

T.C.  
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SİNİR HASARINDA KULLANILMAK ÜZERE BİYOAKTİF  
MOLEKÜLLER İÇEREN BİYOMALZEMELERİN GELİŞTİRİLMESİ  
VE ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ

Aslı Pınar ZORBA YILDIZ

DOKTORA TEZİ

Biyomühendislik Anabilim Dalı  
Biyomühendislik Programı

Danışman

Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR

Haziran, 2022

T.C.  
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Aslı Pınar ZORBA YILDIZ tarafından hazırlanan tez çalışması 6.6.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı, Biyomühendislik Programı **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR  
Yıldız Teknik Üniversitesi  
Danışman

Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR, Danışman

Yıldız Teknik Üniversitesi

---

Prof. Dr. Dilek TURGUT BALIK, Üye

Yıldız Teknik Üniversitesi

---

Prof. Dr. Tülay İREZ, Üye

İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi

---

Doç. Dr. Serap ACAR DERMAN

Yıldız Teknik Üniversitesi

---

Dr. Öğr. Üyesi Hakan DARICI

İstinye Üniversitesi

---

Danışmanım Doç.Dr. Emrah Şefik ABAMOR sorumluluğunda tarafımda hazırlanan “**Sinir Hasarında Kullanılmak Üzere Biyoaktif Moleküller İçeren Biyomalzemelerin Geliştirilmesi Ve Etkinliğinin 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.

Aslı Pınar ZORBA YILDIZ

İmza



Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü'nün 1245A numaralı projesi ve Tübitak 2209-B Üniversite Öğrencileri Sanayiye Yönelik Araştırma Projeleri Desteği Programı'nın 1139B411802273 numaralı projesi ile desteklenmiştir.



*Prof.Dr. Adil Allahverdiyev*

*ve*

*Aileme,*

## TEŞEKKÜR

“Hayatta en hakiki mürşit ilimdir; fendir” sözüyle yola çıktığım hayatımın en güzel yolculuğunda bana yolu gösteren, bilgi, nezaket ve zerafetleriyle yolumu aydınlatan canım hocalarım Prof.Dr. Adil Allahverdiyev ve Doç.Dr. Melahat Bağirova’ya, en zor koşullarda bile yan yana yürüdüğümüz sevgili danışmanım Doç.Dr.Emrah Şefik Abamor’a ve ‘Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği’ ekip arkadaşlarıma teşekkür ederim. Bu tez çalışmasını birlikte gerçekleştirdiğimiz Dr. Öğr. Üyesi Hakan Darici’ya ve canım hocam Prof. Dr. Erdal Karaöz’e benimle paylaştıkları bilgi, tecrübe, gösterdikleri sevgi ve saygılarından ötürü teşekkür ederim. Tez çalışmamın başladığı günden beri takip eden ve tecrübelerini bizden esirgemeyen değerli jüri üyelerim Prof. Dr. Dilek Turgut Balık ve Prof. Dr. Tülay İrez hocama sonsuz teşekkür ederim. Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü kurucu hocalarımız Prof.Dr. Mehmet Mustafaev Akdeste, Doç. Dr. Zeynep Akdeste ve Prof. Dr. Huriye Kuzu’ya ve aramızda olmayan ekip arkadaşlarımıza sonsuz rahmet diliyorum. Bu yolculuktaki edinimlerime katkı sunan Doç.Dr.Serap Acar Derman, Doç.Dr.Murat Özmen ve Doç.Dr.Murat Topuzoğulları’na, Kimya-Metalurji Fakültesi Dekanlığı’na, sevgili bölüm başkanımız Prof. Dr. Mehmet Burçin Pişkin ve nezdinde Biyomühendislik Bölümü’ndeki değerli hocalarıma, Sayın Rektörümüz Prof. Dr. Tamer Yılmaz’a, Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü Doç. Dr. Zeynep Işık ve tüm ekip arkadaşlarına emeklerinden ötürü teşekkür ediyorum. Öğretim Görevlisi olarak çalıştığım, tez çalışmamı maddi ve manevi olarak destekleyen İstinye Üniversitesi yönetimine, müdürüm sevgili hocam Dr. Öğr. Üyesi Yemliha Yıldız’a çok teşekkür ediyorum. En büyük teşekkürüm ise bugüne gelmemde en büyük rolü olan sevgili annem Nuray Zorba’ya, her zaman yanımda olan canım babam Osman Zorba’ya ve tüm nazımı çeken biricik kardeşim Ezgi Ecem Zorba’ya, tüm zorlukları birlikte göğüslediğim sevgili eşim Melih Yıldız’a ve ailemize, iyi ki aynı yolda yan yanayız dediğim canım yol arkadaşım sevgili Burçak Yavuz’a sonsuz minnetlerimle...

Aslı Pınar

İstanbul/Bostancı,2022

# İÇİNDEKİLER

<b>SİMGE LİSTESİ</b>	<b>ix</b>
<b>KISALTMA LİSTESİ</b>	<b>x</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b>	<b>xii</b>
<b>TABLO LİSTESİ</b>	<b>xiv</b>
<b>ÖZET</b>	<b>xv</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xvii</b>
<b>1 GİRİŞ</b>	<b>19</b>
1.1 Literatür Özeti.....	19
1.2 Tezin Amacı.....	26
1.3 Hipotez.....	27
<b>2 GENEL BİLGİLER</b>	<b>30</b>
2.1 Sinir Sistemi.....	30
2.1.1 Periferik Sinir Sistemi .....	31
2.1.2 Periferik Sinir Sistemi Yaralanmaları Tarihçesi .....	33
2.1.3 Periferik Sinir Hasarlarının Sınıflandırılması .....	34
2.1.4 Periferik Sinir Sistemi Paralizde Nörodiagnostik Testler.....	37
2.2 Kök Hücreler.....	39
2.2.1 Kök Hücrelerin Elde Edildiği Kaynaklar.....	40
2.3 Wharton Jeli Mezenkimal Kök Hücresi.....	42
2.4 Eksozomlar.....	44
2.4.1 Eksozom Biyogenezi ve Görevleri.....	45
2.5 Biyomalzemeler.....	47
2.5.1 Biyomalzemelerin Sınıflandırılması.....	48
2.6 Biyomalzeme olarak Grafen.....	49
2.7 Biyomalzeme olarak Polikaprolakton.....	53
2.8 Sinir Doku Mühendisliğinde ‘Bioink’ Kavramı ve 3B Baskı Teknolojisi.....	55
<b>3 DENEYSEL ÇALIŞMALAR</b>	<b>58</b>
3.1 Materyal.....	58
3.1.1 Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeler.....	58
3.1.2 Cihazlar .....	59

3.1.3	Deneylerde Kullanılan Kimyasalların Hazırlanması.....	60
3.2	Yöntemler.....	62
3.2.1	Wharton Jeli Mezenkimal Kök Hücre Kültürü.....	62
3.2.2	Wj-MKH'den Eksozom Üretimi.....	62
3.2.3	Wj-MKH'den Üretilen Eksozomların NTA Yöntemi ile Analizi.....	64
3.2.4	Wj-MKH'den Üretilen Eksozomların Zeta Potansiyel Ölçümü.....	64
3.2.5	Eksozomların Hücreler Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin İncelenmesi..	64
3.2.6	Eriyik Elektro-Yazma Yöntemi ile PCL Sinir Kanalının Üretimi.....	65
3.2.7	Grafenin 2B Etkileşiminin İncelemesi.....	65
3.2.8	Grafenin WJ-MKH'lerine Karşı Toksik Olmayan Konsantrasyonunun MTT Yöntemi ile Belirlenmesi ve Dikişleme Yöntemi ile Time-Lapse'de Görüntülenmesi.....	66
3.2.9	'Baseink™'- Grafink Bioinklerinin Üretimi.....	67
3.2.10	Hazırlanan Jellerin 3B Biyoyazıcıda Basımı.....	68
3.2.11	Üretilen 'Baseink™' ve Grafink Bioinklerinin Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) ile Karakterizasyonu.....	69
3.2.12	Üretilen 'Baseink™' ve Grafink Bioinklerinin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Karakterizasyonu.....	69
3.2.13	GFP İşaretli Mezenkimal Kök Hücrelerin Grafink Bioinki İçerisine Eklenmesi ve Time-Lapse Görüntülerinin Alınması.....	71
3.2.14	WJ-MKH'lerinin Sinir Hücrelerine Farklılaşma Öncesi Deney Gruplarının Oluşturulması.....	71
3.2.15	WJ-MKH'lerinin Bioinkler ile Birlikte Basımı Sonrası Resveratrol ile Farklılaşma Etkinliğinin İncelenmesi.....	72
3.2.16	WJ-MKH'lerinin Bioinklerin Üzerinde Sferoid Form Oluşturulması ve Kombinasyon Terapisi ile Sinir Hücrelerine Farklılaşmasının İncelenmesi.....	74
3.2.17	Gen Ekspresyon Seviyesinde Sinir Farklılaşmasının Karakterizasyonu.....	75
<b>4</b>	<b>DENEYSEL ÇALIŞMALARIN SONUÇLARI</b>	<b>75</b>
4.1	Wj-MKH'den Ultrasantrifüj Yöntemi ile Üretilen Eksozomların Karakterizasyonu.....	79
4.1.1	NTA Analizi ile Eksozom Karakterizasyonu.....	79
4.1.2.	Zeta Potansiyel Ölçümü ile Eksozom Karakterizasyonu.....	80
4.1.3	Eksozomların Fibroblast ve WJ-MKH'leri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin İncelenmesi.....	81



4.2. Biyomalzemelerin Üretimi.....	82
4.2.1 Eriyik Elektro-Yazma Yöntemi ile PCL Sinir Kanalının Üretimi.....	82
4.2.2. Grafenin WJ-MKH'leri Üzerinde Toksik Olmayan Konsantrasyonunun MTT Yöntemi ile Belirlenmesi ve "Dikişleme" Yöntemi ile Görüntülenmesi.....	83
4.2.3 'Baseink™'-GrafinK Bioinklerinin FTIR ile Karakterizasyonu.....	86
4.2.4 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi .....	88
4.3 GFP İşaretli Mezenkimal Kök Hücrelerin GrafinK Bioinki İçerisine Eklenmesi ve Time-Lapse Görüntülerinin Alınması.....	92
4.4 Biyomalzeme Gruplarında Yer Alan WJ-MKH'lerin Sinir Farklılaştırılmasının İncelenmesi.....	93
4.4.1 WJ-MKH'lerinin Bioinkler ile Birlikte Basımı Sonrası Resveratrol ile Nöronal Farklılaştırılmasının İncelenmesi Sonuçları.....	93
4.4.2 Sferoid Formda WJ-MKH'lerinin Nöronal Farklılaştırılmasının İncelenmesi.....	95
4.5 Gen Ekspresyon Seviyesinde Sinir Farklılaşmasının Karakterizasyonu...	102
<b>5 SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>105</b>
<b>KAYNAKÇA</b>	<b>113</b>
<b>TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR</b>	<b>122</b>

## SİMGE LİSTESİ

---

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\Delta$	Delta
ml	Mililitre
mg	Miligram
M	Molar
$\mu\text{g}$	Mikrogram
nm	Nanometre
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat Derece
cm	Santimetre
TM	Türk Malı

## KISALTMA LİSTESİ

---

AGAA	Arginil glisil aspartik asit
ATCC	Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
$\alpha$ -SMA	Alfa-Düz Kas Aktini ( $\alpha$ - Smooth muscle actin)
Bioink	Biyomürekkep
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DP	Dopamin
ELİSA	Enzime bağlı İmmünosorbant Tahlili
FBS	Fetal Sığır Serumu
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (Fourier-transform infrared spectroscopy)
GelMA	Jelatin Metakrilamid
GFP	Yeşil Floresan Protein (Green Fluorescent Protein)
GMP	İyi Üretim Uygulamaları (Good Manufacturing Practices)
GO	Grafenoksit
GrafinK	Grafen içeren bioink grubu
HRP	Yaban Turpu Peroksidaz
2B	2-Boyutlu
(Cl <sup>-</sup> )	Klor
MEW	Eriyik elektroyazma (Melt Elektrowriting)
MKH	Mezenkimal Kök Hücre
MnP	Manganez Peroksidaz

MPO	Miyeloperoksidaz
MRI	Manyetik Rezonans Görüntüleme Sistemi
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il) -2-5-difeniltetrazolyum bromür
PBS	Fosfat tuz tamponu
PCL	Poli( $\epsilon$ -kaprolakton )
PCR	Polimeraz Zincirleme Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
Pen-Strep	Penisilin-Streptomisin
PFA	Paraformaldehit
PLCL	Polilaktik-ko-kaprolakton
PLGA	Polilaktik-ko-glikolik asit
(K <sup>+</sup> )	Potasyum
PT-PCR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincirleme Reaksiyonu
(Na <sup>+</sup> )	Sodyum
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscope)
3B	3-Boyutlu
WJ-MKH	Wharton Jeli Mezenkimal Kök Hücresi
YY	Yüzyıl

## ŞEKİL LİSTESİ

---

Şekil 2.1 İnsan göbek kordonunun şematik kesiti.....	43
Şekil 2.2 Eksozom biyogenezi ve bunların bir ana hücreden salınması.....	46
Şekil 2.3 Grafenin kimyasal yapısı.....	50
Şekil 2.4 PCL yapısı.....	53
Şekil 2.5 Biyobaskı çeşitleri.....	63
Şekil 3.1. -20 C°de saklanan serumsuz besiyeri hücre süpernatantları.....	61
Şekil 3.2.Eksozomların ultrasantrifüj yöntemiyle eldesi ve NTA analiz aşaması	64
Şekil 3.3. Seyreltilmiş grafenli besiyeri görüntüsü.....	66
Şekil 3.4. Grafen-Bioink hidrojel desenlemesinin 3B biyoyazıcı ile basım aşamaları.....	69
Şekil 3.5. Bioinklerin damlatma yöntemi ile aktarımı.....	70
Şekil 3.6. SEM görüntüleme ve hazırlık aşaması.....	70
Şekil 4.1. Wharton Jeli Kaynaklı MKH görüntüleri (10X).....	79
Şekil 4.2. NTA ile eksozom karakterizasyonu sonuçları.....	80
Şekil 4.3.Wharton-Jeli'den elde edilen kök hücrelerden üretilen eksozomların NTA görüntüsü.....	80
Şekil 4.4. Zeta-Sizer'da eksozomların karakterizasyonu.....	81
Şekil4.5.Eksozomların hücreler üzerindeki sitotoksik etkisinin MTT yöntemi ile incelenmesi grafiği.....	82
Şekil 4.6. Eriyik Elektro-Yazma yöntemi ile üretilmiş PCL nöral kanal.....	83
Şekil 4.7. % grafen konsantrasyonlarının WJ-MKH'leri üzerindeki proliferasyon etkisinin incelenmesi.....	84
Şekil 4.8. "Dikişleme" ile Time-Lapse'te HD kalitede 4x5 çoklu fotoğrafın birleştirilmesiyle elde edilmiştir.....	85
Şekil 4.9. 'Baseink™' ve Grafink FTIR ölçümleri.....	86
Şekil 4.10. 'Baseink™' ve Grafink Korelasyon Benzerlik Katsayısı Ölçümü.....	87
Şekil 4.11. 'Baseink™' SEM görüntüleri.....	88
Şekil 4.12. Grafink SEM görüntüleri.....	90
Şekil 4.13. 40 sn'lik Time-Lapse Görüntüleme videosu içerisinde alınan fotoğraf örnekleri.....	92
Şekil 4.14. Morfolojik İnceleme.....	94
Şekil 4.15. Nöronal belirteçler için yapılan immün boyamalardan örnekler.....	95

<b>Şekil 4.16.</b> 7 günlük farklılaşma sonrası görüntüler.....	96
<b>Şekil 4.17.</b> Sadece nörojenik farklılaştırma yapılan bioink grubu sferoid örnekleri ile kombinasyon terapisi ile farklılaştırma solüsyonu verilen bioink grubu sferoid örnekleri.....	97
<b>Şekil 4.18.</b> 7 gün kültürlenmiş hücrelerin immüno Floresan görüntüleri.....	98
<b>Şekil 4.19.</b> $\beta$ -tubulin ekspresyonunun immün boyama ile 2B ve 3B gruplarda incelenmesi.....	100
<b>Şekil 4.20.</b> Sox2 ekspresyonunun immün boyama ile 2B ve 3B gruplarda incelenmesi.....	101
<b>Şekil 4.21.</b> Nöron benzeri hücre yapısı mikroskobik görüntüsü.....	102
<b>Şekil 4.22.</b> 2B ve 3B deney gruplarında, Sox2, Nestin ve Tubulin 3 gen ekspresyonlarına ait amplifikasyon grafiği.....	103



## TABLO LİSTESİ

---

<b>Tablo 2.1</b> Seddon ve Sunderland Periferik Sinir Hasarı Tablosu .....	36
<b>Tablo 3.1</b> Grafenin Kademeli Seyreltmesi .....	66
<b>Tablo 3.2</b> Deney Grupları .....	72
<b>Tablo 3.3</b> Örneklerin cDNA'ya Çevrime Aşamasındaki Hesaplar .....	77
<b>Tablo 3.4</b> RT-PCR Hesaplamaları.....	78
<b>Tablo 4.1</b> RNA miktar tayini .....	102
<b>Tablo 4.2</b> Sox2, Nestin ve Tubulin 3 Genlerinin Ortalama Ct ve $\Delta$ Ct Değerleri .....	103



## Sinir Hasarında Kullanılmak Üzere Biyoaktif Moleküller İçeren Biyomalzemelerin Geliştirilmesi Ve Etkinliğinin İncelenmesi

Aslı Pınar ZORBA YILDIZ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Danışman: Doç.Dr. Emrah Şefik ABAMOR

Sinir sistemi, merkezi ve periferik sinir sistemi olarak iki bölüme ayrılan, organizmanın iç yapısıyla çevresel değişiklikler arasında köprü oluşturan mekanizmadır. Periferik sinir sistemi hasarları çeşitli travmalar, doğumlarda görülen brachial pleksus yaralanması, enjeksiyon hataları, anatomik anomaliler, tümörler, otoimmün yetmezlik, ateşli silahla yaralanmalar ya da kazalar ve metabolik hastalıklar gibi farklı nedenlerden oluşabilir. Dünya genelinde önemli bir iş gücü kaybına neden olan periferik sinir hasarlarının, pleksus ve kök yaralanmaları da dahil edildiğinde travma merkezine başvuran hastaların %5'inde görüldüğü bildirilmiştir. Periferik sinir rejenerasyonunda yaşanan mevcut problemlerin giderilmesi için, sinir yenilenmesinin optimize edilmesi, gerekli büyüme faktörleri eksikliğinin uygun mikroçevresi ile birlikte



oluşturulmasını ve kas atropisinin azaltılmasını sağlayacak teknolojiler gerekmektedir. Son yıllarda literatürde farklı kaynaklardan izole edilen kök hücrelerin çeşitli biyomalzemeler ile bir araya getirilerek kullanıldığı doku mühendisliğine dayalı yaklaşımlar periferik sinir hasarı modellerinde sıklıkla incelenmektedir. Bu tez çalışması kapsamında, Wharton jeli kaynaklı MKH'ler ve aynı hücre hattından elde edilen eksozomların ve toksik olmayan konsantrasyondaki grafen ile 3B biyoyazıcı aracılığıyla bioink yapısının oluşturulması; elektroyazıcı ile üretilmiş PCL iskele ile kompozit biyomalzeme olarak nöral konduit şeklinde birleştirilmesi gerçekteştirilmiştir. Bu biyomalzemenin karakterizasyonu FTIR ve SEM ile yapılmıştır. Üretilen nöral konduitin içerdiği grafenin, hem biyomalzeme içindeki GFP işaretili kök hücreler ile hem de biyomalzeme üzerine sferoidal formda ekilmiş kök hücrelerle etkileşimi Time-Lapse görüntüleme ile incelenmiştir. Daha sonraki aşamada biyomalzeme üzerindeki kök hücre sferoidlerinin eksozom ve farklılaşma solüsyonu kullanılarak sinir hücrelerine farklılaşması yani kombinasyon terapisi yapılmıştır. Farklılaşma etkinliği hem immün boyama ile hem de gen ekspresyon seviyesinde 2B ve 3B ortamda test edilmiştir. Buna göre üretilen bu kompozit biyomalzemenin periferik nöromühendislikte özün bir nöral konduit yapısında olduğu, içerdiği kök hücre, eksozom ve grafen ile sinir hücre farklılaşmasını desteklediği ve gelecekte sinir hasarlarında kullanılmak üzere potansiyel bir biyomalzeme adayı olduğu görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Sinir Doku Mühendisliği, Bioink, Grafen, Eksozom,3B Biyoyazıcı, Periferik Nöromühendislik

# Development and Effectiveness of Biomaterials Containing Bioactive Molecules for Use in Nerve Damage

Aslı Pınar ZORBA YILDIZ

Department of Bioengineering

Doctor of Philosophy Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Emrah Şefik ABAMOR

The nervous system is the mechanism that is divided into two parts; the central and peripheral nervous system and it forms a bridge between the internal structure of the organism and environmental changes. Peripheral nervous system damage can occur from different causes such as various traumas, brachial plexus injury at birth, injection errors, anatomical anomalies, tumors, autoimmune failure, gunshot wounds or accidents, and metabolic diseases. In order to eliminate the existing problems in peripheral nerve regeneration, technologies are required to optimize nerve regeneration, create the necessary growth factors deficiency together with the appropriate microenvironment, and reduce muscle atrophy. In recent years, tissue engineering-based approaches in which stem cells isolated from different sources are combined with various biomaterials have been frequently studied in peripheral nerve injury models. Within the scope of this thesis, the creation of Wharton gel-derived MSCs and exosomes obtained from

the same cell line and the bioink structure by 3D bioprinter with graphene in non-toxic concentration;As a composite biomaterial, it was combined with the PCL scaffold produced with an electrowriting in the form of a neural conduit. Characterization of this biomaterial was done by FTIR and SEM. The interaction of the graphene contained in the produced neural conduit with both the GFP-labeled stem cells in the biomaterial and the stem cells planted in spheroid form on the biomaterial was investigated by Time-Lapse imaging.At the next stage, the stem cell spheroids on the biomaterial were differentiated into nerve cells using exosome and differentiation solution, that is, combination therapy.Differentiation efficiency was tested both by immunostaining and at the gene expression level in 2D and 3D environments.Accordingly,it has been seen that this composite biomaterial produced has a unique neural conduit structure in peripheral neuroengineering,supports nerve cell differentiation with its stem cells,exosomes and graphene,and is a potential biomaterial candidate to be used in nerve injuries in the future.

**Keywords:** Nervous Tissue Engineering, Bioink, Graphene, Exosome, 3D Bioprinter, Peripheral Neuroengineering

### 1.1 Literatür Özeti

Sinir sistemi, merkezi ve periferik sinir sistemi olarak iki bölüme ayrılan, organizmanın iç yapısıyla çevresel değişiklikler arasında köprü oluşturan mekanizmadır. Nöron adı verilen sinir hücreleri parenkimal hücre olup; hücre gövdesi ve uzantılarıyla impuls iletiminde görevlidir [1]. Duyusal, otonomik ve motor sinir liflerini içeren , nöromüsküler sistemin temel bileşeni olan periferik sinirler, fiziksel hareket ve bilişsel cevaplar aracılığıyla merkezi sinir sisteminin tepki verici-algılayıcı yapılarıdır [1],[2]. Periferik sinir sistemine ait ilk çalışmalar M.S 2.YY'da Gallen tarafından sinir kopmalarının yenilenmesinin mümkün olmadığı yönünde uzun süre benimsenecek bir görüşün ortaya atılmasıyla devam etmiştir [3]. Modern sinir cerrahisinin temelleri, 1948 yılında Seddon tarafından sinir rejenerasyon süresi, hızı, iskemi ile periferik sinir sistemi arasındaki bağlantı ve greftle onarım teknikleri gibi konular üzerine atılarak, yapılan çalışmalarda sinir ucu birleştirmelerinde fibrin dikiş kullanılmıştır. Eş zamanlı olarak Sunderland' ile birlikte geliştirdiği sinir onarım teknikleri ve periferik sinirin internal topografisi üzerine önemli bilgiler elde etmişlerdir [4], [5]. Genel cerrah olan Jacobson periferik sinir ucu birleştirmelerinde mikroskobun kullanılabilirliğini 1963 yılında ortaya atarken [6], Milessi'nin 1960'ların başında uç uca anastozunun yerine interfasiküler anastomuzu tanımlamasıyla beraber bir çok klinikte bu yöntem uygulanmış; aynı zamanda greft gerginliği üzerine de önemli katkılar sunmuştur [7].

Periferik sinir sistemi hasarları çeşitli travmalar, doğumlarda görülen brachial pleksus yaralanması, enjeksiyon hataları, anatomik anomaliler, tümörler, otoimmün yetmezlik, ateşli silahla yaralanmalar ya da kazalar ve metabolik hastalıklar gibi farklı nedenlerden oluşabilir [8]. Dünya genelinde önemli bir iş gücü kaybına neden olan periferik sinir hasarlarının, pleksus ve kök

yaralanmaları da dahil edildiğinde travma merkezine başvuran hastaların %5'inde görüldüğü rapor edilmiştir[9]. Bu hastalıktan yakınan hastalar, ağrıdan duyu kaybına, hareket kısıtlılığından soğuğa tahammülsüzlüğe kadar bir çok zorlukla karşılaşır [10]. Periferik nöropatiler genellikle aksonal, zaman zaman da demiyelinizan olarak hasar görebilir. Bazı hasarlar ise her ikisinden de özellikler taşıyabilir. Waller dejenerasyon, aksonal dejenerasyon ve segmental demiyelinizasyon olmak üzere başlıca üç zararlanma modeli bulunur[1]. Periferik nöropatiler seçici duysal veya motor hasarına ya da ikisini birden içermesine göre farklı anatomik paternlere ayrılmaktadır. Bunlar, basit nöropatiler, Karpal Tüner Sendromu'ndaki gibi tek bir siniri içeren travmatik zararlanma iken; polinöropatilerde simetrik ve uzunluğa bağlı olarak yayılan duyu kaybı olarak sınıflandırılabilir. Periferik nöropatiler metabolik ve nötrisyonel (*Diabetis mellitus*, üremi), toksik (kolşisin vb. ilaçlar), inflamatuvar (Guillain-Barré sendrom vb.), enfeksiyonlar (lepra, HIV vb.), kalıtsal (PMP22'de çift mutasyon vb. ), bazı lökodistrofiler ve vaskülopatik (vaskülit vb.) durumlardan dolayı gelişir. Sinir yaralanmaları sinir yapısının fizyopatolojisine göre tam kesi ve kısmi yaralanmalar olarak da sınıflandırılır. Kısmi de motor nöronlarda zayıflık söz konusu iken; tam kesilerde moto ve duysal fonksiyonlar tamamen kaybolmaktadır. Travmatik periferik sinir yaralanmalarında, periferik sinir lifleri içindeki tüm lifler tam kesi gibi bir durumda hepsi aynı hasarı görebilecekken; farklı şiddetlerde zarar alan sinir yaralanmaları da olabilir[2]. Özellikle tam kesi sinir hasarı olarak görülen nöromeziste sempatik, duysal ve motor sinir, aynı zamanda endonöryum, epinöryum ve perinöryumda da ağır hasar görülür. Rejenerasyon çok zayıf olduğundan mutlaka cerrahi gerektirir. Cerrahide kullanılan biyouyumlu ve biyobozunur greftler veya nöral konduitler, hasarlanmayı giderecek yeni dokuların oluşumunu sağlayacak hücre hatları özellikle kök hücreler ve biyosinyal molekülleri, hepsini içinde barındıran doku mühendisliği prensipleri ile geliştirilmiş biyomalzemeler oldukça önemlidir.

Periferik sinir rejenerasyonunda yaşanan mevcut problemlerin giderilmesi için, sinir yenilenmesinin optimize edilmesi, gerekli büyüme faktörleri eksikliğinin uygun mikroçevresi ile birlikte oluşturulmasını [11] ve kas atropisinin

azaltılmasını [12] sağlayacak teknolojiler gerekmektedir. Son yıllarda literatürde farklı kaynaklardan izole edilen kök hücrelerin çeşitli biyomalzemeler ile bir araya getirilerek kullanıldığı doku mühendisliğine dayalı yaklaşımlar periferik sinir hasarı modellerinde sıklıkla incelenmektedir.

Normal şartlar altında kök hücreler, boyut ve fonksiyonları azalmamış, özelleşmemiş, kendi popülasyonlarını koruyan, uzun süre boyunca bölünerek kendini yenileyebilen ve farklılaşma potansiyeline sahip hücrelerdir. Çoğalarak yeterli miktarda hücre oluşturabilmeleri, genetik potansiyellerine uygun olarak istenilen hücre tipine farklılaşmaları, donör ile nakil sonrası uyum sağlamaları nedeniyle kök hücreler, temel ve klinik araştırmalar açısından oldukça önemlidirler [14]. Kordon matrisi, osteoblast, adiposit, kondrosit, hepatosit, diş pulpa, olfaktör, kardiyomyosit ve pankreatik vb. kaynaklı organlarda yer alan, bulunduğu yere göre isimlendirilen multipotent stromal hücrelere mezenkimal kök hücreler denir. İnsan Wharton Jelinden kökenlenen mezenkimal kök hücreler (WJ-MKH), 1656'da keşfedildiği andan itibaren günümüze kadar rejeneratif tıp ve doku mühendisliğinin, eşsiz yenilenme ve farklılaşma kapasitelerinden ötürü vazgeçilmez hücreleri haline gelmiştir. Günümüzde rejeneratif tıp uygulamalarının başlıca kaynağı olarak kullanılırlar. İnsan göbek kordonundan elde edilen WJ-MKH'leri üç germ tabakasından elde edilen birçok hücre hattına farklılaşabilme potansiyeli taşır. Endodermden kökenlenen hepatosit, pankreatik adacık benzeri hücrelere; mezodermden kökenlenen osteoblast, kondrosit, adiposit, kardiyomyosit, iskelet kası, endotelial hücrelere ; ektodermden kökenlenen de nöronlara farklılaşabilme yeteneğindedir [15]. Bu bilgiler ışığında WJ-MSC'leri, özellikle edinme protokollerinin optimizasyonu, çoğalma yetenekleri ve farklılaşma kapasiteleri göz önüne alındığında doku mühendisliği ve sinir rejenerasyonu üzerine yapılan çalışmalarda uygun bir aday hücre dizisi gibi görünmektedir [16]. Kök hücre hipotezine göre, kök hücre sistemi, önemli bir bileşeni olan mikroçevrenin etkisi altındadır. Kök hücrelerin korunumu ve farklılaşması, bu mikroçevrenin varlığı olmadan düşünülemez [17]. Kök hücre nişi adı verilen mikroçevre, kök hücrelerin sayılarını arttırmasında, kararlanma, farklılaşma ve onarım süreçlerinde etkilidir. Niş

yapısı, kök hücreler ile birlikte ona eşlik eden destek hücreleri ve hücre iskelelerinden oluşur[18]. Mikroçevrenin zarar görmesi vücudun farklı bölgelerinde ortaya çıkan hasarların rejenerasyonunda büyük bir engel oluşturmaktadır. Bununla birlikte niş yapısı günümüzde doku mühendisliği prensipleri dikkate alınarak laboratuvar koşullarında sentetik olarak oluşturulabilmektedir. Hem mühendislik hem de biyoloji ilkelerinin multidisipliner olarak kullanılması ile canlı dokularının yerine geçecek, bu dokuların yenilenmesinde, oluşan hasarın giderilmesinde ve fonksiyonlarının yeniden kazandırılmasında kullanılabilir yapay dokular *in vitro* koşullar altında sentezlenebilir [19]. Doku iskelesi, hücreler ve biyosinyal molekülleri doku mühendisliğinin üç temel taşıdır. Doku mühendisliğinin üç temel taşından biri olan doku iskeleleri, doğal ve sentetik maddelerden farklı yöntemlerle üretilmektedir [20]. Üç boyutlu (3B) baskı olarak da adlandırılan katkı üretim teknolojileri (AMT) kullanılarak iskele imalatı, doku mühendisliğinde kusurlu dokuları geri yüklemek, değiştirmek veya yenilemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. 3B Biyobaskı (3D Bioprinting, Biyoyazıcı) genellikle 'biyomürekkep (bioink)' olarak adlandırılan, biyomalzemeler ile hücrelerin aynı anda basıldığı bir katkı üretim tekniğidir[21]. 2004 yılındaki keşfinden bu yana esnek elektronik, superkapasitör, piller, yazdırılabilir mürekkepler, optik, elektrokimyasal sensörler ve enerji depolama gibi özelliklere sahip olan grafen, doku mühendisliği alanında sıklıkla tercih edilen bir biyomalzeme olmuştur. Grafen hasarlı dokuların, organların çoğalması ve yenilenmesi çalışmalarında kullanılmaktadır [22]. Özellikle biyomalzeme olarak tercih edilmesinin başlıca nedenleri arasında biyoyumluluk, gözenekliliği, yüksek özgül yüzey alanı, düşük sitotoksitesisi, antibakteriyel özellik, yüksek mekanik mukavemet gibi özellikler yer almaktadır [23]. Grafenin 2B'li sisteme kıyasla 3B'li sistemde hücre-hücre etkileşiminin sınırlarının ortadan kalktığı, kök hücre farklılaşmasını daha hızlı gerçekleştirdiği, bu farklılaşmanın osteojenik , adipojenik, miyojenik ve nörojenik olduğu gösterilmiştir [24]. Grafenin sinir iletimi üzerinde biyomateryal olarak kullanıldığı çeşitli çalışmalar da mevcuttur [25], [26].

Grafen temelli nanomalzemeler üstün kimyasal kararlılık ve biyouyumluluğun yanı sıra esneklik ile birleşen yüksek bir spesifik yüzey alanı ile kök hücrelerin uygun mikroçevresini oluşturma, proliferasyon ve farklılaşmada rejeneratif biyolojiye katkı sağlayan eşsiz bir biyomalzeme adayı haline gelmektedir [27], [28], [29].

Biyomalzemelerin en çok arzu edilen özelliklerinden biri biyolojik olarak parçalanabilirliktir [30]. Tek başına grafen nanotüpler yerine grafen içeren kompozit biyomalzemelerin biyobozunurluk seviyeleri birbirinden farklıdır. Kompozit malzemelerde istenilen bu özelliğin elde edilmesi daha kolaydır [31],[32], [33], [34].

Polikaprolakton (PCL) biyolojik sistem içerisinde yavaş degradasyona uğrar ve bu sebeple kemik, kıkırdak ve çeşitli mukavemet gerektiren doku mühendisliğinde tercih edilme nedenidir [35]. Periferik nöromühendislikte sinir dokusuna uzun vadeli destek sağlayabilmesi açısından uygun bir iskele yapısı oluşturur[36]. Elektro eğirme yöntemiyle üretilmiş PCL lifler bir cam substrat üzerinde GO ile kompozit oluşturulmuş, kontrol olarak da nanoliflerin yer almadığı cam slatlara GO kaplanmıştır. Buna göre PCL-GO cam yüzeyin nanolif yer almayan kontrol grubuna göre, hücreler açısından daha yüksek bir afiniteye sahip olduğu, oligodendrosit farklılaşmasını daha iyi etkilediği görülmüştür. Yüksek konsantrasyonda GO-PCL nanolif birlikteliği nöral rejenerasyonu ve nöronal kök hücrelerin sinerjik etkileşimi açısından birbirini tamamlayabilen kompozit malzeme olduğunu göstermiştir [37].

Güncel başka bir çalışmada gelişen periferik sinir hasarında porlu bir yapıya sahip Poli(laktik-ko-kaprolakton) (PLCL) malzemesi ile 3B baskı yöntemi ile oluşturulan içi kollajen kaplı PCLC sinir kanalı malzemelerinin etkinlikleri karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada kollajen kaplı malzemenin hem sinir yenilenmesi üzerindeki etkinliğinin yüksek olması, hem de esnek yapısı sayesinde cerrahi olarak uygulanabilirliğinin kolaylığı nedeniyle sadece PLCL içeren biyomalzemeye kıyasla kullanımlarının daha avantajlı olduğu sonucuna varılmıştır [26]. Bu bağlamda polikaprolakton (PCL) da sinir doku



mühendisliğinde yüksek mukavemet, biyobozunur ve biyoyumlu yapısından ötürü, grafenin ise sinir farklılaşması ve sinir iletimi üzerine etkileri bu malzemeleri uygun birer biyomalzeme adayı haline getirmektedir. Özellikle homojen biyomalzemelere kıyasla kompozit malzemeler, iki sinir ucunu birleştirmede biyoyumlu, biyobozunur, uygun mukavemete sahip bir sinir kanalı oluşturabilme potansiyeli açısından sinir hasarlarında kullanılmak için daha fazla umut vaat etmektedir.

Doku mühendisliğini oluşturan diğer bir etken ise hücrelerin farklılaşmasını sağlayan biyosinyal molekülleridir. Bu bağlamda, tüm vücut sıvıları ve bitki ekstratlarından elde edilebilen hücreler arası sinyal iletimi, genetik malzeme aktarımı ve bağışıklık yanıtının düzenlenmesi gibi görevler üstlenen nano keseciklere eksozom adı verilir. Eksozomların biyodağılımının ve kararlılığının yüksek olması, onları tedavi uygulamalarında uygun bir aday haline getirmiştir. MKH eksozomları DNA, RNA, miRNA, siRNA, ve ilaçlar gibi çeşitli bileşenleri aktarmak için bir nanokargo görevi görebilir [38]. Sinir çalışmalarında eksozomların beyindeki sinaptik plastisite, nöronal stres yanıtı, hücre-hücre iletişimi ve nöroenez gibi süreçlerde rol aldığı gösterilmiştir [36], [39]. Olfaktör hücreleri ile insan WJ-MKH'lerinden elde edilen eksozomların sinerjik bir ilişki içerisinde Schwann hücrelerinin ve aksonların hayatta kalmasını desteklediği, aynı zamanda periferik sinir hasarından biri olan siyatiğin rejenerasyonunu teşvik ettiği gösteren çalışmalar bulunmaktadır [40]. Sinir rejenerasyonunda kullanılan hücresel terapileri ve bunlardan üretilen eksozomları [40], [41] klinik araştırmalara taşıyan çalışmalar sınırlı olmasına rağmen; hücrelerin güvenli ve verimli olduğunu göstermektedir [42]. Rejeneratif tıbbı yönelik uygulamalarda kavite bölgesine enjekte edilen hücresel terapilerin ya da eksozomal biyoaktif moleküllerin etkinliği, sinir doku mühendisliğindeki iskele-hücre-biyosinyal molekülü üçlü yapısına kıyasla yetersiz kalmaktadır. Buna göre de, özellikle tam kesi sinir hasarlarında nöral kondukt sistemlerde üretilen biyomalzemeler içerdiği veya enjekte edilebilen hücreler ve biyosinyal molekülleri ile sinir rejenerasyonunda daha etkindir. Örneğin; poliglikolik asit tabanlı nörotüp kanalının periferik sinir hasarlarından biri olan fasial sinir hasarına uğratılmış

sıçanlara implante edilmesi ve işaretlenmiş olfaktör kök hücrelerinin konduitten içeri verilerek anastomozu sonucu yüz felci rejenerasyonunun başarıyla gerçekleştiğini gösteren çalışmalar da literatürde yer almaktadır [43],[44].Bir başka çalışmada insan normal dermal fibroblastları kullanılarak geliştirilen çoklu hücreli sferoidlerden elde edilen 3B yapı ile literatürde inert özelliği nedeniyle sıklıkla kullanılan silikon sinir kanalının siyatik sinir hasarı rejenerasyonundaki etkinlikleri karşılaştırılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda sferoid temelli 3B yapının siyatik hasar oluşturulan hayvan modellerinde doku rejenerasyonunu anlamlı bir biçimde arttırdığı [45] tespit edilse de; literatürde sıklıkla kullanılan silikon temelli sinir tüplerinin yüksek enfeksiyon riski ve düşük biyouyumluluk gibi bazı önemli dezavantajları olduğu da bilinmektedir [46],[47].Diğer yandan yapılan başka bir çalışmada kitin/kitosan tabanlı yapay sinir greftinin, kesilen siyatik sıçan hayvan modelinde iki sinir ucunu birleştirme görevini üstlendiği, aynı zamanda bu yapının biyouyumlu, biyobozunur, uygun mukavete sahip bir sinir kanalı oluşturabilme potansiyelinin sinir hasarlarında kullanılmak için umut vaat ettiği belirtilmiştir [48]. Başka bir çalışmada ise polyakrilamid, grafen oksit, jelatin, and sodyum aljinatın (PAM/GO/Gel/SA,PGGS) iki farklı konsantrasyonundan oluşan kompozit sinir kanalı biyomalzemelerinin siyatik sinir hasarında onarımını etkili bir şekilde teşvik ettiği gösterilmiştir [49].

Her geçen gün mevcut tedavilerin yetersizliği ile artan periferik sinir hasarı gibi çeşitli nörodejeneratif hastalıklara karşı geliştirebilecek doku mühendisliğine dayalı hücreli tabanlı terapötik yaklaşımlar ile biyomalzemelerin üretilmesi bu tez çalışmasının önemini vurgulamaktadır. Tüm bu bilgilen ışığında bu tez çalışması kapsamında, Wharton jeli kaynaklı kök hücreler ve aynı hücre hattından elde edilen eksozomların ve toksik olmayan konsantrasyondaki grafen ile 3B biyoyazıcı aracılığıyla bioink yapısının oluşturulması; elektroyazıcı ile üretilmiş PCL iskele ile kompozit biyomalzeme olarak nöral konduit şeklinde birleştirilmesi gerçekleştirilmiştir. Bu biyomalzemenin karakterizasyonu FTIR ve SEM ile yapılmıştır. Üretilen nöral konduitin içerdiği grafenin, hem biyomalzeme içindeki GFP işaretli kök hücreler ile hem de biyomalzeme üzerine sferoidal formda ekilmiş kök hücrelerle etkileşimi Time-Lapse görüntüleme ile

incelenmiştir. Daha sonraki aşamada biyomalzeme üzerindeki kök hücre sferoidlerinin eksozom ve farklılaşma solüsyonu kullanılarak sinir hücrelerine farklılaşması gerçekleştirilmiş ve bu farklılaşma hem immünboyama ile hem de gen ekspresyon seviyesinde kanıtlanmıştır. Buna göre üretilen bu kompozit biyomalzemenin periferik nöromühendislikte özgün bir nöral konduit yapısında olduğu, içerdiği kök hücre, eksozom ve grafen ile sinir hücre farklılaşmasını desteklediği ve gelecekte sinir hasarlarında kullanılmak üzere potansiyel bir biyomalzeme adayı olduğu görülmüştür.

## 1.2 Tezin Amacı

Her geçen gün mevcut tedavilerin yetersizliği ile artan periferik sinir hasarına karşı hücre, eksozomal ya da çeşitli iskele tasarımlarını barındıran çalışmalar artmaktadır. Bu doktora tez çalışmasının amacı, doku mühendisliği prensipleri dikkate alınarak; sinir hücrelerine farklılaşma potansiyelleri olan WJ-MKH'leri ve aynı hücre hattından elde edilen eksozomların, grafen içeren aljinat/jelatin tabanlı GrafenK olarak isimlendirilmiş bioink ile mukavemeti yüksek yeni jenerasyon eriyik elektroyazma ile üretilmiş PCL iskele ile periferik nöromühendislikte etkin olabilecek sinir kanalı üretimi ve kök hücre-eksozomal kombine terapinin sinir rejenerasyonu üzerine etkinliğinin incelenmesidir.

Bu bağlamda,

- WJ-MKH kaynaklı eksozomun üretilmesi, NTA ve Zeta-potansiyel ölçümü ile karakterizasyonu,
- Grafenin toksik olmayan dozunun 2B sistemde belirlenmesi,
- Kök hücrelerle zenginleştirilmiş grafen içeren ve içermeyen bioinkin 3B biyoyazıcı ile basımı ve FTIR, SEM ve Time-Lapse görüntüleme ile karakterizasyonu,
- Grafen içeren bioinklerin GFP işaretli hücrelerle birlikte 3B biyoyazıcı aracılığıyla basımı ve hücre-biyomalzeme etkileşiminin incelenmesi,
- Üretilen bioink ile kompozit bir sinir kanalı oluşturmak için mukavemeti yüksek PCL iskelenin eriyik elektroyazıcı yöntemi ile sinir tüpü şeklinde

basımı, bioinklerin bu sinir tüpü içerisine 3B biyoyazıcı aracılığıyla aktarılması,

- WJ-MKH'lerinin bioink içerisinde veya üstünte sferoid formda sinir hücrelerine farklılaşmasının iki farklı yolla incelenmesi ve en uygun hücre ekleme metodunun belirlenmesi,
- Sferoid formda hücrelerin sinir kanalı kesitine eklenmesinin ve farklılaştırma aşamasında eksozomal kombinasyon terapisinin yapılması ve diğer gruplar ile mikroskobik olarak sferoid formlar üzerindeki etkinliğinin görüntülenmesi,
- Oluşturulmuş grupların içerdiği kök hücrelerin farklı metodlarla sinir hücrelerine farklılaştırılmasının immün boyama ve gen ekspresyon seviyesinde incelenmesi ve 2B sistemdeki gruplar ile karşılaştırılması gerçekleştirilmiştir.

### 1.3 Hipotez

Günümüze kadar doku mühendisliği prensipleri kullanılarak üretilen ve prelinik çalışmalarda etkinliği incelenen yapay sinir kanallarının aynı anda hem doku iskelesi, hem kök hücre, hem de biyosinyal moleküllerini içermediği ve doku rejenerasyonunda sınırlı bir başarı gösterdiği görülmektedir. Yapılan çalışmalarda üretilen biyomalzemelerin, sadece kök hücre ya da eksozom içermesi, çoğu zaman kök hücre farklılaşmasını sağlayacak biyoaktif molekülün yer almaması, kullanılan biyomalzemenin biyoyumluluğunun olmaması, doku nişinde yer alacak hücrelerin proliferasyonuna etkisinin düşük olması, tam kesi hasarlarda kesilmemiş hale göre iyileşme oranının eski halini alabilecek başarıya ulaşamaması, sinir iletiminin tam olarak gerçekleşmemesi gibi çeşitli problemlerle karşı karşıya kalınmıştır. Mevcut sorunlar göz önünde bulundurularak; doku iskelesini, sinyal moleküllerini ve kök hücreleri aynı anda içeriğinde bulunduracak kombinasyon terapisini oluşturan iskele-hücre-biyosinyal molekülü temelli sinir kanallarının üretilmesinin ve sinir rejenerasyonda kullanılmasının daha başarılı sonuçlar doğurabileceği düşünülmektedir.

Özellikle WJ-MKH'lerinin farklılaşma potansiyellerinin yüksek olması ve bu hücrelerden elde edilecek eksozomların sinyal iletimi, hücre proliferasyonu, hücre migrasyonu ve hücre farklılaşması açısından gösterdikleri yetkinlik kök hücre-eksozom kombinasyonlarının sinir hasarının tedavisi için uygun bir yaklaşımı oluşturabilir. Diğer yandan doku iskelesi olarak düşünülen PCL'nin mukavemet gücü, elastisitesi, biyobozunur ve biyouyumlu yapısı, grafenin ise sinir iletimi konusunda gösterdiği eşsiz özellikler dikkate alındığında, kompozit biyomalzeme kullanımının sinir dokusunu taklit etme açısından başarılı bir uygulama olduğu sonucu da ortaya çıkmaktadır. Tüm bu bilgiler mevcut doktora tezinin hipotezini ortaya koymaktadır.

Bu hipotez doğrultusunda ;

- Toksik olmayan konsantrasyonu belirlenen grafenin 3B biyoyazıcı aracılığıyla aljinat-jelatin tabanlı bioink şeklinde basımı,
- Elektroyazıcı ile PCL membran iskelesinin bu bioinkin etrafında porlu bir yapı oluşturacak şekilde basımı ve bioink ile nöral konduit şeklinde kompozit bir biyomalzeme olarak ilk kez oluşturulması,
- Biyoaktif molekül olarak WJ-MKH'lerinden üretilmiş eksozomların eldesi,
- Grafen içeren bioinkin, transdüksiyon yöntemi ile üretilmiş GFP işaretli WJ-MKH'leri ile etkileşiminin Time-Lapse görüntüleme ile incelenmesi,
- Üretilen bioinklerin FTIR ve SEM analizleri ile karakterizasyonu,
- Üretilen PCL-Grafen bioink kompozit biyomalzeme adayı ile sağlanacak kombinasyon tedavisinin modelinin oluşturulması ve hücrelerin hem bioink içerisinde hem de sferoid formda malzeme ile etkileşiminin incelenmesi,
- Sferoid formdaki kök hücrelerin uygun mikroçevrenin oluşturulduğu biyomalzeme üzerinde sinir hücrelerine farklılaştırılması ve bu farklılaşmanın hem immün boyama hem de gen ekspresyon seviyesinde incelenmesi,

- Eş zamanlı olarak kombinasyon terapisi şeklinde farklılaşma solüsyonu ile birlikte verilen eksozomların verilmesi ve literatürde yer alan sinir farklılaşması üzerindeki etkinliği bilinen resveratrol ajanı ile karşılaştırılması,
- Sferoidal formda farklılaştırılmış hücrelerin farklılaşma etkinliğinin hem immün boyama hem de gen ekspresyon seviyesinde incelenmesi ve 2B ortam ile kıyaslanması gerçekleştirilmiştir.

Böylelikle sinir hasarında kullanılmak üzere biyouyumlu, biyobozunur, kompozit prototip sinir kanalı biyomalzeme adayı ve aktif biyomoleküller ve kök hücreler ile zenginleştirilmiş kombinasyon terapisinin ile sinir rejenerasyonunda etkinliği test edilmiştir.

### 2.1 Sinir Sistemi

Sinir sistemi ve hastalıkları M.Ö 3-4000'li yıllarına kadar uzandığı Mısır papirüslerinde yer almaktadır. O günlerden bugüne gelişen sinirbilimin temelini sinir sisteminin sınıflandırılması oluşturmaktadır. Sinir sistemi, merkezi ve periferik sinir sistemi olarak iki bölüme ayrılan, organizmanın iç yapısıyla çevresel değişiklikler arasında köprü oluşturan mekanizmadır. Nöron adı verilen sinir hücreleri parenkimal hücre olup; hücre gövdesi ve uzantılarıyla impuls iletiminde görevlidir. Dendrit adı verilen bu uzantılar bir sinir hücresi gövdesinde birden fazla olabilir. Her sinir hücresinde tek bir yapıdan oluşan aksonlar, milimetreden yaklaşık bir metreyi geçen uzunluk aralığında bir boya sahip olabilir. Dendritler impulsları hücre gövdesine doğru sağlarken, akson ise gövdeden perifere doğru bu iletimi gerçekleştirir. Nöronların dışında, merkezi sinir sisteminde glia ve nöroglia hücreleri de bulunur ki; astrositler, oligodendrositler ve mikroglialarda bu sınıflandırmada yer alırlar [1].

Evrimsel süreçte kordalılarda bulunan mezodermden kökenlenen notokord, mezenkimal kök hücrelerin primitif çizgi boyunca göçü ve zamanla mezodermal özellik kazanmasıyla oluşur. Primitif düğüm ve çukurun kraniyale doğru orta çizgide oluşturduğu notokord uzantısı bu düğümden göçen hücrelerle oluşturulur, zamanla lümene ve kanala dönüşür. Notokord uzantısı ile mezodermi örten embriyonik ektodermin merkezi sinir sisteminin primordiyumu olan nöral plağı oluşturur ve 3. hafta sonunda tamamen oluşan notokorddan sonraki süreçte omurgalılarının sinir, kas ve iskelet sisteminin oluşumunu sağlar. Embriyonik dönemde 3-4. Haftalarda nöral plak ve nöral kıvrımların oluşması ile birlikte giderek bu yapıların birleşmesi nörolasyonu yani nöral kanal oluşumunu sağlar. Nöral plağın ektoderminden kökenlenen yapıya nöroektoderm adı da verilir. Nörolasyon sırasında ektoderm yapısının birleşmesi ile oluşan içi boş

nöral tüp, ileride beyin ve omuriliğe gelişir. Bu nöral tüp yapısından gelişen nöral krest hücreleri göç eden hücreler olarak bilinir ve bu hücreler uzağa göç ederek sinir sistemi yapılarına farklılaşırlar. 4. Haftada tamamlanan nörolasyon olayında oluşan nöral krest hücreleri ikiye ayrılarak nöral tüpün dorsolateraline yerleşerek spinal ve kranial sinirlerin duysal gangliyonlarının kökenlerini oluştururlar. Bu farklılaşma ve göç olayı çeşitli genlerin kontrolü altındadır. Ör; FoxD3, Snail2, Sox9, Sox10 gibi. Nöral krest hücreleri, otonom sinir sisteminin ve spinal sinirlerin gangliyonları ile aynı zamanda periferik sinirlerin nörolema kılıfını oluştururlar. Bunların dışında araknoid mater , pia mater, pigment hücreleri, adrenal medulla ve kafa bölgesi bağ dokusundaki çoğu hücrenin yapısına katılırlar[50].

Periferik ve otonom olarak temelde ikiye ayrılan sinir sisteminde, periferik sinir sistemi çoğunlukla nöral krest hücrelerinden gelişerek, kranial, spinal ve otonomik gangliyonlar olarak üçe ayrılır. Otonom sinir sisteminin ise büyük bir bölümü ile adrenal bezin medullası yine aynı hücrelerden gelişir. Otonom sinir sistemi, sempatik ve parasempatik olarak ikiye ayrılır. Aksonların miyelin kılıflarını oluşturan Schwann hücreleri, medulla spinalis dışında, nöral krestten kökenlenir. Nöral tüpü duvarında yer alan epitelyal hücrelerden ise merkezi sinir sistemindeki bütün hücreler ve makroglial hücreler gelişirken; mikroglial hücreler ise, merkezi sinir sistemindeki kan damarlarından giren mezenkimal hücrelerden gelişir[50].

### **2.1.1 Periferik Sinir Sistemi**

Duyusal, otonomik ve motor sinir liflerini içeren , nöromüsküler sistemin temel bileşeni olan periferik sinirler, fiziksel hareket ve bilişsel cevaplar aracılığıyla merkezi sinir sisteminin tepki verici-algılayıcı yapılarıdır [1],[2]. Omurilik ön boynuzunu terk eden ikinci motor nöronların aksonları periferik motor sinir liflerini oluşturur. Periferik sinir içerisinde duysal nöron periferik uzantıları, arka kök yoluyla santral uzantılar omuriliğe konuşlanır. Otuz bir çift olan spinal siniri, ön ve arka kökler omurilik dışında birleşerek oluşturur. Spinal sinirin ön dalları boyun ve ekstremitelerde servikal, lumbasakral pleksus ve brakial; göğüste



interkostal sinirleri oluşturur. Omurgadaki cildin duyusunu sağlayan ise spinal sinirin arka dallarıdır. Spinal sinirin kasta iç içe geçtiği yapıya miyotom denirken; duyu alanından sorumlu deri kısmına dermatom denilmektedir. Komşu dermatomları birbirleriyle örtüşürken, kas spinal sistemden birden fazla miyotom alır. Böylelikle alınan bir hasar ile hem kas kısmı felce uğrayabilir, hem de ilgili çevre etkilenir [1].

Yarı geçirgen zara sahip olan sinir hücresi, membran potansiyel farkına göre iyon dengesini sağlar. Bu dengede akson zarında sodyum iyonu yalnızca sodyum/potasyum pompası ile aktif taşınım yoluyla sağlanır. Hücre içinde potasyum ( $K^+$ ) yüksekken, sodyum ( $Na^+$ ) ve klor ( $Cl^-$ ) düşük yoğunluktadır. Aksiyon potansiyelinin ortaya çıkışı, denge halindeki  $-70mV$ 'luk sinirin uyarımı ile  $Na^+$  geçirgenliğinin artması sonucu zar potansiyelinin  $+30mV$ 'a ulaşması sonucu olur ve tüm sinir boyunca yayılır. Miyelinli sinir liflerinde kesintili iletim Ranvier boğumlarından dolayı gerçekleşirken sıçrama tipi iletim görülür ve hızlıdır; miyelinsiz sinir listelerinde ise iletim kesintisiz devam eder.

Kalınlık ve ileti hızı açısından sinir lifleri üçe ayrılır:

1. Kalın Miyelinli En Hızlı İletim Sinir Lifleri: Deri duyusal aferentleri, kas aferentleri ve omurilik ön boynuzundan kaslara giden eferent liflerde iletim oldukça hızlıdır. En kalın miyelin çapı  $20 \mu m$ 'dir
2. İnce Miyelinli Sinir Lifleri: Preganglionik otonomik eferent liflerdir.
3. Miyelinsiz Lifler: Küçük liflerdir. Genellikle çapları  $1.5 \mu m$  kalınlığındadır. Somatik ve otonom sinir lifleri bu gruba girer.

Periferik motor ve duyusal lifleri içeren bir sinirin enine kesiti incelendiğinde, siniri örten bir epinöryum , altında fasüküllerin yer aldığı akson grubunu perinöryum çevrelerken, fasikül içinde yer alan aksonların bağ dokusu ise epinöryumdur. Ayrıca kan taşınımını sağlayan ve siniri besleyen *vasa nervorum* adı verilen kapiller damar sistemi bulunur. Akson boyunca bulunan Schwann hücrelerinin kıvrım yapması ile miyelin kılıf oluşur ve kıvrımın her bir aralığına Ranvier boğumu denir. Bu nodlar arasındaki mesafe akson çapına bağlıdır ve akson çapı arttıkça nodlar arasındaki mesafe artış gösterir.

### 2.1.2 Periferik Sinir Sistemi Yaralanmaları Tarihçesi

Hipokrat ile başlayan sinir çalışmaları [51], M.Ö 3. Yüzyılda (YY) Herophilus'un tendon ile sinir arasındaki farkın yanı sıra omurilik sinir bağlantılarını göstermesi ile şekillenmiştir [52]. Periferik sinir sistemine ait ilk çalışmalar M.S 2.YY'da Gallen tarafından sinir kopmalarının yenilenmesinin mümkün olmadığı yönünde uzun süre benimsenecek bir görüşün ortaya atılmasıyla devam etmiştir [3]. Bu yaygın görüş 14. YY'da ilk sinir onarımının Guy de Chaulic tarafından yapılması bu görüşü sekteye uğratsa da 20. YY'a kadar sürmüştür. 17.YY'da Glisson sinirlerin uyarılabilirliğini gösterirken; Von Purkinje ve Schwann nöron-akson bağlantısını ve fonksiyonlarını 19.YY'da tanımlayarak tarihe kazandırmıştır. Aynı yüzyıllar arasında Gabriele Ferrara kesilen sinir uçlarının sütünasyonunu tarif ederken; iki sinir ucunu dikenler Philipeaux ve Vulpian olmuştur. İlk otogreftlerin kullanımı tarihsel süreçte köpeklerin hypoglossal ve lingual sinirlerinin tamirinde gerçekleştirilmiştir [51].

Modern sinir cerrahisinin temelleri, 1948 yılında Seddon tarafından sinir rejenerasyon süresi, hızı, iskemi ile periferik sinir sistemi arasındaki bağlantı ve greftle onarım teknikleri gibi konular üzerine atılarak, yapılan çalışmalarda sinir ucu birleştirmelerinde fibrin dikiş kullanılmıştır. Eş zamanlı olarak Sunderland' ile birlikte geliştirdiği sinir onarım teknikleri ve periferik sinirin internal topografisi üzerine önemli bilgiler elde etmişlerdir [4],[5],[53]. Genel cerrah olan Jacobson periferik sinir ucu birleştirmelerinde mikroskopun kullanılabilirliğini 1963 yılında ortaya atarken [54], Kurze, fasiyo-hipoglossal anastomoz gerçekleştirdiği 49 hastası olan bir klinik çalışmada mikroskop ile periferik sinir tamiri yapan ilk beyin cerrahi olmuştur [55]. Dr. Milessi'nin 1960'ların başında uç uca anastomozun yerine interfaziküler anastomozu tanımlamasıyla beraber bir çok klinikte bu yöntem uygulanmış; aynı zamanda greft gerginliği üzerine de önemli katkılar sunmuştur [51], [56].

Ülkemizde periferik sinir cerrahisi üzerine ilk yaklaşımlar Şerefeddin Sabuncuğlu'nun "Cerrahiyetul Haniye" isimli eserinde 15. Yy'da yer bulmuştur. Modern cerrahinin ülkemizdeki gelişimi cumhuriyet dönemine denk gelmekte

olup; yaptığı girişimsel çalışmalar ve azalttığı mortalite-morbidite oranlarıyla Prof. Dr. Cemil Topuzlu kurucusu olarak kabul edilmektedir. Prof. Dr. Mazhar Osman'la birlikte ülkemizde ilk nörolojik bilimlerin kurulması bu alandaki çalışmalara hız kazandırmıştır. Prof. Dr. Mazhar Osman periferik sinir hasarı onarımında yapılan çalışmaların derlenmesi ve mikroskopik büyütmenin katkıları üzerinde oldukça durmuştur. Ülkemizde nöroşürji bilimini kurumsallaştıran Prof. Dr. Hami Dilek, Fransa'da öğrendiği yöntemleri ülkemizde gerçekleştirmiş, aynı zamanda ameliyat defterine çizdiği peroneal ve siyatik anastomozları ile yöntemlerini kalıcı halde gelecek nesillere bırakmıştır [57].

### **2.1.3 Periferik Sinir Hasarlarının Sınıflandırılması**

Periferik sinir sistemi hasarları çeşitli travmalar, doğumlarda görülen brachial plexus yaralanması, özellikle siyatik sinirini etkileyebilen enjeksiyon hataları, anatomik anomaliler, tümörler, otoimmün yetmezlik, ateşli silahla yaralanmalar ya da kazalar ve metabolik hastalıklar gibi farklı nedenlerden oluşabilir [8]. Dünya genelinde önemli bir iş gücü kaybına neden olan periferik sinir hasarlarının, plexus ve kök yaralanmaları da dahil edildiğinde travma merkezine başvuran hastaların %5'inde görüldüğü rapor edilmiştir[9]. Bu hastalıktan yakınan hastalar, ağrıdan duyu kaybına, hareket kısıtlılığından soğuğa tahammülsüzlüğe kadar bir çok zorlukla karşılaşrlar [10]. Periferik sinirlerin önemli iki unsuru vardır bunlar; Schwann hücreleri tarafından yapılan miyelin kılıflar ve aksonal uzantılardır. Akson kalınlığı arttıkça ileti hızı artarken, ince ve miyelinsiz aksonlarla yavaş ileti oluşturulur [2]. Periferik nöropatiler genellikle aksonal, zaman zaman da demiyelinizan olarak hasar görebilir. Bazı hasarlar ise her ikisinden de özellikler taşıyabilir. Waller dejenerasyon, aksonal dejenerasyon ve segmental demiyelinizasyon olmak üzere başlıca üç zararlanma modeli bulunur. Wallerian Dejenerasyonu, çeşitli yaralanmalar, şiddetli baskı, infarktüs, travma gibi herhangi bir nedene bağlı olarak aksondaki sinir lifinin kesilmesi ve bütünlüğün bozulması sonucu makrofajların bölgede etkinliği ile dejenere olan miyelin kılıfın fagositozu gerçekleşir. Periferik sinir sağlam kalırken, akson kesintiye uğrar. Buna Wallerian dejenerasyonu denmektedir. Uzun süreli olan rejenerasyon süresi 4 ile 11 gün arası değişkenlik gösterir. Aksonal

Dejenerasyon, toksik ya da metabolik nedenlerden olayı periferik sinir hücresinin aksonunda veya gövdesinde meydana gelen hasardır. Periferik sinir hücresinin bütünlüğü bozulmadıysa akson yavaş bir rejenerasyon ile; eğer bozulduysa aylar-haftalar arasında fonksiyonunu sağlayabilir. Ancak periferik sinir hücresinin canlılığını kaybetme gibi bir durum söz konusu olursa yeniden yapılanma sağlanamaz. Bu dejenerasyonda akson yoğunluğunda ve yeniden gelişen miyelinizasyonda elektrofizyolojik sinir impulslarının şiddetinin azalması görülür. Segmental Demiyelinizasyon, bu hasarlanmada aksonda herhangi bir yapı bozulması görünmezken, miyelinli sinir liflerinde Schwann hücrelerinde veya miyelin kılıfta tüm sinir boyunca veya belirli bir bölgesinde hasar söz konusudur. Miyelinin yenilenebilme özelliği dolayısıyla süreç geçicidir. Sebep olan nedenler ortadan kalktığında demiyelinizasyon , ardından da 15 gün ile 6 ay arasında remiyelinizasyon devam eder [1]. Ancak remiyelinizasyonu gerçekleştiği bölgede daha ince bir miyelin kılıf, kısa internodlar [2] oluşur ve ileti hızı yavaşlar.

Periferik nöropatiler seçici duyuşal veya motor hasarına ya da ikisini birden içermesine göre farklı anatomik paternlere ayrılmaktadır. Bunlar, basit nöropatiler, Karpal Tüner Sendromu'ndaki gibi tek bir siniri içeren travmatik zararlanma iken; polinöropatilerde simetrik ve uzunluğa bağlı olarak yayılan duyu kaybı olarak sınıflandırılabilir. Periferik nöropatiler metabolik ve nötrisyonel (*Diabetis mellitus*, üremi), toksik (kolşisin vb. ilaçlar), inflamatuvar (Guillain-Barré sendrom vb.), enfeksiyonlar (lepra, HIV vb.), kalıtsal (PMP22'de çift mutasyon vb. ), bazı lökodistrofiler ve vaskülopatik (vaskülit vb.) durumlardan dolayı gelişir. Travmatik periferik sinir yaralanmalarında, periferik sinir lifleri içindeki tüm lifler tam kesi gibi bir durumda hepsi aynı hasarı görebilecekken; farklı şiddetlerde zarar alan sinir yaralanmaları da olabilir [2]. Sinir yaralanmaları sinir yapısının fizyopatolojisine göre tam kesi ve kısmi yaralanmalar olarak da sınıflandırılır. Kısmi de motor nöronlarda zayıflık söz konusu iken; tam kesilerde moto ve duyuşal fonksiyonlar tamamen kaybolmaktadır. Aşağıda yer alan sinir yaralanmalarının şiddetine göre Seddon ve Sunderland'ın sınıflandırma tablosu görülmektedir:

**Tablo 2.1** Seddon ve Sunderland Periferik Sinir Hasarı Tablosu

Sunderland	Seddon	Patoloji	Semptomlar	İyileşme	Yaygın Görülme Yerleri
1. Derece	Nöroplaksi	Miyelin kılıf hasarı, bölgesel iletim bloğu	Ağrı yoktur, uyuşukluk, duyu azalması mevcut	Hafta-ay bazlı eskiye yakın iyileşme	Brachial pleksus felci
	Aksonomezis	Akson kaybı, destek dokunun farklı derecelerde hasarı	Ağrı vardır, kısmi duyu ve motor kaybı, ayrıca bazı kas gruplarında atrofi görülür	Destek doku korunumu ve kas ile mesafesine bağlı olarak iyileşme	Ateşli silah ve trafik kazası yaralanmalar
2. Derece		Akson kaybı, endonöryum, perinöryum sağlamdır		Kas mesafesine bağlı iyileşme derecesi	
3. Derece		Akson kaybı, endonöryum hasarlı, epinöryum ve perinöryum sağlamdır		Akson yönü hatalı ve Cerrahi gerektiren durum ve olabilir.	
4. Derece		Akson Kaybı, endonöryum ve perinöryum hasarlı, epinöryum sağlamdır		Cerrahi görülme sıklığı fazla, akson yönelmesi hatalı olabilir.	
5. Derece	Nörotmezis	Akson kaybı epinöryum, endonöryum, perinöryumda ağır hasar		Cerrahi gereklidir.	Tam sinir kopması
6. Derece		Karışık zararlanmaya bağlı akson kaybı ve ileti bloğunun olduğu yaygın zararlanma şekli			

Sunderland tablosu, Seddon tablosuna göre daha gelişmiştir. Bu tabloya göre;

- Nöroplaksi: Bası ile ortaya çıkan hasarlanmadır, dejenerasyon görülmez. Akson devamlılığı sağlanır, Schwann hücreleri sağlamdır. Kısmi duyu kaybı görülse de bası ortadan kalktığında hafta-ay bazlı iyileşme süresi bulunur.
- Aksonotmezis: Schwann hücresi, endonöryum ve perinöryum sağlamken, Wallerian dejenerasyonu görülür ve akson ile miyelin kılıf hasarlıdır. Motor ve duyu hasarı vardır. Bu doku nişi iyileşirse tam iyileşme sağlanır.
- Nörotmezis: Tam kesi sinir hasarı oluşur. Böylelikle sempatik, duyuusal ve motor sinir, aynı zamanda endonöryum, epinöryum ve perinöryumda da ağır hasar görülür. Rejenerasyon çok zayıf olduğundan mutlaka cerrahi gerektirir.

#### **2.1.4 Periferik Sinir Sistemi Paralizinin Değerlendirilmesinde Kullanılan Nörodiagnostik Testler**

Polinöropatilerde periferik sinirlerin hepsi aynı nedene bağlı olarak aynı anda hastalanmasıyla oluşurken; bu neden hücre gövdesine etki ediyorsa nöronopati, akson hasarı gerçekleştiriyorsa aksonopati ve miyelin kılıfı direkt hasara uğratiyorsa miyelinopati olarak ayrılabilir. Mononöropati multiplekste, hastalık farklı periferik sinirlerde farklı zamanlarda etkilenir.

Polinöropatilerde klinik tanı, hasta öyküsünde yer alan belirtilere ve laboratuvar test sonuçlarına göre değerlendirilir. Bu belirtiler, metabolik bozukluklar, immün bozukluklar, enfeksiyonlar, kanser ve lenfoproliferatif bozukluklar, ilaçlar, toksinlere bağlı olarak edinsel; motor nöron hastalığı, nadir periferik nöropatiler, herediter basınca duyarlılık nöropatisi, herediter motor-duyuusal nöropati gibi kalıtsal nedenli olabilir. Polinöropatilerde laboratuvar testleri olarak elektrofizyolojik testler, sinir biyopsileri [58], deri biyopsileri, kantitatif duyuusal testler, tam kan sayımları, eritrosit sedimentasyonu, kan biyokimya testleri (özellikle açlık-tokluk kan şekeri, kreatinin, glikozil hemoglobin testleri), TSH ve T4 hormon testleri, vitamin B12 düzeyi, anti-nükleer antikor, romatoid faktör ve özellikle 60 yaş üstü hastalarda rastlanma olasılığı yüksek olan monoklonal

gamopati nedeniyle monoklonal proteinlerin araştırılması ve immünelektroforezi önemlidir.

Elektrofizyolojik testler, özellikle iğne elektromiyografisi[44], aksonal ve demiyelinizan nöropatilerin ayırımında sıklıkla tercih edilir. Demiyelinizan polinöropatilerde sinir iletimi oldukça yavaşlamışken, aksonal polinöropatilerde sinir iletim hızları normal veya normale göre hafif yavaş, aynı zamanda kas aksiyon potansiyeli düşüktür. Bu testler herediter yani kalıtsal ve edinsel polinöropati ayırımına da yardımcı olur.

Sinir lifi ayırma yöntemi olan “teasing” yöntemi ile özellikle enfeksiyona bağlı örneklerde uygulanabilir (Ör; leprada aside dirençli mikroorganizlar sinir biyopsisinde tespit edilebilir). Işık ve elektron mikroskopi ile incelemeler gerçekleştirilir. İntraepidermal sinir lifleri için ise deri biyopsi örnekleri özellikle gelişen çağda çeşitli nöropeptidler ile boyanarak konfokal mikroskopi ile incelenebilir.

Çeşitli bilgisayar algoritmaları kullanılarak uyaranlar (Ör; sıcak-soğuk) ile birlikte duyum eşiklerinin sayısallaştırılması kantitatif duyuşal testler (QST) aracılığıyla gerçekleştirilir. Hem tanı hem tedavinin seyrinin incelenmesinde sonuç odaklı yöntemlerdir.

Kan, idrar ve çeşitli doku sıvılarının ileri laboratuvar incelemeleri nöropatiler ile ilgili olabilecek muhtemel etyoloji hakkında özellikle biyokimyasal bir cevap oluşturabilir. Bunun için çeşitli hormon testlerinin, vitamin eksikliklerinin, tam kan sayımlarının ve immünolojik çeşitli faktörlerin araştırılması gerekmektedir. Bazen de sinir köklerinde tutulmanın olduğu vakalarda ya da çeşitli karsinom durumlarında (Ör; meningeal karsinomatozis) BOS protein aranabilir. Bunun için de “Lomber Ponksiyon” testi uygulanır.

Herediter nöropatiler özellikle moleküler biyolojinin ileri tanı tekniklerinden yararlanır. Elektrofizyolojik, histopatolojik ve klinik incelemelere gerek kalmaksızın genetik tanı ile daha etkili ve duyarlı sonuçlar daha kısa sürede elde edilebilir [59]. Özellikle herediter nöropatilerde, hücre içerisindeki “protein

trafficking” adını alan protein işlevleri ve gelişen mutasyonların tespitiyle tanıya ulaşmak günümüz teknolojiyle mümkün hale gelmiştir.

## 2.2 Kök Hücreler

Normal şartlar altında kök hücreler, boyut ve fonksiyonları azalmamış, özelleşmemiş, kendi popülasyonlarını koruyan, uzun süre boyunca bölünerek kendini yenileyebilen ve farklılaşma potansiyeline sahip hücrelerdir. Çoğalarak yeterli miktarda hücre oluşturabilmeleri, genetik potansiyellerine uygun olarak istenilen hücre tipine farklılaşmaları, donör ile nakil sonrası uyum sağlamaları nedeniyle kök hücreler, temel ve klinik araştırmalar açısından oldukça önemlidirler [14]. Kök hücre hipotezine göre, kök hücre sistemi, önemli bir bileşeni olan mikroçevrenin etkisi altındadır. Kök hücrelerin korunumu ve farklılaşması, bu mikroçevrenin varlığı olmadan düşünülemez [17]. Kök hücre nişi adı verilen mikroçevre, kök hücrelerin sayılarını arttırmasında, kararlanma, farklılaşma ve onarım süreçlerinde etkilidir. Niş yapısı, kök hücreler ile birlikte ona eşlik eden destek hücreleri ve hücre iskelelerinden oluşur [18]. Mikroçevrenin zarar görmesi vücudun farklı bölgelerinde ortaya çıkan hasarların rejenerasyonunda büyük bir engel oluşturmaktadır. Bununla birlikte niş yapısı günümüzde doku mühendisliği prensipleri dikkate alınarak laboratuvar koşullarında sentetik olarak oluşturulabilmektedir. Kök hücreler elde edildiği kaynaklar fark etmeksizin kendilerine özgü en önemli dört özelliği taşırlar. Bunlar ; kendini yenileyebilme, uzun süre çoğalabilme, farklılaşmadan kalabilme ve gerekli sinyaller altında farklılaşabilmedir. Bu sinyaller hücre içi kararlanması ya da hücre dışı sinyaller aracılığıyla oluşabilir. Kaynaklarına göre farklı kararlanma ve farklılaşma potansiyeline sahip olan kök hücrelerin , embriyonik dönemde ilk dört gün içerisinde bir canlı organizmayı oluşturabilecek yetenekte olanlara ‘totipotent kök hücreler’ denirken; embriyonik dönemin 5.-6. Günü içerisinde blastosist evresinin inner cell mass adı verilen iç hücre kitlesinden elde edilen ‘pluripotent kök hücreler’ yaklaşık 200 çeşit hücre tipine farklılaşabilme potansiyeli taşırlar. Dokularda bulunan farklı tip kök hücrelerin farklılaşma potansiyelleri gittikçe azalır. ‘Multipotent kök hücreler’



yakın akraba olduğu bir miktar hücre tipine farklılaşırken; ‘oligopotent kök hücreler’ lenfoid ve myeloid gibi birkaç hücre tipine farklılaşma potansiyeli taşır. ‘Unipotent kök hücreler’ ise yalnızca bulunduğu yerin hücre tipine farklılaşma potansiyeli taşıyan hücredir.

## **2.2.1 Kök Hücrelerin Elde Edildiği Kaynaklar**

### **2.2.1.1 Embriyonik Kök Hücreler**

Embriyo oluştuktan 4-5 gün sonra meydana gelen blastosist evresinin içi hücre kütlesi yaklaşık 50-150 hücreden oluşmaktadır ve bu iç kütleinin *in vitro* ortamda kültürlenmesi ile embriyonik kök hücreler elde edilir. Bu hücreler pluripotent özellik taşırlar ve her biri *in vitro*'da döllenmiş yumurtalardan elde edilirler. İnsan embriyonik kök hücresi 220'den fazla hücre tipine dönüşebilen, ektoderm, endoderm ve mezoderm tabakasının her üçüne farklılaşabilme yeteneğinde olan hücrelerdir[60].

Bazı etiksel problemler insan embriyonik kök hücrelerinin kullanımını sınırlandırmıştır. Genellikle fare embriyonik kök hücreleri üzerine çalışmalar yoğunlaşmakla beraber; farklı hücre tiplerine farklılaşma potansiyellerinin çok yüksek olmasından dolayı, günümüzde tedavileri tam olarak bulunamayan özellikle nörodejeneratif ve diyabet gibi çeşitli hastalıkların terapilerinde umut vermektedir. Oct-4 transkripsiyon faktörünün varlığı tipik olarak farklılaşmamış embriyonik kök hücre belirtecidir [14], [61].

### **2.2.1.2 Erişkin Kök Hücreler**

Vücudumuzdaki herhangi bir doku veya organda bulunan, farklılaşmamış ancak bulunduğu nişte uygun sinyaller aldığıında o mikroçevredeki hücre tiplerine farklılaşma potansiyeline sahip somatik kök hücrelerdir. Bir çok kan hücresi tiplerine dönüşebilen kemik iliğinde yer alan ‘hematopoitik kök hücreler’, çeşitli doku ve organlarda yer alan ‘mezenkimal kök hücreler’ ve *in vitro* ortamda yeniden yapılanma yoluyla somatik hücrelerin kök hücreye dönüştürülmesiyle üretilen ‘indüklenmiş pluripotent kök hücreler’ olarak üç farklı sınıfta incelenebilir [61]. Erişkin kök hücrelerin farklı dokularda bulunan hücre tiplerine dönüşebilme, yani plastisite özelliği vardır. Laboratuvar ortamında

çoğaltılarak otojenik hücre transplantasyonunda immün reddin görülmemesi yönünden büyük avantaj sağlar [14].

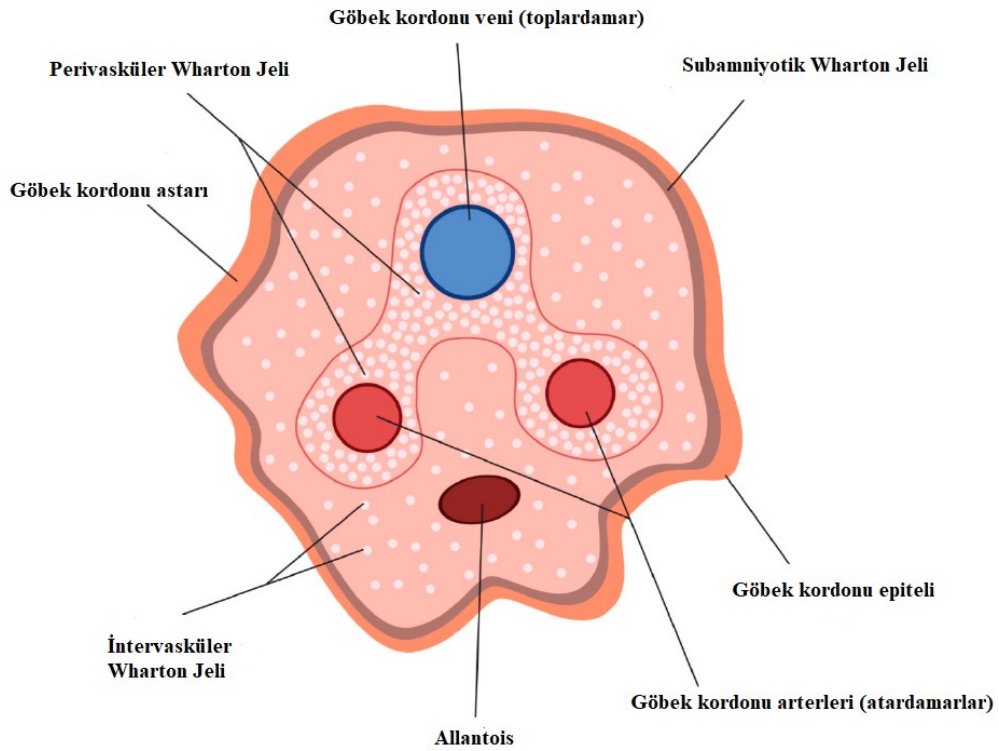
Hematopoietik kök hücreler özellikle leğen kemiği, uyluk kemiği ve göğüs kemiği başta olmak üzere hematopoezin büyük çoğunluğunun meydana geldiği kemik iliğinde, az miktarda da göbek kordonu ve periferel kanda bulunan, kan hücrelerinin lenfoid ve miyeloid soylarının her ikisini meydana getirebilme yeteneğine sahip kök hücrelerdir.

Günümüzde rejeneratif tıp uygulamalarının başlıca kaynağı olarak kullanılan mezenkimal kök hücreler, kordon matriks, osteoblast, adiposit, kondrosit, hepatosit, diş pulpa, olfaktör, kardiyomyosit, akciğer ve pankreatik vb. kaynaklı organlarda yer alan, bulunduğu yere göre isimlendirilen multipotent stromal hücrelerdir[60].

Yeniden programlama yoluyla somatik hücrelerin uyarılması ve hücrelere kök hücre özelliği kazandırılarak indüklenmiş pluripotent kök hücreler (ipkh) elde edilir. Bunun için somatik hücre çekirdeği nakli, hücre füzyonu , hücre ekstratlarının kullanılması, doğrudan programlama yolu ile yapılabilir. Viral ya da viral olmayan sistemler aracılığıyla kök hücre transkripsiyon faktörleri somatik hücrelere aktararak hücrelerin yeniden programlanması sağlanır ve kök hücrelerle aynı fizyolojik özelliklere sahip olan İPHK'ler oluşturulur. İlk kez olarak Dr. Shinya Yamanaka tarafından somatik hücrelerden pluripotent kök hücre eldesi gerçekleştirilmiş ve bu teknoloji Dr. Yamanaka'yı 2012 yılında Nobel ödülüne götürmüştür. Kullanılan transkripsiyon faktörleri arasında Oct4, Sox2, Klf4 ve c-Myc yer alır ve fare fibroblastlarına aktarılan bu transkripsiyon faktörleri ile fibroblastlar embriyonik kök hücrelere dönüştürülmüştür [60]. Kişiselleştirilmiş tıp kapsamında geniş bir kullanım alanına sahip olabilecek bu teknoloji ile çeşitli ilaç geliştirme, kalıtsal hastalıklarda gen terapileri, hastalık modelleme, toksisite çalışmaları gibi bir çok alanda faydanılabilmektedir. Ayrıca embriyonik kök hücre kullanımındaki etiksel problemleri geride bırakmaya yardımcı bir kaynak olarak kişiye özgü pluripotent bir kaynak olarak umut vermektedir [14].

## 2. 3 Wharton Jeli Mezenkimal Kök Hücresi

İnsan Wharton Jelinden kökenlenen mezenkimal kök hücreler (WJ-MKH) günümüzde rejeneratif tıp ve doku mühendisliğinin, eşsiz yenilenme ve farklılaşma kapasitelerinden ötürü vazgeçilmez hücreleri haline gelmiştir. İnsan göbek kordonu bebek ile anne arasındaki iletişimi sağlayan, yaklaşık 3m boyunda, 1.5 cm çapında, 40 g ağırlığında yapıdır. Göbek kordonu histolojik yapısında yer alan göbek damarlarının gömülü olduğu mukoid tabakayı içeren jel kısmının histolojik tanımını 1656 yılında ilk kez olarak Thomas Wharton yapmıştır. İnsanda sinir, kan ve lenf damarlarından yoksun olan bu yapının temelini başta hyoluronik asit olan glikozaminoglikanlar ve farklı tipte kollajenler oluşturur. Ayrıca fibroblast benzeri bir bağ doku hücreleri ve az miktarda mast hücreleri oluşturur [15].



**Şekil 2.1** İnsan göbek kordonunun şematik kesiti ([15] no'lu kaynaktan uyarlanmıştır)

Wharton jeli hücre dışı matristen oluşan, çoğunlukla hyaluronik asit olmak üzere glikozaminoglikanlarda, miyofibroblastlarda, kollajen liflerinde bol miktarda

bulunan jelatinimsi bir bağ dokusudur. Anne ve bebek arasındaki iki yönlü bağlantı gebeliğin 5. haftasında plasentanın oluşmasıyla kurulur. Bu göbek kordonu iki arter bir ven içerir. Göbek kordonunun endotel ve subendotelinden izole edilen kök hücreler morfolojik olarak fibroblastoid yapıdadır. Göbek kordonu mezenkimal kök hücreleri ven endotelyumu ve subendotelyumu fibroblastoid şeklindedir, uygun koşullar altında adipojenik, kondrojenik ve osteojenik farklılaşma geçirebilir. Bu MKH'ler, CD29 (Integrin beta 1), CD13, CD44, CD49e (integrin alfa 5), CD54 (hücreler arası yapışma molekülü 1), CD90 (Thy-1), HLA-sınıf 1 (insan lökosit antijeni sınıf 1) gibi belirteçleri ifade ederken; CD34, CD45, CD14, GLA (glikoforin A), HLA-DR (insan lökosit antijeni—DR izotipi), CD51 (integrin alfa V), CD61 (integrin beta 3), CD106 (vasküler hücre yapışma proteini 1) ve CD49d (integrin alfa 4) markırlarını ifade edemez [62],[63].

İnsan göbek kordonundan elde edilen WJ-MKH'leri üç germ tabakasından elde edilen birçok hücre hattına farklılaşabilme potansiyeli taşır. Endodermden kökenlenen hepatosit, pankreatik adacık benzeri hücrelere; mezodermden kökenlenen osteoblast, kondrosit, adiposit, kardiyomyosit, iskelet kası, endotelial hücrelere ; ektodermden kökenlenen de nöronlara farklılaşabilme yeteneğindedir [15].

Bu bilgiler ışığında WJ-MSC'leri, özellikle edinme protokollerinin optimizasyonu, çoğalma yetenekleri ve farklılaşma kapasiteleri göz önüne alındığında doku mühendisliği ve sinir rejenerasyonu üzerine yapılan çalışmalarda uygun bir aday hücre dizisi gibi görünmektedir [16].

## **2.4 Eksozomlar**

Prokaryotik dünyadan çok hücreli ökaryotik dünyaya geçiş düşünüldüğünde, hücreler arası iletişim ve etkileşim oldukça önemlidir. Özellikle gelişmiş organizmalarda bulunan milyarlarca hücrenin birbirleriyle olan iletişimi hem metabolik hem de immünolojik açıdan birçok fonksiyonu içerisinde barındırır. Hücresel temelli olan bu iletişim hücreler arası mesafeyi esas alarak ikiye ayrılır:

Birincisi 'Yerel (lokal)Haberleşme', nörotransmitterler ve yerel regülatörler aracılığıyla kısa mesafeli uyarımdan sorumludur. İkincisi ise 'Uzun Mesafeli Haberleşme', burada ekstrasellüler veziküller ve hormonlar görev alır. [64].

Ekstrasellüler veziküller, sinyal iletimi, haberleşme, genetik materyal taşıma , bağışıklığı düzenleme gibi görevleri olan, apoptozom, mikrovezikül ve eksozom olarak üç farklı boyutta hücre dışına salınan veziküllerdir. Geçmişte hücre atığı olarak görülen ve önemi son 20 yıldır anlaşılan bu veziküller farklı nanoboyutta sahiptirler [65].

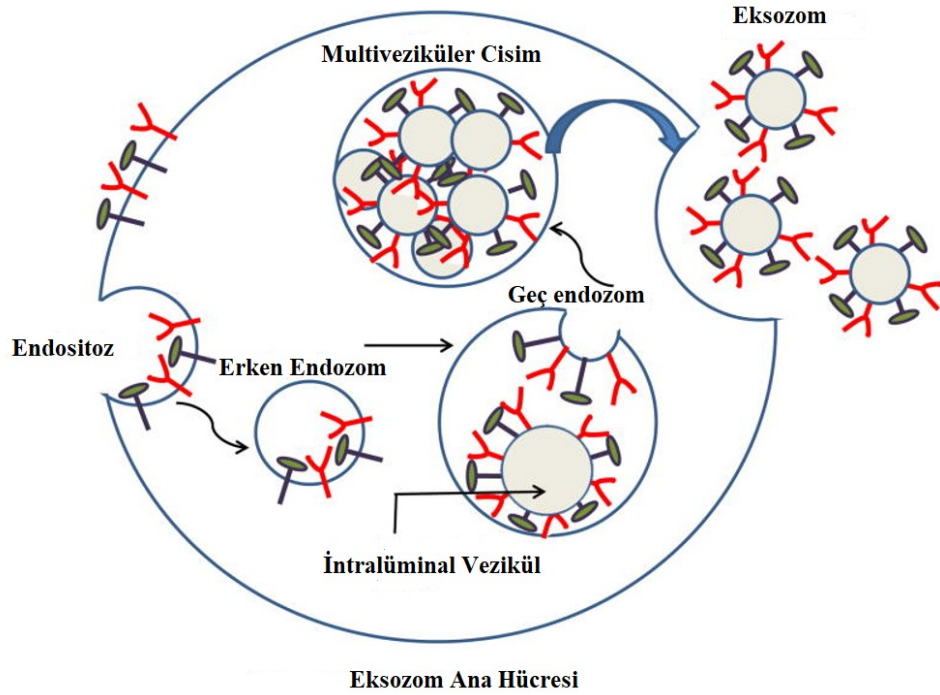
Apoptotik Cisimler(Apoptozom) : Hücrelerin apoptoz mekanizmalarının işlevselliği sonucu oluşan, boyut açısından en büyük, 1000-5000nm arasında veziküllerdir [65].

Mikroveziküller: Sitoplazma zarından kökenlenerek tomurcuklanan, 200-1000nm boyutuna sahip veziküllerdir [65].

Eksozomlar: Tüm vücut sıvıları ve bitki ekstratlarından elde edilebilen hücreler arası sinyal iletimi, genetik malzeme aktarımı ve bağışıklık yanıtının düzenlenmesi gibi görevler üstlenen, en küçük boyuttaki, 10-200nm, nanokeselerdir [65].İlk kez olarak 1981'de elektron mikroskopunda Tram ve arkadaşları tarafından farkedilen eksozomların izolasyonu tam 5 yıl sonra Johnstone ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. Eksozomları diğer ekstrasellüler veziküllerden ayıran CD9, CD63 gibi membran proteinlerini vardır. Tüm eksozomlarda salınabilen sitoskeleton proteinleri, ısı şok proteinleri ya da tetraspanin ailesindeki tüm proteinler gibi yapılar bulunurken; sadece kökenlendiği hücreye ait spesifik proteinlerde barındırabilir. Hücre çöprü olarak görülen bu yapıların gün geçtikçe gen ifadesini düzenlediği, immün yanıtın regülasyonunda görev aldığı, hücreler arası haberleşmeyi ve göçü sağladığı hatta farklılaşma mekanizmalarında da aktif rol oynadığı görülmüştür [66]. Eksozomların biyodağılımının ve kararlılığının yüksek olması, onları tedavi uygulamalarında uygun bir aday haline getirmiştir. MKH eksozomları DNA, RNA, miRNA, siRNA, ve ilaçlar gibi çeşitli bileşenleri aktarmak için bir nanokargo görevi görebilir [38].

### 2.4.1 Eksozom Biyogenezi ve Görevleri

Eksozom oluşumunun ilk basamağı seramid tarafından indüklenen plazma zarı içe doğru girinti yapması ile başlar. Bu aşamada erken endozom oluşur ve bu da eksozomların kökenini oluşturmaktadır. Erken endozom birden fazla girintiler yaparak, geç endozoma dönüşür. Geç endozomdaki bu girintiler kapanarak intralüminal vezikülleri oluşturur ve böylelikle bir çok intralüminal vezikül içeren multiveziküler cisimler oluşur (66). Sonraki aşamada iki farklı yol izleyebilen multiveziküler cisimler, lizozomla kaynaşarak parçalanabilir ya da plazma membranı ile kaynaşarak eksozom olarak hücre dışına salınır [65]. Bu olaya eksozom biyogenezi denir ve aşağıdaki Şekil.2.2 'de gösterilmiştir.



**Şekil.2 2** Eksozom biyogenezi ve bunların bir ana hücreden salınması ([67] no'lu kaynaktan uyarlanmıştır)

Eksozomların başlıca görevleri aşağıda sıralanmıştır :

- Hücreler arası haberleşmede etkindir. Bu haberleşme hem hücre farklılaşmasını sağlayabilir hem de bağışıklık uyarıcı immünhomeostazi düzenleyebilir. Enfeksiyöz ajanlara koruyucu bir immün yanıt oluşturmada önemli olabileceği keşfedilmiştir[65]. Örneğin; *Toxoplasma*

*gondii* paraziti enfekteli bir kişinin dendritik hücrelerinden elde edilen eksozomların çeşitli proteazları içermesi ile aşı yerine geçebilecek koruyucu bir ajan üretme fikri ortaya çıkmıştır [68].

- Taşıdığı markırlar sayesinde kanser belirteci başta olmak üzere, içerdiği DNA ya da RNA parçaları ile kalıtsal veya nörodejeneratif hastalıkların da tanı ve erken teşhisinde kullanılabilir [66].
- Kargo görevleri ile bağışıklığı düzenleyici olarak tedavi de kullanılabilirler. Özellikle ilaç yüklü eksozomlar, farklı teknolojilerle üretilmiş genetik tabanlı aşılardan hem koruyucu hem de teröpatik etkinlik barındırabilir. Hatta hücre içersine giremeyen, kan beyin bariyerini geçemeyen çeşitli ajan veya ilaçların kontrollü taşınımında nanokesecek yapıları sayesinde kullanılabilirler[65].
- Eksozomların sinir yenilenmesi, kök hücre farklılaşması ve nöronal stres üzerindeki rolleri sayesinde 3B doku mühendisliği alanında da biyoaktif molekül olarak ya da enjekte edilebilen sistemler ile hücresel terapilerde kendine rejeneratif tıp alanında yer açmaktadır.

Özellikle yapılan sinir çalışmalarında eksozomların beyindeki sinaptik plastisite, nöronal stres yanıtı, hücre-hücre iletişimi ve nörogenez gibi süreçlerde rol aldığı gösterilmiştir [39], [69]. Olfaktör hücreleri ile insan göbük kordonu mezenkimal kök hücrelerinden elde edilen eksozomların sinerjik bir ilişki içerisinde Schwann hücrelerinin ve aksonların hayatta kalmasını desteklediği, aynı zamanda periferik sinir hasarından biri olan siyatiğin rejenerasyonunu teşvik ettiği gösteren çalışmalar bulunmaktadır [40].

## 2.5 Biyomalzemeler

Son yüzyılın en çok gelişen bilimsel alanlarından biri olan biyomalzemelere tarihsel süreçte baktığımızda Mısırlılara kadar uzandığını görebiliriz. Mısır medeniyetinde burun, yapay göz, diş kalıntıları; altının diş hekimliğinde kullanım alanı bulması, kemik protezlerinde bronz-bakır gibi metallerin tüm olumsuzluklarına rağmen yer verilmiş olması insanlığın eksilen dokularının yerini tamamlama isteğini bize göstermektedir [70]. MÖ'sinden 19. Yüzyıla

kadar uzanan süreçte tüm olumsuz etkilerine rağmen bakır metali ve bronz alaşımı gibi malzemeler kemik protezlerinde kullanım alanı bulmuştur. Gelişen malzeme bilimi ile hücreler ve dokular ile uyumlu, özellikle hasarlı dokuların yerini alabilecek bir ara yüzey oluşturan malzemelere biyomalzemeler denir [70]. Biyomalzemelerin en önemli özelliği çevresindeki doku ve organların işlevlerini bozmadan entegrasyona uyum gösteren bir ortam yaratarak dokunun gelişmesini, büyümesini, iyileşmesini ve onarılmasını sağlayan biyouyumluluktur. 1938 yılında insan vücudunda kullanılmak üzere kemik kırıkları için vida ya da plaka şeklinde geliştirilen metal olan “Vanadyum Çeliği” korozyona uğramasının insan vücudu üzerindeki etkileri anlaşılana kadar yaklaşık 30 yıl boyunca kullanılmıştır. Sonrasında alümina-zirkonyum gibi seramiklerin kemik doku mühendisliğinde kullanımı yaygınlaşsa da inert ve doku bütünlüğünü sağlayamayan yapısı nedeniyle biyomalzeme olarak kullanımı zayıf kalmıştır [70]. Buradaki olumsuzluk, 1960’ların sonlarında 45S5-Bioglass® olarak isimlendirilen biyocam ve hidroksiapatit gibi biyoaktif seramiklerin zirkonyum ve alüminadaki bu doku uyumsuzluğundaki bağlanma sorununu ortadan kaldıracı bir hamle olarak Larry L. Hench tarafından atılmasıyla ortadan kalkmıştır [71], [72]. 1950’lerde yapay kalp damar değişimlerinde kullanılan poliüretan gibi esnek malzemelerin kullanımını, 1960’larda Polimetilmetakrilat (PMMA) ve yüksek molekül ağırlıklı polietilen türevlerinin (UHMWPE) kalça protezlerinde kullanımı izler. Polimer teknolojilerinin gelişmesi ile ameliyat ipliği olarak poliglukolik asitin kullanımından, diş hekimliğinde PMMA’nın kullanımına, rekonstrüktif cerrahide silikonun yer bulmasına, lens, kalp pili, çeşitli biyosensözler, diş teli, işitme cihazı, sinir konduitleri, kateter, yara örtüleri, direnajlar, omurga fiksatorlerine kadar birçok alanda biyomalzemelere ihtiyaç duyulmaktadır [70]. Nanobiyoteknolojinin de gelişmesi ile sadece vücut içerisindeki implantasyona tabi olan sistemlerde değil vücut ile entegre çeşitli cihazlarda da biyomalzemelere ihtiyaç duyulmaktadır [73].



### 2.5.1 Biyomalzemelerin Sınıflandırılması

Biyomalzemeler temelde metalik ve metalik olmayan malzemeler olarak ikiye ayrılır. Aynı zamanda metaller, seramikler, polimerler ve kompozitler olarak dörde ayrılır.

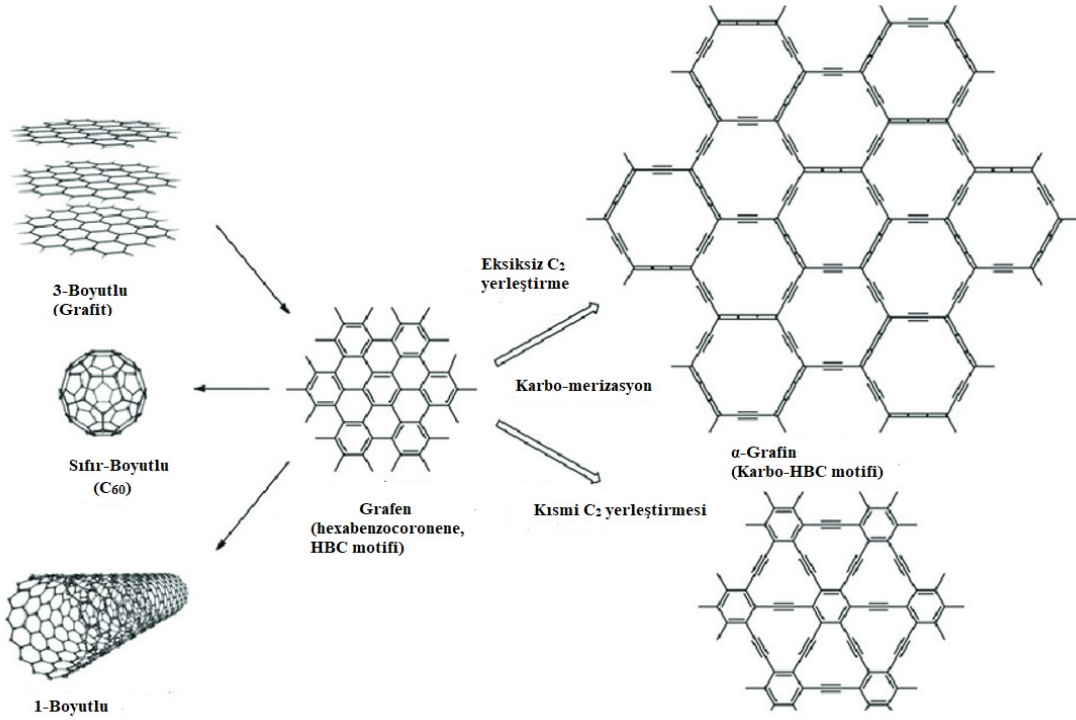
- Metalik Biyomalzemeler: Paslanmaz çelikten, amalgama (AgSnCuZnHg), titanyum ve titanyum alaşımlarından, altına, platine, gümüşe, paslanmaz çeliğe, kobalta ve çeşitli kadar bir çok metal ve alaşımları, hatta hafızalı alaşımları, başta ortopedik uygulamalardan, yüz-çene cerrahisine, dişçiliğe, kalp kapakçığı gibi bir çok medical cihaz teknolojisinde teşhis ve tanı amaçlı kullanılmaktadır.
- Biyoseramikler: Yüksek baskı dayanımına sahip, inert, inorganic ve polikristal yapıda, estetik görünümlü olmalarının yanında elektriksel ve termal yalıtkanlığı olan malzemelerdir. Dental uygulamalarda estetik yapıları nedeniyle sıklıkla tercih edilirken, kemik vida ve plakalarda, özellikle femoral gövde pöroz kaplamalarda, kalça protezlerinde kullanılırlar. Üretimlerinin zor olması, sert ve kırılgan olmaları dezavantajları arasındadır. Cam-seramik olarak literature kazandırılan camın kontrollü olarak kristallendirilmesi ile biyoaktif seramikler elde edilir ve bunlar osteoblast uyarımı, korozyona direnç, yüksek dayanım ve iyi biyobozunurluk sebebiyle kemik doku mühendisliğinde tercih edilirler.
- Polimerik Biyomalzemeler: Doğal ya da sentetik olarak elde edilebilen, işlenebilir, çoğunun biyobozunurluk özelliğini taşıdığı, yüzey modifikasyonlarını gerçekleştirilebilirliği açısından hücre-yüzey bağlanması kapsamında dental, oftalmik, ortopedik, kardiyovasküler, implant ve doku mühendisliğinin tüm alanlarında geniş bir kullanım alanı bulan, iyi gerilim kuvveti özelliği nedeniyle özellikle dikiş ipliği gibi cerrahi alanda ve uygun salım profiline bağlı olarak ilaç taşınım sistemlerinde de sıklıkla tercih edilen malzemelerdir. Farklı üretim yöntemleri ile akıllı polimerik biyomalzemeler elde edilerek biyosensör gibi biyomedikal cihaz tasarımları da yapılabilir. Doğal polimerler

arasında kollajen, jelatin, ipek, polisakkaritler, elastin vb. yapılar yer alırken; en çok kullanılan sentetik polimerler arasında silikon, polietilen (PE), polietilen glikol (PEG), poliüretan (PÜ), polivinil klorir (PVC), polilaktik asit (PLA), poliglikolik asit (PGA), polikaprolakton (PCL), polimetil metrakrilat (PMMA), politetrafloroetilen (Teflon- PTFE) vb. polimerler vardır.

- Kompozit Biyomalzemeler: Birleşiminde yer alan tüm malzemelerin en iyi özelliklerini koruyarak yeni ve çok fazlı oluşan biyomalzemelere denir. Homojen biyomalzemelere kıyasla kompozit malzemeleri avantaj konumuna getiren yapısal uyumluluğun sağlanması ve bileşen malzemelerden tek başına sahip olmadığı özelliklere sahip olmasından ötürüdür. İmplant sistemlerde ve doku mühendisliği teknolojisinde sıklıkla tercih edilmektedirler [70].

## **2.6 Biyomalzeme Olarak Grafen**

2004 yılında K. S. Novoselov ve arkadaşlarını Nobel ödülüne götüren ilk nanokarbon biyomalzeme olan 2-Boyutlu grafenin keşfi ile kemik, kırık, sinir, kalp, iskelet kası ve deri doku mühendisliği için sıklıkla tercih edilen bir biyomalzeme adayı haline gelmiştir. Muhteşem fizikokimyasal özelliklere sahip grafen, bir benzen halkasının bağlı olduğu altıgen bir petek yapısında, periyodik olarak sıkıca paketlenmiş karbon atomu tabakasından oluşur [74],[75].



**Şekil 2.3** Grafenin kimyasal yapısı ([76] no'lu kaynaktan uyarlanmıştır)

Mekanik sıyırma, silisyum karbür epitak kimyasal buhar biriktirme, yönlendirilmiş bağlama, redoks gibi yöntemlerle hazırlanarak, yüksek mekanik, optik, elektriksel özellik kazanan grsfen çeşitli sensör sistemlerinde, enerji malzemelerinin yapısında, depolamada, sağlık alanında ise kemik, kalp, sinir, kıkırdak, iskelet kası ve deri doku mühendisliğinde tercih edilen bir malzemedir. Özellikle biyomalzeme olarak tercih edilmesinin başlıca nedenleri arasında biyouyumluluk, gözenekliliği, yüksek özgül yüzey alanı, düşük sitotoksitesi, antibakteriyel özellik, yüksek mekanik mukavemet gibi özellikler yer almaktadır[40]. Grafen, hasarlı doku ve organların çoğalması ve yenilenmesi çalışmalarında kullanılır [22]. Grafenin sinir iletimi üzerinde biyomateryal olarak kullanıldığı çeşitli çalışmalar da mevcuttur [25],[26]. Ayrıca grafenin en ince ve en hafif malzeme olması sağlık teknolojilerinde tercih edilmesini artırmaktadır [30].

Biyomalzemelerin en çok arzu edilen özelliklerinden biri biyolojik olarak parçalanabilirliktir. Grafen ve türevlerinin biyolojik bozunmasını araştırmak için deneysel ve moleküler simülasyon teknolojileri uygulanmıştır. Bu noktada, yüzey

modifikasyonu-işlevselleştirme veya kompozit biyomalzemeler formunda üretim, büyük ölçüde katkı maddelerinin özelliklerine bağlı olarak biyobozunmayı iyileştirebilir veya engelleyebilir.

Grafen türevlerinin biyodegradasyonu için literatürde MnP (manganez peroksidaz), HRP (yaban turpu peroksidaz), MPO (miyeloperoksidaz) gibi çeşitli enzimler mevcuttur. Yabancı cisimlerin bulunduğu bölgeye gelen ve fagositoz yapan nötrofillerden salınan bir peroksidaz olan MPO enzimi, özellikle insan akciğerinde grafen biyodegradasyonu ile ilişkilidir. Tek başına grafen nanotüpler yerine grafen içeren kompozit biyomalzemelerin biyobozunurluk seviyeleri birbirinden farklıdır. Kompozit malzemelerde istenilen bu özelliğin elde edilmesi daha kolaydır. Ek olarak, grafenin toksik dozunun belirlenmesi, klinik olarak uygulanabilir biyomalzemelerin kullanımına katkıda bulunur [30].

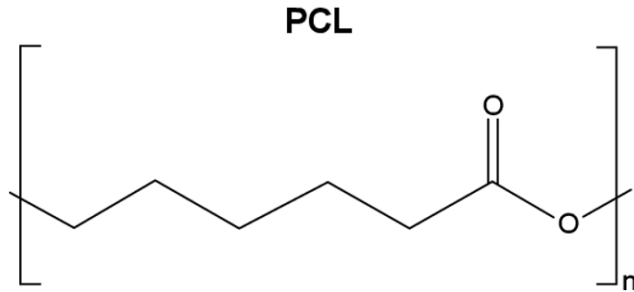
Karbon bazlı nanomalzemelerin kök hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasını hızlandırdığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Karbon nanobiyomalzemelerin özellikle viskoelastik davranış açısından yumuşak dokularda bulunan zarların esnekliği ile benzerliği görülmektedir. Bu durumda kök hücrelerin daha hızlı proliferasyonunun gerçekleşmektedir [77], [78]. Grafen temelli nanomalzemeler üstün kimyasal kararlılık ve biyouyumluluğun yanı sıra esneklik ile birleşen yüksek bir spesifik yüzey alanı ile kök hücrelerin uygun mikroçevresini oluşturma, proliferasyon ve farklılaşmada rejeneratif biyolojiye katkı sağlayan eşsiz bir biyomalzeme adayı haline gelmektedir [79],[80]. Yumuşak membranlar olarak 2B grafen ve grafenden türetilmiş grafenoksit (GO) nano tabakaları, kaplanabilir ve işlenebilir özellikleri sayesinde çok tercih edilmektedir [81]. Üstün mekanik özellikler bir yana, grafen çok yönlü bir kimya sunar. Benzersiz yüzey özelliklerini tamamen karbon ve aromatik ağı nedeniyle grafenin açık yüzeyinde diğer biyomoleküllerle gerçekleşen kovalent veya kovalent olmayan etkileşimlerle sağlar. Bu da kolayca yüzeyin işlenebilirliğine, kök hücrelerle etkili bir etkileşime ve farklılaşmanın yönlendirilmesine yarar. Aynı zamanda bu etkileşim farklı biyomalzemelerle kompozit bir doku oluşturmayı sağlayarak biyomalzemenin etkinliğini artırır [82], [83], [84], [85]. Fibroblast [86] ve kök hücreler [82], [83],[87] ile grafenin 2B etkileşimi

üzerine yapılan bir çalışmada hücrelerin proliferasyonunu ve farklılaşmasını sağladığı gösterilmiştir. Ayrıca grafen hasarlı dokuların, organların çoğalması ve yenilenmesi çalışmalarında kullanılmaktadır [22]. Grafenin 2B'lu sisteme kıyasla 3B'lu sistemde hücre-hücre etkileşiminin sınırlarının ortadan kalktığı, kök hücre farklılaşmasını daha hızlı gerçekleştirdiği, bu farklılaşmanın osteojenik, adipojenik, miyojenik ve nörojenik olduğu gösterilmiştir [24]. Özellikle kök hücre ile yapılan çalışmalarda homeostazı korumak için hücre-mikroçevre etkileşiminin 3B dinamik bir makromolekül ağı üzerinde gerçekleşmesi sinyalizasyon açısından esastır [24]. Yapılan bir çalışmada *in vitro* koşullarda gözenekli ve birbirine bağlı 3B grafen foam şeklinde hazırlanan iskelenin üzerinde fare hipokampusundan elde edilen nöronal kök hücrelerin kültüre edildiği çalışmada, TUJ1, O4, GFAP ve DAPI gibi çeşitli immünofloresan belirteçlerle boyanarak nöronal kök hücrelerin sırasıyla nöronlar, oligodendrositler, astrositlere farklılaştığı görülmüştür. 2B grafen ortamında nestin seviyesindeki düşüklüğün 3B ortamda daha yüksek ekspresyona ulaştığı yine aynı çalışma ile gösterilmiştir. Mikro ölçekli topografik özellikler ve iskeledeki gözeneklilik nöronal kök hücrelerde verimli iletişime, daha iyi besin alışverişine, elektriksel anlamda da daha etkili uyarıma olanak tanır[88]. Hasarlı alanlarda akson büyümesini yönlendirmek, iyileşme verimliliğini artırmak için, kılavuz köprüler ve kanallar üretilir. Bu kanallara nöral konduit-kanal adı da verilmektedir. Grafen nanopartikülleri içeren yumuşak malzemelerin, sertliğinin ve elektriksel iletkenliğinin ayarlanması grafen konsantrasyonuna bağlıdır. Bu konsantrasyondaki artış malzemenin kristalizasyon sıcaklığını, elektriksel iletkenliğini ve sertliğini artırır. İşlenebilirliğin konsantrasyona bağlı olması kanal şeklinde üretilen bu yapıları cerrahide implante edilebilir boyuta taşır [22]. Örneğin; yapılan bir çalışmada polyakrilamid, grafen oksit, jelatin, and sodyum aljinatın (PAM/GO/Gel/ SA, PGGS) iki farklı konsantrasyonundan oluşan kompozit sinir kanalı biyomalzemelerinin siyatik sinir hasarında onarımını etkili bir şekilde teşvik ettiği gösterilmiştir [49]. Başka bir çalışmada iletken polimer olan polipirol ve polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA) kullanılarak grafen ile kompozit nanolifli yapı iskelesi üretildi. Bu iskelenin hücre bağlanması için

yüksek bir yüzey alanına sahip olduğu, ayrıca elektrik stimülasyonuna izin vererek hücre nöritlerini hizalanmış fiber desenler boyunca yeniden üretmeye yönlendirdiği tespit edildi. Ayrıca bu nanolif yapısı yaşlanma çalışmalarında da kullanılmış ve elektroaktifliği sayesinde optik sinirler üzerinde de teröpatik etkinlikte olduğu keşfedilmiştir. Nanolif üzerindeki retina gangliyon hücrelerine elektrik simülasyonu uygulandığında, sadece hücrelere kıyasla daha uzun süre sağlıklı kaldığı, morfolojik yapısının daha çok korunduğu ve apoptoza daha az uğradığı görülmüştür [89]. Yapılan başka bir çalışmada biyoyumlu ve düşük sertlik özelliği sergileyen %10 jelatin metakrilamid (GelMA) hidrojel ile grafen birlikteliğinin oluşturulduğu biyo-mürekkep tasarlandı ve içerdiği nöral kök hücreler üzerinde proliferatif etkide olduğu gösterilmiştir[90].

## 2.7 Biyomalzeme Olarak Polikaprolaktone

Alifatik polyesterdir Poli( $\epsilon$ -kaprolakton) (PCL),  $\epsilon$ -kaprolaktonun halka açık polimerizasyonu ile sentezlenen, biyoyumlu, biyobozunur, suya, çözücülere ve yağa karşı iyi direnç gösteren bir polimerdir [91].



**Şekil 2.4** Poli( $\epsilon$ -kaprolakton) (PCL) yapısı ([93] no'lu kaynaktan uyarlanmıştır)

Doğrusal, alifatik ve yarı kristal bir poliester Polikaprolakton, düşük yoğunluğu, biyolojik olarak parçalanabilirliği ve diğer plastiklerle karıştırılabilme kolaylığı ile kendine doku

mühendisliği, gıda ambalaj teknolojisi ve kontrollü ilaç salınımları gibi alanlarda yer bulabilmektedir[94]. Üretim yöntemi açısından diğer plastiklere göre daha maliyetlidir. Erime sıcaklığı ve camsı geçiş sıcaklığının düşük olması sebebiyle

mekanik özellik açısından zayıf karakter gösterebilir[95]. Bu durum da nanokompozit teknoloji ile çözüme kavuşturulabilir [96]. Biyolojik sistem içerisinde yavaş degradasyona uğrar ve bu sebeple kemik, kırıldak ve çeşitli mukavemet gerektiren doku mühendisliğinde tercih edilme nedenidir [97].

Literatürde yapılan bir çalışmada, elektro eğirme yöntemiyle üretilen PCL lifler bir cam substrat üzerinde GO ile kompozit oluşturulmuş, kontrol olarak da nanoliflerin yer almadığı cam slatlara GO kaplanmıştır. Buna göre PCL-GO cam yüzeyin nanolif yer almayan kontrol grubuna göre, hücreler açısından daha yüksek bir afiniteye sahip olduğu, oligodendrosit farklılaşmasını daha iyi etkilediği görülmüştür. Yüksek konsantrasyonda GO-PCL nanolif birlikteliği nöral rejenerasyonu ve nöronal kök hücrelerin sinerjik etkileşimi açısından birbirini tamamlayabilen kompozit malzeme olduğunu göstermiştir [37].

PCL, periferik sinir hasarında iki sinir ucunun anastomozunda konduit olarak da kullanılan bir polimerdir. Periferik nöromühendislikte sinir dokusuna uzun vadeli destek sağlayabilmesi açısından uygun bir iskele yapısı oluşturur. Yapılan bir çalışmada dopamin (DP) ve arginil glisil aspartik asit (AGAA) gibi sinir hasarında etkili ve yapışmaya yardımcı olan moleküllerle yüklü grafen nanopartikülleri ile PCL iskelesi nöral konduit şeklinde kompozit biyomalzeme olarak oluşturulmuştur. Sinir uçlarını birleştirmede uzun süreli implantasyona izin verdiği, grafen nanopartiküllerinin makro gözenekli yapısıyla kontrollü salımı gerçekleştirerek DP-AGAA'nın salınabildiği ve aynı zamanda su ve oksijen geçişini sağladığı görülmüştür. Bu konduit daha sonra Sprague Dawley sıçanlarının siyatik sinirine implante edilerek kontrol grubu ile 12 hafta boyunca fonksiyonel iyileşmesi karşılaştırılmıştır. Schwann hücresi yüklü nano-iskelelerde siyatik sinirin iyileşmesinin, bileşenlerden biri olmayan diğer iskelelere kıyasla daha sinerjik iyileşme göstermesi, kullanılan malzemelerin uygun bir kompozit materyal olduğunu göstermektedir [36]. Güncel başka bir çalışmada gelişen periferik sinir hasarında porlu bir yapıya sahip Poli(laktik-ko-kaprolakton) (PLCL) malzemesi ile 3B baskı yöntemi ile oluşturulan içi kollajen kaplı PCLC sinir kanalı malzemelerinin etkinlikleri karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada kollajen kaplı malzemenin hem sinir yenilenmesi üzerindeki etkinliğinin yüksek olması,

hem de esnek yapısı sayesinde cerrahi olarak uygulanabilirliğinin kolaylığı nedeniyle sadece PLCL içeren biyomalzemeye kıyasla kullanımlarının daha avantajlı olduğu sonucuna varılmıştır [26].

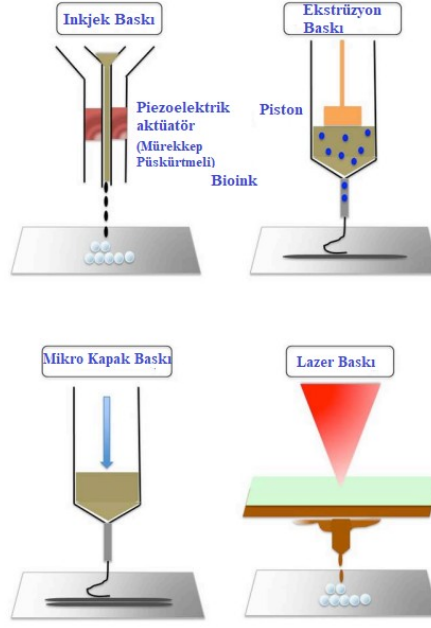
Buna göre de PCL'nin mukavemet gücü, elastisitesi, biyobozunur ve biyouyumlu yapısı, grafenin ise sinir iletimi konusunda gösterdiği eşsiz özellikler dikkate alındığında, periferel rejenerasyonda sinir dokusunu taklit etme açısından başarılı bir kompozit biyomalzeme adayı olduğunu göstermektedir.

## **2.8 Sinir Doku Mühendisliğinde 'Bioink' Kavramı ve 3B Baskı**

### **Teknolojisi**

Sinir hücrelerinin aralarındaki iletişim, elektriksel etkileşim, migrasyon, sinir kök hücrelerinin farklılaşması veya dokulaşma yönündeki adımları mikroçevresinin kontrolü altında gerçekleşir. Hem mühendislik hem de biyoloji ilkelerinin multidisipliner olarak kullanılmasıyla sinir rejenerasyonunda etkili, canlı ve hasarlı dokularının yerine geçebilecek, bu dokuların yenilenmesinde, oluşan hasarın giderilmesinde ve fonksiyonlarının yeniden kazandırılmasında kullanılacak yapay dokular, *in vitro* koşullar altında sentezlenebilir [19]. Doku iskelesi, hücreler ve biyosinyal molekülleri doku mühendisliğinin üç temel taşı oluşturur. Doku mühendisliğinin üç temel taşından biri olan doku iskeleleri, doğal ve sentetik maddelerden farklı yöntemlerle üretilmektedir [20]. Üç boyutlu (3B) baskı olarak da adlandırılan katkı üretim teknolojileri (AMT) kullanılarak iskele imalatı, doku mühendisliğinde kusurlu dokuları geri yüklemek, değiştirmek veya yenilemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. 3B biyobaskı, genellikle 'biyomürekkep (bioink)' olarak adlandırılan, biyomalzemeler ile hücrelerin aynı anda basıldığı bir katkı üretim tekniğidir [21]. 3B baskı teknolojileri püskürtmeli, lazer destekli ve ekstrüzyon tabanlı olarak ayrılmaktadır [98], [99].





**Şekil 2.5** Biyobaskı çeşitleri ([100] no'lu kaynaktan uyarlanmıştır)

Eriyik elektroyazma (Melt Elektrowriting, MEW) ise, elektroğirme ve ekstrüzyon bazlı biyobaskıyı birleştiren ve doku mühendisliği uygulamaları için bir iskele oluşturmak için kullanılan farklı bir üretim tekniğidir [101],[102].

Eriyik elektroyazma fiber tasarımlarına olanak sağlayan, özellikle PCL gibi çeşitli polimerlerin işlenmesine önemli katkılar sunar. Eriyik ekstrüzyonda, CAM-CAD gibi bilgisayar destekli tasarımıdır ve iskele yapısı katmanlar şeklinde biriktirilerek oluşturulur. Desenli tasarımlara daha fazla izin veren bu sistem ile hem farklı kalınlıklarda hem de fiber çapı kontrol edilerek tek adımda üretilir [103]. Doku mühendisliğinin temel yapı taşları iskeleler, hücreler ve biyosinyal molekülleri oluşturur[20]. Rejeneratif tıbbı yönelik uygulamalarda sinir hücreleri veya kök hücreler sıklıkla tercih edilmektedirler. Sinir hasarına yönelik tek başına hücreler terapi çalışmalarından Wharton Jeli ya da olfaktör kök hücrelerine ait çalışmalar bulunmaktadır. Literatürde omurilik hasarına karşı kullanılmış insan olfaktör mukozasından nazal biyopsi ile elde edilen hücrelerle gerçekleştirilmiş prelinik ve klinik birkaç çalışmada, hücreler enjeksiyondan 1 ile 3 yıl sonrası herhangi bir kist, siringomiyeli veya tümör oluşumu tespit edilmediği görülmüştür. Aynı çalışmanın sonucunda hücreler güvenlik değerlendirmeleri gerçekleştirilmiş ve buna bağlı olarak uygulanabilirliğini

manyetik rezonans görüntüleme sistemi (MRI) ile kanıtlamıştır [104], [105]. 2011 yılında Li ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada omurilik hasarına karşı sıçan hayvan modellerinde olfaktör bulbtan elde edilen olfaktör kılıf hücrelerinin enfeksiyon sonrası hayatta kaldığı, lezyondan kısa mesafeye göç edebildiği, remiyelinizasyonu sağladığı ve kavite boyunu azaltmasa da iyileşme görüldüğü gösterilmiştir [106]. Sinir rejenerasyonunda kullanılan hücresel terapileri klinik araştırmalara taşıyan çalışmalar sınırlı olmasına rağmen; hücrelerin güvenli ve verimli olduğunu göstermektedir [42]. Ancak bu çalışmaların gösterdiği bir diğer unsur ise; tek başına hücre ya da biyosinyal moleküllerinin kavite bölgesine enjeksiyonu, sinir doku mühendisliğindeki iskele-hücre-biyosinyal molekülü üçlü yapıtaşına kıyasla daha yetersiz gelebilmektedir. Örneğin; poliglikolik asit tabanlı nörotüp kanalının periferik sinir hasarlarından biri olan fasial sinir hasarına uğratılmış sıçanlara implante edilmesi ve işaretlenmiş olfaktör kök hücrelerinin konduitten içeri verilerek anastomozu sonucu yüz felci rejenerasyonunun başarıyla gerçekleştiğini gösteren çalışmalar da literatürde yer almaktadır [43], [44]. Bir başka çalışmada insan normal dermal fibroblastları kullanılarak geliştirilen çoklu hücresel sferoidlerden elde edilen 3B yapı ile literatürde inert özelliği nedeniyle sıklıkla kullanılan silikon sinir kanalının siyatik sinir hasarı rejenerasyonundaki etkinlikleri karşılaştırılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda sferoid temelli 3B yapının siyatik hasar oluşturulan hayvan modellerinde doku rejenerasyonunu anlamlı bir biçimde arttırdığı [45] tespit edilse de; literatürde sıklıkla kullanılan silikon temelli sinir tüplerinin yüksek enfeksiyon riski ve düşük biyoyumluluk gibi bazı önemli dezavantajları olduğu da bilinmektedir [46], [47]. Diğer yandan yapılan başka bir çalışmada kitin/kitosan tabanlı yapay sinir greftinin, biyoyumlu ve aynı zamanda biyobozunur özelliğinden dolayı da kesilen siyatik sıçan hayvan modelinde iki sinir ucunu birleştirmede umut vaat ettiği belirtilmiştir [48]. Tüm bu bilgiler ışığında 3B biyobaskı yöntemlerinden biyoyazıcıların ve eriyik elektroyazıcıların özellikle ileride sinir kanal gibi kondoidal sistemlerde daha çok tercih edilecek yeni jenerasyon baskı teknikleri arasında olduğu düşünülmektedir [107].

### 3.1 Materyal

#### 3.1.1 Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeler

- Jelatin/Aljinat Bioink Toz (HD Bioink/ Baseink)
- CaCl<sub>2</sub> çapraz bağlayıcı (HD Bioink)
- Grafen , Industrial Graphen Nanoplates
- Polikaprolakton, ESUN, Çin
- 3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromürn(MTT), Invitrogen
- Fetal sığır serumu (FBS), Sigma , ABD
- Penisilin-Streptomisin Solüsyonu, Sigma, ABD
- Fosfat tuz tamponu (PBS) tablet, Gibco, ABD
- DMEM/F-12 &L-Glutamin içeren Sigma, Almanya
- DMEM/F-12&L-Glutamin içeren Capricorn, Almanya
- Nörojenik farklılaştırma solüsyonu (Promocell Neurogenic Differentiation Medium)
- %0,25 Tripsin-2.21mM Etilen Diamin Tetraasetik Asit 4Na (Tripsin-EDTA), Multicell
- TrypLE™ Express Enzyme (1X-no phenol red), Gibco Thermo Fisher Scientific
- Dimetilsülfoksit (DMSO), Sigma, Almanya
- Paraformaldehit (PFA)-Sigma&Aldrich, Inc., Almanya
- 4',6-Diamidino -2-fenilindol dihidroklorür (DAPI), Sigma
- Tween-20, Sigma
- Triton X-100, Biofroxx
- RNA izolasyon kiti, Quick-RNA™ Miniprep Kit
- cDNA kiti, Bioline
- Etanol, Millipore

- Bovin serum albumin (BSA), Sigma, Almanya
- Anikorlar: N-Cadherine-tavşan (Rabbit-mAb Cell Signaling Technology 13116);  $\beta$ -III tubulin-fare (Santa cruz Biotechnology; Purifield anti-tubulin Beta Biolegend MMS-435P);  $\alpha$ -SMA (Polyclonal Antibody Abp52851 Abblin) ; Nestin (Santa cruz Biotechnology); Sox2-keçi (Santa cruz Biotechnology)
- Sekonder antikorlar: Anti-fare IgG-FTIC-tavşan; Anti-fare IgG-SC2781-keçi (Santa cruz Biotechnology)
- Sybr Green Real-Time PCR, Bioline
- 25-75 cm<sup>2</sup> 'lik kültür kabı, TPP- Nest
- 6, 24 ve 48 kuyulu plakalar, Nest
- 15-50 ml steril falkon santrifüj tüpleri, Eppendorf , IsoLAB
- Steril enjektör ucu filtre (0,22-0,45  $\mu$ ), Corning
- Thoma lamı, Bright-Line, Hauser Scientific Horsham, PA, USA
- Kriyotüp, Corning
- 1-5- 10 ml'lik enjektörler, Set inject
- 10-100-1000  $\mu$ l'lik pipet uçları, İsolab

### 3.1.2 Cihazlar

- Hava akımlı kabinler (Laminar flow – Thermo Scientific HERAsafe KS )
- 3B Bioyazıcı A3 Axolotl Biosystems, Türkiye
- Eriyik Elektroyazıcı Axo MEW (Melt Electrowriting) Axolotl Biosystems, Türkiye
- Otoklav, Nüve, OT120M
- Inverted Mikroskop ( Zeiss Primovert), Japonya
- Floresans Mikroskobu, Zeiss Axio
- Hücre Kültürü İnkübatörü (CO<sub>2</sub> inkübatörü), Panasonic
- Buzdolabı, Panasonic
- -80 °C Dondurucu , Panasonic
- Mikroplaka Okuyucu, Spektrostar Nano
- Mikropipet seti (10, 50, 100, 1000  $\mu$ l'lik ),Thermo, Pippetman
- pH Metre, Ohaus

- Hassas Terazi, Kern ABJ-NM/ABS-N
- Santrifüj, Hitachi, Japonya
- Su banyosu, Senova
- Etüv, Nüve FN055
- Manyetik karıştırıcı, Jeiotech
- Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR), JASCO 6600-Tetra
- Zeta Potansiyeli ve Partikül Boyutu Ölçüm Cihazı, Zetasizer Agilent Technologies
- Ultrasantrifüj Optima XPN-100, Beckman Coulter
- Taramalı elektron mikroskobu (SEM) Cihazı, FEI QUANTA 450 FEG ESEM SEM
- Işık mikroskobu ,Olympus
- -195°C azot tankı ve azot taşıma tankları (DMC air liquid systems)
- Spectrostar-Nano-Spectrophotometry ,BMG LABTECH
- NTA Cihazı, Nanosight 300-NS300 ,Malvern Panalytical
- Nanodrop Ölçüm Cihazı ,Thermo Nanodrop ONE
- Thermal Cyler ,BIORAD T100
- Real Time PCR System ,Applied Biosystems Step One Plus
- Serolojik pipet tabancası, Thermo

### **3.1.3 Deneylerde Kullanılan Besiyerleri, Tampon ve Kimyasalların Hazırlanması**

Dulbecco'nun Modifiye Eagle Nutrient Mixture-F12 medyumunu için; %10 fetal sığır serum (FBS), %1 Penisilin-Streptomisin (Pen-Strep) ve %1 L-Glutamin içeren DMEM/F-12 besiyeri hazırlamak için; 50'lik falkona 45 ml %1 Penisilin-Streptomisin (Pen-Strep) ve %1 L-Glutamin içeren DMEM/F-12besiyeri koyulup ve 5ml steril şırınga filtrasyonu ile süzölmüş FBS ile eklendi.

PBS tamponu için; 8 g NaCl, 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,8 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O ve 2 g KCl tartılıp distile su eklenerek Ph metre ile pH ölçöldü ve pH'ı 7,4'e ayarlanacak şekilde son hacim 1000 ml olacak şekilde solösyon hacmi tamamlandı ve süzöldü. Takibinde sterilizasyon amaçlı otoklavlama yapılarak kullanım için +4°C saklandı. Hazır PBS tabletler için ise 100ml'de 2 tablet PBS çözdüröldü ve otoklavla sterilizasyonu yapıldı.

MTT solüsyonu için; 5 mg/ml MTT tuzu tartılarak PBS içerisinde çözündürülüp vortekslenildi. Çalışılacağı zaman taze olarak hazırlanması gereken MTT solüsyonu 0,45 µl' lik filtreden geçirilerek steril edilmiş oldu ve kullanım süresine kadar buzdolabında bekletildi.

Dondurma solüsyonunu için; %10 dimetil sülfoksit (DMSO) solüsyonu hazırlamak için total 15 ml'lik falkona 13,5 ml FBS üzerine 1,5 ml DMSO eklenerek hazırlandı ve -20°C saklandı.

'Baseink' ve GrafinK bioinkleri için; Liyofilize halde bulunan besiyeri ile sulandırılabilen 'Baseink' (3:5 oranında aljinat-jelatin) ürünü 5 ml DMEM/F-12 besiyeri içerisinde çözüldü. GrafinK bioinkini hazırlamak için ise; optimum (%0.1) grafen konsantrasyonu içeren GrafinK elde etmek için, 4955 µl 'Baseink™' kültür ortamı içerisine 5µl (%1) stok grafen çözeltisi eklenir. Her iki grupta da tozlar tamamen çözülüp homojen bir jel içeriği oluşana kadar serolojik pipet ile karıştırıldı. UV ya da otoklavda sterilizasyonu yapılabilir. Örnekler 121 °C'de 20 dk boyunca otoklavlandı ve sonrasında oluşan baloncukları gidermek için 280 g x 2 dakika santrifüj edildi. Numuneler, hücrelerle aynı ısıda olması için 37°C'de inkübatörde bekletildi. Daha sonra kullanılmak üzere hazırlanan jeller +4°C'de tutulabilir.

Nörojenik farklılaştırma solüsyonunun için; Promocell nörojenik farklılaştırma kiti 90 ml'lik medyum ve 10 ml'lik özel solüsyonu halinde kullanılmaktadır. Buna göre 90 ml'lik medyum 15'lik falkonlara 10'ar ml eklenerek alikodlanır ve +4 °C'de muhafaza edilir. Kullanılacağı zaman -20 °C'de muhafaza edilen özel solüsyondan alikodlanan medyuma 1ml eklenerek iyice süspanse edilir. Böylelikle 15'lik falkonda hazırlanan farklılaştırma solüsyonu total hacmi 10 ml olur. Hazırlanan bu solüsyon kullanılana kadar +4 °C'de muhafaza edilir. Kullanım aşamasında 6'lık plakada her bir kuyuya 2 ml olacak şekilde eklenmiştir.

RNA izolasyon kiti solüsyonu için; %100'lük etonelden 96 ml, %95'lik etanolden 104ml alınarak üzerine 24 ml konsantre RNA Yıkama Tampon'undan eklenir.

Liyofilize DNAaz DNAaz/RNAaz-İçermeyen Su ile sulandırılarak (50 u/55µl olacak şekilde) nazıkçe ters çevirerek karıştırılır.

## 3.2 Yöntemler

### 3.2.1 Wharton Jeli Mezenkimal Kök Hücre Kültürü

Kriyobanktan çıkarılan ATCC kaynaklı pasaj 3'teki WJ-MKH'leri, %10 FBS, %1 Pen-Strep ve %1 L-Glutamin içeren DMEM/F-12 besiyeri ile kültüre edildi. Kültürü devam eden hücrelerin kriyoprezervasyonu için %10'luk DMSO kullanılarak kademeli dondurma işlemi ile -80 °C'ye kaldırılmıştır.

### 3.2.2 WJ-MKH'den Eksozom Üretimi

%80 doluluğa ulaşan ve pasajı gelen hücreler fosfat içeren tuzlu su tampon olan PBS ile yıkanarak 75cm<sup>2</sup>'lik flask için yaklaşık 5 ml tripsin enzimi ile 37 °C'de 5 dakika bekletildi ve hücreler taban yüzeyinden kalktıklarında 15ml'lik falkon tüplere aktararak 1500 rpm'de (101 x g) santrifüjlendi ve süpernatant atılarak hücrelerin sayımı yapıldı. Kademeli ölçek büyütmesine uygun olarak bir büyük boy flaska aktarıldı. Yeterli miktarda eksozom üretimi gerçekleştirebilmek için hücrelerin pasajı yaklaşık 3 kez devam ettirildi. Yaklaşık 180 ml süpernatantı biriktirilen hücrelerde kademeli-ultrasantrifüjleme ile eksozom elde etme aşamasına geçildi.

Kültürü devam ettirilen WJ-MKH'leri %80 yoğunluğa ulaştıktan sonra serumlu besiyeri ortamından uzaklaştırılacak, PBS ile yıkandı. Daha sonra serumsuz olarak hazırlanan %1 Pen-Strep DMEM/F-12 ile 48 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından hücrelerin üzerindeki besiyeri 50 ml falkon içerisinde toplanarak biriktirildi. Biriktirilen besiyerleri santrifüj aşamasına kadar -20 °C'de saklanır. Yaklaşık 180 ml besiyeri biriktirildikten sonra izolasyon aşamasına geçildi (Şekil 3.1).



**Şekil 3.1** -20 C°de saklanan serumsuz besiyeri hücre süpernatantları

Önce 300 g'de 10 dakika +4°C'de santrifüj edildi. Bunu takip eden ilk üç aşamada süpernatant ile devam edilerek pellet atılmıştır. Santrifüj sonrası süpernatant yeni tüplere aktarılarak tekrar 2000 g'de 10 dakika +4°C'de santrifüj edildi. Tekrar süpernatant dikkatlice yeni tüplere aktarılmış ve pellet atılmıştır. Aktarımı yapılan süpernatant 10.000 g'de 30 dakika +4°C'de santrifüj edildi. Bu aşamada toplanan süpernatantlar ile ultrasantrifüj aşamasına geçilmiştir ve 110.000 g'de 130 dakika boyunca santrifüj yapılmıştır. Bu aşamadan sonra santrifüj uzaklaştırılarak elde edilen pelletler tek bir tüpte PBS ile toplanmıştır. PBS bu aşamada ayrıca ortamda herhangi bir hücre kalıntısı varsa yıkama amaçlı da kullanılmaktadır. Yaklaşık 1 ml PBS ile çözülerek yıkanan pellet vortekslendikten sonra tekrar 110.000 g'de 70 dakika +4°C'de ultrasantrifüjleme yapıldı. Son santrifüjleme sonrası süpernatant dikkatlice çekilerek elde edilen pelletin üzerine yaklaşık 1 ml PBS eklenerek iyice pipetajı gerçekleştirildi [41]. Bu aşamadan sonra NTA analizi ile elde edilen eksozomların karakterizasyon aşamasına geçildi. Şekil 3.2'de gösterilen ultrasantrifüj ve NTA analizi aşamaları Yeditepe Üniversitesi Eksozom Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.





**Şekil 3.2** Eksozomların ultrasantrifüj yöntemiyle eldesi ve NTA analiz aşaması; (A),(B), Ultrasantrifüj hazırlık; (C), Ultrasantrifüj 110.000g' de; (D),Elde edilen PBS ile süspansiyon pellet; (E), NTA'da karakterizasyon

### 3.2.3 WJ-MKH'den Üretilen Eksozomların NTA Yöntemi ile Analizi

Eksozom karakterizasyonu için altın standart olarak belirlenen NTA analizi yapılmıştır. PBS ile seyreltilen eksozom örneğinden 10  $\mu$ l alınarak 100 kat PBS ile seyreltilmiştir. Tek kullanımlık enjektör ile NanoSight NS300 by Malvern Panalytical cihazında ölçüm yapıldı.

### 3.2.4 WJ-MKH'den Üretilen Eksozomların Zeta Potansiyel Ölçümü

Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü'nde bulunan Malvern Nano ZS cihazında 20  $\mu$ l örnek 980  $\mu$ l PBS ile seyreltilerek ölçüm yapılmıştır. Zeta potansiyeli ölçümü NTA analiz sonuçları ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

### 3.2.5 Eksozomların Hücreler Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin İncelenmesi

Fibroblast hücre kültürü Tripsin/EDTA ile kaldırılarak 96'lık plakalara yaklaşık her kuyuya 10.000 hücre düşecek şekilde ekim yapıldı ve %10'luk FBS içeren DMEM/F-12 besiyerinde her kuyuda toplamda 100  $\mu$ l olacak şekilde besiyeri eklenerek 24 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından tüm besiyerleri çekilerek yeni besiyeri koyuldu. İzolasyonu yapılmış ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiş PBS seyreltilmiş eksozom örneğinden ( $3 \times 10^8$  tanecik/ 5ml) 10  $\mu$ l, 50  $\mu$ l ve 100  $\mu$ l her bir kuyuya koyulacak ve 5 tekrar yapılacak şekilde gruplar oluşturuldu. 10  $\mu$ l için kuyucuklardan 10  $\mu$ l besiyeri atılarak yerine 10  $\mu$ l eksozom solüsyonundan; 50  $\mu$ l için 50  $\mu$ l eksiltılarak 50  $\mu$ l eksozom ve aynı şekilde 100  $\mu$ l için bir kuyudaki tüm besiyeri çekilerek yerine seyreltik eksozom

solüsyonundan 100 µl konuldu (sadece eksozom içeren grup). Kontrol grubu taze besiyerinde bırakıldı. Eksozom miktar/taneciklerinin hücreler üzerindeki IC50 değerleri MTT 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) yöntemi ile belirlendi [108]. MTT çözeltisi +4 °C de saklanır, PBS (MTT 5 mg, PBS 5 ml; 1,5 mg MTT, 1,5mlt PBS) ile çözülür ve ara stok çözelti hazırlanır. Hazırlanan ara stok çözelti 0,45 µl lik filtrelerden geçirilerek her bir yuvaya 10'ar µl koyuldu ve 37°C de 4 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından mikroskopta kristallerin oluşumu gözlemlendi. Hücrelerde oluşan formazon kristallerinin çözünmesi için MTT üzerine her bir kuyucuğa pipetaj yaparak 100'er µl DMSO eklendi ve 30 dakika karanlıkta bekletildi. DMSO ile kristaller çözüldükten sonra ELİSA'da 570 nm de okutuldu. Elde edilen MTT sonuçlarının GraphPad Prism programında One-Way Anova Tukey testi ile istatistiği yapıldı.

### **3.2.6 Eriyik Elektroyazma (Melt Elektro-Writing, MEW) Yöntemi ile PCL Sinir Kanalının Üretimi**

Bu çalışmada polimer olarak PCL kullanılmış ve sinir kanalı membranının yapısal çerçevesi bir AxoMEW cihazı (Axolotl Biosystems Ltd., Türkiye) kullanılarak basılmıştır. AxoSuite yazılımı (Axolotl Biosystems Ltd., Türkiye) tarafından kontrol edilen bir x-y slayt sistemine dayanmaktadır. İlk olarak, PCL malzemeleri 80°C'lik paslanmaz çelik şırınga ısıtma sıcaklığına yüklendi ve döner kollektör üzerinde  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 'lik bir ortam sıcaklığında 0,4 mm'lik bir uçtan dağıtıldı.

### **3.2.7 Grafenin 2B Etkileşiminin İncelenmesi**

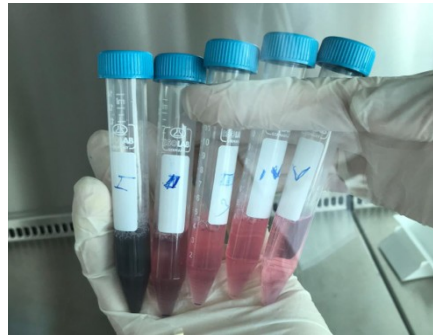
Çalışmada kullanılan grafen Kırklareli Üniversitesi Makine Mühendisliği Bölüm Başkanı Dr. Sencer S. Karabeyoğlu tarafından hediye edilmiştir. “Industrial Graphen Nanoplates” türündeki grafenin teknik özellikleri; kalınlık 5-8 nm, çapı 5 µm, yüzey alanı: 120-150 m<sup>2</sup>/g 'dir. Alınan grafen örnekleri ısıya dayanıklı olduklarından 121°C'de 20 dk süre ile otoklavlanarak steril edildi. Sterilizasyonun ardından biyolojik deneylerde kullanım için %1 oranında besiyeri ile sulandırılıp ara stok solüsyonu hazırlandı ve +4°C'de buzdolabında saklandı.

### 3.2.8 Grafenin WJ-MKH'lerine Karşı Toksik Olmayan Konsantrasyonunun MTT Yöntemi ile Belirlenmesi ve "Dikişleme" Yöntemi ile Time-Lapse'de Görüntülenmesi

Grafenin toksik olmayan konsantrasyonunu belirleyebilmek için farklı oranlarda besiyeri-grafen karışımları hazırlandı. Bu oranlar ilk dilüsyon oranı olan %1'e ek olarak %0.1, %0.01, %0.001, %0.0001 grafen/besiyeri oranlarıdır. Kontrol grubunda ise sadece besiyeri kullanıldı. Grafenin bu beş konsantrasyonu seyreltme işlemi Tablo 3.1'deki gibi gerçekleştirildi. Grafen parçacıkları 5 $\mu$ m'ye kadar değişen çaplarda plakalar şeklinde olduğundan sabit bir molekül ağırlıkları bulunmamaktadır. Bu nedenle dilüsyonlarımızda ve takip eden deneylerde molarite yerine yüzde olarak ağırlık/hacim yöntemi (w/v) kullanılmıştır.

**Tablo 3.1** Grafenin Kademeli Seyreltmesi

%1	%0,1	%0,01	%0,001	%0,0001	Kontrol (Grafen yok)
100ug Grafen/10ml DMEM/F-12	1 ml I.Örnekten; 9ml besiyeri	1 ml II.Örnekte n; 9ml besiyeri	1 ml III.Örnekte n; 9ml besiyeri	1 ml IV.Örnekte n; 9ml besiyeri	10 ml DMEM/F-12 besiyeri



**Şekil 3.3** Seyreltilmiş grafenli besiyeri görüntüsü; I. %1'lik, V. %0.0001'lik grafen oranı temsil etmektedir

MTT için WJ-MHK'leri 96'lık plakalara her bir kuyuda 10.000 hücre olacak şekilde 6 tekrarlı ekimi yapıldı. Grafen hücrelerle muamele edilen belirli oranlarda IC50 değerleri MTT yöntemi ile belirlendi [108].

Ayrıca 2B sistemde MTT öncesi bu hücrelerin grafenin farklı oranları ile etkileşimi Time-Lapse mikroskopta belirli aralıklarla alınan görüntü örnekleriyle oluşturulmuş "Stitch Imaging" olarak adlandırılan bu "Dikişleme Fotoğraf" yöntemi ile görüntülendi. Bu görüntüleme yöntemi, HD kalitede 4x5 çoklu fotoğrafın birleştirilmesiyle oluşturuldu.

### 3.2.9 'Baseink™'- Grafink Bioinklerinin Üretimi

Çalışmada kullanılan 'Baseink™' Tübitak 2209-B Sanayiye Yönelik Lisans Araştırma Projeleri Destekleme Programı tarafından kabul edilen "Mezenkimal Kök Hücrelerin Grafen Eklenmiş Biyomürekkeplerle 3B Biyoyazıcılarda Basımı ve Farklılaştırılması" isimli proje (Başvuru No: 1139B411802273) HD Bioink iş birliği ile bu tez çalışması kapsamında geliştirildi. Çalışmanın diğer bir grubu olan yeni aday ürün 'Baseink™'in grafen içeren halidir ve bu tez çalışması kapsamında Grafink olarak adlandırılmıştır. Çalışma için her grupta total hacim 5'er ml olacak şekilde besiyeri ile bioink tozları (aljinat/jelatin 3:5 oranında) tartılıp homojen bir jel içeriği oluşana kadar serolojik pipet ile karıştırıldı. Grafink grubunun içine %1 oranında grafen içerecek şekilde sulandırılmış stok çözültiden grafen eklendi. 20 dk otoklavlandı ve otoklav sonrası oluşan baloncukları gidermek için 280 g x 2 dakika santrifüj edildi. Numuneler, hücrelerle aynı ısıda olması için 37°C'de inkübatörde bekletildi. Daha sonra kullanılmak üzere hazırlanan jeller 4°C'de tutulabilir. Bioink gruplarının her ikisine de hücreler iki farklı yöntemle eklenmiştir:

1. Yöntem Bioink İçerisinden Hücreler: Hücreler tripsin ile 2B kültür ortamından kaldırılıp santrifüj edildikten sonra sayımı gerçekleştirilmiş ve her bir grup tekrarında 10<sup>6</sup> tane olacak şekilde otoklavlanmış ve santrifüj edilmiş bioinklerin içine eklenmiştir. Total hacim 5ml olması gerektiğinden besiyeri ile toz karışım en başta hazırlanırken yaklaşık 4.5ml besiyeri olacak şekilde hazırlanmış ve sayımı yapılan hücre pelleti

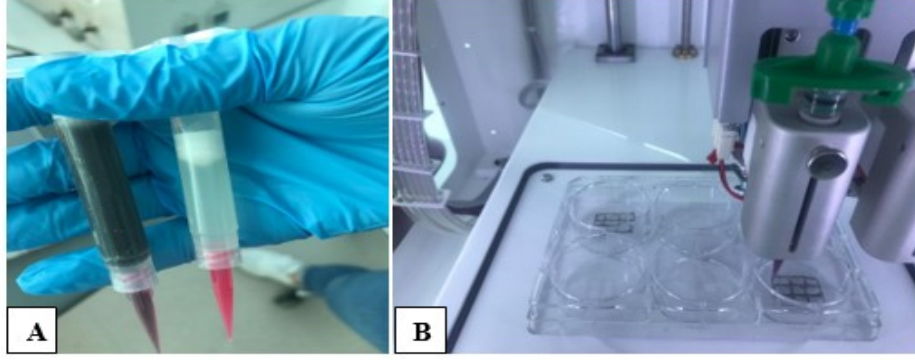
besiyeri ile 500  $\mu$ lye tamamlanıp pipetaj yapılarak bu 4.5 ml üzerine eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır. Hücreleri içeren bioink gruplarının 3B biyoyazıcıda basımı gerçekleştirildi.

2. Yöntem Sferoid Oluşturma: En başta 5ml besiyeri bioink karışımı hazırlanarak otoklavlanır ve santrifüj edilir. Hücreler tripsin ile 2B kültür ortamından kaldırılıp santrifüj edildikten sonra yine aynı oran olan  $10^6$  tane şekilde sayılarak basım aşamasından sonra plakalarda yer alan bioink hidrojel desenlemeleri üzerine eklenir.

### **3.2.10 Hazırlanan Jellerin 3B Biyoyazıcıda Basımı**

Baskıda Axolotl A3 marka 3B biyoyazıcı kullanıldı. Cihaz çalışma öncesinde %70'lik etil alkolle silindi. Ardından dahili UV sterilizasyon sistemi ile steril edildi. Çalışma sırasında hava akışı sadece HEPA filtrelerden gerçekleştirildi. Baskı için daha önce bilgisayarda modellenmiş standart 3B baskı işlemleri uygulandı. Baskı basıncı olarak ortalama 7,5 psi basınç, kartuş tutacağına sıcaklığı  $37^{\circ}\text{C}$ 'de şeklinde ayarlandı.

Hazırlanan jeller steril kabin içerisinde 3B Biyoyazıcıya uygun 3 ml'lik kartuşlara dolduruldu (Şekil 3.4). Doldurma sırasında oluşan hava kabarcıklarından kurtulmak için kartuşlar yeniden santrifüjlendi. Ardından  $37^{\circ}\text{C}$ 'ye ayarlanan biyoyazıcının kartuş haznelere yerleştirilen örnekler ile baskı aşamasına geçildi. Baskı işlemi biyoyazıcının kapakları kapalı iken gerçekleştirildi. Baskıdan sonra plakaların kapakları kapatılarak laminar kabine geri taşındı. Bioinklerin yüzeyini kaplayacak kadar taze %10'luk FBS içeren DMEM/F-12 besiyeri eklendi. Sferoid grubu için hücresiz basılan jellerin üzerine ise her bir kuyuya 1 ml de  $10^6$  hücre olacak şekilde sayılmış bioinklerin üzerine ekilmiştir.



**Şekil 3.4** Grafen-Bioink hidrojel desenlemesinin 3B biyoyazıcı ile basım aşamaları; (A), Grafen eklenmiş hidrojellerin görüntüsü (GrafinK); Solda grafen içeren, sağda ise içermeyen bioinkler 3B biyoyazıcı kartuşu içerisinde görülüyor; (B), 3B biyoyazıcı ile hidrojellerin basım aşaması

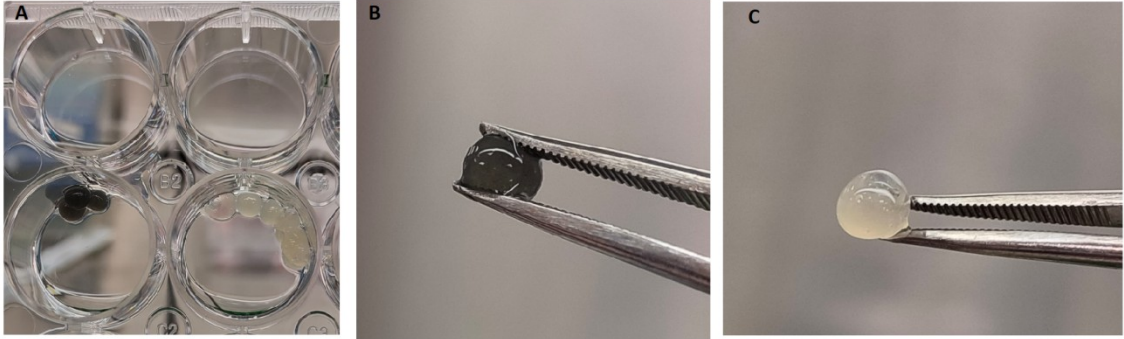
### 3.2.11 Üretilen ‘Baseink™’ ve GrafinK Bioinklerinin Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) ile Karakterizasyonu

Üretilen ve 3B biyoyazıcı aracılığıyla hidrojel desenlemesi yapılan malzemelerin karakterizasyon işleminde FTIR ve SEM görüntüleme teknikleri yapılmıştır. Her iki yöntem de Arel Üniversitesi POTKAM Araştırma Merkezi’nde gerçekleştirilmiştir. Malzeme karakterizasyonunda sık tercih edilen “Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi” (FTIR), ışığın infrared yoğunluğuna karşı dalga sayısını ölçen matematiksel Fourier dönüşümüne dayalı kimyasal analitik bir yöntemdir. Bu yöntem ile katı, sıvı ve gaz formlarında organik bileşiklerin içerdiği fonksiyonel grupların belirlenmesi, iki farklı grubunun moleküler bağ karakterizasyonu, bağlanma yapılarının karşılaştırılmasına olanak sağlar. Hem ‘Baseink™’ hem de GrafinK bioinklerinin hücresiz formlarının FTIR karakterizasyonu yapılmış ve her iki bioink içeriği kimyasal açıdan karşılaştırılmıştır.

### 3.2.12 Üretilen ‘Baseink™’ ve GrafinK Bioinklerinin Taramalı Elektron Mikroskobu ile Karakterizasyonu

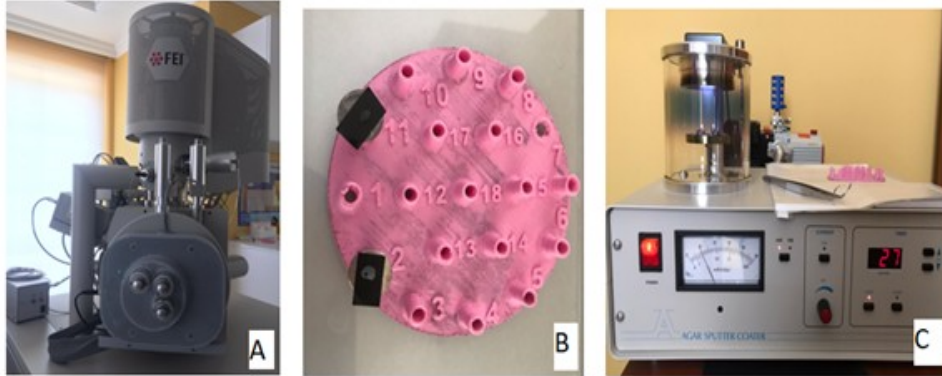
Kalan bioinklerin içerisine yaklaşık 3 milyon Wharton Jeli kaynaklı MKH eklenerek karıştırılmış ve yaklaşık 1 saat kadar 37 °C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası pipet ucu damlatma yöntemi (Şekil 3.5) ile önce CaCl<sub>2</sub> çapraz bağlayıcı içerisine daha sonra oradan dikkatlice alınarak PBS içeren 6’lık

plakalardaki kuyucuklara koyuldu. Böylelikle tuzlardan arındırılmak için yıkanmış, sonrasında damlacıklar dikkatli bir şekilde pens yardımıyla %5'lik paraformaldehit içeren ependorf tüplere alınmıştır.



**Şekil 3.5** Bioinklerin damlatma yöntemi ile aktarımı; (A),Bioink toplarının fikse olmuş genel görünümü; (B),Grafink bioink topu görünümü (C),'Baseink™' bioink topu görünümü

Ependorflara alınan damla bioinklerden bistüri yardımı ile ince kesitler alınarak Au kaplama yapılarak (Şekil 3.6. B-C) FEI QUANTA 450 FEG ESEM marka Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscope-SEM) cihazında (Şekil 3.6.A) hem yüzeyden hem de hidrojel desenlemenin iç kısmından görüntüler alınmıştır.



**Şekil 3.6** SEM görüntüleme ve hazırlık aşaması; (A) SEM cihazı; (B) Bioink kesitleri kaplama öncesi hazırlık; (C) Kaplama cihazı

SEM analizi ile elde ettiğimiz bioinklerimizin yüzeysel morfolojisini, iç yapısını, hücre dağılımları ve bioink-hücre etkileşimleri farklı  $\mu\text{m}$  boyutlarda incelenmiştir.

### **3.2.13 GFP İşaretli Mezenkimal Kök Hücrelerin Grafink Bioink İçerisine Eklenmesi ve Time-Lapse Görüntülerinin Alınması**

Tez çalışmasının bu aşamasında Virostem firması tarafından üretilerek hibe edilmiş olan transdüksiyon yöntemi ile lentivirüs aracılığıyla GFP geni (Yeşil Florasan Protein-Green Fluorescent Protein) WJ-MKH'ne aktarılarak kök hücreler işaretlenmiş yaklaşık her bir kuyucuğa yaklaşık 2 milyon hücre gelecek şekilde 6'lık plakalar içerisindeki bioinklere eklendi. Bioink içerisinde dağılması için pipetaj yapıldı. Seyreltik  $CaCl_2$  çapraz bağlayıcı ile 1-2 sn bekletilerek bağlandıktan sonra jelin içerisinden çapraz bağlayıcı çekildi. Daha sonra 37°C'ye ayarlanan Time-Lapse Görüntüleme'ye yaklaşık 16 saat boyunca bırakıldı.

### **3.2.14 WJ-MKH'lerinin Sinir Hücrelerine Farklılaşma Öncesi Deney Gruplarının Oluşturulması**

2B ve 3B sistemlerde grafenin kök hücrelerin canlılığına ve farklılaşmasına karşı etkinliği hücrelerin ekim yöntemine göre özellikle 3B sistemlerde iki farklı şekilde incelendi. İlk incelemede hücreler 2B sistemde grafen-kök hcre etkileşiminin farklılaşması incelenmesinin yanı sıra; 3B sistemde de bioink gruplarının içine WJ-MKH'leri gömülerek 3B basımı basımı birlikte yapılmıştır. İlk aşama için farklılaştırma ajanı olarak resveratrol kullanıldı ve hem mikroskopik hem de immün boyama ile bu farklılaşma etkinliği incelendi. İkinci aşamada tez çalışmasının da hipotezini oluşturan kombinasyon tedavisi kapsamında, hücreler sferoid formda biyomalzemelerin üzerine eklerken sinir farklılaşma solüsyonu ve eksozomun belirlenen dozu aracılığıyla nöranal hücrelere farklılaşması incelendi. Bu inceleme de mikroskopik, immün boyama ve gen ekspresyon seviyelerinin ölçülmesi ile ilişkilendirildi. Buna göre kurulan deney grupları aşağıdaki Tablo 3.2'de verilmiştir.



**Tablo 3.2** Deney Grupları

1.Grup (3B- Bioink Grubu)	2.Grup (3B-Bioink Grubu)	3.Grup (3B- GrafinK Grubu)	4.Grup (3B-GrafinK Grubu)	5.Grup (2B- Grafen Grubu)	6. Grup (2B- Pozitif Kontrol)	7.Grup (2B-Negatif Kontrol)
'Baseink <sup>TM</sup> '	'Baseink <sup>TM</sup> ' + Eksozom kombinasyon terapişi	GrafinK (%0.1 Grafen)	GrafinK (%0.1 Grafen) + Eksozom kombinasyon terapişi	2B WJ-MK + % 0.1 Grafen	WJ-MK	WJ-MK
Farklılaştırma var				Farklılaştırma var		Farklılaştırma yok

Grupların belirlenmesi ile iki farklı şekilde sinir farklılaştırılması yapıldı.

### 3.2.15 WJ-MKH'lerinin Bioinkler ile Birlikte Basımı Sonrası Resveratrol ile Farklılaşma Etkinliğinin İncelenmesi

Bu aşamada hem resveratrolün hem de grafenin kök hücreler üzerindeki sinir hücrelerine dönüşümü mikroskopik ve immün boyama ile incelendi. Bu sebeple çalışmanın ilk aşamasında grafenin hem 2B sistemde WJ-MKH'lerin, hem de bioink ile beraber basılan kök hücrelerin 3B sistemde farklılaşma etkinliği incelendi. Bunun için 6'lık plakalara hem WJ-MKH'lerinden grafen içeren ve içermeyen 2B kültür, hem de 'Baseink<sup>TM</sup>' ve GrafinK içeren bioink hidrojel desenleme grupları oluşturuldu. Tüm gruplar 14 gün boyunca bu plakalarda DMEM/F-12 besiyeri ile kültüre edildi. Farklılaşma prosedüründe özel bir solüsyon kullanılmadı. Her gruptan bir örneğin ortamına besiyeri değişim gününde medium içerisine 5 µM [109] resveratrol uygulandı. Literatürde resveratrolün mezenkimal kök hücrelerin proliferasyonu ve nöronal farklılaşma üzerinde etkilerinin olduğu bilinmektedir [110], [111].

14 günün sonunda hücrelerin grafen ile etkileşimi Time-Lapse görüntüleme ile fotoğraflandı. Sonrasında farklılaşma etkinliğinin ölçümü için plakaların fiksasyonu ve ikili immün boyanması gerçekleştirildi.

İlk aşamada immün boyama prosedürü aşağıdaki gibi uygulanmıştır:

- Fiksasyon işlemi plakalar içerisinde gerçekleştirildi. Bunun için %4'lük paraformaldehit kullanıldı. Fiksasyon sonrası +4 °C'ye kaldırılan plakalar çalışılacağı zamana kadar burada bekletildi.
  - Boyama yapılacağı zaman +4 °C'den çıkarılan plakalardan fiksatifi uzaklaştırabilmek için üç kez 5'er dk PBS ile yıkandı.
  - Antikoru permeabilizasyonunu sağlamak için örneklerin üzerine %1'lik PBS-Tween-20 çözeltisi eklenerek 10 dk beklendi.
  - Çözelti yeniden PBS ile yıkandı.
  - Bloklama için %1'lik bovine serum albümin (BSA), PBS'te hazırlanarak örneklerle 30 dk inkübe edildi.
  - İşaretleme için farklı boya kokteylleri hazırlandı. Antikor konsantrasyonu 1:100 olarak dilüe edildi. Her kuyuya 100  $\mu$ l primer antikor karışımı eklendi.
  - Örnekler primer antikorlarla bir gece +4°C buzdolabında bekletildi.
  - Ertesi gün oda ısısında 2 saat bekletilen örnekler 3 kez PBS ile yıkandı. Bundan sonraki işlemler karanlıkta gerçekleştirildi.
  - Örneklerin üzerine ilgili sekonder antikor eklendi ve 30 dk beklendi.
  - Örnekler PBS ile son kez yıkandı.
  - PBS çekilerek çekirdek boyası olarak DAPI (Fluoroshield™) eklenerek boyama tamamlandı.
  - Boyanan örnekler Zeiss Axio Observer.Z1 floresan mikroskopta görüntülendi.
1. Boya kokteyli: N-cadherin-tavşan + Nestin; proliferasyonu en iyi seçili 4 kuyu çalışmak için her bir boyadan 4  $\mu$ l alınarak 392  $\mu$ l Antibody Diluent Reagent Solution içerisine konulur. Her kuyuya 100  $\mu$ l düşecek şekilde hesaplandığından total hacim 400  $\mu$ l olur.

2. Boya kokteyli:  $\beta$ -III Tubulin +  $\alpha$ -SMA; aynı şekilde total hacim 400  $\mu$ l olacak şekilde boyalardan 4'er  $\mu$ l Antibody Diluent Reagent Solution'dan 392  $\mu$ l eklendi.

### **3.2.16 WJ-MKH'lerinin Bioinklerin Üzerinde Sferoid Form Oluşturulması ve Kombinasyon Terapisi ile Sinir Hücrelerine Farklılaşmasının İncelenmesi**

Bu aşamada 6'lık plakalara basımı gerçekleştirilmiş bioink grupları üzerine yaklaşık yaklaşık 250 bin WJ-MKH'leri ekilerek 24 saat sonra sferoid oluşumları gözlemlendi. Daha sonra, kuyucuk başına 2 ml olacak şekilde nörojenik farklılaşma ortamı (Promocell Neurogenic Differentiation Medium) eklendi ve 2 günde bir yenilendi. Kombinasyon terapisi yapılan gruplara 10  $\mu$ l eksozom da farklılaşma solüsyonu ile birlikte eklendi. Nöral farklılaşmanın indüklenmesi için hücreler 7 gün boyunca takip edildi. 7. Günde gruplardan birer kuyu içindeki sferoidler başka plakaya aktarılarak immün boyama için kullanıldı.

Sferoidler çapraz bağlı hidrojellerle yarı adezyon sağlayan bir şekilde birliktelik halindedirler. İmmün boyamanın yapılabilmesi için sferoidleri belirli bir yüzeye sabitleme gerekmektedir. Parafine gömmek veya doku kesiti almak yerine daha kolay bir yöntemle, küre formlarını bozmadan, toplanıp yeni plakalara ekilip 1 gün inkübasyona bırakılarak boyama aşamasına geçilebilmektedir. Bunun için 7. Gün sonunda önce yeni bir 48'lik plaka 20 mL önceden otoklavlanmış %0.1 jelatin solüsyonu ile kaplandı ve en az 10 dakika inkübasyonda bekletildi. Burada, jelatin ile kaplama nedeni, jelatinin hafifçe şişerek toplanan sferoidlerin bağlanması için daha uygun bir ortam oluşturmasına olanak tanır [112].

Kuyucuklarda yer alan sferoidlerin yapısını bozmadan besiyeri ya da PBS ile yıkayarak toplandı ve jelatin kaplı inkübe edilmiş plakaya ekildi. Üzerine taze besiyeri koyularak 24 saat boyunca inkübe edildi. Sferoidleri sayarak dağıtmak oldukça zor olduğundan, tek bir tüpte tüm kuyular toplanmış ve toplam hacim kuyulara eşit olarak dağıtılmıştır.

Daha sonra sferoidlerin immün boyama aşamasına geçilmiştir. Bu aşamalar aşağıda maddelendirilmiştir:

- Medyum ortamdan yavaşça çekilmiş ve sferoidler üstte olduğundan dolayı hücreleri toplayabilmek için PBS ile yavaşça yıkanmıştır.
- 2 saat boyunca %4 paraformaldehitte sabitlenmiştir.
- Numuneler tekrar PBS ile yıkanmış ve 30 dakika boyunca yaklaşık 10 mL %2 BSA ve %0.1 TritonX ile bloke edilmiştir. Daha sonra PBS 3x ile yıkanmıştır.
- Seçilen primer antikorları (N-Cadherine-tavşan ve  $\beta$ -III tubulin-fare) 1:100 oranında antikor seyreltici reaktif solüsyonu ile seyreltilmiştir. Numunelerin her birine 100  $\mu$ L antikor çözeltisi eklemiş ve gece boyunca 4 °C'de inkübe edilmiştir.
- Numuneler PBS ile 3x yıkanmıştır.  $\beta$ -III Tubulin için Anti-fare IgG-FTIC-tavşan, oda sıcaklığında 30 dakika boyunca 1:200'e seyreltilmiş N-Cad için Anti-fare IgG-SC2781-keçi ikincil antikorunu ile inkübe edilmiştir. Tüm işlemler karanlıkta gerçekleştirilmiştir. Burada önemli bir nokta, çift boyamalarda birincil antikor olarak hangi tür (örneğin fare) kullanılırsa kullanılsın, ikincil antikor için farklı bir suş (örneğin keçi veya tavşan) kullanılmalıdır.
- Tekli boyamada Sox2 (keçi) ve  $\beta$ -tubulin (fare) antikorları 1:100 sulandırılarak hazırlanmıştır. Sox için anti-goat FTIC (yeşil);  $\beta$ -III tubulin için ise anti-mouse FITC (yeşil) sekonder antikor kullanılmıştır.
- İkincil antikor PBS 3x ile yıkanmış ve ardından DAPI solüsyonu(1:1) numunelerin her birine damlatılmıştır. 15-20 dk beklendikten sonra kuyulardaki ikili ve tekli boyamalar Zeiss floresans mikroskobu ile fotoğrafları çekildi.

### 3.2.17 Gen Ekspresyon Seviyesinde Sinir Farklılaşmasının Karakterizasyonu

7. Gün örneklerinden 1'er kuyu ayrılarak RNA izolasyonuna gidildi. Kit (Zymogen RNA) ile gerçekleştirilen RNA izolasyonu sonrası cDNA'ya (Bioline) çevrim sağlandı ve -80°C'ye örnekler koyuldu.

Tüm RNA izolasyon aşamaları oda sıcaklığında steril kabin içerisinde gerçekleştirildi. 3B'lu ortamdan PBS ile yüzeyden toplanan sferoidler yeni bir

plakaya alınıp 24 saat adezyonu beklendi. TrypLE™ Express enzimi ile ortamdan daha az zararla kaldırılan hücreler 1500 rpm'de 5 dk çevrildi ve pellet oluşturuldu. Ayrıca tüm 2B'lu hücreler de aynı enzimle kaldırılıp santrifüj edildi. RNA izolasyonu aşağıdaki protokole göre gerçekleştirildi:

- Hücre içeriği ( $\leq 5 \times 10^6$  hücre içeriği-  $\geq 300 \mu\text{l}$ ) üzerine RNA lizis solüsyonu eklenerek iyice süspanse edildi ve sarı filtreli kit özel ependorf kolonuna alındı.
- Daha sonra 500 x g'de 1 dk çevrilen tüpün içinde kalan hücre içeriğinin üzerine %95'lik etanol 1:1 oranında eklendi ve iyice karıştırıldı.
- Karışım yeşil filtreli özel ependorf kolonuna alınarak tekrar santrifüj edildi. Süpernatant atılarak yeşil filtreli kolonla yeni bir ependorfa koyuldu ve üzerine yaklaşık 400  $\mu\text{l}$  "RNA Yıkama Tamponu" eklendi ve tekrar santrifüj edildi. Süpernatant atılarak tekrar yeşil filtreli kolon temiz bir ependorfa alındı.
- Alınan ependorf nükleazdan yoksun olan özel tüplerdir. Kolona 75  $\mu\text{l}$  "DNA Sindirim Tamponu" ve 5  $\mu\text{l}$  DNAaz I eklendi.
- Daha sonra kolon oda sıcaklığında 15 dk bekletildi.
- Ardından 400  $\mu\text{l}$  "RNA Hazırlık Tamponu" kolona eklendi ve santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.
- 700  $\mu\text{l}$  "RNA Yıkama Tamponu" kolona eklendi ve santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.
- Tekrar 400  $\mu\text{l}$  "RNA Yıkama Tamponu" kolona eklendi ve 1 dk boyunca santrifüj edildi.
- Kolonu nükleaz içermeyen bir tüpe aktardıktan sonra 100  $\mu\text{l}$  "DNAaz/RNAaz İçermeyen Su" ile direkt kolon matrisine eklendi v santrifüj edildi.

Böylelikle elde edilen RNA örneği nükleaz içermeyen tüpe son santrifüjle aktarılmış oldu. RNA örneği elde edildikten sonra soğuk ortama çabuk geçilmesi gerekir. -80 °C'de cDNA'ya çevrilene kadar yaklaşık 1 ay bekletilebilir. Ancak en yüksek verimi elde etmek için işlemlerin art arda yapılması önemlidir. Bunun için öncelikle elimizde olan örneklerin Nanodrop ile ölçümü alındı. Nanodrop ile

ölçüm alınırken program RNA'ya ayarlandı. Daha sonra ölçüm yerine önce DNAaz/RNAaz içermeyen RNA izolasyonunda da kullandığımız solüsyondan 1  $\mu$ l koyulup körü alındı. Sistem sıfırandıktan sonra buz içerisindeki RNA örneklerinden sırasıyla birer  $\mu$ l eklenerek ölçüm yapıldı. Her örnek sonrası ölçüm yeri kuru bir bezle silindi.

Daha sonra cDNA'ya çevirme aşamasına geçildi. Bunun için kullanılan kite göre önce DNAaz/RNAaz içermeyen su, sonra 5X tampon çözelti, sonra ölçümü alınmış ve ona göre hesaplanmış RNA, en son ise Revers Transkriptaz enzimi soğuk ortamda buz içerisinde eklenir. Buna göre örneklerin cDNA'ya çevrilmeden önceki hesaplamaları aşağıdaki Tablo 3.3'de verilmiştir:

**Tablo 3.3** Örneklerin cDNA'ya çevirme aşamasındaki hesaplar

NK	PK	Grafink	Baseink
RNA: 4,8 $\mu$ l	RNA: 2,9 $\mu$ l	RNA: 5,5 $\mu$ l	RNA: 3,5 $\mu$ l
5XTampon: 4 $\mu$ l	5XTampon: 4 $\mu$ l	5XTampon: 4 $\mu$ l	5XTampon: 4 $\mu$ l
RT enzimi: 1 $\mu$ l	RT enzimi: 1 $\mu$ l	RT enzimi: 1 $\mu$ l	RT enzimi: 1 $\mu$ l
DNAaz/RNAaz Su: 10,2 $\mu$ l	DNAaz/RNAaz Su: 12,1 $\mu$ l	DNAaz/RNAaz Su: 9,5 $\mu$ l	DNAaz/RNAaz Su: 11,5 $\mu$ l
Total hacim 20 $\mu$ l	Total hacim 20 $\mu$ l	Total hacim 20 $\mu$ l	Total hacim 20 $\mu$ l

Örnekler total hacim 20  $\mu$ l olacak şekilde hazırlandıktan sonra spin cihazı ile döndürülerek Termocycle cihazına yüklenir. Programdaki akış aşağıdaki gibidir:

- 25 °C'de 10 dk,
- 42 °C'de 15 dk,
- 48 °C'de 15 dk,
- 85 °C'de 5 dk,
- 4 °C'de alınana kadar durabilecek şekilde programlandı. Yaklaşık 45 dk sonra örnekler alınarak -20 °C'ye kaldırıldı.

Daha sonra Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time PCR; RT-PCR) aşamasına geçildi. Gen ekspresyon analizi için housekeeping gen olarak

GAPDH, karşılaştırılacak genler olarak da NESTİN, Sox2, Tubulin 3'e ait revers ve forward primerleri toplam karışım için hesaplandı (Tablo 3.4).

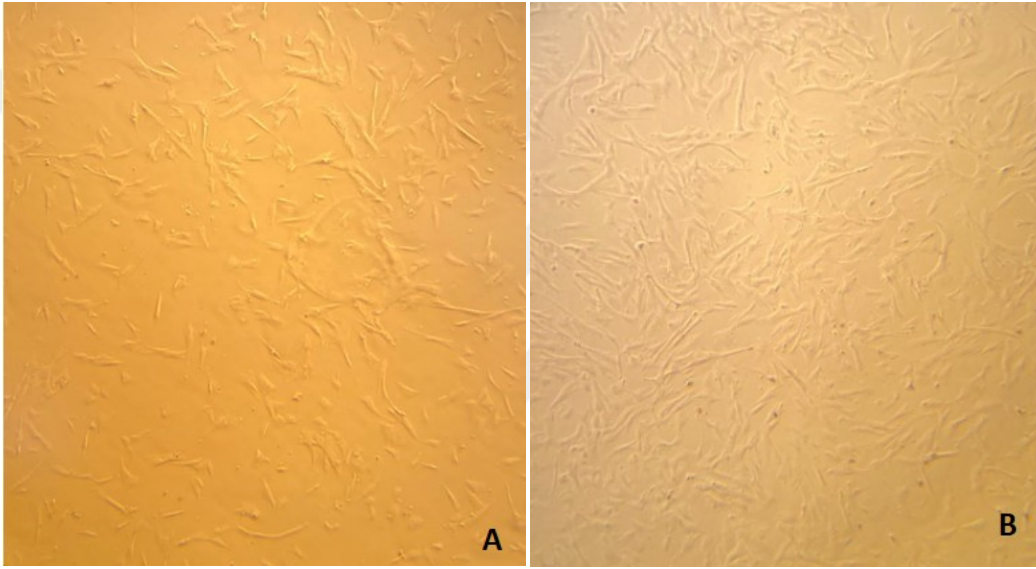
**Tablo 3.4** RT-PCR hesaplamaları

	1 Örnek için	Tüm örnekler için 'Toplam Karışım'	+Hazırlanan 'Toplam Karışım'
<b>SYBR Green</b>	10 $\mu$ l	90 $\mu$ l	100 $\mu$ l
<b>Revers-Forward</b>	0.8 $\mu$ l- 0.8 $\mu$ l	7.2 $\mu$ l- 7.2 $\mu$ l	8 $\mu$ l
<b>H<sub>2</sub>O</b>	7.4 $\mu$ l	66.6 $\mu$ l	74 $\mu$ l
<b>Toplam</b>		171,4 $\mu$ l	190 $\mu$ l

190  $\mu$ l hazırlanan toplam karışımdan her bir stripte 19  $\mu$ l koyuldu. Üzerine her bir örneğin cDNA'sından 1  $\mu$ l eklendi. Tüm deney buz küveti içinde gerçekleştirildi. 4 Örnek için 2 tekrar yapılarak 8 toplam örnek sayısı X 4 gen sayısından 36 kuyu çalışıldı. Her stripte son kuyu negatif kontrol olarak çalışılmış ve cDNA eklenmedi.

#### 4.1 Wj-MKH'den Ultrasantrifüj Yöntemi ile Üretilen Eksozomların Karakterizasyonu

Pasaj 3'te kültürüne başlanan WJ-MKH'lerinin kriyoprezervasyon sonrası ve eksozom eldesi için serumsuz besiyerine geçiş öncesi görüntüleri Şekil.4.1'de verilmiştir.

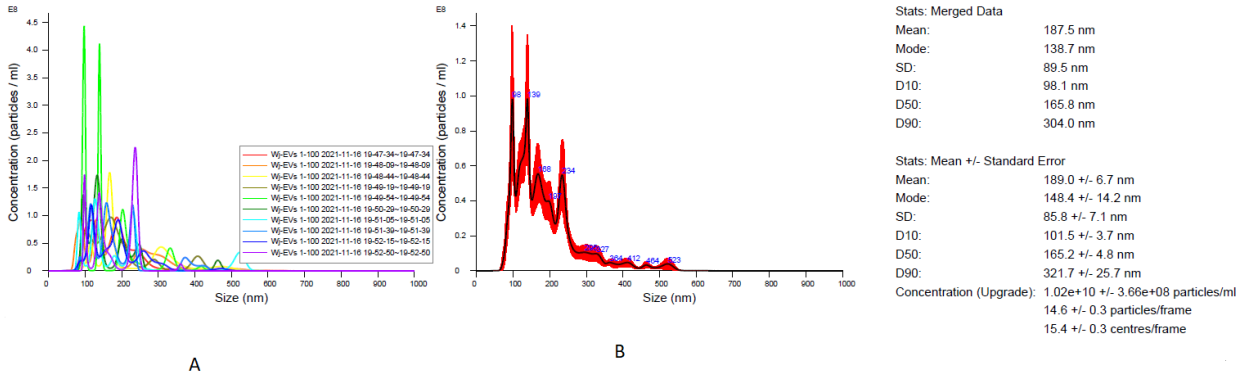


**Şekil 4.1** Wharton Jeli Kaynaklı MKH görüntüleri (10X).; (A) Pasaj 3 görüntüsü, (B) Serumsuz besiyerine geçiş öncesi %80 üzerinde MKH'lerin yüzeyi kaplama görüntüsü

##### 4.1.1 NTA Analizi ile Eksozom Karakterizasyonu

WJ-MKH'lerden elde edilen ve ultrasantrifüj yöntemi ile üretilen eksozomlardan 10  $\mu$ l alınarak 100 kat PBS seyreltilmiş ve NTA cihazına enjektör ile aktarılmıştır. Buna göre Şekil 4.2'deki grafikler ve sonuçlar elde edilmiştir.





**Şekil 4.2** NTA ile eksozom karakterizasyonu sonuçları

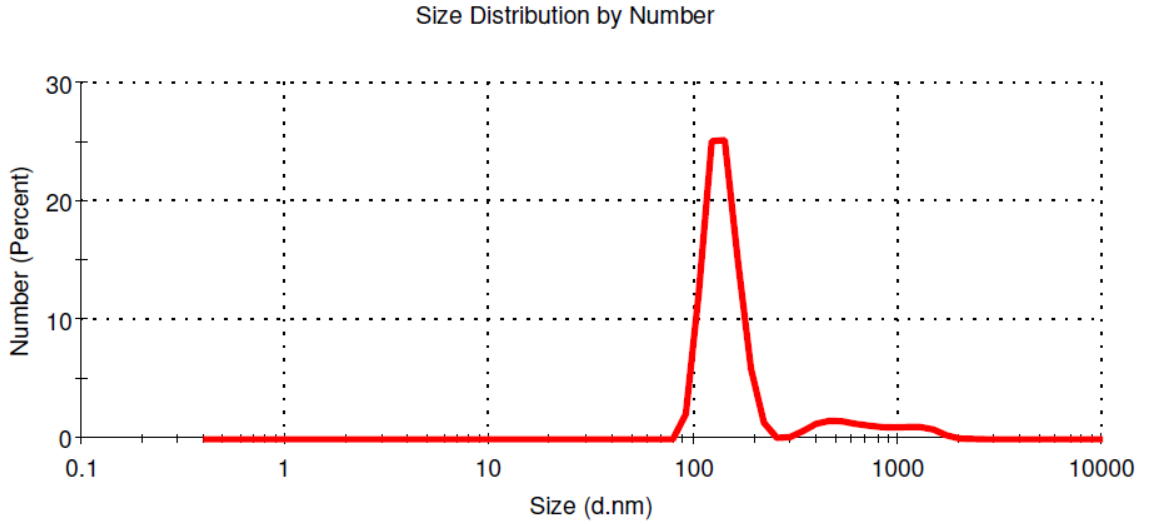
Bu sonuçlara göre 1 ml PBS içerisinde yer alan eksozom miktarı yaklaşık  $10^9$  tanecik/ml olarak hesaplanmıştır. Ayrıca eksozomların ortalama boyutu 98 nm civarında çıkmıştır. Eksozom dağılımına bakıldığında eksozom boyutunun homojenliğe yakın bir oranda olduğu görülmüş ve eksozomların hareketlerini gösteren videolar çekilmiştir. Bu videolardan çekilen fotoğrafın yer aldığı görüntü Şekil 4.3' de yer almaktadır.



**Şekil 4.3** Wharton-Jeli'den elde edilen kök hücrelerden üretilen eksozomların NTA görüntüsü

#### 4.1.2 Zeta Potansiyel Ölçümü ile Eksozom Karakterizasyonu

20  $\mu$ l eksozom örneği 980  $\mu$ l PBS ile seyreltilerek ölçüm yapılmıştır. Buna göre Şekil 4.4'te Zeta-Sizer ölçüm sonuçları verilmiştir.



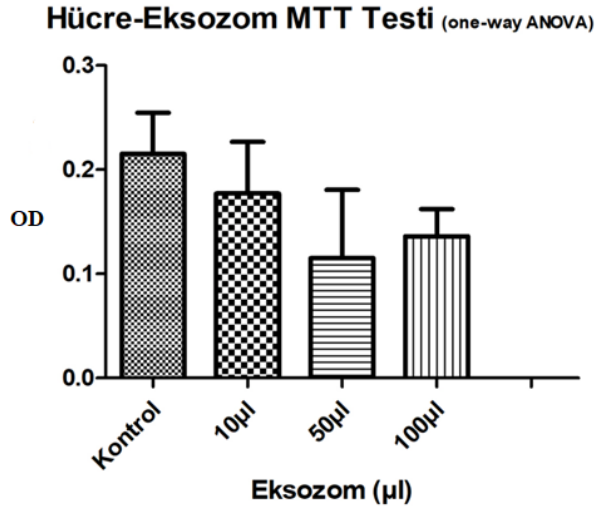
**Şekil 4.4** Zeta-Sizer'da eksozomların karakterizasyonu

Buna ölçüme göre eksozom boyutları 100 nm civarında çıkmış olup, NTA analizi ile birbirini doğrulamaktadır. Ayrıca zeta-potensiyel ölçümü ( $-15.7\text{mV} \pm 1.1$ ) olarak hesaplanmıştır.

Karakterize edilen eksozomlardan  $300 \times 10^6 / 5$  ml olacak şekilde örnekler hazırlanmış ve deneylerde kullanılana kadar  $-20^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir. Fazla üretilen eksozomlar ise ependorflara bölünerek  $-80^\circ\text{C}$ 'ye kaldırılmıştır.

#### **4.1.3 Eksozomların Fibroblast ve WJ-MKH'leri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin İncelenmesi**

$300 \times 10^6 / 5$  ml olan stok eksozom örneğinden farklı oranlarda seyreltmeler yapılarak fibroblast hücreleri üzerindeki toksik etki MTT yöntemi ile incelenmiştir. Buna göre hücreler üzerinde % canlılık oranları One-Way ANOVA Tukey testi ile istatistiki olarak incelenmiş ve Şekil 'deki grafik elde edilmiştir.



**Şekil 4.5** Eksozomların hücreler üzerindeki sitotoksik etkisinin MTT yöntemi ile incelenmesi grafiği; Buna göre kontrol grubu ile 10, 50, 100 µl eksozom grupları arasında istatistiki olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır

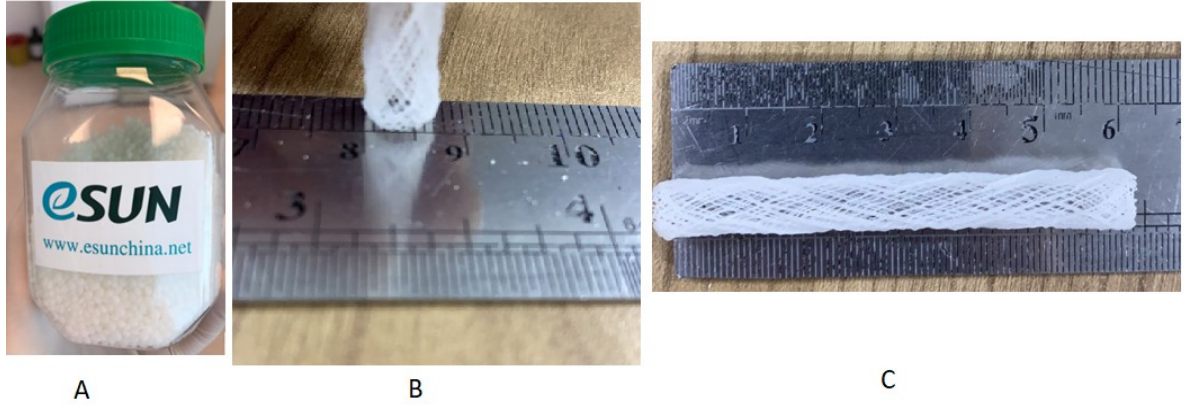
Sonraki biyomalzeme çalışmaları için 10 µl konsantrasyon oranı eksozom seçilerek çalışmalara devam edilmiştir. 5 ml'de  $3 \times 10^8$  tanecik içeren stok solüsyondan 10 µl alındığında 600.000 eksozom tanecik alınmıştır. Literatürde biyomalzeme içeriğine genellikle 10 µg eksozom/10 ml [113] eksozomların µl'de ne kadar tanecik içerdiği verilmemektedir. Bu da ml başına düşen eksozom tanecik sayısının bilinmediği için µg açısından belli bir standardizasyonun izlenmediğini göstermektedir. Ancak bu çalışmada kullanılan NTA analizi ile tanecik/ µl oranı hesaplanarak üretilen dokudaki hücrelerin ne kadar eksozoma maruz bırakıldığı tam olarak belirlenmiştir. Bu da eksozoman çalışmalarda literatüre tanecik hesabı açısından farklı bir boyut kattığını göstermektedir.

## 4.2. Biyomalzemelerin Üretimi

### 4.2.1 Eriyik Elektro-Yazma Yöntemi ile PCL Sinir Kanalının Üretimi

Eriyik Elektro-Yazma yöntemi ile üretilen PCL nöral kanalının en iyi çözünürlüğü, döner kollektör üzerinde 7 mm mesafeden 50 mm/s basınç hızında 9 Psi basınç aralığında ve 3 kV voltajda elde edilmiştir. Eriyik Elektro-Yazma olarak da adlandırılan bu yöntem ile üretilen PCL iskele, Şekil 4.6'daki gibi 6 cm boyunda- 3mm çapında sinir kondüiti şekilde üretilmiştir. Sık dokunmuş ama

gözenekli bir yapıya sahiptir. Bu da içine 3B biyoyazıcı ile basılacak olan aljinat-jelatin tabanlı grafen içeren bioinkin mukavemetini yükseltici aynı zamanda da doku entegrasyonuna izin veren bir yapı halindedir.

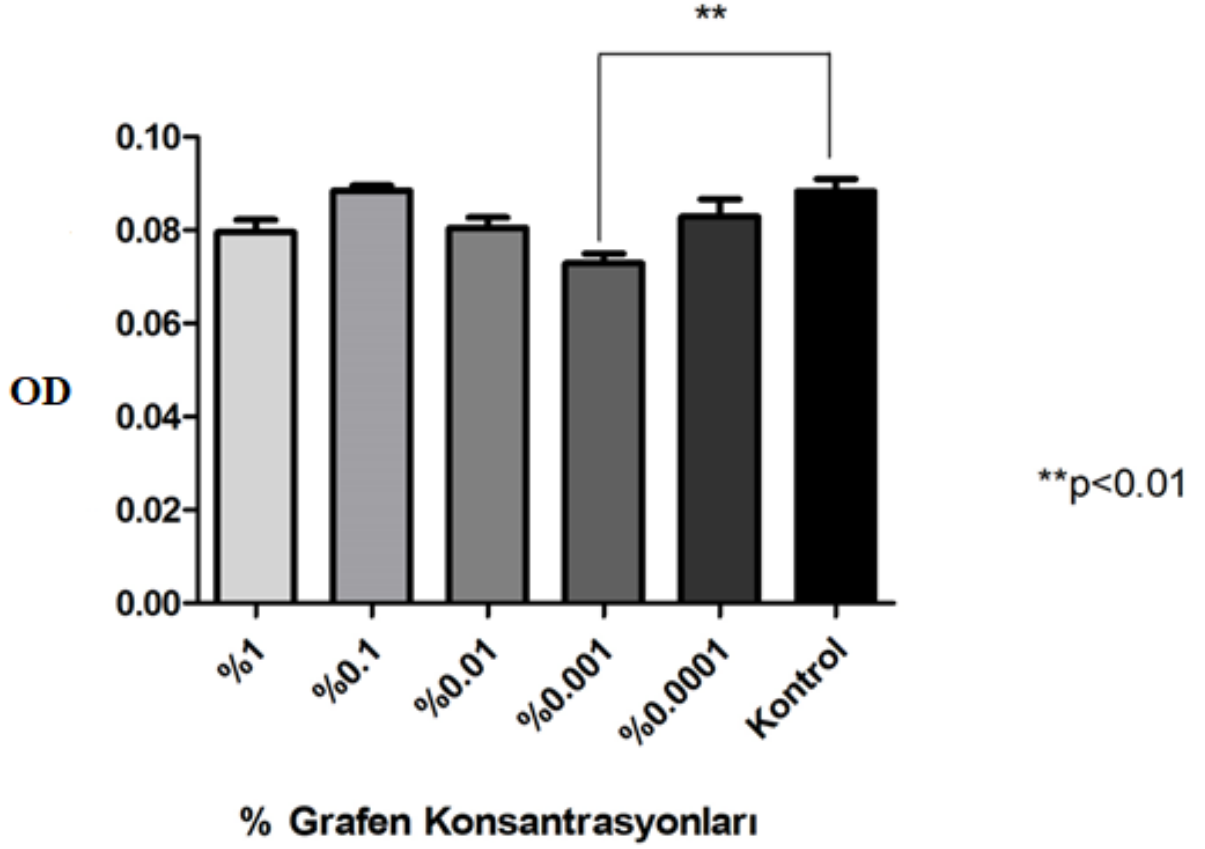


**Şekil 4.6** Eriyik Elektro-Yazma yöntemi ile üretilmiş PCL nöral kanal

#### 4.2.2. Grafenin WJ-MKH'leri Üzerinde Toksik Olmayan Konsantrasyonunun MTT Yöntemi ile Belirlenmesi ve “Dikişleme” Yöntemi ile Görüntülenmesi

WJ-MKH'leri farklı konsantrasyonlarda hazırlanan % grafen oranları ile kültüre edilmiş ve bu konsantrasyonların hücrelerin proliferasyonuna etkisi MTT yöntemi ile belirlenmiştir. Çıkan sonuçların istatistiği için GraphPad Prism One-Way ANOVA Tukey testi yapılmıştır. Hata çubukları standart sapmayı temsil eder. Buna göre aşağıdaki Şekil 4.7 'de yer alan grafik elde edilmiştir.

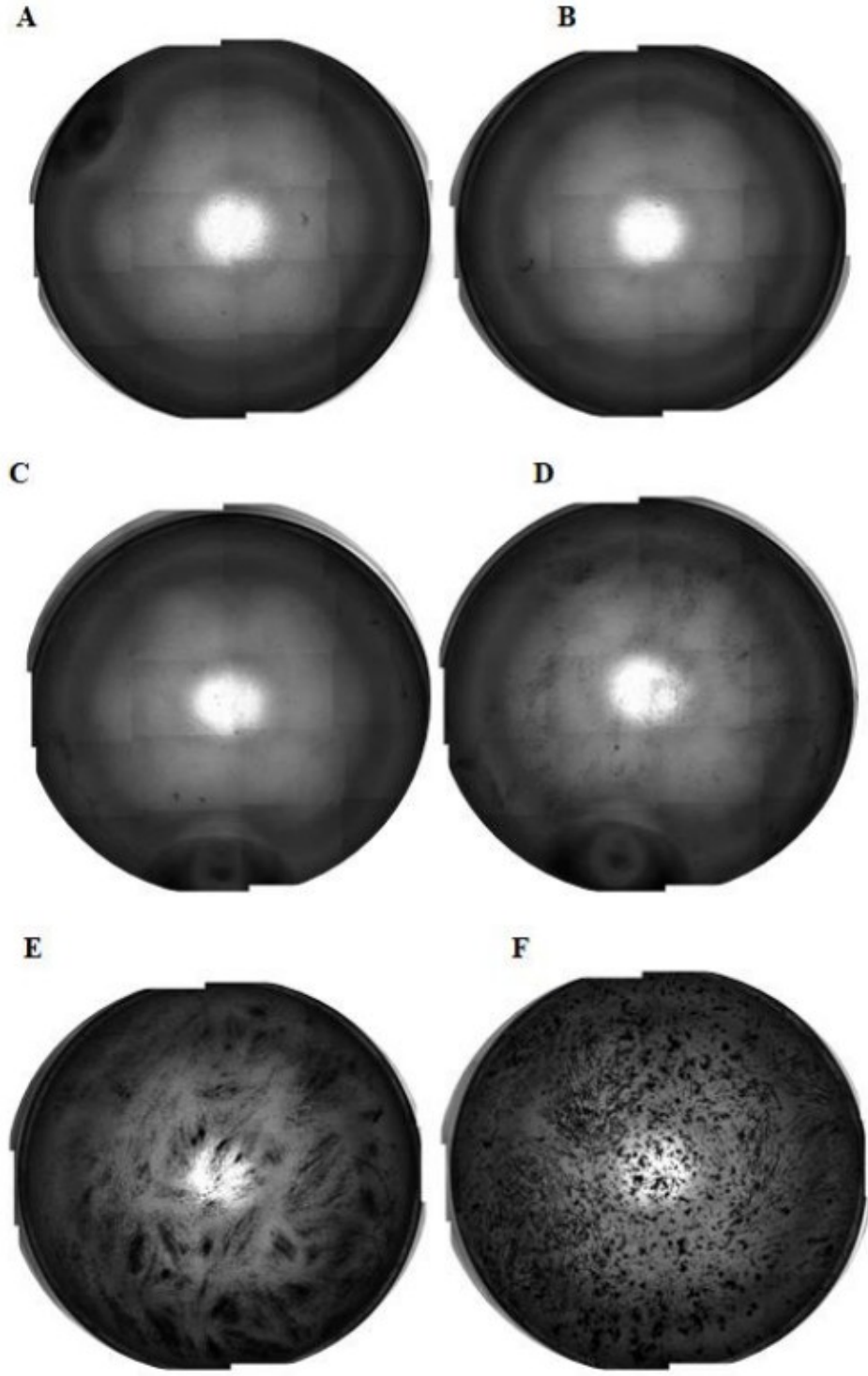
## Grafen Toksikite Testi



**Şekil 4.7** % grafen konsantrasyonlarının WJ-MKH'leri üzerindeki proliferasyon etkisinin incelenmesi

Buna göre kontrol ile sadece %0.001 grafen konsantrasyonu arasında anlamlı bir azalma (\*\*p<0.01; n=6) bulunmuş; diğer gruplar ile istatistiki olarak anlamlı bir etki bulunamamıştır (p>0.05; n=6).

MTT sonuçları sonrası farklı grafen oranlarının WJ-MKH'ler ile etkileşimi "Stitch Imaging" adı verilen dikişleme tekniği ile Time-Lapse aracılığıyla çekilmiştir (Şekil 4.8).

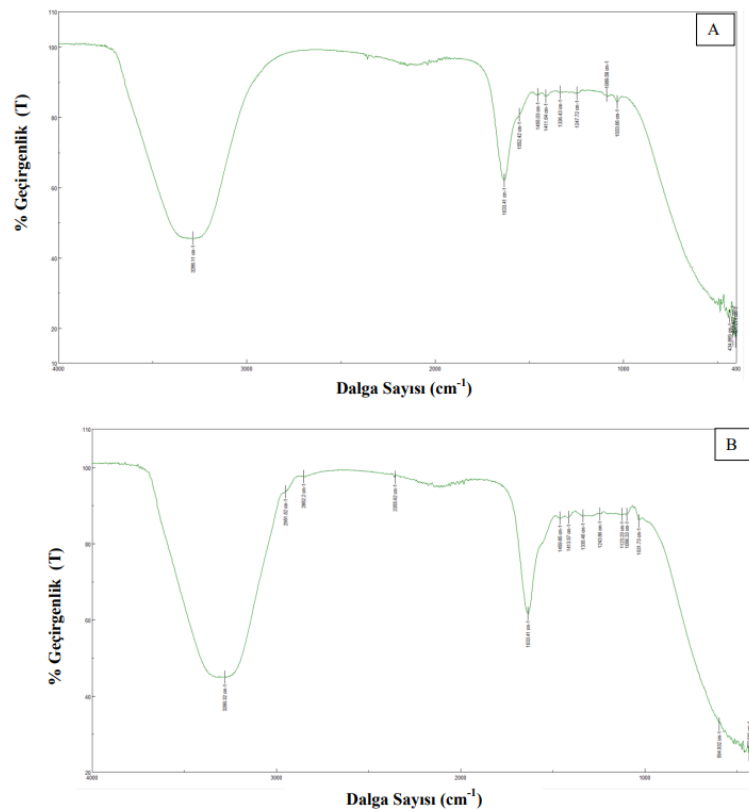


**Şekil 4.8** “Dikişleme” ile Time-Lapse’te HD kalitede 4x5 çoklu fotoğrafın birleştirilmesiyle elde edilmiştir; A.Kontrol, B.%0.0001, C. %0.001, D. %0.01, E. %0.1, F.%1 grafen konsantrasyonu

MTT ve dikişleme tekniği ile çekilen görüntülerin sonuçları bize göstermektedir ki; 2B kültürde hücreler grafenin yüksek konsantrasyonlarını bile tolere eder ve hücre canlılığını korumayı sürdürür. Ayrıca hücreler grafen parçacıklarını endositozla hücre içine almışlardır. Hücre içindeki grafen parçacıklarının sitoplazma boyunca hareket ettiği gözlemlenmiştir. Biyomalzeme çalışmalarına MTT ve görüntüler dikkate alınarak %0.1 grafen konsantrasyonu ile devam edilmiştir.

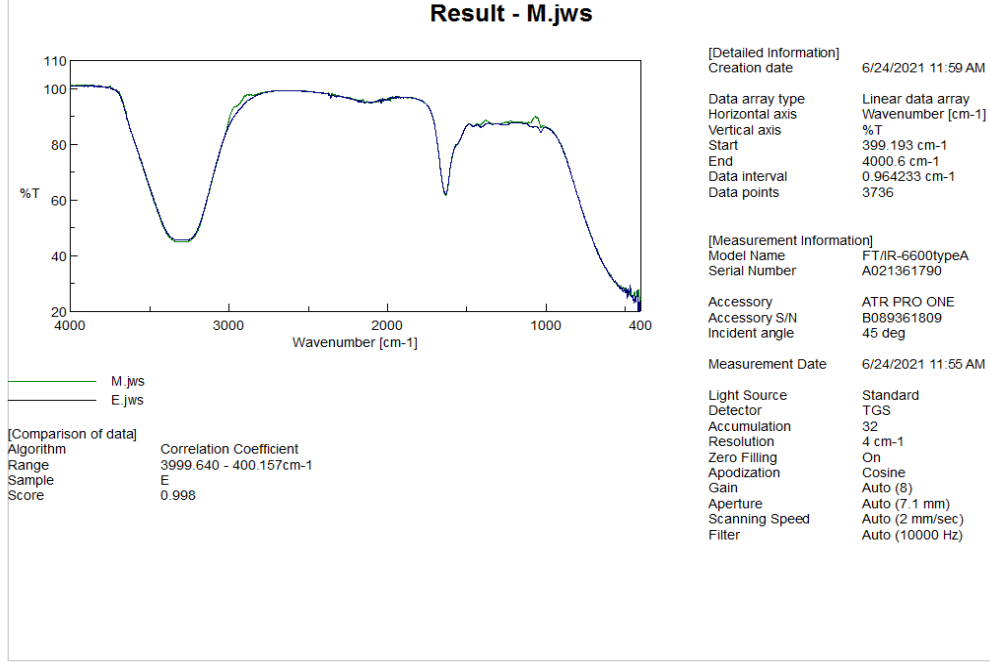
#### 4.2.3 'Baseink™' - Grafink Bioinklerinin FTIR ile Karakterizasyonu

Arel Üniversitesi POTKAM Araştırma Merkezi'nde hem 'Baseink™' hem de Grafink 'Baseink™' bioinklerinin hücresiz formlarının FTIR karakterizasyonu yapılmış ve her iki bioink içeriği kimyasal açıdan karşılaştırılmıştır. Bu analiz verilerine göre aşağıdaki Şekil 4.9'da verilen grafikler elde edilmiştir.



Şekil 4.9 'Baseink™' ve Grafink FTIR ölçümleri; (A) Baseink™ bioink; (B) Grafink bioink

Literatürde aljinat/jelatin bazlı hidrojel çalışmalarında  $1633,41 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1552,42 \text{ cm}^{-1}$  ve  $1033 \text{ cm}^{-1}$  gibi pikler bulunmuştur [21]. Ayrıca  $1335,46 \text{ cm}^{-1}$  pik, grafen biyomalzeme çalışmalarında [114] görülen piklere benzerdir.



**Şekil 4.10** 'Baseink™' ve GrafınK Korelasyon Benzerlik Katsayısı Ölçümü

Bu analize göre, 'Baseink™' bioinkinin aljinat-jelatin tabanlı olması literatürde benzer çalışmalar ile karşılaştırıldığında en belirgin pikler O-H germe titreşimine karşılık gelen  $3300 \text{ cm}^{-1}$ 'de karakteristik bir tepe görünümüdür [21].  $1633.41 \text{ cm}^{-1}$  karboksilatın (COO) asimetrik gerilme titreşiminin karbonil (C=O) grubuna [115],  $1552.42 \text{ cm}^{-1}$ 'deki bant ise karakteristik zirve olarak aljinattaki COO grubunun negatif yükü ile jelatin içindeki bir amin grubunun (NH+) pozitif yükü arasındaki elektrostatik etkileşim yoluyla polielektrolit (CONH<sub>2</sub>) kompleksi oluşumuna atanmış ve benzer olan iki farklı çalışmada sırasıyla  $1637$  [115], ve  $1560 \text{ cm}^{-1}$  'de [21] bant görülmüştür. Diğer görülen  $1033 \text{ cm}^{-1}$  civarındaki pik ise aljinat-jelatin bioinkinin guluronik birimlerinin CO grubu C-O grubu ile ilgili olduğu ve benzer çalışmada aynı pike rastlandığı görülmüştür [21].

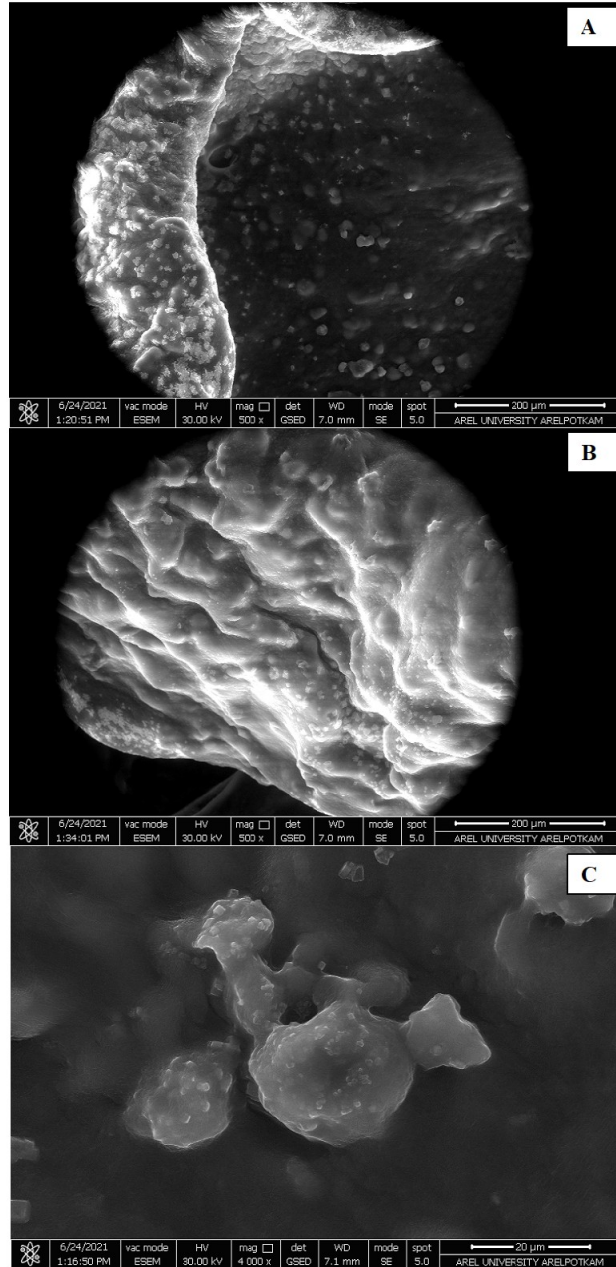
GrafınK bioinkinde ise farklı olarak görülen  $1335.46 \text{ cm}^{-1}$ 'deki pik literatürde yer alan bir çalışmada benzer olarak  $1399 \text{ cm}^{-1}$  'da görülmüştür [114].

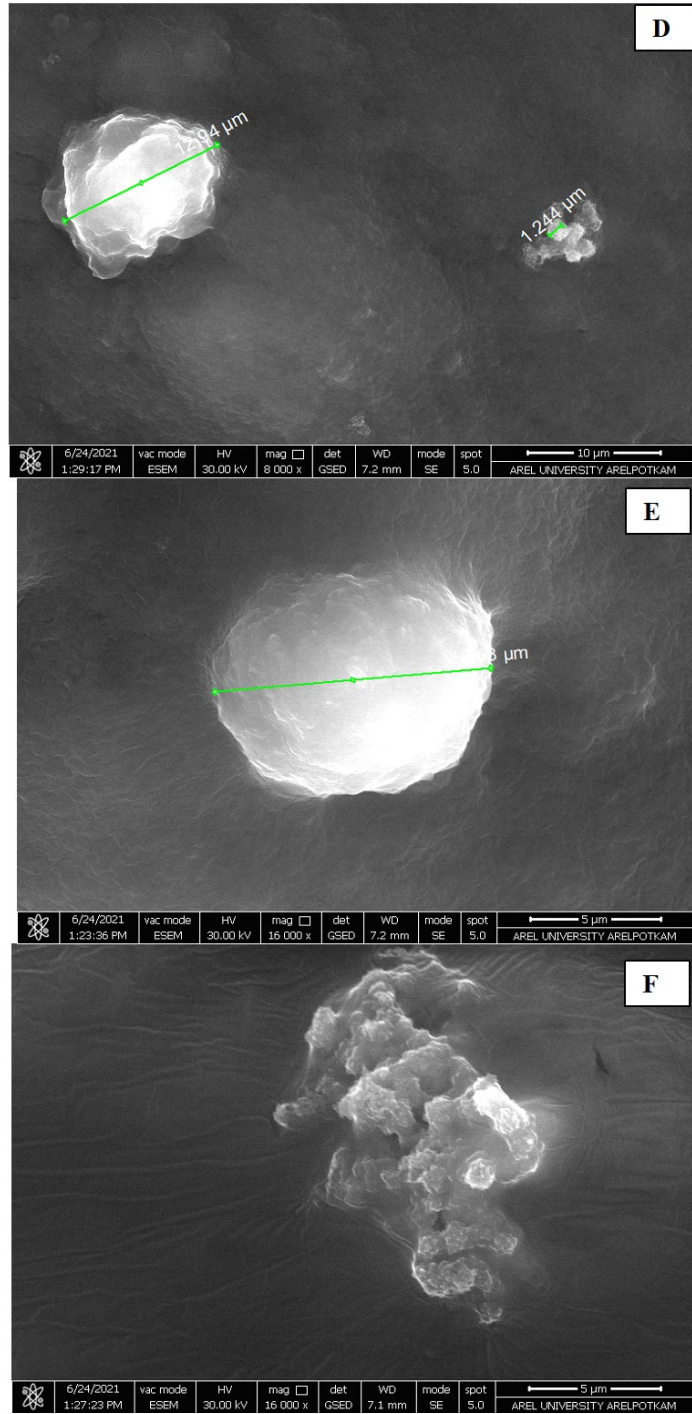


Her iki bioinke ait karşılaştırılmalı korelasyon katsayı grafiğine göre, aljinat-jelatin tabanlı bioinkin içeriğinin grafene oranla baskın olduğu, grafenin yoğunluğunun jel içerisinde düşük olduğu görülmektedir.

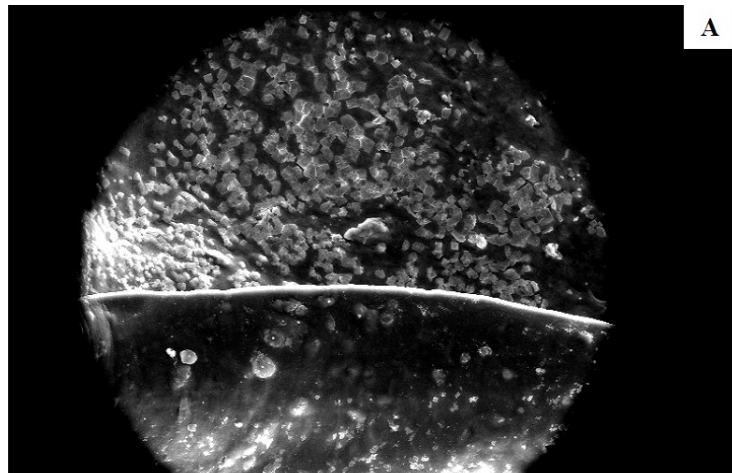
#### 4.2.4 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

'Baseink™' ve GrafınK'in SEM görüntüleri Şekil 4.11 ve Şekil 4.12 'de verilmiştir.

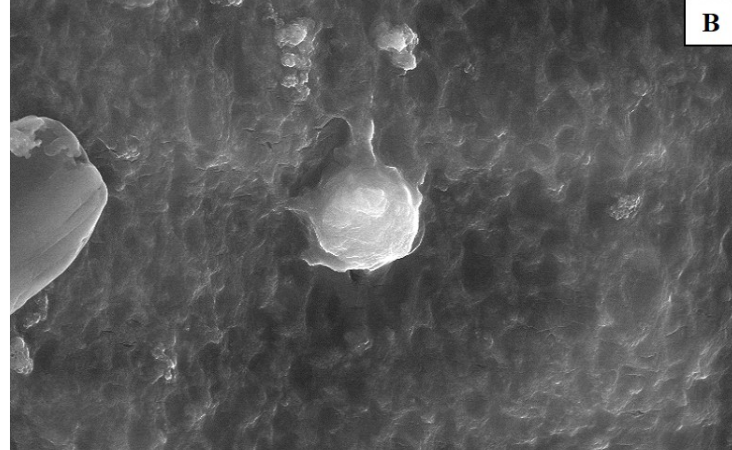




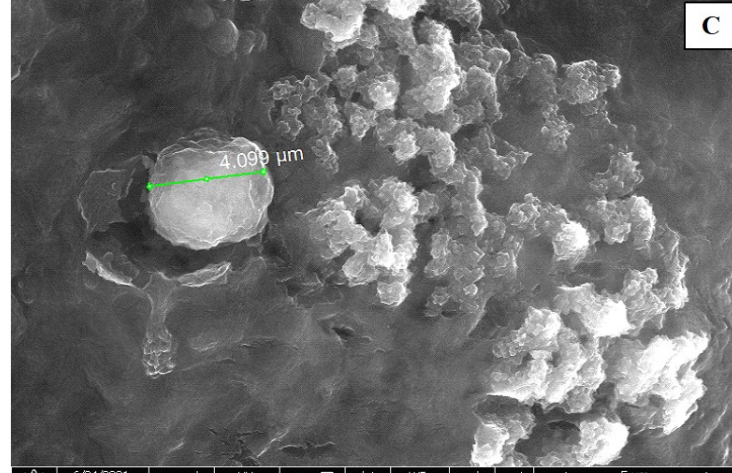
**Şekil 4.11** 'Baseink™' SEM görüntüleri; (A) 'Baseink™' iç ve dış yapısı birlikte görüntüsü (200μm); (B) Bioinkin dış girintili çıkıntılı yüzey yapısı yapısı (200 μm); (C) İç yüzeye bağlanmış bileşik hücre yapısı görüntüsü (20 μm); (D) İç yüzeyde ölçülmüş hücre yapısı (10 μm); (E) Bioink iç yüzeyine bağlanmış MKH görüntüsü (5 μm); (F) Hücre yığını görüntüsü (5 μm)



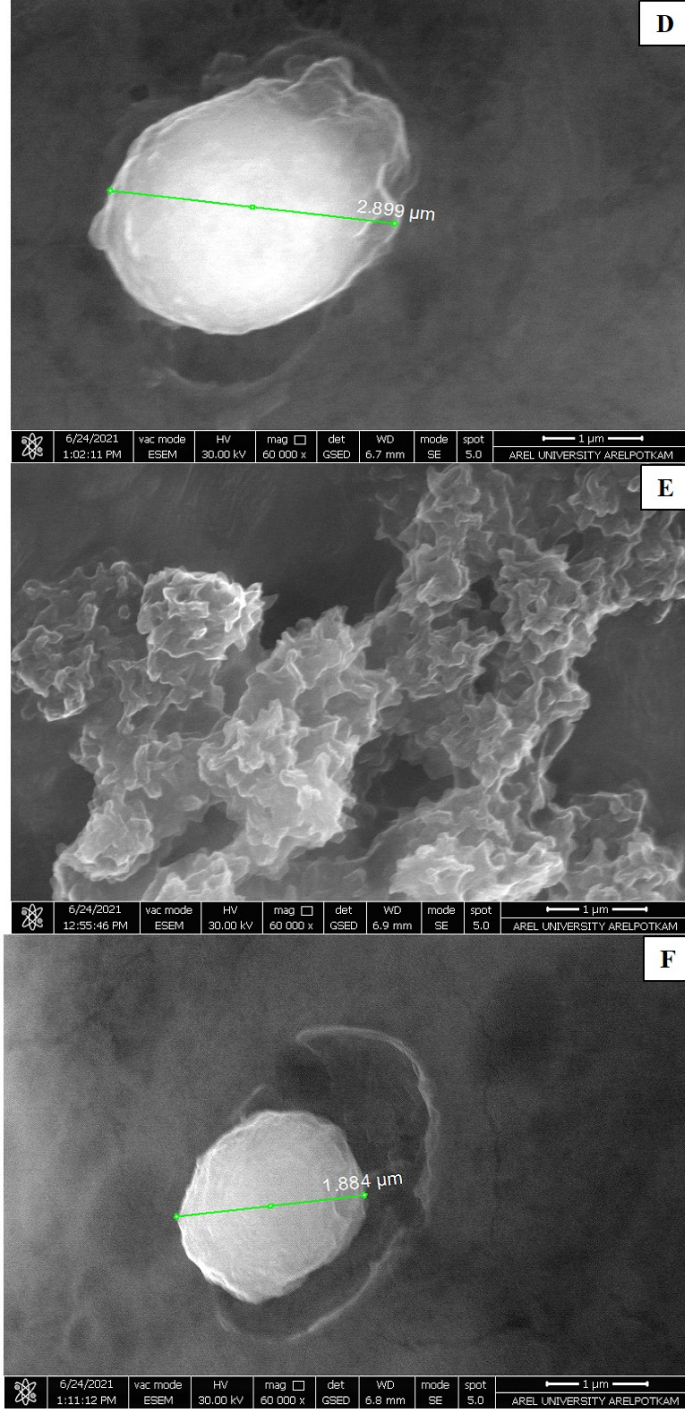
	6/24/2021 1:06:44 PM	vac mode ESEM	HV 30.00 kV	mag <input type="checkbox"/> 500 x	det GSED	WD 6.8 mm	mode SE	spot 5.0	200 μm	AREL UNIVERSITY ARELPOTKAM
--	-------------------------	------------------	----------------	---------------------------------------	-------------	--------------	------------	-------------	--------	----------------------------



	6/24/2021 12:58:42 PM	vac mode ESEM	HV 30.00 kV	mag <input type="checkbox"/> 6 000 x	det GSED	WD 6.8 mm	mode SE	spot 5.0	10 μm	AREL UNIVERSITY ARELPOTKAM
--	--------------------------	------------------	----------------	---	-------------	--------------	------------	-------------	-------	----------------------------



	6/24/2021 12:49:48 PM	vac mode ESEM	HV 30.00 kV	mag <input type="checkbox"/> 16 000 x	det GSED	WD 6.8 mm	mode SE	spot 5.0	5 μm	AREL UNIVERSITY ARELPOTKAM
--	--------------------------	------------------	----------------	--	-------------	--------------	------------	-------------	------	----------------------------



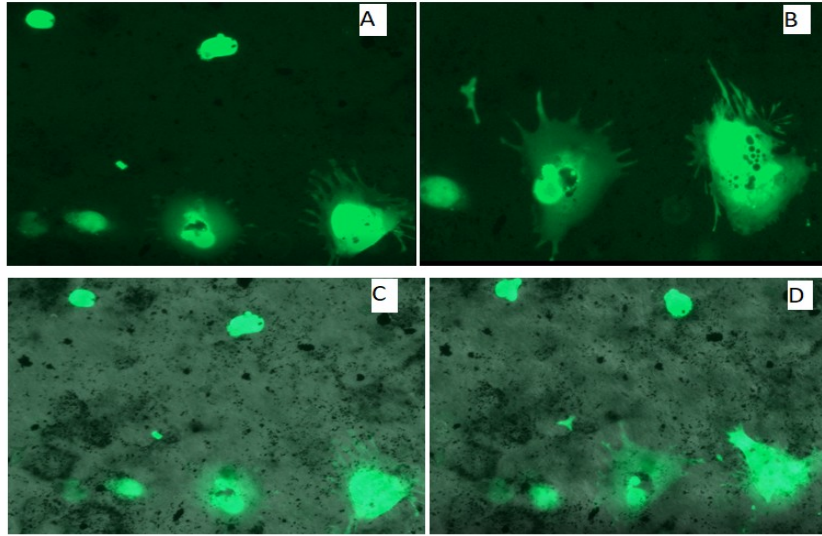
**Şekil 4.12** Grafink SEM görüntüleri, (A), İç ve dış yüzey kesit alanının birlikte görüntüsü (200 μm); (B), İç yüzey hücre-bioink adezyon görüntüsü (10 μm); (C), İç yüzeyindeki 4.099 μm ölçümünde hücre ve grafen parçacık yığınlarının birlikte görüntüsü (5 μm); (D), Bioink- hücre etkileşimi, hücre boyutu 2.899 μm olarak ölçülmüştür (1 μm) ; (E), Grafen parçacıklarının bioink içerisindeki tabakalaşmış görüntüsü (1 μm) ; (F), En küçük büyütmede bioink iç yüzeyde hücre etkileşimi, hücre boyutu 1.884 μm olarak ölçülmüştür (1 μm)

SEM sonuçlarından elde edilen sonuçlar aşağıda yer almaktadır:

- Bioink hücre etkileşimleri hem yüzeysel hem de iç kısımda gösterilmiştir. Her iki bioinkte de hücre biyomalzeme etkileşimi bulunmaktadır.
- Hücreler morfolojik olarak yuvarlak tiptedir.
- Şekil A'da yer alan Grafink bioinki iç ve dış yüzey görüntüsüne bakıldığında üst kısımda köşeli yapılar yer almaktadır. Bunlar tuz kristali olup SEM analizi öncesi daha çok PBS veya steril deiyonize su ile yıkanması gerektiği sonucuna varılmıştır. Şekil C ve E 'de özellikle yığınlar halinde görülen yapının literatürdeki çalışmalarla karşılaştırıldığında grafene ait olduğu tespit edilmiştir [114].

### 4.3 GFP İşaretli Mezenkimal Kök Hücrelerin Grafink Bioinki İçerisine Eklenmesi ve Time-Lapse Görüntülerinin Alınması

Transdüksiyon yöntemi ile GFP işaretlenmiş WJ-MKH'lerinin Grafink bioinki ile 40 sn boyunca etkileşimi Time-Lapse görüntüleme ile incelenmiştir (Şekil 4.13).



**Şekil 4.13** 40 sn'lik Time-Lapse Görüntüleme videosu içerisinde alınan fotoğraf örnekleri; (A) ve (C) , 8 sn'de farklı filtrelerde alınan görüntüler. (B) ve (D) 38. sn'de alınan görüntüler; Buna göre Şekil (A) ve (B) 'de hücrelerin Grafink içerisinde yönelimi ve sağkalımı görülmektedir; Şekil (C)ve (D)'deki örneklerde grafen parçacıkları seçilebilir durumdadır ve hücrelerle grafen parçacıklarının etkileşimi gerçekleşmektedir

Time-Lapse 3B GFP işaretli WJ-MKH- Bioink etkileşiminden elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibidir:

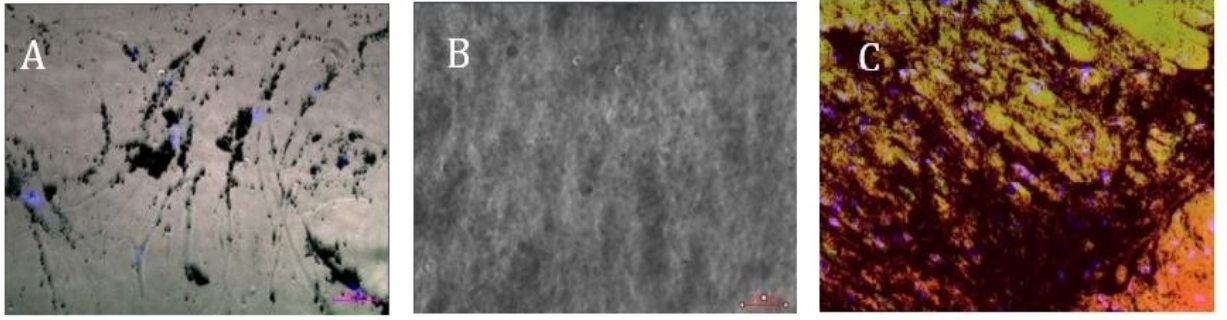
- Hücrelerin grafen nanotaniciklerine doğru yöneldiği,
- Grafenin hücreler üzerinde toksik bir etkisinin görülmediği,
- 2B boyutunda aldığımız Time-Lapse görüntüleriyle karşılaştırıldığında 3B ortam içerisinde de aynı etkinlik ve etkileşime sahip olduğu görüldü.
- Ayrıca GFP işaretli hücreler hücre ölümü görüldüğünde sönümlenmektedir. Burada 16. saate kadar hücrelerin 3B grafenli ortamda ölmediği canlılıklarını ve GFP parlaklığını sürdürdüğü tespit edildi.

#### **4.4 Biyomalzeme Gruplarında Yer Alan WJ-MKH'lerin Sinir Farklılaştırılmasının İncelenmesi**

WJ-MKH'lerinin sinir hücrelerine farklılaştırılması hem 2B hem de 3B olarak farklı teknikler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Liretatürde sıklıkla başvuru alan resveratrole kıyasla farklılaştırma solüsyonu ve eksozomal kombinasyon terapisi ile sinir hücrelerine farklılaştırılması mikroskopik inceleme ve immün boyama yapılarak birbiriyle karşılaştırılmıştır. Ayrıca biyomalzeme hücre etkileşimi farklılaşmayı da etkileyeceği için hücreler iki farklı şekilde eklenmiştir. İlk olarak biyomalzeme içerisine WJ-MKH'leri basım öncesi eklenerek biyoyazıcıda birlikte basılmıştır. Bu şekilde oluşturulan gruba 14 gün boyunca resveratrol uygulanmıştır ve 2B sistemle 3B sistem sinir hücrelerine farklılaşması açısından test edilmiştir. 2. Yöntemde ise WJ-MKH'leri biyomalzeme üzerine sferoid formda oluşturacak şekilde eklenmiştir. Bu grupta yer alan kök hücrelerin nöronlara farklılaşması için 7 gün boyunca hazır farklılaştırma solüsyonu kullanılmıştır.

##### **4.4.1 WJ-MKH'lerinin Bioinkler ile Birlikte Basımı Sonrası Resveratrol ile Nöronal Farklılaştırılmasının İncelenmesi Sonuçları**

Öncelikle farklılaştırma prosedürü öncesi grafenin ile hücre etkileşimi hem 2B hem de 3B olarak ışık mikroskopunda incelenmiştir (Şekil 4.14).



**Şekil 4.14** Morfolojik İnceleme (A), Grafen-hücre etkileşiminin Time-Lapse görüntülemeye 2B görüntüsü ; (B), 3B 'Baseink™' biyomalzemede ışık mikroskobu ile yüzey görüntüsü; (C), Mavi, yeşil ve kırmızı kanallarına ek olarak görünür ışık da verilerek şeffaflaştırılan Grafink bioinki görüntüsü

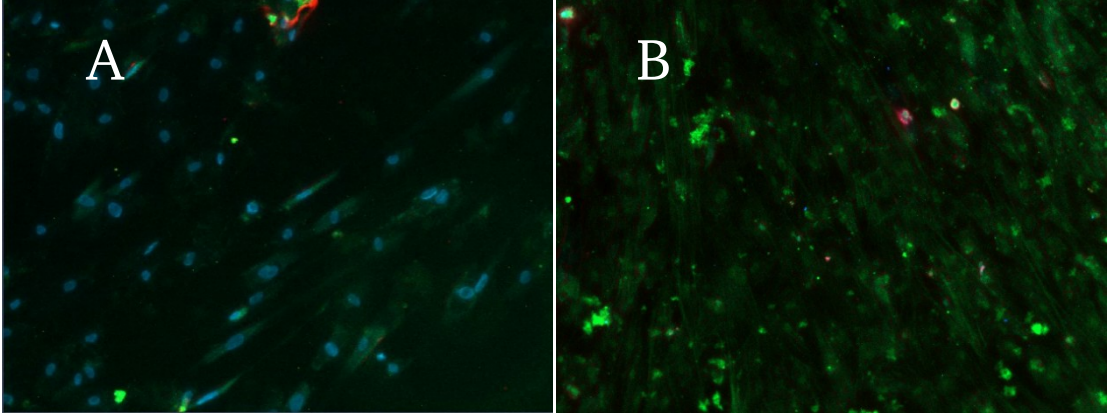
Şekil 4.14'de görüldüğü gibi grafenin 2B kültürde sitoplama içerisine endositoz ile taşındığı görülmektedir. Şekil 4.14.B'de de görüldüğü gibi yüzeye yakın hücreler jelin içerisinde gömülü ve 3B ortamın etkisiyle küresel şekilde görülmektedir. Şekil 4.14.C'de ise grafen tanecikleri jel içerisinde siyah renkte görülmektedir.

Çalışmanın ilk aşamasında yer alan morfolojik incelemeler sonuçlarına göre aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir:

1. Grafenin hücreler tarafından absorbe edilerek hücre içine girmesi ve hücrelerde bir toksik etki oluşturmamıştır.
2. Aynı şekilde grafenin jel yapıda da hücreler tarafından tolere edilebildiği ve hücrelerin 14 gün sonunda da halen canlı olduğu saptanmıştır.
3. Bioink içerisine ekilen hücrelerin etkinliğini ve farklılaşmasını incelemek hücrelerin izolasyonu açısından zordur bu sebeple farklılaştırılmak istenen hücreler biyomalzemeye sferoid formda ekilmiştir.

Çalışmanın sonraki aşamasında 2B ve 3B sistemde grafenin bioink içerisinde yer alan kök hücrelerin farklılaşmasındaki rolünü belirlemek amacıyla 14. Günün sonunda immün boyamalar yapılmıştır.

Yapılan immün boyamalar sonucu Şekil 4.15' deki görüntüler elde edilmiştir.



**Şekil 4.15** Nöronal belirteçler için yapılan immün boyamalardan örnekler; (A), N-Cadherin (yeşil) ve Nestin (kırmızı); (B),  $\alpha$ -SMA (yeşil) ve  $\beta$ -tubulin (kırmızı) boyamaları görülmektedir

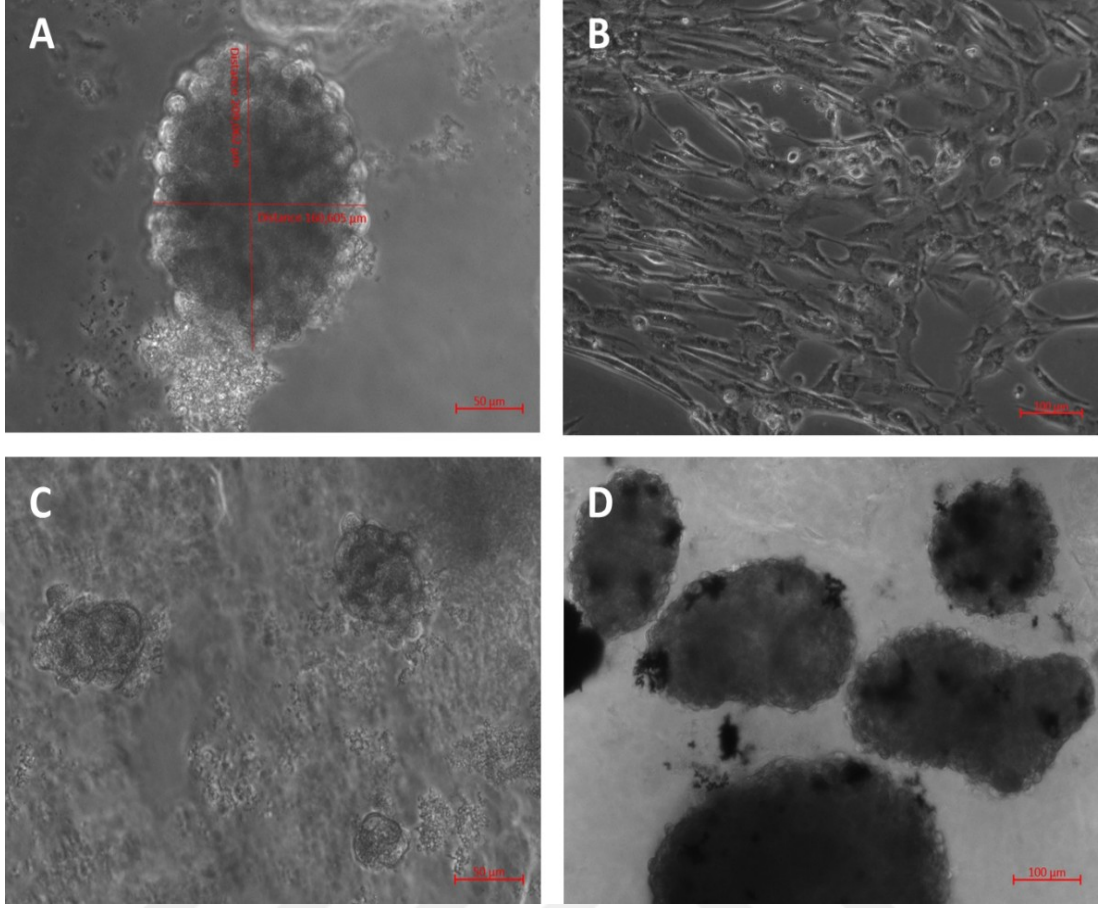
Çalışmanın bu aşaması incelendiğinde aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir:

1. Yapılan çift boyamalarda nöronal belirteçlerde ekspresyonun çok düşük oranda olduğu yorumuna varılmıştır.
2. Resveratrolün 2B ve 3B sistemde WJ-MKH'leri üzerinde 14. Günde nöronal farklılaşma için yeterli olmadığı gözlenmiştir.
3. Aynı zamanda grafenin kök hücreler üzerinde farklılaştırma potansiyelinin de 14 günde gerçekleşmediği sonucuna varılmıştır.

#### 4.4.2 Sferoid Formda WJ-MKH'lerinin Nöronal Farklılaştırılmasının İncelenmesi

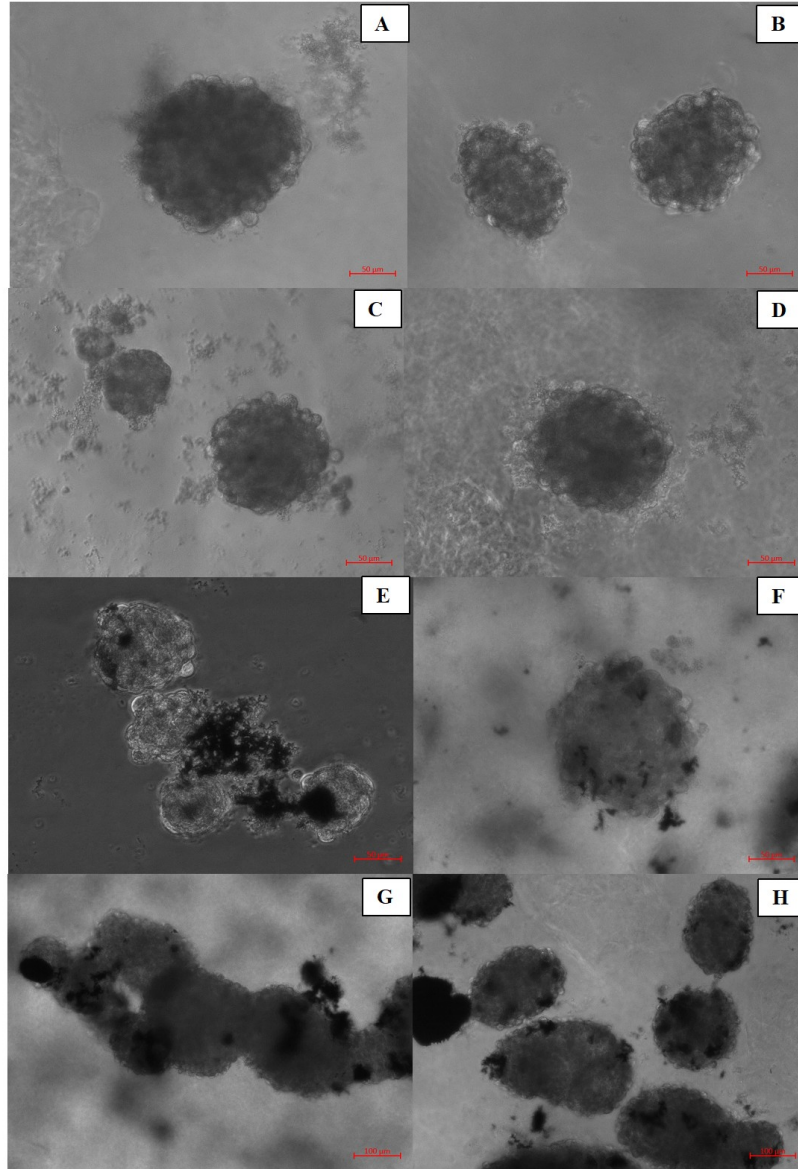
Sferoid formda biyomalzeme gruplarına eklenen hücreler 7. Gün boyuncafarklılaştırma solüsyonu ve 10  $\mu$ l eksozom ile kombinasyon terapisi şeklinde farklılaştırma prosedürü gerçekleştirilmiştir. Buna göre 7. Gün farklılaştırma sonrası öncelikle Time-Lapse görüntüleme ile sferoidler görüntülenmiştir (Şekil 4.16).





**Şekil 4.16** 7 günlük farklılaşma sonrası görüntüler (A), Çapları 160 ve 200  $\mu\text{m}$  olan 'Baseink™' bioink grubundan kürenin boyutu ; (B), Konvansiyonel 2D yöntemiyle kültürlenmiş kontrol hücreleri 'Baseink™' bioink grubundan (C) ve GrafınK grubundan (D),sferoidler (D)'deki siyah görüntüler; sferoidlerle entegre grafen molekülleridir

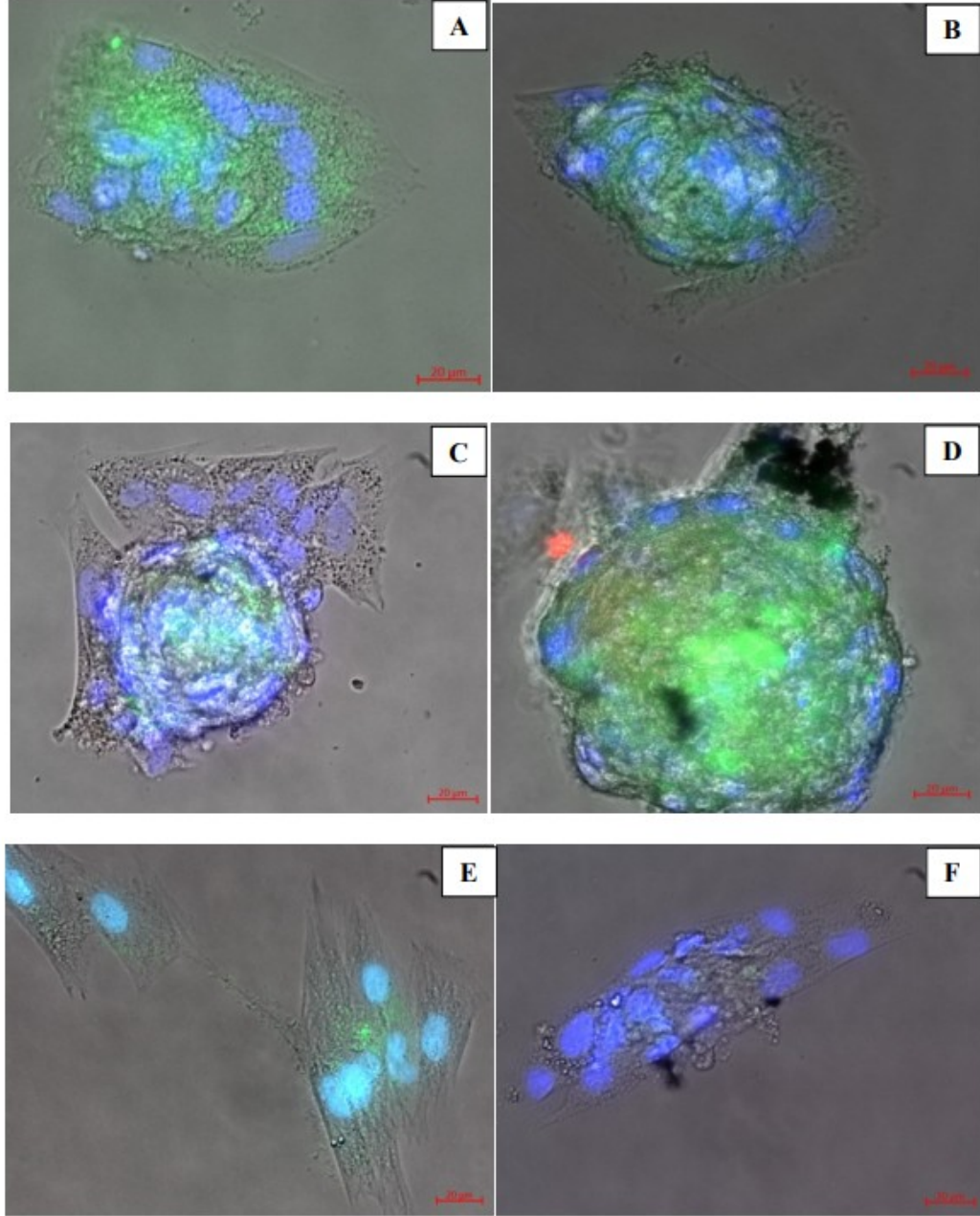
Şekil 4.17'deki görüntülerde ise 3B gruplarda sadece farklılaştırma solüsyonu veya kombine terapi ile farklılaştırma solüsyonuyla birlikte eksozom verilen sferoid gruplarının görüntüleri yer almaktadır.



**Şekil 4.17** Sadece nörojenik farklılaştırma yapılan bioink grubu sferoid örnekleri ile kombinasyon terapisi ile farklılaştırma solüsyonu verilen bioink grubu sferoid örnekleri; (A) ve (B), Yalnızca farklılaştırma solüsyonu ile nörojenik farklılaşması gerçekleştirilen Baseink sferoidleri; (C) ve (D), Kombinasyon terapisi ile farklılaştırılan Baseink sferoidleri; (E) ve (F) Yalnızca farklılaştırma solüsyonu ile nörojenik farklılaşması gerçekleştirilen Grafink sferoidleri; (G) ve (H) Kombinasyon terapisi ile farklılaştırılan Grafink sferoidleri

Elde edilen görüntüler ışığında hem 2B hem de 3B kültürlerde hücrelerin canlılığını koruduğu görülmektedir. Her iki gruptaki sferoid hücrelerin sınırlarının şeffaf ve canlı olduğu, grafen grubundaki sferoidlerin nispeten daha büyük olduğu ve grafeni hücre içinde hapsediği görülmüştür.

Farklılaşma ayrıca immün boyama ile test edildi. Burada yine kullanılan çift boyama ile hücrelerin 2B nöronal dönüşümdeki aktiviteleri 3B kültür ile karşılaştırılmıştır (Şekil 4.18).



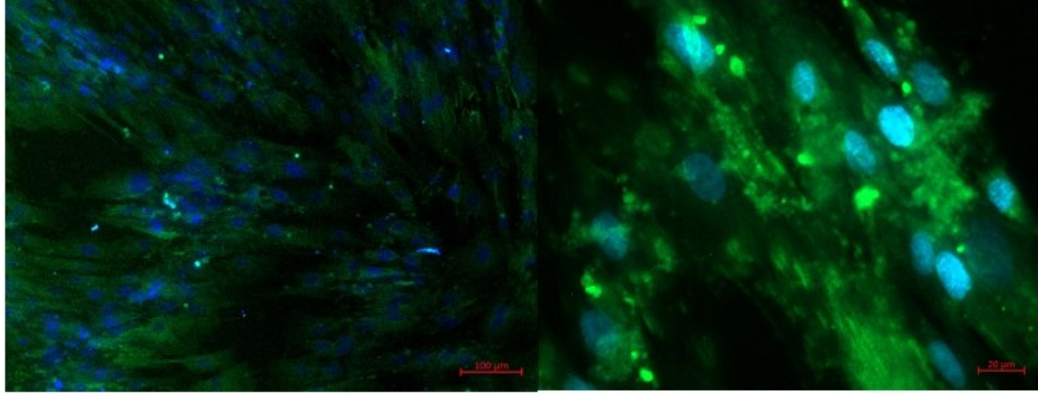
**Şekil 4.18** 7 gün kültürlenmiş hücrelerin immünofloresan görüntüleri; (A ve B) grafen olmadan bioinkin üstünde kültürlenmiş sferoid , (C) ve (D), grafen içeren bioinki üzerinde kültürlenmiş sferoidlerdir; grafen zamanla çözülür ve büyüyen hücre katmanlarına entegre olur; (E), 2B WJ-MKH- pozitif kontrol, (F), 2B WJ-MKH- negatif kontrol

Buna göre, 7 gün boyunca farklılaştırılan 2B ve 3B örneklerde kullanılan N-Cad (yeşil); sinyal mekanizmaları ve nöronların gelişiminde önemli rol oynar. A, B, C, D ve E yer alan bu yeşil görüntü nöral farklılaşmanın başladığını temsil eder. Sınıf III  $\beta$ -tubulin, insan genomunda nöron belirteçleri olarak bilinen 7 izotipten biridir. Bu çalışmada kullanılan WJ-MSK'lerin nöron benzeri yapılar oluşturmaya başladığını göstermektedir. Burada Sınıf III  $\beta$ -tubulin ile Teksas Red sekonder antikoru boyanarak kırmızı olması istenmiştir. Görüntülerde özellikle sferoidlerin iç kısımlarında kırmızılıklar görülse de istenen yoğunlukta değildir. Burada sekonder antikorun çalışmadığı ya da 1:200 seyreltilerek eklenen antikorun yetersizliği görüşüne varılabilir. Bu nedenle sekonder antikor değiştirilerek ve seyreltme oranı 1:100 yapılarak  $\beta$ -tubulin bu kez tekli şekilde boyanmıştır. Bunun dışında bu görüntü örnekleri bize 3B sistemlerin, hücrelerin canlılıklarını sürdürmeleri ve farklılaşmaları için daha uygun bir mikroçevre oluşturduğunu da göstermektedir. Pozitif kontrol ve negatif kontrol diğer 3B sferoid örnekleri ile karşılaştırıldığında boyanma miktarı açısından bu sonuca varılmıştır.

Tekli  $\beta$ -tubulin immün boyamasında, konjuge FITC (yeşil) sekonder antikoru (1:100) bağlanmıştır. Buna göre de tubulin ekspresyonu yeşil olarak görüntülenmiştir. DAPI koyu mavi-mavi olarak görünmektedir (Şekil 4.19).

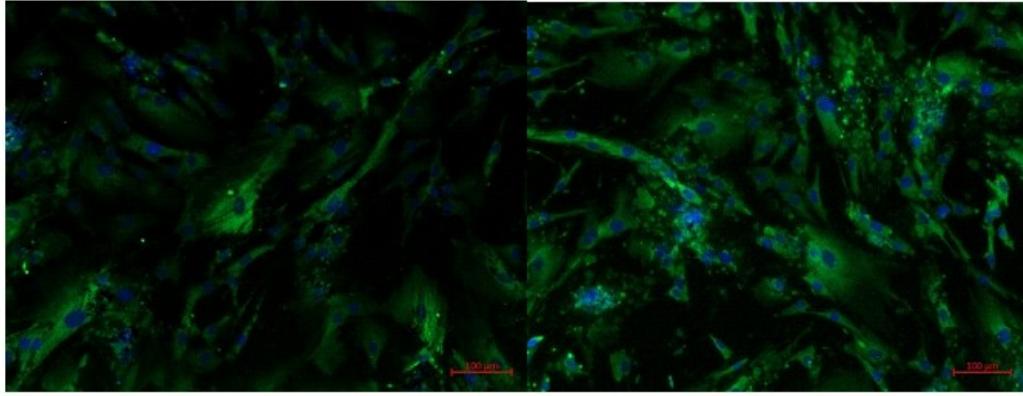
A. Pozitif Kontrol (2B)  $\beta$ -Tubulin 10X

B. Pozitif Kontrol (3B)  $\beta$ -Tubulin 20X



C. GrafınK  $\beta$ -Tub 10X

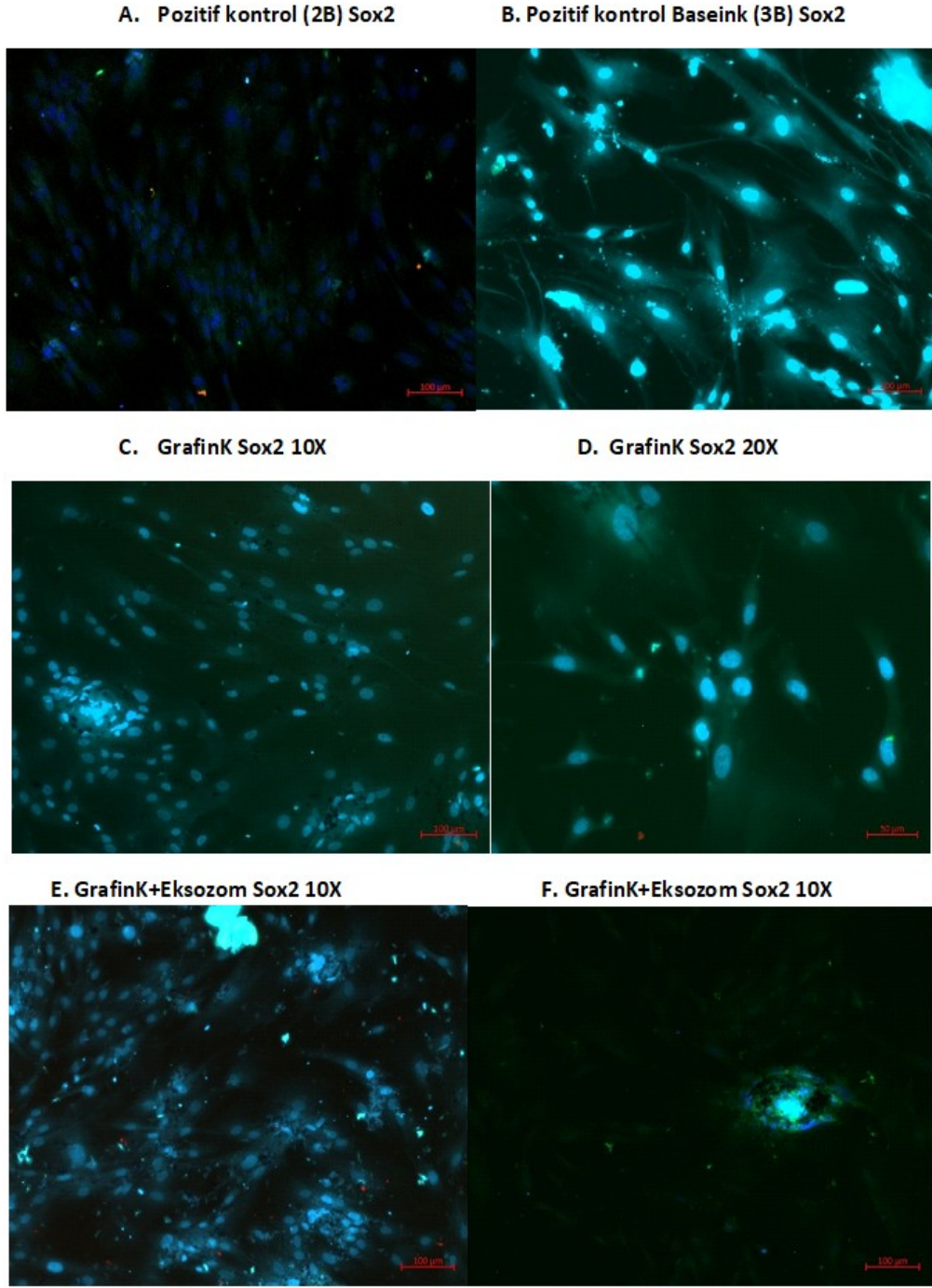
D. GrafınK+Eksozom  $\beta$ -Tub 10X



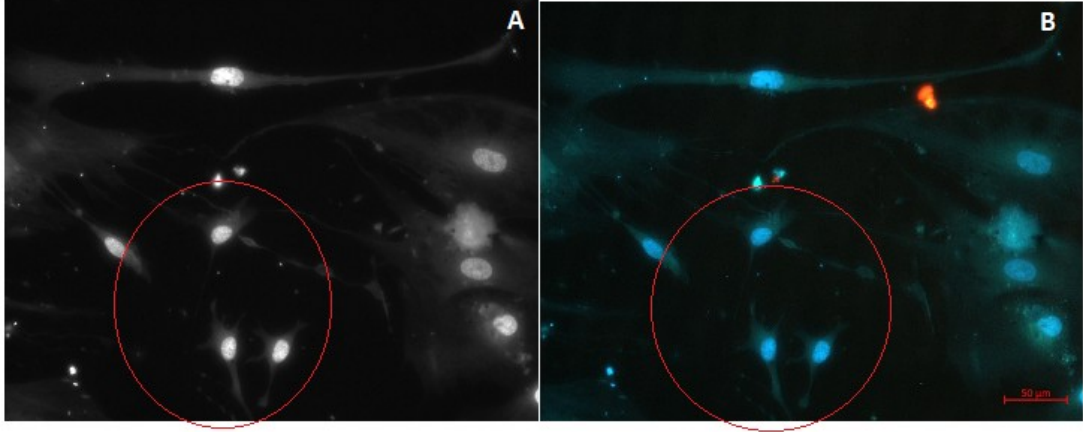
**Şekil 4.19**  $\beta$ -tubulin ekspresyonunun immün boyama ile 2B ve 3B gruplarda incelenmesi; (A), 2B pozitif kontrol; (B), 3B pozitif kontrol (Baseink bioink); (C), GrafınK; (D), GrafınK+Eksozom

Şekil 4.19'daki görüntülere göre 2B pozitif kontrol grubu, 3B Baseink bioink grubu (3B pozitif kontrol), GrafınK ve kombinasyon terapisi grubu olan GrafınK+Eksozom gruplarının hepsinde farklılaşmanın gerçekleştiğini, nöronal hücrelerde görülen  $\beta$ -tubulin ekspresyonunun varlığı tespit edilmiştir.

Bir başka tekli boyama ise Sox2 ile yapıldı. Sox2 belirteci embriyonik kök hücrelerde, nöron kök hücrelerinde, nöron progenitörlerinde ve nöronal farklılaşmanın ilk evrelerinde eksprese edilir. Bu nedenle FITC sekonder antikor (1:100) ile konjuge edilerek yeşil boyanması istenen Sox2 hem 2B hem de 3B gruplardaki ekspresyonu immün boyama ile belirlenmiştir (Şekil 4.20).



**Şekil 4.20** Sox2 ekspresyonunun immün boyama ile 2B ve 3B gruplarda incelenmesi; (A), 2B Pozitif Kontrol; (B), 3B Pozitif Kontrol (Baseink bioink) ; (C), Grafink 10X ; (D), Grafink 20X; (E), Grafink+ Eksozom 10X ; (F), Grafink+Eksozom 10X



**Şekil 4.21** Nöron benzeri hücre yapısı mikroskopik görüntüsü (GrafinK grubundan) 20X; (A), Siyah-Beyaz ışıkta çekilmiştir; (B), Sox2 ile FITC konjuge antikoru immün boyalı florans ışıkta çekilmiş görüntü

Buna göre farklılaştırma yapılan grupların nöron benzeri hücre yapısında olduğu da görüntülenmiştir.

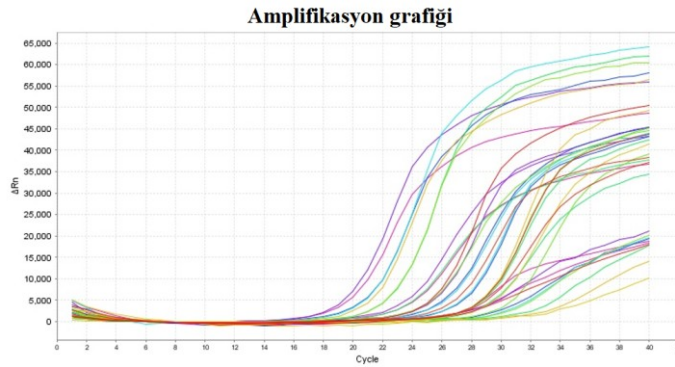
#### 4.5 Gen Ekspresyon Seviyesinde Sinir Farklılaşmasının Karakterizasyonu

RNA 'nın izolasyonu sonrası Nanodrop ile miktarının ng/  $\mu$ l cinsinden ölçüm sonuçları aşağıdaki tabloda verilmiştir:

**Tablo 4.1** RNA miktar tayini

	ng/ $\mu$ l (RNA miktarı)	(A260/A280)
<b>1. Örnek: Negatif Kontrol</b> (2B farklılaştırma yapılmamış WJ-MKH)	21.3	2.13
<b>2. Örnek: Pozitif Kontrol</b> (2B farklılaştırma yapılmış WJ-MKH)	35.4	1.98
<b>3. Örnek: GrafinK</b> (3B farklılaştırılmış WJ-MKH)	18.7	2.48
<b>4. Örnek: Baseink</b> (3B farklılaştırılmış WJ-MKH)	28.3	2.18

Burada (A260/A280) ile verilen değer tipik olarak protein kontaminasyonunu temsil eder ve bu oran tamponlu çözeltilerde saf dsDNA'nın A260/A280'i 1.85–1.88'dir ve saf RNA'nın oranı 2.1 civarındadır. Daha sonra cDNA'ya çevrilen örneklerle Real-Time PCR yapılmış ve 2B ve 3B sistemdeki hücrelerin Sox2, Nestin ve Tubulin 3 gen ekspresyon seviyeleri belirlenmiş ve referans gen olarak GAPDH kullanılmıştır. Buna göre Real-Time PCR sonucunda Şekil 4.22'deki amplifikasyon grafiği elde edilmiştir.



**Şekil 4.22** 2B ve 3B deney gruplarında, Sox2, Nestin ve Tubulin 3 gen ekspresyonlarına ait amplifikasyon grafiği

Daha sonra tüm grupların  $\Delta Ct$  değeri hesaplanmış ve hiç farklılaştırma yapılmamış 2B negatif kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır. Buna göre aşağıdaki Tablo 4.2'de ilgili gen ekspresyon seviyelerine ait ortalama Ct ve  $\Delta Ct$  değerleri verilmiştir.

**Tablo 4.2** Sox2, Nestin ve Tubulin 3 genlerinin ortalama Ct ve  $\Delta Ct$  değerleri

	<b>GAPDH</b>	<b>Sox2</b>	<b>Nestin</b>	<b>Tubulin 3</b>
<b>2B Negatif Kontrol (NK) grubu WJ-MKH</b>	Ort. Ct=24,1490	Ort. Ct=28,0174 $\Delta Ct= 3,868$	Ort.Ct=29,8480 $\Delta Ct= 5,699$	Ort.Ct=31,46 $\Delta Ct= 7,3204$
<b>2B Pozitif Kontrol (PK) grubu hücreleri</b>	Ort. Ct=23,2289	Ort. Ct=28,0563 $\Delta Ct= 4,7273$	Ort.Ct=25,2425 $\Delta Ct= 2,0136$	Ort.Ct=32,58 $\Delta Ct= 9,35$
<b>3B Baseink bioink grubu sferoidleri</b>	Ort. Ct=21,8275	Ort. Ct=26,695 $\Delta Ct= 4,8677$	Ort.Ct=26,7027 $\Delta Ct= 4,8751$	Ort.Ct=30,75 $\Delta Ct= 8,9275$
<b>3B Grafink bioink grubu sferoidleri</b>	Ort. Ct=20,6016	Ort. Ct=26,3133 $\Delta Ct= 5,7117$	Ort.Ct=24,4699 $\Delta Ct= 3,8683$	Ort.Ct=28,68 $\Delta Ct= 8,079$



Sox2 geni köklülük (stemness) geni olarak da bilinmektedir ve kök hücre pluripotensisinin korunumunu sağlar [116].  $\Delta Ct$  oranlarına bakılacak olursa Sox2 gen ekspresyonu 3B sistemlerde çok daha geç ortaya çıkarken, 2B negatif kontrol olan farklılaştırma yapılmamış kök hücre grubunda en erken eksprese edilmiştir. Bir ara filament olan Nestin , embriyonik günden itibaren ifade edilen özellikle de merkezi sinir sistemi progenitör hücreleri için bir belirteç olarak kullanılmaktadır [117]. Bu tez çalışmasında Nestin gen ekspresyonuna ait sonuçlar 2B farklılaşmış hücrelerde daha kısa sürede eksprese edildiği ancak 3B'lu sistemdeki farklılaşmış hücrelerde de ekspresyonun görüldüğüdür. Negatif kontrolde ise en geç ekspresyon seviyesine ulaşmıştır. Tubulin 3 gen ekspresyonu özellikle nörojenik farklılaşma belirteci olarak kullanılır [118]. Gen ekspresyonlarına ait ortalaması alınan düşük Ct değerlerinin nükleik asit miktarı test orantılı olduğundan dolayı Tubulin 3 gen ekspresyonu incelendiğinde 3B gruplarda en yüksek nükleik asit seviyesinde olduğu görülür. Bu da nöranal farklılaşmayı vermektedir.

Periferik nöromühendisliğin temelinde iskele tasarımı, uygun hücre hattı seçimi ve hem iletimde hem de rejenerasyonda etkin biyoaktif moleküllerin bir arada tasarlandığı 3B yaklaşımlar gelmektedir. Literatürde var olan çalışmalar genellikle bu üçlü yapının tekini ya da ikisini içinde barındırmaktadır. Örneğin; 2016 yılında Öztel tarafından yapılan bir çalışmada, poliglikolik asit bazlı bir nöral kanalının fasiyal periferik sinire anastomozu gerçekleştirilmiş ve etiketli olfaktör mezenkimal kök hücreleri bu kanala implantasyon sırasında başarıyla aktarılmıştır [43]. Periferik cerrahide iskele ile birlikte verilen kök hücrelerin tercih edilme nedeni üstün proliferasyon yetenekleridir. Başka bir çalışmada dermal fibroblastlarını sferoid formda içeren, silikon tabanlı bir nöral kanalın etkinliği siyatik sinir hasarı deney hayvan modelinde incelenmiştir [45]. Yalnızca uç uca sinir bağlama ile karşılaştırılan 3B silikon tabanlı bu yaklaşım ile birlikte uygulanabilir hücresel terapi, doku rejenerasyonda hem 3B yapının önemini, hem de hücresel terapiyle birlikte daha etkin sonuçlar verdiğini ortaya koymaktadır. Tek başına hücresel terapiler Li ve ark.'da gösterdiği gibi, hücrelerin lezyondan kısa mesafeye göç edebilmesi ve hasarlanmış bölgede kavite boyunu uzatabilecek 3B iskele yapısının yoksunluğundan dolayı yetersiz kalmasına rağmen; günümüzde remiyelinizasyondaki iyileşmeye etkisi açısından hala tercih edilmektedir [107]. Hücresel terapilerin klinikteki yüzünde WJ-MKH'leri farklılaşma yetenekleri açısından geniş yer bulmaktadır. Ayrıca sinir doku mühendisliği içinde uygun bir aday hücre dizisi olmasına rağmen, özellikle edinme için protokollerin optimizasyonu, çoğalmaları yeteneği ve farklılaşma proseslerinin iyi belirlenmesi gerekmektedir [29].

Periferik nöromühendislikteki en önemli durumlardan biri tasarlanan yapı iskelesinin biyoyumlu ve zaman içerisindeki biyobozunur yapı olma özelliğini göstermesidir. Silikon tabanlı iskeleler periferik cerrahide kullanım alanı bulsa da, enfeksiyon riski ve düşük biyoyumluluk gibi bazı önemli dezavantajlara

sahiptir [45],[46],[47]. Diğer önemli bir özellik biyolojik olarak parçalanabilirliktir [30]. Homojen malzemelere kıyasla kompozit biyomalzemelerde bu özelliğe daha iyi ulaşılır [31],[32], [33], [34]. Literatürde yapılan çalışmalarda genellikle elektro eğirme ile üretilen PCL'un mukavemetinin yüksek olması ve yavaş degradasyonu sebebiyle kemik ve kırıldak rejenerasyonunda tercih edildiğini göstermektedir [35]. Uygun koşulların sağlanması ve PCL iskeleye uygun şeklin verilmesi açısından 3B biyoyazıcı ile basımının zorluğu farklı teknolojilerin kullanımına malzeme bilimcileri yönlendirmiştir. Yeni bir teknoloji olan Eriyik Elektroyazma Tekniği ile bu polimerden sinir kanalı üretimi daha uygun olabilir [101],[102]. [103]. Bu tez çalışması kapsamında PCL sinir konduit dış katman yapısı Eriyik Elektroyazma yöntemiyle üretilerek lifli yapı içerisinde eksküzyon baskı ile hidrojel dolgu maldesi eklenmiş ve kompozit bir yapı oluşturulmuştur. Eriyik Elektroyazma özellikle erime sıcaklığı yüksek polimer tabanlı malzemelerde uygun şeklin verilmesinde oldukça verimli bir yöntemdir [120]. PCL lifler üzerinde desenli yüzeyler yaratarak iç dolgu malzemesi olarak kullanılan GrafınK ve Baseink bioinklerinin ve hücrelerin iskele dış katmanına daha iyi oryantasyonunun sağlandığı görülmüştür. Literatürde yapılan bir çalışmada porlu bir yapıya sahip sadece Poli(laktik-ko-kaprolakton) (PLCL) malzemesi ile 3B baskı yöntemi ile içi kollajen kaplanmış PCLC sinir kanalı malzemelerinin etkinliği periferik sinir hasarında karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada kollajen kaplı malzemenin hem sinir yenilenmesi üzerindeki etkinliğinin yüksek olması, hem de esnek yapısı sayesinde cerrahi olarak uygulanabilirliğinin kolaylığı nedeniyle, sadece PLCL içeren biyomalzemeye kıyasla kullanımlarının daha avantajlı olduğu sonucuna varılmıştır [26]. Bu da elde ettiğimiz dış katman PCL iskele iç katman hidrojel yapısındaki sinir konduit prototipimizin etkinliğini doğrular niteliktedir.

Bu çalışmada üretilen sinir kanalının iç katmanını oluşturan hidrojel desenlemesi içerisinde yer alan grafen nanoparçacıklarının sinir yenilenmesi ve etkileşimi üretine etkinliği ayrıntılı olarak incelenmiştir. En ince ve en hafif malzemelerden biri olan grafen, üstün kimyasal kararlılık, biyouyumluluk, esneklik gibi özellikleri ile hücrelere uygun bir mikroçevre oluşturur. Ayrıca MPO enzimi gibi

çeşitli enzimler ve fagositik yanıtlar ile biyobozunur özelliği ile rejeneratif biyolojiye eşsiz bir katkı sağlamaktadır [27], [28], [29]. Yapılan bir çalışmada polyakrilamid, grafen oksit, jelatin, and sodyum aljinatın (PAM/GO/Gel/SA, PGGs) iki farklı konsantrasyonundan oluşan kompozit sinir kanalı biyomalzemelerinin siyatik sinir hasarında onarımını etkili bir şekilde teşvik ettiği gösterilmiştir [49]. Başka bir çalışmada biyoyumlu ve düşük sertlik özelliği sergileyen %10 jelatin metakrilamid (GelMA) hidrojel ile grafen birlikteliğinin oluşturulduğu biyomürekkep tasarlanmış ve içerdiği nöral kök hücreler üzerinde proliferatif etkisi incelenmiştir [90]. Bu bağlamda PCL'nun sinir doku mühendisliğinde tercih edilmesi yüksek mukavemet, biyobozunur ve biyoyumlu yapısından ötürü olmakla birlikte, grafenin sinir farklılaşması ve sinir iletimi üzerine etkileri bu malzemeleri uygun birer biyomalzeme adayı haline getirmektedir.

Bu nedenle bu çalışma kapsamında, eriyik elektroyazma teknolojisi ile oluşturulan PCL iskele içerisine 3B biyoyazıcı aracılığıyla toksik olmayan %0.1 konsantrasyonda grafen içeren aljinat/jelatin tabanlı bioink hidrojel desenlemesi ilk kez olarak sinir kanalı şeklinde özgün bir kompozit prototip biyomalzeme geliştirilmiştir. Grafenin toksik dozunun belirlenmesi, biyomalzemelerin klinik olarak uygulanabilirliğine katkı sağlamaktadır. Buna göre de bu çalışma kapsamında grafenin toksik dozu 2B ortamda WJ-MKH'leri üzerinde tespit edilmiş ve hem 2B'lu ve hem de iki farklı grup olarak üretilen 3B'lu bioinkte hücrelerle etkileşimi incelenmiştir. Ayrıca literatürde ilk kez olarak GFP işaretli MKH'ler ile 3B biyobaskı yöntemi ile üretilmiş grafen içeren bioink içerisinde yer alan grafen nanoplakaları ile etkileşimi Time-Lapse görüntüleme ile görüntülenmiştir.

Üretilen biyomalzemenin karakterizasyonu SEM ve FTIR ile yapılarak literatürde yapılan çalışmalarla karşılaştırılmıştır. 'Baseink™' bioinkinin aljinat-jelatin tabanlı olması literatürde benzer çalışmalar ile karşılaştırıldığında en belirgin pikler O-H germe titreşimine karşılık gelen  $3300\text{ cm}^{-1}$ de karakteristik bir tepe görünümüdür [21].  $1633.41\text{ cm}^{-1}$  karboksilatın (COO) asimetric gerilme

titreşiminin karbonil (C=O) grubuna [115], 1552.42  $\text{cm}^{-1}$ 'deki bant ise karakteristik zirve olarak aljinattaki COO grubunun negatif yükü ile jelatin içindeki bir amin grubunun (NH<sup>+</sup>) pozitif yükü arasındaki elektrostatik etkileşim yoluyla polielektrolit (CONH<sub>2</sub>) kompleksi oluşumuna atanmış ve benzer olan iki farklı çalışmada sırasıyla 1637 [115], ve 1560  $\text{cm}^{-1}$  'de [21] bant görülmüştür. Diğer görülen 1033  $\text{cm}^{-1}$  civarındaki pik ise aljinat-jelatin bioinkinin guluronik birimlerinin CO grubu C-O grubu ile ilgili olduğu ve benzer çalışmada aynı pike rastlandığı görülmüştür [21]. Grafink bioinkinde ise farklı olarak görülen 1335.46  $\text{cm}^{-1}$ 'deki pik literatürde yer alan bir çalışmada benzer olarak 1399  $\text{cm}^{-1}$  'da görülmüştür [114]. Ayrıca yapılan SEM analizleri daha önce grafenli üretilmiş hidrojeller ile karşılaştırıldığında elde edilen görüntülerdeki yığınlar halinde görülen yapının grafene ait olduğu göstermektedir [114].

Doku mühendisliğini oluşturan diğer bir etken ise hücrelerin farklılaşması, göçünü, proliferasyonunu sağlayan biyosinyal molekülleridir. Eksozomların beyindeki sinaptik plastisite, nöronal stres yanıtı, hücre-hücre iletişimi ve nöroenez gibi süreçlerde rol alması [36], [39], sinir rejenerasyonuna yönelik terapilerde biyoaktif molekül olarak kullanımını gündeme getirmektedir [40], [41]. Eksozomları klinik araştırmalara taşıyan çalışmalar sınırlı olmasına rağmen; hücrelerin güvenli ve verimli olduğunu göstermektedir [42]. Rejeneratif tıbbi uygulamalarda kavite bölgesine enjekte edilen hücreler ya da eksozomal biyoaktif moleküllerin etkinliği, sinir doku mühendisliğindeki iskele-hücre-biyosinyal molekülü üçlü yapısına kıyasla yetersiz kalmaktadır. Buna göre, özellikle tam kesi sinir hasarlarına karşı geliştirilen nöral konduit biyomalzemeler içerdiği veya enjekte edilebilen hücreler ve/veya biyosinyal molekülleri ile sinir rejenerasyonunda daha etkindir. Eksozomların elde edilme yöntemlerinin optimizasyonu ve karakterizasyonu oldukça önemlidir. NTA karakterizasyon açısından altın standar olarak kabul edilen bir yöntem olarak görülmektedir. NTA ile eksozomların boyut ve parçacık sayısı belirlenmektedir. Literatürde yer alan eksozomal terapi çalışmalarındaki en büyük sorun ml başına düşen eksozom sayısı yerine protein miktarının BCA yöntemiyle belirlenerek  $\mu\text{l}$

oranlarının yer almasıdır. Bu noktada optimizasyon yetersiz kalmaktadır. Ancak gerçekleştirdiğimiz bu tez çalışması kapsamında WJ-MKH'lerinden elde edilen eksozomların karakterizasyonu için hem NTA hem de Zeta-Sizer analizleri yapılmış ve birbirleriyle tutarlı sonuçlar elde edilmiştir. Buna göre eksozom boyutu yaklaşık 98 nm yoğunlukta bulunmuş ve ml'deki oranı 10 milyar partikül olarak belirlenmiştir. Bu da kullanılacak oranın ml/partikül açısından şeffaflığını ortaya koymaktadır.

Bu çalışma kapsamında, 3B'lu ortamda iki farklı formda hücreler-bioink etkileşimleri incelendi. Her iki formda da hücrelerin sinir hücresine farklılaştırılması ve bu farklılaşmanın analizi gerçekleştirildi. Hidrojeller sahip oldukları yüksek kapasitede sıvı tutma yetenekleri ve ekstrasellüler matriks fonksiyonlarını taklit eden mikroçevre oluşturmalarına rağmen; özellikle aljinat/jelatin tabanlı hidrojellerde fiziko-kimyasal modifikasyonların hücrelerin adezyon yeteneklerini etkilediğini gösteren çalışmalar literatürde yer almaktadır [121]. Bu bağlamda literatürde ilk kez olarak üretilen PCL-Grafen (%0.1)-Bioink hidrojel desenlemesinin, hem üstünde sferoid form oluşturulan grubunda hem de hem de bioink içine lokalize halde basılan hücrelerin malzeme ile uyumluluğu görülmüştür. GFP işaretli kök hücrelerin, 3:5 oranındaki bu aljinat/jelatin grafen hidrojel desenlemesi içerisindeki etkileşiminin gösterilmesini sağlamıştır. Ayrıca sferoid formdaki hücrelerin farklılaştırılması ile nörosfer oluşumu da gösterilmiştir. Bioink içinde lokalize hücrelerin 14 gün boyunca farklılaşması gerçekleştirilemese de sferoid formda oluşturulan hücrelerin nörosfere dönüşümleri 7 günde gerçekleşmiştir.

Bu tez çalışması kapsamında üretilen 3B yapı ve içerdiği hücrelerin sinir farklılaşması, 2B'lu ortamla kıyaslı olarak iki farklı farklılaştırma yöntemi ile karşılaştırılmıştır. Bunun için ilk yöntem olarak seçilen resveratrolün literatürde yapılan çalışmaya [110] benzer olarak nörit gelişiminde tek başına etkili olmadığı hem 2B hem de 3B ortamda gösterilmiştir. Diğer farklılaştırma yönteminde ise 2B ve 3B üretilen ortamda hem sinir farklılaştırma solüsyonu hem de bu çalışma kapsamında üretilmiş olan eksozomların kombinasyon terapisi şeklinde kök hücreler üzerinde etkisi ilk kez olarak incelenmiştir.

Oluşan nöron benzeri hücrelerin immün boyama yöntemiyle farklılaşmaları gösterilmiştir. Yapılan ikili boyamalara kıyasla tekli boyamalarda daha yüksek başarı sağlanmış ve özellikle sinir hücrelerinde eksprese edilen  $\beta$ -III Tubulin ekspresyonunun farklılaştırılan tüm gruplarda yüksek seviyede olduğu görülmüştür. 2015 yılında WJ-MKH'lerinin aljinat tabanlı 3B ortamda sinir hücrelerine farklılaştırılmış gerçekleştirilmiş ve bu farklılaşma  $\beta$ -III Tubulin ile immünfloresans boyama ile gösterilmiştir. Buna göre 3B ortamda sinir hücrelerine dönüşen kök hücrelerin 2B ortama kıyasla daha yüksek seviyede  $\beta$ -III Tubulin ifade ettiği görülmüştür [122]. Buna göre de bu tez çalışması kapsamında da kullanılan aljinatın hücre farklılaşması için uygun bir platform olduğu, aynı zamanda 3B yapının nöronal farklılaşmada  $\beta$ -III Tubulin ekspresyonu açısından daha yüksek olduğu sonucu elde ettiğimiz sonuçları literatüre göre tutarlı kılmaktadır.  $\beta$ -tubulin isotiplerinden  $\beta$ -I,  $\beta$ -II ve  $\beta$ -III'te farklılaştırma öncesi fark olmadığı ancak farklılaştırma sonrasında  $\beta$ -II'nin nöritlerde,  $\beta$ -I ve  $\beta$ -III'ün ise hem nörit hem de hücre gövdesinde görüldüğü literatürde yapılan gen ekspresyon çalışmalarında belirtilmiştir[123]. 2010 yılında Guo ve ark. Tarafından yapılan bir çalışmada siRNA'lar kullanılarak  $\beta$ -III Tubulinin gen ifadesi susturulmuş ve özellikle bu genin nöronlarda serbest radikallere karşı koruyucu özelliği olduğu farklılaştırılmış SK-N-SH nöroblastoma hücrelerinde gösterilmiştir [123]. Erken nörit büyümesinde ilk faktör olmayan  $\beta$ -III Tubulinin nörit uzamasında etkilidir [124]. Bu tez kapsamında elde edilen sonuçlara göre  $\beta$ -III Tubulin ekspresyonunun tüm gruplarda görüldüğü 3B gruplar arasında  $\Delta$ Ct oranları açısından fazla fark olmadığı ve pozitif kontrole göre daha fazla eksprese edildiği görülmüştür.  $\beta$ -III Tubulin interfaz evresindeki mikrotübüllerde ve mitotik iğ iğliklerinde de eksprese edildiği için [123], bu çalışma kapsamında negatif kontrol olarak kullanılan 2B farklılaştırılmamış WJ-MKH'lerindeki yüksek ekspresyon seviyesi hücrelerin genç ve proliferatif olmasına bağlanabilir.

Sox2 köklülüğü ifade eden bir belirteç olarak kök hücre farklılaştırma çalışmalarında literatürde sıklıkla yer almaktadır [116]. Bu tez çalışması kapsamında Sox2 immün boyama sonuçları, farklılaştırılan gruplardaki düşük

ekspresyonu göstermiştir. Kök hücre pluripotensisinin korunumunu sağlayan ve literatürde kök hücre karakterizasyonunda da kullanılan [116] Sox2 gen ekspresyon  $\Delta$ Ct oranları 3B sistemlerde daha geç ortaya çıkarken, 2B negatif kontrol olan farklılaştırma yapılmamış kök hücre grubunda literatüre uygun olarak en erken eksprese edilmiştir.

Merkezi sinir sistemi progenitör hücreleri için literatürde [117] belirteç olarak kullanılan Nestin, bu çalışmada hem 2B farklılaşmış hücrelerde hem de 3B ortamdaki hücrelerde eksprese edilmiştir. Farklılaştırma yapılmamış negatif kontrolde nöron-benzeri hücre ekspresyonlarına göre daha geç ekspresyon seviyesine ulaşmıştır.

Bu doktora tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar çerçevesinde aşağıda yer alan maddeler önerilmektedir:

- ✓ WJ-MKH'lerinin rejeneratif nöromühendislikte hem 2B hem de 3B ortamda kullanımının uygun olduğu görülmüştür.
- ✓ Aljinat/Jelatin oranının 3:5 kullanımının kök hücrelerin farklılaşması için uygun olduğu görülmüştür.
- ✓ %0.1 grafen oranının hem 2B hem de 3B hidrojel desenlemesindeki hücreler üzerinde toksik olmadığı ve bundan sonra yapılacak farklı içerikteki hidrojel kompozit biyomalzeme çalışmalarında bu oranın kullanılabilmesi önerilmiştir.
- ✓ PCL iskelenin ekstrüzyon 3B yazıcı baskı ya da elektro eğirme yöntemi yerine, Eriyik elektroyazma işlemi ile istenilen özellikte ve formasyonda basılabileceği görülmüş ve oluşturduğu lif içerisindeki desenlemelerden ötürü iç dolgu maddeleri ve hücrel etkileşime daha fazla olanak sağlaması yönünden önerilmektedir.
- ✓ WJ-MKH'lerinin nöronal farklılaşmasındaki etkisinin yanı sıra nöroprotaktif etkisi nedeniyle özellikle konduidal ya da enjekte edilebilir sistemlerde kullanımı etkili olabilir.
- ✓ Gen ekspresyon seviyeleri farklılaştırılmış ve farklılaştırılmamış hücrelerde ölçülürken; kontrol olarak insan vb. kaynaktan elde edilip



nöron etkinliği kanıtlanmış hücrelerin ekspresyon seviyeleriyle karşılaştırılması  $\Delta Ct$  değerlerinin yorumlanması açısından daha sağlıklı olabilir.

Son olarak siyatik veya fasial sinir gibi çeşitli periferik sinirlerde meydana gelebilecek tam kesi sinir hasarlarında, kliniğe uyarlanabilir, sinir kanalı şeklindeki 3B sistemlerin ve kombinasyon terapilerinin geliştirmesi periferik nöromühendislikte oldukça önemlidir. Bu nedenle, in vivo'ya giden yolda biyomalzemelerin ve üretilen biyoaktif moleküllerin biyolojik özelliklerinin in vitro'da test edilmesi, bu tarz çalışmaların niteliğini arttırmaktadır. Klinik alana uygulanabilirlik koşulları, biyomalzeme tasarımından hücresel süreçlerin üretimine ve kombinasyon terapilerinin uygulanabilir boyuta taşınmasına kadar 'İyi Üretim Uygulamaları' olarak adlandırılan GMP standartlarında gerçekleştirilmelidir. Bu çalışmada üretilen özgün biyomalzeme ve kombinasyon terapisi, enjekte edilebilir veya cerrahi sinir bağlama kiti şeklinde kullanım alanı bulabilecek bir prototip olarak tasarlanmıştır.

- [1] A. E. Öge, B. Baykan, S.Z. Bahar, B. Bilgiç, “Nöroloji”, Nobel Tıp Kitabevi, 2. Baskı, 2019.
- [2] V. Kumar, A.K. Abbas, J.C. Aster, “Robbins Temel Patoloji”, Nobel Tıp Kitapevleri, 9. Basım 2014.
- [3] G. In, C. G. Kuhn, “Medicorum Graecorum opera quae exstant, Lipsiae: Prostat in Officina Libraria Car”, 1821-1833, 1964.
- [4] H. J. Seddon, “Fibrin suture of human nerves”, *Lancet*, 2:87-88, 1942.
- [5] S. Sunderland, “Nerves and Nerve Injuries”, ed. 2. London: Churchill Livingstone, 1978.
- [6] J.H. Jacobson, “Microsurgical technique in the repair of the traumatized extremity”, *Clinical orthopedics*, 29: 132-145, 1963.
- [7] S. Nadir, L. Postalci, “Türkiye’de Periferik Sinir Cerrahisi Tarihi”, *Türk Nöroşirürji Dergisi*, Cilt: 20, Sayı: 2, 57-63, 2010.
- [8] B. Kamaşak, “Periferik Sinir Yaralanmaları ve Fizyoterapi”, *Klinik Fizyoterapi*, Vize Yayıncılık, S.19, 2019.
- [9] H. Yıldırım, “DeneySEL Olarak Siyatik Sinir Hasarı Oluşturulmuş Ratlarda Periferik Sinir Rejenerasyonu Üzerine Hypericum Perforatum’un Etkisinin Değerlendirilmesi: İmmünohistokimyasal Bir Çalışma”, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi Ve Travmatoloji Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, 2019.
- [10] A. Faroni, S. A. Mobasser, P.J. Kingham, A.J. Reid, “Peripheral nerve regeneration: Experimental strategies and future perspectives”, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 82, 160–167, 2015.
- [11] J. Scheib, A. Hoke, “Advances in Peripheral Nerve Regeneration”, *Nature Reviews: Neurology*, 9 (12), 668–676, 2013
- [12] J.R. Bingham, K. Knierya, L. Nikolas, “Stem Cell Therapy to Promote Limb Function Recovery in Peripheral Nerve Damage in a Rat Model”, *Experimental Research*, 41, 20-28, 2019.
- [13] H. Zhuang, S. Bu, L. Hua, M., A. Darabi, X. Cao, M. Xing, “Gelatin-Methacrylamide Gel Loaded with Microspheres to Deliver GDNF in Bilayer Collagen Conduit Promoting Sciatic Nerve Growth”, *International Journal of Nanomedicine*, 11, 1383–1394, 2016.
- [14] A. Allahverdiyev, “Somatik ve Kök Hücre Kültür Sistemlerinin Temel İlkeleri”, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 1. Baskı, 2018.
- [15] K. Stefańska, K. Ożegowska, G. Hutchings, M. Popis, L. Moncrieff, C. Dompe ve ark., “Human Wharton's Jelly-Cellular Specificity, Stemness Potency, Animal Models, and Current Application in Human Clinical Trials”, *J Clin Med.* 12;9(4):1102, 2020.
- [16] L.L. Liao, B.H.I. Ruszymah, M.H. Ng, J.X. Law, “Characteristics and Clinical Applications of Wharton’s Jelly-derived Mesenchymal Stromal Cells”, *Current Research in Translational Medicine*, 68, (1), 5-16, 2020.

- [17] R. Schofield, "The Relationship Between the Spleen Colony-Forming Cell and the Hemopoietic Stem Cell", *Blood Cells*, 4 (1-2), 7-25, 1978.
- [18] A. Can, "Kök Hücre Biyolojisi, Türleri ve Tedavide Kullanımları", İstanbul: Akademisyen Kitabevi, 2013.
- [19] T.İ. Kaya, "Doku Mühendisliği", *Türkiye Klinikleri J Int Med Sci*, 1(48):165-9, 2018.
- [20] P. Sensharmaa, G.M. Rahul,, D. Jayantc, K. Amit, "Biomaterials and cells for neural tissue engineering: Current choices", *Materials Science and Engineering: C*, 7, 1302-1315, 2017.
- [21] K. Hölzl, S. Lin, L. Tytgat,, V.S Van, L. Gu, A. Ovsianikov "Bioink properties before, during and after 3D bioprinting", *Biofabrication*, 23;8(3):032002, 2016.
- [22] S.R. Shin, Y.C. Li, H.L. Jang, P. Khoshakhlagh, M. Akbari, Nasajpour, A., A. Khademhosseini, "Graphene-based materials for tissue engineering", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 105, Part B, 255-274, 2016.
- [23] Y. Zheng, X. Hong, J. Wang, L. Feng, T. Fan, R. Guo, H. Zhang, "2D Nanomaterials for Tissue Engineering and Regenerative Nanomedicines: Recent Advances and Future Challenges", *Advanced healthcare materials*, 10(7), 2021.
- [24] F. Gattazzo, A. Urciuolo, P. Bonaldo, "Extracellular matrix: A dynamic microenvironment for stem cell niche", *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Gen. Subj.*, 1840, 2506–2519, 2014.
- [25] S.A. Othman ve ark., "Alginate-Gelatin Bioink for Bioprinting of HeLa Spheroids in Alginate-Gelatin Hexagon-Shaped Scaffolds", *Polymer Bulletin*. 78, 6115–6135, 2021.
- [26] J. Yoo ve ark., "Augmented Peripheral Nerve Regeneration Through Elastic Nerve Guidance Conduits Prepared Using a Prous PLCL Membrane with a 3D Printed Collagen Hydrogel", *Biometaterials Science*, 1-12, 2020.
- [27] E. Mooney, P. Dockery, U. Greiser, M. Murphy, V. Barron, "Carbon nanotubes and mesenchymal stem cells: biocompatibility, proliferation and differentiation", *Nano Lett.* 8 (8), 2137e2143, 2008.
- [28] Y.C. Hu, V. M. Ni,, R.C. Haddon, V. Parpura, "Chemically functionalized carbon nanotubes as substrates for neuronal growth", *Nano Lett.* 4 (3), 2004.
- [29] V. Lovat, D. Pantarotto, L. Lagostena, B. Cacciari, M. Grandolfo, M. Righi, G. Spalluto, M. Prato, L. Ballerini, "Carbon nanotube substrates boost neuronal electrical signaling", *Nano Lett.* 5 (6), 2005.
- [30] M. Chen, X. Qin, G. Zeng, "Biodegradation of Carbon Nanotubes, Graphene, and Their Derivatives", *Trends Biotechnology*, 35(9), 836-846, 2017.
- [31] A.M. Pinto, F. D. Magalhães, "Graphene-Polymer Composites", *Polymers*, 13(5), 685, 2021.
- [32] W.C. Lee, C. Lim, H. Shi, L.A.L. Tang, Y. Wang, C.T. Lim, K.P. Loh, Origin of enhanced stem cell growth and differentiation on graphene and graphene oxide, *ACS Nano* 5 (9), 7334e7341, 2011.

- [33] T. Kuila, S. Bose, A.K. Mishra, P. Khanra, N.H. Kim, J.H. Lee, Chemical functionalization of graphene and its applications, *Prog. Mater. Sci.* 57 (7), 1061e1105, 2011.
- [34] V. Georgakilas, M. Otyepka, A.B. Bourlinos, V. Chandra, N. Kim, K.C. Kemp, P. Hobza, R. Zboril, K.S. Kim, Functionalization of graphene: covalent and non-covalent approaches, *Deriv. Appl. Chem. Rev.* 112 (11), 6156e6214, 2012..
- [35] N. S. Binulal, A. Natarajan, D. Menon, V. K. Bhaskaran, U. Mony, S. V. Nair, "PCL–Gelatin Composite Nanofibers Electrospun using Diluted Acetic Acid–Ethyl Acetate Solvent System for Stem Cell-Based Bone Tissue Engineering", *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* 25, 325–340, 2013.
- [36] Y. Qian, X. Zhao, Q. Han, W. Chen, H. Li, W. Yuan, "An integrated multi-layer 3D-fabrication of PDA/RGD coated graphene loaded PCL nanoscaffold for peripheral nerve restoration", *Nat. Commun.* 9, 323, 2018.
- [37] H. P. Bei, Y. Yang, Q. Zhang, Y. Tian, X. Luo, M. Yang, X. Zhao, "Graphene-Based Nanocomposites for Neural Tissue Engineering", *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(4), 658, 2019.
- [38] N. Chopra, D.B. Arya, N. Jain, P. Yadav, S. Wajid, S. P. Singh, S. Choudhury, "Biophysical Characterization and Drug Delivery Potential of Exosomes from Human Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells.", *ACS Omega*, 8, 13143–13152, 2019.
- [39] S. Saedi, S. Israel, C. Nagy, G. Turecki, "The emerging role of exosomes in mental disorders", *Translational Psychiatry*, 9, 122, 2019.
- [40] Y. Zhang,, W.T. Wang, C.R. Gong, C. Li, M. Shi, "Combination of olfactory ensheathing cells and human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomes promotes sciatic nerve regeneration." *Neural Regeneration Research*, 2020.
- [41] B.Yavuz, H.Darici, A.P. Zorba-Yıldız, E.Ş.Abamor, M.Topuzluoğulları, M.Bağirova, A. Allahverdiyev, E.Karagöz, "Formulating and Characterizing an Exosome-based Dopamine Carrier System" *Jove*, 10.3791/63624, 2022.
- [42] S. Ursavaş,, H. Darici,, E. Karaöz, "Olfactory ensheathing cells: Unique glial cells promising for treatments of spinal cord injury", *J Neurosci Res.*,00:1–19, 2021.
- [43] A.B. Karaaltın, M.V. Karaaltın, O.N. Oztel, E. Ovalı,, M.B. Sener, T. Adatepe,, A. Allahverdiyev, "Human olfactory stem cells for injured facial nerve reconstruction in a rat model", *Wiley Online Library. Head & Neck*, 38(S1),2016.
- [44] O.N. Öztel, "İnsan Olfaktor Kök Hücrelerin İzolasyonu Kültürünün Yapılması Karakterizasyonu Ve Hasar Görmüş Fasiyal Sinirin (Ratlarda) Rejenerasyonuna Etkisinin İncelenmesi" (Doktora tezi), 2014.
- [45] H. Yurie, R. Ikeguchi, T. Aoyama, Y. Kaizawa, J. Tajino, A. Ito, S. Matsuda, "The efficacy of a scaffold-free Bio 3D conduit developed from human fibroblasts on peripheral nerve regeneration in a rat sciatic nerve model", *PLOS ONE*, 12(2), 2017.
- [46] S. Chiriac,, S. Facca, M. Diaconu, S. Gouzou, P. Liverneaux, "Experience of using the bioresorbable copolyester poly(DL-lactide-ε-caprolactone) nerve

- conduit guide Neurolac™ for nerve repair in peripheral nerve defects: Report on a series of 28 lesions”, *Journal of Hand Surgery (European Volume)*, 37(4), 342–349, 2011.
- [47] K. Jansen, M. F. Meek, J. F. A. Werff, P. B. Wachem, M. J. A. Luyn, “Long-term regeneration of the rat sciatic nerve through a biodegradable poly(DL-lactide-ε-caprolactone) nerve guide: Tissue reactions with focus on collagen III/IV reformation”, *Journal of Biomedical Materials Research*, 69A(2), 334–341, 2004.
- [48] Z. Jiang, Y. Song, J. Qiao, Y. Yang, W. , Zhang, W. Liu, B. Han, “Rat sciatic nerve regeneration across a 10-mm defect bridged by a chitin/CM-chitosan artificial nerve graft”, *International Journal of Biological Macromolecules*, 129, 997-1005, 2019.
- [49] S. Chen, Y. Zhao, X. Yan, L. Zhang, G. Li, Y. Yang, “PAM/GO/Gel/SA composite hydrogel conduit with bioactivity for repairing peripheral nerve injury”, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 107, 1273-1283, 2019.
- [50] K. L. Moore, “Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi”, Nobel Tıp Kitapevleri, 10. Basım, 2018.
- [51] M. Daneyemez, Y. Kaçar, “Periferik Sinir Cerrahisi Tarihçesi”, Türk Nöroşirürji Derneği Spinal Ve Periferik Sinir Cerrahisi Öğretim Ve Eğitim Grubu Bülteni, Bölüm 4, 11-13, 2015
- [52] F. Acar, N.S.M. Güvençer, U. Türe, M.N. Arda, “Herophilus of Chalcedon: A Pioneer in neuroscience”, *Neurosurg*, 56:581-867, 2005.
- [53] H.J. Seddon, “The use of autogeneous grefts fort he repair of large gaps in peripheral nerves”, *Br J Surg* 35; 151-167, 1947.
- [54] J.H. Jacobson, “Microsurgical technique in the repair of the traumatized extremity”, *Clinical orthopedics*, 29: 132-145, 1963.
- [55] T. Kurze, “Microtechniques in neurological srgery”, *Clin Neurosurg*. 11:128-137, 1964.
- [56] T. Matsuyama, “Peripheral nerve repair and grafting techniques:a review”, *Neurol Med Chir*, 40: 187-99, 2000.
- [57] İ. Elmacı, “Hami Dilek ve periferik sinir cerrahisi”, *Spinal ve Periferik Sinir* 27: 9-10, 2005.
- [58] F. Soyuer, “Travmatik Periferik Nöropati Rehabilitasyonu”, *Van Tıp Dergisi*, Cilt:9, Sayı:4, 2002 .
- [59] D. Kotan, A. A. Gündoğdu , M. Alemdar, “Sakarya İlindeki Herediter Nöropati Hastalarının Demografik, Klinik ve Elektrofizyolojik Özellikleri Demographic, *Sakarya Tıp Dergisi*, Cilt 9, Sayı 1, 120– 124, 2019.
- [60] A. Doğan, “Embryonic stem cells in development and regenerative medicine”, *Adv. Exp. Med. Biol.* 1079, 1–15, 2018.
- [61] S.R. Goodman, “Stem Cells and Regenerative Medicine”, *Goodman's Medical Cell Biology*, Elsevier 4th Edition, 2020.
- [62] D.T. Covas, J.L.C. Siufi, A.R.L. Silva, M.D. Orellana, “Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells”, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 36, 1179–1183, 2003.

- [63] R.A. Panepucci, J.L.C.Siufi, W.A. Silva, R. Proto-Siquiera, L. Neder, M. Orellana, V. Rocha, D.T. Covas, M.A. Zago, "Comparison of gene expression of umbilical cord vein and bone marrow-derived mesenchymal stem cells", *Stem Cells* 22, 1263–1278, 2004.
- [64] J.B. Reece, N.A. Campbell, *Campbell Biology*, Pearson Yayınları, 2011.
- [65] C.İnanır, L.Ekici, "Eksozomlar: Kompozisyonları, Biyolojik Fonksiyonları ve Biyoaktif Bileşiklerin Taşınmasındaki Potansiyelleri", *Akademik Gıda* 18(4), 421-432, 2020.
- [66] S.Bozkurt, "Eksozomlar ve Kanserdeki Rollerini", *Dicle Tıp Dergisi / Dicle Medical Journal*, 45 (2) : 209-217, 2018.
- [67] T. L. Whiteside, "Tumor-Derived Exosomes and Their Role in Cancer Progression", *Advances in clinical chemistry*, 74, 103–141, 2016.
- [68] C. J. Ramírez-Flores, R. Cruz-Mirón, R. Arroyo, M. E. M. Castelán, T. Nopal-Guerrero, S. González-Pozos, E. Ríos-Castro, R. Mondragón-Flores, "Characterization of metalloproteases and serine proteases of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and their effect on epithelial cells", *Parasitology research*, 118(1), 289–306, 2019.
- [69] L. Qing, H. Chen, J. Tang, X. Jia, "Exosomes and their microRNA cargo: new players in peripheral nerve regeneration", *Neurorehabil Neural Repair*, 32(9): 765–776, 2018.
- [70] A.Pasinli, "Biyomedikal Uygulamalarda Kullanılan Biyomalzemeler", *Makine Teknolojileri Elektronik Dergisi*, (4) 25-34, 2004.
- [71] M, Rahaman, "Bioactive glass in tissue engineering", *Acta Biomaterialia*. 7 (6): 2355–2373,2011.
- [72] I. Thompson, A. Boccaccini, "45S5 Bioglass®-derived glass–ceramic scaffolds for bone tissue engineering". *Biomaterials*. 27 (11): 2414–2425, 2006.
- [73] M. Gümüşderelioğlu, "Biyomalzemeler", *Bilim ve Teknik Dergisi, TÜBİTAK, Temmuz özel sayısı*, 2002.
- [74] K. S. Novoselov, A. K. Geim, S. V. Morozov, D. Jiang, Y. Zhang, S. V. Dubonos, I. V. Grigorieva, A. A. Firsov, "Electric field effect in atomically thin carbon films", *Science* 306, 666–669, 2004.
- [75] N. Lu, L. Q. Wang, M. Lv, Z. S. Tang, C. H. Fan, "Graphenebased nanomaterials in biosystems", *Nano Res.*,12, 247–264, 2019.
- [76] M. Islama, S.S. Ahmedb, M. Rashidc, M., "Mechanical and Thermal Properties of Graphene over Composite Materials: A Technical Review", *Akandad Journal of Casting & Materials Engineering* Vol. 3 No. 1, 19–30, 2019.
- [77] N.W.S. Kam, E. Jan, N.A. Kotov, "Electrical stimulation of neural stem cells mediated by humanized carbon nanotube composite made with extracellular matrix protein", *Nano Lett.* 9 (1) 273e278, 2009.
- [78] S.R. Shin, S.M. Jung, M. Zalabany, K. Kim, P. Zorlutuna, S.B. Kim, M. Nikkhah, M. Khabiry, M. Azize, J. Kong, K.T. Wan, T. Palacios, M.R. Dokmeci, H. Bae, X.W. Tang, A. Khademhosseini, "Carbon-Nanotube-embedded hydrogel sheets for engineering cardiac constructs and bioactuators", *ACS Nano*,7(3),2013.

- [79] E. Mooney, P. Dockery, U. Greiser, M. Murphy, V. Barron, “Carbon nanotubes and mesenchymal stem cells: biocompatibility, proliferation and differentiation”, *Nano Lett.* 8 (8),2137e2143, 2008.
- [80] H. Hu, Y.C. Ni, V. Montana, R.C. Haddon, V. Parpura, “Chemically functionalized carbon nanotubes as substrates for neuronal growth”, *Nano Lett.* 4 (3) 2004.
- [81] Y. Lee, S. Bae, H. Jang, S. Jang, S.E. Zhu, S.H. Sim, Y.I. Song, B.H. Hong, J.H. Ahn, “Wafer-scale synthesis and transfer of graphene films”, *Nano Lett.* 10 (2), 2010.
- [82] T.R. Nayak, H. Andersen, V.S.Makam, C. Khaw, S. Bae, X.F. Xu, P.L.R. Ee, J.H. Ahn, B.H. Hong, G. Pastorin, B. Ozyilmaz, “Graphene for controlled and accelerated osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells”, *ACS Nano* 5 (6),4670e4678, 2011.
- [83] W.C. Lee, C. Lim, H. Shi, L.A.L. Tang, Y. Wang, C.T. Lim, K.P. Loh, “Origin of enhanced stem cell growth and differentiation on graphene and graphene oxide”, *ACS Nano* 5 (9), 7334e7341, 2011.
- [84] T. Kuila, S. Bose, A.K. Mishra, P. Khanra, N.H. Kim, J.H. Lee, “Chemical functionalization of graphene and its applications”, *Prog. Mater. Sci.*, 57 (7), 2012.
- [85] V. Georgakilas, M. Otyepka, A.B. Bourlinos, V. Chandra, N. Kim, K.C. Kemp, P. Hobza, R. Zboril, K.S. Kim, “Functionalization of graphene: covalent and non-covalent approaches, *Deriv. Appl. Chem. Rev.*, 112 (11), 2012.
- [86] S.R. Ryoo, Y.K. Kim, M.H. Kim, D.H. Min, “Behaviors of NIH-3T3 fibroblasts on graphene/carbon nanotubes: proliferation, focal adhesion, and gene transfection studies”, *ACS Nano* 4 (11), 2010.
- [87] E. Bressan, A. Carraro, L. Ferroni, C. Gardin, L. Sbricoli, R. Guazzo, E. Stellini, M. Roman, P. Pinton, S. Sivoletta, B. Zavan, “Nanotechnology to drive stem cell commitment”, *Nanomedicine (Lond)*. 8: 469-486, 2013.
- [88] Q. Ma, L. Yang, Z. Jiang, Q. Song, M. Xiao, D. Zhang, X. Ma, T. Wen, G. Cheng, “Three-dimensional stiff graphene scaffold on neural stem cells behavior”, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 8 (50),34227e34233,2016.
- [89] X. Yan, J. Liu, J. Huang, M. Huang, F. He, Z. Ye, W. Xiao, X. Hu, Z. Luo, “Electrical stimulation induces calcium-dependent neurite outgrowth and immediate early genes expressions of dorsal root ganglion neurons”, *Neurochem. Res.* 39, 129–141, 2014.
- [90] W. Zhu, B.T. Harris, , L.G. Zhang, “Gelatin methacrylamide hydrogel with graphene nanoplatelets for neural cell-laden 3D bioprinting”, In *Proceedings of the 2016 IEEE 38th Annual International Conference of the Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC)*, pp. 4185–4188, 2016.
- [91] J.T. Yeh, M.C. Yang, C.J. Wu, C.S. Wu, “Preparation and Characterization of Biodegradable Polycaprolactone/Multiwalled Carbon Nanotubes Nanocomposites”. *J Appl Polym Sci*,112(2):660-8, 2009.
- [92] I. Janigova, F. Lednicky, D.J. Moskova, I. Chodak, “Nanocomposites with Biodegradable Polycaprolactone Matrix”, *Macromol Symp.*301:1-8, 2011.

- [93] R. Song, M. Murphy, C. Li, K. Ting, C. Soo, Z. Zheng, “Current development of biodegradable polymer materials for biomedical applications”, *Drug design, development and therapy*, 12, 3117–3145, 2018.
- [94] J. Ahmed, R. Auras, T. Kijchavengkul, S. K. Varshney, “Rheological, thermal and structural behavior of poly( $\epsilon$ -caprolactone) and nanoclay blended films”, *Journal of Food Engineering*, 111(4), 580–589, 2012.
- [95] H. Peng, Y. Han, T. Liu, W. C. Tjiu, C. He, “Morphology and thermal degradation behavior of highly exfoliated CoAl-layered double hydroxide/polycaprolactone nanocomposites prepared by simple solution intercalation”. *Thermochimica Acta*, 502, 1–7, 2010.
- [96] F. Yahiaoui, F. Benhacine, H. Ferfera-Harrar, A. Habi, A. S. Hadj-Hamou, Y. Grohens, “Development of antimicrobial PCL/nanoclay nanocomposite films with enhanced mechanical and water vapor barrier properties for packaging applications”. *Polymer Bulletin*, 72, 235–254, 2015.
- [97] R. Dwivedi, S. Kumar, R. Pandey, A. Mahajan, D. Nandana, D.S. Katti, D. Mehrotra, “Polycaprolactone as biomaterial for bone scaffolds: Review of literature”, *J Oral Biol Craniofac Res.*, 10(1):381-388,2020.
- [98] D.A. Foyt, M.D.A. Norman, T.T.L. Yu, E. Gentleman, “Exploiting Advanced Hydrogel Technologies to Address Key Challenges in Regenerative Medicine”, *Adv Healthc Mater.*, 7(8):e1700939, 2018.
- [99] Z. Xie, M. Gao, A.O. Lobo, T.J. Webster “3D Bioprinting in Tissue Engineering for Medical Applications: The Classic and the Hybrid”, *Polymers*, 31;12(8):1717,2020.
- [100] S.Agarwala,“A Perspective on 3D Bioprinting Technology:Present and Future” *American Journal of Engineering and Applied Sciences* 9, 985-990, 2016.
- [101] C.R. Lynch, P.P.D. Kondiah, Y.E. Choonara, “Advanced Strategies for Tissue Engineering in Regenerative Medicine: A Biofabrication and Biopolymer Perspective”, *Molecules*, 26;26(9):2518,2021
- [102] J.H.Chung, S. Sayyar, G. G. Wallace, “Effect of Graphene Addition on Polycaprolactone Scaffolds Fabricated Using Melt-Electrowriting”. *Polymers*, 14(2), 319, 2022.
- [103] M.L. Muerza-Cascante, D. Haylock, D. W. Hutmacher, P. D. Dalton, “Melt electrospinning and its technologization in tissue engineering”. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 21(2), 187-202, 2015.
- [104] A. Hrynevich, B.S. Elci, J.N. Haigh, R. McMaster, A. Youssef, C. Blum, T. Blunk, G. Hochleitner, J. Groll, P. D. Dalton, “The Next Frontier in Melt Electrospinning: Taming the Jet, *Adv. Funct. Mater.*, 29, 1904664, 2019.
- [105] F. Feron, C. Perry, J. Cochrane, P. Licina, A. Nowitzke, S. Urquhart, T. Geraghty, A. Mackay-Sim,“Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human spinal cord injury”. *Brain*, 128(12), 2951–2960, 2005.
- [106] A. Mackay-Sim, F. Feron, J. Cochrane, L. Bassingthwaighe, C. Bayliss, W. Davies ve ark., “Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human paraplegia: A 3-year clinical trial”, *Brain*, 131(9), 2376–2386, 2008.



- [107] B. C. Li, Y. Li, L. F. Chen, J. Y. Chang, Z. X. Duan, “Olfactory ensheathing cells can reduce the tissue loss but not the cavity formation in contused spinal cord of rats”, *Journal of the Neurological Sciences*, 303(1–2), 67–74, 2011.
- [108] R. McMaster, C. Hoefner, A. Hrynevich, C. Blum, M. Wiesner, K. Wittmann, T. R. Dargaville, P. Bauer-Kreisel, J. Groll, P. D. Dalton, T. Blunk, “Tailored Melt Electrowritten Scaffolds for the Generation of Sheet-Like Tissue Constructs from Multicellular Spheroids” *Adv. Healthcare Mater.*, 8, 1801326, 2019.
- [109] C. Kose, R. Kacar, A.P. Zorba, M. Bagirova, A. Allahverdiyev, “The Effect of CO<sub>2</sub> Laser Beam Welded AISI 316L Austenitic Stainless Steel on the Viability of Fibroblast Cells, *in vitro*”, *Materials Science and Engineering: C*, 60, 211-218, 2016.
- [110] G. Bora-Tatar, H. Erdem-Yurter, “Investigations of curcumin and resveratrol on neurite outgrowth: perspectives on spinal muscular atrophy”, *Biomed Res Int*. 709108, 2014.
- [111] (N. Dai, Y. C. Yu, T. H. Ren, J. G. Wu, L. G. Shen, J. Zhang, “Gynura root induces hepatic veno-occlusive disease: A case report and review of the literature”, *World Journal of Gastroenterology*, 13(10), 1628–1631, 2007.
- [112] J. G. Huang, C. B. Shen, W. Bin Wu, J. W. Ren, L. Xu, S. Liu, Q. Yang, “Primary cilia mediate sonic hedgehog signaling to regulate neuronal-like differentiation of bone mesenchymal stem cells for resveratrol induction *in vitro*”, *Journal of Neuroscience Research*, 92(5), 587–596, 2014.
- [113] A.P. Zorba Yildiz, H. Darici, B. Yavuz, E.S., Abamor, C. Ozdemir, M.E. Yasin, M. Bagirova, A. Allahverdiyev, E. Karaoz, “Preparation and Characterization of Graphene-Based 3D Biohybrid Hydrogel Bioink for Peripheral Neuroengineering”. *J Vis Exp.*, (183), 2022.
- [114] F. Rao, D. Zhang, T. Fang, C. Lu, B. Wang, X. Ding, S. Wei, Y. Zhang, W. Pi, H. Xu, Y. Wang, B. Jiang, P. Zhang, “Exosomes from Human Gingiva-Derived Mesenchymal Stem Cells Combined with Biodegradable Chitin Conduits Promote Rat Sciatic Nerve Regeneration”, *Stem Cells International*, 2546367, 12, 2019.
- [115] X., L. Peng, Z. Yang, Z. Guoliang, F. X.Fengbao, “Functionalization of Graphene with Nitrile Groups by Cycloaddition of Tetracyanoethylene Oxide”, *Journal of Nanomaterials*, 1-5. 10.1155/2013/841789 ,2013.
- [116] C. Xiao, H. Liu, Y. Lu, L. Zhang, “Blend films from sodium alginate and gelatin solutions”, *J. Macromol. Sci. Part A*, 38, 317–328, 2001.
- [117] L. Chen, G. Q. Daley, “Molecular basis of pluripotency”, *Human Molecular Genetics*, 17(R1), R23–R27, 2008.
- [118] J. Dahlstrand, M. Lardelli, U. Lendahl, “Nestin mRNA expression correlates with the central nervous system progenitor cell state in many, but not all, regions of developing central nervous system”, *Brain research. Developmental brain research*, 84(1), 109–129,1995.
- [119] B. Başer, “3b Biyoyazıcı Kullanılarak Oluşturulan Dokularda Mezenkimal Kök Hücre Gen Ekspresyonlarının Karşılaştırılması”, (Yüksek Lisans Tezi), 2022.

- [120] G. Constante, I. Apsite, H. Alkhamis, M. Dulle, M. Schwarzer, A. Caspari, A. Synytska, S. Salehi, L. Ionov, “4D Biofabrication Using a Combination of 3D Printing and Melt-Electrowriting of Shape-Morphing Polymers” *ACS Applied Materials & Interfaces*, 13 (11), 12767-12776, 2021.
- [121] M. B. Łabowska, K. Cierluk, A.M.Jankowska, J. Kulbacka, J. Detyna, I. Michalak, “A Review on the Adaption of Alginate-Gelatin Hydrogels for 3D Cultures and Bioprinting”, *Materials (Basel, Switzerland)*, 14(4), 858, 2021.
- [122] S.M. Hosseini, A. Vasaghi, N. Nakhparvar, R. Roshanravan, T. Talaei-Khozani, Z. Razi, “Differentiation of Wharton's jelly mesenchymal stem cells into neurons in alginate scaffold”, *Neural Regen Res.* 10(8):1312-6, 2015.
- [123] J. Guo, C. Walss-Bass, R. F. Ludueña, “The beta isotypes of tubulin in neuronal differentiation”, *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)*, 67(7), 431–441, 2010.
- [124] A. Ferreira, A. Caceres, “Expression of the class III  $\beta$ -tubulin isotype in developing neurons in culture”, *J Neurosci Res.*, 32(4):516–29, 1992.



# TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

---

## Konferans Bildirileri

1. **A.P. Zorba Yıldız**, B. Yavuz, E.Ş. Abamor, H. Darici, M. Bağırova, A. Allahverdiyev, “3D Therapeutic Approaches for Peripheral Nerve Damage”, 9th International Molecular Biology and Biotechnology Congress, 6-10 December 2020. (Sözlü Bildiri)

2. B. Yavuz, **A.P. Zorba Yıldız**, Ruşen, E., E.Ş. Abamor, H. Darici, M. Bağırova, A. Allahverdiyev, “A New Approach to Biomarker of Parkinson’s Disease: Exosomes”, 9th International Molecular Biology and Biotechnology Congress, 6-10 December 2020. (Sözlü Bildiri)

## Makaleler

1. **A.P. Zorba Yıldız**, H. Darici, B. Yavuz, E.S. Abamor, M. Bagirova, C. Ozdemir, M.E. Yasin, A. Allahverdiyev, E.Karaoz “Preparation and Characterization of GrapheneBased 3D Biohybrid Hydrogel Bioink for Peripheral Neuroengineering”, JoVE Journal of Visualized Experiments e63622, doi:10.3791/63622, 2022.

2. B. Yavuz, H. Darici, **A.P. Zorba Yıldız**, E.Ş. Abamor, M. Topuzoğullari, M. Bağırova, A. Allahverdiyev, E. Karaoz, “Formulating and Characterizing an Exosome-based Dopamine Carrier System” JoVE Journal of Visualized Experiments (182), e63624, doi:10.3791/63624 ,2022.

## Projeler

1. “Sinir Sistem Hastalıklarında Eksozom Temelli Tedavi Yaklaşımlarının Geliştirilmesi”, YTÜ- BAP, Genel Araştırma Projesi (Proje No: TSA-2021-4713) (2021-halen) (Araştırmacı)

2. “Mezenkimal Kök Hücrelerin Grafen Eklenmiş Biyomürekkeplerle 3B Biyoyazıcılarda Basımı ve Farklılaştırılması” TÜBİTAK 2209-B- Sanayi Odaklı Lisans Bitirme Tezi Destekleme Programı (Başvuru Numarası: 1139B411802273) (2019-Temmuz 2020). (Akademik Danışman)