T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

REJENERE İPEK FİBROİNİ/HÜCRESİZLEŞTİRİLMİŞ OMURİLİK MENİNKS KAYNAKLI DOKU MÜHENDİSLİĞİ YAPI İSKELELERİNİN ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TUĞÇE KURT

Tez Danışmanı
DOÇ. DR. YAVUZ EMRE ARSLAN

ÇANAKKALE – 2025

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

REJENERE İPEK FİBROİNİ/HÜCRESİZLEŞTİRİLMİŞ OMURİLİK MENİNKS KAYNAKLI DOKU MÜHENDİSLİĞİ YAPI İSKELELERİNİN ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TUĞÇE KURT

Tez Danışmanı
DOÇ. DR. YAVUZ EMRE ARSLAN

Bu çalışma, Canakkale Onsekiz Mart Universitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.
Proje No: FYL-2023-4519

ÇANAKKALE – 2025

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

Tuğçe KURT tarafından Doç. Dr. Yavuz Emre ARSLAN yönetiminde hazırlanan ve **01/08/2025** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan "**Rejenere İpek Fibroini/Hücresizleştirilmiş Omurilik Meninks Kaynaklı Doku Mühendisliği Yapı İskelelerinin Üretimi ve Karakterizasyonu**" başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü **Biyomühendislik Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	**İmza**
Doç. Dr. Yavuz Emre ARSLAN (Danışman)	……
Doç. Dr. Elif KARACAN YELDİR	……
Doç. Dr. Burak DERKUŞ	…….

Tez No : 10600445
Tez Savunma Tarihi : 01/08/2025

……
Prof. Dr. Melis ULU DOĞRU
Enstitü Müdürü

../../2025

ETİK BEYAN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kuralları'na uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında; tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi taahhüt ve beyan ederim.

Tuğçe KURT
01/08/2025

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleştirilmesinde, yalnızca akademik bilgi ve rehberliğiyle değil; her aşamada sunduğu içten desteği, sabrı ve yol göstericiliğiyle yanımda olan; bana bir ekibin değil, bir ailenin parçasıymışım gibi hissettiren, benim için yalnızca bir danışman değil, aynı zamanda mentörüm olan kıymetli hocam Doç. Dr. Yavuz Emre ARSLAN'a,

Çalışma süresince kıymetli bilgi birikimini, tecrübesini ve manevi desteğini bir an olsun esirgemeyen, her zaman güven veren yaklaşımıyla yanımda olan değerli hocam Dr. Tuğba Sezgin ARSLAN'a

Yüksek lisans sürecim boyunca her sıkıştığımda yanımda olan, yaşadığım tüm zorluklara katlanma gücü veren; benim için yalnızca bir ekip arkadaşı değil, aynı zamanda ailem ve dostum olan, birbirinden değerli yol arkadaşlarım Dr. Gürkan AKARKEN, Berk Deniz TOSUNOĞLU, Doğaç TAMTÜRK, Eylül ERDAL, Fikri Mert ŞİMŞEK, Görkem SARUHAN ve Arş. Gör. Eren ÖZÜDOĞRU'ya

Çalışmamın ilk günlerinden itibaren fikirleri ve desteğiyle yanımda olan, süreç içinde mezun olup yollarımızın ayrıldığı değerli çalışma arkadaşlarım Şerife BEKAR, Elif Beyza DEMİRAY, Safiye YILDIZ'a

Zor zamanlarımda desteğini her daim yanımda hissettiren, tüm stresime ve yorgunluğuma sabırla ortak olan Remzi GÜVEN'e

Hayatımın her evresinde maddi ve manevi desteğini bir an olsun esirgemeyen; her türlü zorluğa göğüs germem için beni cesaretlendiren, hayallerime ortak olan, benimle gülüp ağlayan kıymetli aileme, çocukları olduğum için binlerce kez şükrettiğim biricik annem Neriman KURT'a ve biricik babam Orhan KURT'a, canım abim Okay KURT ve benim için kız kardeşten farksız Elif KURT'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmanın başarıyla yürütülmesinde ve analizlerin gerçekleştirilmesinde bilgi birikimlerini ve laboratuvar olanaklarını paylaşan Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne içten teşekkür ederim.

Bu araştırma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından finansal olarak desteklenmiştir (FYL-2023-4519).

Tuğçe KURT

Çanakkale, Ağustos 2025

ÖZET

REJENERE İPEK FİBROİNİ/HÜCRESİZLEŞTİRİLMİŞ OMURİLİK MENİNKS KAYNAKLI DOKU MÜHENDİSLİĞİ YAPI İSKELELERİNİN ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU

Tuğçe KURT
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Biyomühendislik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi
Danışman: Doç. Dr. Yavuz Emre ARSLAN
01/08/2025, 100

Sinir sisteminde meydana gelen yapısal hasarların kalıcı fonksiyon kayıplarına yol açması, bu alanda etkili biyomalzemelerin geliştirilmesini hayati hale getirmiştir. Özellikle omurilik yaralanmalarında rejeneratif kapasitenin sınırlı olması, doku mühendisliği temelli çözümlerin önemini artırmaktadır. Bu çalışmada, hedef dokuya biyokimyasal ve yapısal açıdan benzerlik gösteren özgün bir hidrojel sistemi geliştirilmiştir. Deterjan içermeyen, ultrasonik destekli bir yöntemle hücresizleştirilen spinal kord meninks dokusundan elde edilen hücre dışı matriks (HDM), çözünürlüğü iyileştirilmiş, liyofilize edilerek stabil formda elde edilen suda çözünebilir ipek fibroin (İF) ile birleştirilmiştir. Ortaya çıkan kompozit sistem, HRP/H_2O_2 aracılığıyla enzimatik olarak çapraz bağlanarak üç boyutlu hidrojel yapısına dönüştürülmüştür. Karakterizasyon sürecinde, çift sarmal DNA, hidroksiprolin ve glikozaminoglikan içerikleri kantitatif olarak analiz edilmiş; agaroz jel ve SDS-PAGE teknikleriyle hücresel kalıntılar değerlendirilmiştir. SEM görüntüleme, mikro mekanik ve reolojik testlerle yapısal özellikler; ATR-FTIR, XRD, TGA ve BET analizleriyle kimyasal ve fiziksel nitelikler ortaya konmuştur. Şişme, temas açısı ve in vitro bozunurluk testleriyle fonksiyonel parametreler incelenmiştir. Hücre kültürü deneylerinde nöroblastoma hücre hattı kullanılarak canlılık, proliferasyon ve miyojenik gen ekspresyonu (RT-qPCR) analiz edilmiştir. CAM modeliyle de anjiyojenik potansiyel doğrulanmıştır. Elde edilen sonuçlar, geliştirilen dSCM-İF hidrojel sisteminin sinir doku mühendisliği için biyofonksiyonel bir platform sunduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Ultrasonik hücresizleştirme, Suda çözünebilir ipek fibroini, Enzimatik çapraz bağlama, Sinir doku mühendisliği, Hidrojel

ABSTRACT

FABRICATION AND CHARACTERIZATION OF REGENERATED SILK FIBROIN/DECELLULARIZED SPINAL MENINGES-DERIVED TISSUE ENGINEERED SCAFFOLDS

Tuğçe KURT
Çanakkale Onsekiz Mart University
School of Graduate Studies
Master of Science Thesis in Bioengineering
Advisor: Assoc. Prof. Dr. Yavuz Emre ARSLAN
01/08/2025, 100

Structural damage in the nervous system often results in permanent functional loss, making the development of effective biomaterials in this field critically important. Particularly in spinal cord injuries, the limited regenerative capacity of neural tissue has increased the significance of tissue engineering-based approaches. In this study, a novel hydrogel system was developed that structurally and biochemically mimics the target tissue. The extracellular matrix (ECM) obtained from decellularized spinal cord meninges via a detergent-free, ultrasonically assisted protocol was combined with water-soluble silk fibroin (SF), which had been lyophilized to ensure long-term stability. The resulting composite system was enzymatically crosslinked using horseradish peroxidase (HRP) and hydrogen peroxide (H_2O_2) to form a three-dimensional hydrogel network. For characterization, the contents of double-stranded DNA, hydroxyproline, and glycosaminoglycans were quantitatively analyzed, and cellular residues were assessed using agarose gel electrophoresis and SDS-PAGE. Structural properties were evaluated through SEM imaging, micromechanical testing, and rheological analysis, while chemical and physical properties were determined via ATR-FTIR, XRD, TGA, and BET analyses. Functional performance was assessed by swelling ratio, contact angle measurements, and in vitro degradation tests. In vitro experiments using a neuroblastoma cell line examined cell viability, proliferation, and myogenic gene expression (RT-qPCR). Additionally, angiogenic potential was confirmed through the CAM assay. The results demonstrated that the developed dSCM-SF hydrogel system offers a biofunctional platform for neural tissue engineering applications.

Keywords: Ultrasonic decellularization, Water-soluble silk fibroin, Enzymatic crosslinking, Neural tissue engineering, Hydrogel

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

JÜRİ ONAY SAYFASI……..……... iv
ETİK BEYAN…… v
TEŞEKKÜR…….. vi
ÖZET ……..…….. viii
ABSTRACT …….. x
İÇİNDEKİLER ……..…… xii
SİMGELER ve KISALTMALAR…….....……. xv
TABLOLAR DİZİNİ…….…. xvii
ŞEKİLLER DİZİNİ……...……...…….….. xviii

BİRİNCİ BÖLÜM
GİRİŞ

1.1. Sinir Sistemi…….…….....…….…… 3
1.1.1. Sinir Sisteminin Genel Yapısı ve İşlevi…….…….. 5
1.1.2. Omurilik Anatomisi ve Fizyolojisi…….…….. 6
1.1.3. Omurilik Meninkslerinin Yapısı ve Biyolojik Rolü……..… 8
1.2. Sinir Doku Mühendisliği ve Rejeneratif Yaklaşımlar…….....…….. 9
1.2.1. Hücre Dışı Matriks (HDM) Temelli Biyomalzemeler…….…… 13
1.3. Doğal Polimerler…….…….....…….. 15
1.3.1. İpek Fibroini (İF)…….…… 17
1.4. Çapraz Bağlı Biyomalzemeler…….…… 19

İKİNCİ BÖLÜM
KURAMSAL ÇERÇEVE/ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 24

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM
ARAŞTIRMA YÖNTEMİ/MATERYAL YÖNTEM 28

3.1. Materyal…….……...……..... 28
3.2. Yöntem…….……... 28

3.2.1. Sığır Omurilik Meninks Dokusunun Hücresizleştirilmesi……... 28
3.2.2. Hücresizleştirilmiş Omurilik Meninks Dokusunun Sindirilmesi…..…. 29
3.2.3. Suda Çözünür İpek Fibroin Ekstraksiyonu…….. 31
3.2.4. Çift Sarmal DNA İçerik Analizi…… 32
3.2.5. Hidroksiprolin İçerik Analizi…… 32
3.2.6. Glikozaminoglikan (sGAG) İçerik Analizi……... 33
3.2.7. Agaroz Jel Elektroforezi…… 34
3.2.8. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) Analizi……... 35
3.2.9. Kompozit Hidrojellerin Üretimi…… 38
3.2.10. Mikromekanik Analiz……... 39
3.2.11. Reolojik Analizler……. 40
3.2.12. Atenüe Toplam Reflektans Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (ATR-FTIR) Spektroskopisi……. 41
3.2.13. Termogravimetrik Analiz (TGA)…….. 41
3.2.14. X-Işını Difraktometre Analizi (XRD)……... 42
3.2.15. Brunauer-Emmett-Teller (BET) Analizi……... 42
3.2.16. Temas Açısı Analizi…….. 42
3.2.17. Şişme Testi…… 43
3.2.18. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM)…… 43
3.2.19. In Vitro Bozunurluk Analizi……. 44
3.2.20. Immuno/Histokimyasal Analizler……. 44
3.2.21. In Ovo Civciv Koriyoallantoik Membran (CAM) Testi ile Kriyojellerin Anjiyojenik Özelliklerinin Belirlenmesi……. 45
3.2.22. Hücresel Deney Tasarımı ve Kültür Koşulları……. 47
3.2.23. Hücre Canlılığı ve Çoğalması Analizi…….. 47
3.2.24. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR) Analizleri…….. 48
3.2.25. İstatistiksel Analiz……. 48

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM
ARAŞTIRMA BULGULARI 50

4.1. Sığır Omurilik Meninksinin Hücresizleştirilmesi ve DNA İçerik Analizi…….... 50
4.2. Hidroksiprolin ve Glikozaminoglikan İçerik Analizi…….. 52
4.3. Agaroz Jel Elektroforezi……. 55

4.4. SDS-PAGE Analizi……. 56
4.5. Histolojik Değerlendirme…… 58
4.6. Mikromekanik Analiz……. 59
4.7. Reolojik Analizler……... 61
4.8. ATR-FTIR Sonuçları…….. 64
4.9. TGA Sonuçları…… 65
4.10. XRD Sonuçları…… 66
4.11. Temas Açısı Analizi…… 68
4.12. Yüzey Morfolojisi ve Gözeneklilik Analizi…… 69
4.13. Şişme Testi……..... 72
4.14. *In Vitro* Bozunurluk…… 74
4.15. *In Ovo* CAM Analizi……... 75
4.16. Hücre Canlılığı ve Sitotoksisite Testleri……. 79
4.17. Gen Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi (qRT-PCR)…… 81
4.18. Histolojik ve İmmünohistokimyasal İncelemeler…… 82

BEŞİNCİ BÖLÜM
SONUÇ ve ÖNERİLER 85

KAYNAKÇA ...……. 88

SİMGELER VE KISALTMALAR

HDM	Hücre dışı matriks
İF	İpek fibroin
HRP	Horseradish peroxidase
MSS	Merkezi sinir sistemi
PSS	Periferik sinir sistemi
BOS	Beyin omurilik sıvısı
GAG	Glikozaminoglikanlar
RGD	Arginin-glisin-aspartik asit
DAT	Hücresizleştirilmiş yağ dokusu
ASC	Yağ doku kaynaklı kök hücreler
BMSC	Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler
dH_2O	Distile su
ddH_2O	Çift distile su
çsDNA	Çift sarmallı DNA
Na_2CO_3	Sodyum karbonat
dSCM-D	Deterjanla hücresizleştirilmiş doku
dSCM-US	Ultrasonik yöntemle hücresizleştirilmiş doku
SDS	Sodyum dodesil sülfat
BR	Broad Range
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
HYP	Hidroksiprolin
sGAG	Sülfatlanmış glikozaminoglikanlar
DMMB	1,9-dimetil-metilen mavisi
TBE	1X Tris-Borik Asit-EDTA
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi
APS	Amonyum persülfat
TEMED	tetrametiletilendiamin
CBB	Coomassie Brilliant Blue
dSCM	Deselülarize spinal kord meninks
LVR	Doğrusal viskoelastik bölge
G′	Depolama modülü

G″	Kayıp modülü
Tan δ	Sönümleme faktörü
ATR-FTIR	Atenüe Toplam Reflektans Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
TGA	Termogravimetrik Analiz
XRD	X-Işını Difraktometre Analizi
BET	Brunauer-Emmett-Teller
PBS	Fosfat tamponlu salin
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
CAM	Civciv koriyoallantoik membran
FBS	Fetal bovin serumu
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
HIER	İndüklenmiş antijen geri kazanım
EthD-1	Ethidium Homodimer-1
RT-qPCR	Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
H&E	Hematoksilen-eozin
qRT-PCR	Gen ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi
BSA	Bovine serum albumin
ADSC	Yağ dokusu kaynaklı stromal hücreler

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo No	Tablo Adı	Sayfa No
Tablo 1	SDS-PAGE analizinde kullanılan çözeltiler ve içerikleri	36
Tablo 2	SDS-PAGE analizinde kullanılan boyama ve boya uzaklaştırma çözeltilerinin bileşenleri ve hazırlanma oranları	37
Tablo 3	Kompozit kriyojellerin gözenek boyutları	72

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Şekil Adı	Sayfa No
Şekil 1	Merkezi ve periferal sinir sisteminin şematik gösterimi	4
Şekil 2	İnsan omurgasının anatomik bölgelerinin sınıflandırılması	6
Şekil 3	Gri ve beyaz madde yapısı ve omuriliği çevreleyen üç ana meninks katmanının anatomik konumlarını ve ilişkilerini gösteren şematik temsil	8
Şekil 4	Sinir doku mühendisliğinde kullanılan biyomalzeme türleri ve hedef doku bölgeleri	11
Şekil 5	Hücresizleştirilmiş hücre dışı matriks (HDM) biyomalzemelerinin elde edilme, karakterizasyon ve uygulama süreçlerinin şematik gösterimi	12
Şekil 6	Hücre dışı matriksin (HDM) temel bileşenleri	14
Şekil 7	Doğal polimerlerin biyolojik kaynakları, kimyasal yapıları, üretim teknikleri ve rejeneratif tıptaki uygulama alanlarının şematik temsili	16
Şekil 8	İpek fibroinin serisin ayrımı sonrası yapısal ve moleküler organizasyonu	18
Şekil 9	İpek fibroinin farklı kaynaklardan elde edilerek film, hidrojel, gözenekli yapı, nanolif, örgü ve 3B baskı gibi çeşitli iskele formatlarına dönüştürülmesi	19
Şekil 10	Çapraz bağlama yöntemlerinin yapısal karşılaştırması	22
Şekil 11	Sığır omurilik meninks dokusunun hücresizleştirilmesi aşamaları	29
Şekil 12	Farklı asit çözeltileriyle hazırlanan meninks pre-gel örnekleri	30
Şekil 13	0,01 M HCl ile sindirilmiş meninks pre-gel örneğinin nötralizasyon sonrası jel formu	31
Şekil 14	Suda çözünebilir ipek fibroin (İF) üretim sürecine ait görsel işlem basamakları	32
Şekil 15	Hidroksiprolin analizine ait renk değişimleri	33

Şekil 16	sGAG tayini için boya uygulanmış meninks örneklerinin spektrofotometrik ölçümüne yönelik hazırlanan küvet görüntüleri	34
Şekil 17	Agaroz jel elektroforezi sistemi (A) Jel görüntüleme cihazı (B)	34
Şekil 18	Elektoforez sistemi ve örneklerin yürütülme aşaması	38
Şekil 19	Olgunlaşan kompozit hidrojellerin stereo mikroskop görüntüleri	39
Şekil 20	1:0,5 oranındaki kompozit hidrojel örneğine ait basma testi sırasında elde edilen deformasyon görüntüleri (t = 0, 30, 60, 90 s)	40
Şekil 21	Kompozit hidrojel örneğinin reolojik analiz öncesinde DHR-2 reometrede paralel plaka sistemiyle konumlandırılması	41
Şekil 22	CAM testi aşamaları. (A) İlk inkübasyon, (B) EDD3'te açılan pencere görünümü, (C) Pencere açılan yumurtaların yeniden inkübasyonu	46
Şekil 23	Ham ve hücresizleştirilmiş omurilik meninks dokuları	51
Şekil 24	DNA içerik analizi	52
Şekil 25	Hidroksiprolin içerik analizi	53
Şekil 26	Glikozaminoglikan içerik analizi	54
Şekil 27	Agaroz jel görüntüsü	56
Şekil 28	SDS-PAGE jel görüntüsü	57
Şekil 29	Ham doku ve hücresizleştirilmiş omurilik meninks örneklerinin histolojik karşılaştırması	59
Şekil 30	Kompozit hidrojellerin gerinim-gerilim grafikleri	60
Şekil 31	Kompozit hidrojellerin young modülü değerleri	61
Şekil 32	Kompozit hidrojellerin depo (G′) ve kayıp (G″) modülü değerleri	62
Şekil 33	Kompozit hidrojellerin kendini toparlama davranışları	63
Şekil 34	Kompozit kriyojellerin FTIR spektrumları	65
Şekil 35	Kompozit kriyojellerin, dSCM-US ve İF örneklerinin TGA ve DTG eğrileri	66
Şekil 36	Kompozit kriyojellerin, dSCM-US ve İF örneklerinin XRD spektrumları	68

Şekil 37	Kompozit kriyojellerin temas açısı analiziyle ıslanabilirliğine ait görseller	69
Şekil 38	Kompozit kriyojellerin SEM mikrografları (A), gözenek boyutu analizi (B)	71
Şekil 39	Kompozit kriyojellerin şişme oranları	73
Şekil 40	Kompozit kriyojellerin 7. ve 14. günlerdeki in vitro bozunurluk oranları	75
Şekil 41	Kompozit hidrojellerin CAM üzerine implantasyon sonrası 7. ve 11. embriyonik gelişim günlerindeki stereo mikroskop görüntüleri (A), Vasküler yoğunluk indeksi değerlerinin karşılaştırması (B)	77
Şekil 42	In ovo CAM testi sonucu hücre yüklü kompozit kriyojellerden elde edilen histogramlar (A), hücre yüklü kriyojellerin SEM mikrografları (B)	78
Şekil 43	Calcein-AM/EthD-1 boyası ile SH-SY5Y hücrelerinin canlılık analizi	80
Şekil 44	MTS testi ile SH-SY5Y hücre çoğalmasının kantitatif analizi	81
Şekil 45	Kompozit hidrojeller üzerinde kültürlenen SH-SY5Y hücrelerinde, 2. ve 7. günlerde MAP2 ve βIII-Tubulin genlerine ait bağıl ekspresyon düzeyleri	82
Şekil 46	SH-SY5Y hücrelerinin A) Hematoksilen-eozin (H&E) ve B) Toluidin mavisi (TB) ile histolojik boyamaları.	83
Şekil 47	SH-SY5Y hücrelerinde A) β- βIII-tubulin ve B) MAP2 immünohistokimyasal boyamaları.	84

BİRİNCİ BÖLÜM
GİRİŞ

Sinir doku mühendisliği, geri dönüşü olmayan nörolojik kayıpların önlenmesi ve tedavisi için multidisipliner yaklaşımlar sunan, hızla gelişen bir araştırma alanı haline gelmiştir. Özellikle omurilik yaralanmaları, travmalar ve dejeneratif hastalıklar; bireylerin yaşam kalitesini doğrudan etkileyen ciddi fonksiyonel kayıplara neden olmaktadır (Feng vd., 2022). Konvansiyonel tedavi yaklaşımları olan otogreft ve allogreft uygulamaları, rejenerasyon mesafesinin sınırlı olması, donör yetersizliği, immünojenik yanıt riski ve fonksiyonel entegrasyonun sağlanamaması gibi önemli kısıtlarla karşı karşıyadır (Wang vd., 2019). Bu nedenle, sinir dokusunun doğal mikro çevresini taklit eden, biyofonksiyonel ve işlenebilir yapılar sunabilecek yeni nesil biyomalzemelere olan ihtiyaç her geçen gün artmaktadır.

Doku mühendisliği bu doğrultuda; hücre, büyüme faktörü ve biyomalzeme kombinasyonları ile sinir dokusunun onarılmasını amaçlayan yenilikçi stratejiler geliştirmektedir. Bu stratejilerde, iskele işlevi görecek biyomalzemenin biyouyumluluğu, hücre proliferasyonunu destekleyici yüzey özellikleri, uygun mikromekanik davranışı ve doğal hücre dışı maktrikse (HDM) benzer yapıda olması temel gerekliliklerdendir (Chen vd., 2024). Bu nedenle doğal kaynaklı biyopolimerler ve özellikle hücresizleştirilmiş dokulardan elde edilen HDM temelli malzemeler sinir doku mühendisliğinde ön plana çıkmaktadır (Koffler vd., 2019). HDM temelli biyomalzeme üretiminde uygulanan klasik hücresizleştirme protokolleri sıklıkla Triton X-100, sodyum dodesil sülfat (SDS) gibi deterjanlar kullanmakta; bu da hücre kalıntılarının uzaklaştırılmasında etkili olmasına rağmen, HDM'in biyolojik ve yapısal bütünlüğüne zarar verebilmektedir (Gilbert vd., 2006). Bu bağlamda, çalışmamızın en önemli yeniliklerinden biri, herhangi bir deterjan kullanmaksızın yalnızca enzimatik ve ultrasonik destekli bir hücresizleştirme yöntemi ile omurilik meninks dokusundan HDM elde edilmesidir. Bu yöntem sayesinde, HDM bileşenlerinin (kollajen, GAG, laminin vb.) yapısal ve biyokimyasal bütünlüğü yüksek oranda korunurken, hücresel kalıntılar etkin şekilde uzaklaştırılmıştır. Aynı zamanda deterjan içermemesi, hem hücre uyumluluğunu artırmakta hem de çevreye ve hücre kültürü sistemlerine zarar vermemektedir (Keane vd., 2015).

Literatürde sinir doku mühendisliği kapsamında deterjansız hücresizleştirme protokolüyle elde edilen HDM kaynaklı hidrojel çalışmaları oldukça sınırlı olup, bu yönüyle çalışma özgünlük arz etmektedir. Ham doku olarak kullanılan meninks, dura mater, arachnoid ve pia mater katmanlarından oluşan, omuriliği çevreleyen ve sinir sistemi ile doğrudan temasta bulunan özgün bir yapıdır. Ancak literatürde HDM kaynaklı biyomalzeme çalışmalarının büyük çoğunluğu beyin veya spinal kord parankimi üzerine odaklanmıştır. Meninks kaynaklı HDM'in hem biyolojik sinyal taşıma potansiyeli hem de üretim kolaylığı açısından değerlendirilmemiş olması, bu çalışmanın literatürdeki boşluğu hedef alan bir diğer yönüdür (Badylak ve Gilbert, 2008). Elde edilen HDM, sinerjistik bir etki oluşturmak amacıyla yenilikçi bir modifiye doğal polimer olan suda çözünebilir ipek fibroin (hİF) ile kombine edilmiştir. Klasik ipek fibroin (İF) çözeltileri beta-tabakalı yapıya dönüşerek zamanla agregasyona uğrayabilmekte ve çözeltinin raf ömrünü kısıtlamaktadır (Partlow vd., 2014).

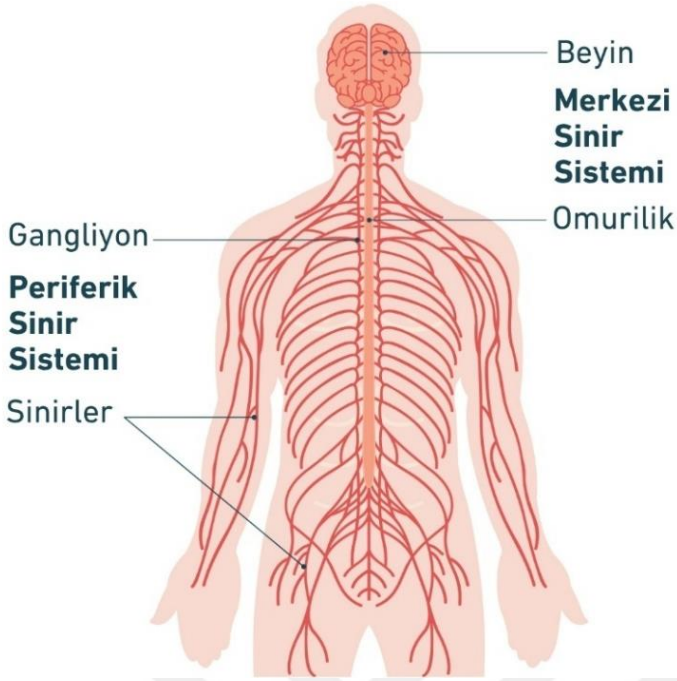
Bu tez kapsamında, İF Ajisawa solüsyonunda çözündürülmüş, ardından liyofilize edilerek tekrar suda çözünebilen ve uzun süre stabil kalabilen bir form elde edilmiştir. Bu yönüyle, hem üretim esnekliği sunan hem de uygulamaya hazır bir biyopolimer olarak hİF, HDM ile birlikte hidrojel formuna getirilmiştir. Kompozit hidrojel yapılar, HRP ve hirojen peroksit (H_2O_2) kullanılarak, hücre dostu bir ortamda enzimatik çapraz bağlama yöntemiyle elde edilmiştir. Bu yaklaşım, hem yapısal stabilite sağlayan hem de hücresel yaşama uygun özellikler sunan bir ağ oluşumunu mümkün kılmıştır (Decante vd., 2024). Hidrojellerin morfolojik karakterizasyonu SEM ile yapılmış ve mikro gözenekli, iyi organize olmuş bir iç yapı ortaya konmuştur. Yapıların biyouyumluluğu in vitro MTT testi ile değerlendirilmiş; doku ile etkileşim potansiyeli ise in ovo CAM modeli aracılığıyla incelenmiştir. Ayrıca, miyojenik yönlendirme kapasitesi gen ekspresyon analizleri ve immünohistokimyasal boyamalarla doğrulanmıştır. Bu tez çalışmasında ayrıca, deterjan içermeyen ve ultrasonik destekli bir hücresizleştirme yöntemi uygulanarak omurilik meninks dokusundan elde edilen HDM'in sinir doku mühendisliği açısından değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Hücresel kalıntılardan etkin şekilde arındırılmış bu doğal yapı ile hİF'nin bir araya getirilmesi sonucunda oluşturulan biyohibrit hidrojellerin, sitotoksisite oluşturmadan hücre yaşamsallığını sürdürdüğü, damar oluşumunu desteklediği ve miyojenik yönelim gösterdiği

çeşitli biyolojik testlerle gösterilmiştir. Bu bulgular, geliştirilen materyalin sinir doku mühendisliği uygulamaları için umut verici bir platform sunduğunu ortaya koymaktadır.

1.1. Sinir Sistemi

İnsan vücudu, birbirinden farklı ancak sürekli iletişim halinde çalışan birçok fizyolojik sistemin bütünleşik etkileşimiyle işlev görür. Bu sistemler arasında yer alan sinir sistemi, organizmanın çevresel değişimlere uyum sağlayabilmesi ve hayatta kalabilmesi açısından hayati bir role sahiptir. Duyusal verilerin algılanması, motor yanıtların oluşturulması, içsel dengenin (homeostazis) sürdürülmesi, öğrenme, hafıza ve duygudurum düzenlenmesi gibi yaşamsal süreçlerin tamamı sinir sistemi aracılığıyla koordine edilir (Swanson, 2000). Anatomik ve fonksiyonel açıdan oldukça karmaşık bir yapıya sahip olan bu sistem, organizmanın bütünsel işleyişini yöneten merkezi bir kontrol ağı gibi görev yapmaktadır (Bullmore ve Sporns, 2009).

Sinir sistemi, yapısal olarak iki ana bölüme ayrılmaktadır: merkezi sinir sistemi (MSS) ve periferik sinir sistemi (PSS) (Şekil 1). MSS, beyin ve omurilikten oluşur ve organizmanın yönetim merkezi olarak değerlendirilir. Beyin; bilişsel işlevlerin sürdürülmesi, istemli hareketlerin kontrolü ve emosyonel süreçlerin yönetimi gibi üst düzey işlevleri gerçekleştirirken, omurilik, beyin ile vücut arasındaki bilgi iletimini sağlayan kritik bir sinirsel iletim yoludur. PSS ise, MSS'den çıkan kranial ve spinal sinirlerin çevresel dokularla bağlantı kurarak organlara sinyaller iletmesini ve dış çevreden gelen uyarıların merkeze taşınmasını sağlar (McCorry, 2007).



Şekil 1. Merkezi ve periferal sinir sisteminin şematik gösterimi

(Healthdirect, 2023)

Sinir sisteminin temel işlevi, vücut içinden veya çevreden gelen uyarıları algılamak, bu bilgileri analiz etmek ve uygun fizyolojik ya da davranışsal yanıtları üretmektir. Bu süreç genel olarak üç bileşen çerçevesinde işler: duyusal giriş (afferent yollar), merkezi işleme ve motor çıkış (efferent yollar) (Catala ve Kubis, 2013). Duyusal reseptörlerden gelen bilgiler öncelikle MSS'ye iletilir, burada işlenerek anlamlandırılır ve ardından efektör organlara iletilmek üzere motor sinir yolları üzerinden yanıtlar oluşturulur. Böylelikle organizma, çevresel değişimlere hızlı ve etkili biçimde uyum sağlayabilir. Bu bağlamda, sinir sisteminin organizmanın hem içsel düzenini hem de dış çevreyle etkileşimini sürdürebilmesini mümkün kılan dinamik bir ağ olduğu söylenebilir (Gautam, 2017). Örneğin, sıcak bir yüzeye temas edildiğinde hissedilen acı, birkaç milisaniye içerisinde refleksif bir geri çekilme tepkisi ile sonuçlanır. Bu hızlı yanıt, sinir sisteminin yüksek iletim kapasitesi ve sinaptik organizasyonundaki verimlilikle ilişkilidir (Sandrini vd., 2005). Aynı zamanda homeostatik mekanizmaların sürdürülebilmesi adına, vücut sıcaklığı, kan basıncı, pH gibi içsel parametreler sürekli olarak MSS'ye iletilmekte ve uygun fizyolojik tepkilerle düzenlenmektedir (Conceicao vd., 2017).

1.1.1. Sinir Sisteminin Genel Yapısı ve İşlevi

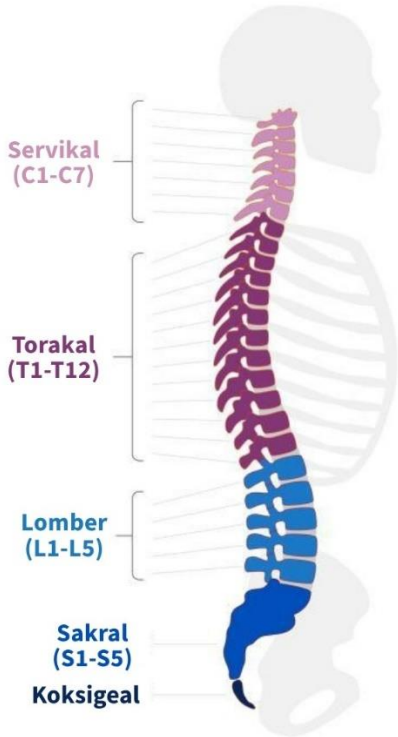
Sinir sisteminin genel yapısı hem organizasyon düzeyi hem de fonksiyonel çeşitlilik açısından son derece özelleşmiş bir mimariye sahiptir. Bu sistem, hücresel düzeyden makroskobik anatomik yapılara kadar hiyerarşik bir düzen içerisinde yapılandırılmıştır. İşlevselliği yalnızca yapıların varlığına değil, aynı zamanda bu yapılar arasındaki iletişimin hızı, doğruluğu ve plastik kapasitesine de bağlıdır (Bassett ve Bullmore, 2006). Yapısal olarak, sinir sistemi öncelikle iki ana eksende organize olur: MSS ve PSS. MSS, beyin ve omurilikten oluşurken; PSS, bu yapılardan çıkan sinir liflerinin çevresel organlara uzanmasını sağlayan bir ağ görevini görür (Navarro, 2009). Ancak bu basit sınıflandırmanın ötesinde, sistemin işleyişi nöroanatomik bölgelerin özel işlevlerine göre şekillenir. Örneğin, serebral korteks duyusal algıların yorumlanmasından ve istemli motor hareketlerin başlatılmasından sorumluyken; beyin sapı, hayati fonksiyonların sürdürülmesinde (örneğin solunum, kardiyak ritim) temel rol oynar (Mountcastle, 1997).

Sinir sisteminin işlevsel organizasyonu da yine üç temel bileşene ayrılır: duyusal giriş, bilgi işleme ve motor yanıt. Duyusal sistem, çevreden gelen bilgiyi toplayan reseptörlerle başlar. Bu reseptörlerden alınan elektriksel sinyaller, duyusal nöronlar aracılığıyla MSS'ye taşınır. Merkezi bölgelerde bu bilgiler analiz edilir, mevcut bellekle karşılaştırılır ve uygun tepkiler organize edilir. Son aşamada ise motor nöronlar, efektör hücrelere (kas, bez vb.) sinyal göndererek davranışsal ya da fizyolojik bir yanıt oluşturulmasını sağlar (McCorry, 2007). Bu süreç, organizmanın çevresel değişimlere dinamik şekilde uyum sağlayabilmesini ve yaşamı tehdit eden durumlara hızlı yanıtlar verebilmesini mümkün kılar. Örneğin, ani bir ağrı uyarısı karşısında oluşan refleks hareket, birkaç milisaniyede tamamlanan karmaşık bir iletim dizisi sonucu meydana gelir. Bu refleksler, genellikle omurilik düzeyinde gerçekleşen ve kortikal kontrol gerektirmeyen motor yanıtlar olarak tanımlanır (Lemon, 2008; Sandrini vd., 2005). Bununla birlikte, daha üst düzey yanıtlar, korteksin değerlendirme süreçlerine dahil olmasıyla şekillenir. Sinir sisteminin yapısı, aynı zamanda plastisite ve nöromodülasyon gibi özellikleriyle de dikkat çeker. Özellikle gelişimsel dönemlerde ve hasar sonrası yeniden yapılanma süreçlerinde, sinaptik bağlantıların değişebilme kapasitesi (sinaptik plastisite) organizmanın adaptif

yanıtlar üretebilmesini sağlar (Nudo, 2013; Pascual-Leone vd., 2005). Bu durum, sinir sisteminin sadece uyarıya yanıt veren değil, aynı zamanda öğrenen ve yeniden şekillenen bir sistem olduğunu da ortaya koyar.

1.1.2. Omurilik Anatomisi ve Fizyolojisi

Omurilik, merkezi sinir sisteminin beyinle birlikte temel yapı taşlarından biridir ve motor, duyusal ve otonom işlevlerin kontrolünde hayati bir rol üstlenir (Paracha vd., 2025; Xiao vd., 2025) . Yaklaşık 42–45 cm uzunluğundaki bu yapı, kafatası tabanındaki foramen magnum'dan başlayarak erişkin bireylerde genellikle L1–L2 omur düzeyine kadar uzanır (Frostell vd., 2016). Silindirik formdadır ve segmental bir düzende organize olmuştur; her segment, bir çift spinal sinirle bağlantılıdır. Toplamda 8 servikal, 12 torakal, 5 lomber, 5 sakral ve 1 koksigeal olmak üzere 31 çift spinal sinir bulunur (Şekil 2) (Ellis, 2006).



Şekil 2. İnsan omurgasının anatomik bölgelerinin sınıflandırılması

(National Institute of Neurological Disorders and Stroke, 2023)

Omurilik, dıştan içe doğru iki ana yapıya ayrılır: beyaz cevher ve gri cevher. Gri cevher, kelebek ya da "H" şeklinde görünür ve nöron gövdeleriyle ara nöronları barındırır (Şekil 2). Ön boynuzlarda motor nöronlar, arka boynuzlarda duyusal nöronlar bulunur. Yan boynuzlar ise otonom sinir sistemine ait nöronları içerir ve bu yapılar torakal ve üst lomber segmentlerde özellikle belirgindir. Gri cevherin çevresini saran beyaz cevher, yukarı ve aşağı yönlü sinir iletimini sağlayan miyelinli akson demetlerinden oluşur (Watson ve Kayalioglu, 2009).

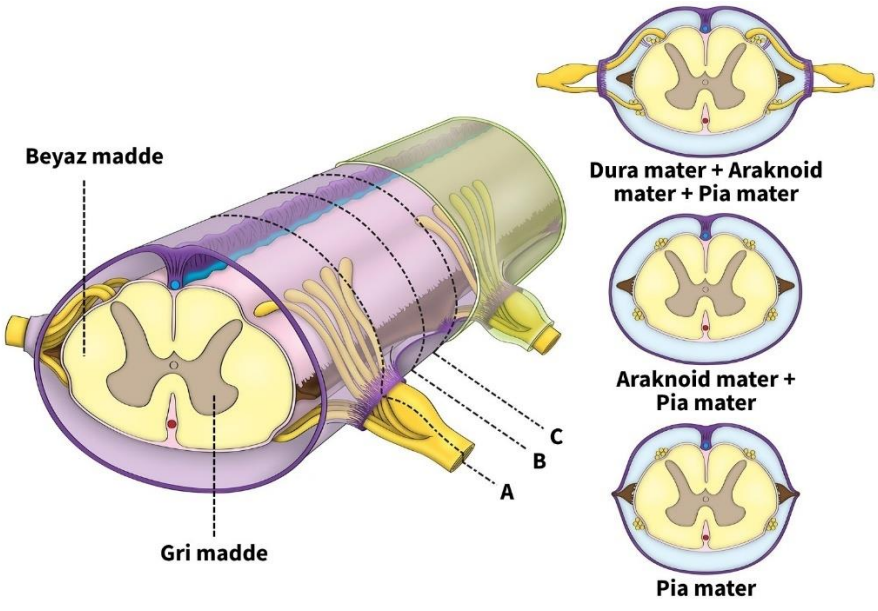
Anatomik olarak omurilik, işlevsel bölgelere ayrılmıştır. Servikal ve lomber bölgelerde, kollar ve bacaklardan gelen yoğun sinir trafiği nedeniyle belirgin şişkinlikler gözlenir. Servikal şişkinlikler, üst ekstremitelerin, lombar şişkinlikler ise alt ekstremitelerin sinirsel kontrolünde görev alır. Omuriliğin en alt kısmı, konik biçimli "conus medullaris" adı verilen bir yapıyla son bulur. Bu bölgeden çıkan sinir lifleri "cauda equina" (at kuyruğu) adıyla anılır. Bu yapısal özellikler, sinir iletiminin hem segmental hem de hedef odaklı bir düzende işlemesini sağlar (Diaz ve Morales, 2016). Ancak omurilik yalnızca bilgi aktarımını gerçekleştiren bir yol değil, aynı zamanda reflekslerin yönetim merkezi konumundadır. Spinal refleksler, beyin korteksinin doğrudan kontrolüne gerek duymayan, genellikle omurilik düzeyinde sonlanan hızlı ve otomatik tepkilerdir. En bilinen örneklerden biri olan patellar refleks, sadece iki nöron ve tek bir sinaps içeren monosynaptik bir refleks arkıyla çalışır. Daha karmaşık refleksler ise çok sayıda sinaps içeren polisinaptik yapılarla gerçekleşir ve inhibitör ya da uyarıcı ara nöronlar aracılığıyla organize olur. Bu refleks mekanizmaları, organizmanın çevresel tehditlere hızla tepki vermesini ve yaşamı tehdit eden durumlarda koruyucu yanıtlar üretmesini sağlar (Heise ve Kayalioglu, 2009).

Bunlara ek olarak omurilik, otonom sinir sistemi için de bir merkez işlevi görür. Özellikle torakal ve lomber segmentlerde bulunan preganglionik nöronlar; kalp ritmi, damarların kasılma durumu, terleme, sindirim ve mesane kontrolü gibi istemsiz süreçleri düzenler. Bu bölgesel sinir yapılanması, vücudun temel fizyolojik işlevlerini denge içinde sürdürmesine olanak tanır. Sonuç olarak, omurilik hem yapısal karmaşıklığı hem de işlevsel çok yönlülüğü ile merkezi sinir sisteminin bel kemiğini oluşturur. Bu yapının bütünlüğündeki herhangi bir bozulma, yalnızca sinir iletimini aksatmakla kalmaz, aynı

zamanda istemsiz beden fonksiyonlarını da ciddi biçimde etkileyebilir. Bu nedenle, omuriliğin yapısını ve görevlerini iyi anlamak hem nörolojik tanılama hem de yenileyici tıp uygulamaları açısından son derece önemlidir.

1.1.3. Omurilik Meninkslerinin Yapısı ve Biyolojik Rolü

Omuriliği çevreleyen meninks yapıları, yalnızca yapısal koruma sağlamakla kalmaz; aynı zamanda merkezi sinir sistemi için hayati öneme sahip fizyolojik destek görevini de üstlenir. Bu zarlar, sinir dokusunu dış etkenlere karşı koruyan bir bariyer oluştururken, aynı zamanda sinir sisteminin işlevselliğini sürdürebilmesi için gerekli olan mikro çevrenin sürekliliğini sağlar (Alves de Lima vd., 2020). Meninksler üç temel katmandan oluşur: dura mater, araknoid mater ve pia mater. Bu zarların omurilikle olan anatomik ilişkisi ve birbirleriyle olan konumsal bağlantıları Şekil 3'te şematik olarak sunulmuştur. En dışta yer alan dura mater, sert ve lifli bağ dokusundan meydana gelir. Bu yapı, omurilik kanalına sıkıca tutunarak, özellikle omurganın kemik yapılarıyla arasında şok emici bir tampon görevi görür. Orta tabaka olan araknoid mater ise daha ince ve yarı geçirgen bir zar yapısındadır. Bu tabaka, dura ve pia mater arasında uzanır; iç yüzeyinden çıkan ince trabeküller sayesinde pia mater ile bağlantı kurar. Araknoid ve pia mater arasında kalan boşluk, beyin omurilik sıvısıyla (BOS) dolu olan subaraknoid boşluk olarak bilinir (Sakka vd., 2016).



Şekil 3. Gri ve beyaz madde yapısı ve omuriliği çevreleyen üç ana meninks katmanının anatomik konumlarını ve ilişkilerini gösteren şematik temsil

(Dauleac vd., 2019)

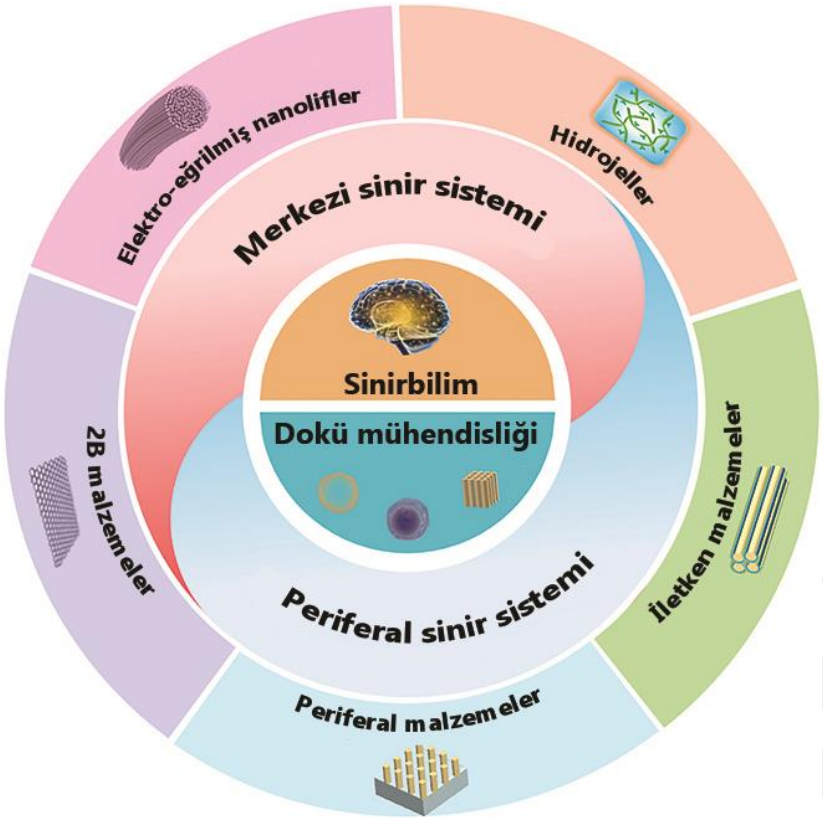
Pia mater ise en içte yer alır ve omuriliğin yüzeyine sıkı sıkıya yapışıktır. İnce damarlar açısından zengin olan bu zar, omurilikteki nörovasküler yapılara destek verir. Ayrıca BOS dolaşımı sırasında iyon dengesinin korunması ve metabolitlerin taşınması gibi hayati işlevleri de üstlenir (Hwang, 2021). Son yıllarda yapılan araştırmalar, meninkslerin yalnızca koruyucu bir kılıf olmaktan öte, biyolojik olarak da aktif yapılara sahip olduğunu göstermiştir. Her bir zar katmanı, kendine özgü bağ dokusu hücreleri ve HDM bileşenleri içerir. Özellikle pia ve araknoid materin HDM yapısı; kollajen, elastin, laminin ve fibronektin gibi proteinlerden oluşur. Bu proteinlerin hem mekanik destek sunduğu hem de hücre davranışlarını yönlendirme potansiyeline sahip olduğu ortaya konmuştur (Ransohoff ve Engelhardt, 2012).

Klinik açıdan bakıldığında meninksler; enfeksiyon (örneğin menenjit), travma (örneğin spinal yaralanmalar) ve tümör (örneğin meningiom) gibi birçok hastalıkla ilişkilendirilir (Dong vd., 2023). Bununla birlikte, biyomalzeme araştırmalarında da giderek daha fazla önem kazanmaktadırlar. Özellikle meninks kaynaklı dokulardan elde edilen HDM'nin, biyomalzeme üretiminde kullanılabileceğine dair çalışmalar artmaktadır. Eğer bu dokuların antijenik özellikleri azaltılıp biyouyumlulukları korunabilirse, rejeneratif tıpta oldukça değerli bir kaynak haline gelmeleri mümkündür (Monazah vd., 2024). Sonuç olarak, omuriliği saran meninks yapıları yalnızca fiziksel birer kalkan değildir; aynı zamanda biyolojik işlevleri, özgün HDM içerikleri ve potansiyel tedavi uygulamaları ile modern sinir doku mühendisliğinde yeniden keşfedilen karmaşık bir mikrosistemdir.

1.2. Sinir Doku Mühendisliği ve Rejeneratif Yaklaşımlar

Sinir doku mühendisliği, merkezi ve periferik sinir sisteminde meydana gelen yaralanmalar ya da dejeneratif hastalıkların tedavisine yönelik olarak biyomalzemeler, hücreler ve biyolojik faktörlerin birlikte kullanıldığı multidisipliner bir alandır (Gu vd.,

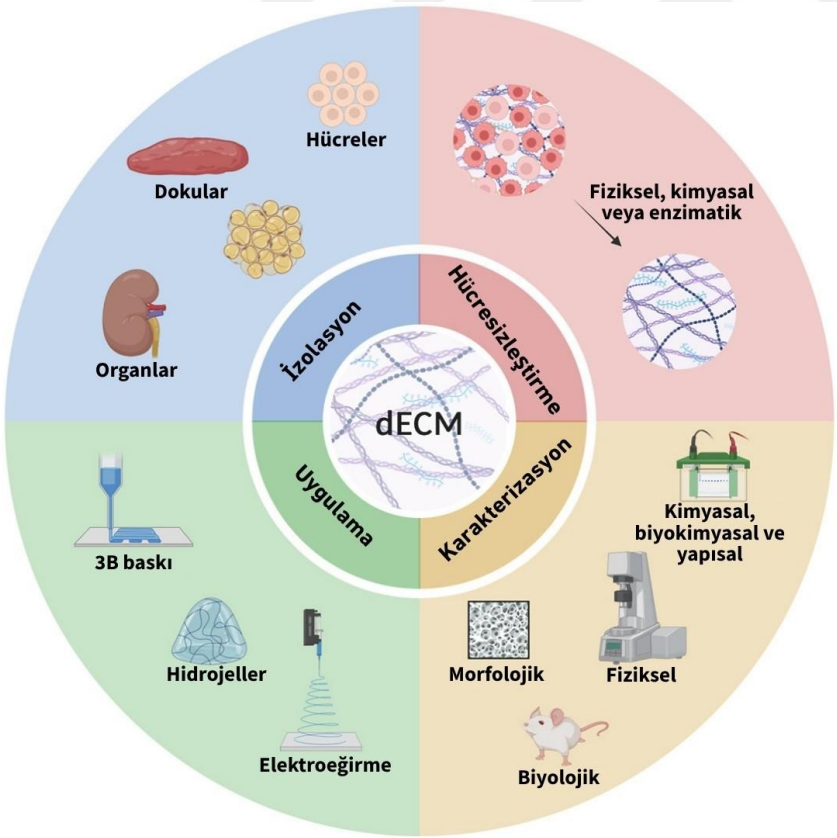
2014). Sinir dokusunun kendini sınırlı ölçüde yenileyebilme kapasitesi, bu alanı rejeneratif tıbbın en öncelikli hedeflerinden biri haline getirmiştir. Özellikle travmatik omurilik yaralanmaları, iskemik hasarlar ve nörodejeneratif hastalıklarda sinir hücrelerinin kendiliğinden yenilenme yetisinin oldukça düşük olması, dışsal destek yapılarına olan ihtiyacı artırmaktadır (Varma vd., 2013). Bu mühendislik yaklaşımının temel amacı, sinir dokusunun doğal yapısına biyokimyasal, biyomekanik ve hücresel açıdan benzeyen üç boyutlu iskele sistemleri geliştirmektir. Bu iskeleler, sinir hücrelerinin tutunmasını, göçünü, çoğalmasını ve farklılaşmasını desteklemenin yanı sıra; büyüme faktörlerinin taşınması ve besin maddelerinin difüzyonu gibi mikro çevresel gereksinimleri de karşılamalıdır (Villanueva-Flores vd., 2023). Bu amaçla kullanılan biyomalzemelerin; biyobozunur, biyouyumlu, steril edilebilir ve uygun mekanik özelliklere sahip olmaları beklenir. Sinir sisteminin oldukça karmaşık bir yapıya sahip olması, nöron, glia ve damar ağları gibi farklı hücresel bileşenlerin koordineli çalışmasını gerektirir. Bu nedenle sinir doku mühendisliğinde kullanılan stratejiler de genellikle çok bileşenlidir. Bu stratejiler; doğal ve sentetik polimerler, protein bazlı biyomalzemeler, büyüme faktörleri (örneğin NGF, BDNF), kök hücreler ile elektriksel ve biyokimyasal uyarıcı sistemlerin entegre kullanımını içerir (Tupone vd., 2021). Kullanılan biyomalzeme stratejileri arasında hidrojeller, elektroeğrilmiş nanolifler, iletken ve 2D malzemeler gibi farklı yapı ve işlev özellikleri taşıyan sistemler yer almaktadır (Şekil4) (Zhang vd., 2023).



Şekil 4. Sinir doku mühendisliğinde kullanılan biyomalzeme türleri ve hedef doku bölgeleri *(Zhang vd., 2023)*

Rejeneratif tıp yaklaşımları yalnızca kaybolan dokunun yapısal olarak yeniden oluşturulmasını değil, aynı zamanda sinir sisteminin işlevsel olarak da kazanımını hedefler. Bu bağlamda geliştirilen biyomalzemeler, nöron büyümesini teşvik etmekle kalmamalı; aynı zamanda sinaptogenez, miyelin oluşumu ve aksonların yeniden yapılanması gibi daha ileri düzey fonksiyonları da desteklemelidir. Bu nedenle geliştirilen sistemlerin, nöronal hücrelerle etkili biyolojik etkileşim kurabilme potansiyeli titizlikle test edilmelidir (Huang vd., 2021). Son yıllarda, dokuya özgü HDM kaynaklı biyomalzemelerin sinir doku mühendisliğinde kullanımı dikkat çekici şekilde artmıştır. Özellikle omurilik ve meninks dokularından elde edilen HDM yapılarının doğal doku mimarisini taklit edebildiği ve bu sayede hücre davranışlarını yönlendirebildiği gösterilmiştir. Bu bulgular, geleneksel sentetik malzemelerin ötesine geçilerek, biyolojik olarak aktif mikro çevrelerin üretilebileceğini ortaya koymaktadır (John ve Nagarajan, 2024).

HDM kaynaklı biyomalzemelerin sinir doku mühendisliğinde kullanılabilirliği, elde edildikleri dokudan hücresizleştirme sürecine, karakterizasyon ve uygulama yöntemlerine kadar çok adımlı bir süreci kapsamaktadır. Bu süreçte uygulanan fiziksel, kimyasal ve biyolojik analizler; geliştirilen yapıların biyolojik aktivitesini, hücre etkileşimini ve klinik potansiyelini doğrudan etkiler (Şekil 5) (Vilaça-Faria vd., 2024). Sinir doku mühendisliğinde geliştirilen rejeneratif stratejiler; laboratuvar ortamında yapılan modellemelerden canlı organizmalar üzerindeki uygulamalara, klinik öncesi çalışmalardan translasyonel tıbba kadar geniş bir yelpazede değerlendirilmektedir. Ancak dokuya özgü yapıların biyolojik olarak aktif biçimde korunması, bağışıklık yanıtlarının minimize edilmesi, sterilizasyon ve depolama gibi pratik uygulama sorunlarının çözülmesi hâlâ araştırma gerektiren konulardır. Bu nedenle, alanda yapılan her yeni çalışma hem temel bilimsel bilgiye hem de klinik uygulamalara katkı sağlama potansiyeli taşımaktadır (Villanueva-Flores vd., 2023).

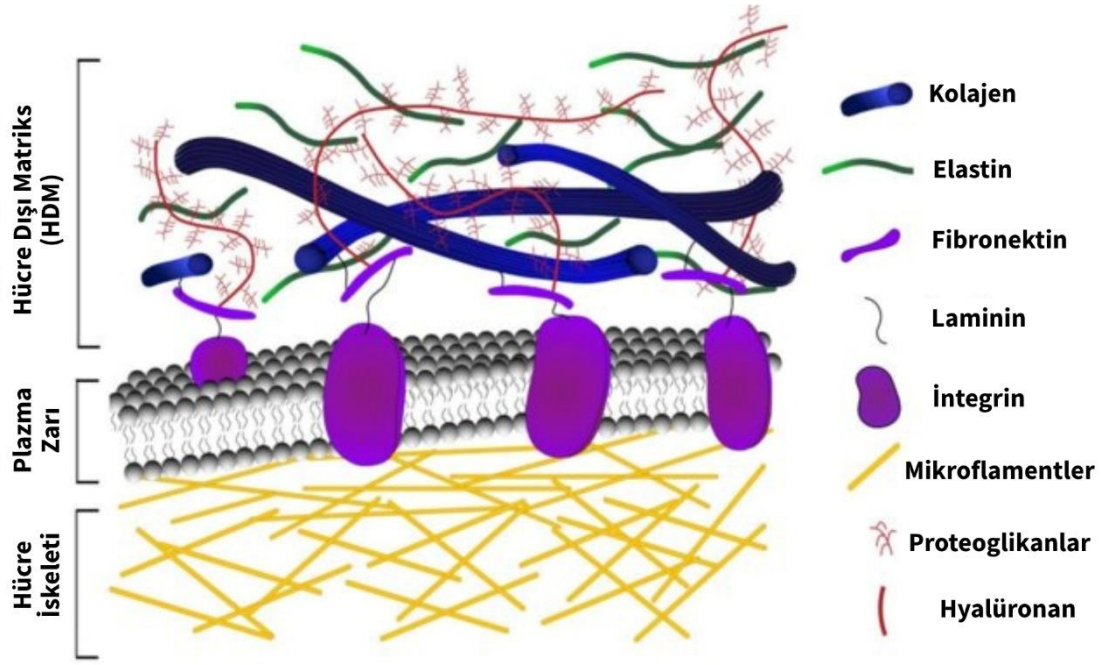


Şekil 5. Hücresizleştirilmiş hücre dışı matriks (HDM) biyomalzemelerinin elde edilme, karakterizasyon ve uygulama süreçlerinin şematik gösterimi

(Vilaça-Faria vd., 2024)

1.2.1. Hücre Dışı Matriks (HDM) Temelli Biyomalzemeler

HDM, doku mikro çevresinde yer alan ve hücrelerin tutunması, hareket etmesi, çoğalması ve farklılaşması gibi temel biyolojik süreçleri yönlendiren biyokimyasal ve biyomekanik sinyalleri taşıyan karmaşık bir yapıdır (Frantz vd., 2010). Özellikle yüksek derecede özelleşmiş ve rejeneratif kapasitesi sınırlı olan sinir sistemi gibi dokular için HDM, doğal iyileşme süreçlerini taklit eden biyomalzeme platformlarının geliştirilmesinde oldukça değerli bir kaynak olarak öne çıkmaktadır (Barros vd., 2011). HDM, başlıca fibriler proteinler (kollajen, elastin), hücre yapışma proteinleri (laminin, fibronektin), proteoglikanlar ve glikozaminoglikanlar (GAG) gibi moleküllerden oluşur. Bu bileşenler yalnızca yapısal destek sağlamakla kalmaz; aynı zamanda büyüme faktörlerinin depolanması ve hücre yüzeyindeki reseptörlere sunulması yoluyla sinyal iletimine katkıda bulunur (Hynes ve Naba, 2012). HDM'nin biyolojik etkileri, içerdiği kollajen, elastin, laminin, fibronektin gibi yapısal proteinlerin yanı sıra; proteoglikanlar, glikozaminoglikanlar ve hiyalüronan gibi moleküller aracılığıyla hücre zarındaki integrin reseptörlerine bağlanarak aktardığı sinyallere dayanır. Bu etkileşimler, hücre iskeleti ile doğrudan bağlantı kurarak hücre davranışlarını düzenler (Şekil 6) (Poole ve Mostaco-Guidolin, 2021). Bu özellikleri sayesinde HDM, sadece pasif bir yapı iskelesi değil; hücre davranışlarını aktif olarak şekillendiren dinamik bir biyolojik mikro çevre görevi görür. HDM temelli biyomalzemeler genellikle doğal dokulardan hücresizleştirme işlemiyle elde edilir. Bu süreçte, dokuya özgü hücreler uzaklaştırılırken, HDM'nin yapısal bütünlüğü ve biyolojik işlevselliği mümkün olduğunca korunmaya çalışılır. Özellikle sinir sistemiyle ilgili dokulardan—örneğin omurilik, beyin, meninks ve periferik sinir kordonu—elde edilen HDM yapılarının, nöronal hücrelerle doğal biyolojik etkileşim kurma potansiyeli taşıması, bu biyomalzemeleri sinir doku mühendisliği açısından son derece değerli hale getirmektedir (Medberry vd., 2013).



Şekil 6. Hücre dışı matriksin (HDM) temel bileşenleri

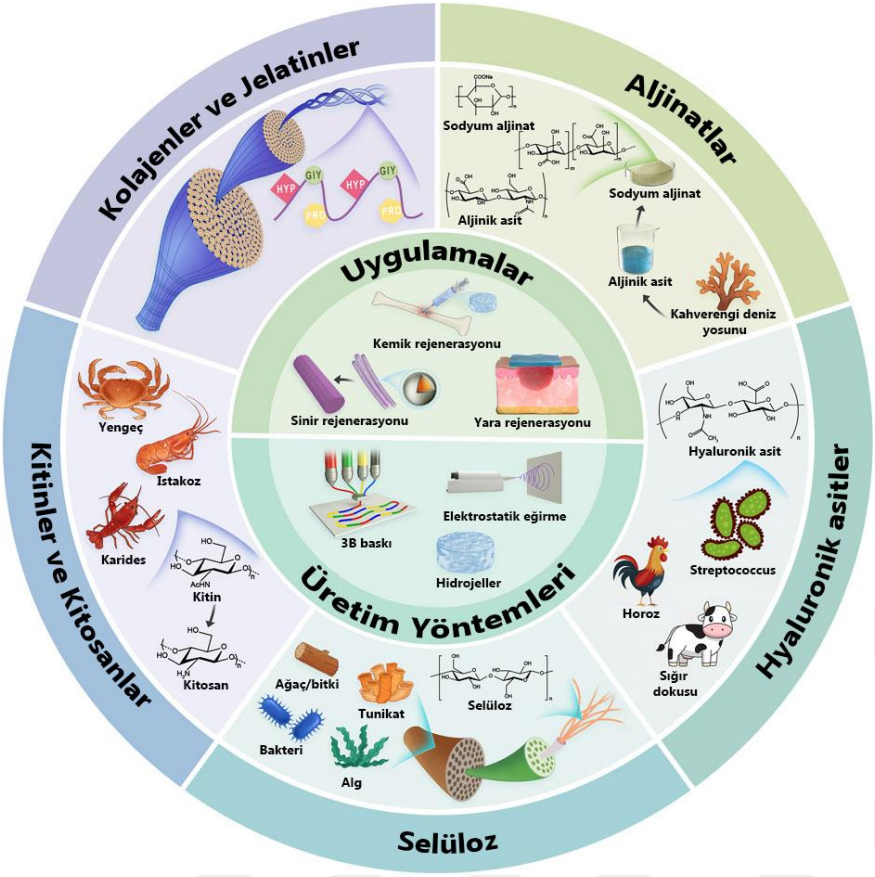
(Poole ve Mostaço-Guidolin, 2021)

HDM türevli biyomalzemelerin en önemli avantajlarından biri, dokuya özgü (tissue-specific) yapıları sayesinde hücrelere hedeflenmiş biyokimyasal sinyaller sunabilmeleridir. Örneğin, omurilikten elde edilen HDM, aksonal büyümeyi ve miyelin onarımını destekleyen özgün proteinler içerebilir. Bu özellik, biyolojik aktivitesi sınırlı olan sentetik polimerlerle karşılaştırıldığında oldukça büyük bir avantaj sağlar (Saldin vd., 2017). Ayrıca, HDM yapıların konvansiyonel biyomalzemelerle birleştirilerek kompozit sistemler hâlinde kullanılması, yalnızca biyolojik değil, aynı zamanda mekanik dayanıklılık açısından da olumlu sonuçlar vermektedir. Ancak, tüm bu potansiyeline rağmen HDM tabanlı biyomalzemelerin klinik uygulamaya geçirilmesi bazı zorlukları beraberinde getirmektedir. Hücresizleştirme sürecinde HDM yapısının bozulma riski, antijenik yapıların tamamen ortadan kaldırılamaması, ayrıca sterilizasyon ve uzun süreli depolama koşullarının biyolojik işlevselliği azaltması gibi etkenler, bu sistemlerin standart hâle getirilmesini zorlaştırmaktadır (Wan vd., 2024). Buna rağmen, HDM temelli iskele sistemleri, rejeneratif tıbbın geleceği açısından hâlâ son derece umut verici bir araştırma ve uygulama alanı olarak değerlendirilmektedir. Günümüzde birçok HDM türevli biyomalzeme hem preklinik modellerde hem de bazı klinik denemelerde sinir dokusunda işlevsel iyileşmeyi teşvik eden

mikro ortamlar oluşturma kapasitesiyle dikkat çekmektedir. Özellikle meninks kaynaklı HDM yapıları, içerdiği özgün protein profili sayesinde nöronal hücrelerin davranışlarını olumlu yönde etkileyebilmekte ve yeni nesil biyomimetik malzeme geliştirme süreçlerinde alternatif ve değerli bir kaynak olarak öne çıkmaktadır (Jiang vd., 2023).

1.3. Doğal Polimerler

Doğal polimerler, canlı organizmalardan elde edilen ve biyolojik sistemlerle yüksek düzeyde uyum içinde etkileşim kurabilen biyolojik kaynaklı makromoleküllerdir. Bu yapılar, vücut tarafından "tanıdık" olarak algılandıkları için bağışıklık sistemini minimum düzeyde uyarır ve genellikle düşük sitotoksisite gösterir. Aynı zamanda, hücre yapışması, proliferasyonu (çoğalması) ve farklılaşması gibi temel hücresel süreçleri destekleyen biyoaktif bileşenler içerirler (Zhao vd., 2023). Bu özellikler, doğal polimerleri özellikle rejenerasyon kapasitesi sınırlı olan sinir dokusu gibi sistemlerde oldukça cazip ve işlevsel hale getirmektedir. En yaygın kullanılan doğal polimerler arasında kolajen, jelatin, fibrin, elastin, laminin, alginat, kitosan, hiyalüronik asit ve İF gibi protein ve polisakkarit bazlı yapı taşları yer almaktadır (Jose vd., 2020). Doğal polimerlerin biyolojik kaynakları, yapısal çeşitliliği ve uygulama alanları, onları rejeneratif tıp açısından son derece geniş bir kullanım yelpazesinde değerlendirmeye olanak tanımaktadır. Kolajen, kitosan, alginat ve hiyalüronik asit gibi başlıca doğal polimerlerin elde edildiği kaynaklar ve bu malzemelerin sinir rejenerasyonu, yara onarımı gibi farklı uygulamalarda nasıl kullanıldığını gösteren özet bir şematik yapı Şekil 7'de sunulmuştur (Hu vd., 2024). Söz konusu doğal polimerlerin bir kısmı, doğrudan HDM'nin yapısal bileşenleri arasında yer almakta; bir kısmı ise HDM'nin biyolojik işlevlerini taklit edebilme yetenekleri sayesinde sinir doku mühendisliğinde biyomimetik materyaller olarak tercih edilmektedir. Bu polimerler, hücrelerle moleküler düzeyde biyolojik etkileşim kurabilme kapasiteleri sayesinde rejeneratif süreçlerde aktif rol oynarlar. Örneğin, kolajen hem yüksek mekanik dayanıklılığı hem de içerdiği RGD (arginin-glisin-aspartik asit) dizileri sayesinde hücre bağlanmasını kolaylaştırırken; hiyalüronik asit, güçlü su tutma kapasitesiyle doku hidrasyonunu ve hücre göçünü destekler (She vd., 2025).



Şekil 7. Doğal polimerlerin biyolojik kaynakları, kimyasal yapıları, üretim teknikleri ve rejeneratif tıptaki uygulama alanlarının şematik temsili

(Hu vd., 2024)

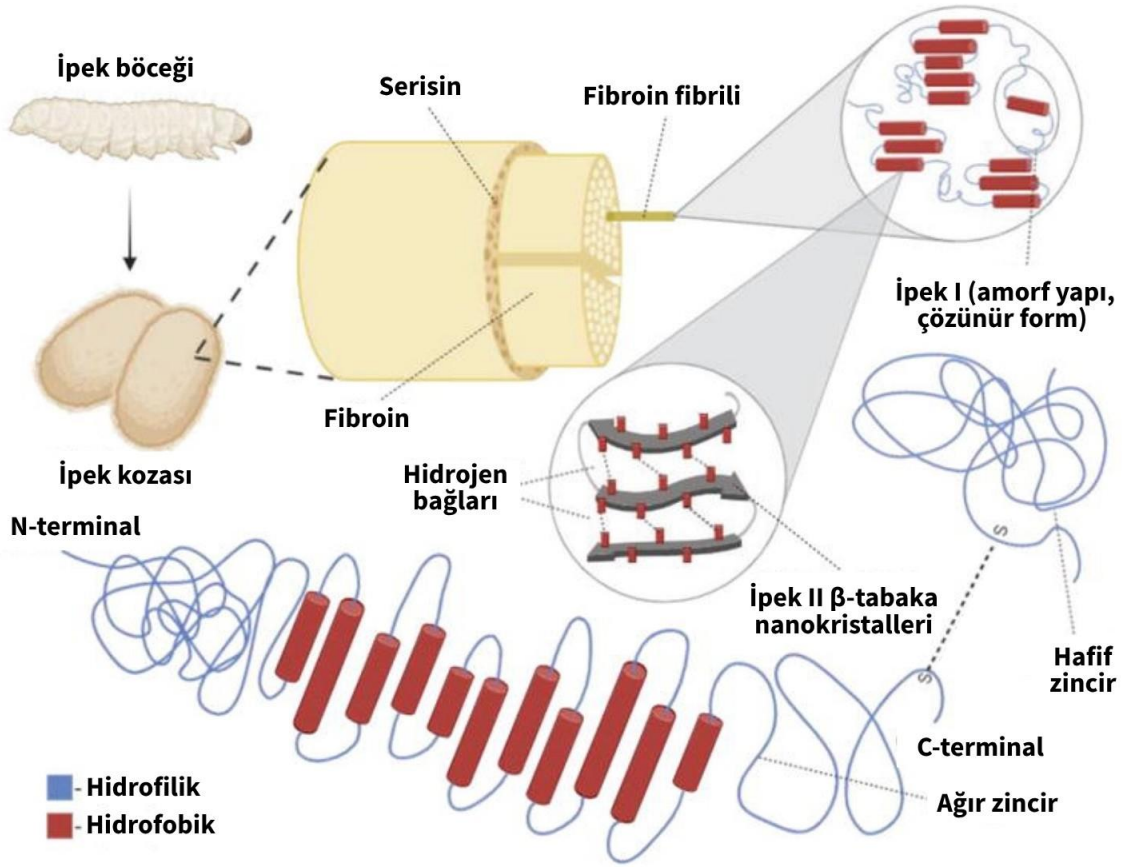
Doğal polimerlerin avantajları arasında biyouyumluluk, biyobozunurluk, düşük sitotoksisite ve hücrelerle doğrudan etkileşim kurabilme yetenekleri yer almaktadır. Ancak bu malzemelerin mekanik dayanıklılığının genellikle zayıf olması, bozunma hızlarının kontrolsüz seyredebilmesi ve uzun süreli uygulamalarda yapısal kararlılıklarının sınırlı olması gibi bazı önemli dezavantajları da vardır (Nanda vd., 2025). Bu nedenle, doğal polimerler çoğu zaman sentetik polimerlerle birlikte hibrit veya kompozit yapılar içinde kullanılmakta; böylece hem biyolojik hem de mekanik açıdan daha dengeli sistemler geliştirilebilmektedir. Sinir doku mühendisliğine özel olarak bakıldığında, doğal polimerler sayesinde in vitro ortamda oluşturulan mikro çevre, sinir dokusunun fizyolojik koşullarını daha gerçekçi şekilde taklit edebilmektedir. Bu durum, hücrelerin iskele materyaliyle daha doğal bir etkileşim kurmasına olanak tanır. Ayrıca bu malzemeler üzerine büyüme faktörlerinin immobilize edilmesi ya da kontrollü salım sistemlerinin entegre edilmesiyle,

sinirsel rejenerasyonu yönlendirebilecek daha sofistike ve etkili sistemlerin tasarlanması mümkün hale gelmektedir (Liu vd., 2025). Rejeneratif tıp ve doku mühendisliği alanlarında, doğal polimerler temel yapı taşları arasında yer alır. Özellikle sinir sistemine özgü biyofiziksel gereksinimlerin karşılanabilmesi için, bu malzemelerin titizlikle seçilmesi, gerektiğinde yapısal ve kimyasal olarak modifiye edilmesi ve çoğu durumda sentetik sistemlerle bütünleşmiş biçimde kullanılması büyük önem taşır. Bu bağlamda, protein temelli doğal polimerler hem hücresel biyouyumlulukları hem de mühendislik uygulamalarına uygunlukları nedeniyle öne çıkmaktadır. Bu çerçevede, doğal kökeniyle birlikte yüksek mekanik ve biyolojik performans sergileyen İF, sinir doku mühendisliği uygulamalarında dikkat çeken özel bir biyomalzeme olarak ön plana çıkmaktadır. Protein yapısı sayesinde biyolojik sinyallerle uyumlu bir platform sunabilmesi, suda çözünebilir formda işlenebilmesi ve çapraz bağlanabilirlik özelliği, onu biyomimetik hidrojel sistemlerinin tasarımı için değerli bir yapı taşı haline getirmektedir.

1.3.1. İpek Fibroini (İF)

İF, *Bombyx mori* ipekböceği tarafından sentezlenen doğal bir protein olup; yüksek biyouyumluluğu, kontrollü biyobozunurluğu ve üstün mekanik özellikleri sayesinde doku mühendisliği uygulamalarında artan bir ilgiyle değerlendirilmektedir (Attri vd., 2024). Doğal haliyle lif formunda bulunan bu protein, iki temel bileşenden oluşur: yapısal rol oynayan fibroin ve lifleri bir arada tutan yapıştırıcı nitelikteki serisin. Uygulama öncesinde, biyouyumluluğu olumsuz etkileyebilen serisin tabakası uzaklaştırılarak saflaştırılmış fibroin elde edilir. Elde edilen bu saf protein; film, sünger, hidrojel, mikroküre ya da lif gibi çeşitli biyomalzeme formlarına dönüştürülebilir (Altman vd., 2003). İF'nin moleküler yapısı hem amorf hem de kristal bölgeler içeren beta tabakalı konformasyonlara sahiptir. Bu yapısal özellik, fibroine yalnızca yüksek mekanik dayanıklılık kazandırmakla kalmaz; aynı zamanda kontrollü çözünürlük gibi biyoteknolojik açıdan değerli özellikler de sağlar. Yapı içerisindeki β-sheet oranı, fibroinin kristalinliğini ve buna bağlı olarak biyolojik bozunma hızını belirleyen temel faktörlerden biridir. Moleküler düzeyde bakıldığında, fibroin yapısı büyük ölçüde glisin, alanin ve serin aminoasitlerinden oluşur. Bu aminoasitler, düzenli ve tekrarlayan dizilimler hâlinde fibroin zincirlerinde yer alarak kompakt, hidrofobik ve kristalleşmiş bir yapı oluşturur. Özellikle $(Gly\text{-}Ala\text{-}Gly\text{-}Ala\text{-}Gly\text{-}Ser)_n$ tekrar dizisi, fibroinin beta tabakalı kristal bölgelerinin temel yapı taşını oluşturur ve bu yapı, materyalin hem

stabilitesinde hem de biyolojik performansında kritik rol oynar (Howard vd., 2023; Johari vd., 2020). İF'nin bu çok katmanlı yapısal organizasyonu, Şekil 8'de şematik olarak sunulmuştur. Görselde ipekböceği kozasından elde edilen serisin ve fibroin ayrımı, fibroin fibril oluşumu, Silk I ve Silk II yapılarının moleküler düzenlenişi ile hidrojen bağlarının oluşturduğu beta-tabakalı kristal bölgeler detaylı şekilde gösterilmektedir (Şekil 8).



Şekil 8. İpek fibroinin serisin ayrımı sonrası yapısal ve moleküler organizasyonu

(Howard vd., 2023)

İF, sinir doku mühendisliği açısından oldukça dikkat çekici bir biyomalzemedir. Hücrelerin yüzeyle etkileşimini kolaylaştıran yapısı sayesinde nöron ve glia hücrelerinin tutunmasını etkin şekilde destekler. Aynı zamanda, fonksiyonel proteinler ve büyüme faktörlerini kontrollü biçimde taşıyabilme yeteneği sayesinde, hedefe yönelik biyolojik sinyallerin iletilmesini kolaylaştırır. Bununla birlikte, İF yapısı elektriksel iletkenlik gibi biyofiziksel modifikasyonlara da açık olduğundan, nöronal uyarılabilirliği artıran sistemlerin

tasarlanmasında da potansiyel sunmaktadır (Uebersax vd., 2007). Biyolojik açıdan değerlendirildiğinde, İF düşük immünojenik özellikler sergiler ve hem nöronlar hem de glial hücreler üzerinde sitotoksik etki göstermeden hücre yaşamsallığını destekleyebilir (Vepari ve Kaplan, 2007). Ayrıca, farklı çapraz bağlama yöntemleri—örneğin enzimatik, UV ışığıyla ya da fiziksel etkileşim yoluyla—kullanılarak, fibroinin mekanik dayanıklılığı ve bozunma hızı istenilen düzeyde ayarlanabilir (Kundu vd., 2013). Bu özelleştirilebilirlik, İF'yi farklı uygulamalara uyarlanabilir esnek bir biyomalzeme haline getirmektedir. Nitekim fibroin; gözenekli yapı, film, hidrojel, 3D baskı, nanolif ve örgü gibi çok çeşitli malzeme formatlarına dönüştürülebilmekte ve bu çeşitlilik, sinir doku mühendisliği başta olmak üzere pek çok rejeneratif tıp uygulamasına adaptasyon imkânı sunmaktadır (Şekil 9) (Kumar Sahi vd., 2023).



Şekil 9. İpek fibroinin farklı kaynaklardan elde edilerek film, hidrojel, gözenekli yapı, nanolif, örgü ve 3B baskı gibi çeşitli iskele formatlarına dönüştürülmesi

(Kumar Sahi vd., 2023)

1.4. Çapraz Bağlı Biyomalzemeler

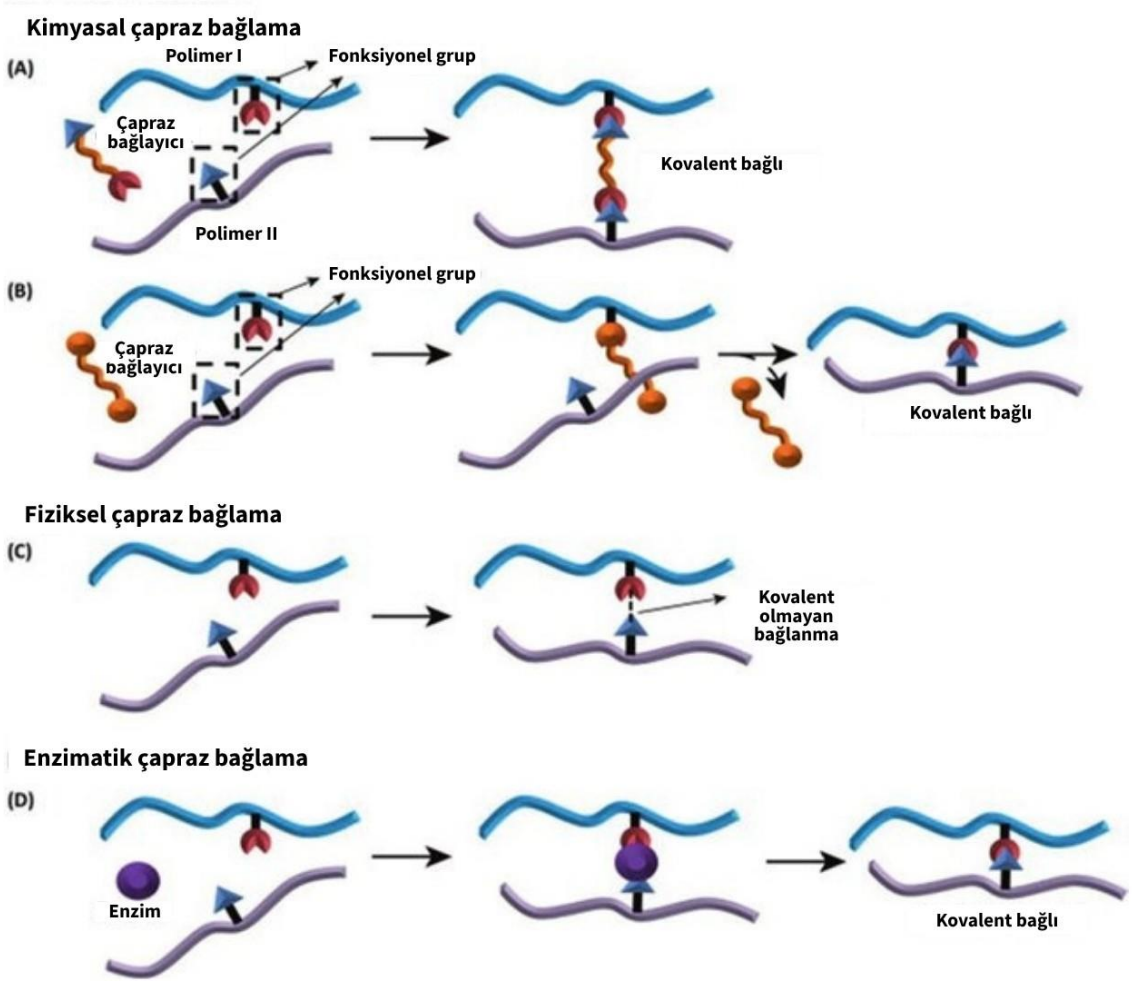
Çapraz bağlama, polimer zincirleri arasında kovalent ya da fiziksel bağlar oluşturarak biyomalzemelerin mekanik dayanıklılığını ve yapısal bütünlüğünü artırmak amacıyla uygulanan temel bir modifikasyon yöntemidir (Călina ve Raza, 2025). Bu işlem sonucunda ortaya çıkan çapraz bağlı ağ yapısı, malzemenin çözünme hızını azaltırken aynı zamanda elastikiyet, mukavemet ve şekil stabilitesi gibi fiziksel özellikleri de belirgin şekilde iyileştirir. Özellikle hidrojel sistemlerinde çapraz bağlama, üç boyutlu ve kontrollü gözenek yapılarının oluşturulmasını sağlar; bu da hücre çoğalması, besin maddelerinin difüzyonu ve mekanik stabilitenin aynı anda desteklenmesine olanak tanır (Li ve Mooney, 2016). Çapraz bağlamanın temel hedefi, biyomalzemenin çevresel koşullara karşı dayanıklılığını artırmak ve uygulama esnasında şekil bozulmalarını önlemektir. Ancak dikkat edilmesi gereken önemli bir nokta da, aşırı çapraz bağlamanın malzemenin rijitliğini artırarak hücre infiltrasyonunu engelleyebilmesi ya da biyolojik bozunabilirliğini azaltabilmesidir. Bu nedenle çapraz bağ yoğunluğu, biyomalzemenin hedeflenen uygulamaya uygun performans göstermesi için dikkatli bir şekilde optimize edilmelidir (Lai vd., 2018). Çünkü çapraz bağ düzeyi yalnızca mekanik özellikleri değil; aynı zamanda gözenek yapısını, şişme davranışını ve hücresel biyolojik yanıtları da doğrudan etkiler. Özellikle sinir dokusu gibi yumuşak ve elastik yapılarda, aşırı rijit ağ yapıları hücresel entegrasyonu ve doku benzeşimini olumsuz yönde etkileyebilir.

Çapraz bağlı biyomalzemeler, başta doku mühendisliği ve kontrollü ilaç salınımı sistemleri olmak üzere pek çok biyomedikal uygulamada yaygın şekilde kullanılmaktadır. Sinir doku mühendisliğinde ise, mekanik açıdan stabil ve biyolojik olarak etkileşimli hidrojel sistemleri tasarlamak için doğal polimerlerden elde edilen çapraz bağlı yapılar sıklıkla tercih edilmektedir. Bu sistemler, implantasyon sonrası uygun mikroçevre oluşturarak hücrelerin doğal yapılarla entegrasyonunu destekler (Caló ve Khutoryanskiy, 2015). Ayrıca kullanılan çapraz bağ tipi ve miktarı, malzemenin vücut içindeki bozunma hızını da etkileyerek; rejenerasyon süreci boyunca malzemenin kademeli olarak yerini doğal dokulara bırakmasına olanak tanıyacak şekilde planlanabilir. Çapraz bağlama teknikleri genel olarak üç ana kategori altında sınıflandırılır: kimyasal, fiziksel ve enzimatik çapraz bağlama. Her bir yöntem, biyomalzemenin yapısal ve biyolojik özelliklerini farklı şekillerde etkileyerek spesifik uygulamalara uygun sistemlerin geliştirilmesine olanak sağlar (Şekil 10).

- **Kimyasal çapraz bağlama**, polimer zincirleri arasında kalıcı kovalent bağlar oluşturarak yüksek mekanik dayanıklılık sağlayan güçlü bir yöntemdir. Bu işlem genellikle glutaraldehit, genipin veya EDC/NHS gibi reaktif çapraz bağlayıcı ajanlar kullanılarak gerçekleştirilir. Ancak bu ajanlar sitotoksik olabileceğinden, kullanılan kimyasalın konsantrasyonu, reaksiyon süresi ve kalan reaktiflerin uzaklaştırılması gibi parametreler dikkatle optimize edilmelidir. Uygun şekilde uygulandığında, bu yöntemle uzun ömürlü ve stabil yapılar elde edilebilir (Grabska-Zielińska, 2024).

- **Fiziksel çapraz bağlama** ise hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler veya iyonik kompleks oluşumu gibi geri dönüşümlü fiziksel kuvvetlere dayanır. Bu yöntem, kimyasal ajan kullanılmadığı için genellikle daha düşük toksisite riski taşır. Ancak oluşturulan yapıların mekanik stabilitesi kimyasal yöntemlere göre daha düşüktür. Düşük sıcaklık, pH değişimleri veya iyon varlığı gibi çevresel faktörlerle tetiklenebilir olması sayesinde, çevresel duyarlılığı yüksek ve kontrollü sistemlerin üretimi için avantaj sağlar (Liu vd., 2023).

- **Enzimatik çapraz bağlama** ise biyouyumlu ve hedefe yönelik modifikasyonlar sunar. HRP (horseradish peroxidase) ve transglutaminaz gibi enzimlerin kullanıldığı bu yöntem, hücrelerle yüksek uyum gösterir ve genellikle fizyolojik koşullarda gerçekleşir. Enzimatik çapraz bağlama, özellikle büyüme faktörleri ya da canlı hücrelerle birlikte uygulandığında canlılığı koruma açısından önemli avantajlar sunar. Bu nedenle, doku mühendisliği uygulamalarında hassas biyolojik bileşenlerin korunması gereken durumlarda tercih edilen bir stratejidir (Li vd., 2023).



Şekil 10. Çapraz bağlama yöntemlerinin yapısal karşılaştırması

(Reddy vd., 2015)

İF gibi doğal biyopolimerlerin çapraz bağlanması, biyomalzemenin mekanik dayanıklılığını artırmak ve biyolojik bozunma hızını kontrol altına almak açısından stratejik bir rol oynar. Bu sayede, hem yapısal bütünlük korunabilir hem de malzemenin uygulandığı biyolojik ortamda hedeflenen süre boyunca işlevini sürdürebilmesi sağlanabilir. Çapraz bağlama yönteminin türüne bağlı olarak, elde edilen hidrojel yapıları farklı özellikler gösterebilir. Örneğin, enzimatik yöntemler kullanıldığında—özellikle HRP/H_2O_2 sistemleriyle—biyoaktif bileşenlerin ve hücresel canlılığın korunması mümkün olurken, fiziksel çapraz bağlama teknikleri ise daha yumuşak, geçirgen ve hücre infiltrasyonuna uygun ağ yapıları oluşturulmasına olanak tanır. Bu çeşitlilik, uygulama alanına göre özel olarak tasarlanmış hidrojel platformlarının geliştirilmesine imkân verir. Nitekim yapılan çalışmalar, HRP/H_2O_2 temelli çapraz bağlama sistemlerinin, fibroin içeren hidrojel ağlarında

sitotoksisite oluşturmadan stabil yapılar kazandırdığını ve sinir hücrelerinin canlılığını etkin biçimde koruduğunu ortaya koymuştur (Lyu vd., 2023).

İKİNCİ BÖLÜM
KURAMSAL ÇERÇEVE/ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Bu tez kapsamında geliştirilen hidrojel sistemi, literatürde ilk kez deterjan kullanılmadan, ultrasonik destekli yöntemle hücresizleştirilmiş omurilik meninkslerinden elde edilen ham doku kaynaklı HDM ile, suda çözünebilir forma getirilmiş İF'nin kombinasyonuna dayanmaktadır. Dolayısıyla bu çalışma, her iki biyomalzemenin söz konusu formlarında bir araya getirildiği ve HRP/H_2O_2 aracılı enzimatik çapraz bağlama ile üç boyutlu hidrojel yapıya dönüştürüldüğü ilk örnek niteliğindedir. Her ne kadar bu düzeyde özgün bir kompozit yapı daha önce rapor edilmemiş olsa da literatürde İF ve kollajen gibi doğal proteinlerin birlikte kullanıldığı çok sayıda hidrojel tasarımına rastlanmaktadır. Bu bölümde, özellikle İF–kollajen temelli hidrojel sistemlerine dair yapılan çalışmalara odaklanılarak, bu alandaki bilgi birikimi özetlenecek ve sunulan sistemin literatürdeki yeri konumlandırılacaktır.

Zhang ve ark, eklem kıkırdağının sınırlı rejenerasyon kapasitesine yönelik olarak, kimyasal çapraz bağlayıcı içermeyen ve biyolojik olarak aktif bir biyoink geliştirmeyi amaçlamıştır. Bu doğrultuda, farklı oranlarda ipek İF ve hücresizleştirilmiş ekstrasellüler matriks (dSCM) içeren, kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerle (BMSC) birlikte kullanılan İF-dSCM bazlı biyobelirteçler hazırlanmıştır. İF ve dSCM bileşenleri fiziksel çapraz bağlanma ve moleküler dolanıklık yoluyla birbirine entegre edilmiştir. Yapı içindeki polietilen glikol uzaklaştırılarak porozite sağlanmış ve üç boyutlu biyobasım işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen yapıların mekanik dayanıklılıkları ve bozunma hızları, kontrollü hücre farklılaşmasına olanak tanıyacak şekilde optimize edilmiştir. Özellikle kondrogenezle ilişkili gen ekspresyon düzeyleri, yalnızca İF içeren kontrollere kıyasla anlamlı şekilde artış göstermiştir. Ayrıca, TGF-β3 salımı sağlayacak şekilde tasarlanan İF-dSCM yapılarının, BMSC'lerin kıkırdak farklılaşmasını desteklediği ve doku onarımı açısından uygun bir mikroçevre sunduğu doğrulanmıştır. Bu sonuçlar, geliştirilen yapının kıkırdak doku mühendisliği uygulamaları için biyolojik olarak aktif ve mekanik açıdan yeterli bir iskele olabileceğini ortaya koymuştur (Zhang vd., 2023).

Buitrago ve ark. *Bombyx mori* kaynaklı İF ile kollajenin kombinasyonundan oluşan kompozit hidrojellerin, hücre enkapsülasyonu ve doku mühendisliği uygulamaları için sunduğu avantajları araştırmıştır. Çalışmada, bu iki doğal proteinin birleştirilmesiyle, tek başlarına sergiledikleri sınırlı biyolojik ve mekanik özelliklerin üstesinden gelinmesi hedeflenmiştir. Özellikle kollajenin düşük mekanik dayanımı ve hücre kaynaklı büzülme eğilimi ile İF'nin hücre adezyon motiflerinden yoksun yapısının, kompozit sistemde birbirini tamamlayıcı biçimde dengelendiği ortaya konmuştur. Bu kompozit yapı sayesinde, geniş bir bileşim aralığında jelasyon sağlanabilmiş; bu durum hem jel oluşum kinetiğini hem de yapısal ve mekanik özellikleri olumlu yönde etkilemiştir. Elde edilen hidrojellerin elastikiyetleri yüksek olup, farklı gerilim modlarında kalıcı deformasyona direnç gösterdikleri bildirilmiştir. Kayma depo modülü değerleri 0,1–20 kPa arasında ayarlanabilir şekilde optimize edilmiş ve bu değerlerin yumuşak dokudan sert dokuya kadar çeşitli biyolojik ortamların sertlik aralığını kapsadığı belirtilmiştir. Ayrıca kollajen varlığı, fibroin temelli sistemin eksikliği olan hücre yapışma noktalarını sağlayarak, hücrelerin tutunma ve yayılım davranışlarını anlamlı şekilde iyileştirmiştir. Yapılar, hücreleri uzun süre boyunca canlı ve çoğalabilir biçimde 3D kültür ortamında tutabilmiş ve biyolojik açıdan stabil kalmıştır. Sonuç olarak, İF/kollajen kompozit hidrojellerin hem fiziksel hem de biyolojik parametreler bakımından ayarlanabilir ve üstün özelliklere sahip olduğu vurgulanmış; bu yönüyle hücre taşıma ve doku mühendisliği alanlarında önemli bir potansiyele sahip olduğu ifade edilmiştir (Buitrago vd., 2018).

Kayabolen ve ark. yumuşak doku defektlerinin rejenerasyonu için umut vadeden yağ doku mühendisliği alanında, vaskülarizasyonu destekleyen ve biyomekanik olarak uygun hidrojel yapıların geliştirilmesini amaçlamıştır. Bu amaçla, sıçan kaynaklı hücresizleştirilmiş yağ dokusu (DAT) ile İF farklı hacim oranlarında (3:1, 1:1 ve 1:3, DAT: İF) karıştırılarak fiziksel olarak çapraz bağlı hidrojeller oluşturulmuştur. Jelasyon süresinin fibroin oranı arttıkça kısaldığı gözlemlenmiş; özellikle 1:3 DAT: İF oranındaki hidrojel, yağ dokusuna benzer mekanik özellikler sergilemiştir. Bu yapı içerisine, yağ doku kaynaklı kök hücrelerden (ASC) türetilmiş pre-adipositler ve pre-endotelyal hücreler enkapsüle edilmiştir. İn vitro analizlerde, 1:3 oranındaki hidrojelin hücre canlılığı açısından en uygun ortamı sunduğu, pre-adipositlerin lipid vezikülleri oluşturduğu ve pre-endotelyal hücrelerin tübüler yapılar meydana getirdiği raporlanmıştır. Hücreler jel içerisine önceden 7 gün farklılaştırılmış halde yerleştirildiğinde hem adipogenik hem de endotelyal yönelimlerini

sürdürebilmişlerdir. Subkutan implantasyon sonrasında 1. ve 2. haftalar arasında erken vaskülarizasyon gözlenmiş; boş hidrojel kontrollerine kıyasla bu sürecin daha hızlı ilerlediği belirlenmiştir. Sonuçlar, 1:3 DAT: İF oranına sahip hidrojellerin, hücre farklılaşmasını ve erken vaskülarizasyonu destekleyerek, yağ doku mühendisliğinde potansiyel taşıyan fonksiyonel iskele sistemleri olarak kullanılabileceğini göstermektedir (Kayabolen vd., 2017).

Zhou ve ark. kıkırdak doku mühendisliği alanında ideal bir iskele sisteminin geliştirilmesi amacıyla, hücresizleştirilmiş kıkırdak HDM (dSCM) ve İF bazlı kompozit hidrojeller üretmiştir. Bu çalışmada, biyolojik aktiviteyi koruyarak yapısal stabiliteyi artırmak amacıyla çift aşamalı çapraz bağlama yöntemi kullanılmıştır: ışınlama ve etanol indüksiyonu. Ayrıca, jel karışımları özel kalıplara dökülerek, iç bağlantıyı ve hücre göçünü kolaylaştıracak şekilde çok kanallı üç boyutlu yapı oluşturulmuştur. Elde edilen dSCM–İF hidrojelleri liyofilizasyon sonrası gelişmiş gözenekli mikro yapı, yüksek su tutma kapasitesi, hidrofilik yüzey özellikleri ve sitotoksisite içermeyen bir profil göstermiştir. Yapıların biyolojik performansı, yağ dokusu kaynaklı stromal hücrelerin (ADSC) 2 hafta in vitro kültürü ve ardından 4 ve 12 haftalık in vivo implantasyon ile değerlendirilmiştir. Histolojik analizler (H&E, Safranin O, Tip II Kollajen boyamaları) ve qPCR sonuçları, bu yapıların ADSC'lerin kıkırdak farklılaşmasını ve yeni kıkırdak benzeri doku oluşumunu desteklediğini göstermiştir. Sonuçlar, çift çapraz bağlı ve çok kanallı dSCM–İF hidrojel iskelelerinin hem in vitro hem de in vivo ortamda yüksek plastisite, biyolojik indüksiyon kapasitesi ve rejeneratif potansiyel sunduğunu ortaya koymakta; bu yapıların kıkırdak doku mühendisliği için güçlü adaylar olduğunu göstermektedir (Zhou vd., 2023).

Fritz ve ark. insan menisküsünün taşıdığı yüksek aksiyal yükleri taklit edebilecek ve yaralanma sonrası fonksiyon kaybını telafi edebilecek 3D baskılanabilir biyomalzemeler geliştirmeyi amaçlamıştır. Bu doğrultuda, üstün mekanik özellikleriyle bilinen İF esaslı hidrojeller, bovin menisküs kaynaklı HDM, jelatin ve infrapatellar yağ yastığından elde edilen mezenkimal kök hücrelerle (IFP-MSC) birlikte tasarlanmıştır. %10 İF içeren hidrojel sistemi hem biyobaskıya uygunluk hem de hücre tutunmasını teşvik etme amacıyla HDM ve jelatin katkılarıyla optimize edilmiştir. Çalışmada, hücre içeren ve içermeyen sistemler

karşılaştırılmış; IFP-MSC'lerin çapraz bağlanma kinetiğini, β-tabaka oluşumunu ve mekanik dayanımı doğrudan etkilediği gözlemlenmiştir. Baskılanan ve kalıpta dökülen hidrojeller arasında, hücre sayısı, metabolik aktivite, ikincil yapı analizi ve mekanik özellikler açısından farklılıklar kaydedilmiştir. Özellikle, hücre içeren baskılanmış hidrojellerin 0,16 MPa'lık Young modülü, osteoartritik insan menisküsünün mekanik profiline yakınlık göstermiştir. Başlangıçta düşük hücre canlılığı gözlense de IFP-MSC'ler zamanla biyomalzeme içinde proliferasyon göstermiştir. Kondrojenik farklılaşma ortamında kültürlenen yapılar, kıkırdak belirteçlerinin ekspresyonunda anlamlı artış sergilemiş ve bu yapıların menisküs doku mühendisliği uygulamaları için yüksek potansiyele sahip olduğu sonucuna varılmıştır (Fritz vd., 2025).

Wan ve ark., sınırlı kendini yenileme kapasitesi nedeniyle tedavisi güç olan kıkırdak doku defektlerinin onarımında kullanılmak üzere biyomimetik ve mikro çevreye duyarlı bir hidrojel sistemi geliştirmiştir. Bu amaçla, p-hidroksibenzene propanoik asit ile modifiye edilmiş kitosan, İF ve HDM içeren kompozit bir yapı hazırlanmıştır. HRP katalizörlüğünde, PC ve İF üzerindeki fenol hidroksil grupları çapraz bağlanarak enjekte edilebilir formda hidrojel elde edilmiştir. DCM katkısı, yapının doğal kıkırdak HDM'ini taklit etme kapasitesini artırmış ve hidrojelin hücre tutunması ve çoğalmasını destekleyen ağ yapıları oluşturmasına olanak tanımıştır. İn vitro testlerde, bu hidrojellerin biyouyumlu olduğu ve kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (BMSC) kondrojenik farklılaşmasını teşvik ettiği gösterilmiştir. İn vivo deneylerde ise, tavşan troklear oluk ve keçi femoral kondilinde oluşturulan kıkırdak defektleri üzerine uygulanan hidrojel sisteminin, düşük immünojenisite profiliyle birlikte kıkırdak rejenerasyonunu hızlandırdığı raporlanmıştır. Sonuç olarak, bu çalışmada geliştirilen PC/İF/DCM temelli HRP çapraz bağlı kompozit hidrojel hem yapısal hem biyolojik açıdan uygunluğu sayesinde kıkırdak doku mühendisliğinde etkili bir tedavi stratejisi olarak sunulmaktadır (Wan vd., 2025).

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM
ARAŞTIRMA YÖNTEMİ/MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmada kullanılan sığır omurilik meninks dokusu, Edirne ili Keşan ilçesinde bulunan yerel bir mezbahaneden temin edilmiştir (etik kurul izni gerekmemektedir). Suda çözünebilir İF üretiminde kullanılan *Bombyx mori* ipekböceği kozaları ise Bursa'da bulunan Koza Han'dan (Türkiye) sağlanmıştır.

Deneysel aşamalarda kullanılan tüm kimyasallar, aksi belirtilmedikçe Merck (Sigma-Aldrich) firmasından tedarik edilmiştir. Çalışmada kullanılan analiz ve karakterizasyon cihazlarının marka ve model bilgileri, ilgili yöntem bölümlerinde belirtilmiştir.

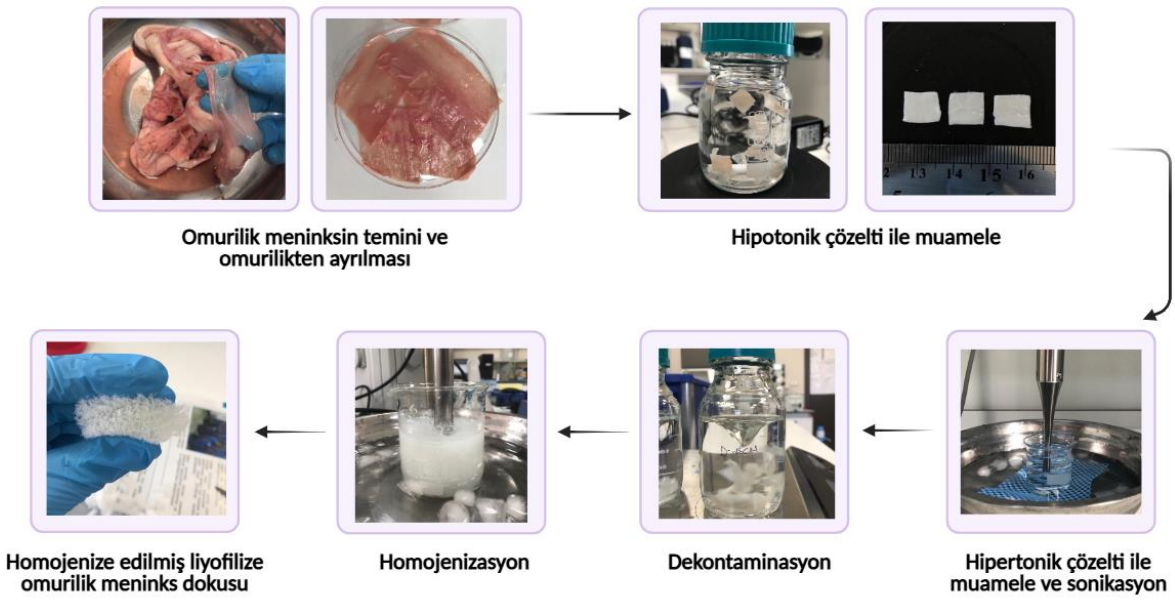
3.2. Yöntem

3.2.1. Sığır Omurilik Meninks Dokusunun Hücresizleştirilmesi

Yerel mezbahaneden temin edilen meninks dokusu soğuk zincir ile laboratuvara transfer edilerek bistüri yardımıyla omurilikten ayrılmıştır. Omurilikten ayrılan meninksler makas ve bistüri yardımıyla yağ, kan vb. safsızlıklardan arındırılarak saf su ile yıkanmıştır. Hücresizleştirme işlemine hazırlanan meninks dokuları, yaklaşık 1 × 1 cm boyutlarında kesilerek küçük parçalara ayrılmıştır. Hücresel içeriklerin uzaklaştırılması amacıyla bu dokular, pH 8,0 değerine sahip hipotonik bir çözelti (10 mM Trizma-HCl ve 5 mM EDTA) içerisinde 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. İşlem sonunda dokular, distile su (dH_2O) ile dikkatlice durulanarak arındırılmıştır. Durulama sonrasında dokular, pH 8,0 değerindeki hipertonik bir çözeltiye (50 mM Trizma-HCl ve 5 mM EDTA) aktarılmış ve bir buz banyosu içerisinde, ultrasonik homojenizatör (Scientz JY88-IIN) kullanılarak 125 Watt güçte 30 dakika boyunca sonikasyona tabi tutulmuştur. Sonikasyonun ardından dokular yeniden dH_2O ile iyice durulanmıştır. Ardından dokular, pH 7,5'e ayarlanmış ve 50 mM Trizma-HCl ile 10 mM $MgCl_2$ içeren bir tampon çözeltisine alınmış; içerisine DNaz (40 µg/mL) ve RNaz (20 µg/mL) enzimleri eklenerek 37,5 °C'de 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. Enzimatik

işlem sonrasında, dokular çift distile su (ddH_2O) ile yıkanarak nükleik asit kalıntılarından tamamen arındırılmıştır.

Bir sonraki adımda meninks dokuları, %0,1 perasetik asit ve %4 etanol içeren bir çözeltide 5 saat boyunca dekontaminasyona tabi tutulmuştur. Bu işlem, doku yüzeyinde veya içinde bulunabilecek olası mikrobiyal kontaminasyonların ortadan kaldırılması ve biyolojik güvenliğin sağlanması amacıyla gerçekleştirilmiştir. Dekontaminasyon sonrasında dokular, ddH_2O ile tekrar durulanarak kimyasal kalıntılardan tamamen temizlenmiştir. Tüm bu işlemlerin ardından elde edilen dokular, 5 gram yaş dokuya karşılık gelecek şekilde 20 mL dH_2O içeren cam bir şişeye yerleştirilmiş ve buz banyosunda homojenize edilmiştir. Elde edilen süspansiyon cam balonlara aktarılmış, -26 °C'de 24 saat süreyle dondurulmuş ve ardından liyofilizasyon işlemine tabi tutulmuştur. İşlem basamakları sırasıyla Şekil 11'de görsel olarak sunulmuştur.



Şekil 11. Sığır omurilik meninks dokusunun hücresizleştirilmesi aşamaları

3.2.2. Hücresizleştirilmiş Omurilik Meninks Dokusunun Sindirilmesi

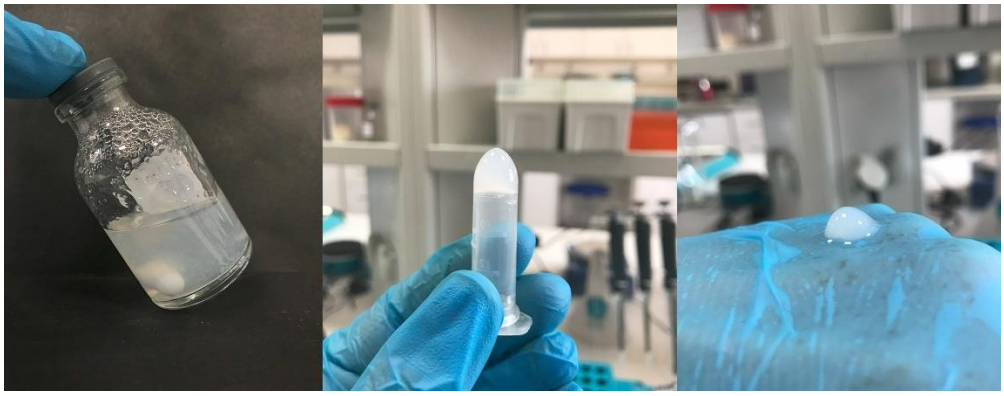
Liyofilize edilen omurilik meninks dokuları, enzimatik sindirim işlemi için uygun hale getirilmek amacıyla küçük parçalara ayrılmıştır. Bu aşamada, sindirim koşullarının

optimize edilmesi amacıyla çeşitli asit çözeltileri kullanılarak ön çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Deneysel tasarımda; 0,01 M HCl, 0,1 M HCl, 40 mM asetik asit ve 60 mM asetik asit çözeltileri kullanılarak pepsinle sindirim işlemleri uygulanmıştır (Şekil 12).



Şekil 12. Farklı asit çözeltileriyle hazırlanan meninks pre-gel örnekleri

Tüm deneysel gruplarda pepsin konsantrasyonu 1 mg/mL, doku konsantrasyonu ise 10 mg/mL olarak sabit tutulmuştur. Pepsin enzimi (SIGMA-77160), ilgili asit çözeltisi içerisinde çözündürülerek hazırlanmış ve ardından önceden parçalanmış meninks dokuları bu çözeltiye ilave edilmiştir. Elde edilen karışımlar, manyetik karıştırıcı üzerinde 24 saat süreyle sindirime bırakılmıştır. Sindirim sürecinin tamamlanmasının ardından, çözünmemiş partiküllerin uzaklaştırılması amacıyla 10.000 ×g'de 5 dakika süreyle santrifüj işlemi uygulanmıştır. Santrifüj sonrasında üst fazda toplanan pre-gel çözeltileri steril falcon tüplere alınarak +4 °C'de muhafaza edilmiştir. Yapılan ön çalışmalar kapsamında, farklı asit çözeltileriyle hazırlanan pre-gel örnekleri nötralize edilerek jel formasyonları değerlendirilmiştir. Bu karşılaştırmalar sonucunda, 0,01 M HCl ile hazırlanan çözeltiye %7,5'lik sodyum bikarbonat eklenerek yapılan nötralizasyon sonrası diğer koşullara göre daha homojen ve stabil bir jel elde edildiği gözlemlenmiştir. Bu nedenle, deneysel uygulamalarda 0,01 M HCl ile hazırlanan sindirim koşulları tercih edilmiştir (Şekil 13).

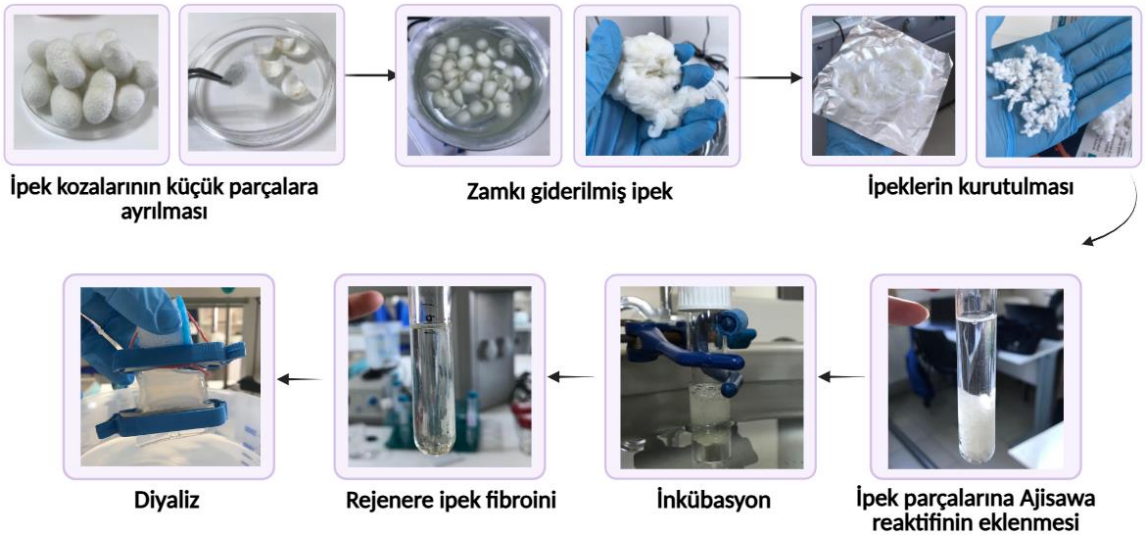


Şekil 13. 0,01 M HCl ile sindirilmiş meninks pre-gel örneğinin nötralizasyon sonrası jel formu

3.2.3. Suda Çözünür İpek Fibroin Ekstraksiyonu

Ticari olarak temin edilen *Bombyx mori* ipekböceği kozaları, üzerlerinde bulunan artık böcek parçacıklarından arındırıldıktan sonra küçük parçalara ayrılmıştır. Serisin (zamk) uzaklaştırma işlemi için, parçalanmış ipekler %0,05 M sodyum karbonat (Na_2CO_3) çözeltisi içerisinde 60 dakika süreyle kaynatılmıştır. Kaynatma işleminin ardından ipekler, dH_2O ile üç kez durulanarak serbest serisin kalıntılarından arındırılmıştır. Temizlenen ipekler, alüminyum folyo üzerine serilerek oda sıcaklığında bir gece boyunca kurutulmuştur. Kurutulan ipekler, daha sonraki işlemler için hazırlanarak karanlık bir ortamda muhafaza edilmiştir.

İF çözeltisinin hazırlanması amacıyla, 1:8:2 molar oranında formüle edilmiş Ajisawa reaktifi ($CaCl_2$:H_2O:EtOH), 1:15 (w/v) oranında (ipek: reaktif) olacak şekilde ipek örneklerinin üzerine eklenmiştir (Ajisawa, 1998). Elde edilen karışım, 60 °C sıcaklıktaki su banyosunda 30 dakika süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında elde edilen suda hİF çözeltisi, düşük moleküllü safsızlıkların uzaklaştırılması amacıyla 72 saat boyunca distile suya karşı diyalize edilmiştir. Diyaliz işlemi tamamlandıktan sonra çözeltide kalabilecek partiküller, 9600 rpm'de santrifüj edilerek uzaklaştırılmıştır. Elde edilen berrak süpernatant toplanarak +4 °C'de saklanmıştır. Uygulanan işlem basamakları görsel olarak Şekil 14'te sunulmuştur.



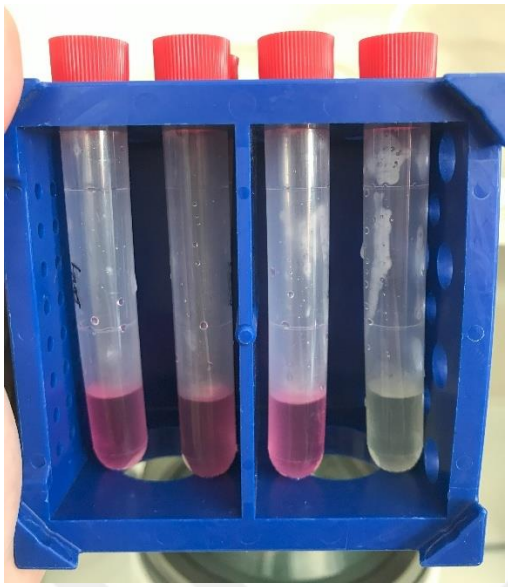
Şekil 14. Suda çözünebilir ipek fibroin (İF) üretim sürecine ait görsel işlem basamakları

3.2.4. Çift Sarmal DNA İçerik Analizi

İşlem görmemiş ham doku ve hücresizleştirilmiş doku örneklerinden çift sarmallı DNA (çsDNA) izolasyonu, üretici firmanın talimatlarına uygun olarak PureLink™ Genomic DNA saflaştırma kiti (ThermoFisher Scientific, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen çsDNA miktarları; ham doku, ultrasonik yöntemle hücresizleştirilmiş doku (dSCM-US) ve deterjanla hücresizleştirilmiş doku (dSCM-D) grupları için, Qubit™ 1X dsDNA Broad Range (BR) test kiti kullanılarak ölçülmüştür. Ölçümler, kit protokolüne uygun biçimde Qubit 4 Fluorometer (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, ABD) cihazı ile yapılmıştır.

3.2.5. Hidroksiprolin İçerik Analizi

Kolajen miktarının belirlenmesi amacıyla, hidroksiprolin (HYP) içeriği Elabscience HYP Colorimetric Assay Kiti (E-BC-K062-S) kullanılarak, kit protokolüne uygun şekilde analiz edilmiştir. Bu analiz sayesinde, hücresizleştirme işleminin doku bütünlüğü ve HDM yapısı üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir**.** Hücresizleştirme öncesi (sarı renkli, ham doku) ve sonrası doku örneklerinde hidroksiprolin (kolajen) içeriği, belirtilen kit ile yapılan analiz sonucunda elde edilen renk yoğunluklarıyla görsel olarak değerlendirilmiştir (Şekil 15).



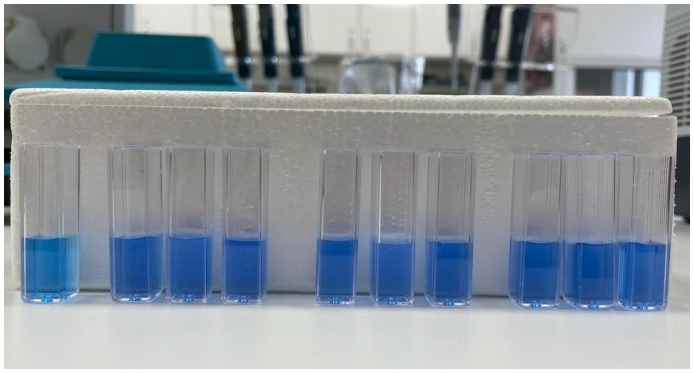
Şekil 15. Hidroksiprolin analizine ait renk değişimleri

3.2.6. Glikozaminoglikan (sGAG) İçerik Analizi

Omurilik meninks dokusundaki sülfatlanmış glikozaminoglikan (sGAG) içeriğini belirlemek amacıyla, yaklaşık 10 mg kuru doku örneği tartılarak 2 mL papain sindirim çözeltisi içinde hazırlanmıştır. Bu çözeltide 100 mM Na_2HPO_4, 10 mM Na_2EDTA, 10 mM L-sistein ve 0,125 mg/mL papain içeren ve pH değeri 7,5'e ayarlanmış bir tampon sistem kullanılmıştır. Örnekler, 65 °C sıcaklıktaki blok ısıtıcıda (Jeiotech, Kore), 500 rpm karıştırma hızında 12 saat boyunca inkübe edilmiştir. Sindirim işleminin ardından, enzimatik aktivitenin sonlandırılması amacıyla örnekler 100 °C'de 15 dakika süreyle ısıtılmıştır.

Elde edilen sindirilmiş çözeltilere 1,9-dimetil-metilen mavisi (DMMB) boyası eklenmiş (Şekil 16) ve sGAG miktarları, 525 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değerleri, aşağıda verilen denklem aracılığıyla sGAG konsantrasyonlarına dönüştürülmüştür:

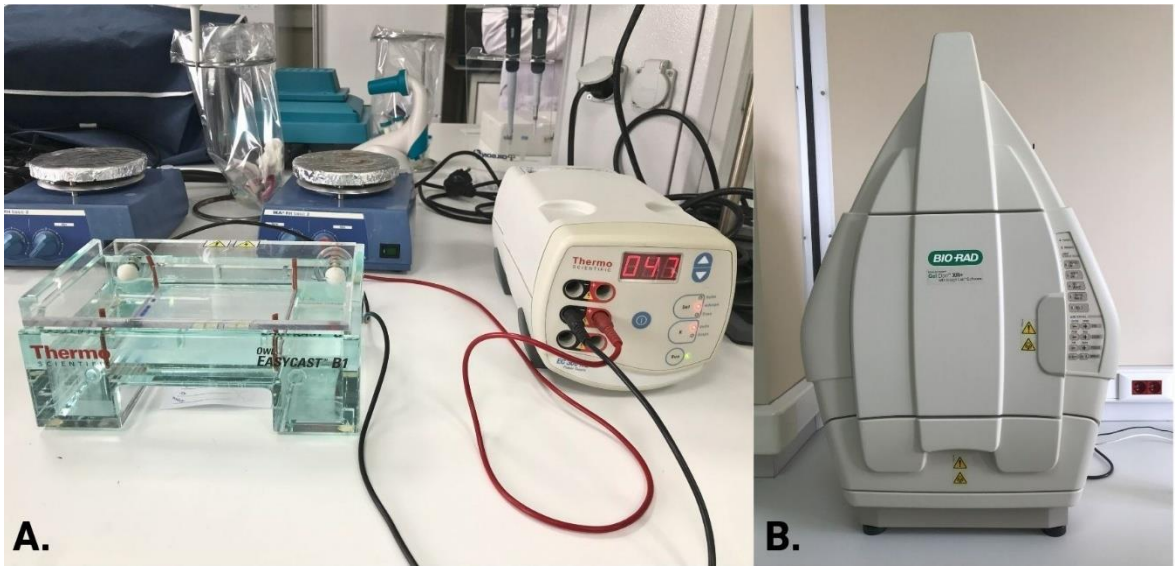
sGAG Kuru Ağırlık (µg/mg) = [(OD_{525}/eğim) x (seyreltme faktörü x toplam hacim)] /(omurilik meninks dokusunun ağırlığı (mg)) (3.1)



Şekil 16. sGAG tayini için boya uygulanmış meninks örneklerinin spektrofotometrik ölçümüne yönelik hazırlanan küvet görüntüleri

3.2.7. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi için %1,5 oranında agaroz jel, pH 8,3'e ayarlanmış 1X Tris-Borik Asit-EDTA (TBE) tamponu içerisinde hazırlanmıştır. Ham ve deselülarize edilmiş meninks dokularından izole edilen çsDNA örnekleri, hazırlanan jellere yüklenmiş ve elektroforez işlemi 1X TBE tamponu içinde, yatay elektroforez cihazı (Thermo, Owl EASYCAST B1, ABD) kullanılarak 90 V sabit voltajda 2 saat boyunca gerçekleştirilmiştir (Şekil 17A). Jel üzerinde oluşan çsDNA bantları, Biorad Gel Doc XR+ (ABD) görüntüleme sistemi (Şekil 17B) ve ImageLab yazılımı ile analiz edilmiştir.



Şekil 17. Agaroz jel elektroforezi sistemi (A) Jel görüntüleme cihazı (B)

3.2.8. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) Analizi

SDS-PAGE analizi, Laemmli (1970) yöntemine uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Analiz öncesinde dikey elektroforez düzeneği dikkatle kurulmuş; cam plakalar arasına yerleştirilen spacer'ların hizalanmasına ve düzeneğin su terazisiyle dengede olmasına özen gösterilmiştir. Kurulan düzenek, jel dökme standına yerleştirilmiş ve kalın camın desteğiyle eşit basınç uygulanarak mandallar yardımıyla sıkıca sabitlenmiştir. Yükleme ve ayırma jelleri Tablo 1'deki oranlar kullanılarak hazırlanmıştır.

İlk aşamada %12,5'lik yürütme jeli hazırlanmış; polimerizasyonun başlatılması için son aşamada karışıma amonyum persülfat (APS) ve katalizör olarak tetrametiletilendiamin (TEMED) eklenmiştir. Jel yüzeyinin hava ile temasını engellemek amacıyla üzerine %99,9 izopropanol dökülmüş ve polimerizasyonun tamamlanması için yaklaşık 1 saat beklenmiştir. Süre sonunda izopropanol uzaklaştırılmış, jel yüzeyi jel overlay çözeltisiyle iki kez yıkanarak filtre kâğıdı yardımıyla kurulanmıştır. Daha sonra, %4'lük yükleme jeli hazırlanmış ve ayrıştırma jelinin üzerine dikkatlice dökülmüştür. Protein kuyucuklarının oluşturulması amacıyla tarak, alt jelle arasında en az 1 cm boşluk kalacak şekilde hızlı ve dikkatli biçimde yerleştirilmiştir. Yükleme jelinin polimerizasyonu için yaklaşık 30 dakika beklenmiş, ardından jel ünitesi elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Tankın alt kısmına referans çizgisine kadar, üst kısmına ise jelin tamamen ıslanmasını sağlayacak düzeyde 1X SDS elektroforez tamponu (pH 8,3) eklenmiştir. Jel yeterince ıslandıktan sonra tarak, kuyucuklar zarar görmeyecek şekilde dikkatlice çıkarılmıştır.

Protein örnekleri elektroforeze uygun hale getirilmek üzere numune tamponu ile 1:1 oranında karıştırılmış ve 100 °C'de 5 dakika süreyle denatürasyona tabi tutulmuştur. Denatürasyon işlemi sonrasında soğutulan örnekler kuyucuklara dikkatlice yüklenmiştir. Her bir örnekten kuyucuklara 5 µL yüklenmiş olup; sırasıyla BSA'dan 0,5 µg, Tip I kolajenden 12,5 µg, dSCM-US örneğinden 12,5 µg ve hİF örneğinden 50 µg protein yüklenmiştir. İlk kuyucuğa ise referans olarak protein marker (Biorad, Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards; Katalog No: 161-0377) eklenmiştir. Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra elektroforez, 10 °C'de ve 15 mA sabit akımda yaklaşık 2 saat süreyle

yürütülmüştür. Yürütme tamamlandıktan sonra jel, dikkatlice cam plakalar arasından ayrılmış ve saf su içerisine alınmıştır. SDS içeriğinin uzaklaştırılması amacıyla jel üç kez 10'ar dakikalık saf su yıkamasına tabi tutulmuştur.

Tablo 1

SDS-PAGE analizinde kullanılan çözeltiler ve içerikleri

Çözelti	**İçerik**	**%12,5 Yürütme Jeli (10 mL)**	**%4 Yükleme Jeli (5 mL)**
Akrilamid/Bisakrilamid	%30 (w/v) Akrilamid ve %0,8 (w/v) Bisakrilamid çözeltisi	4,16 mL	0,66 mL
Yürütme jel tamponu (pH 8,8)	1,5 M Tris-HCl (ultra saf suda çözülmüş)	2,5 mL	-
Yükleme jel tamponu (pH 6,8)	0,5 M Tris-HCl (ultra saf suda çözülmüş)	-	1,26 mL
%10 SDS	SDS'in ultra saf sudaki çözeltisi	100 uL	50 uL
Ultra saf su	-	3,185 mL	3 mL
APS	%10 Amonyum persülfat çözeltisi (taze hazırlanmalı)	50 uL	25 uL
TEMED	Tetrametiletilendiamin (ticari olarak temin edilmiştir)	5 uL	5 uL
Diğer Çözeltiler			
1X Yürütme Tamponu	0,025 M Tris, 0,192 M Glisin ve %0,1 (w/v) SDS, (pH 8,3) (Oda sıcaklığında muhafaza edilebilir, kullanılmış tampon süzülerek yeniden kullanılabilir.)		
2X Numune Hazırlama Tamponu	0,125 M Tris-HCl, %2 SDS, %25 (v/v) gliserol, %0,01 (w/v) bromofenol mavisi (pH 6,8) (Tampon ışığa duyarlıdır, ışıktan korunmalıdır. -26 ℃' de porsiyonlanarak saklanabilmektedir.)		

Tablo 1'in devamı

Merkaptoetanollü Numune Tamponu	950 µL 2X numune hazırlama tamponu ve 50 µL β-merkaptoetanol (Karışımın taze hazırlanması gerekmektedir.)
Ayrılma Jeli Overlay	0,375 M Tris-HCl, %0,1 SDS (pH 8,8) (Çözelti +4 ℃' de 3 ay muhafaza edilebilir.)

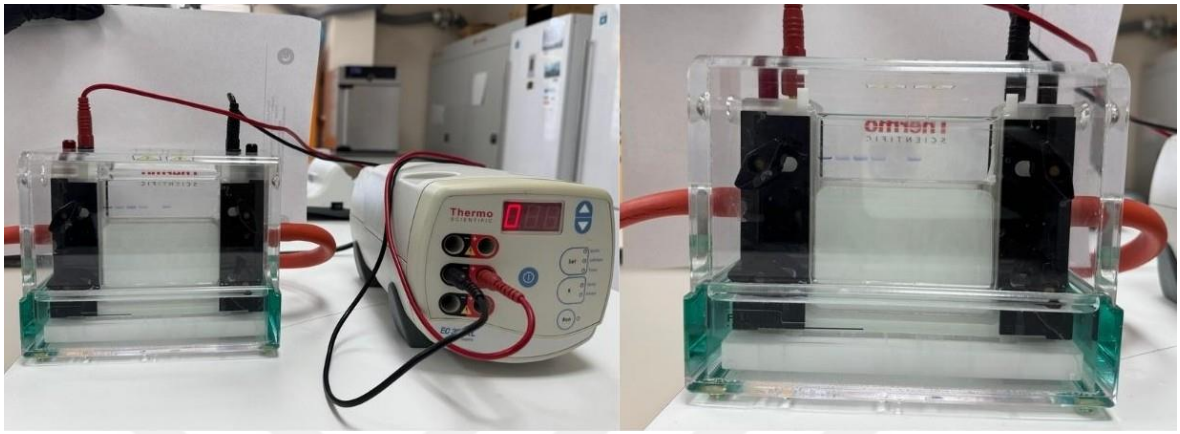
Boyama işlemi için kolloidal Coomassie Brilliant Blue (CBB) G-250 boyası Tablo 2'deki prosedüre göre hazırlanmış ve jel bu boya içerisinde gece boyunca hafif çalkalama ile boyanmıştır. Boyama sonrasında fazla boya, saf su ile iki kez 10 dakika süreyle yıkama yapılarak uzaklaştırılmıştır. Jel bantlarının belirginleştirilmesi amacıyla boya uzaklaştırma çözeltisinde 1 saat bekletilmiş ve ardından tekrar saf su ile iki kez yıkanmıştır. Elde edilen jel görüntüsü, Biorad Gel Doc XR+ (ABD) görüntüleme sistemi ile kaydedilmiştir.

Tablo 2

SDS-PAGE analizinde kullanılan boyama ve boya uzaklaştırma çözeltilerinin bileşenleri ve hazırlanma oranları

Boyama Çözeltisi (100 ml)		
Kimyasal	**Konsantrasyon**	**Miktar**
Coomasie Brilliant Blue G-250	%0,02 (w/v)	20 mg
Alüminyum Sülfat-(14-18)-hidrat	%5 (w/v)	5 g
Etanol (%96)	%10 (v/v)	10 ml
Ortofosforik Asit (%85)	%2 (v/v)	2,35 ml
Ultra Saf Su	-	87,65 ml
Boya Uzaklaştırma Çözeltisi (100 ml)		
Etanol (%96)	%10 (v/v)	10 ml
Ortofosforik Asit (%85)	%2 (v/v)	2,35 ml

Tablo 2’in devamı		
Ultra Saf Su	-	87,65 ml



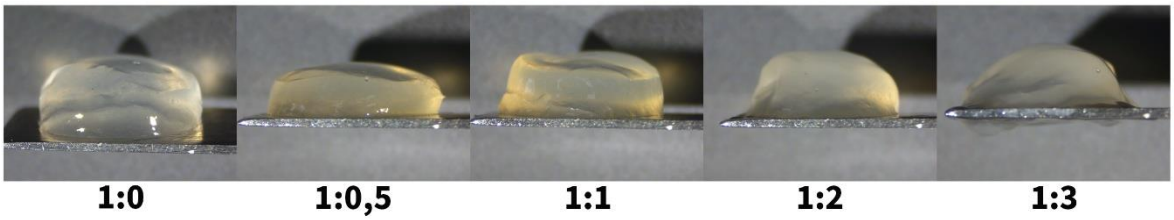
Şekil 18. Elektroforez sistemi ve örneklerin yürütülme aşaması

3.2.9. Kompozit Hidrojellerin Üretimi

Deselülerize spinal kord meninks (dSCM) dokusundan elde edilen pre-gel formundaki hidrojel, suda çözünebilir İF ile modifiye edilerek kompozit hidrojel formuna dönüştürülmüştür. Bu işlem için öncelikle, +4 °C’de muhafaza edilen dSCM bazlı pre-gel çözeltileri oda sıcaklığına getirilmiştir. Ardından, bu çözeltiler 1:0, 1:0,5, 1:1, 1:2 ve 1:3 (dSCM:İF, v/w) oranlarında karıştırılarak farklı kompozit formülasyonlar hazırlanmıştır.

Homojen bir yapı elde edilmesini sağlamak amacıyla, her iki bileşen belirtilen oranlarda birleştirilmiş ve mekanik olarak karıştırılmıştır. Karıştırma işleminin tamamlanmasının ardından, çapraz bağlanmayı başlatmak üzere karışımlara 20 U/mL HRP (274,0 U/mg) ve 1/10 oranında (v/v) 40 mM H_2O_2 eklenmiştir. Bu reaktiflerin ilavesiyle birlikte, jelasyonun hızla gerçekleşebilmesi amacıyla karışım pipet yardımıyla kalıplara aktarılmış ve yaklaşık 5–10 dakika içinde jel oluşumu tamamlanmıştır. Jelasyonun ardından, yapısal olgunluğun sağlanabilmesi için hidrojeller 1 saat süreyle bekletilmiştir (Şekil 19). Elde edilen kompozit hidrojeller, fizikokimyasal karakterizasyon çalışmaları için dondurularak liyofilize edilerek kriyojel formunda kullanılmıştır. Öte yandan, reolojik,

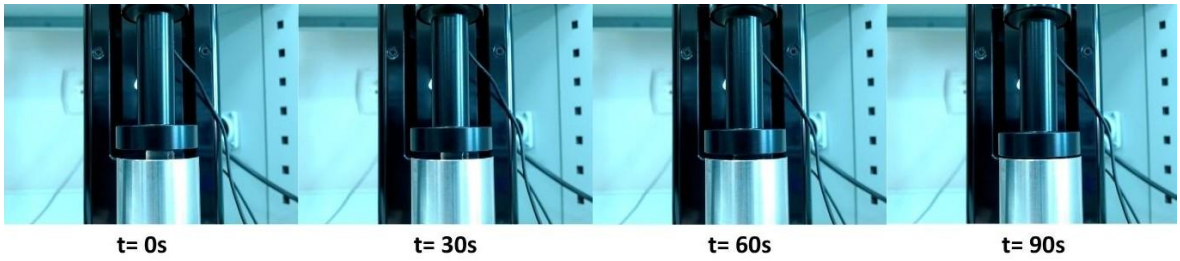
mikromekanik, in ovo ve hücre kültürü analizlerinde kullanılacak hidrojeller ise her deney öncesinde taze olarak hazırlanmıştır.



Şekil 19. Olgunlaşan kompozit hidrojellerin stereo mkroskop görüntüleri

3.2.10. Mikromekanik Analiz

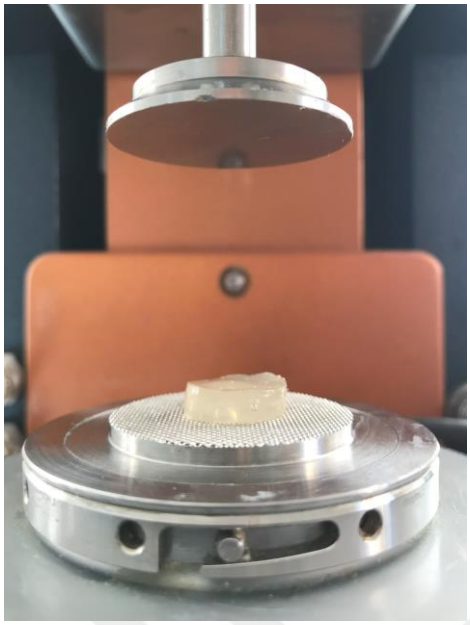
Kompozit hidrojellerin mekanik özelliklerini değerlendirmek ve formülasyona eklenen suda çözünebilir ipek fibroinin (hİF) etkisini analiz etmek amacıyla tek eksenli basma testleri uygulanmıştır. Bu testler için silindirik formda (çap: 11 mm; yükseklik: 10 mm) hazırlanan kompozit hidrojel örnekleri, iki plaka arasına yerleştirilmiş ve 10 N kapasiteli yük hücresi kullanılarak 0,05 mm/s hızla sıkıştırılmıştır. Örnekler, orijinal yüksekliklerinin %85–90'ı oranında deformasyona uğratılmıştır. Şekil 20'de basma testi sürecinde elde edilen gerçek zamanlı görüntülerden seçilmiş kareler yer almaktadır. Bu görseller, testin uygulanışını ve örneklerin deformasyon davranışını görsel olarak sunmak amacıyla yalnızca 1:0,5 oranındaki kompozit hidrojel örneğine ait olup sırasıyla t = 0, 30, 60 ve 90 saniyedeki durumu göstermektedir. Basma testleri, UniVert mekanik test sistemi (CellScale Biomaterials Testing) ile gerçekleştirilmiştir. Test sırasında elde edilen kuvvet ve yer değiştirme verileri kullanılarak gerilme-gerinim eğrileri oluşturulmuş; bu eğriler üzerinden hidrojellerin elastik modülünü temsil eden Young modülü hesaplanmıştır.



Şekil 20. 1:0,5 oranındaki kompozit hidrojel örneğine ait basma testi sırasında elde edilen deformasyon görüntüleri (t = 0, 30, 60, 90 s)

3.2.11. Reolojik Analizler

Kompozit hidrojellerin reolojik özellikleri, DHR-2 reometre (TA Instruments, New Castle, ABD) kullanılarak analiz edilmiştir. Ölçümler sırasında hidrojeller, çapı 25 mm olan çapraz tırtıklı paralel çelik plakalar arasına yerleştirilmiş ve 1 mm'lik boşluk bırakılarak testler gerçekleştirilmiştir (Şekil 21). Hidrojellerin doğrusal viskoelastik bölgesini (LVR) belirlemek amacıyla, 25 °C sıcaklıkta ve 1 Hz frekansta, %0,01 ile %100 aralığında salınımlı genlik taraması yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre belirlenen LVR aralığında, 0,01–100 Hz frekans aralığında frekans taramaları gerçekleştirilmiştir. Bu analizler sonucunda, hidrojellerin depolama modülü (G′), kayıp modülü (G″) ve sönümleme faktörü (tan δ) değerleri belirlenerek dinamik koşullardaki viskoelastik davranışları değerlendirilmiştir. Buna ek olarak, hidrojellerin kontraktilite (kasılabilirlik) ve rijitlik özelliklerini değerlendirmek üzere, dinamik salınımlı reoloji ölçümleri sırasında sırasıyla %0,1 (200 s), %100 (200 s), %0,1 (200 s) ve %100 (200 s) gerinim değerleri ardışık olarak uygulanmıştır. Bu protokol, materyalin değişken deformasyon altında gösterdiği mekanik yanıtı incelemek amacıyla tasarlanmıştır.



Şekil 21. Kompozit hidrojel örneğinin reolojik analiz öncesinde DHR-2 reometrede paralel plaka sistemiyle konumlandırılması

3.2.12. Atenüe Toplam Reflektans Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (ATR-FTIR) Spektroskopisi

Ham ve hücresizleştirilmiş omurilik meninks dokularındaki kimyasal bağ farklılıklarını belirlemek amacıyla, ATR modunda Nicolet IS50 Flex Gold Kızılötesi Spektrometre (Thermo Fisher Scientific, Madison, WI, ABD) kullanılarak Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi (ATR-FTIR) analizi gerçekleştirilmiştir. Her bir numunenin IR spektrumu, 4000–500 cm^{-1} dalga sayısı aralığında, 16 cm^{-1} spektral çözünürlükle ve 64 tarama sayısı ile oda sıcaklığında kaydedilmiştir. Ölçüm öncesinde arka plan spektrumu alınmış ve ortam koşullarındaki değişikliklere karşı otomatik düzeltme uygulanmıştır.

3.2.13. Termogravimetrik Analiz (TGA)

Ham ve deselülarize edilmiş omurilik meninks iskelelerinin termal özelliklerini belirlemek amacıyla termogravimetrik analiz (TGA), Perkin Elmer TGA 8000™ (PerkinElmer, ABD) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analiz sırasında, her bir

numune 30 °C'den başlayarak 800 °C'ye kadar, dakikada 10 °C'lik ısıtma hızıyla ısıtılmıştır. Isıtma işlemi, 15 mL/dakika akış hızında azot gazı altında yürütülerek inert atmosfer sağlanmıştır. Bu yöntemle, kompozit kriyojellerin termal kararlılıkları ve bozunma profilleri değerlendirilmiştir.

3.2.14. X-Işını Difraktometre Analizi (XRD)

Kompozit kriyojeller ile birlikte suda çözünebilir İF ve dSCM örneklerinde kristallilik derecesini değerlendirmek amacıyla XRD analizi uygulanmıştır. Analizler, Cu-Kα radyasyonu (λ = 1,54056 Å), 45 kV gerilim ve 40 mA akım koşullarında gerçekleştirilmiştir. Kristal yapının doğru şekilde değerlendirilmesini sağlamak amacıyla veriler, 5°–70° 2θ aralığında ve 0,02°/dakika tarama hızında toplanmıştır.

3.2.15. Brunauer-Emmett-Teller (BET) Analizi

Üretilen kompozit kriyojellerin toplam yüzey alanı, gözenek hacmi ve gözenek çapı dağılımı, BET-BJH analiz yöntemi kullanılarak karakterize edilmiştir. Bu analizler, Micromeritics 3Flex (Micromeritics, Atlanta, ABD) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Ölçüm öncesinde, numunelere 100 °C sıcaklıkta 1 saat süreyle degas (gaz giderme) işlemi uygulanarak yüzeydeki nem ve uçucu bileşiklerin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Ardından, 77 K sıcaklıkta azot gazı atmosferi altında ve 0,01–0,99 P/P_0 basınç aralığında gaz adsorpsiyon ölçümleri yapılmıştır.

3.2.16. Temas Açısı Analizi

Kompozit kriyojel yüzeyinin ıslanabilirlik özelliklerini değerlendirmek amacıyla temas açısı ölçümleri, su temas açısı ölçüm cihazı (Dataphysics OCA15EC, Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analizler sırasında, yüzeye bir şırınga yardımıyla 5 µL saf su damlatılmış ve temas açıları ±1° hassasiyetle ölçülmüştür. Bu ölçümler sayesinde, kriyojel yüzeyinin hidrofilik veya hidrofobik karakteri değerlendirilmiştir.

3.2.17. Şişme Testi

Kompozit kriyojellerin sıvı tutma ve şişme kapasiteleri, Shirosaki ve ark. tarafından tanımlanan yönteme benzer şekilde, pH 7,2–7,4 aralığındaki fosfat tamponlu salin (PBS) çözeltisi kullanılarak uygulanan şişme testi ile değerlendirilmiştir (Shirosaki vd., 2009). Bu doğrultuda, öncelikle her bir kriyojel örneğinin kuru kütlesi (m_{kuru}) hassas bir terazi ile tartılarak kaydedilmiştir. Daha sonra, her bir kuru kriyojel 10 mL PBS içeren ayrı kaplara yerleştirilmiş ve 37 °C'de, etüv (Memmert UN30, Almanya) içerisinde 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda örneklerin ıslak kütleleri ($m_{ıslak}$) yeniden tartılmış ve kriyojellerin şişme yüzdesi, aşağıda verilen Denklem (3.2) kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Şişme Oranı (\%) (mg/mg)} = [[(m_{ıslak} - m_{kuru})] / (m_{kuru})] \times 100 \quad (3.2)$$

3.2.18. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM)

Kompozit kriyojellerin hem hücresiz hem de hücre yüklü formlarının yüzey morfolojisini incelemek amacıyla taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu doğrultuda örnekler, fosfat tamponlu salin (PBS, pH 7,2–7,4) içerisinde hazırlanmış %2,5 (v/v) glutaraldehit çözeltisinde en az 24 saat süreyle fikse edilmiştir. Sabitleme işlemi sonrası örnekler, distile su ile yıkanmış ve ardından sırasıyla %50, %70, %80, %90, %95 ve %100 etanol konsantrasyonlarından geçirilerek dehidratasyon işlemi uygulanmıştır. Tamamen kurutulan örnekler, SEM analizinden önce yüksek vakum altında, %80 altın – %20 palladyum (Au–Pd) alaşımı kullanılarak 90 saniye süreyle kaplanmıştır. Yüzey görüntüleme işlemi, 10 kV hızlandırma voltajında ve farklı büyütme oranlarında gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen SEM görüntüleri, ImageJ yazılımı (Sürüm 6.0.0.260, NIH) kullanılarak analiz edilmiştir. Gözenek boyutu ve dağılımını belirlemek amacıyla rastgele seçilen bir

örnekten alınan 100 farklı gözenek ölçülmüş ve bu veriler üzerinden ortalama gözenek çapı ile yüzdesel dağılım hesaplanmıştır.

3.2.19. *In Vitro* Bozunurluk Analizi

Kompozit materyallerin hidrolitik stabilitesini ve in vitro bozunma davranışını değerlendirmek amacıyla degradasyon testleri uygulanmıştır. Test öncesinde, örneklerin başlangıç kütleleri (m_{ilk}) hassas terazi ile ölçülerek kaydedilmiştir. Daha sonra her bir örnek, bozunmayı yavaşlatıcı koruyucu ajan olarak %0,05 (w/v) sodyum azid içeren fosfat tamponlu salin (PBS, pH 7,3–7,4) çözeltisine daldırılmıştır.

Bu koşullar altında, örnekler 37 °C sıcaklıkta, hafif çalkalama eşliğinde 7 ve 14 gün süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda, örnekler ortamdan alınmış, yüzeyde oluşabilecek tuz kalıntılarını gidermek amacıyla deiyonize su ile yıkanmıştır. Ardından, örnekler liyofilize edilerek son kütleleri (m_{son}) yeniden tartılmıştır. Bozunma oranı, aşağıda verilen Denklem (3.3) yardımıyla hesaplanmıştır:

$$Weight\ Loss\ (\%) = \frac{(m_i) - (m_f)}{(m_f)} \times 100 \quad (3.3)$$

3.2.20. Immuno/Histokimyasal Analizler

Hücresizleştirme sürecinin etkinliğini ve doku mimarisi üzerindeki yapısal değişimleri değerlendirmek amacıyla, hematoksilen-eozin (H&E), Sirius kırmızısı ve Alcian mavisi boyamaları uygulanmıştır. Bu kapsamda, doku örnekleri öncelikle %10'luk nötral tamponlu formalin solüsyonunda 48 saat fikse edilmiştir. Fiksasyonu takiben, örnekler sırasıyla %50, %70, %80, %85, %90 ve %100'lük etanol serilerinden geçirilerek dehidrate edilmiştir. Etanol kalıntılarının uzaklaştırılması amacıyla, örnekler oda sıcaklığında 24 saat boyunca açık ortamda bekletilmiştir. Tamamen kuruyan dokular parafine gömülmüş, ardından 3–5 μm kalınlığında kesitler mikrotom cihazı ile alınarak Poly-L-lizin kaplı mikroskop lamları üzerine yerleştirilmiştir. Parafin uzaklaştırmak amacıyla

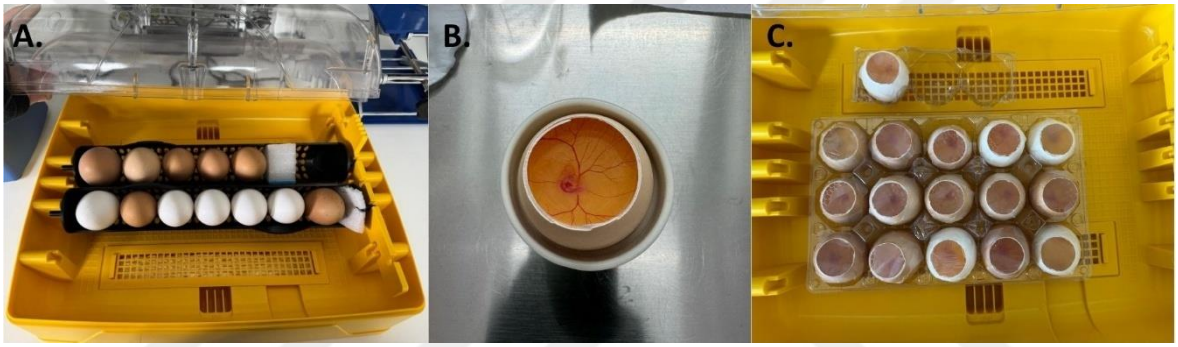
deparafinizasyon işlemi uygulanmış, sonrasında kesitler saf su ile rehidrate edilerek histolojik boyama protokolleri doğrultusunda boyanmıştır (Chen vd., 2023; Yazdanpanah vd., 2023). Hücre kültürü deneylerine ait örneklerde, SH-SY5Y hücrelerinin hidrojel iskeleler üzerindeki dağılımı, hücresel morfolojisi ve HDM ile ilişkisi değerlendirilmiştir. Bu amaçla, H&E ve Toluidin mavisi boyamaları gerçekleştirilmiştir. Toluidin mavisi boyama, özellikle standart protokole uygun şekilde gerçekleştirilmiştir (Bergholt vd., 2019). Öte yandan, *in ovo* ortamında geliştirilen hücre yüklü hidrojel kesitleri, hücresel organizasyon ve doku bütünlüğünün değerlendirilmesine yönelik olarak yalnızca H&E boyası ile boyanmış; elde edilen kesitler ışık mikroskobu ile görüntülenerek histolojik analizler gerçekleştirilmiştir.

İmmünohistokimyasal boyamalar kapsamında, kesitlerdeki endojen peroksidaz aktivitesini inhibe etmek amacıyla örnekler %0,3'lük H_2O_2 çözeltisinde 30 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Ardından, formalin fiksasyonuna bağlı olarak antijenik yapılarda meydana gelebilecek kimyasal modifikasyonların etkisini azaltmak amacıyla ısı ile indüklenmiş antijen geri kazanım (HIER) yöntemi uygulanmıştır. Bu işlemde, kesitler 0,1 M, pH 6,0 sitrat tamponu (Sigma Aldrich, Inc., ABD) içinde, 800 W gücünde bir mikrodalga fırında 20 dakika süreyle ısıtılmıştır. Non-spesifik bağlanmaları önlemek amacıyla, kesitler %10'luk normal keçi serumu içerisinde 30 dakika inkübe edilerek bloklanmıştır. Blokaj adımının ardından, numunelerin üzerine anti-β-Tubulin III (1:500, Abcam, Cambridge, İngiltere) ve anti-MAP2 (1:500, Abcam, Cambridge, İngiltere) primer antikorları damlatılmış ve kesitler 4 °C'de bir gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İmmünohistokimyasal boyamanın ileri aşamaları, üretici firmanın protokolüne uygun olarak HRP-konjuge ikincil antikor kiti (UltraVision Quanto Detection System, Thermo Scientific, ABD) kullanılarak tamamlanmıştır.

3.2.21. *In Ovo* Civciv Koriyoallantoik Membran (CAM) Testi ile Kriyojellerin Anjiyojenik Özelliklerinin Belirlenmesi

In ovo CAM testi, kompozit hidrojellerin biyouyumluluğunu ve anjiyojenik potansiyelini değerlendirmek amacıyla, önceki çalışmalarda tanımlanan protokoller temel alınarak, bazı küçük modifikasyonlarla uygulanmıştır (Demiray vd., 2025; Samancioglu vd.,

2023). Deneylerde, yerel bir çiftlikten temin edilen döllenmiş tavuk yumurtalarının yüzeyleri %20 etanol ile dezenfekte edildikten sonra, 37 °C sıcaklık ve %60 bağıl nem koşullarında döndürme fonksiyonuna sahip bir kuluçka makinesine (Brinsea Ovation 28 Advance Ex, İngiltere) yerleştirilmiştir. Yumurtalar, ilk üç gün boyunca her 120 dakikada bir otomatik olarak döndürülmüştür (Şekil 22A). Embriyonik gelişimin üçüncü gününde, steril koşullarda yumurtaların üst kısmına yaklaşık 1–1,5 cm çapında bir pencere açılmış (Şekil 22B) ve kontaminasyonu önlemek amacıyla açıklık parafilm ile kapatılmıştır. Bu işlem sonrası yumurtalar, aynı sıcaklık ve nem koşulları altında ancak döndürme yapılmaksızın inkübe edilmeye devam edilmiştir (Şekil 22C).



Şekil 22. CAM testi aşamaları. (A) İlk inkübasyon, (B) EDD3'te açılan pencere görünümü, (C) Pencere açılan yumurtaların yeniden inkübasyonu

Yedinci gün geldiğinde, sterilize edilmiş kompozit hidrojel iskeleler, CAM yüzeyindeki belirgin damarlar arasına, dijital kameraya entegre stereo mikroskop (Stemi 305, Axiocam 105 Color, Zeiss) yardımıyla dikkatlice yerleştirilmiştir. Kontrol grupları için, 10 µL hacminde vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) (10 ng/µL) ile doyurulmuş cam lif diskleri pozitif kontrol; PBS ile doyurulmuş diskler ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır. İmplantasyon günü olan EDD7 ve deneyin sonlandırıldığı onuncu günde, örnek bölgelerin makroskopik görüntüleri kaydedilmiştir. Vaskülogenezde meydana gelen değişimlerin değerlendirilmesi amacıyla bu görüntüler, ImageJ yazılımı (Sürüm 1.53t, NIH, ABD) kullanılarak analiz edilmiştir. Analiz sürecinde, Vascular Density ve Vessel Analysis eklentileri aracılığıyla her örnek için, iskele çapından 1 mm daha büyük bir sanal daire çevresindeki 1 mm genişliğinde halkasal alanda damar yoğunluğu ölçülmüştür. Elde edilen veriler kullanılarak vasküler indeks, ilgili denkleme göre hesaplanmıştır.

$$Vascular\ Index = Vascular\ Density_{(EDD10)} - Vascular\ Density_{(EDD7)} \quad (3.4)$$

Ayrıca, literatürde belirtildiği üzere, gelişimlerinin 15. gününe ulaşmamış civciv embriyoları ağrı hissine sahip değildir ve 17. gün öncesinde yasal olarak canlı organizma olarak kabul edilmemektedir (Sokolenko vd., 2021). Bu doğrultuda, tüm deneysel uygulamalar embriyonik gelişimin ilk on günü içerisinde tamamlandığı için etik kurul onayı gerektirmemiştir.

3.2.22. Hücresel Deney Tasarımı ve Kültür Koşulları

SH-SY5Y insan nöroblastom hücreleri (ATCC CRL-2266), %10 fetal bovin serumu (FBS), %1 L-glutamin ve %1 penisilin/streptomisin (P/S) içeren yüksek glikozlu DMEM besiyerinde, 37 °C sıcaklık ve %5 CO_2 içeren nemli atmosferde kültüre edilmiştir. Hücreler yeterli yoğunluğa ulaştığında, DPBS ile yıkanarak hazırlanmış ve ardından %0,25 Tripsin-EDTA çözeltisi kullanılarak yüzeyden ayrılmıştır. Tripsinizasyon işlemi, FBS içeren taze besiyeri ile durdurulmuş, hücre süspansiyonu santrifüj edilerek yeniden süspanse edilmiştir. Hücre sayımı yapıldıktan sonra, hedeflenen yoğunlukta hücre süspansiyonu hazırlanmıştır. Hidrojel öncü çözeltileri, hücre ile temas öncesinde sterilizasyon amacıyla laminer akım kabininde 60 dakika UV ışığına maruz bırakılmıştır. Daha sonra çözeltilere 20 U/mL HRP enzimi ve hacimce 1:10 oranında 40 mM H_2O_2 ilave edilerek, çapraz bağlanma yoluyla hidrojel oluşumu sağlanmıştır. Oluşan hidrojeller, DPBS ile yıkanarak hücre ekimine uygun hale getirilmiştir. SH-SY5Y hücreleri, belirlenen hücre yoğunluğuna göre hidrojel yüzeyine ekilmiştir. Deney süresince, doku kültürü polistireni (TCP) yüzeyine ekilen hücreler kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Tüm örnekler 37 °C ve %5 CO_2 içeren inkübatörde tutulmuş ve besiyeri her 2–3 günde bir yenilenmiştir.

3.2.23. Hücre Canlılığı ve Çoğalması Analizi

Belirlenen zaman noktalarında (2. ve 7. gün), hidrojel bazlı iskelelerin SH-SY5Y hücre hattı üzerindeki biyouyumluluğunu ve olası sitotoksik etkilerini değerlendirmek

amacıyla, önceki bir çalışmada tanımlandığı şekilde Canlı/Ölü boyama ve MTS testleri uygulanmıştır (Isik vd., 2023). Canlı/Ölü boyama testi için, hücre yüklü hidrojel örnekleri PBS ile yıkandıktan sonra, 4 µM Calcein-AM ve 2 µM Ethidium Homodimer-1 (EthD-1) içeren boyama solüsyonu ile muamele edilmiştir. Örnekler, 37 °C, %5 CO_2 koşullarında ve karanlık ortamda 10 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Canlı hücreler, hücre içi esterazlar tarafından aktive edilen yeşil floresan sinyali (Calcein-AM) ile; ölü hücreler ise zarı zarar gördüğü için DNA'ya bağlanan kırmızı floresan etiket (EthD-1) ile görüntülenmiştir. Görüntüleme işlemi, 488 nm (Calcein-AM) ve 527 nm (EthD-1) uyarma dalga boylarında çalışan bir floresan mikroskobu (Leica DMIL, Almanya) ile gerçekleştirilmiştir. Hücre proliferasyonunu kantitatif olarak değerlendirmek amacıyla MTS testi uygulanmıştır. Bu analizde, PBS ile yıkanan hücre yüklü hidrojel örnekleri, 37 °C'de 1 saat boyunca MTS reaktifi ile inkübe edilmiştir. Metabolik olarak aktif hücrelerin MTS reaktifini formazana dönüştürmesiyle oluşan renk değişimi, 490 nm dalga boyunda bir mikroplaka okuyucu (Thermo Scientific Multiskan Sky) kullanılarak ölçülmüştür.

3.2.24. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR) Analizleri

Hidrojel bazlı iskelelerin nöronal farklılaşma üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla, RT-qPCR analizi uygulanmıştır. Bu doğrultuda, nöronal farklılaşma ile ilişkili olan MAP2 ve βIII-Tubulin genlerinin ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. SH-SY5Y hücreleri, kompozit iskeleler üzerinde 2 ve 7 gün süreyle kültüre edildikten sonra, toplam RNA izolasyonu GeneDireX RNA ekstraksiyon kiti (ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen RNA örneklerinden cDNA sentezi, Bio-Rad cDNA sentez kiti (ABD) aracılığıyla tamamlanmıştır. Gerçek zamanlı kantitatif PCR (RT-qPCR) analizleri ise Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR sistemi (ABD) ile yürütülmüş ve ilgili genlerin ifadesi değerlendirilmiştir.

3.2.25. İstatistiksel Analiz

Tüm kantitatif analizler her deney grubu için üç tekrar halinde gerçekleştirilmiş ve sonuçlar ortalama ± standart sapma şeklinde ifade edilmiştir. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmalar, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve sonrasında uygulanan Tukey testi

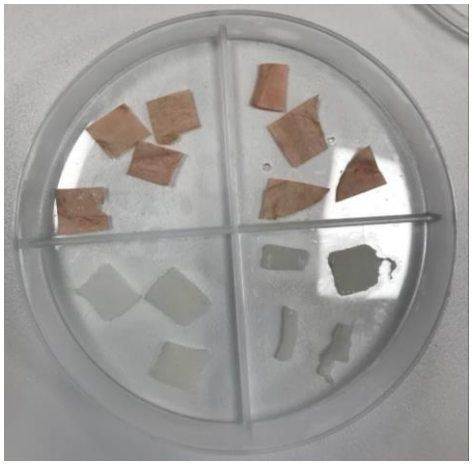
ile değerlendirilmiştir. İstatistiksel analizler OriginPro 2024 (v10.1.0.170, Learning Edition, OriginLab Corporation, MA, ABD) yazılımı kullanılarak yapılmıştır. $p \leq 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiş; anlamlı farklar ilgili grafik ve tablolarda yıldız işareti (*) ile gösterilmiştir.

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM
ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Sığır Omurilik Meninksinin Hücresizleştirilmesi ve DNA İçerik Analizi

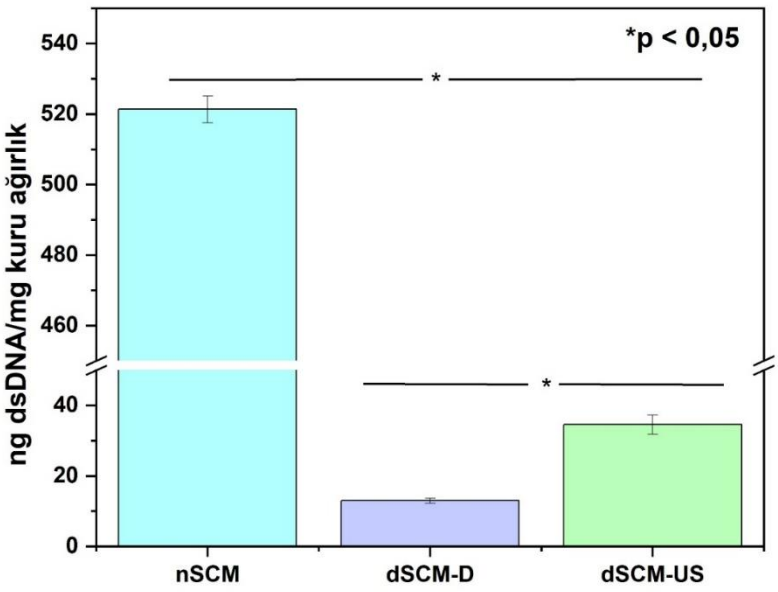
Sığır omurilik meninks dokusu, hücresel bileşenlerinden arındırmak amacıyla deterjan içermeyen, ultrasonikasyon destekli bir hücresizleştirme protokolü ile işlenmiştir. Bu yöntem kapsamında, öncelikle 10 mM Trizma ve 5 mM EDTA içeren hipotonik bir çözeltide, doku örnekleri 24 saat inkübe edilmiştir. Hipotonik ortam, hücre zarının geçirgenliğini artırarak su girişine bağlı hücre şişmesi ve lizisine neden olmuş, böylece hücrelerin yapısal bütünlüğü bozulmuştur. Bu ilk aşamada uygulanan osmotik şok, hücresel içeriklerin serbest bırakılmasına katkı sağlamıştır. Takiben, doku örnekleri 50 mM Trizma ve 5 mM EDTA içeren hipertonik çözeltiye aktarılmış ve burada ultrasonikasyon uygulanmıştır. Hipertonik ortamda, hücre dışına doğru su çıkışı gerçekleşerek hücrelerin büzüşmesi sağlanmış; ultrasonik titreşimlerle birlikte zar ve sitoplazmik kalıntılar fiziksel olarak uzaklaştırılmıştır. Bu ardışık hipotonik ve hipertonik uygulamalar sayesinde, dokuda yoğun bir osmotik şok döngüsü oluşturularak hücre zarlarının parçalanması ve içeriklerinin dışarı atılması etkin bir şekilde sağlanmıştır.

Daha sonra, nükleik asit kalıntılarının uzaklaştırılması amacıyla dokular DNaz ve RNaz enzimlerini içeren enzimatik çözeltide inkübe edilmiştir. Son aşamada ise, mikrobiyal kontaminasyonu önlemek amacıyla dokular perasetik asit içeren bir çözeltide dekontaminasyona tabi tutulmuştur. Tüm protokol boyunca herhangi bir deterjan kullanılmamış; hücre kalıntılarının uzaklaştırılması hem osmotik şok etkisiyle hem de ultrasonik fiziksel bozulma yoluyla gerçekleştirilmiştir. Bu sayede, HDM'nin yapısı mümkün olduğunca korunarak biyolojik uyumluluğu yüksek, deterjan içermeyen bir doku iskeleti elde edilmiştir. Şekil 23'te ham doku ve hücresizleştirilmiş dokuların görsel farkları gösterilmiştir.



Şekil 23. Ham ve hücresizleştirilmiş omurilik meninks dokuları

Çift sarmallı DNA (dsDNA) içerik analizi, uygulanan deselülarizasyon işlemlerinin etkinliğini değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Literatürde, başarılı bir hücresizleştirme işleminden söz edilebilmesi için, dokuya ait kuru ağırlık başına dsDNA miktarının 50 ng/mg'ın altında olması gerektiği belirtilmektedir (Crapo vd., 2011). Bu kriter doğrultusunda yapılan analizler sonucunda, ham (nSCM) omurilik meninks dokusunda ortalama dsDNA içeriği $521{,}3 \pm 0{,}7$ ng/mg kuru ağırlık olarak ölçülmüştür. Hücresizleştirilen örneklerde ise, deterjanla işlem gören grupta (dSCM-D) dsDNA içeriği $12{,}9 \pm 0{,}7$ ng/mg, ultrasonikasyonla işlem gören grupta (dSCM-US) ise $34{,}5 \pm 2{,}7$ ng/mg olarak tespit edilmiştir. Her iki hücresizleştirme yaklaşımı da ham dokuya kıyasla dsDNA içeriğinde anlamlı düzeyde azalma sağlamıştır ($n = 3$; $p < 0{,}05$; ANOVA, Şekil 24). Bu bulgular, uygulanan protokollerin hücresel kalıntıların uzaklaştırılmasında etkili olduğunu ve hücresizleştirme işleminin başarıyla gerçekleştirildiğini göstermektedir.



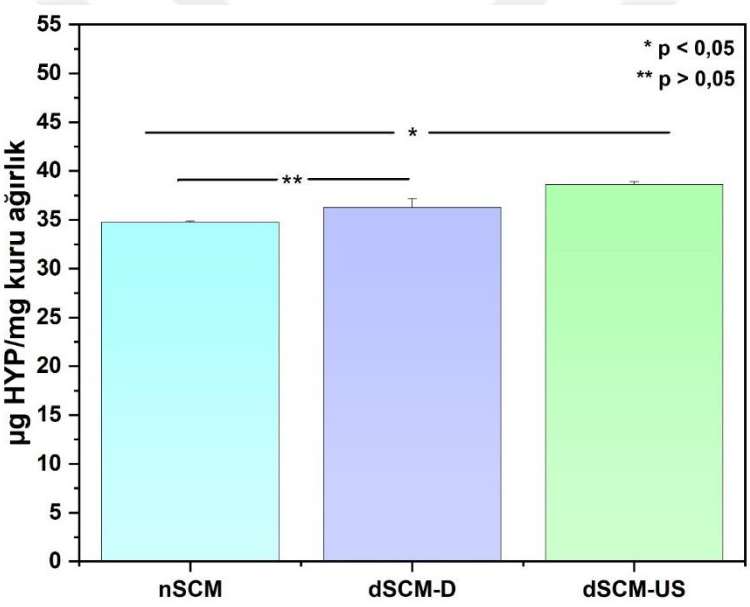
Şekil 24. DNA içerik analizi

4.2. Hidroksiprolin ve Glikozaminoglikan İçerik Analizi

Omurilik meninks dokusunun HDM'si, ağırlıklı olarak kolajenler ve sGAG gibi yapısal proteinler ve polisakaritlerden oluşur. Bu bileşenler, dokunun mekanik dayanıklılığı, biyolojik aktivitesi ve hücresel etkileşimleri açısından merkezi bir rol üstlenmektedir (Haggerty vd., 2017; Wiese ve Faissner, 2015). Kolajene özgü bir amino asit olan hidroksiprolin, kolajen varlığını dolaylı olarak kantitatif biçimde değerlendirmek için yaygın şekilde kullanılmaktadır. Literatürde yapılan çeşitli çalışmalarda, hidroksiprolin düzeylerinin kolajen içeriğini temsil etmede güvenilir bir biyokimyasal gösterge olduğu ve toplam kolajen miktarının yaklaşık %13–14'ünün hidroksiprolin formunda bulunduğu belirtilmiştir (Decimo vd., 2012; Hudson vd., 2014). Bu nedenle, hücresizleştirme sürecinin HDM üzerindeki etkilerini analiz etmek ve yapısal bütünlüğün korunup korunmadığını anlamak adına hidroksiprolin ölçümü yaygın şekilde tercih edilen bir yaklaşımdır. Elde edilen veriler, kolajen yapısının korunma derecesi hakkında dolaylı fakat anlamlı bilgiler sunmaktadır.

Bu çalışmada, nSCM, dSCM-D ve dSCM-US olmak üzere üç farklı gruba ait HYP miktarları sırasıyla $34{,}7 \pm 0{,}2$, $36{,}3 \pm 0{,}9$ ve $38{,}6 \pm 0{,}3$ µg/mg kuru doku ağırlığı olarak

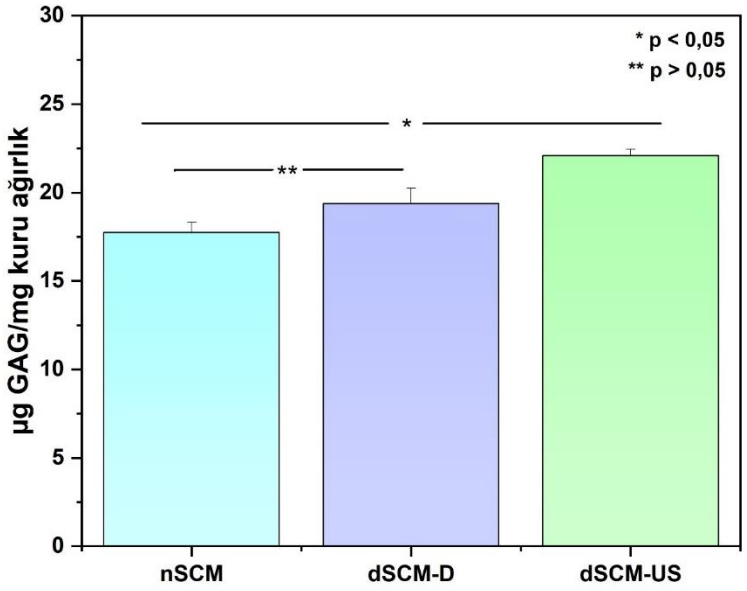
belirlenmiştir (n = 3; p <0,05; ANOVA, Şekil 25). Her iki hücresizleştirme grubunda da ham dokuya kıyasla anlamlı düzeyde artış gözlenmiştir (p <0,05). Gözlemlenen bu artmanın, hücresizleştirme işleminde dokunun hacimsel olarak azaltılması ve eş zamanlı olarak hücresel yapıların, çözünür proteinlerin ve lipit bileşenlerinin uzaklaştırılmasıyla bağlantılı olduğu düşünülmektedir. Bu işlem sonucunda yapısal bileşenlerin -özellikle kolajen liflerinin- doku içinde daha yoğun şekilde kalması, kolajen konsantrasyonunun artmış gibi görünmesine neden olmaktadır. Literatürde de benzer şekilde, bu tür artışların HDM'nin korunmuş yapısal proteinlerinin dokuda göreceli olarak daha yüksek oranda bulunmasıyla açıklanabileceği belirtilmiştir (Turan Sorhun vd., 2023).



Şekil 25. Hidroksiprolin içerik analizi

sGAG'ler, omurilik meninks dokusunun mekanik özelliklerinin korunmasında önemli rol oynayan negatif yüklü polisakaritlerdir. Bu moleküller, yüksek su tutma kapasiteleri sayesinde dokuya elastikiyet ve dayanıklılık kazandırır. Hiyalüronik asit, kondroitin sülfat, dermatan sülfat, keratan sülfat ve heparan sülfat gibi sGAG türleri; yalnızca mekanik destek sağlamakla kalmaz, aynı zamanda hücre göçü, büyüme faktörü taşınımı ve çözünür biyomoleküllerin difüzyonu gibi fizyolojik süreçleri de düzenleyerek hücresel işlevlerin sürdürülmesine katkı sunar (Iozzo ve Schaefer, 2015). Gerçekleştirilen sGAG içerik analizine göre; ham dokuda sGAG miktarı $17,7 \pm 0,6$ µg/mg, dSCM-D grubunda $19,4 \pm 0,8$ µg/mg ve dSCM-US grubunda ise $22,08 \pm 0,4$ µg/mg kuru ağırlık olarak

ölçülmüştür (n = 3; p <0,05; ANOVA, Şekil 26). dSCM-US grubunda sGAG içeriğinde kayda değer bir artış gözlenmiş ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p <0,05). Buna karşılık, dSCM-D grubundaki sGAG düzeyi, ham doku ile karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık göstermemiştir (p> 0,05). Bu bulgular, ultrasonikasyonun HDM bileşenlerinden olan sGAG'lerin korunmasında daha etkili bir yöntem olduğunu ortaya koymaktadır.



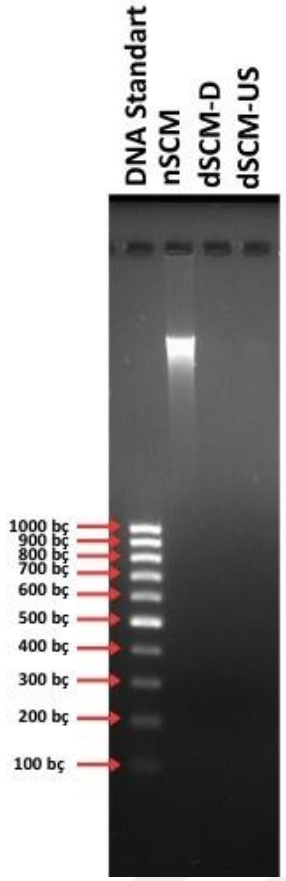
Şekil 26. Glikozaminoglikan içerik analizi

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, her iki hücresizleştirme yönteminin de HYP ve sGAG içeriğini büyük ölçüde koruyabildiğini ve HDM'nin yapısal bütünlüğünün genel olarak sürdürülebildiğini göstermektedir. Bununla birlikte, ultrasonikasyon tabanlı protokol hem kolajen liflerinin hem de sGAG bileşenlerinin korunumu açısından daha dengeli ve yapıya duyarlı bir işlem profili sergilemiştir. Ultrasonik dalgaların fiziksel etkisiyle, hücresel bileşenlerin uzaklaştırılması sırasında kimyasal tahribatın minimize edilmesi ve HDM'nin biyokimyasal ile yapısal özelliklerinin bozulmadan kalması, literatürde de vurgulandığı üzere, bu yöntemin yapıya duyarlı doğasına bağlanmaktadır (Neishabouri vd., 2022). Bu durum, literatürde de ifade edildiği üzere, hücresizleştirme sürecinde uygulanan fiziksel parametrelerin HDM kompozisyonunun korunmasında kritik rol oynadığını desteklemektedir.

4.3. Agaroz Jel Elektroforezi

Hücresizleştirme protokollerinin etkinliğini değerlendirmede en temel kriterlerden biri, hücre kaynaklı nükleik asitlerin ve sitoplazmik içeriklerin doku matrisinden uzaklaştırılma derecesidir. Hücre zarları, nükleus ve sitoplazmik kalıntılar yeterince uzaklaştırılmadığında, bu kalıntılar hedef hücrelerde immün yanıtı tetikleyerek doku entegrasyonunu ve biyouyumluluğu olumsuz etkileyebilir. Bu nedenle, hücresizleştirme sonrası doku örneklerinde nükleik asit kalıntılarının varlığının değerlendirilmesi kritik önemdedir. Literatürde, yeterli DNA uzaklaştırılmasının (<50 ng/mg doku) immünojenisitenin azaltılması açısından önemli bir eşik olduğu belirtilmiştir (Crapo vd., 2011). Bu bağlamda, agaroz jel elektroforezi, dokuya ait kalıntı DNA'nın kalitatif düzeyde analiz edilmesine olanak tanıyan güvenilir ve sıkça kullanılan bir yöntemdir. DNA'nın görünür bantlar halinde tespiti, yeterli uzaklaştırmanın sağlanamadığını gösterebileceğinden dolayı, bu analiz protokollerin doğrulanması açısından oldukça değerlidir (Barajaa vd., 2024; Suss vd., 2022). Bu tez çalışmasında, nSCM, dSCM-D ve dSCM-US örnekleri karşılaştırılmıştır. DNA kalıntılarının tespiti amacıyla %1,5 agaroz jel elektroforezi uygulanmış ve sonuçlar Şekil 27'de sunulmuştur. Ham dokuda yaklaşık 500–1000 baz çifti arasında yoğunluk gösteren belirgin bir DNA bandı gözlemlenmiştir. Buna karşın, her iki hücresizleştirme yöntemiyle elde edilen örneklerde anlamlı bir bant oluşumu gözlenmemiştir. Özellikle dSCM-US örneğinde tamamen silik bir profilin elde edilmesi, bu yöntemin DNA uzaklaştırma açısından oldukça başarılı olduğunu göstermektedir.

Bu bulgular, literatürde yer alan verilerle de örtüşmektedir. Özellikle agaroz jel elektroforezinde belirgin DNA bantlarının izlenmemesi, doku içerisindeki nükleik asit kalıntılarının etkin bir şekilde uzaklaştırıldığını göstermektedir. Bu durum, hücresizleştirme işleminin başarısını ortaya koymakla kalmayıp, aynı zamanda elde edilen biyomateryalin immünojenisite potansiyelinin düşük olduğunu ve doku mühendisliği uygulamalarında güvenle kullanılabileceğini düşündürmektedir.



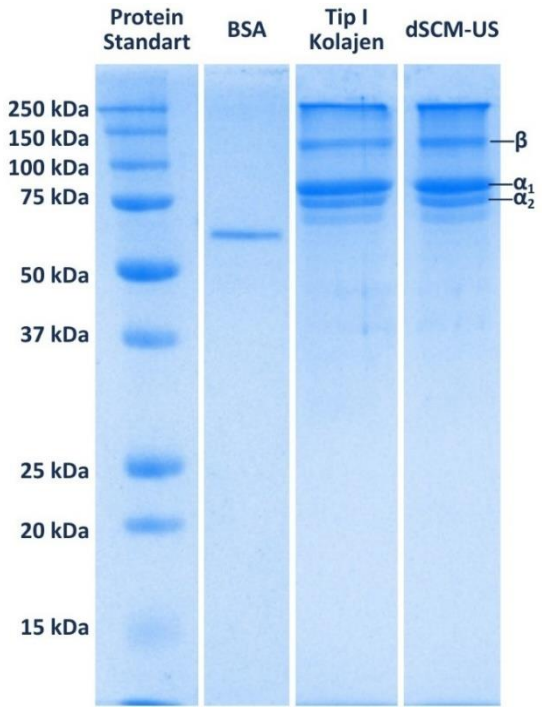
Şekil 27. Agaroz jel görüntüsü

4.4. SDS-PAGE Analizi

SDS-PAGE analizi, ultrasonikasyon destekli hücresizleştirme (dSCM-US) işlemi sonrasında elde edilen omurilik meninks kaynaklı ekstraselüler matriksin protein profillerini değerlendirmek amacıyla uygulanmıştır. Analiz kapsamında, karşılaştırma yapabilmek için BSA (bovine serum albumin) ve Tip I kolajen kontrolleriyle birlikte toplam protein ekstraktları %12,5 poliakrilamid jeline yüklenmiş ve protein bantları Coomassie Brilliant Blue boyasıyla görselleştirilmiştir. Yaklaşık 15–250 kDa aralığında belirgin bantlar içeren protein standart çizgisi, örneklerin karşılaştırmalı değerlendirilmesinde referans olarak kullanılmıştır. Beklendiği üzere, BSA örneğinde yaklaşık 66 kDa'da tek bir bant gözlemlenmiştir. Tip I kolajen örneğinde ise kolajene özgü karakteristik bant paterni net bir şekilde izlenmiştir: yaklaşık 135 kDa'da β zinciri ile 100–120 kDa aralığında α_1 ve α_2 zincirleri belirgin şekilde ayrışmıştır. Aynı bant profili, dSCM-US işlemi sonrasında elde

edilen örnekte de açıkça görülmüş ve bu bantların sırasıyla Tip I kolajenin β, α_1 ve α_2 zincirlerine karşılık geldiği belirlenmiştir (Şekil 28). Bu bulgu, ultrasonikasyon destekli hücresizleştirme süreci sonrasında ekstraselüler matrikste yer alan Tip I kolajenin yapısal bütünlüğünün büyük ölçüde korunduğunu göstermektedir.

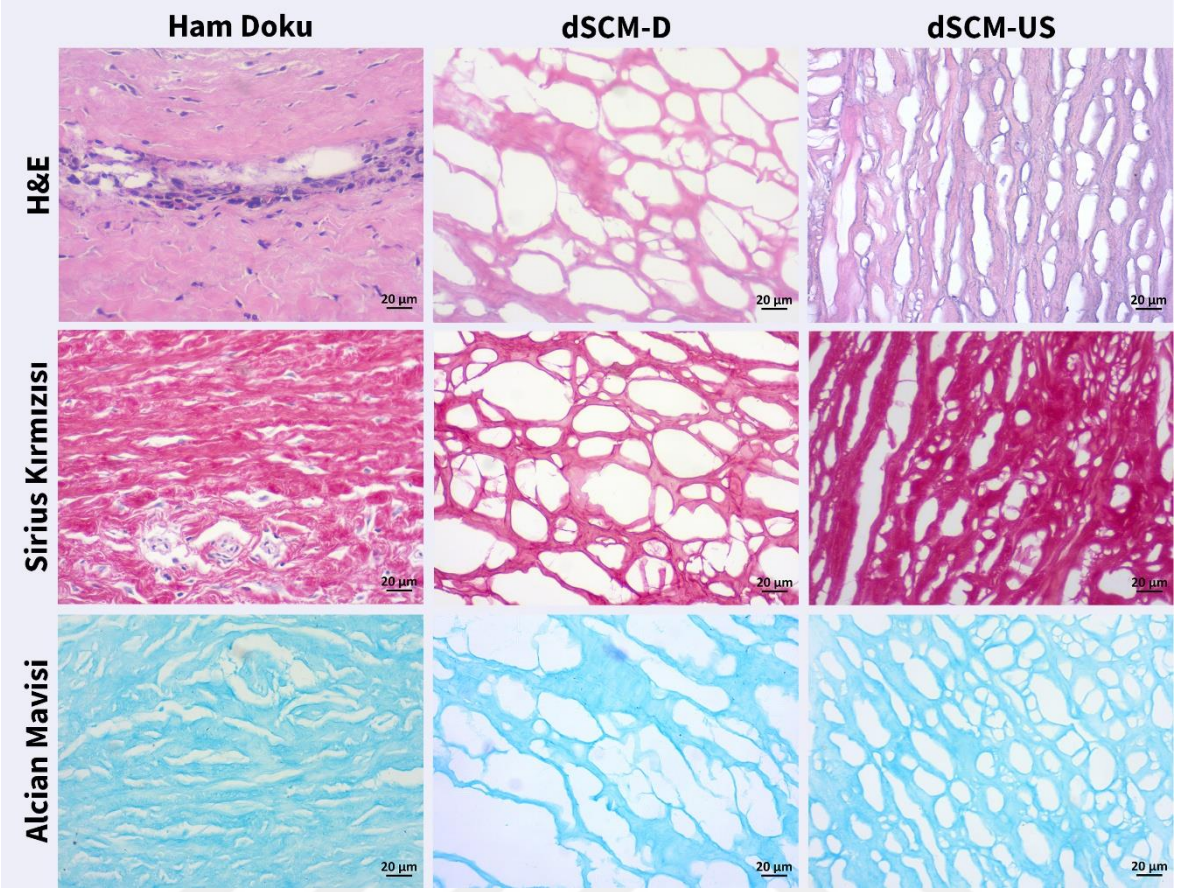
Elde edilen sonuçlar, literatürdeki benzer çalışmalarla da uyumluluk göstermektedir. Örneğin, Coscueta ve ark. tuzla kürlenmiş Atlantik morina balığı derisinden izole ettikleri asit çözünür Tip I kolajeni SDS-PAGE yöntemiyle analiz etmiş ve yaklaşık 115 kDa'da α_1, 100 kDa'da α_2 ve 135 kDa'da β zincirlerini açık şekilde ayrıştırmıştır (Coscueta vd., 2021). Bu çalışmada gözlemlenen benzer üçlü bant paterni, dSCM-US sonrası elde edilen kolajen yapısının denatürasyona uğramadan izole edilebildiğini ve biyokimyasal bütünlüğünü koruduğunu ortaya koymaktadır. Bu durum, doku mühendisliği uygulamalarında büyük önem taşımaktadır; zira kolajenin yapısal bütünlüğü, geliştirilen biyomateryalin mekanik dayanıklılığı, hücre-matris etkileşimi ve biyouyumluluğu üzerinde doğrudan etkili olmaktadır.



Şekil 28. SDS-PAGE jel görüntüsü

4.5. Histolojik Değerlendirme

H&E, Sirius kırmızısı ve Alcian mavisi boyamaları, hücresizleştirilmiş meninks kaynaklı biyomalzemelerin karakterizasyonunda önemli bilgiler sunarak doku mühendisliği ve rejeneratif tıptaki potansiyel uygulamaları açısından yol gösterici olmaktadır (Fernández-Pérez ve Ahearne, 2019). H&E boyaması, hücresel içeriğin kalitatif olarak değerlendirilebilmesini sağlamakta olup, ham dokuda belirgin şekilde gözlemlenen çekirdek yapıları, dSCM-US ve dSCM-D örneklerinde bulunmamaktadır. Bu durum, her iki hücresizleştirme yönteminin de hücresel bileşenlerin uzaklaştırılmasında başarılı olduğunu ortaya koymaktadır. Sirius kırmızısı boyaması, kolajen liflerinin morfolojisi ve uzamsal dağılımı hakkında bilgi verir. Boyamaların sonucunda dSCM-US ve dSCM-D gruplarındaki kolajen ağının büyük ölçüde korunduğu, ancak dSCM-US örneklerinde kolajen yoğunluğunun dSCM-D örneklerine göre daha yüksek olduğu dikkat çekmektedir. Bu durum, ultrason destekli hücresizleştirme sürecinin kolajen fibril bütünlüğünü deterjan temelli yaklaşıma kıyasla daha iyi koruduğunu düşündürmektedir. Deterjan bazlı protokollerin kolajen yapılar üzerinde oluşturabileceği peptit bağı kırılmaları, dSCM-D grubundaki kolajen yoğunluğunun azalması ile ilişkilendirilebilir (Gilbert vd., 2006). Alcian mavisi boyamaları ise hücre dışı matriksin önemli bir bileşeni olan sGAG'ların varlığına dair bilgiler sağlamaktadır. Boyamalar sonucunda ham doku ve dSCM-US örneklerinde benzer yoğunlukta Alcian mavisi boyanma gözlenirken, dSCM-D grubunda daha düşük renk yoğunluğu dikkat çekmektedir. Bu da deterjan temelli protokolün sGAG kaybına yol açtığını ve HDM bileşenlerini kısmen de olsa uzaklaştırdığını göstermektedir. Genel olarak değerlendirildiğinde, her iki yöntem de hücresizleştirme açısından etkin görünmekle birlikte, dSCM-US grubunun kolajen ve sGAG yapısını daha iyi koruduğu; dSCM-D protokolünün ise HDM bileşenlerine kısmi zarar verdiği histolojik bulgulardan anlaşılmaktadır. Bu sonuçlar, ilerleyen biyokimyasal analizlerle desteklenerek, uygun hücresizleştirme yönteminin seçimi açısından yol gösterici olabilir.

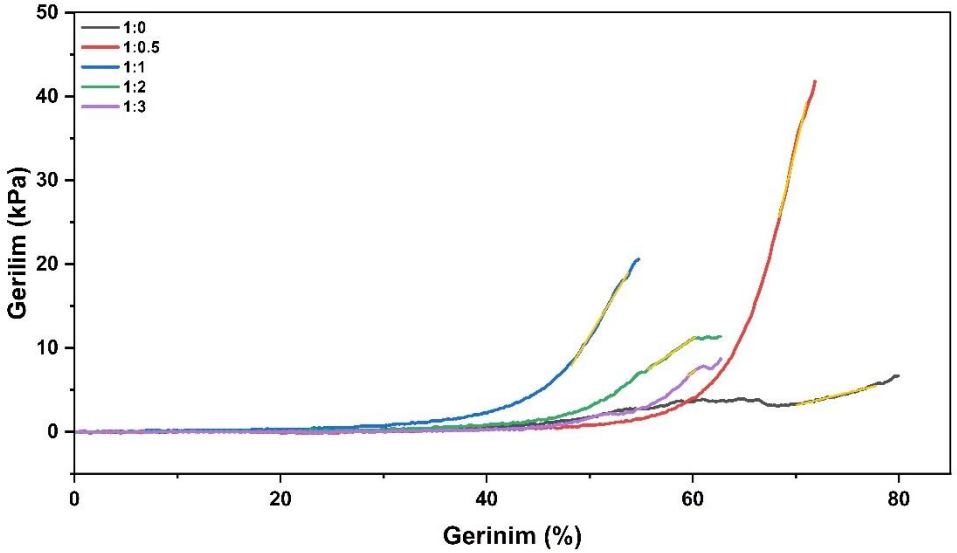


Şekil 29. Ham doku ve hücresizleştirilmiş omurilik meninks örneklerinin histolojik karşılaştırması

4.6. Mikromekanik Analiz

Kompozit hidrojellerin mekanik özellikleri, yapı iskeletlerinin doku mühendisliği uygulamalarındaki başarısı açısından kritik bir rol oynamaktadır; zira bu özellikler hücrelerin tutunması, çoğalması ve farklılaşması üzerinde doğrudan etkilidir. Bu doğrultuda, farklı oranlarda geliştirilen hidrojellerin mikromekanik performansları gerilme-gerinim eğrileri ile Young modülü (elastik modül) değerleri üzerinden değerlendirilmiştir (Şekil 30 ve Şekil 31). Şekil 30'da görüldüğü üzere, tüm gruplar elastik bölgede farklı uzama davranışları sergilemiştir. Özellikle 1:0,5 oranına sahip grup, yüksek elastikiyet ve gerilme altında deformasyon kapasitesiyle dikkat çekmiştir. Bu gözlem, Şekil 31'de sunulan Young modülü verileriyle de desteklenmektedir. Yaklaşık 260 kPa ile en yüksek elastik modül değeri yine bu grupta ölçülmüştür. Bu durum, 1:0,5 oranındaki grubun daha rijit bir yapıya sahip olduğunu ve hücresel yüklenmelere karşı daha dayanıklı olduğunu göstermektedir.

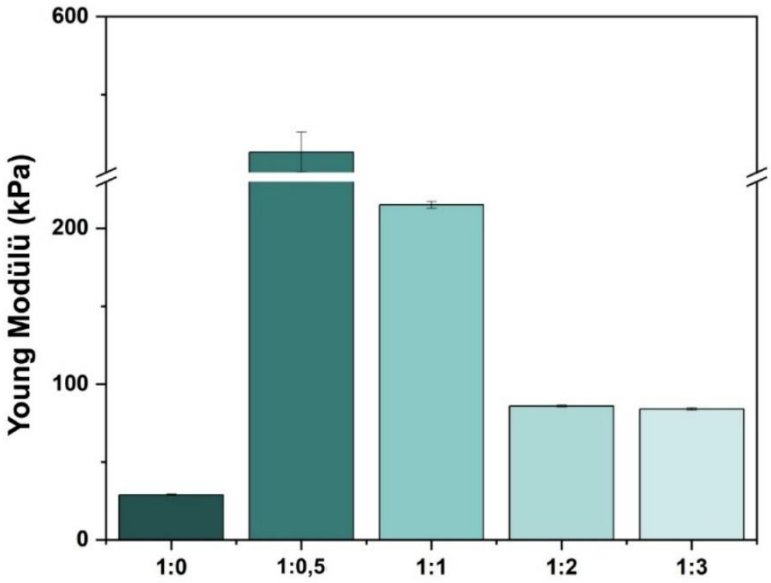
Aleemardani ve ark. (2022) tarafından geliştirilen üç katmanlı İF bazlı kompozit hidrojel sisteminde de, elektrospun fiber katkısının Young modülünü yaklaşık iki kat artırdığı bildirilmiştir; bu da fiberlerin yapı içi organizasyonu ve matriks yoğunluğu üzerindeki rolünü göstermektedir (Aleemardani vd., 2023).



Şekil 30. Kompozit hidrojellerin gerinim-gerilim grafikleri

İF oranının artışıyla birlikte (1:1, 1:2, 1:3), Young modülünde belirgin bir azalma gözlemlenmiştir. Bu düşüşün, fibroin miktarındaki artışın hidrojeldeki matris yoğunluğunu azaltarak daha gevşek ve esnek bir yapı oluşturmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Özellikle 1:3 oranındaki grupta elde edilen düşük modül değeri, bu yapının mekanik dayanım açısından daha zayıf bir karaktere sahip olduğunu göstermektedir. Zheng ve ark., yüksek mukavemetli fonksiyonel İF hidrojellerin tasarımında modüler çapraz bağ yapılarının önemine dikkat çekerek, düşük yoğunluklu veya tek ağ yapılı İF sistemlerinin yetersiz mekanik performans sergilediğini vurgulamışlardır (Zheng ve Zuo, 2021). Diğer yandan, 1:0 grubunda elde edilen düşük Young modülü değeri, İF katkısı olmadan oluşturulan hidrojellerin mekanik olarak yetersiz kaldığını ortaya koymaktadır. Bu sonuç, fibroinin çapraz bağlanma sonrası oluşan matrisin sertliğine önemli ölçüde katkı sağladığını ve uygun oranlarda eklendiğinde mekanik performansı belirgin şekilde artırdığını göstermektedir. Xu ve ark. (2019) tarafından geliştirilen İF/kitosan kompozit hidrojellerde de, İF oranının artışı ile yapının viskoelastik özelliklerinde artış gözlenmiş, ancak çok yüksek

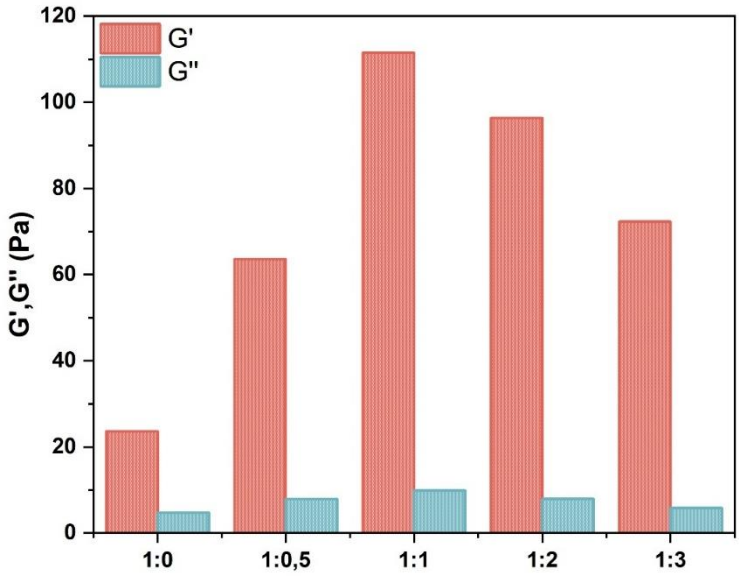
İF içeriğinde mekanik dayanımda düşüş raporlanmıştır (Xu vd., 2019). Elde edilen bulgular, İF'nin elastik modül üzerindeki etkisinin konsantrasyona bağlı olarak optimize edilmesi gerektiğine işaret etmektedir. Ayrıca, bu tür mekanik özelliklerin kontrollü modifikasyonlarla hedef dokuya özel ihtiyaçlara uyarlanabileceği ve böylece uygulama başarısının artırılabileceği değerlendirilmektedir.



Şekil 31. Kompozit hidrojellerin young modülü değerleri

4.7. Reolojik Analizler

Reolojik karakterizasyon, hidrojellerin viskoelastik özelliklerini ve uygulama sırasında gösterecekleri mekanik davranışları anlamak açısından büyük önem taşımaktadır (Partlow vd., 2016). Bu doğrultuda, elastik (geri kazanılabilir) ve viskoz (enerji kaybına yol açan) bileşenleri değerlendirmek amacıyla osilasyon modunda yapılan testlerde, depolama modülü (G′) ve kayıp modülü (G″) parametreleri analiz edilmiştir (Şekil 32). Buna ek olarak, malzemelerin yapısal bütünlüğünü zaman içinde koruyup korumadığını değerlendirmek için step-strain protokolü uygulanmıştır (Şekil 32).

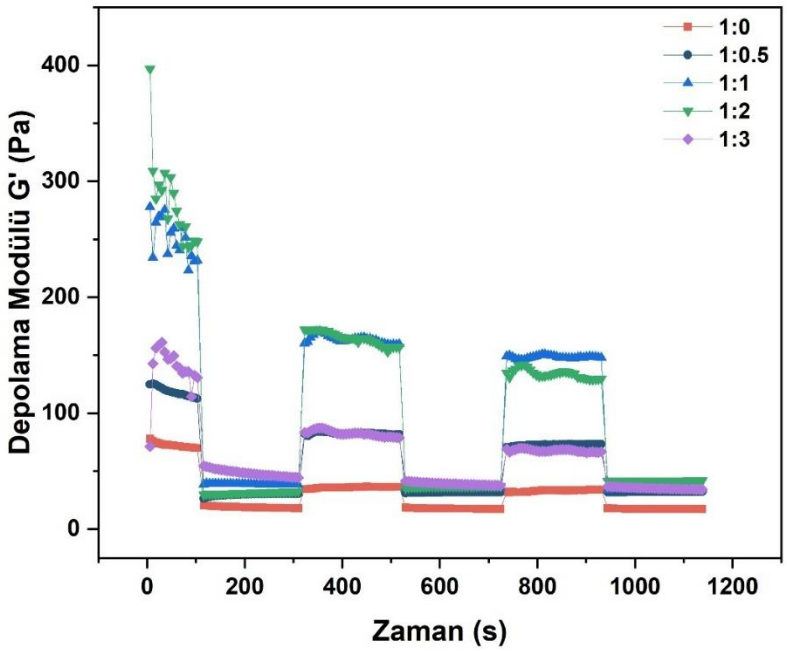


Şekil 32. Kompozit hidrojellerin depo (G′) ve kayıp (G″) modülü değerleri

Şekil 32'de sunulan G′ ve G″ değerlerine göre, tüm hidrojel gruplarında depolama modülü (G′), kayıp modülüne (G″) kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Bu durum, test edilen kompozit yapıların katı-benzeri, yani jel-benzeri bir viskoelastik davranış sergilediğini göstermektedir. En yüksek G′ değeri, yaklaşık 115 Pa ile 1:1 oranındaki grupta ölçülmüş; bu da söz konusu grubun daha güçlü, elastik ve dayanıklı bir ağ yapısına sahip olduğunu göstermiştir. 1:0,5 ve 1:2 oranlarındaki gruplarda da benzer şekilde yüksek G′ değerleri gözlenmiş, bu da İF katkısının ağ yapısının mekanik stabilitesine kayda değer bir katkı sunduğunu ortaya koymuştur. Öte yandan, fibroin oranı arttıkça G″ değerlerinde anlamlı bir yükselme gözlenmemiştir. Bu durum, sistemin viskoelastik yanıtında elastik bileşenlerin viskoz kayıplara kıyasla daha baskın olduğunu ve mekanik davranışın ağırlıklı olarak elastik karakterle belirlendiğini düşündürmektedir (Stojkov vd., 2021).

Şekil 33'te yer alan step-strain testi sonuçları, kompozit hidrojellerin kendini toparlama kapasitelerini değerlendirmektedir. Test kapsamında, düşük (%0,1) ve yüksek (%100) gerinim değerleri arasında geçişler uygulanmış; her döngü sonrası G′ değerindeki değişimler izlenmiştir. Yüksek gerinim uygulamalarının ardından gözlenen G′ düşüşleri, ağ yapısında geçici bozulmaların meydana geldiğine işaret etmektedir. Bununla birlikte, 1:1 ve 1:2 oranındaki gruplar düşük gerinim koşullarına geri dönüldüğünde G′ değerlerini büyük oranda yeniden kazanmıştır. Bu sonuçlar, söz konusu grupların yüksek yapısal bütünlük ve

toparlanma kabiliyetine sahip olduğunu göstermektedir. Özellikle 1:1 oranındaki grup hem başlangıç hem de geri kazanım fazlarında yüksek G′ seviyelerini koruyarak viskoelastik stabilitesi en güçlü sistem olarak öne çıkmıştır.



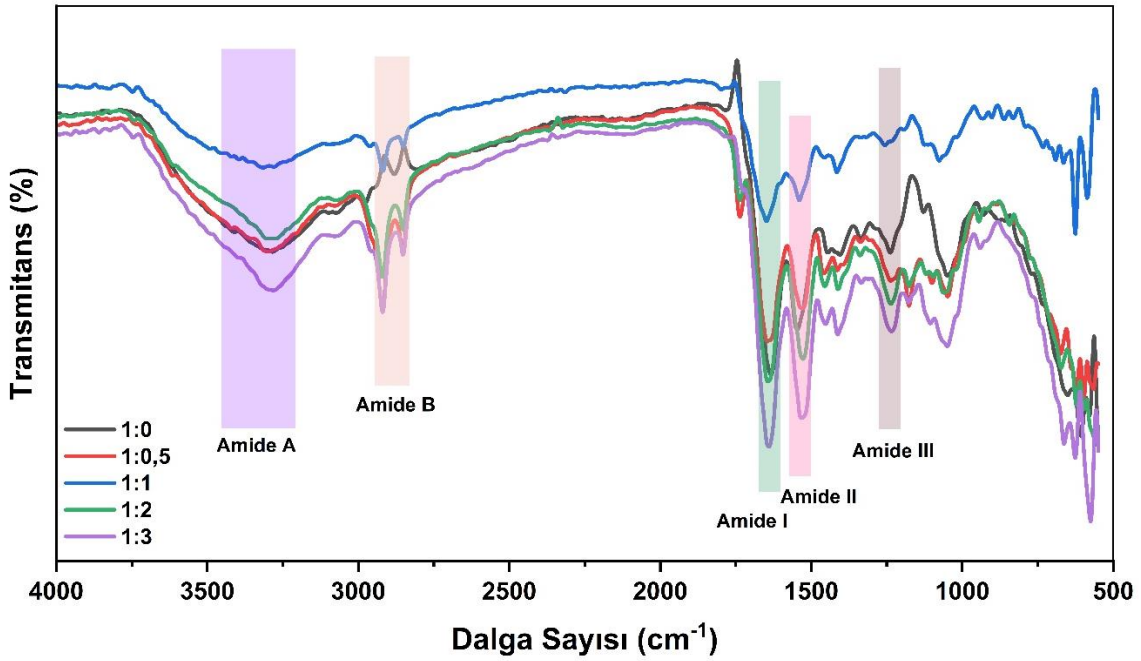
Şekil 33. Kompozit hidrojellerin kendini toparlama davranışları

Bu gözlemler literatürle de uyumludur. Daha önce yapılan çalışmalarda, İF zincirleri arasındaki hidrojen bağlarının ve moleküler dolaşıklıkların reolojik özellikler üzerinde önemli rol oynadığı bildirilmiştir. Ayrıca, fibroin içeriğiyle birlikte ağın çapraz bağlanma yoğunluğunun artmasının G′ değerlerini yükselttiği ve bunun da malzemeyi dışsal mekanik kuvvetlere karşı daha dirençli hale getirdiği vurgulanmıştır (Partlow vd., 2016). Sonuç olarak, elde edilen reolojik veriler İF oranının viskoelastik davranış üzerinde belirleyici bir etkisi olduğunu açıkça göstermektedir. Elastik karakterin, fibroin konsantrasyonuna bağlı olarak optimize edilebileceği; böylece geliştirilen hidrojellerin hedeflenen dokuya uygun mekanik uyumu sağlayarak uygulama sırasında yapısal bütünlüğünü koruyabileceği anlaşılmaktadır. Bu özellikler, özellikle hassas dokulara yönelik biyomalzeme uygulamalarında önemli avantajlar sunmaktadır (Ghica vd., 2016).

4.8. ATR-FTIR Sonuçları

Kompozit kriyojellerin kimyasal yapısı, farklı oranlarda hazırlanan örnekler üzerinde ATR-FTIR spektroskopisi kullanılarak karakterize edilmiştir. Şekil 34'te sunulan spektrumlar, tüm örneklerin proteinlere özgü karakteristik bantları içerdiğini göstermektedir: yaklaşık 3300–3400 cm^{-1} civarında yer alan Amid A, 2920–2950 cm^{-1} arasında gözlemlenen Amid B, 1650 cm^{-1}'deki Amid I, 1540 cm^{-1} civarındaki Amid II ve 1230–1300 cm^{-1} aralığında bulunan Amid III bantları. Bu bantlar, daha önce HDM türevli ve İF bazlı biyomalzemeler için rapor edilen karakteristik spektral özelliklerle tutarlıdır (Hu vd., 2006). Amid A bandı, N–H gerilme titreşimlerine karşılık gelmekte olup, İF içeriğindeki artışa paralel olarak bu bandın şiddetinde belirgin bir yükseliş gözlenmiştir. Bu durum, hidrojen bağlarının güçlendiğine ve moleküller arası etkileşimlerin arttığına işaret etmektedir. Benzer şekilde, alifatik yan zincirlerin C–H asimetrik gerilme titreşimlerini temsil eden Amid B bandı da yüksek İF içeriğine sahip örneklerde daha güçlü sinyaller vermiştir. Bu bulgular, İF bileşeninin moleküler yapıya olan katkısını doğrulamaktadır (Bhar vd., 2024).

Parmak izi bölgesinde yer alan Amid I bandı, özellikle 1:2 ve 1:3 oranlarındaki gruplarda daha keskin bir profile ulaşmış ve hafif bir kırmızıya kayma göstermiştir. Bu değişim, β-tabaka içeriğinin arttığını ve fibroin yapısının konformasyonel olarak daha stabil hale geldiğini düşündürmektedir (Carissimi vd., 2020). Ayrıca, Amid II bandında gözlemlenen küçük spektral kaymalar, dSCM ve İF bileşenleri arasındaki potansiyel fonksiyonel grup etkileşimlerine işaret etmektedir. Tüm örneklerde tutarlı şekilde gözlenen Amid III bandı ise, proteinlerin ikincil yapı özelliklerinin korunduğunu göstermektedir (Bhattacharjee vd., 2023). Bu bulgular, artan İF oranının kovalent olmayan etkileşimler aracılığıyla yapısal olarak bütünleşmiş bir protein ağı oluşumunu desteklediğini göstermektedir. Böyle bir yapı, kriyojellerin mekanik dayanıklılığını artırmakta ve potansiyel biyofonksiyonel uygulamalar için güçlü bir temel sunmaktadır.

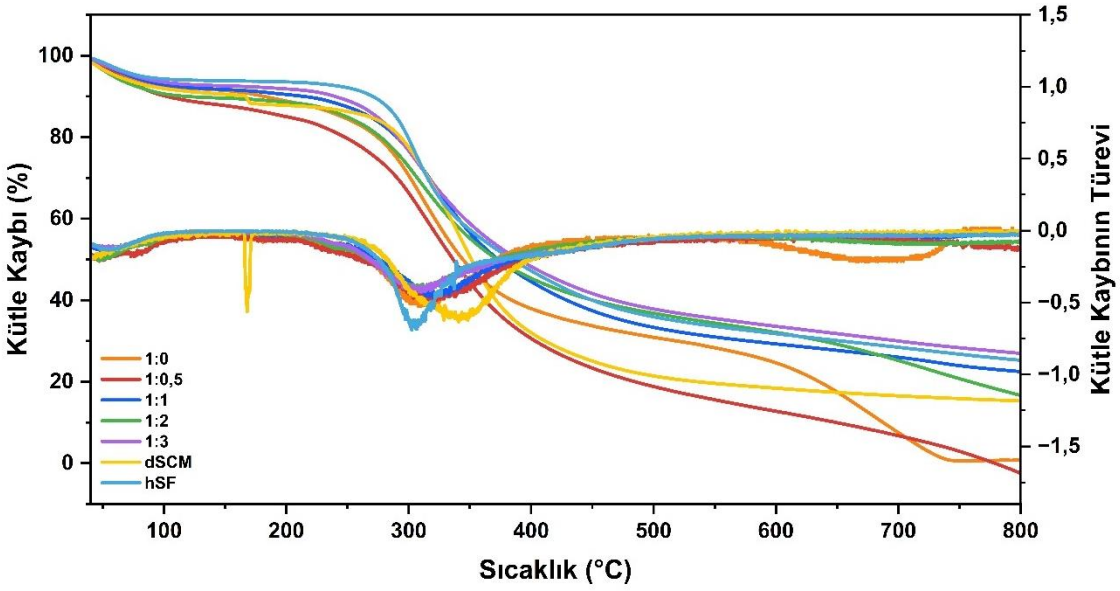


Şekil 34. Kompozit kriyojellerin FTIR spektrumları

4.9. Termogravimetrik analiz (TGA) Sonuçları

Kompozit kriyojellerin termal stabilitesi ve bozunma profili, bileşen bazlı karşılaştırmalar yapılabilmesi amacıyla TGA ve birinci dereceden türevi olan DTG analizleri ile incelenmiştir. Şekil 35'te görüldüğü üzere, tüm örneklerde üç aşamalı tipik bir bozunma eğilimi gözlemlenmiştir. İlk kütle kaybı 30–150 °C aralığında meydana gelmiş olup, bu kaybın fiziksel olarak adsorbe olmuş suyun ve uçucu bileşenlerin buharlaşmasından kaynaklandığı değerlendirilmektedir. Bu aşamadaki kütle kaybı, özellikle dSCM oranı yüksek gruplarda daha belirgin olup, bu durum söz konusu yapıların yüksek hidrofilik karakteri ile ilişkilendirilmiştir (Wang vd., 2021). İkinci ve ana bozunma evresi ise 200–450 °C aralığında gerçekleşmiş, bu evre kolajen ve İF gibi yapısal proteinlerin parçalanmasıyla ilişkilendirilmiştir. Bu süreçte, peptid bağlarının kopması ve yan zincirlerin ayrışmasıyla birlikte belirgin kütle kayıpları meydana gelmiştir. Sadece dSCM-US içeren örnekler (1:0) bu evrede daha erken ve hızlı bozunma göstermiştir; bu da bu formülasyonların daha düşük termal direnç sergilediğini göstermektedir.

Öte yandan, İF oranı yüksek olan gruplar — özellikle 1:2 ve 1:3 oranındaki kompozitler — daha geç bozunma başlangıcı ve daha düşük toplam kütle kaybı ile dikkat çekmiştir. Bu iyileşme, İF'nin β-tabaka açısından zengin yapılarının sağladığı moleküler düzenlilik ve ısıl stabiliteyle açıklanmaktadır (Dreanca vd., 2021; Wang vd., 2021). 500 °C üzerindeki sıcaklıklarda, artık organik bileşenlerin karbonizasyona uğradığı ve bozunma hızının belirgin şekilde azaldığı gözlenmiştir. Bu bölgede, 1:3 oranındaki grup yaklaşık 800 °C'ye kadar en yüksek kalıntı kütlesini koruyarak, İF'nin yarı-kristalin yapısına bağlı yüksek sıcaklık dayanımını ortaya koymuştur (Li vd., 2019). Sonuç olarak, İF içeriğindeki artış, dSCM-US bazlı kriyojellerin termal stabilitesini belirgin şekilde artırmıştır. Bu iyileşmenin temel mekanizması olarak, β-tabaka zengin moleküler paketlenme ve bu yapıların ısıya karşı direncinin katkısı öne çıkmaktadır. Elde edilen bulgular, dSCM-hİF kompozitlerinin sterilizasyon, kontrollü bozunma veya uzun süreli implantasyon gibi termal direnç gerektiren biyomedikal uygulamalar için yüksek potansiyel taşıdığını göstermektedir.



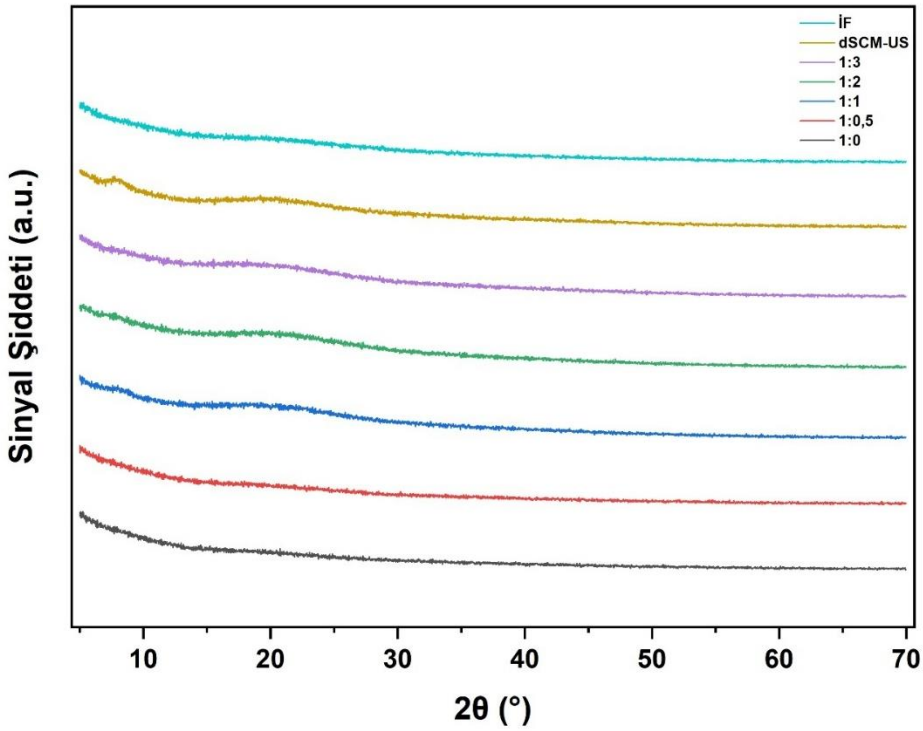
Şekil 35. Kompozit kriyojellerin, dSCM-US ve İF örneklerinin TGA ve DTG eğrileri

4.10. XRD Sonuçları

Kompozit kriyojellerin ve bunları oluşturan temel bileşenlerin kristalin ya da amorf özelliklerini değerlendirmek amacıyla XRD analizi gerçekleştirilmiştir. Şekil 36'da

görüldüğü üzere, tüm örnekler belirgin, keskin tepe noktaları içermeyen; geniş ve yayvan halo yapıları sergilemiştir. Bu durum, numunelerin büyük ölçüde amorf bir moleküler organizasyona sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Elde edilen bu bulgular, elde edilen İF'nin amorf ve hidrofilik fraksiyonları için raporlanan; düzensiz yapılı hücresizleştirilmiş ekstraselüler matriksler ve sulu koşullarda işlenmiş rejeneratif İF ile ilgili literatür verileriyle uyumludur (Deen ve Rosei, 2019). Benzer şekilde, yalnızca dSCM içeren grup da tamamen amorf bir kırınım profili sunmuş; bu da kolajen açısından zengin HDM iskeletlerinin heterojen ve kristalin olmayan mimarisiyle tutarlı bulunmuştur.

Farklı oranlarda İF içeren kompozit kriyojeller (1:0,5'ten 1:3'e kadar) da amorf karakterlerini korumuş; kristalin yapılara özgü herhangi bir belirgin tepe formasyonu gözlemlenmemiştir. Bununla birlikte, fibroin içeriği yüksek formülasyonlarda (özellikle 1:2 ve 1:3 gruplarında) temel çizgide hafif yoğunluk artışları ve halo genişliğinde sınırlı genleşmeler saptanmıştır. Bu gözlemler, polimer karışım sistemlerinde sıkça karşılaşılan lokal moleküler düzenlenme ya da mikrofaz ayrımı gibi fenomenlerin varlığına işaret edebilir (Li vd., 2019; Wang vd., 2021). Sonuç olarak, XRD analizi bulguları hem bireysel bileşenlerin hem de kompozit kriyojel sistemlerinin amorf bir yapıya sahip olduğunu doğrulamaktadır. Bu amorf yapı, biyomedikal iskelet uygulamaları açısından oldukça değerlidir; zira esneklik, yüksek gözeneklilik ve dinamik doku yenilenme süreçleriyle uyumluluk gibi önemli avantajlar sunmaktadır.

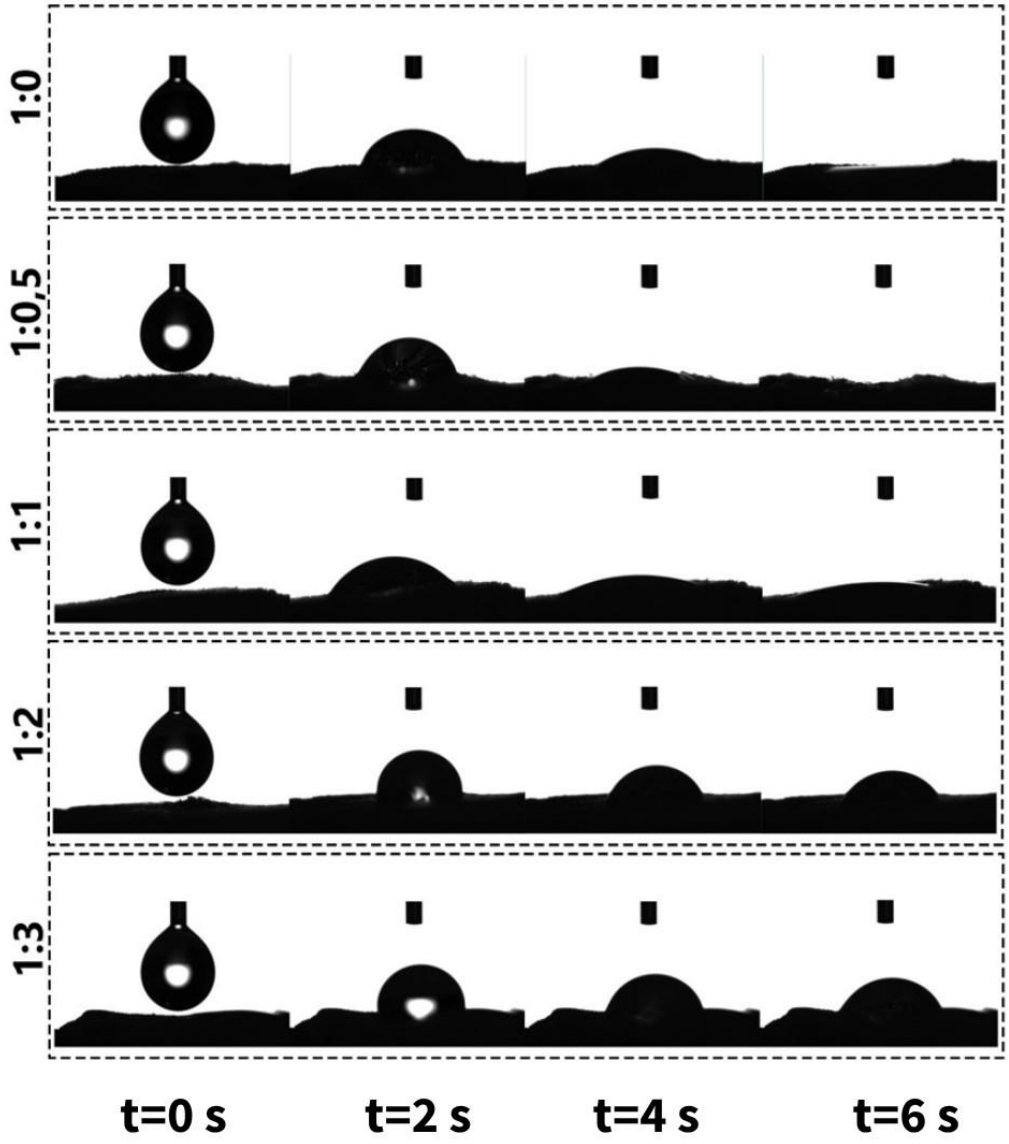


Şekil 36. Kompozit kriyojellerin, dSCM-US ve İF örneklerinin XRD spektrumları

4.11. Temas Açısı Analizi

Hidrojellerin yüzey ıslanabilirliğini değerlendirmek amacıyla temas açısı analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analiz, biyomalzemelerin sıvı ile etkileşim özelliklerini belirleyen temel yüzey parametrelerinden biri olması bakımından büyük önem taşımaktadır. Yan profilden kaydedilen damla görüntülerinin görsel incelemesi, kompozit hidrojel grupları arasında ıslanabilirlik açısından belirgin farklar olduğunu ortaya koymuştur. Yalnızca dSCM-US içeren 1:0 grubunda, su damlalarının yüzeyde daha fazla yayıldığı ve daha basık bir profil oluşturduğu gözlemlenmiştir. Bu durum, yüzeyin daha hidrofilik bir karaktere sahip olduğunu göstermektedir. Buna karşılık, İF içeriği arttıkça (1:0.5'ten 1:3'e doğru), damlaların yüzeyde daha sınırlı yayıldığı ve daha küresel bir formda kaldığı gözlemlenmiştir. Bu gözlemler, yüzeyin giderek daha hidrofobik bir karakter kazandığını ortaya koymaktadır. Elde edilen bu eğilim, literatürde İF oranındaki artışla ilişkilendirilen β-tabaka zengin yüzey kristallenmesi ve buna bağlı olarak su ile etkileşimin azalmasıyla tutarlılık göstermektedir. Yüzeyin düzensiz ve gözenekli yapısı nedeniyle temas açısının kantitatif olarak ölçülmesi mümkün olmasa da damla davranışına ilişkin bu niteliksel

gözlemler, bileşim değişimine bağlı olarak yüzey ıslanabilirliğinin anlamlı biçimde modüle edilebildiğini güçlü biçimde desteklemektedir.



Şekil 37. Kompozit kriyojellerin temas açısı analiziyle ıslanabilirliğine ait görseller

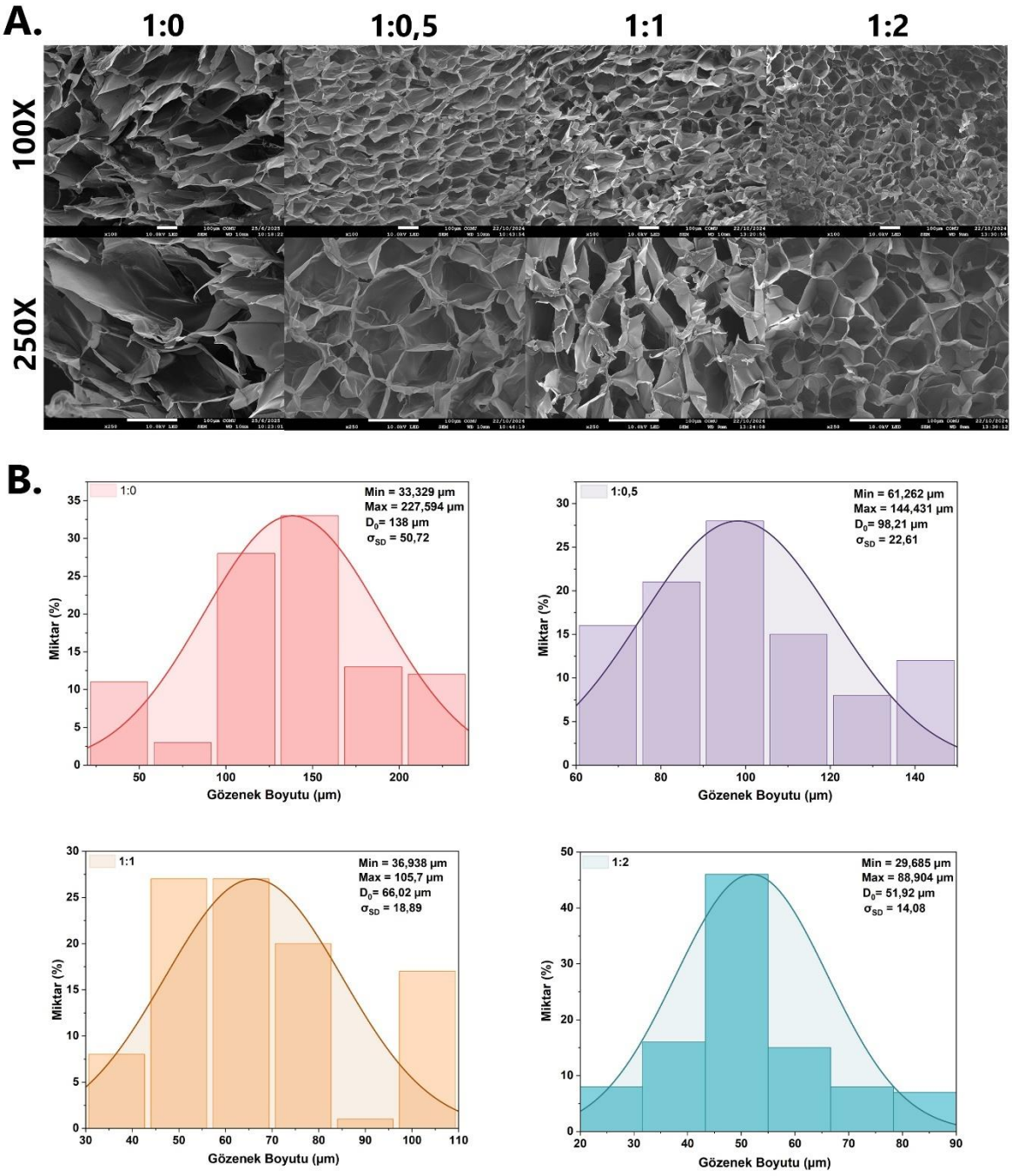
4.12. Yüzey Morfolojisi ve Gözeneklilik Analizi

Kompozit kriyojellerin gözenek morfolojileri, formülasyon bileşimindeki değişikliklere bağlı olarak belirgin yapısal farklılıklar göstermiştir. Şekil 38A'da, her bir formülasyon grubuna ait SEM görüntüleri ile Şekil 38B'de bu görüntülere dayanarak gerçekleştirilen gözenek boyutu analizleri sunulmuştur. Görseller, ImageJ yazılımı

kullanılarak analiz edilmiş; her gruptan rastgele seçilen 100 gözenek ölçülerek Gauss uyumlu histogramlar oluşturulmuştur. 1:0 oranındaki grupta, düzensiz ve geniş çaplı gözeneklerin hâkim olduğu bir yapı gözlemlenmiş; ortalama gözenek çapı 138 µm olarak belirlenmiştir. Bu grup, aynı zamanda en geniş gözenek boyutu dağılım aralığına (Min = 33,329 µm, Max = 227,594 µm) ve en yüksek standart sapma değerine (σ_{50} = 50,72) sahip olmuştur. Bu durum, yapının heterojen ve gözeneklilik açısından oldukça değişken bir mimariye sahip olduğunu göstermektedir. 1:0,5 oranındaki grupta ise daha yuvarlak, homojen ve birbirine bağlantılı gözeneklerden oluşan bir yapı öne çıkmaktadır.

Ortalama gözenek çapı 98,21 µm olarak ölçülmüş; dağılım aralığı daralmış ve standart sapma değeri 22,61 olarak belirlenmiştir. Bu yapı, daha kontrollü ve dengeli bir gözenek organizasyonuna işaret etmektedir. 1:1 oranına geçildiğinde, daha kompakt ve düzenli bir iç yapı oluştuğu gözlenmiştir. Bu grupta, ortalama gözenek çapı 66,02 µm'ye düşmüş; standart sapma değeri ise 18,89 olarak kaydedilmiştir. SEM görüntülerinde, gözenek duvarlarının kalınlaştığı ve iç yapının sıkılaştığı açıkça görülmektedir. Bu durum, fibroin içeriğindeki artışın gözenek mimarisini sıkılaştırıcı bir etki yarattığını göstermektedir. İpek fibroin oranının en yüksek olduğu 1:2 grubunda ise ortalama gözenek çapı 51,92 µm ile en düşük değeri almış; dağılım aralığı (Min = 29,685 µm, Max = 88,904 µm) en dar hale gelmiş ve standart sapma 14,08 olarak ölçülmüştür. Bu veriler, gözenek düzeninin en homojen olduğu yapının bu grupta elde edildiğini ortaya koymaktadır.

Genel olarak değerlendirildiğinde, artan fibroin oranı, büyük çaplı ve düzensiz gözenek oluşumunu baskılayarak daha sıkı, homojen ve kompakt bir iç yapı gelişimini teşvik etmiştir. Bu durum, mekanik dayanıklılık açısından olumlu katkılar sağlarken; gözenek bağlantısının azalması, besin ve oksijen difüzyonunun yanı sıra hücresel infiltrasyon gibi biyolojik süreçler üzerinde sınırlayıcı etkiler oluşturma potansiyeline sahiptir. Bu nedenle, gözenek mimarisi ile biyolojik işlevsellik arasındaki denge, hedef uygulamalara göre dikkatle optimize edilmelidir.



Şekil 38. Kompozit kriyojellerin SEM mikrografları (A), gözenek boyutu analizi (B)

Azot adsorpsiyonuna dayalı BET analizi, dSCM-US ve İF oranlarına bağlı olarak kompozit kriyojellerin özgül yüzey alanlarında belirgin farklılıklar olduğunu ortaya koymuştur. En yüksek yüzey alanı, 34,30 m^2/g değeri ile yalnızca dSCM içeren 1:0 grubunda ölçülmüştür (Tablo 3). Bu durum, hücresizleştirilmiş meninks matrisinin doğası gereği yüksek gözenekliliğe sahip yapısıyla ilişkilendirilmiştir. İF katkısının yapıldığı

formülasyonlarda (1:0,5–1:2 arası gruplar), özgül yüzey alanı değerlerinde belirgin bir azalma gözlemlenmiş; bu değerler 1,44–1,73 m^2/g aralığına kadar gerilemiştir. Bu düşüş, İF'nin matriks yapısında daha kompakt bir ağ oluşturarak azot gazının gözeneklere erişimini sınırlandırmasına ve kısmen gözenek tıkanıklığına yol açmasına bağlanmıştır. Daha yüksek fibroin oranına sahip olan 1:3 grubunda özgül yüzey alanı değerinde kısmi bir artış gözlenmiş olsa da bu değer yine de kolajen açısından zengin referans (1:0) grubuna kıyasla oldukça düşük kalmıştır. Bu bulgu, İF'nin özellikle mikro- ve mezo gözenekli alanlara erişimi sınırladığına işaret etmektedir. BET analiz sonuçları ile SEM görüntüleri arasında gözlemlenen görünür uyumsuzluk, iki yöntemin ölçüm aralıklarındaki farklılıktan kaynaklanmaktadır. BET yöntemi, azot gazı adsorpsiyonuna dayalı bir teknik olup doğası gereği yalnızca mikro- ve mezo gözenekli yapıları (gözenek çapı <50 nm) karakterize edebilmekte; buna karşılık makro gözenekleri (>50 nm) tespit edememektedir (Bardestani vd., 2019). Öte yandan, SEM makro gözenekli yapıların doğrudan görselleştirilmesine olanak tanır. Bu tür büyük ve birbirine bağlı gözenekler, özellikle sinir doku mühendisliği gibi uygulamalarda hücresel infiltrasyonu ve besin taşınımını desteklemek açısından kritik öneme sahiptir (Thommes ve Cychosz, 2014). Bu bağlamda, SEM ile makro gözenekli ancak iç yüzeyleri nispeten düzgün yapılar gözlemlenmesine rağmen, bu malzemeler BET analizinde düşük özgül yüzey alanı değerleri sergileyebilirler.

Tablo 3

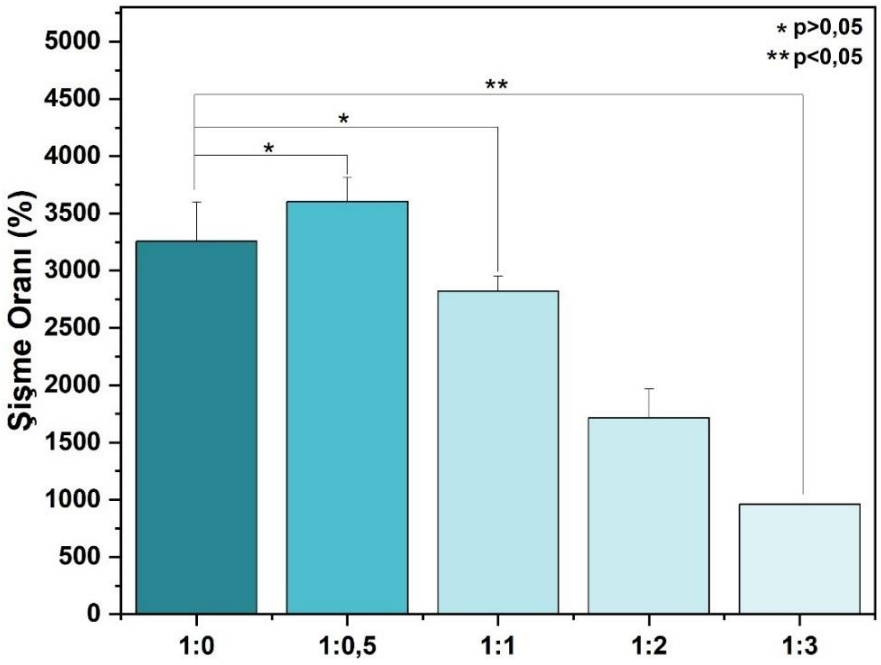
Kompozit kriyojellerin gözenek boyutları

Örnek	1:0	1:0,5	1:1	1:2
Toplam Yüzey Alanı, BET (m^2/g)	34,2988	1,4428	1,5949	1,7330

4.13. Şişme Testi

Hidrojel hidrasyonunun değerlendirilmesinde kullanılan şişme ortamı, ozmotik basınç, iyonik kuvvet ve sıvı hareketi gibi parametreleri etkileyerek şişme davranışını doğrudan şekillendiren önemli bir faktördür. Bu çalışmada, biyolojik olarak anlamlı test

koşullarını sağlamak ve fizyolojik ortamı taklit etmek amacıyla şişme ortamı olarak fosfat tamponlu salin (PBS) tercih edilmiştir (Yilmaz vd., 2021). Şişme testleri sonucunda, tüm formülasyonlar arasında en yüksek şişme oranı 1:0.5 grubunda gözlemlenmiştir. Bu değer, yalnızca dSCM içeren 1:0 grubunun bile üzerinde bulunmuştur. Bu dikkat çekici bulgu, dSCM'nin yüksek oranda hidrofilik bileşenler özellikle kolajen ve sülfatlanmış glikozaminoglikanlar (sGAG) içermesine rağmen gerçekleşmiştir (Antoine vd., 2014). İpek fibroin içeriğinin artmasıyla birlikte şişme oranlarında kademeli bir azalma gözlenmiştir. En düşük şişme oranı, fibroin oranı en yüksek olan 1:3 grubunda kaydedilmiştir. Bu düşüşün, yüksek İF konsantrasyonuna bağlı olarak artan β-tabaka oluşumu sonucu yapının daha kompakt ve daha az hidrofilik hale gelmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Zhang vd., 2023). Elde edilen bu bulgular, dSCM-US-İF oranının ayarlanması yoluyla hidrojel şişme davranışının kontrollü bir şekilde modüle edilebileceğini göstermektedir. Bu durum, uygulamaya özel hidrasyon profillerine sahip biyomalzeme sistemlerinin geliştirilmesine olanak tanıyabilir.

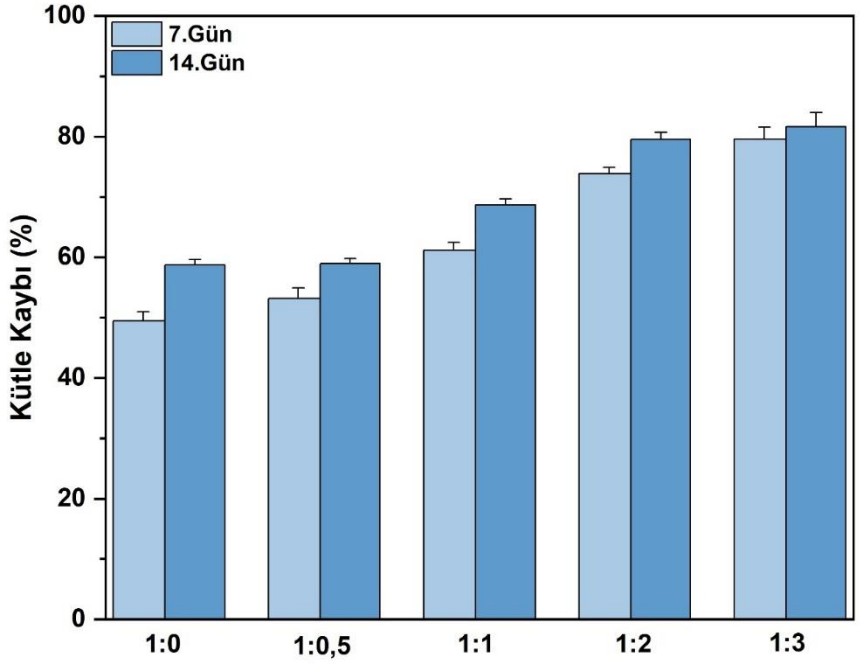


Şekil 39. Kompozit kriyojellerin şişme oranları

4.14. *In Vitro* Bozunurluk

Matris bileşiminin iskele stabilitesi üzerindeki etkisini izole edebilmek amacıyla, bu çalışmada yalnızca hidrolitik koşullar altında gerçekleştirilen in vitro bozunma analizi tercih edilmiştir. Bu kapsamda PBS çözeltisi kullanılmıştır. Böylece, enzimatik süreçlerden kaynaklanan değişkenlikler dışlanmış; İF katkısının yapısal etkileri doğrudan değerlendirilebilmiştir. Aynı zamanda, PBS ortamı, implantasyonun erken evresinde iskelelerin temas ettiği fizyolojik sıvı mikroçevreyi taklit etmesi açısından biyolojik olarak anlamlıdır. Bu dönemde, henüz enzimatik yeniden şekillenme başlamamışken sıvı teması ön plandadır (Sun vd., 2022). Dolayısıyla, bu çalışmada enzimatik bozunma analizleri bilinçli olarak kapsam dışı bırakılmış ve kompozisyon kaynaklı etkilerin daha net bir şekilde gözlemlenmesi amaçlanmıştır.

Kriyojel örneklerinin bozunma profilleri, 14 günlük izleme süresince hem zaman hem de formülasyon bileşimine bağlı olarak farklılık göstermiştir (Şekil 40). Yedinci gün sonunda, yalnızca dSCM-US içeren 1:0 grubunda kütle kaybı yaklaşık %51 olarak ölçülürken, İF içeriği en yüksek olan 1:3 grubunda bu oran %79'a ulaşmıştır. Bu sonuç, fibroin oranı arttıkça matrisin daha hızlı bozunma eğilimi gösterdiğini ortaya koymaktadır. On dördüncü gün itibarıyla, sırasıyla 1:0, 1:0,5 ve 1:1 gruplarında %58, %60 ve %68'lik kütle kaybı kaydedilirken, 1:2 ve 1:3 gruplarında bu oranlar sırasıyla %80 ve %83'e kadar yükselmiştir. İF oranı yüksek olan formülasyonlardaki bu hızlandırılmış bozunma davranışı, fibroinin daha düşük hidrolitik stabiliteye sahip olması ve bu gruplarda çapraz bağlanma yoğunluğunun azalmasıyla ilişkilendirilmiştir. Elde edilen bulgular, kompozit iskelelerin bozunma kinetiğinin, dSCM-US ve İF oranı ayarlanarak kontrollü biçimde modüle edilebileceğini göstermektedir. Bu durum, hedeflenen doku rejenerasyon sürecine uyumlu olarak bozunma hızının tasarlanmasına olanak sağlaması bakımından önemli bir avantaj sunmaktadır.

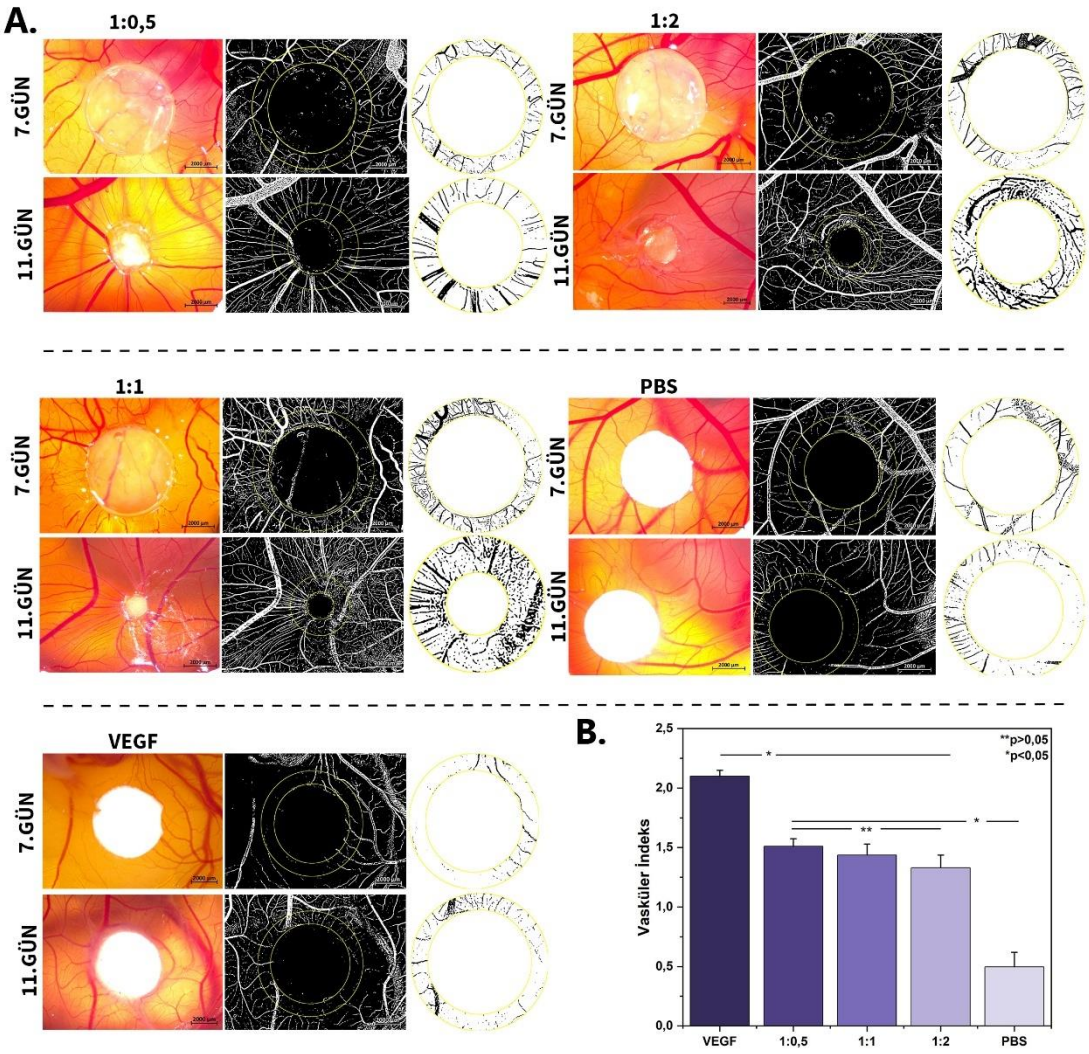


Şekil 40. Kompozit kriyojellerin 7. ve 14. günlerdeki *in vitro* bozunurluk oranları

4.15. *In Ovo* CAM Analizi

Yüksek düzeyde damarlanmış yapısı ve bağışıklık açısından ayrıcalıklı mikro çevresi sayesinde, *in ovo* CAM modeli, biyomalzemelerin anjiyojenik potansiyelinin ve biyouyumluluğunun değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan güvenilir bir preklinik test platformudur (Ribatti2016). Bu çalışmada, farklı dSCM ve hİF oranlarıyla hazırlanan kompozit hidrojellerin anjiyogenez üzerindeki etkileri sistematik olarak CAM modeli aracılığıyla incelenmiştir. Şekil 41A'da sunulan stereomikroskopik görüntülere göre, tüm hidrojel gruplarının implantasyondan sonraki dört günlük süreçte (7.gün–11.gün) yapısal bütünlüklerini korudukları gözlemlenmiştir. Bu bulgu, kısa vadeli in vivo uygulamalar açısından yeterli düzeyde mekanik stabilite sağladıklarını göstermektedir. Damar oluşumu, ImageJ yazılımı ile gerçekleştirilen dijital görüntü analizleri yoluyla kantitatif olarak değerlendirilmiştir. Analiz sonuçları, hidrojel grupları arasında bileşim temelli anlamlı farklılıklar olduğunu ortaya koymuştur. Özellikle 1:0,5 oranındaki grup, 1:1 ve 1:2 gruplarına kıyasla anlamlı derecede daha yüksek vasküler indeks değerlerine ulaşmıştır (Şekil 41B). Bu sonuç, daha düşük fibroin içeriğine sahip formülasyonların neovaskülarizasyon için daha uygun bir mikro çevre sunduğunu göstermektedir.

Pozitif kontrol olarak kullanılan VEGF grubu beklendiği üzere en yüksek damar yoğunluğunu göstermiştir. Bununla birlikte, 1:0,5 oranındaki grup da negatif kontrol olan PBS grubuna kıyasla anlamlı ölçüde damar oluşumunu desteklemiş ve bu özelliğiyle doğasında bulunan damar oluşturma kapasitesini ortaya koymuştur. Elde edilen bu bulgular, matriksin gözenekli yapısı ve yüzey topografyasının, endotel hücre migrasyonu ve filopodial tomurcuklanma gibi anjiyogenezde rol oynayan hücresel süreçleri desteklediğine dair önceki literatürle uyumludur. Artan İF oranı ile vasküler indeks değerlerinde kademeli bir azalma gözlenmiştir. Bu durum, yüksek fibroin içeriğine sahip gruplarda daha yoğun ve geçirgenliği sınırlı bir iç yapının oluşmasıyla açıklanabilir. Böyle bir yapı, besin ve gaz difüzyonunu sınırlandırarak, endotel hücre göçünü ve damar filizlenmesini baskılayabilir. Benzer bulgular, daha önce rapor edilen İF bazlı sistemlerde de gözlemlenmiştir. Ayrıca, CAM membranları üzerindeki histolojik ve makroskobik değerlendirmelerde hiçbir grupta hemoraji, nekroz ya da inflamatuar yanıt izlenmemiştir. Bu gözlem, geliştirilen kompozit hidrojellerin *in ovo* modelde yüksek düzeyde biyouyumluluk sergilediğini ve HDM-türevli iskeleler ile uyumlu bir güvenlik profili sunduğunu göstermektedir. Sonuç olarak, dSCM-US ile kullanılan İF oranının kontrollü şekilde ayarlanması, anjiyojenik cevabın modüle edilmesine olanak sağlamaktadır. Aynı zamanda, biyouyumluluk düzeyinde herhangi bir olumsuzluğa yol açmaksızın bu etki elde edilmiştir. Bu özellikleri sayesinde, geliştirilen kompozit yapılar doku mühendisliği uygulamalarında kullanılabilecek, tasarlanabilir ve biyofonksiyonel iskele sistemleri için güçlü adaylar olarak değerlendirilmektedir.

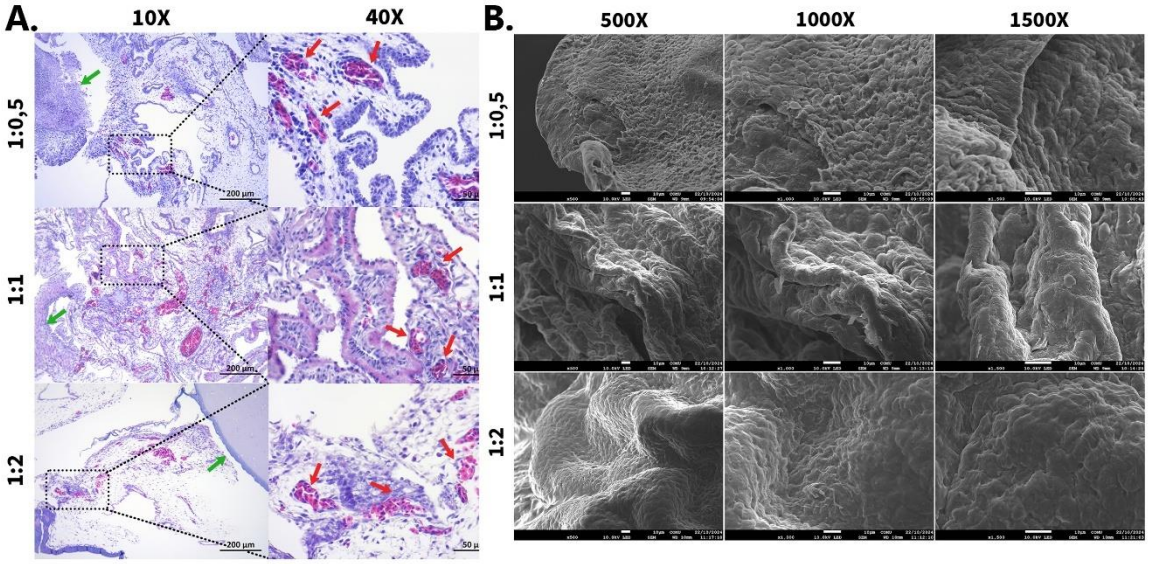


Şekil 41. Kompozit hidrojellerin CAM üzerine implantasyon sonrası 7. ve 11. embriyonik gelişim günlerindeki stereo mikroskop görüntüleri (A), Vasküler yoğunluk indeksi değerlerinin karşılaştırması (B)

Şekil 42'de, CAM membranına yerleştirilen kompozit hidrojellerin doku ile etkileşimleri hem H&E boyalı histolojik kesitlerle hem de SEM görüntüleriyle birlikte sunulmaktadır. Histolojik değerlendirmelerde, özellikle 1:0,5 ve 1:1 oranlarındaki gruplarda, implant çevresinde kırmızı oklarla işaretlenen yeni damar oluşumları açıkça gözlemlenmiştir. Bu damar yapıları, doku düzeyinde aktif bir anjiyogenez sürecinin varlığına işaret etmektedir. Fibroin içeriği arttıkça (özellikle 1:2 grubuna geçişle birlikte), yeni damar yapılarının sayısında azalma kaydedilmiştir. Bu durum, artan fibroin oranıyla birlikte daha kompakt ve geçirgenliği sınırlı bir matriks yapısının oluşmasıyla

ilişkilendirilmiştir. Bu bulgu, matriks yoğunluğu ve yüzey topografyasının endotel hücre göçü üzerindeki etkisini vurgulayan önceki çalışmalarla da uyumludur (Fu vd., 2021). Histolojik kesitlerde yeşil oklarla işaretlenen bölgeler, CAM yüzeyi ile hidrojel arasındaki fiziksel temas bölgesini göstermekte olup, tüm gruplarda iskele yapısının korunmuş olduğu ve çevre dokuda herhangi bir zarar oluşturmadığı görülmüştür. Nekroz, inflamasyon ya da doku yıkımı gibi patolojik bulgulara rastlanmamış olması, geliştirilen hidrojellerin *in ovo* ortamda biyouyumlu olduklarını desteklemektedir.

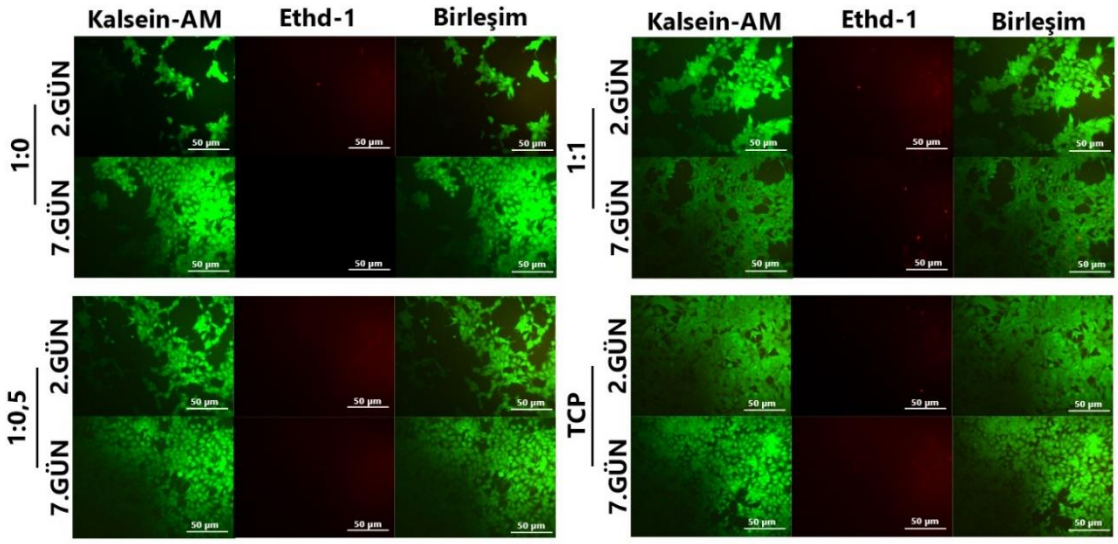
Şeklin sağ bölümünde sunulan SEM görüntüleri, hidrojel yüzeylerinin morfolojik özelliklerini ortaya koymaktadır. 1:0,5 grubunda lifli, açık ve düzensiz bir yüzey yapısı gözlemlenirken; 1:1 ve özellikle 1:2 grubunda fibroin oranındaki artışa bağlı olarak yüzeyin daha yoğun, katmanlı ve kompakt bir yapı kazandığı görülmüştür. Bu değişim, yüksek fibroin içeriğinin β-tabaka formasyonunu artırarak yüzeyin daha az gözenekli hale gelmesine neden olduğu yönündeki literatür verileriyle de uyumludur (Su vd., 2017). Sonuç olarak, histolojik ve yüzey morfolojisine ilişkin analizler birlikte değerlendirildiğinde, İF oranının hem gözeneklilik hem de anjiyogenez kapasitesi üzerinde belirleyici bir faktör olduğu anlaşılmaktadır. Özellikle 1:0,5 oranındaki hidrojel formülasyonu hem yüzey yapısı hem de damar oluşumunu destekleyen biyolojik yanıt bakımından en dengeli ve avantajlı profili sunmuştur.



Şekil 42. *In ovo* CAM testi sonucu hücre yüklü kompozit kriyojellerden elde edilen histogramlar (A), hücre yüklü kriyojellerin SEM mikrografları (B)

4.16. Hücre Canlılığı ve Sitotoksisite Testleri

Kompozit hidrojel sistemlerinin biyolojik uygunluğu, insan nöroblastoma kökenli SH-SY5Y hücre hattı kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu hücreler, sinir doku mühendisliği çalışmalarında yaygın şekilde tercih edilmekte olup, uygun kültür koşullarında nöronal farklılaşma yeteneği göstermeleri sayesinde iskele malzemelerinin hücre yönlendirme potansiyelini değerlendirmek için uygun bir model sunmaktadır. Çalışma kapsamında hücre canlılığı, Kalsein-AM ve EthD-1 boyalarıyla floresan mikroskop altında izlenmiş; hücre proliferasyonu ise MTS testiyle kantitatif olarak analiz edilmiştir. 2. ve 7. günlerde elde edilen görüntüler, tüm gruplarda canlı hücre oranının arttığını, ölü hücre sinyalinin ise düşük kaldığını göstermiştir. Özellikle 1:0 ve 1:0,5 gruplarında hücrelerin yüzeye daha homojen şekilde dağıldığı, daha iyi tutunduğu ve nörit benzeri uzantılar geliştirdiği gözlemlenmiştir (Şekil 43). Bu durum, matriks yapısının nöronal fenotipe yönelim gösteren bir hücre-mikro çevre etkileşimini desteklediğini düşündürmektedir. Nitekim Uebersax ve ark., İF bazlı üç boyutlu yapıların PC12 hücrelerinde NGF varlığında nörit uzamasını ve farklılaşmayı teşvik ettiğini göstermiştir (Uebersax vd., 2007).

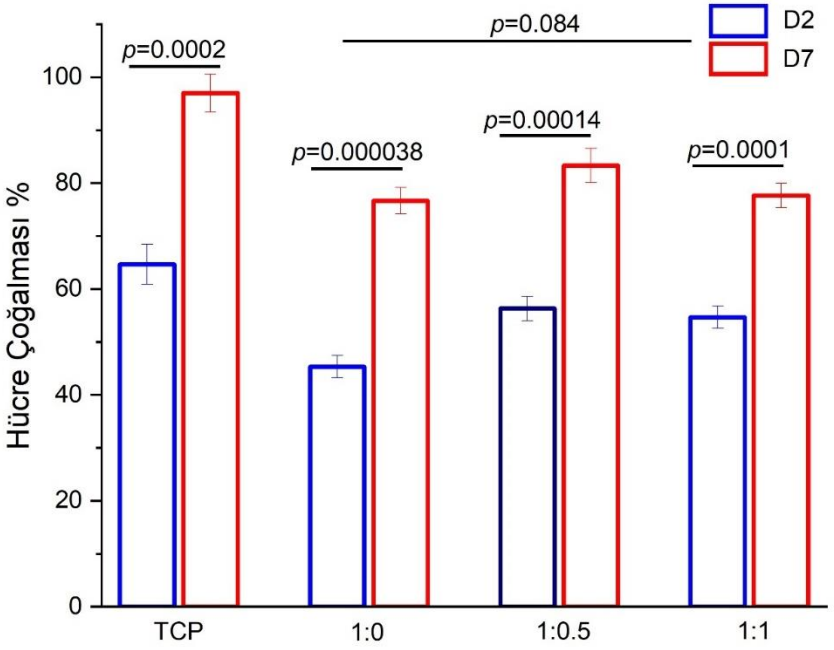


Şekil 43. Calcein-AM/EthD-1 boyası ile SH-SY5Y hücrelerinin canlılık analizi

MTS testi sonuçları, 7. gün sonunda tüm gruplarda hücre proliferasyonunda anlamlı bir artış olduğunu göstermektedir ($p < 0,001$) (Şekil 43). En yüksek proliferatif aktivite, doku kültürü plastiği kontrolü olan TCP grubunda gözlenmiş olup, bu durum kültür plastiğinin hücre yapışmasına uygun yüzey özellikleri sunmasıyla uyumludur. Kompozit hidrojel grupları arasında, 1:0,5 ve 1:1 oranlı formülasyonlar, İF katkısının sağladığı biyofiziksel avantajlarla daha yüksek proliferasyon düzeyleri sergilemiştir. Buna karşılık, yalnızca dSCM içeren 1:0 grubunda başlangıçta daha düşük proliferasyon gözlenmiş, ancak 7. gün sonunda canlı hücre yoğunluğunda belirgin bir artış kaydedilmiştir. Bu bulgular, İF'nin yalnızca mekanik stabiliteye değil, aynı zamanda yüzey topografyası, protein adsorpsiyon kapasitesi ve hücre-matris etkileşimleri üzerinden hücre davranışına da katkı sağladığını göstermektedir. Fibroin içeriğinin artmasıyla (örneğin 1:1 oranında), hidrojel gözenek yapısının daha kompakt hale geldiği ve bunun besin ile gaz difüzyonunu sınırlayarak hücre proliferasyonunu kısmen baskılayabileceği düşünülmektedir.

Nitekim Wang ve ark. yüksek yoğunluklu fibroin iskelelerde gözenek sıkılığına bağlı olarak besin taşınımında azalma ve proliferasyonda düşüş gözlemlenebileceğini raporlamıştır (Wang vd., 2008). Ancak çalışmamızda, 1:1 grubunda hücre morfolojisinin korunmuş olması ve canlı hücrelerin homojen dağılımı, fibroinin yalnızca mekanik değil,

aynı zamanda hücre davranışlarını destekleyici biyokimyasal bir mikroçevre sunduğunu göstermektedir. Bu bulgu, İF temelli yapıların Schwann hücreleriyle yüksek biyouyum gösterdiğini bildiren Yang ve ark. sonuçlarıyla da örtüşmektedir (Yang vd., 2007). Sonuç olarak, elde edilen bulgular, İF katkılı dSCM bazlı hidrojel sistemlerinin SH-SY5Y hücreleriyle biyouyumlu olduğunu; hücre canlılığı ve proliferasyonu açısından olumlu sonuçlar sunduğunu ve bazı formülasyonların nöronal fenotip özelliklerini destekleyebilecek potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

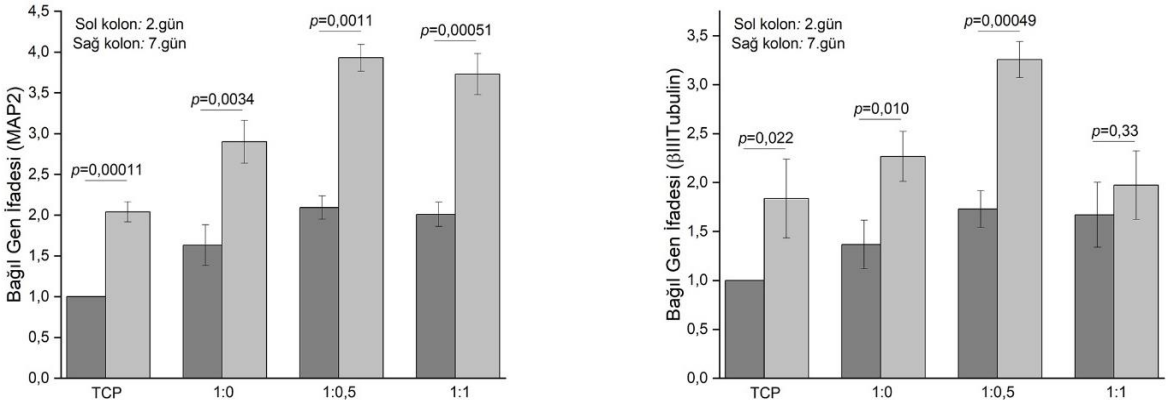


Şekil 44. MTS testi ile SH-SY5Y hücre çoğalmasının kantitatif analizi

4.17. Gen Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi (qRT-PCR)

Farklı dSCM-US/İF oranlarına sahip kompozit hidrojeller üzerinde kültürlenen SH-SY5Y hücrelerinin nörojenik farklılaşma potansiyeli, MAP2 ve βIII-tubulin gen ekspresyon seviyeleri üzerinden değerlendirilmiştir (Şekil 45). MAP2, dendritik yapıların olgunlaşmasıyla ilişkili mikrotübül stabilizasyon proteini iken, βIII-tubulin erken nöronal farklılaşmanın önemli bir belirtecidir (Haque vd., 2004; Katsetos vd., 2003). Yapılan kantitatif analizler, 2. ve 7. günler arasında her iki genin ekspresyon düzeylerinde artış olduğunu ve özellikle dSCM/İF (1:0,5) grubunda bu artışın istatistiksel olarak anlamlı

şekilde yüksek olduğunu göstermiştir (p <0,001). Bu sonuç, 1:0,5 oranlı formülasyonun SH-SY5Y hücrelerini nöronal fenotipe yönlendirme açısından en uygun mikro çevreyi sunduğunu düşündürmektedir. Literatürde, İF içeren biyomateryallerin nöronal farklılaşmayı destekleyebildiği, ancak fibroin oranı arttıkça hücre-matriks etkileşimlerinin topografik kısıtlamalara bağlı olarak değişebileceği bildirilmiştir (Uebersax vd., 2007). Ayrıca, dokuya özgü HDM türevli materyallerin, nöronal hücrelerde gen ekspresyonunu epigenetik düzeyde etkileyerek hücresel yönlendirmeyi artırabildiği ifade edilmiştir (Liu vd., 2024; Ortega vd., 2024). Bu bağlamda, fibroin oranı yüksek olan 1:1 grubunda ekspresyon düzeylerinin görece düşük kalması, gözenek yapısındaki sıkılaşma ve difüzyon sınırlarının etkisiyle ilişkilendirilebilir. Öte yandan, yalnızca dSCM içeren 1:0 grubunun da farklılaşmayı desteklediği, ancak bu etkinin fibroin katkısıyla—özellikle 1:0,5 oranında—sinerjik biçimde arttığı gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, MAP2 ve βIII-tubulin gen ekspresyon profilleri, 1:0,5 oranlı dSCM/İF grubunun SH-SY5Y hücreleri için hem mimari hem de biyokimyasal açıdan en uygun farklılaşma ortamını sunduğunu ortaya koymakta; bu durum literatürde bildirilen İF ve HDM kombinasyonlarının hücresel yönlendirme kapasitesiyle de örtüşmektedir.

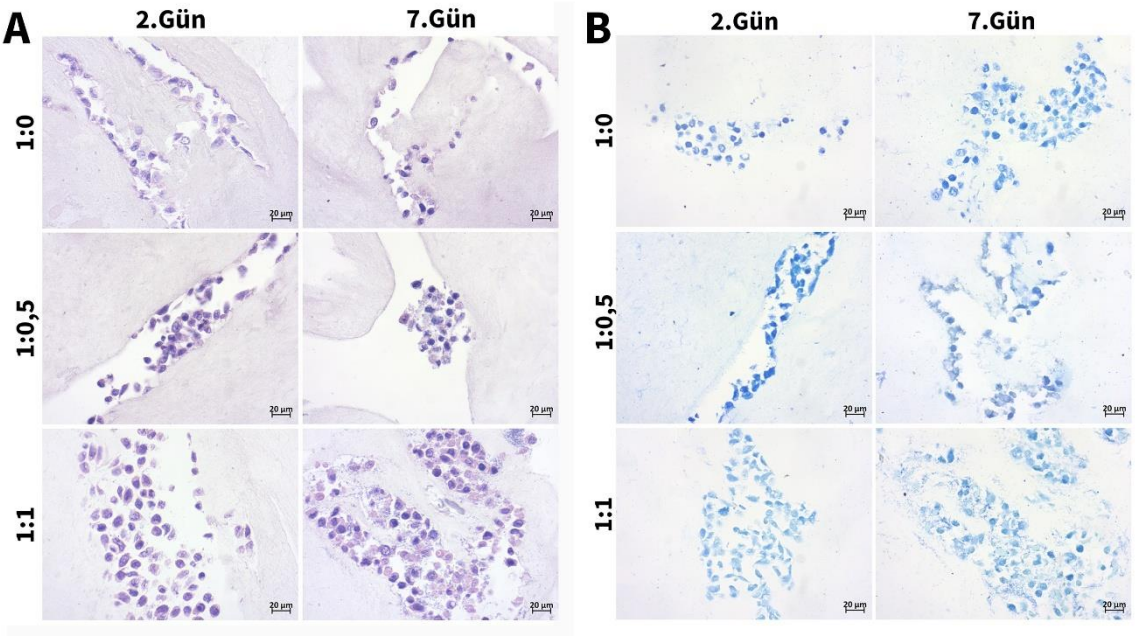


Şekil 45. Kompozit hidrojeller üzerinde kültürlenen SH-SY5Y hücrelerinde, 2. ve 7. günlerde MAP2 ve βIII-Tubulin genlerine ait bağıl ekspresyon düzeyleri

4.18. Histolojik ve İmmünohistokimyasal İncelemeler

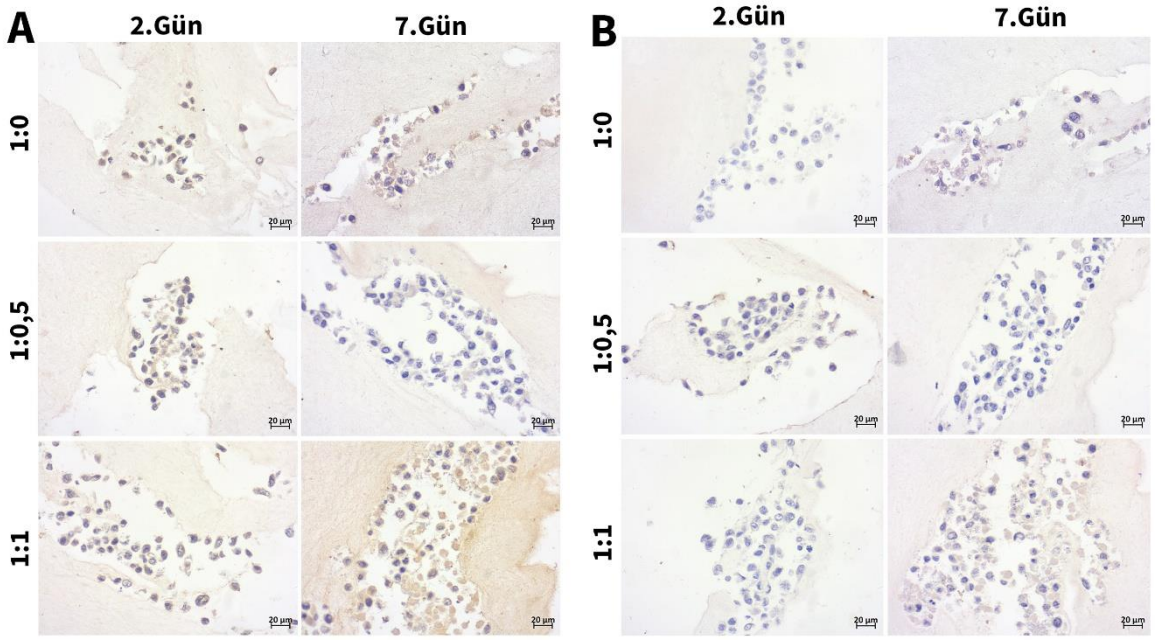
Hücre kültürü çalışmaları kapsamında, nöroblastoma kökenli SH-SY5Y hücreleri, farklı kompozit hidrojel grupları üzerinde 2. ve 7. günlerde değerlendirilmiştir. Hücre-

matriks etkileşimlerinin morfolojik düzeyde incelenebilmesi amacıyla histolojik boyamalar uygulanmış; H&E ile genel hücresel dağılım ve doku organizasyonu, Toluidin Mavisi ile bazofilik yapılar ve nükleer yoğunluk analiz edilmiştir. H&E boyamaları, özellikle 7. günde hücrelerin iskele boyunca homojen dağıldığını ve morfolojik bütünlüklerini koruduğunu göstermiştir. Toluidin Mavisi boyamaları ise tüm gruplarda belirgin nükleer yapıların izlendiğini ve hücre yoğunluğunun zamanla arttığını ortaya koymuştur (Şekil 46).



Şekil 46. SH-SY5Y hücrelerinin A) Hematoksilen-eozin (H&E) ve B) Toluidin mavisi (TB) ile histolojik boyamaları.

İmmünohistokimyasal analizler kapsamında βIII-tubulin ve MAP2 belirteçleri ile hücrelerin nöronal fenotipe yönelimi değerlendirilmiştir. Boyama sonuçları, özellikle 1:0,5 grubunda bu belirteçlerin daha yoğun ekspresyon gösterdiğini ortaya koymuştur (Şekil 47). Bu bulgular, SH-SY5Y hücrelerinin bu mikro çevrede yalnızca yaşamsal aktivitelerini sürdürmekle kalmayıp aynı zamanda nöronal fenotipe yöneldiğini göstermektedir. Elde edilen veriler, geliştirilen kompozit hidrojel yapılarının sinir doku mühendisliği uygulamalarında biyouyumlu ve yönlendirici bir iskele sistemi olarak potansiyel taşıdığını desteklemektedir.



Şekil 47. SH-SY5Y hücrelerinde A) β- βIII-tubulin ve B) MAP2 immünohistokimyasal boyamaları.

BEŞİNCİ BÖLÜM
SONUÇ VE ÖNERİLER

Günümüzde sinir dokusunun kendini yenileyemeyen doğası, travma, dejeneratif hastalıklar veya cerrahi müdahaleler sonrasında oluşan hasarların kalıcı fonksiyonel kayıplara yol açmasına neden olmaktadır. Merkezi ve periferik sinir sistemlerinde meydana gelen bu tür yapısal ve işlevsel bozukluklar, yaşam kalitesini ciddi şekilde düşürmekte ve mevcut tedavi seçenekleri çoğunlukla yalnızca semptomatik rahatlama sağlamaktadır. Bu nedenle, sinir dokusunun yeniden yapılandırılmasına yönelik biyomühendislik tabanlı yaklaşımlar, hem temel bilim hem de klinik uygulamalar açısından büyük önem kazanmıştır. Sinir doku mühendisliği, biyomalzeme bilimi, hücre biyolojisi ve biyokimya gibi disiplinleri bir araya getirerek, hasarlı sinir dokularının onarımı veya yerine konulması amacıyla biyofonksiyonel iskele sistemlerinin geliştirilmesini hedeflemektedir. Ancak geleneksel sentetik malzemelerin sınırlı biyouyumluluğu ve yetersiz biyolojik sinyalizasyon kabiliyeti, dokuya özgü hücresel yanıtların etkin şekilde tetiklenmesini engellemektedir. Aynı şekilde, doğal polimer temelli bazı biyomateryallerin mekanik zayıflıkları ve kontrolsüz bozunma profilleri, uzun vadeli uygulamalarda çeşitli kısıtlamalar oluşturmaktadır. Bu bağlamda, hem biyokimyasal hem de yapısal açıdan doğal dokuya benzerlik gösteren, hücre-matriks etkileşimini destekleyen ve yönlendirici özellikler sunabilen yeni nesil biyomalzeme sistemlerinin geliştirilmesi ön plana çıkmaktadır. Özellikle, dokuya özgü hücre dışı matris (HDM) türevleri ile protein bazlı doğal polimerlerin (örneğin ipek fibroin) kombinasyonu, sinir hücrelerinin proliferasyonu, farklılaşması ve yönlendirilmiş büyümesi açısından umut verici çözümler sunmaktadır.

Bu tez çalışması, sinir dokusu gibi yüksek derecede özgün ve karmaşık bir mikro çevreye sahip hedef sistem için, doğal dokunun mimarisini ve biyokimyasal bileşimini taklit edebilen, biyofonksiyonel ve biyouyumlu bir hidrojel platformu geliştirme fikrinden yola çıkmıştır. Bu amaçla, rejeneratif kapasitesi yüksek olduğu bilinen omurilik meninks dokusundan elde edilen hücresizleştirilmiş HDM, doğal, protein bazlı ve sürdürülebilir bir biyopolimer olan İF ile birleştirilmiştir. Bu iki biyomalzeme, hücre-matriks etkileşimini destekleyen biyokimyasal sinyaller ve fiziksel özellikler sunma potansiyeliyle sinerjik bir yapı oluşturmaktadır. Elde edilen kompozit yapıların fiziksel stabilitesini ve üç boyutlu

mimarisini sağlamak amacıyla HRP ve H_2O_2 sistemi ile enzimatik olarak çapraz bağlanmış ve böylece kontrollü ağ yapısına sahip biyohibrit hidrojeller üretilmiştir. Geliştirilen bu sistem, sinir doku mühendisliğinde iskele materyali olarak kullanılabilecek, hem yapısal destek sağlayan hem de hücresel düzeyde yönlendirici mikroçevre sunan yenilikçi bir platform olarak kurgulanmıştır.

Bu çalışmanın ilk dikkat çeken özgün katkısı, doku mühendisliğinde sıklıkla tercih edilen deterjan temelli hücresizleştirme yöntemleri yerine, omurilik meninks dokusunun deterjan içermeyen fiziksel ve enzimatik yaklaşımlarla hücresizleştirilmiş olmasıdır. Bu yöntem sayesinde, kolajen ve sGAG gibi hücre yönlendirme açısından kritik HDM bileşenleri korunmuş; işlem süresi azaltılmış ve toksik artık oluşumu minimuma indirilmiştir. Böylece, sinir dokusu gibi kompleks bir hedef sistem için, biyolojik sinyallerin bozulmadan korunabildiği, işlevsel bir iskele altlığı sağlanmıştır. İkinci önemli katkı, İF bileşeniyle ilişkilidir. Literatürde yaygın olarak kullanılan Ajisawa yöntemiyle elde edilen fibroin çözeltileri, zamanla β-tabaka oluşumu nedeniyle kararlılığını yitirerek kısa sürede bozulmaktadır. Bu çalışmada, Ajisawa çözeltisi ile hazırlanan fibroin sulu çözeltileri liyofilize edilerek yeniden suda çözünebilen toz forma dönüştürülmüş ve böylece uzun süre saklanabilir, standardize, yeniden kullanılabilir bir hammadde elde edilmiştir. Bu strateji, doku mühendisliği uygulamaları için üretim kolaylığı ve ölçeklenebilirlik açısından önemli bir avantaj sunmaktadır. Gerçekleştirilen fizikokimyasal karakterizasyon çalışmaları (FTIR, XRD, TGA), İF ve dSCM bileşenlerinin yapısal bütünlüğünü büyük ölçüde koruduğunu ve kompozit yapı içerisinde uyumlu etkileşimler oluşturduğunu ortaya koymuştur. Mekanik ve reolojik testler, fibroin katkısının hidrojelin elastikiyetini ve mekanik dayanıklılığını artırdığını göstermiştir. SEM ve ImageJ analizleriyle belirlenen gözenek morfolojileri, özellikle 1:0,5 oranlı dSCM/İF grubunda büyük, bağlantılı ve homojen gözenek mimarisi gözlenmiştir. Bu yapı, besin ve oksijen taşınımı ile hücre infiltrasyonu açısından önemli avantajlar sağlamaktadır. Biyolojik değerlendirmeler, nöroblastoma kökenli SH-SY5Y hücreleri ile gerçekleştirilmiş ve hücre-matriks etkileşimi, proliferasyon ve farklılaşma gibi parametreler analiz edilmiştir. Canlı/Ölü ve MTS test sonuçları, tüm gruplarda hücre canlılığının korunduğunu ve özellikle 1:0,5 grubunun en yüksek biyolojik aktiviteyi sergilediğini ortaya koymuştur. H&E ve Toluidin mavisi boyamaları, hücrelerin matriks üzerine homojen şekilde dağıldığını ve morfolojik bütünlüklerini koruduğunu göstermiştir.

İmmünohistokimyasal analizlerde βIII-tubulin ve MAP2 gibi nöronal belirteçlerin pozitif boyanması, qRT-PCR ile bu genlerin ekspresyon düzeylerinin doğrulanması, geliştirilen yapının nörojenik farklılaşmayı destekleyebildiğini göstermektedir. In ovo CAM modeli ile yapılan in vivo analizler, 1:0,5 oranlı dSCM/İF grubunun anjiyogenezi güçlü şekilde desteklediğini ortaya koymuştur. Bu sonuç, hidrojelin yalnızca nöronal yönlendirmeyi değil, aynı zamanda yeni damar oluşumunu da teşvik edebildiğini ve böylece doku bütünlüğünün sürdürülebilmesi için gerekli vasküler destek potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Genel olarak, geliştirilen dSCM/İF kompozit hidrojeller; hücre canlılığını destekleyen, hücresel farklılaşmayı yönlendirebilen, anjiyogenez gibi kritik süreçleri tetikleyebilen ve doğal mikroçevre ile biyofonksiyonel etkileşim kurabilen çok yönlü bir biyomateryal platformu sunmaktadır. Bu özellikleriyle, sinir doku mühendisliğinde yenilikçi ve uygulanabilir bir iskele sistemi olarak dikkat çekmektedir.

Gelecek çalışmalar kapsamında, geliştirilen dSCM/İF temelli hidrojel sistemlerinin uygun in vivo modellerde test edilmesinin, rejeneratif potansiyelin ve biyolojik entegrasyonun daha bütüncül biçimde değerlendirilmesine olanak sağlayacağını düşünmekteyiz. Ayrıca, liyofilize formda elde edilen hİF'nin farklı doku mühendisliği uygulamalarına (örneğin kas, kıkırdak, deri) uyarlanabilirliğinin araştırılmasıyla, bu malzemenin çok yönlü kullanım potansiyelinin ortaya konabileceğini öngörmekteyiz. Bununla birlikte, deterjan içermeyen hücresizleştirme protokolünün farklı sinir dokusu kaynaklarına adapte edilerek uygulanabilirliğinin test edilmesi, literatüre anlamlı katkılar sunabilecektir. Son olarak, geliştirilen biyomalzemenin sterilizasyon, depolama ve taşınabilirlik gibi pratik uygulamalara yönelik koşullar altında stabilitesinin değerlendirilmesinin, bu sistemin klinik entegrasyon sürecine katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKÇA

Ajisawa, A. (1998). Dissolution of silk fibroin with calciumchloride/ethanol aqueous solution Studies on the dissolution of silk fibroin.(IX). *The Journal of Sericultural Science of Japan*, *67*(2), 91-94.

Aleemardani, M., Solouk, A., Akbari, S., ve Moeini, M. (2023). A hydrogel-fiber-hydrogel composite scaffold based on silk fibroin with the dual-delivery of oxygen and quercetin. *Biotechnol Bioeng*, *120*(1), 297-311. https://doi.org/10.1002/bit.28259

Altman, G. H., Diaz, F., Jakuba, C., Calabro, T., Horan, R. L., Chen, J., Lu, H., Richmond, J., ve Kaplan, D. L. (2003). Silk-based biomaterials. *Biomaterials*, *24*(3), 401-416.

Alves de Lima, K., Rustenhoven, J., ve Kipnis, J. (2020). Meningeal Immunity and Its Function in Maintenance of the Central Nervous System in Health and Disease. *Annual Review of Immunology*, *38*(1), 597-620. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-102319-103410

Antoine, E. E., Vlachos, P. P., ve Rylander, M. N. (2014). Review of collagen I hydrogels for bioengineered tissue microenvironments: characterization of mechanics, structure, and transport. *Tissue Eng Part B Rev*, *20*(6), 683-696. https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2014.0086

Attri, K., G. H, S., Gulabrao, D. P., Teja, K. S. S., Garai, I., Pandey, A. K., Kumar, G. A., P, J., ve Bharathi, B. K. M. (2024). Silk Biomaterials: Applications and Future Prospects in Biomedical Engineering. *Uttar Pradesh Journal of Zoology*, *45*(16), 205-216. https://doi.org/10.56557/upjoz/2024/v45i164301

Badylak, S. F., ve Gilbert, T. W. (2008). Immune response to biologic scaffold materials. Seminars in immunology,

Barajaa, M. A., Otsuka, T., Ghosh, D., Kan, H. M., ve Laurencin, C. T. (2024). Development of porcine skeletal muscle extracellular matrix-derived hydrogels with improved properties and low immunogenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *121*(19), e2322822121. https://doi.org/10.1073/pnas.2322822121

Bardestani, R., Patience, G. S., ve Kaliaguine, S. (2019). Experimental methods in chemical engineering: specific surface area and pore size distribution measurements—BET, BJH, and DFT. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, *97*(11), 2781-2791. https://doi.org/10.1002/cjce.23632

Barros, C. S., Franco, S. J., ve Muller, U. (2011). Extracellular matrix: functions in the nervous system. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *3*(1), a005108. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005108

Bassett, D. S., ve Bullmore, E. (2006). Small-world brain networks. *Neuroscientist*, *12*(6), 512-523. https://doi.org/10.1177/1073858406293182

Bergholt, N. L., Lysdahl, H., Lind, M., ve Foldager, C. B. (2019). A Standardized Method of Applying Toluidine Blue Metachromatic Staining for Assessment of Chondrogenesis. *Cartilage*, *10*(3), 370-374. https://doi.org/10.1177/1947603518764262

Bhar, B., Ranta, P., Samudrala, P. K., ve Mandal, B. B. (2024). Omentum Extracellular Matrix-Silk Fibroin Hydroscaffold Promotes Wound Healing through Vascularization and Tissue Remodeling in the Diabetic Rat Model. *ACS Biomater Sci Eng*, *10*(2), 1090-1105. https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.3c01877

Bhattacharjee, P., Madden, P. W., Patriarca, E., ve Ahearne, M. (2023). Optimization and evaluation of oxygen-plasma-modified, aligned, poly (capital JE, Ukrainian-caprolactone) and silk fibroin nanofibrous scaffold for corneal stromal regeneration. *Biomater Biosyst*, *12*, 100083. https://doi.org/10.1016/j.bbiosy.2023.100083

Buitrago, J. O., Patel, K. D., El-Fiqi, A., Lee, J. H., Kundu, B., Lee, H. H., ve Kim, H. W. (2018). Silk fibroin/collagen protein hybrid cell-encapsulating hydrogels with tunable gelation and improved physical and biological properties. *Acta Biomater*, *69*, 218-233. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.12.026

Bullmore, E., ve Sporns, O. (2009). Complex brain networks: graph theoretical analysis of structural and functional systems. *Nature reviews neuroscience*, *10*(3), 186-198.

Călina, I., ve Raza, M. A. (2025). Editorial for the Special Issue "Polymeric Hydrogels for Biomedical Application". In (Vol. 11, pp. 221): MDPI.

Caló, E., ve Khutoryanskiy, V. V. (2015). Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *European Polymer Journal*, *65*, 252-267. https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.11.024

Carissimi, G., Baronio, C. M., Montalban, M. G., Villora, G., ve Barth, A. (2020). On the Secondary Structure of Silk Fibroin Nanoparticles Obtained Using Ionic Liquids: An Infrared Spectroscopy Study. *Polymers (Basel)*, *12*(6). https://doi.org/10.3390/polym12061294

Catala, M., ve Kubis, N. (2013). Gross anatomy and development of the peripheral nervous system. *Handbook of clinical neurology*, *115*, 29-41.

Chen, W., Zhang, W., Zhang, N., Chen, S., Huang, T., ve You, H. (2023). Pipeline for precise insoluble matrisome coverage in tissue extracellular matrices. *Front Bioeng Biotechnol*, *11*, 1135936. https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1135936

Chen, Z., Du, C., Liu, S., Liu, J., Yang, Y., Dong, L., Zhao, W., Huang, W., ve Lei, Y. (2024). Progress in biomaterials inspired by the extracellular matrix. *Giant*, *19*, 100323.

Conceicao, E. P., Madden, C. J., ve Morrison, S. F. (2017). Glycinergic inhibition of BAT sympathetic premotor neurons in rostral raphe pallidus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, *312*(6), R919-R926. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00551.2016

Coscueta, E., Brassesco, M. E., ve Pintado, M. (2021). https://doi.org/10.20944/preprints202102.0378.v1

Crapo, P. M., Gilbert, T. W., ve Badylak, S. F. (2011). An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*, *32*(12), 3233-3243. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.057

Dauleac, C., Jacquesson, T., ve Mertens, P. (2019). Anatomy of the human spinal cord arachnoid cisterns: applications for spinal cord surgery. *J Neurosurg Spine*, *31*(5), 756-763. https://doi.org/10.3171/2019.4.SPINE19404

Decante, G., Reis, R. L., Silva-Correia, J., ve Oliveira, J. M. (2024). Chapter 10 - Enzymatic crosslinked hydrogels. In J. M. Oliveira, J. Silva-Correia, ve R. L. Reis (Eds.), *Hydrogels for Tissue Engineering and Regenerative Medicine* (pp. 199-212). Academic Press. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823948-3.00046-4

Decimo, I., Fumagalli, G., Berton, V., Krampera, M., ve Bifari, F. (2012). Meninges: from protective membrane to stem cell niche. *American journal of stem cells*, *1*(2), 92.

Deen, I., ve Rosei, F. (2019). Silk fibroin-derived polypeptides additives to promote hydroxyapatite nucleation in dense collagen hydrogels. *PLoS One*, *14*(7), e0219429. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219429

Demiray, E. B., Sezgin Arslan, T., Derkus, B., ve Arslan, Y. E. (2025). A Facile Strategy for Preparing Flexible and Porous Hydrogel-Based Scaffolds from Silk Sericin/Wool Keratin by In Situ Bubble-Forming for Muscle Tissue Engineering Applications. *Macromol Biosci*, *25*(2), e2400362. https://doi.org/10.1002/mabi.202400362

Diaz, E., ve Morales, H. (2016). Spinal Cord Anatomy and Clinical Syndromes. *Semin Ultrasound CT MR*, *37*(5), 360-371. https://doi.org/10.1053/j.sult.2016.05.002

Dong, R. P., Zhang, Q., Yang, L. L., Cheng, X. L., ve Zhao, J. W. (2023). Clinical management of dural defects: A review. *World J Clin Cases*, *11*(13), 2903-2915. https://doi.org/10.12998/wjcc.v11.i13.2903

Dreanca, A., Muresan-Pop, M., Taulescu, M., Toth, Z. R., Bogdan, S., Pestean, C., Oren, S., Toma, C., Popescu, A., Pall, E., Sevastre, B., Baia, L., ve Magyari, K. (2021). Bioactive glass-biopolymers-gold nanoparticle based composites for tissue engineering applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, *123*, 112006. https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112006

Ellis, H. (2006). Anatomy of the spinal nerves and dermatomes. *Anaesthesia ve Intensive Care Medicine*, *7*(11), 405-406.

Feng, Y., Peng, Y., Jie, J., Yang, Y., ve Yang, P. (2022). The immune microenvironment and tissue engineering strategies for spinal cord regeneration. *Frontiers in cellular neuroscience*, *16*, 969002.

Fernández-Pérez, J., ve Ahearne, M. (2019). The impact of decellularization methods on extracellular matrix derived hydrogels. *Scientific Reports*, *9*(1), 14933.

Frantz, C., Stewart, K. M., ve Weaver, V. M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *Journal of cell science*, *123*(24), 4195-4200.

Fritz, J., Moser, A. C., Otahal, A., Redl, H., Teuschl-Woller, A. H., Schneider, K. H., ve Nehrer, S. (2025). Silk Fibroin-Based Hydrogels Supplemented with Decellularized Extracellular Matrix and Gelatin Facilitate 3D Bioprinting for Meniscus Tissue Engineering. *Macromol Biosci*, *25*(6), e2400515. https://doi.org/10.1002/mabi.202400515

Frostell, A., Hakim, R., Thelin, E. P., Mattsson, P., ve Svensson, M. (2016). A Review of the Segmental Diameter of the Healthy Human Spinal Cord. *Front Neurol*, *7*, 238. https://doi.org/10.3389/fneur.2016.00238

Fu, Q., Xia, B., Huang, X., Wang, F., Chen, Z., ve Chen, G. (2021). Pro-angiogenic decellularized vessel matrix gel modified by silk fibroin for rapid vascularization of tissue engineering scaffold. *J Biomed Mater Res A*, *109*(9), 1701-1713. https://doi.org/10.1002/jbm.a.37166

Gautam, A. (2017). Afferent and Efferent Impulses. 1-2. https://doi.org/10.1007/978-3-319-47829-6_1255-1

Ghica, M. V., Hirjau, M., Lupuleasa, D., ve Dinu-Pirvu, C. E. (2016). Flow and Thixotropic Parameters for Rheological Characterization of Hydrogels. *Molecules*, *21*(6). https://doi.org/10.3390/molecules21060786

Gilbert, T. W., Sellaro, T. L., ve Badylak, S. F. (2006). Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*, *27*(19), 3675-3683.

Grabska-Zielińska, S. (2024). Cross-linking agents in three-component materials dedicated to biomedical applications: a review. *Polymers*, *16*(18), 2679.

Gu, X., Ding, F., ve Williams, D. F. (2014). Neural tissue engineering options for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials*, *35*(24), 6143-6156. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.04.064

Haggerty, A. E., Marlow, M. M., ve Oudega, M. (2017). Extracellular matrix components as therapeutics for spinal cord injury. *Neurosci Lett*, *652*, 50-55. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.09.053

Haque, N., Gong, C. X., Sengupta, A., Iqbal, K., ve Grundke-Iqbal, I. (2004). Regulation of microtubule-associated proteins, protein kinases and protein phosphatases during differentiation of SY5Y cells. *Brain Res Mol Brain Res*, *129*(1-2), 163-170. https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2004.07.001

Healthdirect. (2023). *Central Nervous System*. Retrieved 14.06.2025 from https://www.healthdirect.gov.au/central-nervous-system

Heise, C., ve Kayalioglu, G. (2009). Cytoarchitecture of the spinal cord. In *The spinal cord* (pp. 64-93). Elsevier.

Howard, F. H., Gao, Z., Mansor, H. B., Yang, Z., ve Muthana, M. (2023). Silk fibroin nanoparticles: a biocompatible multi-functional polymer for drug delivery. In *Biotechnology-Biosensors, Biomaterials and Tissue Engineering Annual Volume 2023*. IntechOpen.

Hu, T., Fang, J., Shen, Y., Li, M., Wang, B., Xu, Z., ve Hu, W. (2024). Advances of naturally derived biomedical polymers in tissue engineering. *Front Chem*, *12*, 1469183. https://doi.org/10.3389/fchem.2024.1469183

Hu, X., Kaplan, D., ve Cebe, P. (2006). Determining beta-sheet crystallinity in fibrous proteins by thermal analysis and infrared spectroscopy. *Macromolecules*, *39*(18), 6161-6170.

Huang, F., Chen, T., Chang, J., Zhang, C., Liao, F., Wu, L., Wang, W., ve Yin, Z. (2021). A conductive dual-network hydrogel composed of oxidized dextran and hyaluronic-

hydrazide as BDNF delivery systems for potential spinal cord injury repair. *Int J Biol Macromol*, *167*, 434-445. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.206

Hudson, D. M., Werther, R., Weis, M., Wu, J. J., ve Eyre, D. R. (2014). Evolutionary origins of C-terminal (GPP)n 3-hydroxyproline formation in vertebrate tendon collagen. *PLoS One*, *9*(4), e93467. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093467

Hwang, Y.-i. (2021). Anatomy of Spinal Meninges and Meningeal Spaces: Relevant to Surgery of Spinal Cord Tumors. In *Surgery of Spinal Cord Tumors Based on Anatomy: An Approach Based on Anatomic Compartmentalization* (pp. 27-40). Springer.

Hynes, R. O., ve Naba, A. (2012). Overview of the matrisome--an inventory of extracellular matrix constituents and functions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *4*(1), a004903. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004903

Iozzo, R. V., ve Schaefer, L. (2015). Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biol*, *42*, 11-55. https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.02.003

Isik, M., Karakaya, E., Arslan, T. S., Atila, D., Erdogan, Y. K., Arslan, Y. E., Eskizengin, H., Eylem, C. C., Nemutlu, E., Ercan, B., D'Este, M., Okesola, B. O., ve Derkus, B. (2023). 3D Printing of Extracellular Matrix-Based Multicomponent, All-Natural, Highly Elastic, and Functional Materials toward Vascular Tissue Engineering. *Adv Healthc Mater*, *12*(20), e2203044. https://doi.org/10.1002/adhm.202203044

Jiang, W., Zhang, X., Yu, S., Yan, F., Chen, J., Liu, J., ve Dong, C. (2023). Decellularized extracellular matrix in the treatment of spinal cord injury. *Exp Neurol*, *368*, 114506. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2023.114506

Johari, N., Moroni, L., ve Samadikuchaksaraei, A. (2020). Tuning the conformation and mechanical properties of silk fibroin hydrogels. *European Polymer Journal*, *134*, 109842. https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.109842

John, S. P., ve Nagarajan, R. (2024). A Review on the Biomaterials Fabricated for Cardiac Tissue Engineering Using Decellularized Extracellular Matrix. *Regenerative Engineering and Translational Medicine*, *11*(1), 64-75. https://doi.org/10.1007/s40883-024-00341-5

Jose, G., Shalumon, K. T., ve Chen, J. P. (2020). Natural Polymers Based Hydrogels for Cell Culture Applications. *Curr Med Chem*, *27*(16), 2734-2776. https://doi.org/10.2174/0929867326666190903113004

Katsetos, C. D., Legido, A., Perentes, E., ve Mörk, S. J. (2003). Class III β-tubulin isotype: a key cytoskeletal protein at the crossroads of developmental neurobiology and tumor neuropathology. *Journal of child neurology*, *18*(12), 851-866.

Kayabolen, A., Keskin, D., Aykan, A., Karslioglu, Y., Zor, F., ve Tezcaner, A. (2017). Native extracellular matrix/fibroin hydrogels for adipose tissue engineering with enhanced vascularization. *Biomed Mater*, *12*(3), 035007. https://doi.org/10.1088/1748-605X/aa6a63

Keane, T. J., Swinehart, I. T., ve Badylak, S. F. (2015). Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance. *Methods*, *84*, 25-34.

Koffler, J., Zhu, W., Qu, X., Platoshyn, O., Dulin, J. N., Brock, J., Graham, L., Lu, P., Sakamoto, J., ve Marsala, M. (2019). Biomimetic 3D-printed scaffolds for spinal cord injury repair. *Nature medicine*, *25*(2), 263-269.

Kumar Sahi, A., Gundu, S., Kumari, P., Klepka, T., ve Sionkowska, A. (2023). Silk-Based Biomaterials for Designing Bioinspired Microarchitecture for Various Biomedical Applications. *Biomimetics (Basel)*, *8*(1). https://doi.org/10.3390/biomimetics8010055

Kundu, B., Rajkhowa, R., Kundu, S. C., ve Wang, X. (2013). Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations. *Adv Drug Deliv Rev*, *65*(4), 457-470. https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.043

Lai, J. Y., Luo, L. J., ve Ma, D. H. (2018). Effect of Cross-Linking Density on the Structures and Properties of Carbodiimide-Treated Gelatin Matrices as Limbal Stem Cell Niches. *Int J Mol Sci*, *19*(11). https://doi.org/10.3390/ijms19113294

Lemon, R. N. (2008). Descending pathways in motor control. *Annu Rev Neurosci*, *31*, 195-218. https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.31.060407.125547

Li, F., Tan, Y., Chen, L., Jing, L., Wu, D., ve Wang, T. (2019). High fibre-volume silkworm cocoon composites with strong structure bonded by polyurethane elastomer for high toughness. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, *125*, 105553. https://doi.org/10.1016/j.compositesa.2019.105553

Li, J., ve Mooney, D. J. (2016). Designing hydrogels for controlled drug delivery. *Nat Rev Mater*, *1*(12). https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.71

Li, Z., Lu, F., ve Liu, Y. (2023). A Review of the Mechanism, Properties, and Applications of Hydrogels Prepared by Enzymatic Cross-linking. *J Agric Food Chem*, *71*(27), 10238-10249. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c01162

Liu, J., Du, C., Huang, W., ve Lei, Y. (2023). Injectable smart stimuli-responsive hydrogels: pioneering advancements in biomedical applications. *Biomater Sci*, *12*(1), 8-56. https://doi.org/10.1039/d3bm01352a

Liu, J., Yan, R., Wang, B., Chen, S., Hong, H., Liu, C., ve Chen, X. (2024). Decellularized extracellular matrix enriched with GDNF enhances neurogenesis and remyelination for improved motor recovery after spinal cord injury. *Acta Biomater*, *180*, 308-322. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2024.04.015

Liu, Z., Ma, X., Liu, J., Zhang, H., ve Fu, D. (2025). Advances in the application of natural/synthetic hybrid hydrogels in tissue engineering and delivery systems: A comprehensive review. *Int J Pharm*, *672*, 125323. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2025.125323

Lyu, Y., Liu, Y., He, H., ve Wang, H. (2023). Application of Silk-Fibroin-Based Hydrogels in Tissue Engineering. *Gels*, *9*(5). https://doi.org/10.3390/gels9050431

McCorry, L. K. (2007). Physiology of the autonomic nervous system. *American journal of pharmaceutical education*, *71*(4), 78.

Medberry, C. J., Crapo, P. M., Siu, B. F., Carruthers, C. A., Wolf, M. T., Nagarkar, S. P., Agrawal, V., Jones, K. E., Kelly, J., Johnson, S. A., Velankar, S. S., Watkins, S. C., Modo, M., ve Badylak, S. F. (2013). Hydrogels derived from central nervous system extracellular matrix. *Biomaterials*, *34*(4), 1033-1040. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.10.062

Monazah, Mohammad M., Alimohammadi, E., Rostaminasab, G., Zarrintaj, P., ve Rezakhani, L. (2024). Proposing Novel Biological Scaffolds for the Regeneration of the Dura Mater. *Polymers for Advanced Technologies*, *35*(11). https://doi.org/10.1002/pat.6602

Mountcastle, V. B. (1997). The columnar organization of the neocortex. *Brain: a journal of neurology*, *120*(4), 701-722.

Nanda, D., Behera, D., Pattnaik, S. S., ve Behera, A. K. (2025). Advances in natural polymer-based hydrogels: synthesis, applications, and future directions in biomedical and environmental fields. *Discover Polymers*, *2*(1). https://doi.org/10.1007/s44347-025-00017-5

National Institute of Neurological Disorders and Stroke. (2023). Retrieved 15.06.2025 from https://www.ninds.nih.gov/health-information/disorders/spinal-cord-injury

Navarro, X. (2009). Chapter 27: Neural plasticity after nerve injury and regeneration. *Int Rev Neurobiol*, *87*, 483-505. https://doi.org/10.1016/S0074-7742(09)87027-X

Neishabouri, A., Soltani Khaboushan, A., Daghigh, F., Kajbafzadeh, A. M., ve Majidi Zolbin, M. (2022). Decellularization in Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Evaluation, Modification, and Application Methods. *Front Bioeng Biotechnol*, *10*, 805299. https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.805299

Nudo, R. J. (2013). Recovery after brain injury: mechanisms and principles. *Front Hum Neurosci*, *7*, 887. https://doi.org/10.3389/fnhum.2013.00887

Ortega, J. A., Soares de Aguiar, G. P., Chandravanshi, P., Levy, N., Engel, E., ve Alvarez, Z. (2024). Exploring the properties and potential of the neural extracellular matrix for next-generation regenerative therapies. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, *16*(3), e1962. https://doi.org/10.1002/wnan.1962

Paracha, M., Brezinski, A. N., Singh, R., Sinson, E., ve Satkunendrarajah, K. (2025). Targeting Spinal Interneurons for Respiratory Recovery After Spinal Cord Injury. *Cells*, *14*(4). https://doi.org/10.3390/cells14040288

Partlow, B. P., Hanna, C. W., Rnjak-Kovacina, J., Moreau, J. E., Applegate, M. B., Burke, K. A., Marelli, B., Mitropoulos, A. N., Omenetto, F. G., ve Kaplan, D. L. (2014). Highly tunable elastomeric silk biomaterials. *Advanced Functional Materials*, *24*(29), 4615-4624.

Partlow, B. P., Tabatabai, A. P., Leisk, G. G., Cebe, P., Blair, D. L., ve Kaplan, D. L. (2016). Silk Fibroin Degradation Related to Rheological and Mechanical Properties. *Macromol Biosci*, *16*(5), 666-675. https://doi.org/10.1002/mabi.201500370

Pascual-Leone, A., Amedi, A., Fregni, F., ve Merabet, L. B. (2005). The plastic human brain cortex. *Annu. Rev. Neurosci.*, *28*(1), 377-401.

Poole, J. J., ve Mostaço-Guidolin, L. B. (2021). Optical microscopy and the extracellular matrix structure: a review. *Cells*, *10*(7), 1760.

Poole, J. J. A., ve Mostaco-Guidolin, L. B. (2021). Optical Microscopy and the Extracellular Matrix Structure: A Review. *Cells*, *10*(7). https://doi.org/10.3390/cells10071760

Ransohoff, R. M., ve Engelhardt, B. (2012). The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nat Rev Immunol*, *12*(9), 623-635. https://doi.org/10.1038/nri3265

Reddy, N., Reddy, R., ve Jiang, Q. (2015). Crosslinking biopolymers for biomedical applications. *Trends in biotechnology*, *33*(6), 362-369.

Sakka, L., Gabrillargues, J., ve Coll, G. (2016). Anatomy of the Spinal Meninges. *Operative Neurosurgery*, *12*(2), 168-188. https://doi.org/10.1227/neu.0000000000001048

Saldin, L. T., Cramer, M. C., Velankar, S. S., White, L. J., ve Badylak, S. F. (2017). Extracellular matrix hydrogels from decellularized tissues: Structure and function. *Acta Biomater*, *49*, 1-15. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.11.068

Samancioglu, A., Aydin, B., Ozudogru, E., ve Arslan, Y. E. (2023). Evaluating the angiogenic and mechanical properties of hydrogels and physical constructs derived from spinal cord meninges extracellular matrix. *Materials Research Express*, *10*(8), 085401. https://doi.org/10.1088/2053-1591/acf277

Sandrini, G., Serrao, M., Rossi, P., Romaniello, A., Cruccu, G., ve Willer, J. C. (2005). The lower limb flexion reflex in humans. *Progress in Neurobiology*, *77*(6), 353-395. https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.11.003

She, J., Liu, J., Mu, Y., Lv, S., Tong, J., Liu, L., He, T., Wang, J., ve Wei, D. (2025). Recent advances in collagen-based hydrogels: Materials, preparation and applications. *Reactive and Functional Polymers*, *207*, 106136. https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2024.106136

Shirosaki, Y., Tsuru, K., Hayakawa, S., Osaka, A., Lopes, M. A., Santos, J. D., Costa, M. A., ve Fernandes, M. H. (2009). Physical, chemical and in vitro biological profile of chitosan hybrid membrane as a function of organosiloxane concentration. *Acta Biomater*, *5*(1), 346-355. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.07.022

Sokolenko, E. A., Berchner-Pfannschmidt, U., Ting, S. C., Schmid, K. W., Bechrakis, N. E., Seitz, B., Tsimpaki, T., Kraemer, M. M., ve Fiorentzis, M. (2021). Optimisation of the chicken chorioallantoic membrane assay in uveal melanoma research. *Pharmaceutics*, *14*(1), 13.

Stojkov, G., Niyazov, Z., Picchioni, F., ve Bose, R. K. (2021). Relationship between Structure and Rheology of Hydrogels for Various Applications. *Gels*, *7*(4). https://doi.org/10.3390/gels7040255

Su, D., Yao, M., Liu, J., Zhong, Y., Chen, X., ve Shao, Z. (2017). Enhancing Mechanical Properties of Silk Fibroin Hydrogel through Restricting the Growth of beta-Sheet Domains. *ACS Appl Mater Interfaces*, *9*(20), 17489-17498. https://doi.org/10.1021/acsami.7b04623

Sun, M., Li, Q., Yu, H., Cheng, J., Wu, N., Shi, W., Zhao, F., Shao, Z., Meng, Q., Chen, H., Hu, X., ve Ao, Y. (2022). Cryo-self-assembled silk fibroin sponge as a biodegradable

platform for enzyme-responsive delivery of exosomes. *Bioact Mater*, *8*, 505-514. https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.06.017

Suss, P. H., Ribeiro, V. S. T., Motooka, C. E., de Melo, L. C., ve Tuon, F. F. (2022). Comparative study of decellularization techniques to obtain natural extracellular matrix scaffolds of human peripheral-nerve allografts. *Cell Tissue Bank*, *23*(3), 511-520. https://doi.org/10.1007/s10561-021-09977-x

Swanson, L. W. (2000). Cerebral hemisphere regulation of motivated behavior. *Brain research*, *886*(1-2), 113-164.

Thommes, M., ve Cychosz, K. A. (2014). Physical adsorption characterization of nanoporous materials: progress and challenges. *Adsorption*, *20*(2-3), 233-250. https://doi.org/10.1007/s10450-014-9606-z

Tupone, M. G., d'Angelo, M., Castelli, V., Catanesi, M., Benedetti, E., ve Cimini, A. (2021). A State-of-the-Art of Functional Scaffolds for 3D Nervous Tissue Regeneration. *Front Bioeng Biotechnol*, *9*, 639765. https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.639765

Turan Sorhun, D., Kusoglu, A., ve Ozturk, E. (2023). Developing Bovine Brain-Derived Extracellular Matrix Hydrogels: a Screen of Decellularization Methods for Their Impact on Biochemical and Mechanical Properties. *ACS Omega*, *8*(40), 36933-36947. https://doi.org/10.1021/acsomega.3c04064

Uebersax, L., Mattotti, M., Papaloizos, M., Merkle, H. P., Gander, B., ve Meinel, L. (2007). Silk fibroin matrices for the controlled release of nerve growth factor (NGF). *Biomaterials*, *28*(30), 4449-4460. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.06.034

Varma, A. K., Das, A., Wallace, G. t., Barry, J., Vertegel, A. A., Ray, S. K., ve Banik, N. L. (2013). Spinal cord injury: a review of current therapy, future treatments, and basic science frontiers. *Neurochem Res*, *38*(5), 895-905. https://doi.org/10.1007/s11064-013-0991-6

Vepari, C., ve Kaplan, D. L. (2007). Silk as a Biomaterial. *Prog Polym Sci*, *32*(8-9), 991-1007. https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.05.013

Vilaça-Faria, H., Noro, J., Reis, R. L., ve Pirraco, R. P. (2024). Extracellular matrix-derived materials for tissue engineering and regenerative medicine: A journey from isolation to characterization and application. *Bioactive Materials*, *34*, 494-519.

Villanueva-Flores, F., Garcia-Atutxa, I., Santos, A., ve Armendariz-Borunda, J. (2023). Toward a new generation of bio-scaffolds for neural tissue engineering: challenges and perspectives. *Pharmaceutics*, *15*(6), 1750.

Wan, H., Xiang, J., Mao, G., Pan, S., Li, B., ve Lu, Y. (2024). Recent Advances in the Application of 3D-Printing Bioinks Based on Decellularized Extracellular Matrix in Tissue Engineering. *ACS Omega*, *9*(23), 24219-24235. https://doi.org/10.1021/acsomega.4c02847

Wan, J., Jiang, J., Yu, X., Zhou, J., Wang, Y., Fu, S., Wang, J., Liu, Y., Dong, Y., Midgley, A. C., ve Wang, S. (2025). Injectable biomimetic hydrogel based on modified chitosan and silk fibroin with decellularized cartilage extracellular matrix for cartilage repair and regeneration. *Int J Biol Macromol*, *298*, 140058. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.140058

Wang, F., Li, Y., Gough, C. R., Liu, Q., ve Hu, X. (2021). Dual-Crystallizable Silk Fibroin/Poly(L-lactic Acid) Biocomposite Films: Effect of Polymer Phases on Protein Structures in Protein-Polymer Blends. *Int J Mol Sci*, *22*(4). https://doi.org/10.3390/ijms22041871

Wang, X., Rivera-Bolanos, N., Jiang, B., ve Ameer, G. A. (2019). Advanced functional biomaterials for stem cell delivery in regenerative engineering and medicine. *Advanced Functional Materials*, *29*(23), 1809009.

Wang, Y., Rudym, D. D., Walsh, A., Abrahamsen, L., Kim, H. J., Kim, H. S., Kirker-Head, C., ve Kaplan, D. L. (2008). In vivo degradation of three-dimensional silk fibroin scaffolds. *Biomaterials*, *29*(24-25), 3415-3428. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.05.002

Watson, C., ve Kayalioglu, G. (2009). The organization of the spinal cord. In *The spinal cord* (pp. 1-7). Elsevier.

Wiese, S., ve Faissner, A. (2015). The role of extracellular matrix in spinal cord development. *Exp Neurol*, *274*(Pt B), 90-99. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.05.018

Xiao, C. L., Lai, H. T., Zhou, J. J., Liu, W. Y., Zhao, M., ve Zhao, K. (2025). Nrf2 Signaling Pathway: Focus on Oxidative Stress in Spinal Cord Injury. *Mol Neurobiol*, *62*(2), 2230-2249. https://doi.org/10.1007/s12035-024-04394-z

Xu, Z., Tang, E., ve Zhao, H. (2019). An Environmentally Sensitive Silk Fibroin/Chitosan Hydrogel and Its Drug Release Behaviors. *Polymers (Basel)*, *11*(12). https://doi.org/10.3390/polym11121980

Yang, Y., Chen, X., Ding, F., Zhang, P., Liu, J., ve Gu, X. (2007). Biocompatibility evaluation of silk fibroin with peripheral nerve tissues and cells in vitro. *Biomaterials*, *28*(9), 1643-1652. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.12.004

Yazdanpanah, G., Jalilian, E., Shen, X., Anwar, K. N., Jiang, Y., Jabbehdari, S., Rosenblatt, M. I., Pan, Y., ve Djalilian, A. R. (2023). The effect of decellularization protocols on characterizations of thermoresponsive and light-curable corneal extracellular matrix hydrogels. *Sci Rep*, *13*(1), 8145. https://doi.org/10.1038/s41598-023-35202-8

Yilmaz, H. D., Cengiz, U., Arslan, Y. E., Kiran, F., ve Ceylan, A. (2021). From a plant secretion to the promising bone grafts: Cryogels of silicon-integrated quince seed mucilage by microwave-assisted sol-gel reaction. *J Biosci Bioeng*, *131*(4), 420-433. https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2020.11.008

Zhang, X., Liu, F., ve Gu, Z. (2023). Tissue Engineering in Neuroscience: Applications and Perspectives. *BME Front*, *4*, 0007. https://doi.org/10.34133/bmef.0007

Zhao, L., Zhou, Y., Zhang, J., Liang, H., Chen, X., ve Tan, H. (2023). Natural polymer-based hydrogels: From polymer to biomedical applications. *Pharmaceutics*, *15*(10), 2514.

Zheng, H., ve Zuo, B. (2021). Functional silk fibroin hydrogels: preparation, properties and applications. *J Mater Chem B*, *9*(5), 1238-1258. https://doi.org/10.1039/d0tb02099k

Zhou, J., Wu, N., Zeng, J., Liang, Z., Qi, Z., Jiang, H., Chen, H., ve Liu, X. (2023). Chondrogenic Differentiation of Adipose-Derived Stromal Cells Induced by Decellularized Cartilage Matrix/Silk Fibroin Secondary Crosslinking Hydrogel Scaffolds with a Three-Dimensional Microstructure. *Polymers (Basel)*, *15*(8). https://doi.org/10.3390/polym15081868