	Peptit ve nanofibröz iskelelerin FT-IR spekrumu	63
Şekil 4.14	Fonksiyonelleştirilmiş iskelelerin a) şişme yüzdeleri b) bozunma oranları	64
Şekil 4.15	a) VSWRAPTA peptinin mezenkimal kök hücreler üzerindeki sitotoksik aktivitesi b) 150 µg/mL peptit ile muamele edilmiş hücrenin mikroskop görüntüsü	65
Şekil 4.16	Çizik testi ile farklı gruplarda hücre migrasyonu ve yara iyileşmesinin zamana bağlı değerlendirilmesi	66
Şekil 4.17	Ön indüksiyon ortamıyla muamele edilen hücrelerin farklı zaman aralıklarındaki hücre morfolojisindeki değişimler.....	67
Şekil 4.18	Ön indüksiyon ortamı sonrası nöral farklılaşma ortamıyla muamele edilen hücrelerin farklı zaman aralıklarındaki görüntüleri a) Nöral indüksiyondan sonraki 3. gün b) 5. Gün c) 7. Gün ve d) 10. Gün	67
Şekil 4.19	Kontrol, taurin, peptid ve taurin+peptid gruplarında kültürlenmiş hücrelerin faz kontrast (sol) ve floresan mikroskop (sağ) görüntüleri	70
Şekil 4.20	Nanofibröz iskelelerin ekstraksiyon metodu ile incelenen dolaylı sitotoksik sonuçları	71
Şekil 4.21	Nanofibröz iskelelerin 7 günlük kültür süresinde AD-MKH'lerin hücre çoğalması	72
Şekil 4.22	İskele üzerinde kültürlenmiş hücrelerin DAPI boyaması.....	73

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 MSS ve PSS'nin rejeneratif özelliklerin karşılaştırılması.....	14
Tablo 2.2 Elektroegirme yönteminde lif morfolojisine ve boyutlarına etki eden parametreler	23
Tablo 3.1 Çalışma solüsyonlarındaki taurin oranları ve örnek kodları.....	39
Tablo 4.1 Nanofibröz doku iskelelerinin ortalama fiber çapları.....	51
Tablo 4.2 Trn dahil edilmiş iskelelerin mekanik özellikleri.....	54
Tablo 4.3 Fonksiyonelleştirilmiş iskelelerin ortalama fiber çapları.....	61

Nöral Doku Mühendisliği için Biyoaktif Doku İskelelerinin Geliştirilmesi ve Kök Hücreler Üzerinde Biyolojik Etkilerin İncelenmesi

Betül MUTLU ÖZÇINAR

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Rabia ÇAKIR

Bu tez çalışmasında, sinir dokuların rejenerasyonunu desteklemek amacıyla, hücre sağ kalımı ve proliferasyonunu artıran, aynı zamanda kök hücre farklılaşmasını destekleyebilecek fonksiyonel nanofibröz doku iskeleleri geliştirilmiştir. Bu kapsamda, biyobozunur, biyouyumlu Polivinil alkol/ Kitosan (PVA/Kts) doku iskeleleri elektroegirme yöntemiyle üretilmiş ve iki farklı biyoaktif ajan ile fonksiyonelleştirme işlemleri gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada, PVA/Kts iskelelere toplam polimer kütlesinin %1 ile %20 oranında olacak şekilde taurin (Trn) dahil edilmiş ve üretilen iskelelerin fiziksel ve kimyasal karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen karakterizasyon testlerinin sonuçlarına göre %1 Trn içeren PVA/Kts nanofibröz iskelelerin mekanik, şişme ve SH-SY5Y hücreleri üzerindeki *in vitro* proliferatif özellikleri açısından en uygun olduğu saptanmıştır. İkinci aşamada ise iskelelerin yüzeyleri, Tenasin C proteinin türevli bir biyoaktif peptit olan VSWRAPTA ile işlevselleştirilmiştir. İşlevselleştirilmiş iskelelerin mikroyapı analizi peptit modifikasyonundan sonra, nanofibröz yapının

korunmuş olduğunu göstermiştir. Trn dahil edilmiş PVA/Kts iskelelerde işlevselleştirme sonrası ortalama fiber çapları $279,01 \pm 57,7$ 'den $388,1 \pm 106,6$ nm'ye bir artış göstermiş ve fiberlerde pürüzlülüğüne neden olmuştur. Peptitin iskele yapılarına dahil olduğu FT-IR incelemesinde fonksiyonelleştirilmiş iskelelerdeki amin gurubu kaynaklı N-H gerilme bandının azalması ve karbonil gerilme titreşimi bandının genişlemesi ise doğrulanmıştır. Gerçekleştirilen BCA testiyle, PVA/Kts/Trn-VSWRAPTA iskelelerin mg başına $8,58 \pm 1,1$ µg peptit bağlandığı saptanmıştır. Fonksiyonelleştirilmiş nanofibröz iskelelerin *in vitro* çalışmaları adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler (AD-MHK'ler) üzerinde incelenmiş ve peptit fonksiyonel iskelelerin AD-MHK'lerin proliferasyonunu ve hücresel bağlanmayı desteklediği bulunmuştur. Çalışmadan elde edilen bulgular, Trn ve VSWRAPTA ile fonksiyonelleştirmiş nanofibröz iskelelerin, sinir doku mühendisliği uygulamaları için, mezenkimal kök hücrelerin sağ kalımını, proliferasyonu arttırabilecek ve nöronal farklılaşmasını destekleyebilecek bir multifonksiyonel biyoaktif doku iskelesi olarak hizmet edebileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Nöral doku mühendisliği, biyoaktif doku iskelesi, nanofiber, taurine, biyoaktif peptit

ABSTRACT

Development of Bioactive Tissue Scaffolds for Neural Tissue Engineering and Investigation of Biological Effects on Stem Cells

Betül MUTLU ÖZÇINAR

Department of Bioengineering

Doctor of Philosophy Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Rabia ÇAKIR

In this thesis, functional nanofibrous tissue scaffolds that enhance cell survival and proliferation and can also support stem cell differentiation were developed to support neural tissue regeneration. In this context, biodegradable, biocompatible polyvinyl alcohol/chitosan (PVA/Kts) scaffolds were produced via electrospinning and functionalized with two different bioactive agents. In the first stage, taurine (Trn) was incorporated into the PVA/Kts scaffolds at a ratio of 1% to 20% of the total polymer mass, and the physical and chemical characterizations of the produced scaffolds were performed. According to the results of the characterization tests, PVA/Kts nanofibrous scaffolds containing 1% Trn were determined to be the most suitable in terms of mechanical, swelling, and in vitro proliferative properties on SH-SY5Y cells. In the second stage, the scaffold surfaces were functionalized with VSWRAPTA, a bioactive peptide derived from the Tenascin C protein. Microstructural analysis of the functionalized scaffolds showed that the nanofibrous structure was preserved after peptide modification. In the PVA/Kts scaffolds incorporating Trn, the average fiber diameter increased from 279.01 ± 57.7 to 388.1 ± 106.6 nm after functionalization, resulting in roughness in the fibers.

FT-IR examination confirmed the incorporation of the peptide into the scaffolds by reducing the amine group-induced N–H stretching band and broadening the carbonyl stretching vibration band in the functionalized scaffolds. BCA assays revealed that PVA/Kts/Trn–VSWRAPTA scaffolds bound $8.58 \pm 1.1 \mu\text{g}$ of peptide per mg. In vitro studies of functionalized nanofibrous scaffolds were conducted on adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (AD-MSCs), and the peptide-functionalized scaffolds were found to support the proliferation and cellular attachment of AD-MSCs. The findings from the study indicate that nanofibrous scaffolds functionalized with Trn and VSWRAPTA can serve as multifunctional bioactive scaffolds for neural tissue engineering applications, enhancing the survival and proliferation, and promoting the neuronal differentiation of mesenchymal stem cells.

Keywords: Neural tissue engineering, bioactive scaffold, nanofiber, taurine, bioactive peptide

1.1 Literatür Özeti

Merkezi veya periferik sinir sistemlerindeki hasarlar, bilişsel veya sensörimotor yeteneklerin kaybına yol açan, hala etkili bir tedavisi olmayan ve hastaların yaşam kalitesini büyük ölçüde etkileyen en önemli sağlık sorunlarının başında gelmektedir. Travmatik beyin hasarı (TBH), iskemik inme, omurilik hasarları ve travmatizmalar ve periferik sinir hasarı da dahil olmak üzere diğer nöropatiler merkezi sinir sistemi ve periferik sinir sistemi hastalıkları dünya çapında sağlık sistemine bir yük oluşturmaktadır (Steinmetz vd. 2024).

Sinir hasarının onarımı, sinir dokusunun rejenerasyon kapasitesinin sınırlı olması ve sinirlerin oldukça farklılaşmış doğası nedeniyle uzun zamandır halen önemli bir klinik ve bilimsel bir zorluk teşkil etmektedir (Chen, Cohen, ve Hallett 2002; Erichsen 1997). Sinir hasarlarının tedavisinde yaygın olarak başvuru geleneksel yöntemler arasında sinir uçlarının doğrudan birleştirilmesi (dikiş), sinir dokusu nakli (greft) ve sinir yönlendirme yapıları (kanallar) bulunmaktadır. Ancak bu yaklaşımlar, çeşitli yapısal ve fonksiyonel sınırlamalar nedeniyle her durumda istenen iyileşmeyi sağlayamamaktadır. Uçtan uca sinir dikişi, kısa defekt aralıklarına sahip sinir yaralanmalarıyla sınırlıdır. Periferik sinir hasarlarının onarımında en etkili tedavi yöntemi otolog sinir greftleridir. Ancak, sınırlı donör doku temini, ek cerrahi müdahale gerekliliği ve ikincil komplikasyonlar (örneğin enfeksiyon riski, ağırlı nöroma oluşumu ve donör bölgede fonksiyon kaybı) gibi önemli kısıtlamalar bulunmaktadır (Harhaus vd. 2024; Hussain vd. 2020). MSS hasarlarında ise, MSS aksonları, doğası gereği sınırlı bir rejenerasyon kapasitesine sahiptir ve yerel bir engelleyici ortamla çevrilidirler (Curcio ve Bradke 2018). MSS’de nöronal popülasyonların ve sinaptik bağlantıların kaybı, olgun nöronların

sınırlı büyüme kapasitesi nedeniyle geri döndürülemezdir (Baldwin ve Giger 2015). Bu sebeple merkezi sinir sistemi hasarlarının etkili bir tedavisi seçeneği bulunmamakta, mevcut klinik tedaviler ikincil hasarların önlenmesine yönelik ilaç tedavilerini içermektedir (Lee, Ryu, ve Vig 2019; Tsai vd. 2024).

Sinir rejenerasyonundaki son gelişmeler, doku mühendisliği prensiplerinin uygulanmasını içermiş ve bu da nöral terapiye yeni bir bakış açısı getirmiştir. Sinir/nöral doku mühendisliğinin temel amacı, hücre dışı matrisin biyolojik ve yapısal özelliklerini taklit eden, üç boyutlu hücre kültürlerine uygun bir doku iskelesi oluşturarak hücresel süreçleri yönlendirmektir (Zhang vd. 2014). Nöral doğal hücre dışı matrisi, sinir hücrelerinin yapışması ve çoğalmasına ilişkin topografik, elektriksel ve kimyasal ipuçları için ideal bir ortam sağladığından, nörit büyümesini destekleyen, biyouyumlu, immünojenik olmayan, yeni doku oluşum sürecinde biyolojik olarak parçalanabilen ve enfeksiyona dirençli olacak bir iskele geliştirmeye ihtiyaç vardır (Subramanian, Krishnan, ve Sethuraman 2009).

Nanofibröz yapılar, hücre dışı matrisin morfolojik özelliklerini taklit edebilme kapasiteleri sayesinde, pek çok biyomedikal uygulamada umut vadeden alternatifler olarak değerlendirilmektedir (Xie vd. 2010). Nanoteknolojideki ilerlemeler ve çok sayıda üretim tekniğinin mevcudiyeti sayesinde nanofiber malzemeler, yüksek gözeneklilik ve yüksek yüzey alanı elde edecek şekilde üretilir. Nanofibröz malzemeler, sahip oldukları yüksek yüzey alanı sayesinde ilaç salımı, doku mühendisliği, yara onarımı ve biyosensör sistemleri gibi çeşitli biyomedikal alanlarda kullanım için elverişli hale gelmektedir (González vd. 2016; Rasouli vd. 2019). Elektroegirme işlemi en yaygın kullanılan çok yönlü bir nanofiber üretim tekniğidir. Avantajları arasında basitliği, maliyet etkinliği ve ayarlanabilir mekanik ve fiziksel özelliklere sahip çekirdek/kabuk veya içi boş rastgele ve hizalanmış nanofiberler üretme kapasitesi yer alır (Keirouz vd. 2023; Sun vd. 2003). Çeşitli sentetik ve doğal malzemelerden çeşitli sinir doku mühendisliği uygulamaları için doku iskelelerinin üretilmesinde kullanılmıştır (Xie vd. 2009; Heidari vd. 2019).

Polivinil alkol (PVA) ve kitosan (Kts) nanofibröz doku iskeleleri, sinir doku mühendisliğinde sinir rejenerasyonunu desteklemek amacıyla umut vadeden biyomalzemelerdir. PVA'nın mekanik esnekliği ve yüksek hidrofilik yapısı, sinir dokusunun yumuşak ve nemli mikro çevresine benzer bir ortam sağlar (Alhosseini

vd. 2012). Kts ise doğal polisakkarit yapısıyla biyouyumludur ve sinir hücrelerinin yapışması, büyümesi ve yönlendirilmesinde önemli rol oynar (Boecker vd. 2019; Du vd. 2014).

Doku mühendisliği bilimiyle, hücrelerin yapıştığı ve çoğaldığı bir ortam sağlamak için geleneksel olarak üç boyutlu, biyomalzeme bazlı yapı iskeleleri kullanılmış ve bu sayede doku yenilenmesinin yolları açılmıştır. İlk nesil iskeleler, hücre ve besin taşınması sağlayabilen gözenekli yapıda, yeni doku oluşumu sırasında biyobozunma gösterebilen ve biyouyumlu malzemeler olarak tasarlanmıştır (Langer ve Vacanti 2016). Hücreler arası matriks yapısının ve hücre-malzeme etkileşimleri üzerine artan bilgiler, doku iskelelerin yalnızca bir büyüme ve çoğalma için yapısal destek olması dışında çeşitli hücresel aktiviteleri de yönlendirebileceği fikrini doğurmuş ve yeni nesil biyoaktif yapı iskeleleri konseptinin uygulanmasını mümkün kılmıştır (Jones 2009). Biyoaktif iskeleleri geleneksel iskelelerden ayıran çevredeki biyolojik çevre ile aktif olarak etkileşime girme, hücresel yapışmayı, çoğalmayı ve farklılaşmayı teşvik etme yetenekleridir (Stratton vd. 2016). Bu etkileşim, in vitro veya in vivo ortamlarda doku oluşumunu, onarımını ve yenilenmesini kolaylaştırmak için çok önemlidir. Biyoaktif iskeleler, polimerlere ek olarak hücresel tepkileri yönlendirmek ve doku yenilenmesini arttırmak için biyoaktif molekülleri (büyüme faktörleri, sitokinler veya peptitler gibi) içerebilmektedir (Nikolova ve Chavali 2019).

Polimerik doku iskelelerinin biyoaktif hale getirilmesi için çeşitli fonksiyonelleştirme stratejileri kullanılmıştır. En kolay ve uygulanabilir yöntem hedef aktif maddenin doku iskelesi yapısına doğrudan dahil edilmesidir (Grinberg vd. 2010). Doğrudan dahil edilen biyoaktif ajanlar kontrollü ve uzun süreli salımla, hücre adezyonu, proliferasyonu, farklılaşması ve dokuya özgü mikro çevrenin yeniden yapılandırılması gibi biyolojik süreçlerin etkin bir şekilde yönlendirilmesine olanak sağlamaktadır (Ji vd. 2011).

Biyoaktif moleküllerle fonksiyonelleştirme stratejilerinden biri de iskelelerin yüzey modifikasyonudur (Goddard ve Hotchkiss 2007). Bu yöntemde, seçilen biyoaktif ajanlar iskele yüzeyine fiziksel adsorpsiyon veya kimyasal bağlama yöntemleriyle immobilize edilerek, hücrelerin yüzeydeki biyolojik sinyallerle doğrudan etkileşimi sağlanmasıdır (Guo vd. 2015). Böylece hücre adezyonu, proliferasyonu ve farklılaşması gibi süreçler hedefe yönelik şekilde modüle edilebilmektedir.

Sinir dokusu mühendisliğinde biyoaktif peptitler, hücre davranışlarını yönlendirmek ve rejeneratif süreci desteklemek amacıyla iskelelerin fonksiyonelleştirilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (Conovaloff vd. 2011; Kakinoki vd. 2011). Kısa peptit dizileri, tüm protein moleküllerine kıyasla daha yüksek kararlılığa sahip olmaları, sentezlerinin daha pratik olması ve sterik engel oluşturma risklerinin düşük olması gibi avantajlarıyla doku iskelelerinde biyoaktivite kazandırılması için ön plana çıkmaktadır. Bu kısa aminoasit dizileri, doğal ekstraselüler matris (ECM) proteinlerinden türetilerek hücrelerin adezyon, proliferasyon, migrasyon ve farklılaşma gibi temel biyolojik süreçlerini taklit eder (Conovaloff vd. 2011). Hücre bağlanma proteinlerinden türetilen, RGD (Arg-Gly-Asp), IKVAV (Ile-Lys-Val-Ala-Val) ve YIGSR (Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg) gibi kısa peptit motiflerinin, nöral hücrelerin iskele yüzeyine adezyonunu artırdığı ve nöronal farklılaşma süreçlerini desteklediği çeşitli çalışmalarda ortaya konmuştur (Sahab Negah vd. 2018).

Sinir sistemindeki yeni moleküler etkileşimlerin aydınlatılması, mevcut peptit motiflerinin ötesine geçilerek, özgün yapı ve fonksiyonlara sahip yeni nesil biyoaktif peptitlerin tanımlanmasına olanak tanımaktadır (Gelain vd. 2012). Bu yaklaşım, özellikle sınırlı rejeneratif kapasiteye sahip sinir dokusu gibi kompleks biyolojik sistemlerde, hedefe yönelik ve etkin biyolojik yanıtların elde edilmesi açısından kritik bir öneme sahiptir. Keşfedilen yeni biyoaktif motifler, belirli hücre tiplerine özgü biyolojik yanıtları tetikleyerek hücre-malzeme etkileşimlerini daha hassas bir şekilde düzenleyebilir (Tsai vd. 2025). Son yıllarda, salgılanan bir hücre dışı matris glikoprotein olan Tenascin C (TnC)'den türetilmiş biyoaktif peptitler sinir doku mühendisliği için dikkat çekmektedir. Literatürde, TnC türevi bir peptit dizisinin, yani VFDNFVLK'nin, tam uzunluktaki TnC proteininin nörit büyümesini başlatma işlevini yeterli şekilde sürdürdüğü gösterilmiştir (Mercado vd. 2004). Bu bulgu, TnC ile dekore edilmiş yapıların sinir dokusu mühendisliğinde kullanılmasının araştırılmasını teşvik etmiş (Sever vd. 2018) ve TnC türevi peptit hidrojenleri ayrıca kök hücre çoğalmasını, göçünü ve nöronal hücre hatlarına farklılaşmasını yönlendirmek için de araştırılmıştır (Sharma, Kaur, ve Roy 2019).

VSWRAPTA, TnC'den türetilen yeni bir biyoaktif peptittir. Yapılan çalışmalar, VSWRAPTA peptitinin embriyonik kortikal nöronların kültürlerine eklendiğinde,

nörit oluşumunu ve nöronların dallanmasını arttırdığı bulunmuştur (Jarocki vd. 2019).

Sinir doku mühendisliğinde, uygun hücre tiplerinin seçimi tedavi başarısı için büyük önem taşır. Pluripotent kök hücreler, yüksek çoğalma ve farklılaşma kapasiteleri nedeniyle tercih edilse de, embriyonik kök hücrelerin etik ve immünolojik sorunları, indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin (iPSC'lerin) ise güvenli üretim ve stabilite gibi teknik zorlukları klinik uygulamaları sınırlamaktadır (Knowlton vd. 2016). Nöral kök hücreler (NKH'ler), kök hücre temelli tedavilerde uygulanacak en ideal kaynak olarak kabul edilir; bununla birlikte, NKH'lerin yetişkin kökenlerinden toplanması zordur, bu nedenle kullanılabilir başka kök hücre kaynaklarına ihtiyaç vardır. Bu nedenle, etkili ve güvenli hücre temelli terapiler için standartlaştırılmış protokollere ihtiyaç vardır (Kim ve de Vellis 2009).

Mezenkimal kök hücreler (MKH), etik sorunlar olmadan erişilebilmesi, bağışıklık reddi oluşturmaması ve tümör riski taşıması nedeniyle tedavide avantaj sağlar. Uzun süre saklanabilir ve çözündükten sonra da özelliklerini korur. Bu yönleriyle güvenli ve stabil bir hücre kaynağıdır. MKH'ler, uygun indüksiyon protokolleriyle çeşitli hücre tiplerine yönlendirilebilmektedir. Bu özellikleri nedeniyle, sinir sistemi hastalıklarında nakil sonrası hasar görmüş hücre popülasyonlarının yenilenmesini destekleyebilecekleri öne sürülmüştür (Margiana vd. 2022).

Adipoz dokudan izole edilen kök hücreler (AD-MKH'ler), erişilebilirliği, yüksek verimle elde edilebilirliği ve otolog hücre nakli için uygun olmaları nedeniyle önemli bir yetişkin kök hücre kaynağı olarak öne çıkmakta olup, günümüzde çeşitli klinik uygulamalarda değerlendirilmektedir. Literatürdeki çalışmalar, AD-MKH'lerin çeşitli glial hücre tipine farklılaşma potansiyeline sahip olduğunu ortaya koymuştur (Faroni vd. 2013; Wei vd. 2010). Literatürdeki çalışmalarda AD-MKH'lerin, β -merkaptoetanol, izobütilmetilksantin, bütillenmiş hidroksianisol, retinoic asit, KCl, valproik asit ve forskolin gibi çeşitli kimyasal indükleyiciler ve büyüme faktörlerini içeren indükleyici ortamlarda, nöronal farklılaşmalar sergilediği de bildirilmiştir.

Hücre nakline ihtiyaç duyan dokular genellikle dejeneratif değişiklikler altındadır ve yaralanmanın yarattığı olumsuz ortam, nakledilen progenitör hücrelerin hayatta kalmasını sınırlayabilir. Bu sebeple yeni geliştirilen doku mühendisliği stratejileri,

implante edilebilir bir doku mühendisliği ürünün elde edilmesine kadar olan süreçte, doku iskelesi üzerindeki kültürlenmiş hücrelerin sağkalımının artırılması, farklılaşma öncesi yeterli sayıda hücrenin elde edilmesi için proliferasyonun desteklendiği ve dokuya özgü farklılaşma sinyalleri ile farklılaşmanın yönlendirebildiği yeni nesil doku iskelelerinin geliştirilmesine ihtiyaç duymaktadır.

Tez çalışmasında, tüm istenilen özellikte doku mühendisliği ürünün geliştirilmesi için farklı biyoaktif moleküllerle, farklı hücresel olayları etkileyebilecek fonksiyonel bir doku iskelesi tasarımı sunulmuştur. Tasarlanan Polivinil alkol/kitosan doku iskeleleri, literatürde de gösterildiği gibi nöral hücre farklılaşmasını destekleyen bir doku iskelesi malzemesi olarak seçilmiştir.

İskele tasarımında, hücre sağkalımının ve kültürlenmiş hücrelerin proliferasyonun desteklenmesi için taurin (Trn) kullanılmış ve üretim sırasında polimerik yapıya dahil edilmiştir. Trn'nin iskeleye yüklenmesin, kontrollü ve uzun salım sayesinde hücre proliferasyonu destekleyeceği düşünülmüştür.

Tasarımın diğer önemli bir noktası ise iskele yüzeylerinin biyoaktif peptitle fonksiyonel hale getirilip hücresel süreçler üzerinde kontrol sağlamaktır. Bu amaçla nöral gelişim ve rejenerasyon süreçlerinde çeşitli görevli olan TnC proteininden türetilmiş, nörit büyümesi üzerinde etkileri bildirilmiş VSWRAPTA peptid motifi yüzeye kimyasal olarak bağlanarak yüzey işlevselleştirilmesi gerçekleştirilmiştir. Bu doğrultuda geliştirilen biyomalzemenin, biyoaktif peptitlerle fonksiyonelleştirilmesi sayesinde, hücre yüzeyindeki çeşitli reseptörlerle etkileşime girerek doğal hücre dışı matriksi daha gerçekçi şekilde taklit etmesi ve böylece hücresel süreçler için gerekli kimyasal sinyalleri sağlaması hedeflenmektedir.

1.2 Tezin Amacı

Bu tezin amacı nöral dokuların rejenerasyonu için kullanılabilecek, hücrelerin sağkalımını ve proliferasyonunu arttırabilecek, farklılaşmasını yönlendirebilecek çeşitli biyoaktif ajanlar içeren nanofibröz yapıda fonksiyonel doku iskelelerinin geliştirilmesi ve hücreler üzerindeki etkilerinin incelenmesidir. Bu amaçla, biyobozunur ve biyoyumlu polivinil alkol (PVA) ve kitosan (Kts) polimerleri bir arada kullanılarak, fonksiyonelleştirilme için kompozit bir nanofibröz polimerik yapı elektroğirme yöntemi ile üretilmiştir. Üretilen nanofibröz doku iskelelerinin

işlevsel hale getirilmesi için iki farklı biyoaktif madde nanofibröz iskelelerin farklı kısımlarına dahil edilmiştir. İlk olarak, antioksidan ve proliferatif etkileri olduğu bildirilen Trn amino asidi farklı oranlarda PVA/Kts nanofibröz iskelelere doğrudan üretim sırasında dahil edilmiş ve hücreler üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu amaçla, Trn'nin doku iskelesi içerisindeki optimum etki eden miktarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Tez çalışmasının ikinci aşamasında, belirlenen en etkili taurin içeren iskele kompozisyonu, nörit oluşumunu ve embriyonik kortikal nöronların dallanmasını arttığı gösterilmiş VSWRAPTA peptiti ile yüzey fonksiyonelleştirilmesi için kullanılmıştır. Bu sebeple tasarlanan iskelenin, hücrelerin sağkalımını arttırırken, farklılaşmayı da nöral soylara yönlendirebilecek işlev görmesi beklenmektedir.

1.3 Hipotez

Doku mühendisliği uygulamalarında başarılı bir doku rejenerasyonu için temel gerekliliklerden biri, hücrelerin hedef doku iskelesine etkin şekilde tutunması, hayatta kalması (sağkalım) ve uygun fenotipe yönelerek farklılaşmasıdır. Ancak hücrelerin iskele ile yeterli biyolojik etkileşim kuramaması, mikroyapısal uyumsuzluklar veya iskele yüzeyinin hücrelere uygun biyokimyasal sinyaller sunamaması gibi faktörler hücre sağkalımını ve proliferasyonunu olumsuz yönde etkileyebilir. Ayrıca, özellikle sinir dokusu gibi yüksek derecede özelleşmiş hücre tiplerinin elde edilmesi için yalnızca hücrelerin hayatta kalması yeterli olmayıp, bu hücrelerin belirli bir soy hattına (örneğin nöronal ya da glial) yönlendirilmesi büyük önem taşır. Bu süreçte iskelelerin yalnızca yapısal destek değil, aynı zamanda hücre farklılaşmasını yönlendirecek biyokimyasal ve biyofiziksel sinyalleri sunan aktif platformlar olması gerekmektedir. Bu nedenle, hücre sağkalımını destekleyen ve aynı zamanda nöral farklılaşmayı teşvik edebilecek fonksiyonel iskelelerin geliştirilmesi, sinir doku mühendisliğinde halen çözülmeyi bekleyen temel araştırma konularından biridir.

PVA/Kts esaslı nanofibröz yapı, nöral hücrelerin tutunması ve yayılımı için uygun yüzey topografyası sağlar. Doku iskelesine dahil edilen Trn'nin hücre canlılığı üzerinde doza bağlı olarak anlamlı etkiler oluşturur ve kontrollere kıyasla hücre proliferasyonunu artırır. VSWRAPTA peptiti ile yüzey fonksiyonelleştirilmiş iskeleler, mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma oranlarını artırarak sinir

hücrelerine özgü morfolojik ve fenotipik özelliklerin gelişimini destekler. Bu bilgiler ışığında, Trn ve VSWRAPTA içeren PVA/Kts temelli nanofibröz doku iskelelerinin, mezenkimal kök hücrelerin sağkalımını ve proliferasyonunu artırarak, nöral soya yönelimlerini teşvik eden bir mikro  evre sunabileceği hipotezi kurulmuştur.



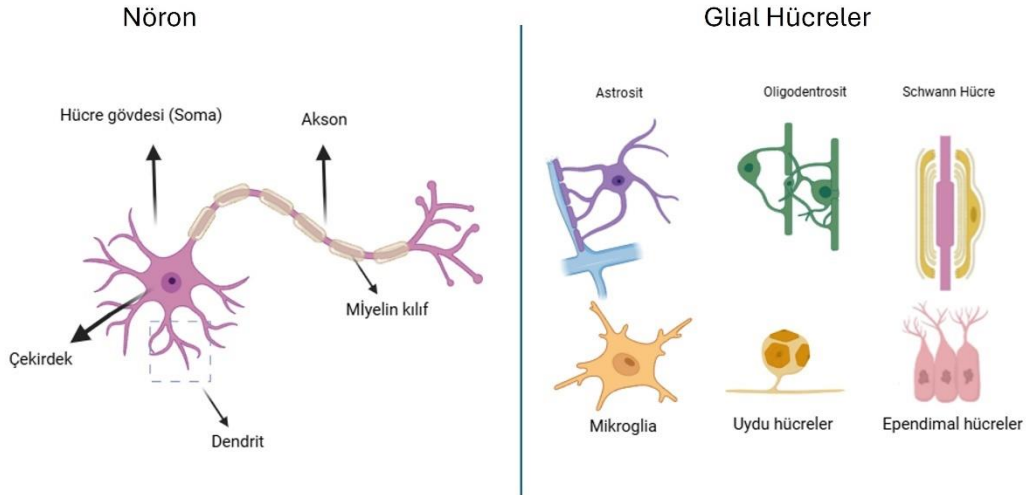
2 GENEL BİLGİLER

2.1 Nöral sistemin Yapısı ve Rejenerasyon Yeteneği

2.1.1 Sinir Sistemi

Nöral sistem veya sinir sistemi, iç organlarımızın ve vücudumuzun tüm işlev ve faaliyetlerini yönetmek, denetlemek ve kontrol etmekle görevli vücudun iletişimi ve koordinasyonunu sağlayan kompleks bir sistemdir. Sinir sistemi, yapısal açıdan merkezi sinir sistemi (MSS) ile periferik sinir sistemi (PSS) olmak üzere iki ana alt birime ayrılır ve bu sistemler bir arada çalışarak, duyum ve vücut hareketleri gibi duysal veya motor sinyallere bölünebilen birçok işlevi sürdürür (Cantile ve Youssef 2016). MSS'nin ana elemanları beyin ve omurilik, duysal sinyalleri iletir ve PSS'ye uyarıcı uyarılar sağlar. PSS, beyinden kaynaklanan kranial sinirleri, omurilikten gelen omurilik sinirlerini ve omurgaya duysal ve uyarıcı girdi ileten duysal sinir hücresi gövdelerini (dorsal kök gangliyon) içerir (Jänig 2013; Mai ve Paxinos 2011). Bir bütün olarak, MSS ve PSS duysal bilgileri iletir, işler ve bedensel işlevleri koordine eder. Her iki sistem dokuları nöronlar ve glial hücrelerden oluşmaktadır (Şekil 2.1).

Sinir sistemindeki birincil hücre tipi olan nöronlar, aksiyon potansiyelleri aracılığıyla sinyaller gönderip almakla görevli uyarılabilir hücrelerdir. Sinir dokuların ana hücreleri olan nöronlar, soma olarak adlandırılan bir hücre gövdesi ve uzantılardan (dendrit), kimyasal veya elektriksel sinyalleri alıp iletebilme işlevine sahip akon denen gelişmiş uzantılardan oluşmaktadır (Jänig 2013; Sousa vd. 2017). Nöronlar yapısal olarak çok kutuplu (bir akson ve çok sayıda oldukça dallanmış dendrit), iki kutuplu (bir akson ve bir dendrit) ve psödonipolar nöronlar (iki akson: periferik ve merkezi) olarak sınıflandırılabilir (Noback vd., 1968).



Şekil 2.1 Sinir sisteminde hücre tipleri

Sinir dokusundaki diğer hücre tipi olan gliyal hücreler hem MSS'de hem de periferik sinir sisteminde nöronların somalarını, aksonlarını ve dendritlerini çevreleyen destekleyici hücrelerdir ve koruyucu işlevler sağlarlar. Gliyal hücreler, periferik sinir sisteminde Schwann hücrelerini (SC); merkezi sinir sisteminde ise astrositler ve oligodendrositler gibi hücre tiplerini kapsamaktadır (von Bernhardt vd. 2016).

PSS gliyal hücreleri, tipik olarak, nöron aksonunu çevresinde konumlanmış SC'ler ve nöron hücre gövdesini destekleyen uydu hücreleridir (Milosavljević vd. 2021; Wilson vd. 2021). SC'ler, miyelinli aksonlarda, akson segmentlerini çoklu katmanlarla sararak miyelin kılıfını oluşturur ve böylece aksonları yalıtan parlak beyaz bir tabaka sağlar. Miyelinsiz aksonlar da SC'ler tarafından çevrelenmiştir ancak miyelin kılıfı içermezler. Uydu hücreleri ise periferik sinir sistemindeki nöronların hücre gövdelerini çevreleyen ve destekleyen düzlemsel yapılar olarak görev yapar. Her iki hücre tipi de internöronal boşlukta bulunarak nöronlar arası ortamın düzenlenmesine katkıda bulunmaktadır (Bigbee 2022),

MSS gliyaları astrositleri (astroglia), oligodendrositleri (oligodendroglia), mikroglia ve ependimal hücreleri içerir. Astrositler birkaç uzantıya sahiptir ve kılcal damarları ve nöron hücre gövdelerini ve dendritleri yerinde tutmaktan, ventriküler sistemin ependimal hücreleriyle temas kurmaktan, beynin hücre dışı ortamını düzenlemekten, kan-beyin bariyerinin oluşumuna yardımcı olmaktan ve hasarlı beyin dokusunu onarmaktan sorumludur (Jäkel ve Dimou 2017). Oligodendrositler,

periferik sinir sisteminin Schwann hücrelerine eşdeğerleridir ve MSS miyelinini üretir ve korurlar (Bigbee 2022; Mai ve Paxinos 2011). Mikroglial hücreler hem bağışıklık tepkisi hem de homeostazın korunmasıyla ilgili işlevlere sahip hücrelerdir. Nöral sistemdeki bir başka gliyal hücre tipi olan ependimal hücreler, omuriliğin merkezi kanalını ve beyin ventriküler boşluklarını kaplayan kübik yapılı hücrelerdir, beyin-omurilik sıvısının sentezi sürecinde rol almaktadırlar (Verkhatsky ve Butt 2018).

Her ne kadar sinir sisteminin her iki bölümünde de nöronlar ve gliyal hücreler bulunsun da ikisi arasında temel hücre tipleri ve doku organizasyonu ile ilgili büyük bir varyasyon gözlemlenebilir. Bu varyasyonların sebep olduğu en önemli sonuçlardan biri de MSS ve PSS arasındaki rejenerasyon kabiliyetleridir (Chen vd. 2002).

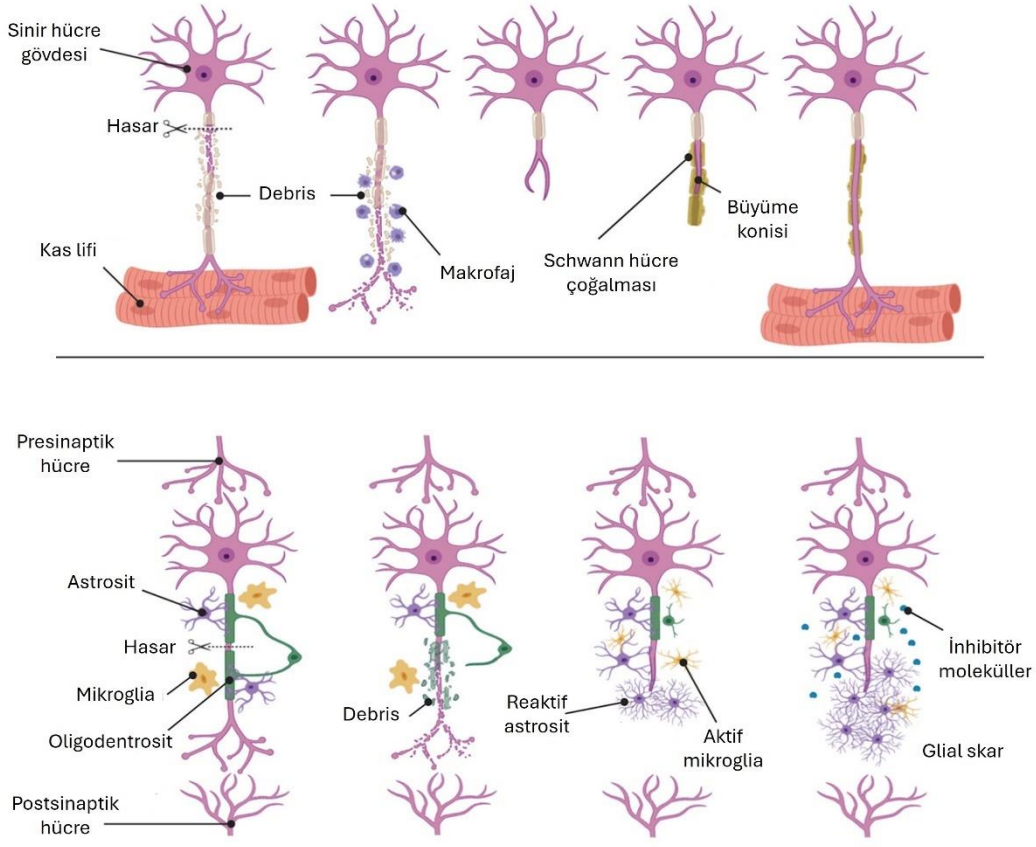
2.1.2 Periferik ve Merkezi Sinir Sisteminde Rejenerasyon

Travmatik yaralanmalar, doğuştan gelen anomaliler, tümörler, enfeksiyonlar ve dejeneratif nörolojik hastalıklar hem MSS hem de PSS'yi etkileyebilen önemli klinik sorunlardır. Sinir hasarı, travmatik veya dejeneratif olsun, normal bilgi akışını bozar ve yaralanmanın yeri ve mekanizmasına bağlı olarak zararlı etkilere yol açabilir. Farklı tiplerdeki travmatik yaralanmalar, kan dolaşımının kesintiye uğramasıyla gerçekleşebilen nöronal hücre kayıpları veya nörodejeneratif hastalıklar, aksonlar ile hücre gövdelerine zarar vererek akson bağlantılarının kopmasına yol açabilir (Chen vd. 2002; Hussain vd. 2020). Sinir sisteminin kompleks yapısı sinir rejenerasyonunu diğer dokulara göre oldukça zor kılar.

Sinir rejenerasyonu, sinir dokusu ve hücrelerinin veya hücresel bileşenlerinin hasar sonrası yeniden büyüme ve onarım süreçlerini barındırır ve bu süreç, sinirsel fonksiyonlarının yeniden kazanılması açısından kritik önem taşımaktadır. Bu onarımlar, yeni dokuların, nöronlar, glia, aksonlar, miyelin veya sinapsların oluşumunu içerebilir (Panagopoulos, Megaloikonomos, ve Mavrogenis 2017). Sinir doku için daha kapsamlı bir rejenerasyon, nöroplastisite ve nörorestorasyona yol açan süreçleri de içerebilir (Smedowski vd. 2016). Sinir rejenerasyonu, yaralanmaya karşı farklı nöronal ve glia tepkileri ve rejeneratif aksonların ve hücrelerin karşılaştığı farklı ortamlar nedeniyle PSS ve MSS arasında farklılık gösterir. PSS, sınırlı da olsa kendini yenileme kapasitesine sahipken, MSS

doğrudan rejenerasyona karşı daha dirençlidir. Bu farklılık, her iki sistemin hücresel kompozisyonu, mikro çevresel ortamı, ekstraselüler matris içeriği ve immün yanıtları ile ilişkilidir (Butt, Bradley, ve Sills 2018).

Periferik sinir yaralanmalarında, aksonlar nispeten kolay bir şekilde yenilenme yeteneğine sahiptir ve çeşitli içsel yollar PSS rejenerasyonu için kritik öneme sahiptir. PSS aksonları yaralanmadan sonra rejenerasyon gösterebilir (Şekil 2.2a). Özellikle dorsal kök ganglionu nöronları, periferik yapıları zarar gördüğünde güçlü bir rejeneratif potansiyel sergiler; bu durum, merkezi yapıların sağlam kalmasıyla desteklenmektedir (Schmidt ve Leach 2003). Akson hasarından sonra distal segmentin hızlı bir şekilde temizlenmesi (Wallerian dejenerasyonu), yenilenme süreci için uygun bir ortam oluşturur (Lunn vd. 1989). Periferik bir akson hasarlarında, proksimal segmentin ucu bir büyüme konisi geliştirir ve bu koni daha sonra hedef hücreleri tarafından yayılan büyüme sinyalleri için ortamını örnekleyerek onlara doğru uzanır. Periferik sinirlerde Schwann hücreleri "Bands of Büngner" adı verilen uzunlamasına hücre dizileri oluşturur (Ribeiro-Resende vd. 2009). Bu yapılar, hasarlı aksonun yeniden filizlenmesini ve hedef dokuya yönelmesini kolaylaştırır (Gaudet, Popovich, ve Ramer 2011). SC'ler, makrofajlar ve monositler, miyelin artıklarının temizlenmesi, nörotrofin salınımı ve aksonların hedef sinaptik bölgelerine yönlendirilmesi süreçlerinde iş birliği yaparak, nöronal fonksiyonun kısmen yeniden kazanılmasını desteklemektedir. Bu mekanizma sayesinde periferik sinir aksonları birkaç santimetre uzunluğunda yeniden büyüyebilir (Panagopoulos vd. 2017).



Şekil 2.2 Yaralanmalardan sonra rejenerasyon mekanizmaları a) PSS'de nörorejenerasyon b) MSS'de nörorejenerasyon (Schmidt ve Leach 2003)

MSS'deki hasarlara karşı oluşan biyolojik yanıt, rejenerasyondan ziyade, stabilizasyonu ve inflamatuvar kontrolü hedefleyen bir süreçtir. MSS aksonları kendi doğal ortamlarında kayda değer bir şekilde yenilenmez (Şekil 2.2b).

MSS aksonlarının rejenerasyonunda karşılaşılan zorlukların başında, aksonların kendilerindeki sınırlı içsel büyüme kapasitesi gelir. MSS aksonlarının yeniden uzaması için gereken mesafeler genellikle çok uzun olup, bu durum rejenerasyon sürecini zorlaştırmaktadır (Fawcett 2020). Buna ek olarak, yaralanma sonrası bölgedeki inhibitör mikro çevre, hasarlı bölgeye göç eden glial hücreler tarafından oluşturulan yara izi, hem fiziksel bir bariyer hem de biyokimyasal olarak olumsuz bir ortam teşkil eder (Curcio ve Bradke 2018; Sandvig vd. 2004).

Bir MSS aksonu yaralandıktan sonra, hasar yolunda Wallerian dejenerasyonu meydana gelir. Ancak oligodendrositlerin apoptozundan sonra dejeneratif miyelin ve aksonal döküntü, makrofajların yetersiz katılımı nedeniyle çok daha uzun süre varlığını sürdürür. MSS'de yaralanma sonrası, makrofajlar, PSS'deki makrofaj

infiltrasyonuna kıyasla yaralanma bölgesine çok daha yavaş sızar ve inhibitör miyelinin çıkarılmasını geciktirir. Bununla birlikte, hasar sonrası, aktifleşen astrositler glial skar oluşturarak nöronların yeniden uzamasına fiziksel bir engel teşkil eder. Bu süreçte glial fibriller asidik protein (GFAP) ekspresyonu artar ve yoğun bir hücre dışı matris birikimi meydana gelir zorlaştırır (Fitch ve Silver 2008). Bunun yanı sıra, oligodendrositlerden kaynaklanan miyelin bileşenleri—özellikle Nogo-A, miyelin ilişkili glikoprotein ve oligodendrosit miyelin glikoproteini (OMgp)—aksonların yeniden büyümesini kimyasal olarak engelleyen inhibitör sinyaller olarak işlev görür. Bu inhibitör sinyaller, nöronal yüzeydeki Nogo reseptörleri (NgR) aracılığıyla RhoA/ROCK sinyal yollarını aktive ederek büyüme konisini stabilize eder ve aksonal uzamayı (Fitch ve Silver 2008; Varadarajan vd. 2022). Ayrıca, MSS'deki nöral progenitör hücrelerin sayısı ve proliferatif potansiyeli sınırlıdır. Nörogenez, yalnızca belirli bölgelerle (örneğin subventriküler bölge (SVZ) ve dentat girus) sınırlı olup, hasarlı bölgelere göç eden yeni nöronların sayısı klinik olarak anlamlı düzeyde rejenerasyon sağlamaktan uzaktır (Kameneva ve Adameyko 2019; Okano ve Sawamoto 2008).

Tablo 2.1 MSS ve PSS'nin rejeneratif özelliklerin karşılaştırılması

Özellik	MSS	PSS
Rejenerasyon kapasitesi	Çok düşük	Görece yüksek
Skar oluşumu	Glial skar baskın	Minimal
Miyelin inhibitörleri	Nogo-A, MAG, OMgp	Daha az inhibitör
Destek hücreleri	Astrosit, oligodendrosit	Schwann hücresi
Nörotrofik faktör salınımı	Sınırlı	Aktif olarak gerçekleşir
Nöron proliferasyonu	Kısıtlı	Yok (ancak aksonal uzama var)
Onarım için dış desteğe ihtiyaç	Yüksek	Orta düzeyde

2.1.3 Sinir Hasarlarında Mevcut Tedaviler

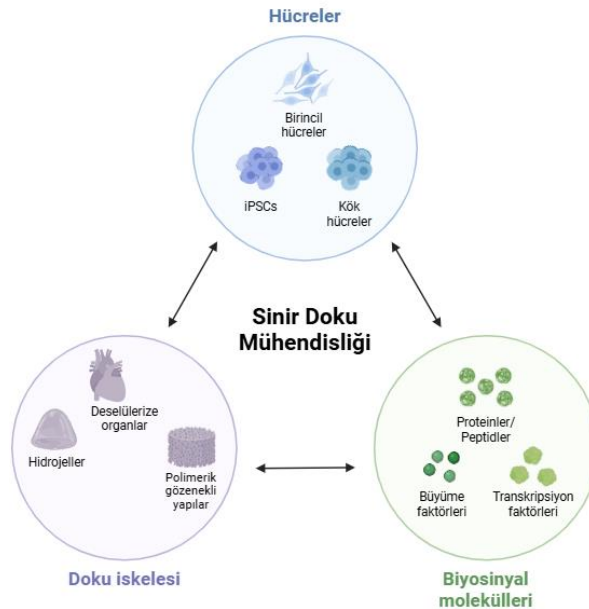
İnsan sinir sisteminin hastalıkları ve yaralanmaları birey için yıkıcıdır ve oldukça yaygın olmaları ve dünya çapında bir milyardan fazla insanı etkilemeleri nedeniyle önemli toplumsal sonuçlara ve maliyetlere sahiptir (WHO, 2007).

Belirtildiği gibi, PSS'deki bir yaralanmadan sonra, rejenerasyon durumu MSS'dekinden daha basittir. PSS'deki oluşan defektin uzunluğu kısa ise sinir uçlarının doğrudan cerrahi olarak birleştirilmesi (nörorafı) mümkün olabilir. Ancak, sinir uçları arasındaki yüksek mekanik gerilim, doğrudan onarımı kısıtladığında, en etkili tedavi yaklaşımı olarak otolog sinir greftleri kullanılmaktadır. Bu yöntemde, hastanın vücudundaki fonksiyonel önemi daha az olan bir bölgeden alınan sinir segmenti, hasarlı bölgeye yerleştirilerek sinir deviasyonu sağlanır ve böylece sinir rejenerasyonunun desteklenmesi amaçlanır (Dahlin 2008)). Büyük boşluklar durumunda, otolog sinir grefti en etkili tedavi seçeneğidir. Bununla birlikte, bu süreç donör ve alıcı sinirleri arasında uyumsuzluk olasılığı, donör dokusunun sınırlı bulunabilirliği, ikincil deformiteler, donör bölgesi morbiditesi ve donör siniri sağlamak için ikinci bir ameliyat gereksinimi dahil olmak üzere birkaç önemli dezavantaja sahiptir (Bedir vd. 2023; Griffin vd. 2013)

MSS'deki rejenerasyon mekanizmaların içsel faktörlerden engellenmesinden dolayı MSS onarımında kanıtlanmış bir iyileşme sağlayan klinik bir tedavi yoktur. Spinal kort hasarları, travmatik beyin hasarları ve dejeneratif hastalıklarda, ilk hasarlar hızlı akut birincil yaralanma olaylarına neden olur. Mevcut tedaviler, hasarlı dokuyu iyileştirmeye çalışmak yerine, spinal kort hasarlarında yüksek dozda steroidlerle (Lee vd. 2019) ikincil yaralanmayı önlemeye ve travmatik beyin hasarlarında yeterli oksijen temini, kan akışı ve basıncı korumaya çalışır. Ağır beyin yaralanmalarında, hematomların cerrahi olarak boşaltılması ve nekrotik dokuların temizlenerek onarılması gerekmektedir (Tsai vd. 2024). MSS yaralanmalarından sonra işlevi iyileştirmek veya birincil yaralanmayı engellemek için şu anda hala bir tedavi bulunmamaktadır.

2.2 Nöral Doku Mühendisliği

Nöral doku mühendisliği, sinir sisteminin hücrelerinin ve dokularının rejenerasyonu veya yeniden kazanımı için çeşitli uygulamalarını içeren doku mühendisliği alt dalıdır (Bellamkonda ve Aebischer 1994). Nöral doku mühendisliği; nörolojik hastalıkların in vitro modellerinin oluşturulması, nörodejeneratif hastalıkların tedavisi, merkezi sinir sistemi ve periferik sinir sistemi dokularının onarılması, yapay sinir sistemi dokularının oluşturulması gibi birçok farklı uygulamayı içermektedir (Bellamkonda ve Aebischer 1994). Diğer doku türlerinden farklı olarak, sinir dokusu çok sayıda farklı biyokimyasal ve topolojik uyaran içeren geniş karmaşık bir yapıya ve gelişmiş fonksiyonlara sahiptir (Bigbee 2022). Sinir sisteminin kompleks doğasının bir sonucu olarak, geleneksel transplantasyon ve tedavi yöntemleri oldukça etkisizdir. Nöral doku mühendisliğinin gelişimi, sinir dokusu onarımı ve hastalıkların tedavisi için yeni alternatif tıbbi stratejiler gelişmesini sağlamıştır (Dalton vd. 2023; Stratton vd. 2016). Nöral doku mühendisliği stratejileri, nöronal farklılaşmayı ve yenilenmeyi kolaylaştıran biyomalzemeleri, hücrelerel bileşenleri ve nörotrofik faktörleri, kaybedilen doku işlevlerini geri kazanmak ve rejenerasyonu sağlamak için kullanılmaktadır.



Şekil 2.3 Nöral doku mühendisliğinin temel bileşenleri

Doku mühendisliğinde iskeleler olarak adlandırılan biyomalzemeler, nöral rejenerasyon için alternatif bir yaklaşım sağlar. Biyomalzemeler ya da doku iskeleleri, Doğal hücre dışı matrisin (ESM) yapısını taklit ederek, topografik, biyokimyasal ve diğer çeşitli ipuçlarını sunarak, nöral onarım ve rejenerasyon üzerindeki biyolojik kısıtlamaların üstesinden gelmek için hücresel büyümeyi ve davranışı yönlendirebilir.

Nöronal rejenerasyon için iskele tabanlı doku mühendisliği stratejileri dört ana kategoride değerlendirilebilmektedir (Gu 2015).

(a) Yönlendirme sinyallerinin entegrasyonu:

Sinir hücrelerinin büyüme yönünü belirlemek ve akson uzamasını teşvik etmek amacıyla iskelelere çeşitli fiziksel veya kimyasal kılavuz ipuçları eklenir. Bu sinyaller, hücrelerin istenilen doğrultuda hizalanmasına ve fonksiyonel bağlantılar kurmasına yardımcı olabilir.

(b) Hücre sağkalımı, adezyonu ve proliferasyonunu destekleyen faktörler:

İskele yapıları çeşitli tiplerdeki hücrelerin adezyonunu, sağkalımını ve çoğalmasını artıran biyoaktif moleküller içerecek şekilde tasarlanarak hücresel süreçler kontrol edilebilir.

(c) Kontrollü ilaç salımı bileşenleri:

İskeleler ilaç taşıyıcı sistemler olarak hizmet edebilir. Büyüme faktörleri, anti-inflamatuar ajanlar veya diğer terapötik molekülleri hedef bölgeye kontrollü ve sürdürülebilir şekilde teslim edilerek yerinde kontrollü bir salım gerçekleştirilebilir. Bu, rejenerasyon sürecini hızlandırabilir.

(d) Elektriksel iletkenlik özelliklerinin iyileştirilmesi:

Sinir dokusunun elektriksel aktiviteye dayalı işlevselliği, için iskelelerinin elektriksel iletkenlik özellikleri geliştirilebilir. Bu sayede hücreler arası iletişim desteklenerek nöronal fonksiyonların yeniden kazanılması teşvik edilir.

2.2.1 Nöral Doku Mühendisliği için Doku İskeleleri

Doku mühendisliğinde kullanılan iskeleler, hedeflenen dokunun özgün biyolojik ve yapısal gereksinimlerine göre tasarlanabilen geniş bir malzeme ve üretim tekniği yelpazesine sahiptir. Sinir dokusu yüksek derecede özelleşmiş fonksiyonlara sahip

olmasından dolayı, iskelelerin taşınması gereken ana özelliklere ek olarak sinir doku biyofiziksel ve biyokimyasal gereksinimlerine uygun şekilde tasarlanmalıdır.

2.2.1.1 Biyouyumluluk ve Biyobozunabilirlik

Biyomalzeme tabanlı tüm doku mühendisliği uygulamaları için en önemli özellik biyolojik olarak uyumluluktur. Biyouyumluluk, bir malzemenin hücre ile etkileşime girdiğinde hücrelerde toksik süreçlere yol açmaması olarak tanımlanabilir. Tasarlanan iskeleler, tutunma, göç etme ve çoğalma gibi doğal hücresel süreçlere izin vermeli, hücreleri desteklemeli ve işlevsel bir doku oluşturmak için kaynaşmalıdır. Aynı zamanda dokusal düzeyde uyum için, iskele immünojenik yanıtları tetiklememeli ve fibrojenik özellikler göstermemelidir (Langer ve Vacanti 2016).

Bununla birlikte beyin gibi sinir dokuları söz konusu olduğunda MSS'nin sahip olduğu anatomik farklılıklar nedeniyle biyouyumluluk daha önemli bir hale gelmektedir. Beyin, vücudun diğer dokularından farklı olarak, yalnızca belirli moleküllerin (örneğin su, oksijen, karbondioksit) geçişine izin veren ve zararlı organizmalar ile pek çok farmakolojik ajanın girişini sınırlayan yüksek derecede seçici bir yapıya sahip olan kan-beyin bariyeri (BBB) ile korunmaktadır (Wong vd. 2013). Dahası, beyinde lenf damarları ve antijen sunan hücreler bulunmadığından, yabancı madde veya iskeleyi tanıma, mikroglianin aktivasyonu ile gerçekleşir. İmplantasyondan sonra, mikroglia aktivasyonu gerçekleşir ve mikroglia uzantılarını implant yüzeyine kadar uzatır (yaklaşık 130 μ m). İmplantasyondan yirmi dört saat sonra, implante edilen cihaz aktive olmuş mikroglia ile tamamen çevrelenir ve ince bir hücre kapsülü oluşturur. Hücresel kapsül iyon değişimini sınırlandırabilir ve nöronal iletişime müdahale edebilir. İmplantasyonu takiben ilk hafta içerisinde astrositler aktive olur ve zamanla mikrogliayı çevreleyen bir yapı oluşturarak inflamatuvar yanıtın temel bileşenlerinden birini teşkil eder. İleriki zamanlarda, hücreler arasında sıkı bağlantılar gelişir; bu durum iyonların ve nörotransmitterlerin difüzyonunu kısıtlayarak, bölgede hücre ölümüne ve nörit dejenerasyonuna neden olur (Kozai vd. 2015; Prodanov ve Delbeke 2016; Sridharan, Rajan, ve Muthuswamy 2013). Bu nedenle, ideal bir implant malzemenin bir süre sonra, tamamen parçalanması ve kalan hücre parçasının doğal işlevi geri yükleyen yeni bağlantılar kurması beklenir. Biyolojik olarak parçalanabilir doku iskeleleri, potansiyel immünolojik yan etkileri azaltabilir.

Önemli bir husus, biyobozunma oranı sinir büyüme oranına uygun olmalı ve parçalanma ürünleri sonunda uzaklaştırılmalıdır.

2.2.1.2 Mekanik Özellikler

Sinir dokuların rejenerasyonu için geliştirilen biyomalzemelerde mekanik özellikler hem rejeneratif başarıyı desteklemek hem de istenmeyen hücresel yanıtları önlemek açısından oldukça kritik bir parametredir. PSS'deki sinirler uzuv hareketiyle birlikte mekanik yüke maruz kalır. Bu nedenle, kullanılan biyomalzemelerin çekme dayanımı, sinirlerin doğal mekanik streslerine benzer olmalıdır. Uygun elastikiyet, rejenerasyon kanalının (örneğin sinir kılavuzlarının) hareketli anatomik bölgelerde deformasyona uğramadan sinir liflerini koruyabilmesini sağlar (Ciardelli ve Chiono 2006; Daly vd. 2013).

MSS için tasarlanan iskelelerde, mekanik özellikler, biyoyumluluğun ve rejeneratif başarının belirlenmesinde temel bir rol oynar. Özellikle yerel doku mikro çevresinin rijitliği, hücre adezyonu, farklılaşması ve migrasyonu gibi çeşitli hücresel süreçleri doğrudan etkileyerek, biyomalzeme-temelli rejeneratif stratejilerin etkinliğini belirleyen kritik bir parametre olarak öne çıkar. Ayrıca, implant edilen malzemenin mekanik uyumu, çevre dokuların biyolojik yanıtını şekillendirebilir; bu da inflamasyon düzeyinden yara iyileşmesine kadar birçok süreci etkileyebilir. Özellikle astrositler, mekanik sinyallere duyarlılıkları yüksek hücrelerdir ve doku ile uyumsuz mekanik özellikler; astrosit hipertrofisi, glial fibriler asidik protein (GFAP) ekspresyonunun artışı ve MSS hasarını takiben gelişen reaktif gliyozis benzeri fenotipik yanıtları tetikleyebilir (Franze 2013). Bu tür hücresel değişiklikler, nörorejeneratif stratejiler açısından olumsuz sonuçlar doğurabileceğinden, biyomalzeme ile konak doku arasında uygun mekanik eşleşmenin sağlanması büyük önem arz etmektedir (Bartlett vd. 2020; Chen, Harn, ve Chiou 2018).

İkinci olarak, biyomalzemenin mekanik özellikleri, terapötik hücrelerin davranışları ve fenotipik özellikleri üzerinde belirleyici olabilir. Literatürde, substrat sertliğinin kök hücrelerin adezyon, migrasyon ve farklılaşma süreçlerini modüle ettiği gösterilmiştir (Rosso vd. 2022).

Bir substratın veya dokunun mekanik özellikleri, nörit uzama hızı, aksonal büyümenin yönü ve nörit dallanmasının derecesi dahil olmak üzere nöronal

davranışı da etkileyebilmektedir (Han vd. 2025; Kothapalli, Mahajan, ve Farrell 2020). Üçüncüsü, makroskobik düzeyde, biyomalzeme-doku arayüzünde oluşan herhangi bir aşırı kuvvet, yapısal sürekliliği bozacak ve hücrelerin veya aksonların geçişini engelleyecektir. Bu nedenle, hedef dokuyla mekanik bütünleşmeler, MSS onarımını amaçlayan herhangi bir biyomalzeme tabanlı tedavi için temel bir gereksinimdir.

Üçüncü olarak, makroskobik düzeyde, biyomalzeme ile doku arayüzünde ortaya çıkabilecek mekanik uyumsuzluklar; yapısal sürekliliği bozarak hücresel ve aksonal geçişi kısıtlayabilir. Bu durum, rejeneratif sürecin etkinliğini olumsuz yönde etkileyebilir. Dolayısıyla, biyomalzemenin konak doku ile mekanik olarak entegre olabilme kapasitesi, MSS onarımına yönelik geliştirilen biyomalzeme temelli tedavi stratejilerinin başarısı açısından temel bir gereklilik olarak değerlendirilmektedir (Chen vd. 2018).

2.2.1.3 Topografya

Sinir sistemi gelişimi sırasında, bir hücre dışı matris (ECM), nöronlar ve nöritlerin olgunlaşmasında yüzey topografyası ve mikro çevre sinyalleri aracılığıyla önemli bir rol oynar. Topografik özellikler ve mikro çevresel sinyaller, nöral doku oluşumu ve rejenerasyonunda sırasıyla fiziksel ve kimyasal yönlendirme unsurları olarak görev yapar (Amari 1980).

İskelelerin yüzey topografyası, hücre adezyonunu, yayılımını, yönelimini ve morfolojisini etkilediği aynı zamanda belirli genlerin ekspresyonunu da modüle ederek farklılaşma süreçlerini yönlendirebilir. (Kania 2013; Taylor vd. 2021). Bu nedenle, nörit çıkıntısını ve akson uzantısını desteklemek için bir biyomimetik yapı veya iskelenin üretilmesi, nöral doku rejenerasyonu için önemli ve yaygın bir stratejidir. Hücreler genellikle düz substratlara kıyasla nanotopografik desenler içeren substratlara daha etkili bir şekilde yapışır ve böylece yapışma aracılı sinyal yollarını iyileştirir. Nanotopografik özellikler mekanotransdüksiyon yollarını düzenleyerek hücre fonksiyonlarını etkiler (Luo vd. 2022; Narayanan 2025).

2.2.1.4 İletkenlik

Nöronal hücrelerin, temel işlevlerinden biri aksonları boyunca elektriksel sinyalleri iletme yetenekleridir. Ayrıca, elektrik alanlarının hücreler arası (parakrin) etkileşimleri modüle etme, hücresel hizalanma ve göçü teşvik etme gibi önemli

roller üstlendiği bilinmektedir. Elektriksel uyarımın periferik sinir yaralanmalarının iyileşmesinde olumlu etkiler sağladığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Ariza vd. 2010). Ayrıca elektriksel uyarımın, sadece nöronlar üzerinde değil, diğer hücre tiplerinin de çoğalma ve farklılaşma gibi davranışlarını uyarmada etkili bir ipucu olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle, biyolojik, kimyasal ve fiziksel ipuçlarının yanı sıra, tasarlanan platformlar sinir dokusu rejenerasyonunun artırılması için elektriksel uyarımı mümkün kılacak iletkenliğe de sahip olmalıdır (Li vd. 2008; Pires vd. 2015).

2.2.1.5 Biyoaktivite

İskele mimarisi ve mekanik özelliklerin hücresel yanıtları yönlendirme potansiyeline sahip olduğu çeşitli çalışmalarda ortaya konmuş olsa da hedeflenen hücre fenotipine tam farklılaşma süreci in vivo ortamda oldukça karmaşık ve sıkı şekilde düzenlenmiş bir süreçtir. Bu nedenle, genellikle bu sürecin başarıyla tamamlanabilmesi için biyoaktif moleküllerin, örneğin büyüme faktörleri, peptitler veya sitokinlerin, iskele sistemine entegre edilmesi gerekebilir. Dahası, biyokimyasal sinyaller, fiziksel sinyallere göre hücresel süreçlerin kontrolünde daha etkilidir (Ding vd. 2017). Bu sebeple yeni nesil iskeleler hücresel olayları daha etkin kontrolü için bu biyoaktif bileşenleri içerecek şekilde tasarlanabilir. Biyoaktif iskeleler, rejeneratif süreci desteklemek amacıyla çeşitli biyoaktif ajanlarla yüklenebilir veya kimyasal olarak işlevselleştirilebilir. Ayrıca, ESM bileşenleri gibi belirli biyolojik işlevleri doğası gereği taşıyan biyomalzemeler de, bu tür iskele yapılarında doğrudan kullanılabilecek potansiyel taşıyıcı sistemler olarak değerlendirilebilir (Boccaccini ve Blaker 2005).

Doğal polimerler kullanılarak üretilen bazı iskeleler biyolojik aktiviteye sahiptir. Örneğin; kolajen ve jelatin gibi doğal ekstraselüler matris bileşenlerinden üretilen doku iskeleleri, hücre yüzey reseptörleri tarafından tanınabilen moleküler bölgeler barındırır (Y. Wang vd. 2011). Bununla birlikte sentetik polimerlerden üretilen iskeleler, biyoaktivite açısından yoksundur ve hücresel süreçlerde aktif rol oynayabilmesi için çoğunlukla biyoaktif moleküller ile aktivite kazandırma stratejileri uygulanır (Ji vd. 2011). Hücre bölünmesinin uyaran mitogenler, çoğalmayı ve farklılaşmayı indükleyen büyüme faktörleri, hücreler süreçlerde etkili çeşitli protein veya peptitler kullanılan başlıca biyoaktif moleküllerdir (Hamley 2017; Ramos-Zúñiga vd. 2022).

2.2.2 Nanofibröz Doku İskeleleri

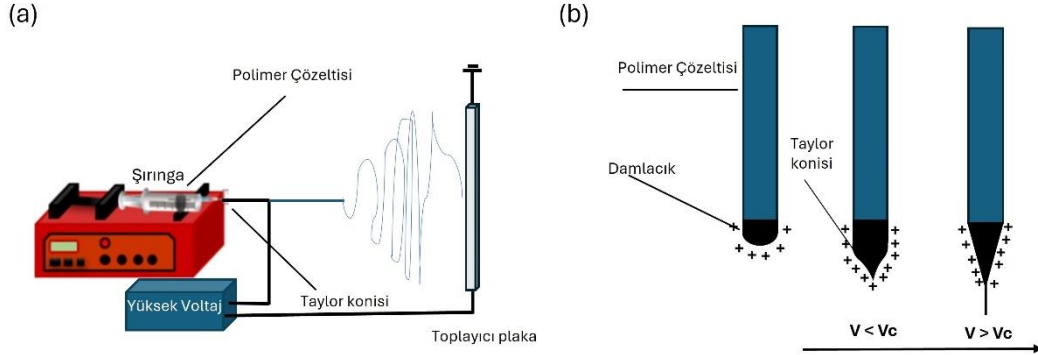
Doku mühendisliğinde kullanılan doku iskelelerinin hedefi ESM 'nin mimarisini taklit etmektir. Doğal ESM yapısı, hücre davranışlarını biyokimyasal sinyaller ve topografik ipuçları aracılığıyla düzenleyerek, doku gelişimi ve rejenerasyonunda kritik bir rol oynar (Xie vd. 2010). ESM yapısı hücrelerin yapışması, göçü, proliferasyonu ve farklılaşması gibi temel biyolojik süreçlere uygun olup, polisakkaritler ve lifli proteinler olmak üzere iki temel bileşenden oluşmaktadır (Bosman ve Stamenkovic 2003). ESM'yi iyi taklit eden bir yapının; bu hücreler için elverişli bir mikroyapı sağlayacağı düşünülmektedir. Ayrıca geniş yüzey alanı, hücre-lif etkileşimlerini artırarak hücreler yapışmayı destekler (Cao, Liu, ve Chew 2009). Nanofibröz iskeleler, yüksek yüzey alanı/hacim oranına sahip olması nedeniyle, çeşitli biyoaktif moleküllerin kontrollü salımına da olanak tanır. Bu özellikleri sayesinde nanofibröz doku iskeleleri, sadece hücreler destek yapısı olarak değil, aynı zamanda potansiyel ilaç taşıyıcı sistemler olarak da değerlendirilmektedir.

2.2.2.1 Elektroğirme Yöntemi

Elektroğirme (Elektrospinning), mikrometreden nanometre boyutlarına kadar çaplara sahip sürekli lifler üretmeyi sağlayan bir yöntemidir. Polimer çözeltilerinden oda sıcaklığı ve atmosferik koşullar altında yüksek voltajlı elektrik alan kullanılarak nano- veya mikroskobik boyutlarda ince liflerin üretildiği bir tekniktir (Doshi ve Reneker 1995).

Elektroğirme sistemleri genel olarak üç ana bileşenden oluşur: yüksek voltajlı güç kaynağı, polimer çözeltisinin bulunduğu ve jetin çıktığı spinneret (genellikle bir enjektör iğnesi) ve liflerin toplandığı kolektör elektrot (Şekil 2.4 a). Elektroğirme işlemi sırasında, yüksek voltaj altında kalan polimer çözeltisinin yüzeyinde elektrik yükü birikir. Belirli bir kritik elektrik alan eşiğine ulaşıldığında, oluşan elektrostatik itici kuvvetler yüzey gerilimini aşarak sıvının yüzey gerilimini dengeleyemez hâle gelir ve uygulanan yüksek elektrik alanının etkisiyle konik bir yapı oluşur. Taylor konisi olarak adlandırılan bu yapının ucundan bir sıvı jetin fışkırmasıyla lif üretimi süreci başlamaktadır (Şekil 2.4 b). Jet, kolektör yüzeyine doğru yönelirken, koni ucundan itibaren incelmeye devam eder ve jetin uç noktası boyunca çözücü buharlaşır. Çözücünün buharlaşmasıyla birlikte, kolektör üzerinde kuru bir polimer

lif birikimi meydana gelir. Lif oluşumu, milisaniyelik zaman aralıklarında gerçekleşen yüksek hızlı bir süreçtir (Angammana ve and Jayaram 2016; Doshi ve Reneker 1995).



Şekil 2.4 a) Elektroeğirme düzeneğinin şematik gösterimi **b)** Taylor koni oluşumunun şematik gösterimi

Elektroeğirme yönteminde çeşitli parametreler elde edilen liflerin çapı, morfolojisi (düzgün, boncuklu, gözenekli vb.) ve yüzey özellikleri üzerinde doğrudan belirleyicidir. Tablo 2.2’te parametrelerin lif morfolojisi üzerindeki etkileri özetlenmiştir.

Elektroeğrilmiş lifli doku iskelelerinin, sinir doku mühendisliğinde hücrelerin büyüme ve farklılaşmasına uygun bir substrat olarak kullanılabilirliği, çeşitli araştırma grupları tarafından kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Bu kapsamda, elektroeğrilmiş liflerin biyolojik etkinliği, polimer film yüzeyleri ile karşılaştırmalı olarak hem in vitro hem de in vivo deneysel modellerde değerlendirilmiştir. Özellikle in vivo çalışmalar, elektroeğrilmiş liflerle oluşturulan sinir kılavuzlarının içerisinde anlamlı aksonal uzama ve kısmi fonksiyonel yeniden innervasyon sağladığını ortaya koymuştur.

Tablo 2.2 Elektroeğirme yönteminde lif morfolojisine ve boyutlarına etki eden parametreler

Parametre Türü	Alt Parametre	Etkisi
Proses (İşlem)	Voltaj	Jet oluşumu, kararlılık, boncuk oluşumu
	İğne- Kolektör Mesafesi	Kuruma süresi, lif morfolojisi

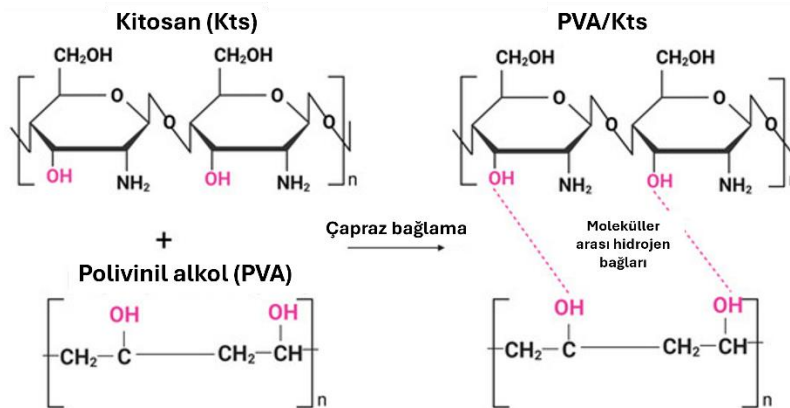
	Akış Hızı	Lif çapı, düzgünlük, boncuklanma
Çözelti (Solüsyon)	Polimer Konsantrasyonu	Viskozite, lif oluşumu, çap
	Elektriksel İletkenlik	Jet hızı, lif inceliği
	Çözücü Türü (Uçuculuk)	Kuruma süresi, gözeneklilik
Ortam (Çevresel)	Sıcaklık	Viskoziteyi azaltır, buharlaşmayı hızlandırır
	Nem (Bağıl nem oranı)	Gözenekli yapı oluşumu, lif yüzey morfolojisi

2.2.2.2 PVA/Kitosan Nanofiber İskeleler

Elektroegirme ile üretilmiş nanofiber malzemeler arasında PVA/Kts nanofiber malzemeler, biyouyumluluk, biyobozunurluk, antibakteriyel ve antiinflamutar özellikler, gaz geçirgenliği ve verimli elektroegirilebilirlik gibi benzersiz özelliklere sahip olması sebebiyle rejeneratif tıp, yara örtüsü, ilaç dağıtımı ve doku mühendisliği uygulamaları gibi geniş bir uygulama alanda potansiyeli vardır (Alavarse vd. 2017; Alhosseini vd. 2012).

PVA, vinil alkol-ko-vinil asetat kopolimerlerinden oluşur ve fizyolojik olarak inert, biyolojik olarak yapışkan, biyolojik olarak uyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilen bir sentetik polimerdir. Mekanik mukavemet, suda çözünürlük, gaz geçirgenliği ve verimli elektrosplinenebilirlik gibi özelliklere sahiptir (Bal Öztürk ve Akgüner 2020). Bir amino şeker olan Kts'nin kimyasal bileşimi (1,4)-bağlı 2-asetamido-2 deoksi-β-D-glikoz (N-asetilglukozamin)'den oluşan kitinin deasetillenmesiyle elde edilen bir polisakkarittir. Kts'nin yüzeyinde bulunan amino grupları, antimikrobiyal ve antioksidan özellikler gibi temel biyolojik fonksiyonlar sergileyerek doku iyileşme sürecini destekleyebilir. Kts, sulu asidik ortamda çözünürlük gösterir ve bu çözünürlük; polimerin moleküler ağırlığına, deasetilasyon derecesine ve asetil gruplarının polimer zinciri boyunca dağılımına bağlı olarak değişkenlik gösterir (Kumar vd. 2004). Yüzey yükünün yanı sıra sahip olduğu antiinflamutar ve antimikrobiyal özellikler nedeniyle, Kts birçok biyomedikal uygulamada yaygın biçimde tercih edilmektedir (Aranaz vd. 2021).

Doku mühendisliği uygulamaları için birçok üstün özelliklere sahip olmasına rağmen Kts, doğası gereği kolay elektroğrilebilir bir polimer değildir. Bunun temel nedeni Kts'nin yalnızca formik veya asetik asit gibi asidik çözücülerde çözünebilmesidir (Pakravan, Heuzey, ve Ajji 2011). Kts'nin sakkaridik omurgasındaki NH_2 grubu, asidik ortamda NH_3^+ e protonlanır ve Kts'yi katyonik bir polielektrolit haline getirmektedir. Bir elektrik alanında, pozitif yüklü gruplar arasında büyük itme kuvvetleri gelişir, bu da Kts'nin sürekli lif oluşumundaki yetersizliğine neden olur ve düzgün olmayan boncuklu morfolojiler üretir. Kts çözeltilerinin fiziksel davranışları üzerindeki etkiler, polimer zincirlerindeki NH_2 ve OH grupları arasındaki güçlü hidrojen bağları ile ilgilidir. Düşük polimer konsantrasyonlarında, zincirler lif oluşturmak için yeterince etkileşime giremeyebilir. Ancak polimer konsantrasyonu arttıkça, zincirler arasında kuvvetli hidrojen bağlarını artırır. Bu durum elektroğirme prosesi için zorluk oluşturur (Homayoni, Ravandi, ve Valizadeh 2009). Bu zorlukların üstesinden gelmek için araştırmacılar tarafından Kts'nin, PVA gibi kolayca elektroğrilebilir bir konuk polimerle birlikte kullanımı önerilmiştir (Koosha ve Mirzadeh 2015). PVA ile kullanıldığında boncuksuz morfolojiye sahip ultra ince Kts nanofiberlerin üretilmesi mümkün olmaktadır. Diğer bir yöntem ise trifloroasetik asit gibi solventler kullanılarak Kts zincirleri arasındaki itici kuvvetlerin azaltılması ve elektroğirme işleminin kolaylaştırılmasıdır. Ancak bu solventlerin çevreye zararlı olması sebebiyle özellikle biyo uygulamalarda kullanımı tercih edilmemektedir (Geng, Kwon, ve Jang 2005; Ohkawa vd. 2004).



Şekil 2.5 Kitosan (Kts) ve polivinil alkol (PVA) polimer zincirleri arasındaki moleküller arası hidrojen bağlar (Teixeira, Amorim, ve Felgueiras 2020)

PVA/Kts bazlı doku iskeleleri, biyoyumlulukları, çok yönlü işlenebilirlikleri ve hücre proliferasyonunu ve doku yenilenmesini destekleme kapasiteleri sayesinde sinir doku mühendisliği alanında umut vadeden malzemeler arasında yer almaktadır. Önceki çalışmalar, bu kompozit yapıların sinir dokusu için etkili bir iskele sistemi olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Alhossein ve arkadaşları, elektroğirme yöntemiyle ürettikleri PVA/Kts iskelelerin, sadece PVA içeren iskelelere kıyasla PC12 nöronal hücrelerinin proliferasyonunu anlamlı düzeyde artırdığını bildirmiştir (Alhosseini vd. 2012). Benzer şekilde, Mottaghitlab ve çalışma arkadaşları, sinir büyüme faktörü (NGF) ile fonksiyonelleştirilmiş elektroğirilmiş kitosan/PVA (CS/PVA) iskelelerin, SKNMC (sinir hücre hattı) ve U373 (glioblastoma) hücrelerinde daha yüksek yapışma ve çoğalma oranlarına neden olduğunu bildirmiştir (Mottaghitlab vd. 2011). Amirian ve arkadaşları ise, sıçan spinal kord kompresyon modeli üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmada, farklı timol konsantrasyonları (%5, %10, %15) ile yüklenmiş PVA/CS nanofiber iskelelerin terapötik etkinliğini değerlendirmiştir (Amirian vd. 2025). Üretilen nanofiberler düzgün morfolojiye sahip olmuş ve timol konsantrasyonu arttıkça fiber çapında artış gözlemlenmiştir. Özellikle %5 ve %10 timol yüklü iskeleler, motor fonksiyon bozukluklarını azaltma ve ağrı tolerans eşiğini artırma açısından önemli terapötik faydalar sağlamıştır. Bu bulgular, PVA/Kts iskelelerinin biyoaktif moleküllerle kombine edildiğinde sinir rejenerasyonunu destekleme potansiyelini artırabileceğini göstermektedir.

Literatürdeki çalışmalar, PVA/Kts elektroğirilmiş nanofibröz iskelelerin, biyoaktif maddelerin kapsülasyonu ve kontrollü salımı için iyi bir aday olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte polimerik solüsyonlara doğrudan dahil edilen maddeler, elde edilen nanofiber malzemenin fiber boyutu, gözeneklilik, şişme gibi fiziksel özellikleri üzerinde doğrudan etkilidir. Bu fiziksel ve mekanik özellikler nanofiber malzemenin iskele yapısı olarak kullanıldığında hücrelerin, bağlanma, sağkalım ve çoğalma gibi davranışlarında doğrudan etkili olduğu göz önüne alındığında, biyoaktif molekül enkapsülasyonun malzeme özelliklerine etkisi çok iyi karakterize edilmelidir.

2.2.3 Fonksiyonelleştirilmiş Nanofibröz İskeleler

Doku rejenerasyon sürecinde biyoaktif moleküllerin rolü oldukça önemlidir. Özellikle ilaçlar ve büyüme faktörleri gibi biyoaktif ajanların hedef bölgede

kontrollü ve zamanlamalı salımı, tedavi etkinliğinin artırılmasında kritik bir faktör olarak kabul edilmektedir (Grinberg vd. 2010; Guo vd. 2015).

Fonksiyonelleştirme, nanofiber yüzeylerinin veya yapısının kimyasal, biyolojik ya da fiziksel yollarla modifiye edilmesini içerir. Nanofiberler kovalent ve kovalent olmayan teknikler kullanılarak işlevselleştirilir. Aktif maddeler, enzimler, proteinler ve büyüme düzenleyiciler gibi biyolojik alt birimler, kapsülleme, fiziksel bağlanmalar ve kimyasal aracılı bağlanma yoluyla çeşitli amaçlar için dahil edilebilir (Qian vd. 2021).

2.2.3.1 Doğrudan Dahil Etme ve Nanofiberlerin İçerisine Yüklenen Hedef Moleküller

Nanofiberlerin içerisine hedef moleküller yüklenerek yapılan fonksiyonelleştirme, rejeneratif tıpta yüksek potansiyele sahip, çok yönlü bir yaklaşımdır. Bu yaklaşım, iskenin yalnızca yapısal bir destekleyici değil, aynı zamanda biyokimyasal olarak etkili bir taşıyıcı işlevi de görmesini sağlar (Zhang, Hu, ve Ma 2012). Yükleme, genellikle elektroğirme sürecinde veya sonrasında gerçekleştirilir. Nanofiber doku iskeleleri, hedef dokularda rejenerasyonu desteklemek amacıyla ilaçlar, büyüme faktörleri, peptitler, vitaminler, antioksidanlar ve diğer biyoaktif ajanlarla yüklenerek fonksiyonelleştirilebilir (Chakrapani, Ramakrishna, ve Zare 2023). Özellikle sinir dokusu mühendisliğinde, kontrollü ve uzun süreli salım sistemleriyle hücre farklılaşması, sinyal iletimi ve doku bütünlüğü sağlanabilir (Zhu vd. 2020). Doğru polimer seçimi, uygun yükleme tekniği ve biyomoleküllerin yapısal uyumu, bu stratejilerin başarısında belirleyici faktörlerdir.

Aktif maddenin nanofiberler içerisine yüklenmesinin bir yöntemi, elektroğirme öncesi polimer çözeltisiyle karıştırılmasıdır (Blend Electrospinning). Bu yöntem kolay uygulanabilirliği ve hedef maddenin homojen dağılımı nedeniyle kontrollü salım uygulamalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Bununla birlikte, hedef maddeler elektroğirme sırasında organik çözücülere veya yüksek gerilime maruz kalabilir bu da biyolojik aktivitede azalma riski oluşturabilir (Liang, Hsiao, ve Chu 2007).

Başka bir yöntem ise koaksiyel elektroğirme ile çekirdek-kabuk (Core-Shell) fiber yapıların oluşturulmasıdır. Çift kapiller iğne sistemi ile, çekirdek kısmına hedef molekül, dış kabuğa polimer çözeltisi yerleştirilerek elektroğirme yapılır. Bu sayede, molekül doğrudan dış çevre ile temas etmez ve gelişmiş kontrollü ve uzun

sürekli salım sağlar. Ancak çekirdek ve kabuk çözeltilerinin viskozite uyumundaki kritik özellikler ve karmaşık cihaz gereksinimi gerektirir (Jiang vd. 2005).

2.2.3.2 Nanofiber Yüzey Fonksiyonelleştirilmesi

Nanofiberlerin yüzey fonksiyonelleştirilmesi genellikle elektroegirme işlemi sonrasında gerçekleştirilir.

- **Yüzey Emdirme /Fiziksel Adsorpsiyon**

Fiziksel yüzey adsorpsiyonu, ilacı nanofibröz ağa yüklemek için en basit yaklaşımdır. Genel olarak, elektrostatik etkileşim, hidrojen bağı, hidrofobik etkileşim ve van der Waals etkileşimi, yüzey adsorpsiyonu için itici güç olarak kullanılabilir (Yoshida vd. 2006). Yüzeyde ilaç dostu fiziksel hareketsizleştirme, hacim oranına göre son derece yüksek bir yüzey alanı olan ve birim kütle başına diğer cihazlardan daha yüksek ilaç yükleme miktarı ile sonuçlanan yüzeyi modifiye edilmiş önceden üretilmiş nanofiber ağlar kullanılarak elde edilebilir. Elektroegrilmiş nanofiberlerin biyoaktif çözeltide bekletilmesiyle yükleme yapılır. Nanofiber yüzeyinden hızlı ilaç salınımı, belirli terapötik maddelerin dozajının etkin şekilde kontrol edilmesini mümkün kılar ve özellikle erken dönemde yüksek ilaç dozajı gereken cerrahi operasyonlardan sonra gelişebilecek bakteriyel enfeksiyonlar için uygun olabilir. Nanofiber yüzeyinden ilaçların anında salınması, bazı terapötik ajanların kolay dozaj kontrolünü sağlayabilir ve ameliyattan birkaç saat sonra oluşan bakteriyel enfeksiyonların önlenmesi gibi bazı özel uygulamalar için uygundur. Moleküler yapıya zarar vermeyen kolay bir yöntem olmasına rağmen yüzey yükleme, hızlı bir salım (burst release) meydana getirir ve kontrollü salımı zorlaştırır (Patel vd. 2007).

- **Plazma İşlemi**

Polimerik doku iskelelere plazma işlemi, yüzey kimyasal bileşimini değiştirerek yüzey yapışmasını ve ıslatma özelliklerini düzenlemek için yaygın olarak kullanılmıştır (Liu vd. 2018). Plazma işlemlerinin doğru seçimi, biyomalzemenin biyoyumumluluğunu artırmak ve farklı biyoaktif moleküllerin sonraki kovalent bağlanmasını kolaylaştırmak amacıyla yüzey üzerinde çeşitli fonksiyonel grupların oluşturulmasına olanak tanır (Intranuovo vd. 2016). En sık kullanılan plazma işlemi, oksijen, amonyak veya hava plazması kullanılarak yüzeyde karboksil ve amin grupların açığa çıkarılmasıdır. Bu sayede jelatin, kolajen, laminin ve

fibronektin gibi hücre dışı matriks proteinleri, plazma ile modifiye edilmiş yüzeye bağlanarak hücrel adezyon ve proliferasyon süreçlerini destekleyebilir (Liang vd. 2007).

- Çok Katmanlı Teknik (Layer by layer)

Polielektrolit çok katmanlı üretim tekniği (Layer-by-Layer, LbL), iskele yüzeylerini birkaç nanometreden birkaç mikrometreye kadar kontrol edilebilir kalınlıklarda kaplamaya olanak tanıyan çok yönlü bir yüzey modifikasyon yöntemidir (He vd. 2013). Bu yöntem, zıt yüklü polielektrolitlerin (polikasyon ve polianyon) elektrostatik etkileşimler aracılığıyla, yüklü bir substrat üzerine ardışık olarak biriktirilmesine dayanır ve kendiliğinden birleşen çok katmanlı kaplama veya serbest duran film ile sonuçlanır. LbL tekniği, uygulama kolaylığı, karmaşık geometriye sahip yüzeylere uyarlanabilirliği ve farklı bileşenlerin kaplama yapısına dahil edilebilmesi gibi avantajları nedeniyle geniş çapta ilgi görmektedir. Bu yöntemde, yüzeyle elektrostatik etkileşim kurabilen yüklü terapötik ajanlar (örneğin heparin, DNA) çok katmanlı yapıya kolaylıkla entegre edilebilirken; yüklü olmayan ve suda çözünmeyen bileşiklerin sistem içerisine dahil edilmesi daha sınırlı ve zorlu olmaktadır (Liu vd. 2024).

- Kimyasal Fonksiyonelleştirme

EDC (1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid) ve NHS (N-Hidroksi süksinimide) yöntemi, doku iskelesi yüzeyine protein, peptit veya diğer biyomoleküllerin kovalent olarak bağlanmasında yaygın şekilde kullanılan bir yöntemdir (Dubey ve Mequanint 2011; Guex vd. 2014). EDC, özellikle biyomoleküller arasındaki kovalent bağların oluşumunda kullanılan yaygın bir çapraz bağlayıcı ajandır. EDC, karboksil (-COOH) gruplarını aktif ara ürünlere dönüştürerek, bunların amino (-NH₂) grupları ile amid bağları oluşturmasını sağlar. Ancak EDC tarafından oluşturulan ara ürünler genellikle kararsızdır ve kolaylıkla hidroliz olur, bu da reaksiyon verimliliğini azaltabilir. Bu kararsızlığı azaltmak ve reaksiyon etkinliğini artırmak için, EDC ile birlikte NHS kullanılır. NHS, EDC ile aktive edilen karboksil grubuna bağlanarak daha stabil ve reaktif bir NHS-ester ara ürünü oluşturur. Bu ara ürün, amino gruplar ile daha kontrollü ve yüksek verimle amid bağları kurar. Oluşan NHS-ester, amin grupları ile reaksiyona girerek sağlam

ve spesifik amid bağları oluşturur. Reaksiyon sonunda suda çözünebilen EDC-üre yan ürünü ve NHS ayrılarak ortamdan uzaklaşır (Fischer 2010).

2.3 Sinir Doku Mühendisliğinde Kullanılan Hücre Kaynakları

Doku mühendisliğinde başarılı bir rejeneratif yanıt elde edilebilmesi, yalnızca uygun biyomalzeme ve biyosinyal moleküllerinin değil, aynı zamanda hedef dokuya özgü biyolojik işlevleri yerine getirebilecek hücrelerin de doğru seçimine bağlıdır (Bellamkonda ve Aebischer 1994; Langer ve Vacanti 2016). Bu bağlamda, hücre nakli hem hasarlı doku ve organların onarımı hem de sinir doku mühendisliği gibi rejeneratif tıbbın özel alanlarında umut verici bir strateji olarak öne çıkmaktadır. Nörojenik farklılaşma kapasitesine sahip çeşitli hücre tipleri bu alanda araştırılmakta olup; özellikle kök hücreler ile sinir sistemi destek hücreleri, sinir sistemi yaralanmalarının tedavisinde olumlu sonuçlarıyla dikkat çekmektedir.

Schwann hücreleri (SC'ler), periferik sinir sisteminde miyelinizasyonun sağlanması, aksonal rejenerasyonun desteklenmesi ve nörotrofik faktörlerin salınımı gibi işlevleriyle sinir doku onarımında kritik rol oynayan gliyal hücrelerdir (Bigbee 2022). Hasarlı bölgede akson büyümesine kılavuzluk yaparak yeniden miyelinizasyonu teşvik ederler. SC'ler, sinir dokusundan izole edilebilir, in vitro kültüre edilebilir ve çoğaltılabilir ve sinir klavuzlarına dahil edilerek rejenerasyonu teşvik edebilir (Allmeling vd. 2008). SC'lerin PSS'de ortaya çıkan nöroglialar olmasına rağmen, MSS'de yolların yeniden bağlanmasına dair çalışmalarda bulunmaktadır (Cao, Mao, ve Zhao 2018). Bununla birlikte, SC'lerin, primer kültürlerden elde edilmeleri zor ve çoğalma kapasiteleri sınırlı olduğundan, bu hücrelerin geniş ölçekli klinik uygulamalarda kullanımı kısıtlıdır (Dezawa 2002).

Benzer şekilde, olfaktör mukozadan türetilen progenitör hücreler de nöronal ve gliyal hücre hatlarına farklılaşabilme kapasiteleri, yüksek proliferasyon yetenekleri ve mikro çevreyle hızlı entegrasyonları sayesinde özellikle omurilik hasarlarının tedavisinde umut vadeden bir hücre kaynağıdır (Sethi vd. 2014). Transplantasyon sonrası çevresel adaptasyon kabiliyetlerinin yüksek olması ve immün yanıtı minimum düzeyde tetiklemeleri, bu hücrelerin sinir doku mühendisliğinde kullanım potansiyelini artırmaktadır (Alvites vd. 2021).

Nörojenik potansiyele sahip, embriyonik kök hücreler, uyarılmış pluripotent kök hücreler (iPSCs), nöral kök hücreler (NSCs) ve mezenkimal kök hücreler gibi farklı kök hücre tipleri, sinir sistemi hasarlarının tedavisinde araştırılmıştır (Dalton vd. 2023).

Embriyonik kök hücreler (ESC'ler), blastosist evresindeki embriyolardan türetilen ve pluripotent özellik taşıyan hücrelerdir. Teorik olarak tüm germ yapraklarına ait hücre tiplerine farklılaşabilmeleri, sinir dokusu dahil olmak üzere çeşitli rejeneratif uygulamalarda dikkat çekicidir (Cui vd. 2008). ESC'ler yüksek seviyede telomeraz aktivitesi içerirler ve hücre replikasyonu ile aktivasyonda azalma gözlenmez. Bu nedenle sınırsız proliferasyon kapasitesine sahiptirler. Sınırsız farklılaşma potansiyelleri avantaj olarak görülse de, teratom oluşturma riski, etik sorunlar ve immün reddetme potansiyeli bu hücrelerin klinik uygulamalarda kullanımını sınırlandırmaktadır (Varela vd. 2011). Diğer hücreler iPSC'ler, yetişkin somatik hücrelerin pluripotent kök hücrelere dönüşmesiyle üretilmiş hücrelerdir ve uygun koşullar altında birçok farklı hücre tipine farklılaşabilir (Kim ve de Vellis 2009; A. Wang vd. 2011). Ancak, klinik uygulamalarda iPSC'lerin güvenli bir şekilde kullanılabilmesi için, genetik yapıya müdahale edilmeksizin elde edilen, karyotipik olarak uzun süre stabil kalan yeniden programlanmış hücrelerin geliştirilmesi; bu hücrelerin hedef dokuya etkin şekilde farklılaştırılabilmesi ve tüm sürecin standart ve güvenli üretim yöntemleriyle gerçekleştirilmesi gerekmektedir (Ortuño-Costela vd. 2019).

Nöral kök hücreler, merkezi sinir sisteminden izole edilen ve nöron, astrosit ve oligodendrositlere farklılaşabilen hücrelerdir. Bu hücreler, doğrudan nöral soydan geldikleri için, sinir rejenerasyonunda hücre temelli tedavilerde uygulanacak en ideal kaynak olarak kabul edilir; bununla birlikte, bu hücrelerin yetişkin kökenlerinden toplanması zordur, sınırlı sayıda bulunurlar ve kültürde uzun süreli proliferasyon yetenekleri düşüktür. Ayrıca, nöral farklılaşmada kontrolsüzlük riski ve immünolojik uyum sorunları da bu hücrelerin yaygın klinik uygulamalarını sınırlandırmaktadır (Rahman vd. 2022) Mezenkimal kök hücreler (MKH' ler) kemik iliği, yağ dokusu, göbek kordonu, amniyon sıvısı gibi çeşitli kaynaklardan izole edilebilen, multipotent özellikteki hücrelerdir (Fitzsimmons vd. 2018). Nörojenik farklılaşmaya yönlendirilebilme yetenekleri, immünomodülatör özellikleri, tümör oluşturma riskinin düşüklüğü ve etik açıdan sorun teşkil

etmemeleri MKH'leri sinir doku mühendisliğinde cazip kılmaktadır (Margiana vd. 2022). Özellikle yağ dokusu kaynaklı MKH'ler (AD-MKH'ler), yüksek hücre verimi ve nörotrofik faktör sekresyon yeteneği ile periferik ve merkezi sinir sisteminde rejenerasyonu destekleyici hücreler olarak öne çıkmaktadır (Faroni vd. 2013; Wei vd. 2010).

2.3.1 Adipoz Dokusu Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler

Son yıllarda, yağ dokusunun çok yönlü kök hücrelerin zengin bir kaynağı olduğu bildirilmiştir. Hematopoietik kök hücreler gibi AD-MKH'ler de mezenkimal kökenlidir; ancak AD-MKH'ler daha bol miktarda bulunur ve izole edilmeleri nispeten daha kolay ve daha uygun maliyetlidir (Fitzsimmons vd. 2018). Dahası, yağ dokusundan elde edilen kök hücre verimi kemik iliğinden elde edilenden kat kat daha yüksektir (Strem vd. 2005). AD-MKH'ler mezodermden kaynaklansa da, farklı çalışmalar AD-MKH'ler mezodermal ve mezodermal olmayan soylara doğru farklılaşmasını tanımlamıştır (Romanov vd. 2005).

AD-MKH'lerin nöral fenotipe farklılaştırılması amacıyla çeşitli nöral indüksiyon modelleri geliştirilmiştir. AD-MKH'lerin nöral soylara farklılaşabileceği ilk kez Safford vd., tarafından bildirilmiştir (Safford vd. 2002). EGF ve bFGF ile ön indüklemeye tabi tutulan hücrelerin, valproik asit, bütillenmiş hidroksianisol, insülin ve hidrokortizon içeren ortamda hızlı morfolojik dönüşüm geçirdiği ve hücrelerde, Nestin, NeuN ve GFAP gibi nöral belirteçlerin ekspresyonu bildirilmiştir (Safford vd. 2004). Başka bir protokole, β -merkaptotanol ve dimetilsülfoksit içeren ortamlarda AD-MKH'ler nöral benzeri hücrelere farklılaştırılmış; Nestin ve NSE ekspresyonunu saptamışlardır (Cardozo, Gómez, ve Argibay 2012). Çalışmalarda, valproik asit, β -merkaptotanol, bütillenmiş hidroksianisol, insülin, indometasin ve dimetilsülfoksit gibi kimyasal indükleyicilerle kısa sürede morfolojik dönüşüm sağlandığı, Nestin, NSE, NeuN ve GFAP gibi nöronal/glial belirteçlerin ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (Jang vd. 2010; Ying vd. 2012; Zuk vd. 2002). Bununla birlikte; birçok çalışma farklılaşmanın geçici olduğu, hücrelerin kısa sürede kültür yüzeyinden ayrıldığı ya da fibroblast benzeri morfolojiye geri döndüğü bildirilmektedir. Bu bulgular, AD-MKH'lerin nörojenik farklılaşma potansiyelinin mevcut olduğu ancak bu sürecin stabil, fonksiyonel ve geri dönüşümsüz farklılaşma için daha gelişmiş indüksiyon yaklaşımlarına ihtiyaç duyduğunu göstermektedir (Salehi vd. 2016).

2.4 Biyoaktif Moleküller

2.4.1 2-aminoetansülfonik asit, Taurin

2-aminoetansülfonik asit, Taurin (Trn), omurgalılar ve omurgasızlar da dahil olmak üzere birçok hücre tipinde ve dokuda serbest bir amino asit olarak büyük miktarlarda bulunan ve protein üretimine katılmayan bir amino asittir. Trn yalnızca birkaç metabolik reaksiyona katılır, antioksidan görevi görür ve osmoregülatör işlevi görür (Huxtable 1992; Ripps ve Shen 2012). Trn, insan beyni, kalp, retina ve kas dokularında yüksek düzeyde ifade edilen bir amino asittir. Trn eksikliği, kardiyomiyopati, böbrek işlev bozuklukları ve gelişmekte olan sinir sisteminde çeşitli anomalilerle ilişkilendirilmiştir (Schaffer vd. 2010). Trn, gelişen sinir sisteminde trofik bir faktör olarak görev yapar. Merkezi sinir sisteminde en bol bulunan organik moleküllerden biri olan Trn, nörogelişimin önemli bir düzenleyicisi olarak kabul edilir, ancak erken beyin gelişimi, fonksiyonu ve onarımı sırasındaki kesin rolü/rolleri büyük ölçüde bilinmemektedir (Wu ve Prentice 2010). Omurgalılarda, embriyonik gelişim sırasında olgunlaşmamış beyindeki Trn seviyeleri yetişkin sinir sistemine göre daha yüksektir ve bu, yaşlanmayla birlikte azalır. Bu bulgu, Trn'in potansiyel gelişimsel rolünü göstermektedir (Sturman 1988). Trn takviyesinin, gelişmekte olan fare hipokampusunda kök hücre proliferasyonunu ve ayrıca sıçan hipokampal birincil kültüründe sinaptik proteinlerin ekspresyonunu arttırdığı ve muhtemelen fare beyninin genel konektomuna katkıda bulunduğu rapor edilmiştir (Shivaraj vd. 2012). Son çalışmalar, Trn'in bir beslenme faktörü olarak kullanılabileceğini ve beyindeki nöral kök hücrelerin (NSC'ler) çoğalmasını, farklılaşmasını, olgunlaşmasını ve hayatta kalmasını destekleme yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir (Hernández-Benítez vd. 2010). Sinir dokusu mühendisliği üzerine yapılan bir diğer dikkat çekici çalışmada, Wang ve arkadaşları, GelMA üzerinde Trn'i işlevselleştirerek sentezlenen Trn bazlı hidrojellerin, sinir kök hücre çoğalmasını teşvik ederek nöroprotektif etkilere sahip olduğunu bildirmiştir (Wang vd. 2024).

2.4.2 Tenasin C Türevli VSWRAPTA Biyoaktif Peptiti

Nöral doku mühendisliğindeki son araştırmalar, nakledilen hücrelerin kaderini değiştirebilen ve dokuda halihazırda mevcut olan endojen hücrelerin homeostazını

düzenleyebilen peptit dizilerinin keşfi üzerinde yoğunlaşmıştır. Çeşitli ESM proteinlerinden seçilen fonksiyonel amino asit sekansları, hücreler ve doku iskelesi arasındaki biyolojik uyumluluğu desteklemek için araştırılmıştır (Pugliese ve Gelain 2017).

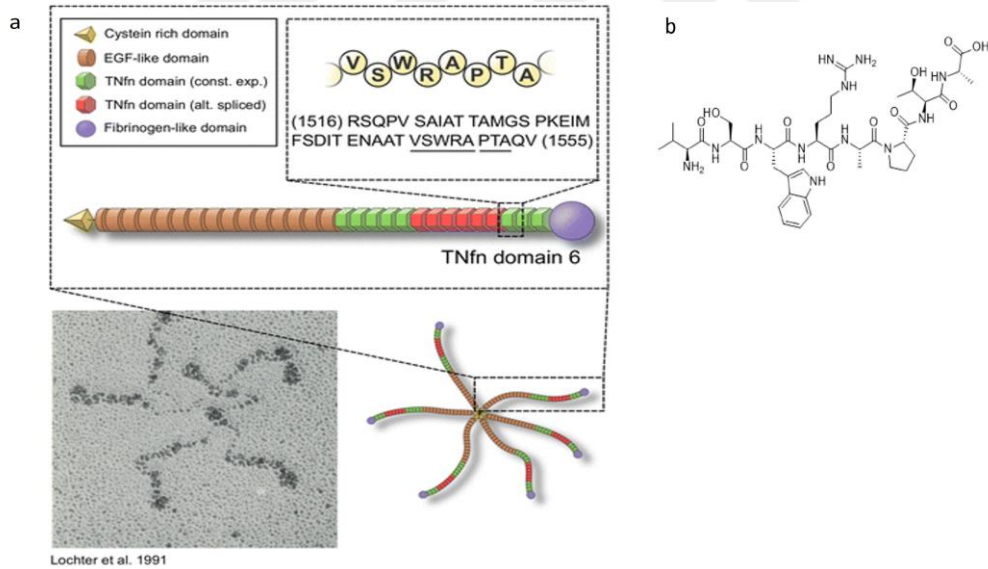
Tenasin protein sınıfı, Tenasin C (TnC), Tenasin-R, Tenasin-W ve Tenasin-X olmak üzere dört üyeden oluşmaktadır. Tüm tenasin proteinlerinde, sistein içeren bir N-ucunda oligomerizasyon bölgesi bulunur; bunu, ardışık heptad tekrarları, değişken sayıda epidermal büyüme faktörü (EGF) benzeri ve fibronektin tip III (FNIII) benzeri alanlar takip eder ve C-ucunda fibrinojen benzeri bir küre yer alır (Midwood vd. 2016). Bu multi modüler yapı, tenasinlerin çok sayıda ligandla etkili şekilde bağlanmasına olanak tanır ve böylece geniş bir işlev yelpazesini mümkün kılar (Giblin ve Midwood 2015).

TnC, gelişim sırasında ESM'de ve yetişkin MSS'de aktif nörojenez bölgelerinde yüksek oranda eksprese edilen glikoproteinlerden oluşan tenasin ailesinin bir üyesidir. TnC genellikle, merkezi bir küresel parçacıktan çıkan altı esnek kolun bulunduğu N-terminal alanının aracılık ettiği disülfür bağlı bir heksamerden oluşur. Her monomer, oligomerik proteinlerin, epidermal büyüme faktörü benzeri (EGFL) tekrarların, fibronektin tip III (FN III) tedavisi ve C terminalinde küresel bir fibrinojen alanında bulunan N-terminalindeki tenascin düzeni (TA) alanlarından oluşur (Tucić, Stamenković, ve Andjus 2021) (Şekil 2.6). FN III alanlarının içindeki alternatif düzenlenmeler, farklı izoformlar TnC'nin oluşumuna izin verir. TnC, integrinler dahil olmak üzere hücre yüzeyi reseptörleri ve aynı zamanda fosfakan gibi ESM bileşenleri, fibronektin ve kondroitin-sülfat proteoglikanlar ile doğrudan etkileşimler yoluyla hücre davranışını etkileyebilir ve birçok hücresel süreçte rol alır (Tucker ve Chiquet-Ehrismann 2015).

TnC'nin beyin gelişimi sırasında nöral progenitörlerin yönlendirilmesinde de görev aldığı bildirilmiştir (Chiquet-Ehrismann vd. 2014). Subventriküler bölgede (SVZ) yüksek düzeyde TnC ekspresyonu, FGF2'ye duyarlılığı artırarak ve EGF reseptör edinimini teşvik eden BMP4'e duyarlılığı azaltarak kök hücre nişine katkıda bulunur (Garcion vd., 2004). Tenasin C (TnC), ayrıca subventriküler zon (SVZ) bölgesinden göç eden nöroblastların, yeni internöronlara dönüşerek koku alma soğanına ulaştıkları rostral göç akışının ekstraselüler matriksinde yoğun olarak ifade edilmektedir (Chiquet-Ehrismann vd. 2014). TnC, hücre yapışmasını

sağlayan ve nörit büyümesini teşvik eden integrin bağımlı mekanizmalar yoluyla etki eder (Stamenkovi 2021; Tucker ve Chiquet-Ehrismann 2015)

Salgılanan bir hücre dışı matris glikoprotein olan TnC, patolojik uyarılara maruz kaldıktan sonra bol miktarda eksprese edilir. Beyin tümörleri, vasküler hastalıklar ve nörodejeneratif bozukluklar gibi durumlarda, TnC'nin enflamatuar yanıtları düzenleyerek ve beyin hasarına katkıda bulunarak; ayrıca çeşitli sinyal yolları aracılığıyla hücre proliferasyonu, göçü ve anjiyogenez süreçlerini destekleyerek kritik bir düzenleyici işlev üstlenir (Midwood ve Orend 2009). Son zamanlarda, TnC'nin çeşitli MSS hastalıklarının ortaya çıkması ve gelişmesindeki rolüne dikkat çekmektedir. Birçok çalışmada, TnC'nin kafa içi tümörler, subaraknoid kanama ve Alzheimer hastalığı gibi kafa içi hastalıklarda düzenleyici bir rolü olduğunu bulmuştur. Bu nedenle son yıllarda TnC, kafa içi hastalıklar için potansiyel bir terapötik hedef haline gelmiştir (Albacete-Albacete, Sánchez-Álvarez, ve del Pozo 2021).



Şekil 2.6 Tenasin C protein yapısı a) TnC altıkollu yapısı b) VSWRAPTA peptiti kimyasal yapısı (Jarocki vd., 2019).

Son yıllarda, TnC'nin farklı ek varyantlarına atıfta bulunan çalışmalar, TnC'nin değişken kombinasyonlarından ve alternatif olarak eklenmiş farklı FNIII alanlarının TnC molekülüne entegrasyonundan kaynaklanan çoklu fonksiyonlarını ortaya çıkarmaktadır (Şekil 1a)(Schaberg, Götz, ve Faissner 2022).

Embriyonik gelişim sırasında, ESM TnC glikoproteini, nörit büyümesini etkilediği ve spesifik fibronektin tip III (FNIII) alanları tarafından yönlendirildiği bilinen önemli bir bileşendir. Murin beyin gelişimi sürecinde 27 farklı Tn-C ek varyantının varlığı belirlenmiş olup, bu durum TnC izoformlarının nöronal mikro çevrelerin özelliklerinde önemli bir rol oynayabileceği yönündeki hipotezi desteklemektedir (Brösicke vd. 2015).

Çeşitli çalışmalar, nörit büyümesinin TnC tarafından uyarılmasının, TnC molekülünün farklı alternatif olarak eklenmiş FNIII alanı D'ye (TNfnD) bağlı olduğunu göstermiştir (Mercado vd. 2004). FNIII alanı D içerisinde, sekiz ardışık amino asit VFDNFVLK'nin korunmuş dizisinin, $\alpha\beta1$ integrin ile etkileşim yoluyla nörit uzaması sürecini kolaylaştırmak için gerekli olduğu bulunmuş (Meiners, Nure-Kamal, ve Mercado 2001) ve bu peptitin amfilik nanofiber jel substratlarına entegre edildiğinde, nörit büyümesini ve nörosfer kültürlerinden türetilen hücrelerin göçünü önemli ölçüde teşvik ettiği bildirilmiştir (Berns vd. 2016). Daha sonraki çalışmalarda TnC'nin 6. FNIII alanından türetilen yeni peptit dizisi VSWRAPTA (Şekil 1b) Brosicke vd. tarafından tanımlanmış ve bu biyoaktif peptit dizisinin tümör hücrelerinin hareketliliğini desteklediği ve nörit büyümesini teşvik ettiği bildirilmiştir (Brösicke vd. 2015). Daha ileri çalışmalarda bu sentetik oktapeptitin, embriyonik kortikal nöronların kültürlerine eklenmesinin fokal adezyon kinazının (FAK) ve hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz 1/2 (ERK1/2) yolunun trans-selüler aktivasyonu yolu ile nörit oluşumunu ve embriyonik kortikal nöronların dallanmasını arttırdığı bulunmuştur (Jarocki vd. 2019).

Bu çalışma, TnC ile işlevsel hale getirilmiş nanoyapıların sinir dokusu mühendisliğinde kullanımı için umut vadeden bir strateji olduğunu göstermiş ve bu doğrultudaki araştırmalara zemin hazırlamıştır.

3

DENEYSEL YÖNTEMLER

3.1 Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler

3.1.1 Kullanılan Cihazlar

Nanofibröz doku iskelelerinin üretimi, NE-100 model New Era şırınga pompası, Genvolt markalı yüksek voltaj güç kaynağı ve özel kesim bir metal plaka ile oluşturulmuş laboratuvar tipi bir elektroeğirme cihazında gerçekleştirilmiştir. Üretilen nanofiberlerin mikro yapı karakterizasyonu için Zeiss, EVO LS 10 modeli Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) kullanılmıştır. Olası kimyasal etkileşimlerin incelenmesi için, ATR aksesuarı aracılığıyla Perkin-Elmer FT-IR Spectrum One-B Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrofotometresi kullanılmıştır. Yüzey hidrofilik özellikleri Biolin Scientific marka Attension Theta line model optik temas açısı ölçüm cihazı kullanılmıştır. Hücre çalışmalarında spektrofotometrik ölçümler Labline Reader Mikroplaka okuyucusu vasıtasıyla kaydedilmiştir. Nanofibröz doku iskelelerine bağlanan peptit miktarlarının belirlenmesi için yapılan spektrofotometrik ölçümler Agilent Cary 60 UV-vis cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Hücresel farklılaşma çalışmalarında floresan görüntüler Zeiss LSM 510. Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop cihazında alınmıştır.

3.1.2 Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada nanofibröz doku iskelelerinin üretimi için kullanılan kitosan (orta moleküler ağırlıkta), Polivinil alkol (PVA) (96% hidrolize, tipik ortalama MW: 85000–124000) ve Trn (2-Aminoetansülfonik asit, Mw:125,15 g/mol) Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)’den, Sodyum hidroksil (NaOH), asetik asit (Glisal), methanol ve etanol (saflık $\geq$ %99,9) Isolab Kimya (İstanbul)’dan satın alınmıştır. Hücre çalışmalarında kullanılan; Fetal sığır serumu (FBS), Antibiyotik solüsyonu (100x), %0,25 Trypsin-EDTA (1×), XTT:[2,3-Bis-(2-Metoksi-4-Nitro-5-

Sülfofenil)-2H-Tetrazolyum-5-Karboksanilid] Gibco'dan satın alınmıştır. Nöral farklılaşma için kullanılan, β -merkaptoetanol (BME) Merck KGaA (Germany) firmasından, all-trans retinoik asit (ATRA) Cayman Chemical firmasından satın alınmıştır. Rekombinant insan FGF basic ve epidermal büyüme faktörü (EGF) ve immunoflorohistokimyasal boyamalarda kullanılan Anti-nestin primer ve Alexa flour 4888 sekonder antikorlar Proteintec firmasından satın alınmıştır.

Nanofiböz iskelelerinin fonksiyonellerştirilmesi için kullanılan VSWRAPTA peptiti (Mw: 886,99 g/mol, Cas NO:2229829-30-3), saflık >96) GenScript firmasında temin edilmiştir.

3.1.3 Kullanılan Hücreler

Çalışmalarda kullanılan insan nöroblastoma hücre hattı SH-SY5Y (CRL-2266) ATCC (American Type Culture Collection (ATCC, USA) firmasından temin edilmiş ve *in vitro* hücre çalışmalarında kullanılmıştır. Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler (AD-MKH'ler), Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden satın alınmış ve deneylerde kullanılmıştır.

3.2 Taurine Eklenmiş PVA/Kitosan Nanofibröz Doku İskelelerinin Üretimi

3.2.1 Elektroegirme Çözeltilerinin Hazırlanması

Kts çözeltisi, %4 'lük asetik asit (h/h) içerisinde %3 (a/h) konsantrasyonda olacak şekilde 4 saat boyunca 55 °C'de sürekli karıştırma altında hazırlandı. Kts'nin tamamen çözülmesi için çözelti oda sıcaklığında gece boyunca karıştırılmaya bırakıldı. Çözünmeyen partiküllerin uzaklaştırılması için 3000 rpm'de 15 dakika santrifüjlendi. PVA çözeltisi, %12 (a/h) konsantrasyonda distile su içinde 80°C'de 7 saat karıştırılarak hazırlandı. Daha sonra PVA/Kts çözeltileri 7:3 (h/h) oranlarında birleştirildi ve homojen bir çözelti sağlamak için çözelti 4 saat karıştırıldı.

Taurin dahil edilmiş PVA/Kts nanofibröz iskelelerin (PVA/Kts/Trn) hazırlanması için total polimer ağırlığına göre %1 ile %20 arasında değişen taurin kullanıldı. PVA/Kts çözeltisi hazırlandıktan sonra toz haldeki Trn polimerik çözeltiye eklenmiş ve 2 saat karıştırılmıştır. Çalışma çözeltilerinin oranları Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1 Çalışma solüsyonlarındaki Taurin oranları ve örnek kısaltmaları

Örnek kısaltması	Polimer çözelti oranları (h:h)	Taurin oranı (wt%)
PVA/Kts	7:3	0
PVA/Kts/Trn%1		1
PVA/Kts/ Trn%5		5
PVA/Kts/ Trn%10		10
PVA/Kts/ Trn%20		20

3.2.2 Taurin Yüklü Poli (Vinil Alkol)/Kitosan Nanofiberlerinin Üretimi

PVA/Kts ve PVA/Kts/Trn nanofibröz iskelelerin üretimi elektroğirme cihazında gerçekleştirildi. Bunun için; taze hazırlanmış PVA/Kts ve taurin içeren PVA/Kts polimer çözeltisi 10 mL'lik bir enjektöre aktarıldı. Daha sonra enjektörün ucuna 22 gauge'lık (iç ve dış çap 0,41 mm 0,70 mm) bir uç takılarak, uç ile toplayıcı arasındaki mesafe 15 cm olarak ayarlandı. Elektroğirme işlemi için voltaj 21 kV'da ayarlandı ve akış hızı 0,6-0,8 mL/saat olarak belirlendi. Rastgele hizalanmış iskeleler elde etmek için nanofiberler toplayıcı plaka üzerine yerleştirilen yağlı kağıt üzerinde toplandı. Kâğıt yüzeyinden ayrılabilen bir nanofiböz mat yapısı elde etmek için işlem 4 saat boyunca (yaklaşık 2,4 ila 3 mL polimer çözeltisi) sürdürüldü. Elektroğirme işlemi, %40 nem oranı ve yaklaşık 22-23 °C oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

3.2.3 PVA/Kts/Trn Elektroğrılmış Nanofiböz Doku İskelelerinin Mikro Yapısı

Mikro yapı incelemesi için 10,00 kV'da çalışan bir Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) kullanıldı. Tüm PVA/Kts nanofiböz doku iskelesi örnekleri, SEM ile

görüntülenmek üzere 2 dakika boyunca argon gazı ortamında ve 30 mA'da altınla kaplandı. Ortalama fiber boyutlarının belirlenmesi için, alınan mikrograflar üzerinden, rastgele seçilen 200 nanofiberin ortalama çapları, ImageJ (National Institutes of Health, sürüm 1.520 yazılımı, ABD) görüntü analiz yazılımı kullanılarak ölçüldü.

3.2.4 Kimyasal Yapı İncelemesi

Farklı kimyasal türlerin tanımlanması için zayıflatılmış toplam yansıma Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (ATR-FTIR) analizi gerçekleştirildi.

Spektrum taraması 600– 4000 cm⁻¹ aralığında analiz edildi.

3.2.5 Yüzey Hidrofilitesi ve Şişme Özelliklerinin Belirlenmesi

PVA/Kts ve PVA/Kts/Trn nanofibroz iskelelerin ıslanabilirliği, temas açısı ölçümü ile belirlendi. Örnekler, CCD video kamera ve veri işleme sistemi ile donatılmış bir optik temas açısı ölçüm cihazına yerleştirildi ve nanofiberlerin üzerine su damlatılarak görüntüler kaydedildi. Temas açısı ölçümü, yakalanan görüntüden hemen elde edildiği için, su sıvı damlasının test numunesinin yüzeyinde oluşturduğu temas açısından hesaplandı.

Şişme özellikleri, 37 °C'de PBS'de (pH 7,4) su alma testi ile araştırıldı. Eşit ağırlıktaki numuneler PBS'ye daldırıldı ve belirli zaman aralıklarında çıkarılarak ağırlıkları ölçüldü. Şişmiş numunelerin ağırlığını ölçmeden önce, matlardaki fazla su filtre kağıdıyla çıkarıldı. Şişme derecesi (SD) aşağıdaki denklem (3.1) kullanılarak hesaplandı;

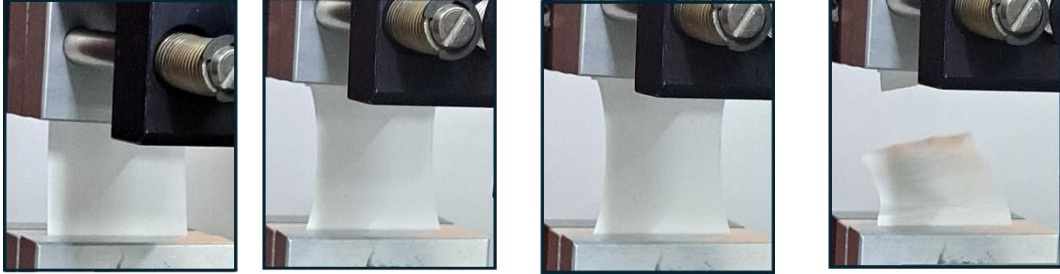
$$SD (\%) = \frac{W_d - W_w}{W_d} \times 100 \quad (3.1)$$

W_d kuru ağırlıktır ve W_w sırasıyla şişmiş numunelerin tanımlanan zamandaki ağırlığıdır. Tüm deneyler en az 3 tekrarlı (n=3) gerçekleştirilmiş ve veriler ortalama ± standart sapma (SD) olarak ifade edilmiştir.

3.2.6 Mekanik Özellikler

Nanofibroz iskelelerinin çekme dayanımı (TS, MPa) ve kopma anındaki uzama yüzdesi (%EB) gibi mekanik özellikleri bir doku analizatörü cihazı kullanılarak belirlendi. İskele örnekleri 2×4 cm'lik dikdörtgenler halinde kesildi. Oda sıcaklığında ve %53 bağıl nemde 24 saatlik bir şartlandırma periyodunun ardından, iskeleler çekme kavramaları arasında 20 mm arayla yerleştirildi. Çekme testleri 5

kg'lık bir yük hücresi ve 1 mm/sn'lik bir çapraz kafa hızı kullanılarak gerçekleştirildi. Uzunmaya Karşı Direnç (N) ve kopma anındaki uzama ölçüldü ve sonuçlar hesaplanan kopma anındaki uzama (%EB) ve çekme dayanımı (MPa) olarak ifade edildi.



Şekil 3.1 Doku analizatör cihazında uygulanan çekme testi

3.2.7 Taurin Sitoksisitesi ve Nanofibröz İskelelerin Sitouyumluluğu

Trn ve Trn dahil edilmiş PVA/Kts nanofibröz doku iskelelerinin sitouyumluluğu, insan nöroblastoma hücre hattı SH-SY5Y üzerinde XTT hücre canlılığı testi ile incelendi. Hücreler, %10 fetal sıgır serumu (FBS) ve %1 penisilin/streptomisin içeren Dulbecco'nun modifiye edilmiş Eagle ortamı (DMEM-F12) kullanılarak standart kültür koşullarında yetiştirildi. Farklı taurin konsantrasyonları içeren taurin yüklü PVA/Kts nanofibröz iskelelerin sitotoksisitesi, ISO 10993-5:2009 standardının dolaylı ekstraksiyon protokolüne uygun olarak gerçekleştirilen XTT hücre canlılığı testi ile değerlendirildi. Örnekler, 2 cm²/mL'de DMEM-F12 ortamında 24 saat boyunca 37 °C'de dolaylı sitotoksisite incelemesi için ekstrakte edildi. SH-SY5Y hücreleri 2×10⁴ hücre/kuyu yoğunluğunda 96 kuyulu bir plakaya ekildi ve hücre tutunması için plaka yüzeyinde kültürlendi. Daha sonra, kuyulardaki kültür ortamı, çeşitli seyreltmelerde (100:0, 75:50, 50:50 ve 25:75) iskele ekstraktı içeren ortamlarla değiştirildi. Taurinin sitotoksisitesi 25-1000 µg/mL aralığındaki konsantrasyonlarda incelendi. 24 saatlik bir inkübasyon süresinden sonra, ortam XTT (0,4 mg/mL, %0,1 (v/v) PMS) içeren bir ortamla değiştirildi ve 4 saat daha inkübe edildi. Son olarak, her bir kuyunun absorbans değeri bir mikro plaka okuyucusu vasıtasıyla 450 nm'de okundu. Taurin ve iskele ekstraktı içermeyen tam ortam kuyuları kontrol olarak kullanıldı. Hücre canlılığı, aşağıda belirtilen formül (3.2) ile hücre canlılığının kontrol hücrelerine göre yüzdesi olarak hesaplandı.

$$\text{Hücre canlılık (\%)} = \frac{\text{Muamele edilen hücre OD450}}{\text{Kontrol hücre OD450}} \times 100 \quad (3.2)$$

Tüm deneyler en az 3 tekrarla (n=3) gerçekleştirildi ve veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak ifade edildi.

3.2.8 Nanofibröz İskelelerin Hücre Proliferasyonu Üzerindeki Etkisi

Nanofibröz doku iskelelerinin SH-SY5Y hücreleri üzerindeki olası proliferatif etkilerinin incelenmesi için, steril örnekler $1 \times 1 \text{ cm}^2$ boyutlarında kesildi ve 24 kuyulu hücre kültürü plakalarına yerleştirildi. Hücrelerin örneklere yapışmasını sağlamak için örneklere tam ortam eklendi ve 37°C 'de 6 saat inkübe edildi. Daha sonra, kuyulardaki besiyeri çekilerek ve hücreler, örnekleri içeren kuyulara 2×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde ekildi. XTT hücre canlılığı testi, 24 ve 72 saat süresince iskeleler üzerinde kültürlenmiş hücrelerde gerçekleştirildi. XTT ile inkübasyondan sonra, süpernatant çekilerek kuyulardaki ortam 96 kuyulu plakalara aktarıldı ve absorbans değerleri 450 nm'de ölçüldü ve hücre canlılığı OD₄₅₀ değerleri olarak ifade edildi.

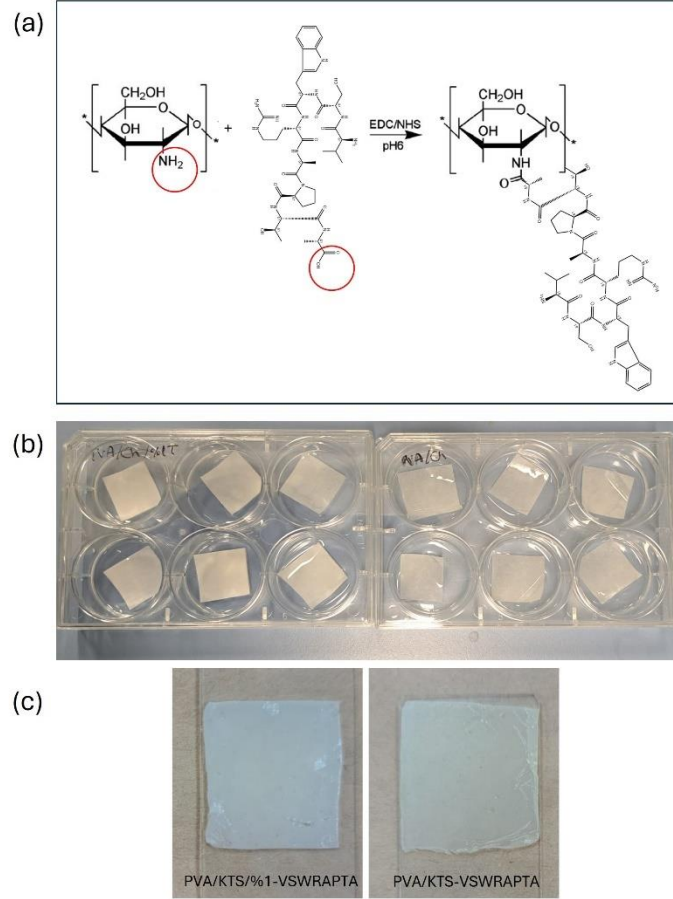
Tüm deneyler en az 3 tekrarla (n=3) gerçekleştirildi ve veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak ifade edildi.

3.3 Peptit ile Yüzey Fonksiyonelleştirilmiş Nanofibröz Doku İskelelerin Üretimi ve Karakterizasyonu

3.3.1 VSWRAPTA Biyoaktif Peptiti ile PVA/Kts ve PVA/Kts/Trn Nanofibröz Doku iskelelerinin Fonksiyonelleştirilmesi

TnC türevli VSWRAPTA peptitini PVA/Kts ve PVA/Kts/Trn iskelelerine bağlamak için Vipin ve Onak tarafından bildirilen karbodiimid çapraz bağlama yöntemi prosedür optimize edilerek kullanılmıştır (Onak, Ercan, ve Karaman 2020; Vipin vd. 2023). Karbodiimid çapraz bağlama, lif bozulma riskini en aza indiren hafif ve sulu koşullar altında gerçekleştirilebilen bir yöntem olduğu için seçilmiştir (Bullock vd., 2021). Üretilen PVA/Kts nanofiber iskeleler, asidik bileşenleri gidermek için 30 dakika boyunca 3M NaOH (metanolde çözölmüş) çözeltisine batırılarak nötralizasyon işlemine tabi tutuldu. Nötralizasyon işleminden sonra, nanofiberler sırasıyla %70 ve %50 metanol çözeltisiyle yıkandı ve 24 saat boyunca dondurularak kurutuldu. Nötralizasyon edilmiş iskeleler, 0,1 M 2-Morfolinoetansülfonik asit tamponunda (MES; pH 6,5) 60 dakika inkübe edildi.

Daha sonra çapraz bağlama için nanofibröz iskelelere ağırlıkça %1 (a/a) oranında olacak şekilde ($2 \times 2 \text{ cm}^2$ boyutlarında örnek için mg başına 10 kat μg peptit içerecek şekilde) peptit uygulanmıştır. VSWRAPTA peptiti 5 mM 1-etil-(dimetilaminopropil) karbodiimid (EDC) ve 12,5 mM N-hidroksi-sülfosüksinimid (NHS) içeren MES tamponu içinde nanofibröz doku iskelelerine uygulanarak ve 24 saat boyunca 4°C 'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası nanofibröz doku iskeleleri iki kez PBS ile yıkandı ve kurutuldu.



Şekil 3.2 PVA/Kts nanofibröz iskelelerin VSWRAPTA peptit ile işlevselleştirilmesi a) EDC/NHS ile peptit bağlanma reaksiyonu b) Doku iskelelerinin peptit ile inkübasyonu c) İnkübasyon sonrası doku iskeleleri (Trn içeren /içermeyen)

3.3.2 Fonksiyonelleştirilen Nanofibröz Doku iskelelerindeki Peptit Miktarının Belirlenmesi

PVA/Kts nanofibröz matların üzerindeki peptit miktarının belirlenmesi için, Micro-BCA analizi kullanıldı. BCA analizi için, VSWRAPTA peptitinin MES tamponu içinde $0,25\text{--}250 \mu\text{g/mL}$ aralığındaki değişen aralıktaki farklı konsantrasyonları hazırlandı ve kit protokolüne uygun olarak peptitin standart BCA eğrisi oluşturuldu.

Nanofibröz doku iskelelerine bağlanan peptit miktarlarının hesaplanabilmesi için çözeltilerde bulunan bağlanmamış peptitlerin miktar ölçümü BCA ile yapıldı. Nanofiber matrislere kaplanan peptit miktarı, kaplama sonrası solüsyondaki peptit miktarlarının, kaplama çözeltisindeki belirlenen başlangıç peptit miktarlarından çıkarılmasıyla hesaplanmış (Ai, Liu, ve Goh 2021) ve sonuçlar aşağıdaki formül kullanılarak nanofiber matrisin mg'ı başına bağlanan µg peptit olarak ifade edilmiştir (Kapoor vd. 2009; Onak vd. 2020).

$$\text{Bağlanan peptit miktarı } (\mu\text{g/mg}) = \frac{(W_{0\text{Abs}562} - W_{1\text{Abs}562}) \times k}{\text{İskele kuru ağırlığı}} \quad (3.3)$$

$W_{0\text{Abs}562}$; başlangıç peptit solüsyonu absorbans değeri, $W_{1\text{Abs}562}$; inkübasyon sonrası bağlama solüsyonunun absorbans değeri ve k; BCA standart eğrisinden elde edilen katsayıdır.

3.3.3 Peptit ile Fonksiyonelleştirilmiş Nanofibröz Doku İskelelerin Karakterizasyonu

3.3.3.1 Mikro Yapının İncelemesi

Mikro yapının incelemesi, Bölüm 3.2.3'te açıklanan Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) analizi ile gerçekleştirildi.

3.3.3.2 FT-IR ile Kimyasal Analiz

Kimyasal yapıların tayini ve peptit fonksiyonelleştirmenin doğrulanması için ATR-FT-IR spektroskopisi Bölüm 3.2.4'te açıklanan şekilde gerçekleştirildi.

3.3.3.3 Şişme ve Biyobozunma

Fonksiyonelleştirilmiş nanofibröz iskelelerin şişme özellikleri, 37 °C'de PBS'de (pH 7,4) su alma testi ile Bölüm 3.2.5'te açıklanan şekilde gerçekleştirilmiştir. İskelelerin biyobozunma çalışmaları 37 °C'de PBS'de (pH 7,4) belirlenen süreler için ağırlık kaybı ölçümleriyle incelenmiştir.

Bunun için iskelelerin kuru ağırlıkları ölçülmüş ve PBS içerisinde belirli sürelerde inkübasyona bırakılıp daha sonra çıkartılıp kurutulmuş ve ağırlıkları tekrar ölçülmüştür.

3.4 Fonksiyonelleştirilmiş Nanofibröz Doku İskelelerinin Kök Hücreler Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi

3.4.1 Mezenkimal Kök Hücre Kültürü

İnsan adipoz doku kaynaklı kök hücreleri (AD-MKH), Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden satın alınmış ve deneylerde kullanılmıştır. İnsan AD-MKH'lerinin kültürü, mezenkimal kök hücre uyarıcı takviyeleri, L-glutamin, %1 pen./strep. içeren %10 FBS ile desteklenmiş insan mezenkimal kök hücre bazal büyüme ortamında, 37 °C'de nemli %5 CO₂ ortamında gerçekleştirildi. İlk aşamada temin edilen hücreler çoğaltılarak düşük pasaj sayılarında dondurularak ileri çalışmalarda kullanılmıştır.

3.4.2 Biyoaktif Maddelerin Sitotoksitesinin İncelenmesi

PVA/Kts nanofibröz doku iskelelerinin fonksiyonelleştirilmesi için kullanılan VSWRAPTA peptitinin AD-MKH'ler üzerindeki olası sitotoksik etkileri hücre canlılığı testi ile incelendi. Hücre canlılığı testi için AD-MKH'ler 1×10⁴ hücre/kuyu yoğunluğunda L-glutamin, %1 pen./strep. içeren %10 FBS ile desteklenmiş DMEM/F12 ortamı içerisinde 96'lı kültür plakalarına ekilerek 24 saat boyunca hücrelerin plaka yüzeyine tutunması için inkübe edildi. Daha sonra hücreler 5-150 µg/mL aralığındaki farklı konsantrasyonlarda peptit içeren besi ortamlarıyla 24 saat boyunca muamele edildi. İnkübasyon süresinin ardından ortam XTT içeren ortamla değiştirildi ve 4 saat daha inkübe edildi. Son olarak, mikro plaka okuyucu vasıtasıyla kuyucukların 450 nm'deki absorbans değerleri alındı ve hücre canlılığı aşağıdaki formül (3.2) kullanılarak hesaplandı. Numune içermeyen kuyucuklar negatif kontrol olarak kullanıldı. Deneyler 5 tekrarlar (n=5) gerçekleştirildi ve veriler ortalama ± standart sapma (SD) olarak hesaplandı.

$$\text{Hücre canlılık (\%)} = \frac{\text{Muamele edilen hücre OD450}}{\text{Kontrol hücre OD450}} \times 100 \quad (3.2)$$

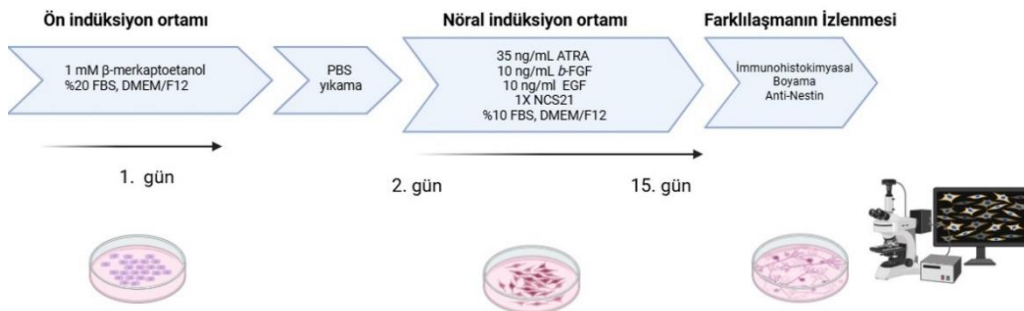
3.4.3 Biyoaktif Maddelerin Hücre Göçü Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi (Çizik Testi)

Nanofibröz doku iskelelerinin fonksiyonelleştirilmesi için kullanılan taurin ve VSWRAPTA peptitinin AD-MKH'lerin in vitro hücre göçü üzerindeki etkisi çizik kapatma testi ile incelendi. Çizik testi için hücreler 12 kuyulu plakalara 4×10⁵ hücre/kuyu yoğunluğunda ekildi ve %95 konfluent olana kadar %5 CO₂ atmosferinde 37 °C'de inkübe edildi. Daha sonra çizikleri oluşturmak için besi ortamının uzaklaştırıldığı kuyulardaki tek hücre tabakası p200 pipet ucuyla tek bir çizgi halinde hafifçe çizildi. Kuyular bağlanmamış hücreleri çıkarmak için 2 kez

PBS ile yıkandı. Daha sonra, çizik oluşturulmuş kuyular guruplara ayrıldı ve 100 µg/mL Trn ve 50 µg/mL VSWRAPTA peptiti içeren besi ortamları eklendi. Kontrol olarak biyoaktif madde içermeyen ortam kullanıldı. Oluşturulan çiziklerin kapanması 48 saat boyunca ve farklı zaman aralıklarında (0., 6., 12. ve 24 saat) 100× büyütme ters mikroskopla takip edildi. Oluşturulan çizik alanlarının kapanma yüzdeleri ImageJ (Ulusal Sağlık Enstitüleri, sürüm 1.520 yazılımı, ABD) görüntü analiz yazılımı kullanılarak analiz edildi.

3.4.4 Mezenkimak Kök Hücrelerin Nöral Farklılaştırılması ve Biyoaktif Maddelerin Farklılaşmaya Etkisi

AD-MKH'lerin nöral farklılaşma potansiyellerinin incelenmesi için farklılaşma analizleri gerçekleştirilmiştir. Bunun için; AD-MKH'ler 48 kuyucuklu plakalara 3×10^3 hücre/kuyu olacak şekilde %10 FBS ve %1 pen./strep. ile desteklenmiş DMEM/F12 ortamıyla ekildi. Kültür yaklaşık %80-%85 konfluent olduğunda, kültür ortamı %20 FBS, %1 pen./strep. ve 1 mM β-merkaptoetanol (BME) içeren DMEM/F12 ön indüksiyon ortamıyla değiştirilmiş ve 24 saat muamele edilmiştir. Daha sonra ön indüksiyon ortamı uzaklaştırılarak, kuyulara %20 FBS, %1 (h/h) pen./strep., 35 ng/mL all trans-retinoik asit (ATRA), 10 ng/mL b-FGF, 10 ng/mL EGF, 1X NCS21 içeren DMEM/F12 ortamdan oluşan nöral indüksiyon ortamı eklenmiştir. İndüksiyon ortamı her 3 günde bir değiştirilmiş ve hücreler 14 gün boyunca takip edilmiştir.



Şekil 3.3 AD-MKH'lerin nöral farklılaştırma süreci

3.4.5 İmmunohistokimyasal Boyama

Fonksiyonelleştirilmiş nanofibröz iskeleler üzerinde kültürlenmiş hücrelerde, nöral indüksiyonun 14. gününde farklılaşmanın izlenmesi için floresan işaretli antikörlerle immünohistokimyasal boyama gerçekleştirilmiştir. İmmünohistokimyasal analiz için ilk olarak hücreler üzerindeki besiyeri uzaklaştırılarak üç kez PBS ile yıkama işlemi yapılmıştır. Daha sonra hücreler %4 paraformaldehid ile 20 dk boyunca fikse edilmiş ve PBS yıkama işlemi tekrarlanmıştır. Daha sonra hücreler, PBS içinde hazırlanan 0.5% Triton X-100 geçirgenlik tamponuyla 15 dk inkübe edilmiştir. 3 kez PBS ile yıkamanın ardından spesifik olmayan bağlanmaların bloke edilmesi için hücreler 60 dk süreyle %3 BSA içeren blokaj solusyonu ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası 1:400 oranında seyreltilmiş Anti-Nestin primer antikoru eklenip, 4 oC' de karanlık ortamda gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra, bağlanmayan antikörlerin uzaklaştırılması için PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiş ve hücreler 1:500 oranında seyreltilmiş CoralLite®488 (yeşil) goat anti-mouse IgG ikincil antikörlerle 90 dakika karanlık ve nemli bir ortamda inkübe edilmiştir. PBS ile yıkamanın ardından çekirdek boyaması için 1:5000 dilüsyonunda 4,6-diamidino-2-fenilindol hidroklorür (DAPI) ile oda sıcaklığında 30 dakika süreyle inkübe edilmiş ve üç kez PBS ile yıkanmıştır (Ravichandran vd., 2013). Hücrelerde nestin belirteç proteini bir lazer taramalı konfokal mikroskop kullanılarak incelenmiştir.

3.4.6 Fonksiyonelleştirilmiş İskelelerinin AD-MKH'ler için Sitouyumluluğu ve Proliferasyona Etkileri

Peptitle fonksiyonelleştirilmiş PVA/Kts nanofibröz iskelelerin biyouyumluluğu, ISO 10993-5 standardına uygun olarak dolaylı ekstraksiyon metodu ile XTT hücre canlılığı yöntemi kullanılarak değerlendirildi. Nanofiber iskeleler deneylerde kullanılmadan önce 4 saat boyunca UV ile sterilize edildi. Dolaylı ekstraksiyon için örnekler mL başına 2 cm² olacak şekilde DMEM-F12 ortamında 37 °C'de 24 saat bekletilerek ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi. AD-MKH'ler, 96 kuyucuklu bir plakaya 1×10⁴ hücre/kuyu yoğunluğunda ekildi ve plaka yüzeyine hücre bağlanması için %5 CO₂ atmosferinde 37 °C'de 24 saat süreyle inkübe edildi.

İskelelerin sitouyumluluk incelemesi için kültür ortamı uzaklaştırıldı ve iskele ekstraktı içeren ortamlar, kuyucuklara eklendi (Mutlu vd. 2023). 24 saatlik

inkübasyonun ardından ortam, %0,1 (h/h) PMS ve 0,4 mg/mL XTT içeren ortamla değiştirildi ve 37 °C'de 4 saat daha inkübasyonun ardından, her bir kuyucuğun absorbansı bir mikropilaka okuyucu kullanılarak 450 nm'de ölçüldü. Nanofibröz iskele ekstraktı içermeyen tam büyüme ortamı kuyucukları kontrol olarak kullanıldı. Hücre canlılığı, kontrol hücrelerine karşı muamele edilen hücrelerin yüzdesi olarak ifade edildi.

Doku iskelelerinin proliferatif etkilerinin incelenmesi amacıyla, steril numuneler 1×1 cm² boyutlarında kesilerek 24 kuyucuklu hücre kültür plaklarına yerleştirildi. Daha sonra her bir nanofibröz iskele örneği üzerine 3×10⁴ hücre/cm² olacak şekilde hücre ekimi yapıldı ve toplam 7 gün boyunca kültürlendi. Kültürün 1., 3., ve 7., günlerinde hücre canlılığını belirlemek için XTT hücre canlılığı testi uygulandı ve 450 nm'de absorbans değerleri ölçüldü. Deneyler paralelli olarak gerçekleştirildi ve kontrol olarak aynı sayıda hücrenin ekildiği kuyucuklar kullanıldı.

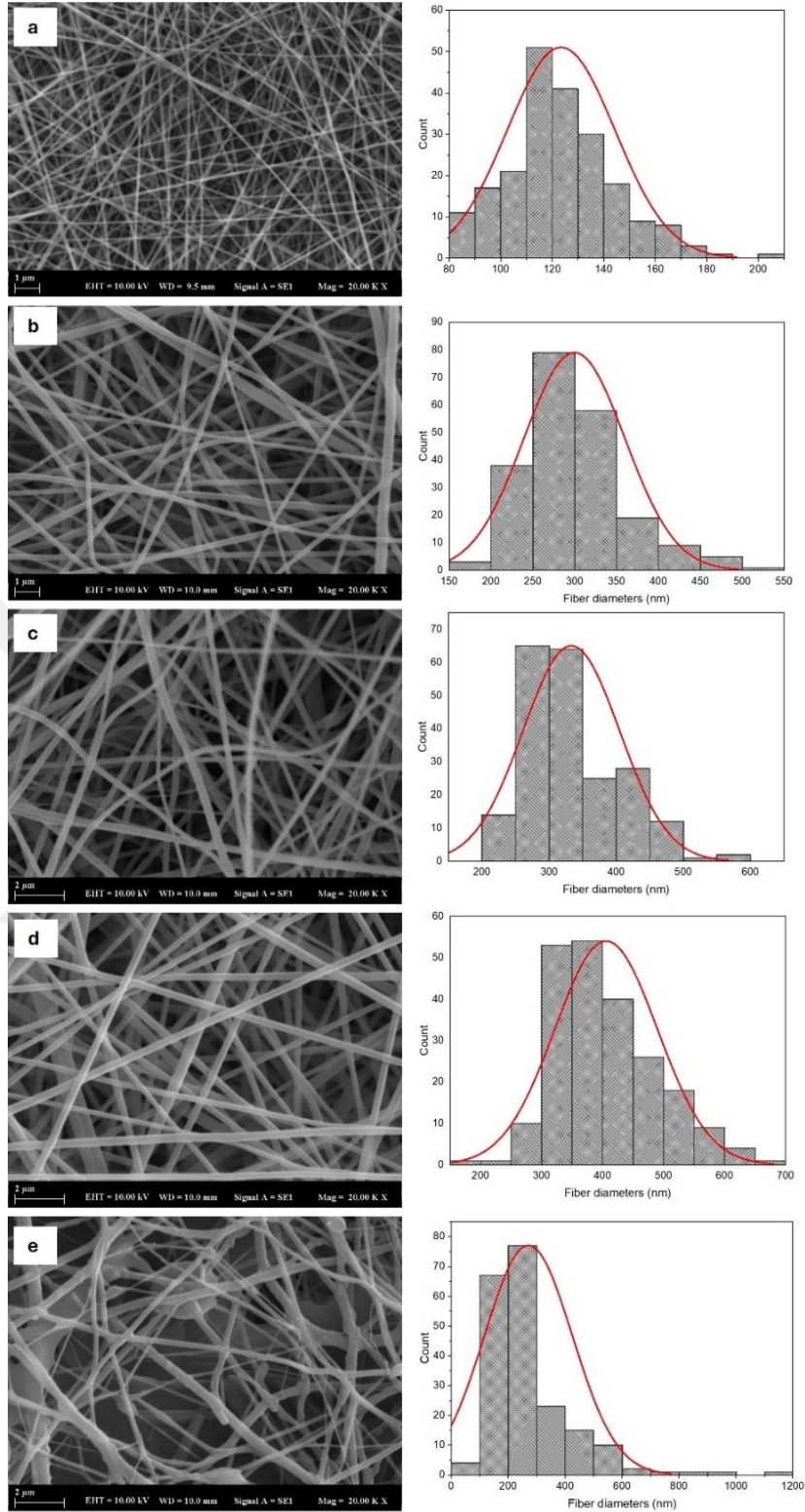
3.4.7 Hücre Yapışmasının İncelenmesi

Nanofibröz iskeleler üzerinde kültürlen AD-MHK'lerin, iskele üzerinde varlığının ve hücre dağılımının incelenmesi için DAPI boyaması gerçekleştirildi. Hücrelerin nanofibröz iskeleler üzerindeki dağılımı floresan mikroskop altında görüntülendi.

4.1 Taurin Yüklü PVA/Kts Doku İskelelerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

4.1.1 Nanofibröz İskelelerin Mikro Yapısı

Elektroegirme işleminden sonra elde edilen PVA/Kts ve PVA/Kts/Trn nanofibröz iskelelerin mikro yapısını ve fiber boyut dağılımlarını gösteren SEM mikrografları Şekil 4.1'de sunulmaktadır. Nanofibröz iskelelerin SEM görüntüleri, PVA/Kts ve taurin içeren PVA/Kts nanofiber mat formlarında birbirine bağlı nano boyutlu liflerden oluşan gözenekli bir yapı olduğunu göstermektedir. Bu, üretilen nanofibröz iskelelerin hücre yapışması ve çoğalması için doğal hücre dışı matrise yakın bir form oluşturabileceğini göstermektedir (Xie vd. 2010). Ancak, nanofiber yapıya Trn eklenmesi, lif boyutlarında ve yapısında önemli değişikliklere yol açmıştır. Tablo 4.1'de sunulan iskelelerin ortalama lif boyutları, Trn miktarının kütlece %10'a kadar artırılmasının ortalama nanofiber çapını artırdığını göstermektedir. İskelelere %1 Trn eklenmesi, $299,6 \pm 60$ nm ortalama lif çapı ile lif boyutlarında önemli bir artışla sonuçlanmıştır; bu değer PVA/Kts iskeleler için $123,4 \pm 20$ nm'dir. İskelelere dahil edilen Trn konsantrasyonunun %10'a kadar artırılması da ortalama lif çaplarında sabit bir artışla sonuçlandı. Ancak, polimerik çözeltide kütlece %20 oranında Trn mevcut olduğunda, boncuk yapıları gözlemlendi ve bu da düzensiz boyutlu liflere ve ortalama lif çaplarında bir azalmaya neden oldu (Şekil 4.1e). Benzer şekilde, Farzamhar ve diğerleri, farklı miktarlarda Trn içeren PCL/jelatin elektroegrilmiş matlarda ortalama lif çapının %5 taurin konsantrasyonuna kadar arttığını, ancak %10 konsantrasyonda önemli ölçüde azaldığını bildirmiştir (Farzamfar vd. 2018).



Şekil 4.1 Farklı miktarlarda Trn içeren PVA/Kts nanofiböz doku iskelelerinin SEM görüntüleri ve fiber boyut dağılımları (a) PVA/Kts (b) PVA/Kts/Trn1% (c) PVA/Kts/ Trn5% (d) PVA/Kts/ Trn10% (e) PVA/Kts/ Trn20%

Trn oranlarındaki artışla ortalama nanofiber çaplarındaki büyük artış, Trn'nin neden olduğu çözelti viskozitesindeki değişikliklere bağlanmıştır. Amino asit yapıdaki taurin, Kts gibi -OH ve NH₂ grupları içerir. Polimerik çözeltiye Trn eklenmesi, PVA'daki -OH grupları tarafından oluşturulan hidrojen bağlarının miktarını artırarak güçlü bir etkileşime yol açmış olabilir (Bahrami vd. 2003). Bu nedenle, Trn içeriğindeki artış, makromoleküller arasındaki etkileşimlerin artmasına, dolanıklıkların oluşmasına ve daha büyük bir iç sürtünmenin gelişmesine ve sistem viskozitesinde bir artışa yol açabilir (Desbrieres 2002). Bu, çözelti viskozitesinde bir artışa ve dolayısıyla daha büyük nanofiber boyutlarına yol açabilir. Ayrıca, %20 Trn konsantrasyonlarında, lif yapısı bozulmaları ve gözlenen boncuklu yapılar bu düşüncüyü desteklemektedir.

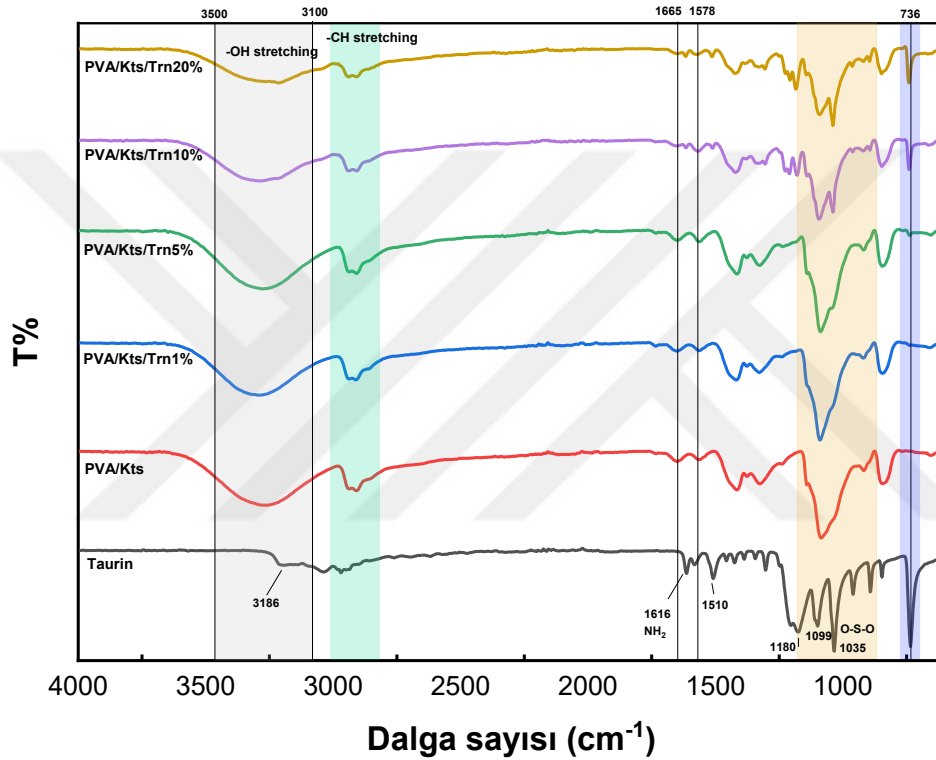
Tablo 4.1 Nanofibröz doku iskelelerinin ortalama fiber çapları

Örnek kısaltması	Ortalama fiber çapı (nm)
PVA/Kts	123.4±20
PVA/Kts/Trn1%	299.6±60
PVA/Kts/ Trn5%	333±71
PVA/Kts/ Trn10%	405.7±84
PVA/Kts/ Trn20%	270.8±154

4.1.2 FT-IR Spektroskopisi ile Kimyasal Yapı Analizi

Taurin, PVA/Kts ve taurin içeren PVA/Kts nanofibröz matların olası kimyasal etkileşimleri ve yapısal analizi ATR/FT-IR spektroskopisi ile incelendi ve spektrumlar Şekil 4.2'de sunulmuştur. Taurin spektrumunda, fonksiyonel gruplarına karşılık gelen bazı karakteristik pikler gözlemlendi. Trn spektrumunda 3186 cm⁻¹'deki pik asimetrik N-H'ye atfedildi. 1207 cm⁻¹ ve 1035 cm⁻¹'deki pikler sırasıyla asimetrik ve simetrik SO₃ gerilmesine atfedildi. 1616–1550 cm⁻¹'de, Trn'nin fonksiyonel grubu N-H'nin gerilme titreşimlerine atfedilmiştir (González-Vázquez vd. 2020; Kumar vd. 2014). Kükürt içeren organik moleküllerin moleküler yapısını belirlemek için de kullanılan C-S gerilme alanının, 736 cm⁻¹'deki banttan sorumlu olduğu düşünülmektedir (Ma vd. 2018). İskelelerin spektrumlarında, N-H ve O-H gerilme titreşimleri arasında bir örtüşme olasılığı olmasına rağmen, 3500-3100 cm⁻¹'deki kuvvetli geniş bant büyük ölçüde O-H gerilme titreşiminin karakteristiğidir. İskele spektrumlarında, asimetrik ve simetrik CH gerilme

titreşimine atfedilen 2938 ve 2904 cm^{-1} 'de pikler görülmektedir. Ayrıca, C–H fleksiyonu için 1426 cm^{-1} civarında ve C–O gerilmesi için 1086 cm^{-1} civarında pikler gözlemlenmiştir. Ek olarak, gözlenen 1665 ve 1578 cm^{-1} civarındaki pikler, Kts'nin amin gruplarından kaynaklanmaktadır (Budlayan vd. 2022; Satpathy vd. 2019). Trn içeren iskelelerin kızılötesi spektroskopisi büyük ölçüde doğal PVA/Kts' ye benzerdir, ancak iskelelerdeki Trn miktarının artması Trn özgü tepelerin belirginleşmesine neden oldu. Sonuçlar, Trn'in PVA/Kts nanofibröz iskelelere başarılı bir şekilde dahil edildiğini göstermektedir.

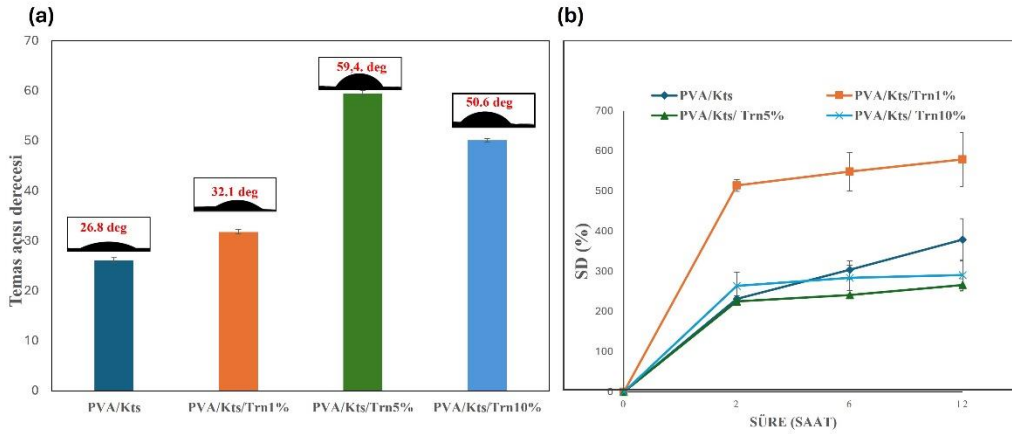


Şekil 4.2 Trn ve nanofibröz iskelelerin FT-IR spektrumları

4.1.3 Taurin Yüklü Nanofibröz İskelelerin İslanabilirlik ve Şişme Özellikleri

İskelelerin ıslanabilirliği temas açısı ölçümü ile araştırılmış ve sonuçlar Şekil 4.3a 'da gösterilmiştir. PVA/Kts iskeleler iyi hidrofilik karaktere sahipti ve literatürdeki önceki çalışmalarla uyumlu olarak $26,8 \pm 0,5$ derecelik bir temas açısı ölçülmüştür (Li vd. 2019). Ancak, PVA/Kts iskelelere Trn dahil edilmesi matların hidrofilik yapısını büyük ölçüde değiştirdi ve hidrofililiğini azalttı. Bu etki, elektroğrılmış mattaki Trn içeriğinin artmasıyla belirginleşti ve matların ıslanabilirliği azaldı. Geliştirilen nanofibröz iskelelerin su etkileşim kapasitesini ve hidrasyon davranışını değerlendirmek ve böylece malzemenin biyolojik ortamdaki davranışı

hakkında ön bilgi elde etmek için şişme testi gerçekleştirildi. Şekil 4.3b' deki elektroğirilmiş matların şişme dereceleri, Trn dahil edilmesinin farklı su alım seviyelerine yol açtığını göstermektedir. PVA/Kts/Trn1%, 12 saat sonra en iyi şişme derecesini gösterdi. %5 ve %10 taurin içeren matlar benzer şişme dereceleri ve PVA/Kts'den daha az şişme gösterdi. Kimyasal veya fiziksel çapraz bağlama işlemi uygulanmamış olmasına rağmen, kullanılan polimerlerin içsel özellikleri nedeniyle hidrojel benzeri bir yapı gözlemlendi. Polimerlerdeki hidroksil ve amino grupları arasında oluşan hidrojen bağları ve elektrostatik etkileşimler fiziksel olarak kararlı bir ağ yapısının oluşumuna katkıda bulunur. Literatürde bildirildiği üzere, bu etkileşimler çapraz bağlamanın yokluğunda bile malzemenin su tutma kapasitesini önemli ölçüde artırabilir ve gözlemlenebilir şişme davranışıyla sonuçlanabilir (El-Hefian, Nasef, ve Yahaya 2010).



Şekil 4.3 PVA/Kts nanofibröz iskelelerin ıslanabilirlik ve şişme özellikleri a) yüzey temas açısı b) şişme derecesi

4.1.4 Nanofibröz İskelelerin Mekanik Özellikleri

Nanofibröz iskelelerin çekme dayanımı (TS) ve kopma anındaki uzama yüzdesi (%) açısından mekanik özellikleri incelenmiş ve Tablo 4.2'te sunulmuştur. Herhangi bir çapraz bağlama işlemi yapılmadan üretilen PVA/Kts nanofibröz iskelelerin çekme dayanımının literatürdeki değerlere benzer olduğu bulunmuştur (Cui vd. 2018). Görülebileceği gibi, Trn eklenmesi PVA/Kts elektroğirilmiş nanofibröz iskelelerin mekanik davranışını iyileştirmiştir. PVA/Kts iskeleler, 1,6 MPa'lık bir çekme dayanımı gösterirken, %10 Trn eklenmesi PVA/Kts matların çekme dayanımında %55'lik bir artışla sonuçlanmıştır. Elektroğirilmiş iskelelerin kopma anındaki uzamaları incelendiğinde, %1 Trn içeren formun kopma anındaki en yüksek uzama

yüzdesine sahip olduğu görülmektedir. Polimer matristeki Trn oranının artmasıyla kopma anındaki uzamaların azaldığı ve bunun da nanofiberlerin sertliğinde bir artışa neden olduğu görülmüştür. Çekme dayanımındaki artış ve kopma anındaki uzamadaki azalma ile birlikte ele alındığında, taurin PVA/Kts nanofiber matrisinde güçlü hidrojen bağlarının oluşumuna katkı sağladığı düşünülebilir. Muhtemelen, iskelelerde toplam polimer ağırlığının %1'i oranında Trn eklenmesi, hidrojen bağlarının sayısındaki artış nedeniyle matların çekme dayanımını iyileştirdi ve ayrıca esnekliklerini önemli ölçüde artırdı. Ancak, yapıya daha fazla Trn eklenmesiyle artan moleküller arası etkileşimler, PVA ve Kts arasındaki çapraz bağı yoğunluğuna katkıda bulunmuş olabilir ve bu da çekme dayanımını artırırken kopma anındaki uzamada bir azalmaya yol açmış olabilir (Bi vd. 2020).

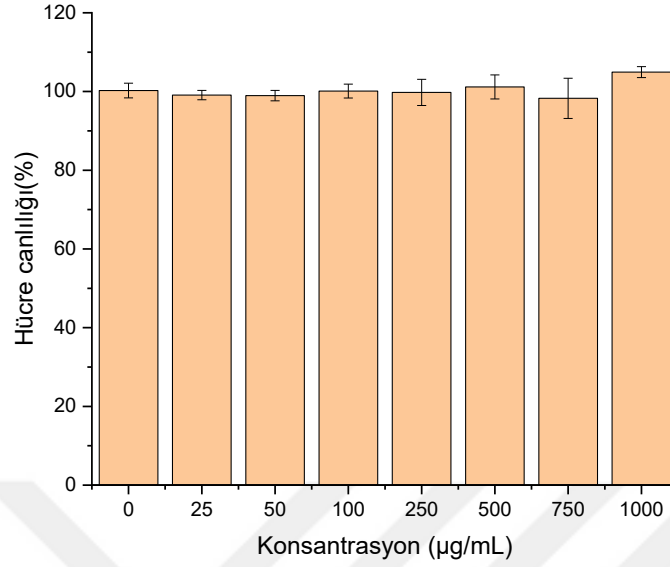
Tablo 4.2 Trn dahil edilmiş iskelelerin mekanik özellikleri

Örnek	Çekme dayanımı (MPa)	Kopma Uzaması (%)
PVA/Kts	1,60 ± 0,3	18,15 ± 1,6
PVA/Kts/Trn1%	2,16 ± 0,2	45,8 ± 5,6
PVA/Kts/ Trn5%	2,26 ± 0,1	38 ± 2,8
PVA/Kts/ Trn10%	2,48 ± 0,5	24,55 ± 4.2

4.1.5 Taurin ve İskelelerin Sitouyumluluğu

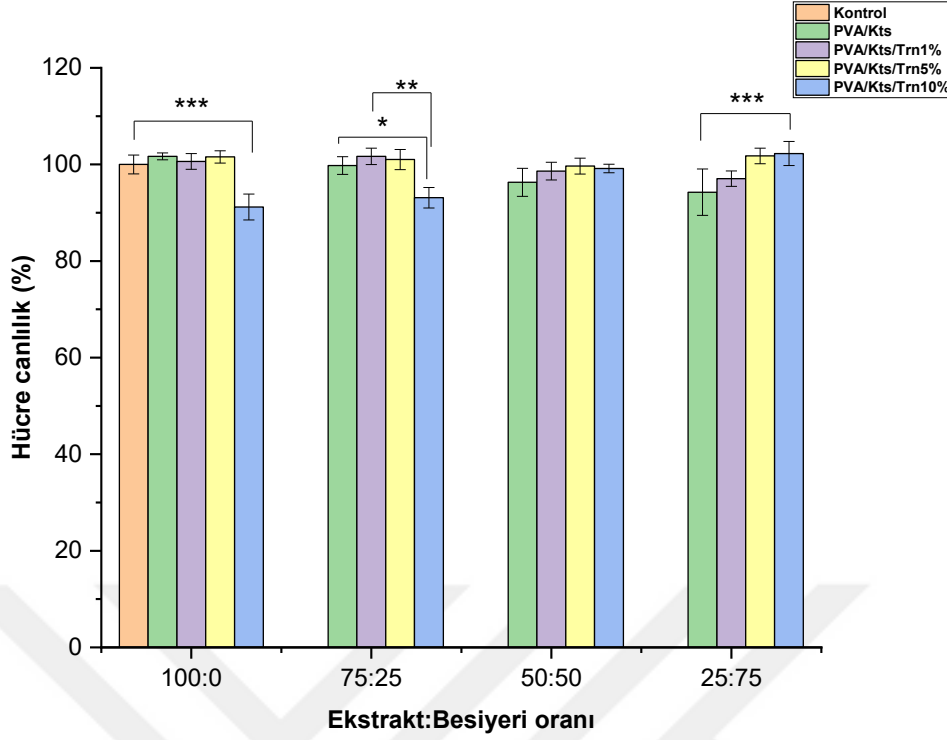
Trn'nin ve Trn içeren PVA/Kts nanofiböz doku iskelelerinin olası sitotoksik aktivitesi insan nöroblastoma hücre hattı SH-SY5Y üzerinde incelenmiştir. Şekil 4.4'te sunulan hücre canlılığı sonuçları, Trn'nin araştırılan konsantrasyonlarda herhangi bir toksisiteye neden olmadığını göstermektedir. Önceki çalışmalarda, t L929 (Farzamfar vd. 2018), insan proksimal tübüler epitel (HK-2) (Chang vd. 2014; Eppler ve Dawson Jr 2002), böbrek epitel hücresi (LLC-PK1), sıçan feokromositoma (PC12) hücreleri (Kearns ve Dawson Jr 2002) vb. gibi birçok hücre hattı üzerinde Trn'nin sitotoksik aktivitesi araştırılmış ve herhangi bir sitotoksikite bildirilmemiştir. Ayrıca, *in vitro* toksisite modellerinde Trn'nin hücreleri toksik hasara karşı koruyabildiği gösterilmiştir. Trn'nin SH-SY5Y hücrelerinde yapılan ön sitotoksikite değerlendirmesi, en yüksek çalışma

konsantrasyonu dahil olmak üzere herhangi bir sitotoksik aktiviteye neden olmadığını ortaya koymaktadır.



Şekil 4.4 Trn'nin SH-SY5Y hücreleri üzerindeki sitotoksitesisi

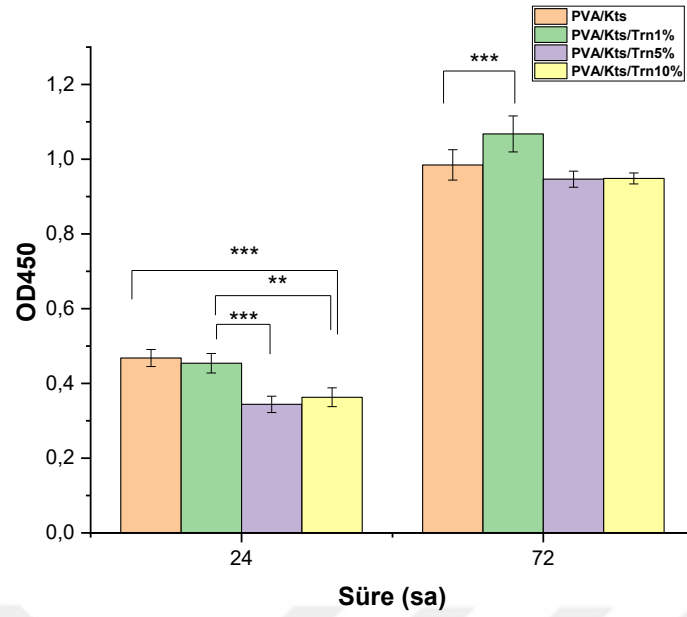
Üretilen iskelelerin sitouyumluluğu SH-SY5Y hücreleri üzerinde dolaylı sitotoksiste yöntemleri ile değerlendirildi. Sunulan SEM görüntülerinde düzenli bir nanofiber yapısı görülmediği için sitotoksiste çalışmalarında PVA/Kts/Trn20% formu kullanılmamıştır. İskelelerin SH-SY5Y hücreleri üzerindeki sitotoksik aktiviteleri Şekil 4.5'te sunulmuştur. Sonuçlar, farklı Trn miktarlarıyla üretilen PVA/Kts herhangi bir sitotoksik aktivite üretmediğini göstermektedir. %1 Trn içeren nanofiber iskelelerin sitotoksik aktivitesi PVA/Kts'ye benzer bulunmuştur. Ancak, %5 Trn içeren iskelelerin 100:0 özütleri, kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığında hafif bir azalmaya neden olmuştur (hücre canlılığı $95,1 \pm 3$). Benzer şekilde, azalma PVA/Kts/Trn %10 formunda biraz daha yüksektir (hücre canlılığı $87,4 \pm 0,7$). Tüm iskele örnekleri için en yüksek hücre canlılığı değerleri 75:25 oranında bulundu. Ancak, hücre canlılığı herhangi bir nanofibröz iskele örneğinde ve seyreltilmiş özütte %70'in altına düşmedi ve bu da taurin içeren üretilen nanofiber matların negatif kontrole (malzemelerle muamele edilmemiş) kıyasla herhangi bir sitotoksiste göstermediğini doğrulamıştır.



Şekil 4.5 Taurin yüklü nanofibröz iskelelerin SH-SY5Y hücreleri üzerindeki dolaylı sitotoksik aktivitesi ($p < 0,05$: *, $p < 0,01$: **, $p < 0,001$: ***)

4.1.6 Nanofibröz İskelelerin Hücre Proliferasyonu Üzerindeki Etkileri

Nanofibröz doku iskelelerinin çoğalma üzerindeki etkileri 24 ve 72 saatte XTT hücre canlılığı testi ile incelendi ve sonuçlar Şekil 4.6'de sunulmuştur. 24 saatlik hücre canlılığı sonuçlarına göre, hücre canlılığı %5 ve %10 taurin içeren iskelelerde daha düşüktür. Ancak, 72 saatlik daha uzun kültür döneminde, hücre canlılığı taurin içermeyen PVA/Kts'ye benzerdir. PVA/Kts/1%Trn nanofibröz iskele, SH-SY5Y hücreleri üzerinde iyi çoğalma etkisi gösterdi. Taurin içeren iskelelerin hücreler üzerindeki olumlu etkileri daha önce çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir. Wu ve ark. deri dokusu iskeleleri olarak tasarlanan Trn içeren kolajen süngerlerin NIH 3T3 fare embriyonik fibroblast hücrelerinde sitotoksikiteye neden olmadığını, aynı zamanda tek başına Trn'ye kıyasla daha yüksek derecede çoğalma nedeniyle daha iyi iyileşme sağladığını bildirmiştir (Wu vd. 2021). Samadiyan ve arkadaşları, %10 taurin dahil edilmiş PCL/PLA/GNF iskelelerinin, tek başına PCL/PLA/GNF iskelelerine kıyasla MG-63 hücrelerinin çoğalmasını iyileştirdiğini bildirmiştir (Samadian vd. 2020). Tüm bu çalışmalar birlikte değerlendirildiğinde, sonuçlar Trn içeren PVA/Kts nanofibröz iskelelerinin, hücre çoğalması üzerindeki etkilerini artırabilecek iskeleler olarak düşünülebileceğini göstermektedir.



Şekil 4.6 Taurin yüklü nanofibröz iskelelerin SH-SY5Y çoğalmasında üzerindeki etkisi. (p < 0.05: *, p < 0.01: **, p < 0.001: ***)

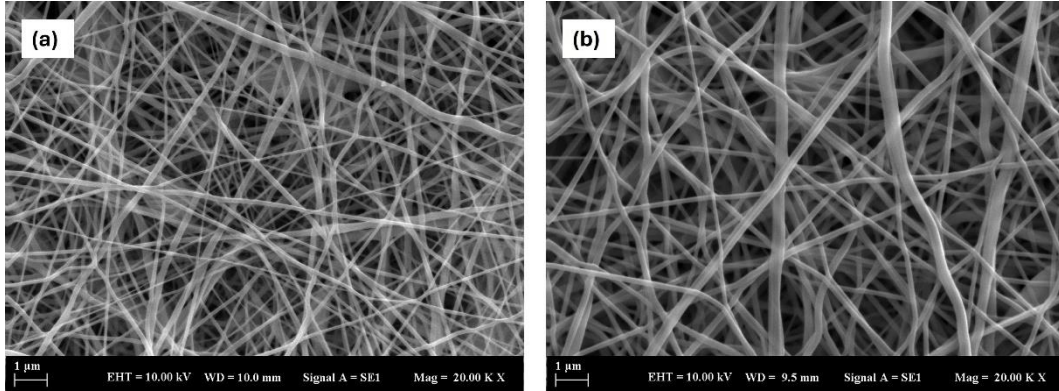
4.2 Peptit ile Yüzey Fonksiyonelleştirilmiş Nanofibröz Doku İskelelerinin Üretimi ve Karakterizasyonu

Tez çalışmasının ikinci aşamasında, ilk aşamadaki bulgulardan yola çıkılarak %1 Trn içeren PVA/Kts iskelelerin, hücre proliferasyonu üzerindeki önemli etkileri göz önüne alınarak peptit ile yüzey fonksiyonelleştirilmesi uygulanmıştır. Ayrıca VSWRAPTA peptitinin doğrudan etkisinin incelenmesi için çapraz bağlı PVA/Kts ve peptit fonksiyonel PVA/Kts iskeleler üretilmiş ve çeşitli yönlerden karakterize edilmiştir. EDC/NHS ile çapraz bağlı iskeleler PVA/Kts, %1 Trn içeren çapraz bağlı iskeleler PVA/Kts/Trn, peptit ile işlevselleştirilen iskeleler PVA/Kts-VSWRAPTA ve %1 Trn içeren peptit ile fonksiyonelleştirilmiş iskeleler PVA/Kts/Trn-VSWRAPTA olarak adlandırılmıştır.

4.2.1 Fonksiyonelleştirilmiş İskelelerin Mikro Yapısı

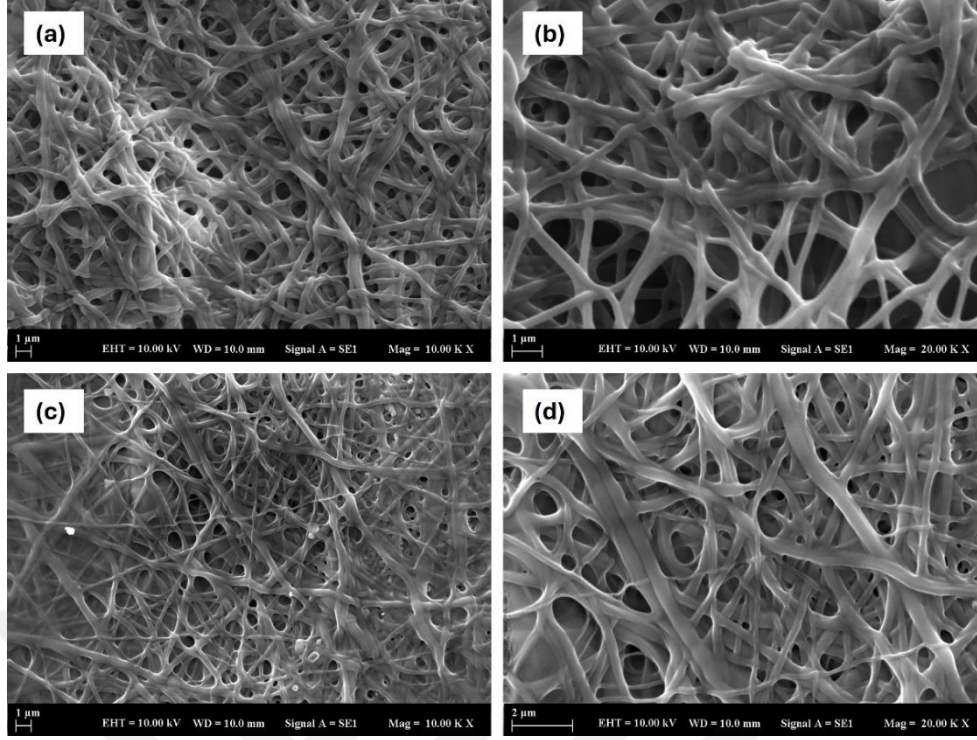
PVA/Kts ve PVA/Kts/Trn doku iskeleleri VSWRAPTA peptiti kullanılarak işlevselleştirildi. Peptit ticari olarak tedarik edildi ve peptiti nanofiberlere kimyasal bağlanma için EDC/NHS kimyası kullanıldı. İlk olarak, nötralizasyon süreci sırasında nanofiberlerin morfolojik kararlılığını gözlemlemek amacıyla 30 dakika metanol içerisinde 3 M NaOH ile nötralize edilmiş PVA/Kts ve PVA/Kts/Trn nanofiberlerin mikro yapıları fonksiyonelleştirme öncesi SEM ile incelenmiştir.

Şekil 4.7’deki SEM mikrografları nötralizasyon işlemi sırasında nanofiber yapıların korunduğunu ve kusurlar olmaksızın oldukça düzgün ve pürüzsüz bir nanofibröz morfoloji sunduğunu göstermektedir. Ayrıca nanofiber kalınlıklarında NaOH içerisinde bekletildiğinde bir miktar artış olduğu görülmektedir. Bu durumun nedeni, nötralizasyon aşamasında ve sonrasında gerçekleştirilen yıkamalarda kullanılan metanol içindeki NaOH çözeltisindeki az miktardaki suyun, Kts bileşeninin şişmesine veya kısmi hidrolizine sebep olması olabilir (Gu vd. 2013).



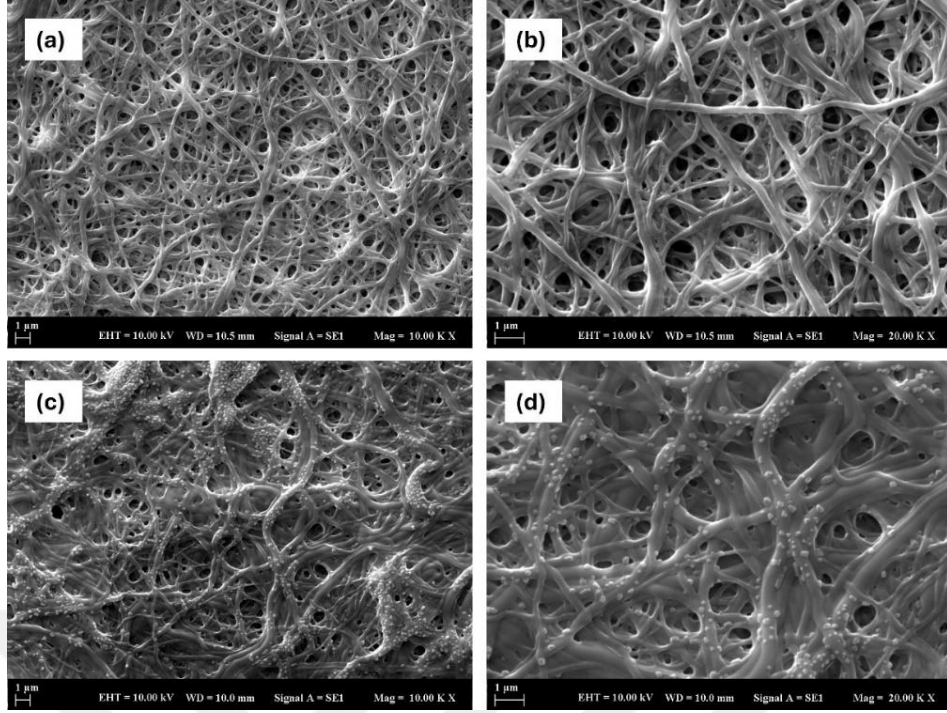
Şekil 4.7 NaOH ile nötralizasyon sonrası nanofiber morfolojisi a) PVA/Kts b) PVA/Kts/Trn

Peptit ile fonksiyonelleştirme sonrası PVA/Kts nanofibröz iskelelerin mikroyapısı SEM ile incelenmiştir. Şekil 4.8 ve Şekil 4.9 sırasıyla; PVA/Kts-VSWRAPTA PVA/Kts/Trn-VSWRAPTA doku iskelelerinin SEM mikrograflarını göstermektedir. SEM görüntüleri incelendiğinde, peptit modifikasyonundan sonra, fiberlerin kalınlaşmış ancak yapısal olarak korunmuş olduğu görülmektedir. Fiber çaplarındaki artışı nicel olarak analiz edilerek Tablo 4.3’ de ortalama fiber çapları sunulmuştur. Fonksiyonelleştirme sonrası PVA/Kts-VSWRAPTA doku iskelelerinde ortalama fiber çapları açısından önemli bir artış saptanmamıştır. Bununla birlikte, PVA/Kts/Trn için peptit modifikasyonu öncesi ve sonrası ortalama fiber çapları, sırasıyla; $279,01 \pm 57,7$ ’den $388,1 \pm 106,6$ nm’ye bir artış gösterdi. PVA/Kts ve PVA/Kts/Trn için önemli bir fark yüzey pürüzlüğü olmuştur. PVA/Kts/Trn-VSWRAPTA doku iskelelerinde fiberler üzerinde partiküllerin birikimi görülmektedir.

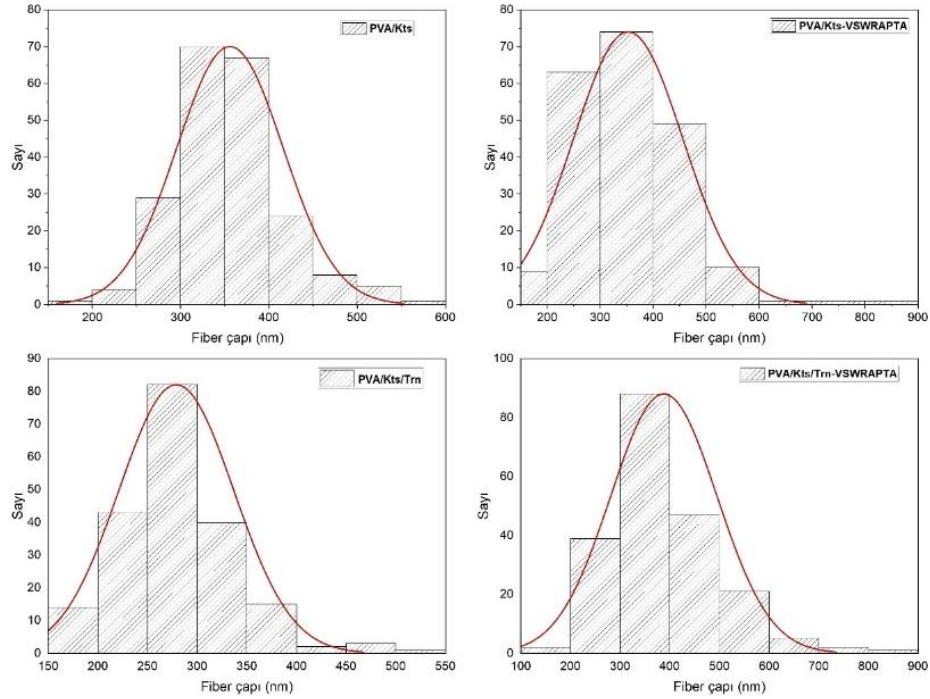


Şekil 4.8 Fonksiyonelleştirilmiş PVA/Kts nanofibröz doku iskelelerinin mikroyapıları; Peptit içermeyen PVA/Kts iskeleler (a) 10000 büyütme (b) 20000 büyütme, VSWRAPTA modifikasyonu sonrası mikroyapı (c) 10000 büyütme (d) 20000 büyütme

Literatürde, EDC/NHS aracılı peptit konjugasyonunun elektroçirilmiş nanofiberlerin morfolojik bütünlüğünü koruduğu ve lif çapında anlamlı bir değişime neden olmadığı rapor edilmiştir (Onak vd. 2020; Song vd. 2016). Trn içeren fonksiyonel iskelelerde ortalama lif çapındaki artış muhtemelen Trn'nin nanofiber yapının hidrofilik özelliklerine katkısından kaynaklı olabilir. Öte yandan, SEM görüntülerinde gözlemlenen pürüzlü ve partikül benzeri yüzey morfolojisinin, Trn'nin EDC/NHS aracılığıyla reaktif gruplarla çapraz bağlanması sırasında oluşan lokal birikimlerden veya faz ayrışmalarından kaynaklanabileceği değerlendirilmektedir (Liu vd. 2022). Bu durum, özellikle sulu ortamda yürütülen çapraz bağlama işlemlerinde, taurin moleküllerinin polimer zincirlerine düzensiz şekilde tutunmasıyla ilişkilendirilebilir.



Şekil 4.9 Fonksiyonelleştirilmiş PVA/Kts/Trn nanofibröz doku iskelelerinin mikroyapıları; Peptit içermeyen PVA/Kts/Trn iskeleler (a) 10000 büyütme (b) 20000 büyütme, VSWRAPTA modifikasyonu sonrası mikroyapı (c) 10000 büyütme (d) 20000 büyütme



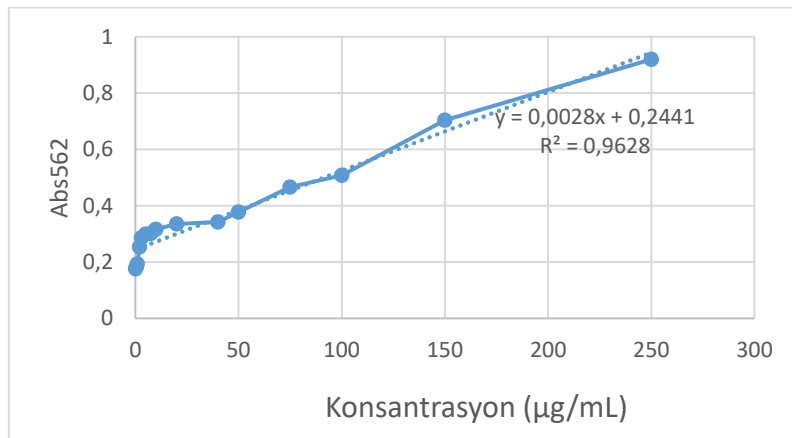
Şekil 4.10 Fonksiyonelleştirme sonrası ortalama fiber çapı boyut dağılımları

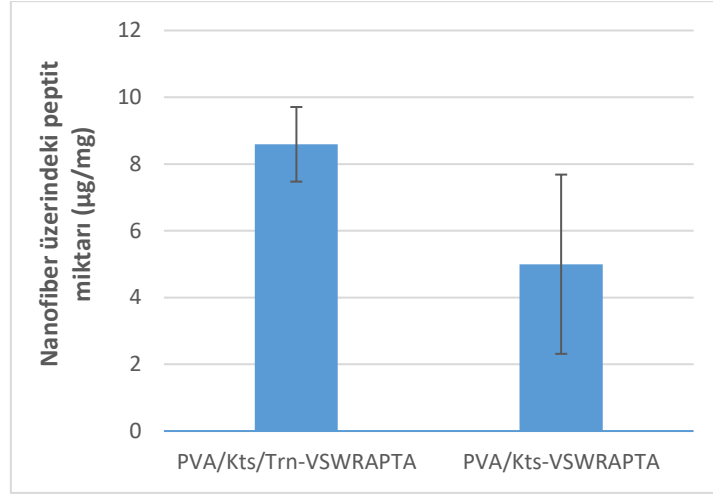
Tablo 4.3 Fonksiyonelleştirilmiş iskelelerin ortalama fiber çapları

İskele	Ortalama fiber çapı (nm)
PVA/Kts	348,6±52,1
PVA/Kts-VSWRAPTA	352,8±103,5
PVA/Kts/Trn	279,01±57,7
PVA/Kts/Trn-VSWRAPTA	388,1±106,6

4.2.2 Nanofibröz İskelelere Bağlanan Peptit Miktarları

Bisinkoninik asit (BCA) testi, çözeltideki ve katı substratlardaki proteinleri ölçmek için yaygın olarak kullanılan kolorimetrik bir yöntemdir. BCA, peptit bağları ile sistein, sistin, tirozin ve triptofan gibi belirli amino asitlerin varlığını temel alarak, bu bileşenlerin konsantrasyonunun tayin edilmesine olanak sağlayan bir bileşiktir (Butruk-Raszeja ve and Kuźmińska 2018; Causa vd. 2010). Nanofibröz iskelelere bağlanan peptit miktarını belirlemek için BCA testi kiti kullanıldı. 0.25 µg/mL ile 250 µg/mL aralığında değişen peptit konsantrasyonları için kitin protokolüne göre VSWRAPTA peptidinin kalibrasyon eğri oluşturulmuş ve Şekil 4.11’de sunulmuştur. Nanofiber yüzeylerine immobilize edilen peptit miktarı, bağlanma sonrası kalan solüsyondaki peptit miktarının ölçülerek başlangıç peptit solüsyonundan çıkarılması ile hesaplanmış ve sonuçlar Şekil 4.12’ de sunulmuştur.

**Şekil 4.11** VSWRAPTA peptidinin BCA analizi ile belirlenen konsantrasyon eğrisi



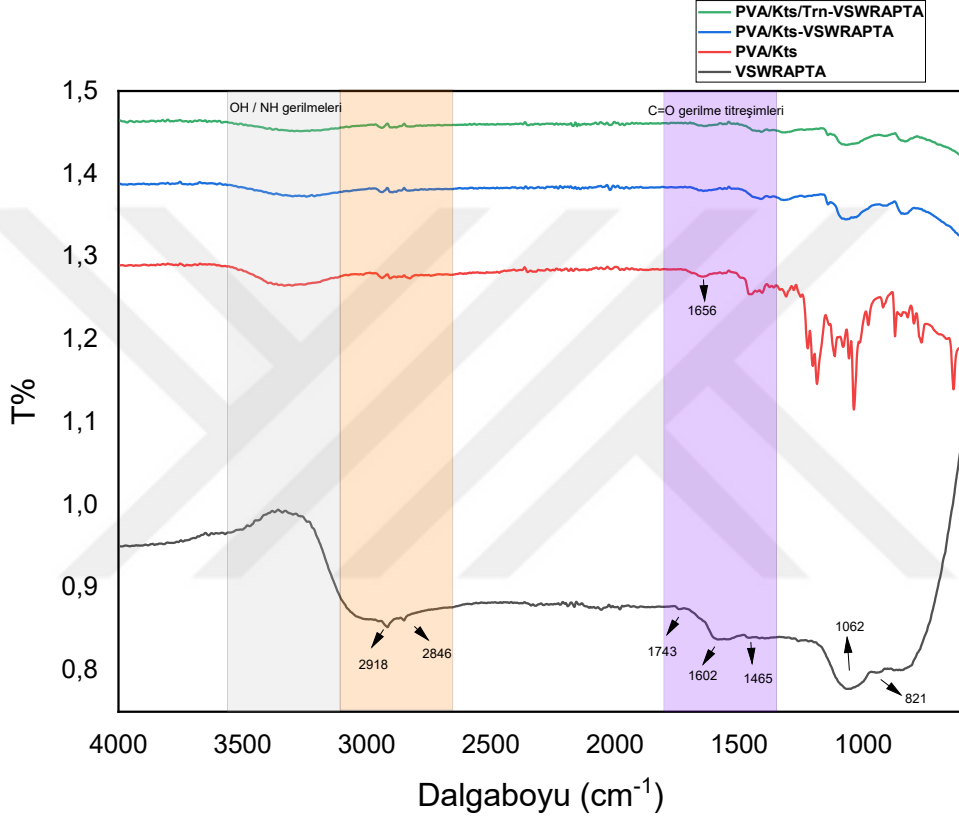
Şekil 4.12 İşlevselleştirilen nanofibröz iskelelerdeki peptit miktarı

İskelelerdeki peptit miktarları, miligram başına bağlanan peptit miktarı olarak mikrogram cinsinden hesaplanmıştır. Peptit bağlanma verimliliği açısından, PVA/Kts/Trn iskelelerinin daha yüksek performans gösterdiği belirlenmiştir. PVA/Kts-VSWRAPTA ve PVA/Kts/Trn-VSWRAPTA örneklerinde bu değerler sırasıyla $8,58 \pm 1,1 \mu\text{g/mg}$ ve $4,99 \pm 2,6 \mu\text{g/mg}$ olarak ölçülmüştür. Bu farkın temel nedenin, Trn' nin yapısında bulunan serbest amin gruplarının, EDC/NHS aracılı bağlanma reaksiyonlarında peptitlerin kovalent olarak tutunabileceği reaktif bölgeleri artırmasından dolayı olduğu düşünülmektedir (Wang vd. 2024). Trn'nin bu özelliği, iskele yüzeyinde daha fazla çapraz bağlanma noktası sağlayarak peptit immobilizasyonunu kolaylaştırmakta ve bağlanma verimliliğini artırmaktadır (Liu vd. 2022).

4.2.3 FT-IR ile Kimyasal Etkileşimler

Peptitlerin kızıl ötesi spektroskopisi ile elde edilen yapısal bilgiler büyük ölçüde amid bantları, özellikle de $1600\text{--}1700 \text{ cm}^{-1}$ aralığındaki amid I bandı analizine dayanır. Bu bant, öncelikle peptit omurgasındaki karbonil (C=O) gerilme titreşimlerinden kaynaklanır ve farklı ikincil yapıların varlığı nedeniyle birkaç örtüşen bileşenden oluşan geniş bir spektral bant profiline sahiptir (Gallagher 2009). Şekil 4.13'te görüldüğü üzere suda incelenen VSWRAPTA peptitinin amid bant I'inin spektrumu, 1602 cm^{-1} 'de yer alan baskın bir tepeden oluşmaktadır. 1741 cm^{-1} 'deki amid I C=O gerilmesine, 1589 ve 1546 cm^{-1} 'deki pikler ise amid II N-H deformasyonuna, 806 cm^{-1} 'deki -NH_3^+ bükülmesine ait titreşim bantları görülmüştür. 1062 cm^{-1} 'deki güçlü pik ise aromatik amin gruplarının C-N

gerilmesine atfedilmiştir. 2923 ve 2852 cm^{-1} 'deki tepe noktaları güçlü amin N-H gruplarının güçlü gerilmelerine atfedilmiştir. Fonksiyonelleştirilmiş iskelelerin spektrumları incelendiğinde, 3300 cm^{-1} 'deki amin gurubu kaynaklı N-H gerilme bandının azaldığı, PVA/Kts'de 1656 cm^{-1} 'de görülen C=O (karbonil) gerilme titreşimini temsil eden bandın genişlediği görülmektedir. Bu durum bağlanma sonrası NH_2 grubunun azalması ve yeni oluşan amid bağlarıyla ilgili olduğu düşünülmektedir (Budlayan vd. 2022; Satpathy vd. 2019).

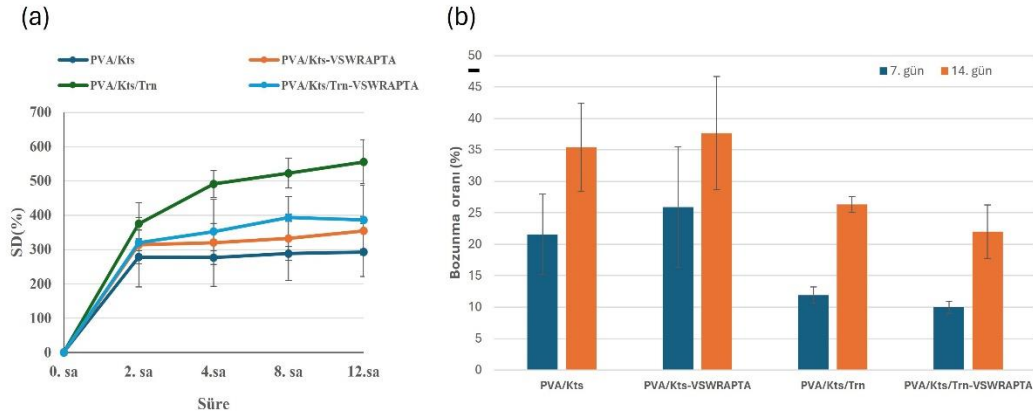


Şekil 4.13 Peptit ve nanofibröz iskelelerin FT-IR spektrumu

4.2.4 Şişme ve Biyobozunma Özellikleri

Fonksiyonelleştirilmiş doku iskelelerinin zamana bağlı şişme davranışları Şekil 4.14a'te gösterilmektedir. Tüm iskele formları 0. saatten itibaren hızlı bir şişme eğilimi gösterdi ve 12. saatte $555,13 \pm 63,7$ ile en yüksek şişme oranı PVA/Kts/Trn nanofibröz iskelelerde görüldü. İlk bölümdeki sonuçlara benzer olarak %1 Trn içeren çapraz bağlı iskelelerin Trn'nin hidrofilik doğası sayesinde matrisin daha fazla su absorbe etmesini sağladığını düşünülmektedir. PVA/Kts iskeleler 12. saatte $292,3 \pm 8,1$ ile en düşük şişme oranına sahip olmakla beraber en hızlı şişme dengesine ulaştı. Peptide fonksiyonelleştirilmiş PVA/Kts-

VSWRAPTA iskeleler PVA/Kts iskelelere göre daha yüksek bir şişme gösterdi. Ancak bu artış tek başına PV/Kts /Trn iskelelerindeki şişme oranına arttırması kadar yüksek olmamakta ve hatta Trn ile peptit beraber kullanıldığında Trn'nin tek başına gösterdiği şişmeyi arttırıcı etkiyi de azalmaktadır. Şekil 4.14 b'deki bozunma oranlarına göre 14. Günde Trn içeren iskelelerin daha az bir bozunma oranı gösterdiği görülmüştür. Trn içeren iskeleler 14. günde benzer olarak yaklaşık %25'lik bir bozunma gösterdi. Trn içermeyen iskelelerde bu oranlar PVA/Kts ve PVA/Kts-VSWRAPTA için sırasıyla, %35,4±6,9 ve %37,6±9 olarak belirlenmiştir.

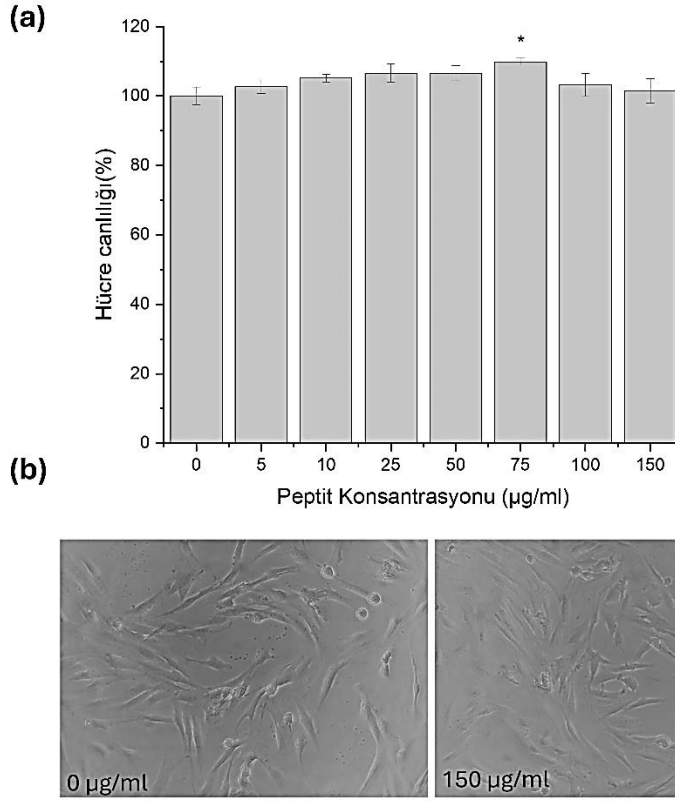


Şekil 4.14 Fonksiyonelleştirilmiş iskelelerin a) şişme oranları b) bozunma oranları

4.3 Kök Hücreler Üzerindeki *In Vitro* Etkiler

4.3.1 Peptit Sitotoksitesi

VSWRAPTA ile PVA/Kts ve PVA/Kts/Trn iskelelerin işlevselleştirme öncesi AD-MKH'ler üzerindeki sitotoksik etkileri XTT hücre canlılığı testi ile değerlendirildi. Peptitin olası sitotoksik etkileri 5-150 µg/mL konsantrasyon aralığında araştırılmış ve sonuçlar Şekil 4.15'te sunulmuştur. Sonuçlar incelendiğinde VSWRAPTA peptitinin herhangi bir sitotoksik etkisi görülmemiştir. Bununla birlikte peptitle 24 saatlik inkübasyon süresinin ardından AD-MKH'lerde 75 µg/mL peptit konsantrasyonunda kontrol grubuna göre hücre canlılığında anlamlı bir artış görülmektedir ($p < 0.05$).

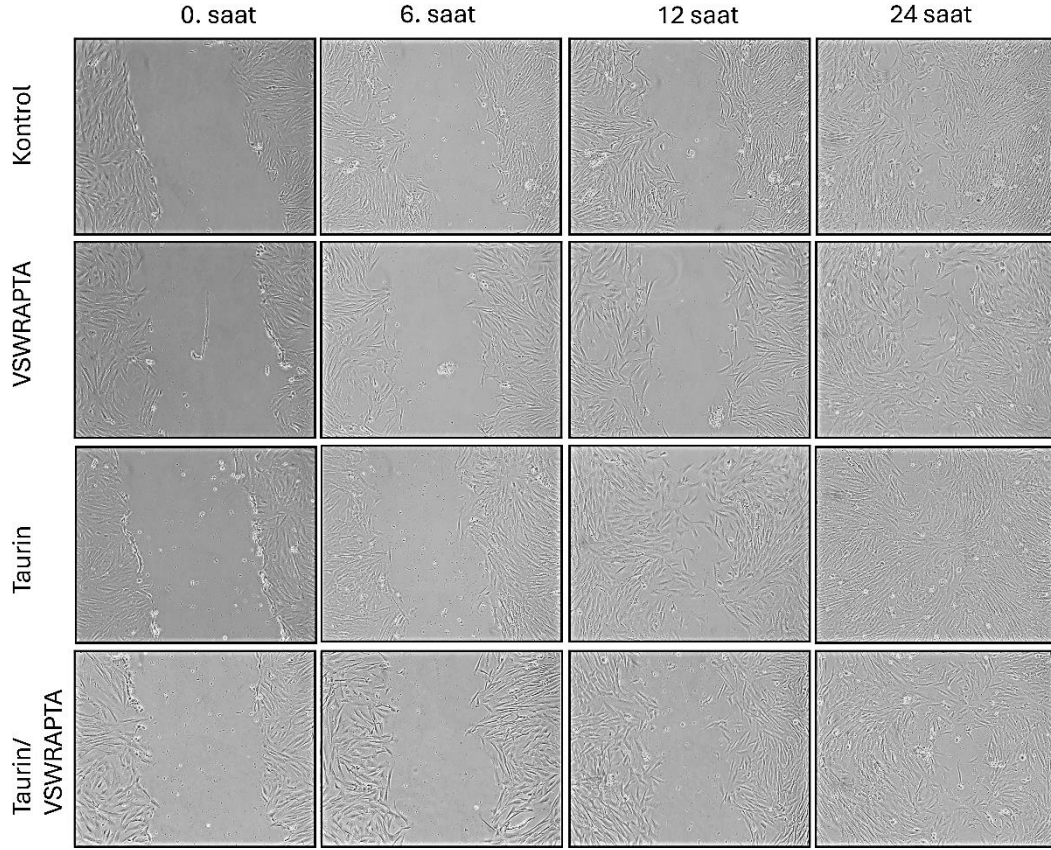


Şekil 4.15 a) VSWRAPTA peptitinin mezenkimal kök hücreler üzerindeki sitotoksik aktivitesi b) 150 µg/mL peptit ile muamele edilmiş hücrenin mikroskop görüntüsü

4.3.2 Taurin ve Peptitin Hücre Göçü Üzerindeki Etkileri

PVA/Kts doku iskelelerinin işlevselleştirilmesi için kullanılan taurin ve peptitin hücre migrasyonu üzerindeki doğrudan etkilerinin araştırılması için çizik testi (scratch assay ya da wound healing assay) kullanıldı. Test, hücrelerin yapay bir yarayı (scratch) ne kadar sürede kapattığını analiz ederek hücre göçü (migrasyonu) ve iyileşme potansiyelini değerlendirmede kullanılır. Şekil 4.16’de, 50 µg/mL VSWRAPTA, 100 µg/mL Taurin ve her iki madde ile eş zamanlı olarak muamele edilen (VSWRAPTA/Taurin) kültür ortamında oluşturulan çiziklerin her hücre grubu için dört zaman noktasındaki mikroskopik görüntüleri sunulmuştur. Testin başlangıcında oluşturulan çizik alanı tüm gruplarda belirgin şekilde görülmekte yaklaşık olarak benzer yüzey alanlarıdır. 6. saatte tüm gruplarda belirgin hücre bir migrasyon başlamış, hücrelerin yara kenarına doğru uzanmaya başladığı görülmektedir. Bununla birlikte gruplar arasında yara kapanması açısından 6. saatte önemli bir fark bulunmamıştır. 12. saatte ise hücre migrasyonu açısından gruplara arası farklılıklar görülmeye başlanmıştır. 100 µg/mL taurin ile muamele edilen

kuyularda çizik alanında, kontrol ve diğer gruplara göre yüksek derece kapanma mevcuttur. 24. saatin sonunda kontrol grubu büyük ölçüde kapanmış olsada küçük açıklarla mevcuttur. Taurin grubunda ise 24. saatte çizik hattının kapanması kontrol grubuna göre daha etkilidir. VSWRAPTA ve VSWRAPTA/Taurin gruplarındaki kapanma yüzdeleri ise kontrol grubuyla benzerdir.

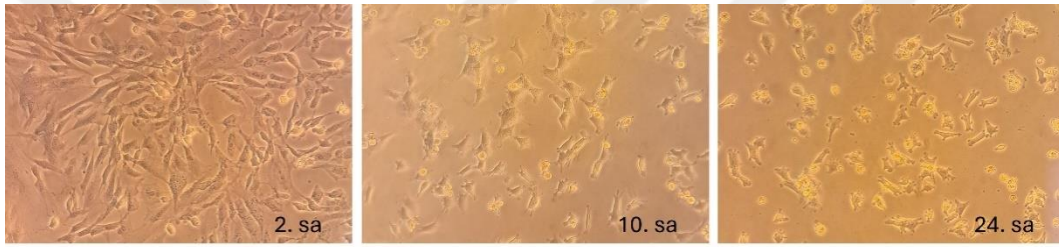


Şekil 4.16 Çizik testi ile farklı gruplarda hücre migrasyonu ve yara iyileşmesinin zamana bağlı değerlendirilmesi

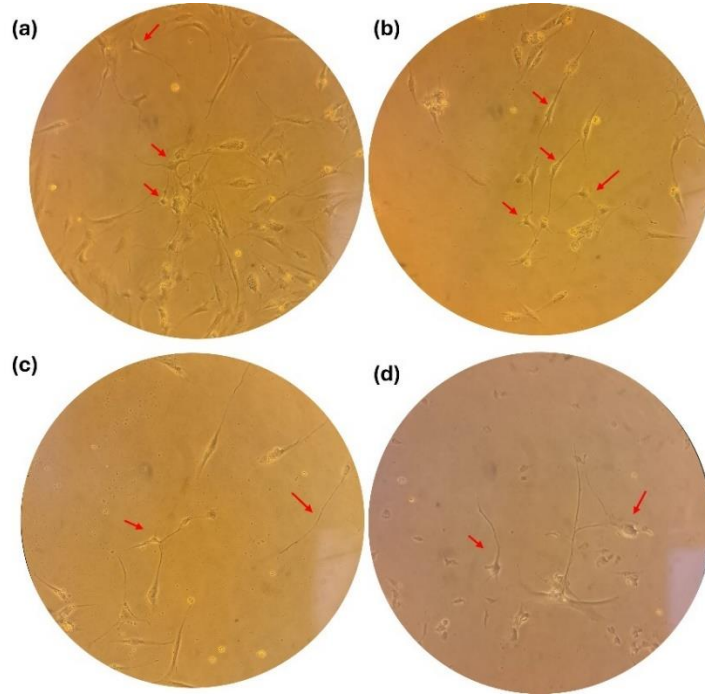
4.3.3 AD-MHK'lerin Nöral Farklılaşma Potansiyelleri ve Aktif Maddelerin Farklılaşmaya Etkileri

Çalışmada AD-MKH'lerin nörojenik farklılaşma potansiyelleri BME ile ön indüksiyon ve sonrasında EGF, FGB ve retinoik asit içeren nöral indüksiyonla araştırıldı. AD-MKH'lerin nöral farklılaşma potansiyelleri ön indüksiyon ortamıyla muamele edildikten sonra nöral farklılaşma ortamı kullanılmadan 14 gün boyunca takip edildi ve morfolojik değişimleri incelemek için belirli zaman aralıklarında alınan mikroskop görüntüleri Şekil 4.17'de gösterilmiştir. Görüntüler incelendiğinde, ön-indüksiyon ortamının hücre morfolojisi üzerinde zamanla artan belirgin etkilerini görülmektedir. İndüksiyondan 2 saat sonra hücreler tipik

fibroblast benzeri morfolojilerini büyük ölçüde korumuş durumda olduğu ve belirgin bir morfolojik değişimlerin olmadığı görülmektedir. İndüksiyonun 10. Saatinde hücre morfolojisinde fark edilebilir değişimler başlamış, sitoplazmik uzantıların azalmış ve daha yuvarlaklaşmış bir forma geçmiştir. Bununla birlikte; muhtemel β -merkaptopropanol (BME'nin) sitotoksitesine bağlı olarak hücre sayısında belirgin bir azalış olduğu görülmüştür. Aynı zamanda bazı hücrelerin stres altında olabileceğine işaret eden parlak, dairesel yapılar (muhtemelen apoptotik cisimcikler) bulunmaktadır. 24. saatin sonunda hücreler oldukça yuvarlaklaşmış ve fibroblast benzeri yapılarını büyük ölçüde kaybetmiştir. Nöronal farklılaşma öncesi ön-indüksiyon fazında sıkça görülen bu yuvarlaklaşma, hücrelerin hazırlık evresinde olduğunu gösterebilir (Feng vd. 2018).



Şekil 4.17 Ön indüksiyon ortamıyla muamele edilen hücrelerin farklı zaman aralıklarındaki hücre morfolojisindeki değişimler (Büyütme 100×)



Şekil 4.18 Ön indüksiyon ortamı sonrası nöral farklılaşma ortamıyla muamele edilen hücrelerin 3. gün (a) 5. gün (b) 7. gün (c) ve 10. gün (d) görüntüleri

(Kırmızı oklarla işaretlenen hücreler, nöronal farklılaşma morfolojisi gösteren hücreler)

Ön indüksiyon ortamının uzaklaştırılmasından sonra hücreler, FGF, EGF, retinoik asit ve $1 \times \text{NSC21}$ 'den oluşan %10 FBS içeren DMEM/F12 nöral indüksiyon ortamı eklenmiş ve fenotipik değişimler farklı zaman aralıklarında takip edilmiştir. Şekil 4.18'de farklı zamanlardaki hücre görüntüleri sunulmuştur.

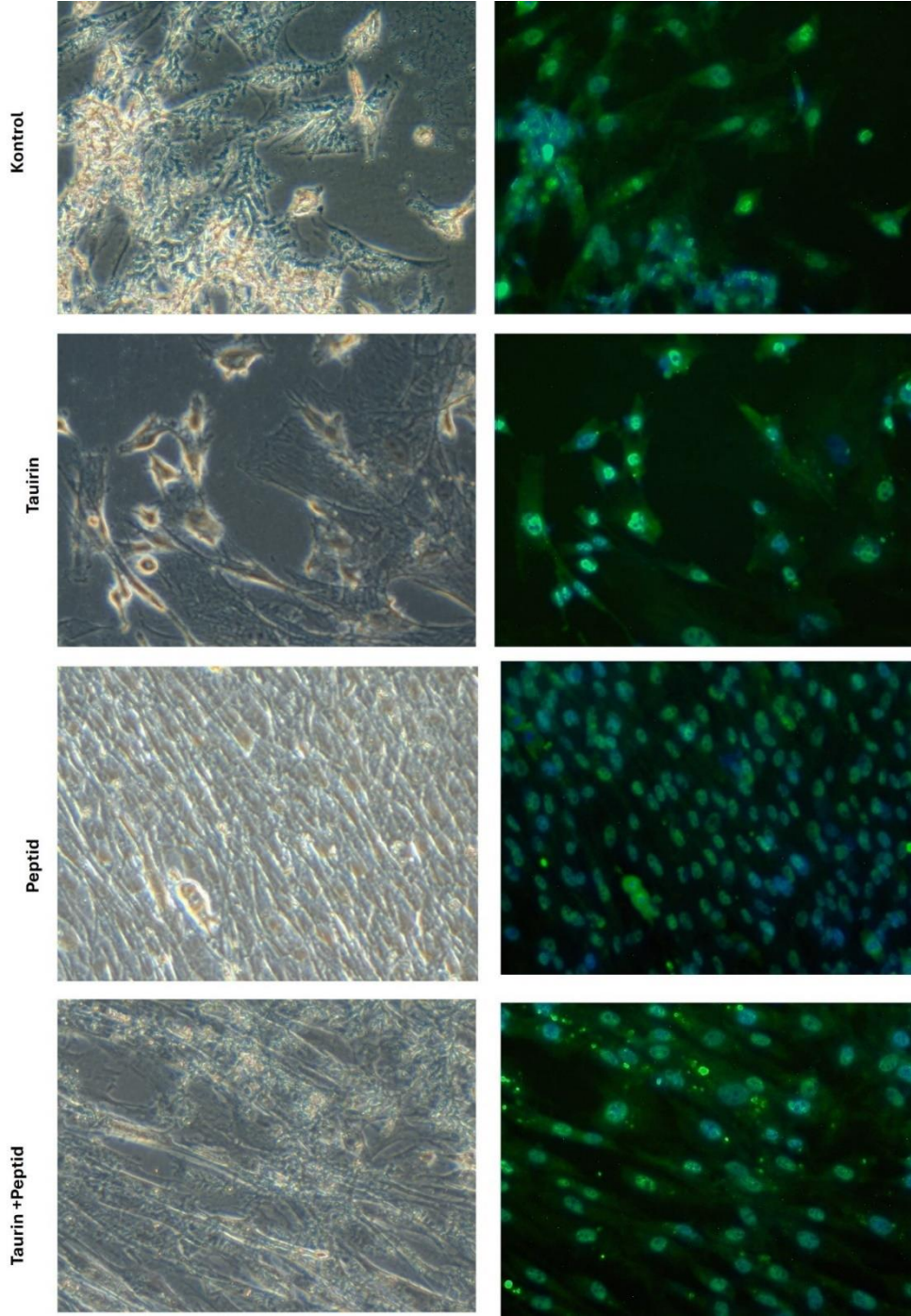
İndüksiyondan sonraki ilk üç günde, farklı morfolojide, karışık bir fenotipte hücreleri içeren bir kültür olduğu görülmüştür. Bu aşamada hücrelerin bir kısmı iğsi morfolojiler gösterirken, bazı hücrelerde yuvarlaklaşmalar ve hücre gövdesinin belirginleştiği yapılar görülmektedir. Bununla birlikte bu hücrelerde yönelimli kısa uzantılar görülmeye başlanmıştır. 5. ve 7. günlerde hücrelerdeki nörit-benzeri uzantılar geliştiği görülmektedir. Özellikle 7. günde oldukça uzun ve ince uzantılar akson benzeri yapının oluştuğunu düşündürmektedir (Scott vd. 2006). İndüksiyondan sonraki 10. günde ise hücrelerde, olgunlaşma aşamasında nöronal morfolojiye yakın, nöron benzeri hücre gövdeleri belirgin olarak görünmektedir. Bu morfolojik göstergeler, nöronal farklılaşma sürecinin ilerlediğini ve protokolün etkili olduğunu ortaya koymaktadır (Safford vd. 2002).

4.3.4 İmmunohistokimyasal Analiz

Çalışmada AD-MHK'lerin farklılaşma potansiyelleri Nestin belirteci ekspresyonu ile incelenmiştir. Nöral farklılaşmanın 15. gününde hücreler floresan işaretli antikorlarla boyanarak floresan mikroskop ile görüntülenmiştir. Fonksiyonelleştirilmesi için kullanılan taurin ve VSWRAPTA peptidinin nöral farklılaşma üzerindeki etkilerini incelemek için ön indüksiyondan sonra hücreler belirtilen biyoaktif maddelerle tek tek ve birlikte muamele edilmiş nöral indüksiyon ortamında yalnızca NCS21 kullanılarak kültürlenmiştir. Şekil 4.19'da floresan mikroskop görüntüleri, muamele edilmiş hücre gruplarının morfolojik özelliklerini ve nestin belirteç ekspresyonları karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir. Kontrol grubunda hücrelerin nestin ifadesinin olduğu ve hücreleri nöral indüksiyondan sonra nöral farklılaşmanın başladığı düşünülmektedir. Ön indüksiyondan sonra taurin ile muamele edilen hücrelerde nestin ekspresyonu kontrol grubuna benzer bulunmuştur. Önceki çalışmalar nöral progenitör hücrelerinin kültürlerine Trn eklenmesinin, Trn'nin neden olduğu proliferatif etkiler nedeniyle daha fazla sayıda nöron farklılaşması gösterdiğini bildirmektedir (Pasantes-Morales, Ramos-

Mandujano, ve Hernández-Benítez 2015). Ayrıca İnsan kemik iliği kök hücrelerinde, retinoik asit (RA) ve Trn'nin birlikte kullanımının fotoreseptör (kon) ve retinal ganglion hücrelerine (RGC) farklılaşmasını arttırdığı ve tek başına Trn ile muamele etmeninde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılaşma teşvik edebileceği bildirilmiştir (Forouzanfar vd. 2021). Benzer şekilde EGF ile birlikte Trn muamelesinin, MHK'lerde nöro-diferansiyasyona güçlü katkıda bulunabileceği gösterilmiştir (Jin, Xing, ve Yang 2009). Tüm bu çalışmalar Trn'nin nöral farklılaşmadaki sinerjetik etkilerini göstermektedir.

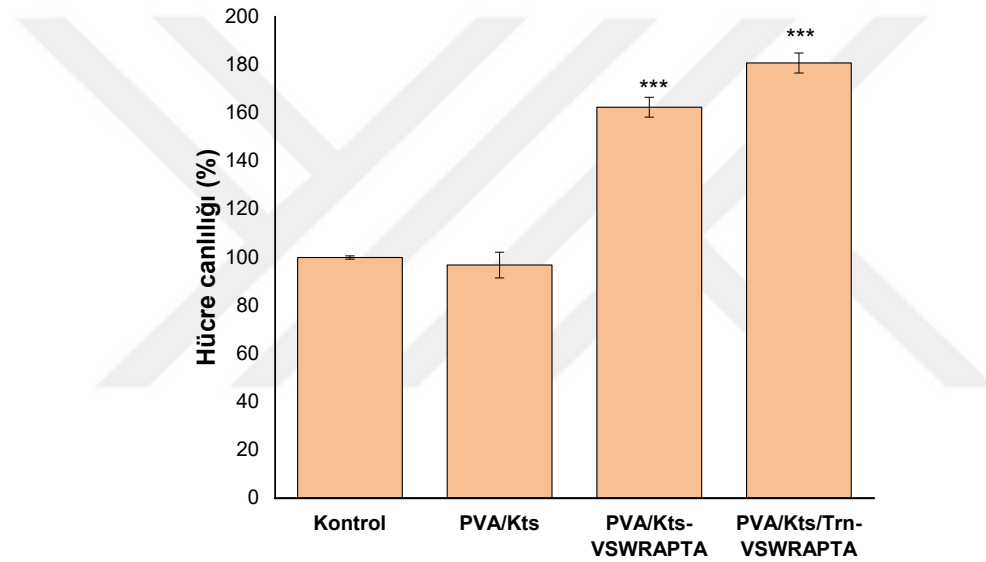
Dikkat çekici biçimde peptit ile muamele hücrelerde belirgin bir şekilde hizalanma ve homojen floresan sinyali gözlemlenmiştir. Aynı durum Trn ve peptitin birlikte araştırıldığı hücre grubunda da görülmüştür. Bu durum peptitin hücre organizasyonunu ve nöronal fenotip oluşumu potansiyelini göstermektedir. Kısaca bu deney grubunda ön indüksiyona maruz tutulmuş hücrelerde farklılaşma ortamı kullanılmadan peptit ve taurin ile farklılaşmaya dair bulguların elde edilmesi seçilen peptit ve Trn'nin nöral farklılaşma açısından güçlü potansiyelleri sahip olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.19 Kontrol (Ön indüksiyon ve nöral farklılaşma ortamı ile muamele edilen hücreler) , Trn, VSWRAPTA ve Trn+VSWRAPTA gruplarında kültürlen hücrelerin faz kontrast (sol) ve floresan mikroskop (sağ) görüntüleri. Floresan görüntülerde mavi ile çekirdekler (DAPI), yeşil ile ise nöronal belirteç Nestin boyaması göstermektedir

4.3.5 Fonksiyonelleştirilen İskelelerin Sitouyumluluğu

İşlevselleştirilen PVA/Kts nanofibröz doku iskelelerinin AD-MKH'ler üzerindeki sitouyumluluğu ekstrakt metoduna göre XTT hücre canlılığı testi ile incelenmiştir. Şekil 4.20' de 24 saat 37°C'de besi ortamında bekletilerek hazırlanan doku iskelesi ekstraktlarıyla muamele edilen hücrelerin hücre canlılıklarını göstermektedir. PVA/Kts doku iskelelerinin hücre uyumluluğu önceki çalışmalarda sıkça araştırılmış ve herhangi sitotoksik aktivite bildirilmemiştir. Bu çalışmada da PVA/Kts EDC/NHS çapraz bağlı iskeleler kontrolle benzer bir hücre canlılığı gösterdi ve AD-MHK'ler için sitouyumlu bulundu. Peptit ile işlevsel hale getirilen iskeleler ise gelişmiş bir hücre canlılığı ve çoğalması gösterdiler.

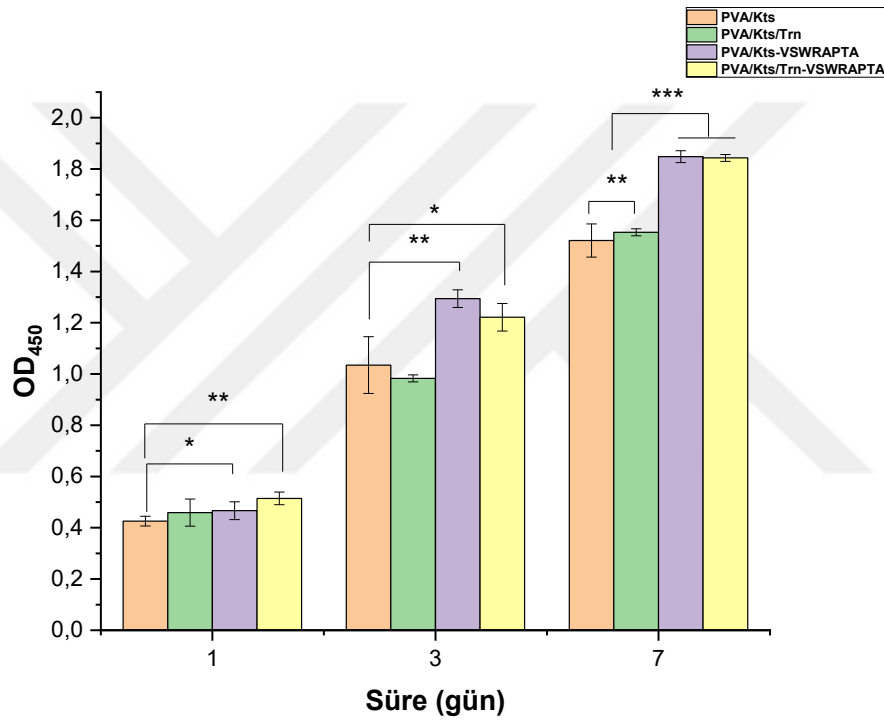


Şekil 4.20 Nanofibröz iskelelerin ekstraksiyon metodu ile incelenen dolaylı sitotoksosite sonuçları

4.3.6 Fonksiyonelleştirilen İskelelerin Hücre Çoğalması Üzerindeki Etkileri

İşlevselleştirilmiş nanofibröz iskelelerin hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri 1, 3 ve 7 günlük inkübasyon süreleri boyunca araştırıldı. Sonuçlar Şekil 4.21'de sunulmuştur. Tüm iskele gruplarında zamanla hücre proliferasyonunda artış gözlemlenmiş olup, bu durum geliştirilen iskelelerin hücre tutunması ve çoğalması için ideal bir iskele olduğunu göstermiştir. Kültürün 1. gününde tüm gruplar benzer hücre canlılıklarına sahipti. Bununla birlikte peptit içeren iskelelerde hücre canlılıkları tek başına PVA/Kts iskelelere göre anlamlı olarak daha fazlaydı ($p<0.05$). Kültürün 3. gününde peptitle fonksiyonelleştirilmiş gruplarda proliferatif etkiler belirgin olarak görülmeye başlanmış olup PVA/Kts-VSWRAPTA iskeleler,

diğer gruplara kıyasla daha yüksek hücre proliferasyonu sergilemiştir. Bununla birlikte peptitle işlevselleştirilmiş iskelelerde hücre canlılıkları açısından anlamlı bir fark yoktu. 7 günlük kültür süresince 3. güne benzer olarak peptitli iskeleler tek başına PVA/Kts ve PVA/Kts/Trn göre daha iyi hücre çoğalması göstermiştir. Peptitli iskelelerde 7. günde hücre canlılığı açısından önemli bir fark saptanmamıştır. PVA/Kts/Trn iskeleler için proliferasyon testi sonuçları karşılaştırıldığında AD-MHK'lerde PVA/Kts formlarında anlamlı olarak daha fazla hücre canlılığına sebep oldu. Ancak hücre çoğalması açısından benzer özellikler sergilemiştir.

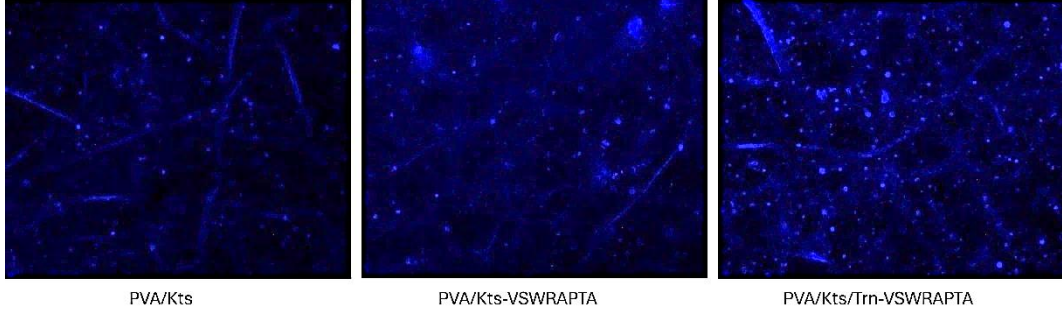


Şekil 4.21 Nanofibröz iskelelerle 7 günlük kültür süresinde AD-MKH'lerin hücre çoğalması

4.3.7 Hücre Tutunması

Fonksiyonelleştirilmiş iskelelere tutunan hücrelerin görüntülenmesi amacıyla çekirdek boyaması DAPI ile yapıldı. Şekil 4.22'de iskele üzerine ekilmiş hücrelerin 3. gün inkübasyon sonrasında gerçekleştirilen DAPI boyamasında, en yüksek hücre yoğunluğunun PVA/Kts/Trn-VSWRAPTA'da olduğu görülmektedir. PVA/Kts-VSWRAPTA iskelelerde PVA/Kts iskelelere göre daha fazla hücre yapışması gözlemlenmiştir. Elde edilen bulgular peptit ile yüzey fonksiyonelleştirmenin

hücrelerin tutunmasını ve proliferasyonu arttırdığını göstermekte ve bu sonuçlar XTT sonuçlarıyla da uyumlu bulunmuştur.



Şekil 4.22 Doku iskeleleri üzerinde kültürlen hücrelerin DAPI boyaması

5 SONUÇ

Bu tez çalışmasında, sinir doku mühendisliğinde kullanılmak üzere farklı moleküller dahil edilerek işlevselleştirilmiş, hücresel sağkalım, proliferasyon ve farklılaşma gibi hücresel süreçler üzerinde gelişmiş etkiler sağlayan bir multifonksiyonel biyoaktif bir doku iskelesi tasarımı yapılmış ve üretilmiştir. Bu amaçla tez çalışmasının ilk kısmında, birçok hücre tipi ve dokusunda proliferatif özelliklere sahip serbest bir amino asit olan taurin, 2-aminoetansülfonik asit, farklı oranlarda (%1-%20 ağırlıkça) polivinilalkol/kitosan nanofibröz iskeleler elektroegirme yöntemiyle üretildi ve çeşitli yönlerden karakterize edildi. İskelelerin SEM analizi sonuçlarına göre, polimer matrise farklı oranlarda doğrudan dahil edilerek üretilen iskelelerin ortalama fiber çaplarının 270 ile 400 nm aralığında değiştiği belirlenmiş ve ağırlıkça %10 Trn kadar düzgün morfolojide fiberlerin üretilbildiği bulunmuştur. FT-IR spektroskopisi ile Trn'nin nanofiber yapıya dahil olduğu Trn özgü piklerin gözlemlenmesiyle doğrulandı. İskelelere Trn dahil edilmesi iskelelerin hidrofilik özelliklerinde farklı sonuçlara neden olmuş ve %1 taurin içeren PVA/Kts iskeleler en iyi şişme davranışını gösterdi. Mekanik özellikler açısından da en iyi kopma uzaması sergilemiştir. SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde gerçekleştirilen in vitro sitotoksosite ve proliferasyon çalışmaları üretilen Trn içeren iskelelerin sitouyumluluğunu doğruladı ve PVA/Kts%1Trn nanofibröz iskelelerin proliferasyonu desteklediğini gösterdi.

Tezin ikinci aşamasında ilk aşamada elde edilen bulgulardan yola çıkılarak, PVA/Kts ve PVA/Kts/Trn%1 iskelelerin yüzey fonksiyonelleştirilmesi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Yüzey fonksiyonelleştirilmesi için nöronal dallanmayı teşvik ettiği bildirilen Tenasin C proteininden türetilen nöroaktif peptit VSWRAPTA,

EDC/NHS çapraz bağlama metodu kullanılarak iskeleler işlevselleştirildi. Biyoaktif doku iskelelerinin mikro yapı incelemesi, peptit ile yüzey modifikasyonundan sonra her iki iskele için de nanofiber yapının korunduğunu göstermiştir. Nanofibröz iskelelere bağlanan peptit miktarı BCA analizi ile belirlenmiştir. Bağlanan peptit miktarı PVA/Kts/Trn iskelelerde, PVA/Kts iskelelerden daha fazladır. Bu durum peptit işlevselleştirilmesi öncesi nanofiber matrise dahil edilen bileşiklerin bağlanma miktarını arttırabileceğini göstermektedir.

Peptit bağlama işlemi PVA/Kts/Trn iskelelerde fiber çaplarında artışa neden olmuştur. Aynı zamanda BCA testi sonuçları, peptit bağlama kapasitesi açısından PVA/Kts/Trn iskelelerin daha yüksek miktarda peptit bağlanması sağladığını göstermiştir. Geliştirilen biyoaktif doku iskelesinin ve kullanılan biyoaktif moleküllerin in vitro hücresel etkileri yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücreler üzerinde incelendi. Biyoaktif maddelerin yara kapanması çalışmaları, taurinin AD-MHK'lerin hücre göçü üzerinde etkili olabileceğini göstermiştir. İmmunohistokimyasal boyamalarda, AD-MHK'lerin nörogenik farklılaşması, erken nöro belirteç olan Nestinin ekspresyonunu ile gösterilmiştir. Ayrıca fonksiyonelleştirme için kullanılan Trn ve VSWRAPTA peptitinin AD-MHK'lerin nörogenik farklılaşması üzerindeki etkileri incelenmiş, ön indüksiyondan sonra EGF, FGF ve retinoik asit içermeyen kültürlerin Nestin ekspresyonu saptanmıştır. Bu bulgu biyoaktif maddelerin farklılaşmadaki potansiyel rolünü göstermiştir. Biyoaktif maddelerin AD-MHK'lerde migrasyon testi sonuçları çizik hattının kapanmasındaki erken aşamalarda hücre göçü üzerinde kontrole göre gelişmiş etkiler sağlayabileceğini göstermektedir. İşlevselleştirilmiş iskelelerin sitotoksitesite çalışmaları geliştirilen tüm formların sitouyumlu olduğunu doğrulamıştır. İşlevselleştirilmiş iskeleler hücre proliferasyonunda gelişmiş özellikler sergilemiştir. Bu tez çalışmasında ilk kez VSWRAPTA peptitinin mezenkimal kök hücreler üzerindeki etkileri incelenmiş olup ayrıca fonksiyonel bir doku iskelesi geliştirilmesi için kullanılmıştır.

- Ai, C., Liu, L., & Goh, J. C.-H. (2021). Pore size modulates in vitro osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells in fibronectin/gelatin coated silk fibroin scaffolds. *Materials Science and Engineering: C*, 124, 112088.
- Alavarse, A. C., de Oliveira Silva, F. W., Colque, J. T., da Silva, V. M., Prieto, T., Venancio, E. C., & Bonvent, J.-J. (2017). Tetracycline hydrochloride-loaded electrospun nanofibers mats based on PVA and chitosan for wound dressing. *Materials Science and Engineering: C*, 77, 271–281.
- Albacete-Albacete, L., Sánchez-Álvarez, M., & del Pozo, M. A. (2021). Extracellular Vesicles: An Emerging Mechanism Governing the Secretion and Biological Roles of Tenascin-C. *Frontiers in Immunology*, 12, 671485.
- Alhosseini, S. N., Moztaazadeh, F., Mozafari, M., Asgari, S., Dodel, M., Samadikuchaksaraei, A., ... Jalali, N. (2012). Synthesis and characterization of electrospun polyvinyl alcohol nanofibrous scaffolds modified by blending with chitosan for neural tissue engineering. *International journal of nanomedicine*, 7, 25–34.
- Allmeling, C., Jokuszies, A., Reimers, K., Kall, S., Choi, C. Y., Brandes, G., ... Vogt, P. M. (2008). Spider silk fibres in artificial nerve constructs promote peripheral nerve regeneration. *Cell Proliferation*, 41(3), 408–420.
- Alvites, R. D., Branquinho, M. V, Sousa, A. C., Amorim, I., Magalhães, R., João, F., ... Maurício, A. C. (2021). Combined Use of Chitosan and Olfactory Mucosa Mesenchymal Stem/Stromal Cells to Promote Peripheral Nerve Regeneration In Vivo. *Stem Cells International*, 2021(1), 6613029.
- Amari, S.-I. (1980). Topographic organization of nerve fields. *Bulletin of mathematical biology*, 42(3), 339–364.
- Amirian, R., Mohammadi Pour, P., Maleki, H., Fakhri, S., Asgary, S., Farzaei, M. H., & Echeverría, J. (2025). Evaluating the anti-neuropathic effects of the thymol-loaded nanofibrous scaffold in a rat model of spinal cord injury. *Frontiers in pharmacology*, 16, 1507397.
- Angammana, C. J., & Jayaram, S. H. (2016). Fundamentals of electrospinning and processing technologies. *Particulate Science and Technology*, 34(1), 72–82.
- Aranaz, I., Alcántara, A. R., Civera, M. C., Arias, C., Elorza, B., Heras Caballero, A., & Acosta, N. (2021). Chitosan: An Overview of Its Properties and Applications. *Polymers*, 13(19), 3256.
- Ariza, C. A., Fleury, A. T., Tormos, C. J., Petruk, V., Chawla, S., Oh, J., ... Mallapragada, S. K. (2010). The influence of electric fields on hippocampal neural progenitor cells. *Stem Cell Reviews and Reports*, 6, 585–600.
- Bahrami, S. B., Kordestani, S. S., Mirzadeh, H., & MANSOURI, P. (2003). *Poly (vinyl alcohol)-chitosan blends: preparation, mechanical and physical properties*. *Iranian Polymer Journal*, 12(2), 139–146.

- Bal Öztürk, A., & Akgüner, Z. P. (2020). İpek Fibroin/Polivinil Alkol Esaslı İlaç Taşıyıcı Yara Örtüleri TT - Silk Fibroin/Polyvinyl alcohol Based Drug Carrier Wound Dressings. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 24(1), 25–34.
- Baldwin, K. T., & Giger, R. J. (2015). Insights into the physiological role of CNS regeneration inhibitors. *Frontiers in molecular neuroscience*, 8, 23.
- Bartlett, R. D., Eleftheriadou, D., Evans, R., Choi, D., & Phillips, J. B. (2020). Mechanical properties of the spinal cord and brain: Comparison with clinical-grade biomaterials for tissue engineering and regenerative medicine. *Biomaterials*, 258, 120303.
- Bedir, T., Şengör, M., Gunduz, O., & Ustundag, C. B. (2023). The need for biomaterials in neural tissue engineering. In *Biomaterials for Neural Tissue Engineering* (pp. 1–8). Elsevier.
- Bellamkonda, R., & Aebischer, P. (1994). Tissue engineering in the nervous system. *Biotechnology and bioengineering*, 43(7), 543–554.
- Berns, E. J., Álvarez, Z., Goldberger, J. E., Boekhoven, J., Kessler, J. A., Kuhn, H. G., & Stupp, S. I. (2016). A tenascin-C mimetic peptide amphiphile nanofiber gel promotes neurite outgrowth and cell migration of neurosphere-derived cells. *Acta Biomaterialia*, 37, 50–58.
- Bi, S., Pang, J., Huang, L., Sun, M., Cheng, X., & Chen, X. (2020). The toughness chitosan-PVA double network hydrogel based on alkali solution system and hydrogen bonding for tissue engineering applications. *International journal of biological macromolecules*, 146, 99–109.
- Bigbee, J. W. (2022). Cells of the central nervous system: an overview of their structure and function. *Glycobiology of the Nervous System*, 41–64.
- Boccaccini, A. R., & Blaker, J. J. (2005). Bioactive composite materials for tissue engineering scaffolds. *Expert review of medical devices*, 2(3), 303–317.
- Boecker, A., Däscher, S. C., Kneser, U., & Harhaus, L. (2019). Relevance and recent developments of chitosan in peripheral nerve surgery. *Frontiers in cellular neuroscience*, 13, 104.
- Bosman, F. T., & Stamenkovic, I. (2003). Functional structure and composition of the extracellular matrix. *The Journal of Pathology*, 200(4), 423–428.
- Brösicke, N., Sallouh, M., Prior, L.-M., Job, A., Weberskirch, R., & Faissner, A. (2015). Extracellular Matrix Glycoprotein-Derived Synthetic Peptides Differentially Modulate Glioma and Sarcoma Cell Migration. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 35(5), 741–753.
- Budlayan, M. L. M., Oracion, J. P. L., De La Rosa, L. B., Rodriguez, M. J. D., Patricio, J. N., Perez, J. L. P., ... Alguno, A. C. (2022). Preparation of spin-coated poly (vinyl alcohol)/chitosan/gold nanoparticles composite and its potential for colorimetric detection of cyanide in water. *Pol. J. Environ. Stud*, 31(2), 1569.
- Butruk-Raszeja, B. A., & Kuźmińska, A. (2018). Determination of polyurethane-grafted peptide (GSGREDVGSG) using bicinehoninic acid assay. *BioTechniques*, 64(6), 245–253.

- Butt, M. T., Bradley, A., & Sills, R. (2018). Nervous system. İçinde *Toxicologic Pathology* (ss. 1093–1132). CRC Press.
- Cantile, C., & Youssef, S. (2016). *Chapter 4 - Nervous system*. In M. G. Maxie (Ed.), *Jubb, Kennedy & Palmer's pathology of domestic animals* (6th ed., Vol. 1, pp. 250–406). Elsevier.
- Cao, H., Liu, T., & Chew, S. Y. (2009). The application of nanofibrous scaffolds in neural tissue engineering. *Advanced drug delivery reviews*, 61(12), 1055–1064.
- Cao, Z., Mao, H., & Zhao, L. (2018). Hierarchically aligned fibrin nanofiber hydrogel accelerated axonal regrowth and locomotor function recovery in rat spinal cord injury. *International journal of nanomedicine*, 13, 2883–2895.
- Cardozo, A. J., Gómez, D. E., & Argibay, P. F. (2012). Neurogenic differentiation of human adipose-derived stem cells: Relevance of different signaling molecules, transcription factors, and key marker genes. *Gene*, 511(2), 427–436.
- Causa, F., Battista, E., Della Moglie, R., Guarnieri, D., Iannone, M., & Netti, P. A. (2010). Surface Investigation on Biomimetic Materials to Control Cell Adhesion: The Case of RGD Conjugation on PCL. *Langmuir*, 26(12), 9875–9884.
- Chakrapani, G., Ramakrishna, S., & Zare, M. (2023). Functionalization of electrospun nanofiber for biomedical application. *Journal of Applied Polymer Science*, 140(23), e53906.
- Chang, C.-Y., Shen, C.-Y., Kang, C.-K., Sher, Y.-P., Sheu, W. H.-H., Chang, C.-C., & Lee, T.-H. (2014). Taurine protects HK-2 cells from oxidized LDL-induced cytotoxicity via the ROS-mediated mitochondrial and p53-related apoptotic pathways. *Toxicology and applied pharmacology*, 279(3), 351–363.
- Chen, R., Cohen, L. G., & Hallett, M. (2002). Nervous system reorganization following injury. *Neuroscience*, 111(4), 761–773.
- Chen, Y.-S., Harn, H.-J., & Chiou, T.-W. (2018). The role of biomaterials in implantation for central nervous system injury. *Cell Transplantation*, 27(3), 407–422.
- Chiquet-Ehrismann, R., Orend, G., Chiquet, M., Tucker, R. P., & Midwood, K. S. (2014). Tenascins in stem cell niches. *Matrix Biology*, 37, 112–123.
- Ciardelli, G., & Chiono, V. (2006). Materials for peripheral nerve regeneration. *Macromolecular bioscience*, 6(1), 13–26.
- Conovaloff, A. W., Beier, B. L., Irazoqui, P. P., & Panitch, A. (2011). Effects of a synthetic bioactive peptide on neurite growth and nerve growth factor release in chondroitin sulfate hydrogels. *Biomatter*, 1(2), 165–173.
- Cui, L., Jiang, J., Wei, L., Zhou, X., Fraser, J. L., Snider, B. J., & Yu, S. P. (2008). Transplantation of Embryonic Stem Cells Improves Nerve Repair and Functional Recovery After Severe Sciatic Nerve Axotomy in Rats. *Stem Cells*, 26(5), 1356–1365.
- Cui, Z., Zheng, Z., Lin, L., Si, J., Wang, Q., Peng, X., & Chen, W. (2018). Electrospinning and crosslinking of polyvinyl alcohol/chitosan composite

- nanofiber for transdermal drug delivery. *Advances in Polymer Technology*, 37(6), 1917–1928.
- Curcio, M., & Bradke, F. (2018). Axon regeneration in the central nervous system: facing the challenges from the inside. *Annual review of cell and developmental biology*, 34(1), 495–521.
- Dahlin, L. B. (2008). Techniques of peripheral nerve repair. *Scandinavian Journal of Surgery*, 97(4), 310–316.
- Dalton, P. D., O'Neill, K. L., Pêgo, A. P., Plant, G. W., Nisbet, D. R., Oudega, M., ... Harvey, A. R. (2023). Tissue engineering of the nervous system. In *Tissue engineering* (pp. 585–627). Elsevier.
- Daly, W. T., Knight, A. M., Wang, H., de Boer, R., Giusti, G., Dadsetan, M., ... Windebank, A. J. (2013). Comparison and characterization of multiple biomaterial conduits for peripheral nerve repair. *Biomaterials*, 34(34), 8630–8639.
- Desbrieres, J. (2002). Viscosity of semiflexible chitosan solutions: Influence of concentration, temperature, and role of intermolecular interactions. *Biomacromolecules*, 3(2), 342–349.
- Dezawa, M. (2002). Central and peripheral nerve regeneration by transplantation of Schwann cells and transdifferentiated bone marrow stromal cells. *Anatomical Science International*, 77(1), 12–25.
- Ding, S., Kingshott, P., Thissen, H., Pera, M., & Wang, P. (2017). Modulation of human mesenchymal and pluripotent stem cell behavior using biophysical and biochemical cues: A review. *Biotechnology and bioengineering*, 114(2), 260–280.
- Doshi, J., & Reneker, D. H. (1995). Electrospinning process and applications of electrospun fibers. *Journal of Electrostatics*, 35(2), 151–160.
- Du, J., Tan, E., Kim, H. J., Zhang, A., Bhattacharya, R., & Yarema, K. J. (2014). Comparative evaluation of chitosan, cellulose acetate, and polyethersulfone nanofiber scaffolds for neural differentiation. *Carbohydrate polymers*, 99, 483–490.
- Dubey, G., & Mequanint, K. (2011). Conjugation of fibronectin onto three-dimensional porous scaffolds for vascular tissue engineering applications. *Acta Biomaterialia*, 7(3), 1114–1125.
- El-Hefian, E. A., Nasef, M. M., & Yahaya, A. H. (2010). The Preparation and Characterization of Chitosan / Poly (Vinyl Alcohol) Blended Films. *Journal of Chemistry*, 7(4), 626235.
- Eppler, B., & Dawson Jr, R. (2002). Cytoprotective role of taurine in a renal epithelial cell culture model. *Biochemical pharmacology*, 63(6), 1051–1060.
- Erichsen, J. E. (1997). Injuries of the nervous system: on railway and other injuries of the nervous system. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*, 336, 4–10.
- Faroni, A., Rothwell, S. W., Grolla, A. A., Terenghi, G., Magnaghi, V., & Verkhatsky, A. (2013). Differentiation of adipose-derived stem cells into Schwann cell phenotype induces expression of P2X receptors that control cell

- death. *Cell Death & Disease*, 4(7), e743–e743.
- Farzamfar, S., Naseri-Nosar, M., Samadian, H., Mahakizadeh, S., Tajerian, R., Rahmati, M., ... Salehi, M. (2018). Taurine-loaded poly (ϵ -caprolactone)/gelatin electrospun mat as a potential wound dressing material: In vitro and in vivo evaluation. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 33(3), 282–294.
- Fawcett, J. W. (2020). The struggle to make CNS axons regenerate: why has it been so difficult? *Neurochemical research*, 45(1), 144–158.
- Feng, Z.-Q., Yan, K., Shi, C., Xu, X., Wang, T., Li, R., ... Zheng, J. (2018). Neurogenic differentiation of adipose derived stem cells on graphene-based mat. *Materials Science and Engineering: C*, 90, 685–692.
- Fischer, M. J. E. (2010). Amine coupling through EDC/NHS: a practical approach. İçinde *Surface plasmon resonance: methods and protocols* (ss. 55–73). Springer.
- Fitch, M. T., & Silver, J. (2008). CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure. *Experimental neurology*, 209(2), 294–301.
- Fitzsimmons, R. E. B., Mazurek, M. S., Soos, A., & Simmons, C. A. (2018). Mesenchymal Stromal/Stem Cells in Regenerative Medicine and Tissue Engineering. *Stem Cells International*, 2018(1), 8031718.
- Forouzanfar, F., Soleimannejad, M., Soltani, A., Sadat Mirsafae, P., & Asgharzade, S. (2021). Retinoic acid and taurine enhance differentiation of the human bone marrow stem cells into cone photoreceptor cells and retinal ganglion cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 122(12), 1915–1924.
- Franze, K. (2013). The mechanical control of nervous system development. *Development*, 140(15), 3069–3077.
- Gallagher, W. (2009). FTIR analysis of protein structure. *Course manual Chem*, 455, 1–8.
- Gaudet, A. D., Popovich, P. G., & Ramer, M. S. (2011). Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. *Journal of neuroinflammation*, 8, 1–13.
- Gelain, F., Cigognini, D., Caprini, A., Silva, D., Colleoni, B., Donegà, M., ... Vescovi, A. (2012). New bioactive motifs and their use in functionalized self-assembling peptides for NSC differentiation and neural tissue engineering. *Nanoscale*, 4, 2946–2957.
- Geng, X., Kwon, O.-H., & Jang, J. (2005). Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution. *Biomaterials*, 26(27), 5427–5432.
- Giblin, S. P., & Midwood, K. S. (2015). Tenascin-C: Form versus function. *Cell Adhesion & Migration*, 9(1–2), 48–82.
- Goddard, J. M., & Hotchkiss, J. H. (2007). Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds. *Progress in polymer science*, 32(7), 698–725.
- González-Vázquez, M., Meza-Márquez, O. G., Gallardo-Velázquez, T., Osorio-Revilla, G., Velázquez Hernández, J. L., & Hernández-Martínez, M. (2020).

- Simultaneous Determination of Caffeine and Taurine in Energy Drinks by FT-MIR Spectroscopy Coupled with Multivariate Analysis. *Journal of Spectroscopy*, 2020(1), 8835846.
- González, E., Shepherd, L. M., Saunders, L., & Frey, M. W. (2016). Surface functional poly (lactic acid) electrospun nanofibers for biosensor applications. *Materials*, 9(1), 47.
- Griffin, J. W., Hogan, M. V, Chhabra, A. B., & Deal, D. N. (2013). Peripheral nerve repair and reconstruction. *Jbjs*, 95(23), 2144–2151.
- Grinberg, O., Binderman, I., Bahar, H., & Zilberman, M. (2010). Highly porous bioresorbable scaffolds with controlled release of bioactive agents for tissue-regeneration applications. *Acta biomaterialia*, 6(4), 1278–1287.
- Gu, B. K., Park, S. J., Kim, M. S., Kang, C. M., Kim, J.-I., & Kim, C.-H. (2013). Fabrication of sonicated chitosan nanofiber mat with enlarged porosity for use as hemostatic materials. *Carbohydrate Polymers*, 97(1), 65–73.
- Gu, X. (2015). Progress and perspectives of neural tissue engineering. *Frontiers of medicine*, 9(4), 401–411.
- Guex, A. G., Hegemann, D., Giraud, M.-N., Tevaearai, H. T., Popa, A. M., Rossi, R. M., & Fortunato, G. (2014). Covalent immobilisation of VEGF on plasma-coated electrospun scaffolds for tissue engineering applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 123, 724–733.
- Guo, B., Lei, B., Li, P., & Ma, P. X. (2015). Functionalized scaffolds to enhance tissue regeneration. *Regenerative biomaterials*, 2(1), 47–57.
- Hamley, I. W. (2017). Small bioactive peptides for biomaterials design and therapeutics. *Chemical reviews*, 117(24), 14015–14041.
- Han, R., Luo, L., Wei, C., Qiao, Y., Xie, J., Pan, X., & Xing, J. (2025). Stiffness-tunable biomaterials provide a good extracellular matrix environment for axon growth and regeneration. *Neural Regeneration Research*, 20(5), 1364–1376.
- Harhaus, L., Dengler, N. F., Schwerdtfeger, K., & Stolle, A. (2024). The Treatment of Peripheral Nerve Injuries. *Deutsches Ärzteblatt International*, 121(16), 534.
- He, L., Tang, S., Prabhakaran, M. P., Liao, S., Tian, L., Zhang, Y., ... Ramakrishna, S. (2013). Surface modification of PLLA nano-scaffolds with laminin multilayer by Lb L assembly for enhancing neurite outgrowth. *Macromolecular bioscience*, 13(11), 1601–1609.
- Hernández-Benítez, R., Pasantes-Morales, H., Saldaña, I. T., & Ramos-Mandujano, G. (2010). Taurine stimulates proliferation of mice embryonic cultured neural progenitor cells. *Journal of Neuroscience Research*, 88(8), 1673–1681.
- Homayoni, H., Ravandi, S. A. H., & Valizadeh, M. (2009). Electrospinning of chitosan nanofibers: Processing optimization. *Carbohydrate Polymers*, 77(3), 656–661.
- Hussain, G., Wang, J., Rasul, A., Anwar, H., Qasim, M., Zafar, S., ... de Aguilar, J.-L. G. (2020). Current status of therapeutic approaches against peripheral nerve injuries: a detailed story from injury to recovery. *International journal of biological sciences*, 16(1), 116.
- Huxtable, R. J. (1992). Physiological actions of taurine. *Physiological reviews*,

72(1), 101–163.

- Intranuovo, F., Gristina, R., Fracassi, L., Lacitignola, L., Crovace, A., & Favia, P. (2016). Plasma processing of scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, 36, 269–280.
- Jäkel, S., & Dimou, L. (2017). Glial cells and their function in the adult brain: a journey through the history of their ablation. *Frontiers in cellular neuroscience*, 11, 235525.
- Jang, S., Cho, H.-H., Cho, Y.-B., Park, J.-S., & Jeong, H.-S. (2010). Functional neural differentiation of human adipose tissue-derived stem cells using bFGF and forskolin. *BMC Cell Biology*, 11(1), 25.
- Jänig, W. (2013). *The Autonomic Nervous System BT - Neurosciences - From Molecule to Behavior: a university textbook* (C. G. Galizia & P.-M. Lledo, Eds.). pp. 179–211. Springer Spectrum.
- Jarocki, M., Sallouh, O., Weberskirch, R., & Faissner, A. (2019). The Tenascin-C-Derived Peptide VSWRAPTA Promotes Neuronal Branching Via Transcellular Activation of the Focal Adhesion Kinase (FAK) and the ERK1/2 Signaling Pathway In Vitro. *Molecular Neurobiology*, 56(1), 632–647.
- Ji, W., Sun, Y., Yang, F., van den Beucken, J. J. J. P., Fan, M., Chen, Z., & Jansen, J. A. (2011). Bioactive electrospun scaffolds delivering growth factors and genes for tissue engineering applications. *Pharmaceutical research*, 28, 1259–1272.
- Jiang, H., Hu, Y., Li, Y., Zhao, P., Zhu, K., & Chen, W. (2005). A facile technique to prepare biodegradable coaxial electrospun nanofibers for controlled release of bioactive agents. *Journal of Controlled Release*, 108(2), 237–243.
- Jin, W., Xing, Y., & Yang, A. (2009). Epidermal growth factor promotes the differentiation of stem cells derived from human umbilical cord blood into neuron-like cells via taurine induction in vitro. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 45, 321–327.
- Jones, J. R. (2009). New trends in bioactive scaffolds: the importance of nanostructure. *Journal of the European ceramic society*, 29(7), 1275–1281.
- Kakinoki, S., Uchida, S., Ehashi, T., Murakami, A., & Yamaoka, T. (2011). Surface modification of poly (L-lactic acid) nanofiber with oligo (D-lactic acid) bioactive-peptide conjugates for peripheral nerve regeneration. *Polymers*, 3(2), 820–832.
- Kameneva, P., & Adameyko, I. (2019). Recent advances in our understanding of central and peripheral nervous system progenitors. *Current opinion in cell biology*, 61, 24–30.
- Kania, A. (2013). Spinal motor neuron migration and the significance of topographic organization in the nervous system. *Cellular and Molecular Control of Neuronal Migration*, 133–148.
- Kapoor, K. N., Barry, D. T., Rees, R. C., Dodi, I. A., McArdle, S. E. B., Creaser, C. S., & Bonner, P. L. R. (2009). Estimation of peptide concentration by a modified bicinchoninic acid assay. *Analytical Biochemistry*, 393(1), 138–140.
- Kearns, S., & Dawson Jr, R. (2002). Cytoprotective effect of taurine against

- hypochlorous acid toxicity to PC12 cells. İçinde *Taurine 4: Taurine and Excitable Tissues* (ss. 563–570). Springer.
- Keirouz, A., Wang, Z., Reddy, V. S., Nagy, Z. K., Vass, P., Buzgo, M., ... Radacsi, N. (2023). The history of electrospinning: past, present, and future developments. *Advanced Materials Technologies*, 8(11), 2201723.
- Kim, S. U., & de Vellis, J. (2009). Stem cell-based cell therapy in neurological diseases: A review. *Journal of Neuroscience Research*, 87(10), 2183–2200.
- Knowlton, S., Cho, Y., Li, X.-J., Khademhosseini, A., & Tasoglu, S. (2016). Utilizing stem cells for three-dimensional neural tissue engineering. *Biomaterials Science*, 4(5), 768–784.
- Koosha, M., & Mirzadeh, H. (2015). Electrospinning, mechanical properties, and cell behavior study of chitosan/PVA nanofibers. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 103(9), 3081–3093.
- Kothapalli, C., Mahajan, G., & Farrell, K. (2020). Substrate stiffness induced mechanotransduction regulates temporal evolution of human fetal neural progenitor cell phenotype, differentiation, and biomechanics. *Biomaterials science*, 8(19), 5452–5464.
- Kozai, T. D. Y., Jaquins-Gerstl, A. S., Vazquez, A. L., Michael, A. C., & Cui, X. T. (2015). Brain tissue responses to neural implants impact signal sensitivity and intervention strategies. *ACS chemical neuroscience*, 6(1), 48–67.
- Kumar, M. N. V. R., Muzzarelli, R., Muzzarelli, C., Sashiwa, H., & Domb, A. J. (2004). Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chemical reviews*, 104(12), 6017–6084.
- Kumar, N., Thomas, S., Tokas, R. B., & Kshirsagar, R. J. (2014). Investigation on the adsorption characteristics of sodium benzoate and taurine on gold nanoparticle film by ATR–FTIR spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 118, 614–618.
- Langer, R., & Vacanti, J. (2016). Advances in tissue engineering. *Journal of pediatric surgery*, 51(1), 8–12.
- Lee, H. J., Ryu, J. S., & Vig, P. J. S. (2019). Current strategies for therapeutic drug delivery after traumatic CNS injury. *Therapeutic Delivery*, 10(4), 251–263.
- Li, L., El-Hayek, Y. H., Liu, B., Chen, Y., Gomez, E., Wu, X., ... Zhang, L. (2008). Direct-current electrical field guides neuronal stem/progenitor cell migration. *Stem cells*, 26(8), 2193–2200.
- Li, T.-T., Yan, M., Zhong, Y., Ren, H.-T., Lou, C.-W., Huang, S.-Y., & Lin, J.-H. (2019). Processing and characterizations of rotary linear needleless electrospun polyvinyl alcohol (PVA)/Chitosan (CS)/Graphene (Gr) nanofibrous membranes. *Journal of Materials Research and Technology*, 8(6), 5124–5132.
- Liang, D., Hsiao, B. S., & Chu, B. (2007). Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(14), 1392–1412.
- Liu, P., Sun, L., Liu, P., Yu, W., Zhang, Q., Zhang, W., ... Shen, J. (2018). Surface modification of porous PLGA scaffolds with plasma for preventing

- dimensional shrinkage and promoting scaffold–cell/tissue interactions. *Journal of Materials Chemistry B*, 6(46), 7605–7613.
- Liu, X., Zhou, C., Xie, Q., Xia, L., Liu, L., Bao, W., ... Liang, W. (2024). Recent advances in layer-by-layer assembly scaffolds for co-delivery of bioactive molecules for bone regeneration: an updated review. *Journal of Translational Medicine*, 22(1), 1001.
- Liu, Y., Zhang, C., Kong, Y., Liu, H., Guo, J., Yang, H., & Deng, L. (2022). Modification of collagen film via surface grafting of taurine molecular to promote corneal nerve repair and epithelization process. *Journal of Functional Biomaterials*, 13(3), 98.
- Lunn, E. R., Perry, V. H., Brown, M. C., Rosen, H., & Gordon, S. (1989). Absence of Wallerian degeneration does not hinder regeneration in peripheral nerve. *European Journal of Neuroscience*, 1(1), 27–33.
- Luo, J., Walker, M., Xiao, Y., Donnelly, H., Dalby, M. J., & Salmeron-Sanchez, M. (2022). The influence of nanotopography on cell behaviour through interactions with the extracellular matrix—A review. *Bioactive materials*, 15, 145–159.
- Ma, G., Sun, N., Yu, Q., Han, L., Wu, L., Cao, H., & Han, G. (2018). Characterization of separation and purification technology and identification of taurine from the bovine liver. *Food analytical methods*, 11, 415–425.
- Mai, J. K., & Paxinos, G. (2011). *The human nervous system*. Academic Press.
- Margiana, R., Markov, A., Zekiy, A. O., Hamza, M. U., Al-Dabbagh, K. A., Al-Zubaidi, S. H., ... Siahmansouri, H. (2022). Clinical application of mesenchymal stem cell in regenerative medicine: a narrative review. *Stem Cell Research & Therapy*, 13(1), 366.
- Meiners, S., Nur-e-Kamal, M. S., & Mercado, M. L. (2001). Identification of a neurite outgrowth-promoting motif within the alternatively spliced region of human tenascin-C. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(18), 7215–7225.
- Mercado, M. L. T., Nur-e-Kamal, A., Liu, H.-Y., Gross, S. R., Movahed, R., & Meiners, S. (2004). Neurite outgrowth by the alternatively spliced region of human tenascin-C is mediated by neuronal $\alpha 7 \beta 1$ integrin. *Journal of Neuroscience*, 24(1), 238–247.
- Midwood, K. S., Chiquet, M., Tucker, R. P., & Orend, G. (2016). Tenascin-C at a glance. *Journal of Cell Science*, 129(23), 4321–4327.
- Midwood, K. S., & Orend, G. (2009). The role of tenascin-C in tissue injury and tumorigenesis. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 3(3), 287–310.
- Milosavljević, A., Jančić, J., Mirčić, A., Dožić, A., Boljanović, J., Milisavljević, M., & Četković, M. (2021). Morphological and functional characteristics of satellite glial cells in the peripheral nervous system. *Folia Morphologica*, 80(4), 745–755.
- Mottaghitlab, F., Farokhi, M., Mottaghitlab, V., Ziabari, M., Divsalar, A., & Shokrgozar, M. A. (2011). Enhancement of neural cell lines proliferation using nano-structured chitosan/poly (vinyl alcohol) scaffolds conjugated with nerve growth factor. *Carbohydrate Polymers*, 86(2), 526–535.

- Mutlu, B., Çiftçi, F., Üstündağ, C. B., & Çakır-Koç, R. (2023). Lavandula stoechas extract incorporated polylactic acid nanofibrous mats as an antibacterial and cytocompatible wound dressing. *International Journal of Biological Macromolecules*, 253, 126932.
- Narayanan, K. B. (2025). Nanotopographical Features of Polymeric Nanocomposite Scaffolds for Tissue Engineering and Regenerative Medicine: A Review. *Biomimetics*, 10(5), 317.
- Nikolova, M. P., & Chavali, M. S. (2019). Recent advances in biomaterials for 3D scaffolds: A review. *Bioactive materials*, 4, 271–292.
- Ohkawa, K., Cha, D., Kim, H., Nishida, A., & Yamamoto, H. (2004). Electrospinning of chitosan. *Macromolecular rapid communications*, 25(18), 1600–1605.
- Okano, H., & Sawamoto, K. (2008). Neural stem cells: involvement in adult neurogenesis and CNS repair. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1500), 2111–2122.
- Onak, G., Ercan, U. K., & Karaman, O. (2020). Antibacterial activity of antimicrobial peptide-conjugated nanofibrous membranes. *Biomedical Materials*, 16(1), 15020.
- Ortuño-Costela, M. D., Cerrada, V., García-López, M., & Gallardo, M. E. (2019). The Challenge of Bringing iPSCs to the Patient. *International Journal of Molecular Sciences*, C. 20.
- Pakravan, M., Heuzey, M.-C., & Ajji, A. (2011). A fundamental study of chitosan/PEO electrospinning. *Polymer*, 52(21), 4813–4824.
- Panagopoulos, G. N., Megaloikonomos, P. D., & Mavrogenis, A. F. (2017). The present and future for peripheral nerve regeneration. *Orthopedics*, 40(1), e141–e156.
- Pasantes-Morales, H., Ramos-Mandujano, G., & Hernández-Benítez, R. (2015). Taurine enhances proliferation and promotes neuronal specification of murine and human neural stem/progenitor cells. *Taurine* 9, 457–472.
- Patel, S., Kurpinski, K., Quigley, R., Gao, H., Hsiao, B. S., Poo, M.-M., & Li, S. (2007). Bioactive nanofibers: Synergistic effects of nanotopography and chemical signaling on cell guidance. *Nano Letters*, 7(7), 2122–2128.
- Pires, F., Ferreira, Q., Rodrigues, C. A. V., Morgado, J., & Ferreira, F. C. (2015). Neural stem cell differentiation by electrical stimulation using a cross-linked PEDOT substrate: Expanding the use of biocompatible conjugated conductive polymers for neural tissue engineering. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1850(6), 1158–1168.
- Prodanov, D., & Delbeke, J. (2016). Mechanical and biological interactions of implants with the brain and their impact on implant design. *Frontiers in neuroscience*, 10, 11.
- Pugliese, R., & Gelain, F. (2017). Peptidic Biomaterials: From Self-Assembling to Regenerative Medicine. *Trends in Biotechnology*, 35(2), 145–158.
- Qian, J., Lin, Z., Liu, Y., Wang, Z., Lin, Y., Gong, C., ... Yang, H. (2021). Functionalization strategies of electrospun nanofibrous scaffolds for nerve

- tissue engineering. *Smart Materials in Medicine*, 2, 260–279.
- Rahman, M. M., Islam, M. R., Islam, M. T., Harun-Or-Rashid, M., Islam, M., Abdullah, S., ... Mostafa-Hedeab, G. (2022). Stem Cell Transplantation Therapy and Neurological Disorders: Current Status and Future Perspectives. *Biology*, 11(1), 147.
- Ramos-Zúñiga, R., Segura-Duran, I., González-Castañeda, R. E., & Rios, J. A. G. (2022). The challenges of the bioactive scaffolds in nervous system: from their molecular conformation to their therapeutic efficiency. *Neurology Perspectives*, 2, S3–S18.
- Rasouli, R., Barhoum, A., Bechelany, M., & Dufresne, A. (2019). Nanofibers for biomedical and healthcare applications. *Macromolecular bioscience*, 19(2), 1800256.
- Ribeiro-Resende, V. T., Koenig, B., Nichterwitz, S., Oberhoffner, S., & Schlosshauer, B. (2009). Strategies for inducing the formation of bands of Büngner in peripheral nerve regeneration. *Biomaterials*, 30(29), 5251–5259.
- Ripps, H., & Shen, W. (2012). Review: Taurine: A “very essential” amino acid. *Molecular vision*, 18, 2673–2686.
- Romanov, Y. A., Darevskaya, A. N., Merzlikina, N. V., & Buravkova, L. B. (2005). Mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue: isolation, characterization, and differentiation potentialities. *Bulletin of experimental biology and medicine*, 140, 138–143.
- Rosso, G., Wehner, D., Schweitzer, C., Möllmert, S., Sock, E., Guck, J., & Shahin, V. (2022). Matrix stiffness mechanosensing modulates the expression and distribution of transcription factors in Schwann cells. *Bioengineering & translational medicine*, 7(1), e10257.
- Safford, K M, Safford, S. D., Gimble, J. M., Shetty, A. K., & Rice, H. E. (2004). Characterization of neuronal/glia differentiation of murine adipose-derived adult stromal cells. *Experimental Neurology*, 187(2), 319–328.
- Safford, Kristine M, Hicok, K. C., Safford, S. D., Halvorsen, Y.-D. C., Wilkison, W. O., Gimble, J. M., & Rice, H. E. (2002). Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 294(2), 371–379.
- Sahab Negah, S., Khooei, A., Samini, F., & Gorji, A. (2018). Laminin-derived Ile-Lys-Val-ala-Val: a promising bioactive peptide in neural tissue engineering in traumatic brain injury. *Cell and tissue research*, 371, 223–236.
- Salehi, H., Amirpour, N., Niapour, A., & Razavi, S. (2016). An Overview of Neural Differentiation Potential of Human Adipose Derived Stem Cells. *Stem Cell Reviews and Reports*, 12(1), 26–41.
- Samadian, H., Farzamfar, S., Vaez, A., Ehterami, A., Bit, A., Alam, M., ... Salehi, M. (2020). A tailored polylactic acid/polycaprolactone biodegradable and bioactive 3D porous scaffold containing gelatin nanofibers and Taurine for bone regeneration. *Scientific reports*, 10(1), 13366.
- Sandvig, A., Berry, M., Barrett, L. B., Butt, A., & Logan, A. (2004). Myelin-, reactive glia-, and scar-derived CNS axon growth inhibitors: expression, receptor signaling, and correlation with axon regeneration. *Glia*, 46(3), 225–

- Satpathy, A., Pal, A., Sengupta, S., Das, A., Hasan, M. M., Ratha, I., ... Bodhak, S. (2019). Bioactive nano-hydroxyapatite doped electrospun PVA-chitosan composite nanofibers for bone tissue engineering applications. *Journal of the Indian Institute of Science*, 99, 289–302.
- Schaberg, E., Götz, M., & Faissner, A. (2022). The extracellular matrix molecule tenascin-C modulates cell cycle progression and motility of adult neural stem/progenitor cells from the subependymal zone. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 79(5), 244.
- Schaffer, S. W., Ju Jong, C., KC, R., & Azuma, J. (2010). Physiological roles of taurine in heart and muscle. *Journal of Biomedical Science*, 17(1), S2.
- Schmidt, C. E., & Leach, J. B. (2003). Neural tissue engineering: strategies for repair and regeneration. *Annual review of biomedical engineering*, 5(1), 293–347.
- Scott, H. J., Stebbing, M. J., Walters, C. E., McLenachan, S., Ransome, M. I., Nichols, N. R., & Turnley, A. M. (2006). Differential effects of SOCS2 on neuronal differentiation and morphology. *Brain research*, 1067(1), 138–145.
- Sethi, R., Sethi, R., Redmond, A., & Lavik, E. (2014). Olfactory Ensheathing Cells Promote Differentiation of Neural Stem Cells and Robust Neurite Extension. *Stem Cell Reviews and Reports*, 10(6), 772–785.
- Sever, M., Gunay, G., Guler, M. O., & Tekinay, A. B. (2018). Tenascin-C derived signaling induces neuronal differentiation in a three-dimensional peptide nanofiber gel. *Biomaterials Science*, 6(7), 1859–1868.
- Sharma, P., Kaur, H., & Roy, S. (2019). Designing a Tenascin-C-Inspired Short Bioactive Peptide Scaffold to Direct and Control Cellular Behavior. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 5(12), 6497–6510.
- Shivaraj, M. C., Marcy, G., Low, G., Ryu, J. R., Zhao, X., Rosales, F. J., & Goh, E. L. K. (2012). Taurine induces proliferation of neural stem cells and synapse development in the developing mouse brain. *PLoS ONE*, 7(8): e42935.
- Smedowski, A., Liu, X., Pietrucha-Dutczak, M., Matuszek, I., Varjosalo, M., & Lewin-Kowalik, J. (2016). Predegenerated Schwann cells—a novel prospect for cell therapy for glaucoma: neuroprotection, neuroregeneration and neuroplasticity. *Scientific Reports*, 6(1), 23187.
- Song, D. W., Kim, S. H., Kim, H. H., Lee, K. H., Ki, C. S., & Park, Y. H. (2016). Multi-biofunction of antimicrobial peptide-immobilized silk fibroin nanofiber membrane: Implications for wound healing. *Acta biomaterialia*, 39, 146–155.
- Sousa, A. M. M., Meyer, K. A., Santpere, G., Gulden, F. O., & Sestan, N. (2017). Evolution of the human nervous system function, structure, and development. *Cell*, 170(2), 226–247.
- Sridharan, A., Rajan, S. D., & Muthuswamy, J. (2013). Long-term changes in the material properties of brain tissue at the implant–tissue interface. *Journal of neural engineering*, 10(6), 66001.
- Stamenkovi, V. (2021). *The Extracellular Matrix Glycoprotein Tenascin C and Adult Neurogenesis*. 9(April), 1–12.

- Steinmetz, J. D., Seeher, K. M., Schiess, N., Nichols, E., Cao, B., Servili, C., ... Moberg, M. E. (2024). Global, regional, and national burden of disorders affecting the nervous system, 1990–2021: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *The Lancet Neurology*, 23(4), 344–381.
- Stratton, S., Shelke, N. B., Hoshino, K., Rudraiah, S., & Kumbar, S. G. (2016). Bioactive polymeric scaffolds for tissue engineering. *Bioactive materials*, 1(2), 93–108.
- Strem, B. M., Hicok, K. C., Zhu, M., Wulur, I., Alfonso, Z., Schreiber, R. E., ... Hedrick, M. H. (2005). Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *The Keio journal of medicine*, 54(3), 132–141.
- Sturman, J. A. (1988). Taurine in Development. *The Journal of Nutrition*, 118(10), 1169–1176.
- Subramanian, A., Krishnan, U. M., & Sethuraman, S. (2009). Development of biomaterial scaffold for nerve tissue engineering: Biomaterial mediated neural regeneration. *Journal of biomedical science*, 16, 1–11.
- Sun, Z., Zussman, E., Yarin, A. L., Wendorff, J. H., & Greiner, A. (2003). Compound core-shell polymer nanofibers by co-electrospinning. *Advanced materials*, 15(22), 1929–1932.
- Taylor, S. R., Santpere, G., Weinreb, A., Barrett, A., Reilly, M. B., Xu, C., ... McWhirter, R. (2021). Molecular topography of an entire nervous system. *Cell*, 184(16), 4329–4347.
- Teixeira, M. A., Amorim, M. T. P., & Felgueiras, H. P. (2020). Poly (vinyl alcohol)-based nanofibrous electrospun scaffolds for tissue engineering applications. *Polymers*, 12(1), 7.
- Tsai, M.-H., Wu, C.-Y., Wu, C.-H., & Chen, C.-Y. (2024). The current update of conventional and innovative treatment strategies for Central Nervous System Injury. *Biomedicines*, 12(8), 1894.
- Tsai, Y., Song, J., Shi, R., Knöll, B., & Synatschke, C. V. (2025). A Roadmap of Peptide-Based Materials in Neural Regeneration. *Advanced Healthcare Materials*, 14(2), 2402939.
- Tucić, M., Stamenković, V., & Andjus, P. (2021). The Extracellular Matrix Glycoprotein Tenascin C and Adult Neurogenesis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, Volume 9-2021.
- Tucker, R. P., & Chiquet-Ehrismann, R. (2015). Tenascin-C: Its functions as an integrin ligand. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 65, 165–168.
- Varadarajan, S. G., Hunyara, J. L., Hamilton, N. R., Kolodkin, A. L., & Huberman, A. D. (2022). Central nervous system regeneration. *Cell*, 185(1), 77–94.
- Varela, E., Schneider, R. P., Ortega, S., & Blasco, M. A. (2011). Different telomere-length dynamics at the inner cell mass versus established embryonic stem (ES) cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(37), 15207–15212.
- Verkhatsky, A., & Butt, A. M. (2018). The history of the decline and fall of the glial numbers legend. *Neuroglia*, 1(1), 188–192.

- Vipin, C. L., Priya, P., Harikrishnan, K., & Kumar, G. S. V. (2023). Enhanced cutaneous wound healing through MMP-8-responsive release of antimicrobial peptide from a porous chitosan-based scaffold. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 89, 105069.
- von Bernhardt, R., Eugenín-von Bernhardt, J., Flores, B., & Eugenín León, J. (2016). Glial cells and integrity of the nervous system. *Glial Cells in Health and Disease of the CNS*, 1–24.
- Wang, A., Tang, Z., Park, I.-H., Zhu, Y., Patel, S., Daley, G. Q., & Li, S. (2011). Induced pluripotent stem cells for neural tissue engineering. *Biomaterials*, 32(22), 5023–5032.
- Wang, Y., Yao, M., Zhou, J., Zheng, W., Zhou, C., Dong, D., ... Wei, G. (2011). The promotion of neural progenitor cells proliferation by aligned and randomly oriented collagen nanofibers through $\beta 1$ integrin/MAPK signaling pathway. *Biomaterials*, 32(28), 6737–6744.
- Wang, Z., Huang, C., Shi, Z., Liu, H., Han, X., Chen, Z., ... Huang, J. (2024). A taurine-based hydrogel with the neuroprotective effect and the ability to promote neural stem cell proliferation. *Biomaterials Advances*, 161, 213895.
- Wei, Y., Gong, K., Zheng, Z., Liu, L., Wang, A., Zhang, L., ... Zhang, X. (2010). Schwann-like cell differentiation of rat adipose-derived stem cells by indirect co-culture with Schwann cells in vitro. *CELL PROLIFERATION*, 43, 606–616.
- Wilson, E. R., Della-Flora Nunes, G., Weaver, M. R., Frick, L. R., & Feltri, M. L. (2021). Schwann cell interactions during the development of the peripheral nervous system. *Developmental neurobiology*, 81(5), 464–489.
- Wong, A. D., Ye, M., Levy, A. F., Rothstein, J. D., Bergles, D. E., & Searson, P. C. (2013). The blood-brain barrier: an engineering perspective. *Frontiers in neuroengineering*, 6, 7.
- Wu, J.-Y., & Prentice, H. (2010). Role of taurine in the central nervous system. *Journal of biomedical science*, 17, 1–6.
- Wu, L., Zhang, Q., Li, Y., Song, W., Chen, A., Liu, J., & Xuan, X. (2021). Collagen sponge prolongs taurine release for improved wound healing through inflammation inhibition and proliferation stimulation. *Annals of Translational Medicine*, 9(12).
- Xie, J., MacEwan, M. R., Schwartz, A. G., & Xia, Y. (2010). Electrospun nanofibers for neural tissue engineering. *Nanoscale*, 2(1), 35–44.
- Ying, C., Hu, W., Cheng, B., Zheng, X., & Li, S. (2012). Neural Differentiation of Rat Adipose-Derived Stem Cells in Vitro. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 32(8), 1255–1263.
- Yoshida, M., Langer, R., Lendlein, A., & Lahann, J. (2006). From advanced biomedical coatings to multi-functionalized biomaterials. *Polymer Reviews*, 46(4), 347–375.
- Zhang, B. G. X., Quigley, A. F., Myers, D. E., Wallace, G. G., Kapsa, R. M. I., & Choong, P. F. M. (2014). Recent advances in nerve tissue engineering. *The International journal of artificial organs*, 37(4), 277–291.

- Zhang, Z., Hu, J., & Ma, P. X. (2012). Nanofiber-based delivery of bioactive agents and stem cells to bone sites. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(12), 1129–1141.
- Zhu, L., Jia, S., Liu, T., Yan, L., Huang, D., Wang, Z., ... Hao, D. (2020). Aligned PCL Fiber Conduits Immobilized with Nerve Growth Factor Gradients Enhance and Direct Sciatic Nerve Regeneration. *Advanced Functional Materials*, 30(39), 2002610.
- Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., ... Hedrick, M. H. (2002). Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Molecular Biology of the Cell*, 13(12), 4279–4295.



TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. Mutlu, B., Üstündağ, C. B., & Çakır, R. “Cytocompatibility of PVA/Chitosan Electrospun Scaffold Loaded with Antioxidant Amino Acid on Fibroblast and Neuroblastoma Cells” International Conference on Engineering, Natural Sciences, and Technological Developments (ICENSTED 2024), 19-21 July, Balıkesir, Turkey, 2024, oral presentation, p.p. 251.

Makaleler

1. Mutlu Özçınar, B., Üstündağ, C. B., & Çakır, R, “Fabrication of Taurine-Containing Poly(vinyl alcohol)/Chitosan Electrospun Mat: Characterization and Biological Activity on Neuroblastoma Cells as Promising Neural Tissue Scaffold”. *ChemistrySelect* 2025, 10, e01728. <https://doi.org/10.1002/slct.202501728>