

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NÖRAL DOKU MÜHENDİSLİĞİ İÇİN DOKU İSKELESİ
TASARIMI VE GELİŞTİRİLMESİ

Tuba BEDİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyomühendislik Anabilim Dalı
Biyomühendislik Programı

Danışman
Doç. Dr. Cem Bülent ÜSTÜNDAĞ

Temmuz, 2020

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NÖRAL DOKU MÜHENDİSLİĞİ İÇİN DOKU İSKELESİ
TASARIMI VE GELİŞTİRİLMESİ

Tuba BEDİR tarafından hazırlanan tez çalışması **30/06/2020** tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı, Biyomühendislik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

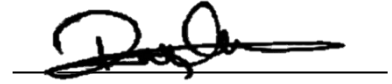
Doç. Dr. Cem Bülent ÜSTÜNDAĞ
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Cem Bülent ÜSTÜNDAĞ, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Rabia Çakır KOÇ, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Oğuzhan GÜNDÜZ, Üye
Marmara Üniversitesi



Danışmanım Doç. Dr. Cem Bülent ÜSTÜNDAĞ sorumluluğunda tarafımca hazırlanan Nöral Doku Mühendisliği İçin Doku İskelesi Tasarımı ve Geliştirilmesi başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Tuba BEDİR

İmza



Aileme

TEŞEKKÜR

Bu çalışmamda engin bilgi ve tecrübelerini, zaman ve mekan gözetmeden her koşulda paylaştan, yol gösterici ve destek olan değerli danışman hocam Doç. Dr. Cem Bülent ÜSTÜNDAĞ'a, sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Çalışmamın yönlendirilmesi ve sonuçlarının değerlendirilmesindeki katkılarından dolayı Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü'ndeki değerli arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam süresince laboratuvarının tüm imkanlarını sunan, değerli bilgi birikimlerini paylaştan ve desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Oğuzhan GÜNDÜZ'e teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmamın her aşamasında yardımını hiç esirgemeyen değerli arkadaşım Songül ULAĞ'a, ihtiyacım olan her anda desteğini hissettiğim Sümeyye CESUR'a, beni her koşulda motive eden Sena SU'ya ve güzel anılar biriktirdiğim tüm Nanoteknoloji ve Biyomalzemeler Uygulama ve Araştırma Merkezi ekibine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Sevgilerini ve desteklerini hayatımın her alanında hissettiğim sevgili aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tuba BEDİR

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	vii
KISALTMA LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ	x
TABLO LİSTESİ	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xv
1 GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.1.1 Omuriliğin Yapısı.....	2
1.1.2 Nöral Doku Mühendisliği	5
1.1.3 Nöral Doku İskeleleri ve Özellikleri	6
1.1.4 Nöral Doku İskelesi Üretim Yöntemleri	8
1.1.5 Nöral Doku Mühendisliği İçin Doğal Polimerler	13
1.1.6 Nöral Doku Mühendisliği İçin Sentetik Polimerler	14
1.1.7 Nöral Doku Mühendisliğinde Destek Hücreleri	18
1.1.8 Büyüme Faktörleri.....	20
1.1.9 Nöral Doku Mühendisliğinde Elektrik Stimülasyonu.....	22
1.2 Tezin Amacı	28
1.3 Hipotez	28
2 GENEL BİLGİLER	30
2.1 Ferroik Özellikler ve Multiferroikler	30
2.1.1 Bizmut Ferrit (BiFeO_3 – BFO).....	33
3 MATERYAL VE METOT	37
3.1 BiFeO_3 Nanopartiküllerinin Sentezi	37
3.1.1 Birlikte Çökeltme Yöntemi İle BiFeO_3 Nanopartiküllerinin Sentezi... 37	
3.2 PLA ve PLA/BFO Çözeltilerinin Hazırlanması	38
3.3 PLA ve PLA/BFO İskelelerinin Tasarımı ve 3B Baskısı.....	39
3.4 Karakterizasyon	40
3.4.1 Partikül Boyutu Analizi (DLS)	40
3.4.2 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM).....	41

3.4.3	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)	42
3.4.4	Termal Analiz (DSC)	43
3.4.5	X-Işını Kırınımı (XRD) Analizi	43
3.4.6	Mekanik Özelliklerin Analizi	44
3.5	Hücre Kültürü	45
3.6	Elektrik Stimülasyon Sisteminin Hazırlanması	45
3.7	3B Basılmış İskelelerde Kültürlenene hADMSC'lere Elektrik Stimülasyonu Uygulanması	46
3.8	Elektrik Stimülasyonu Sonrası 3B Basılmış İskelelerin Floresan Boyanması	48
4	DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA	49
4.1	Karakterizasyon	49
4.1.1	Partikül Boyutu Analizi (DLS)	49
4.1.2	Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)	50
4.1.3	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)	52
4.1.4	Termal Analiz (DSC)	53
4.1.5	X-Işını Kırınımı (XRD) Analizi	54
4.1.6	Mekanik Özelliklerin Analizi	56
4.2	Hücre Canlılığı Analizi	58
4.3	3B Basılmış İskelelerde Hücrelerin Tutunması ve Morfolojisi	59
4.4	3B Basılmış İskelelerde Kültürlenene hADMSC'lere Elektrik Stimülasyonu Uygulanması	60
5	SONUÇ VE ÖNERİLER	62
	KAYNAKÇA	65
	TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	78

SİMGE LİSTESİ

dk	Dakika
rpm	Dakikadaki devir/dönüş sayısı
g	Gram
Hz	Hertz
K	Kelvin
MPa	Megapaskal
μ A	Mikroamper
μ m	Mikrometre
μ s	Mikrosaniye
mA	Miliamper
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mV	Milivolt
nm	Nanometre
N	Newton
s	Saat
°C	Santigrat derece
cm	Santimetre
V	Volt

KISALTMA LİSTESİ

AM	Eklemeli İmalat
3B	3 Boyutlu
BDNF	Beyin Türevi Nörotrofik Faktör
BiFeO ₃ - BFO	Bizmut Ferrit
BMSC	Kemik İliği Türevi Mezenkimal Kök Hücre
CNT	Karbon nanotüp
DLS	Dinamik Işık Saçılımı
DSC	Diferansiyel Tarama Kalorimetresi
ECM	Hücre dışı matris
EDX	Enerji Dağıtıcı X-Işını Spektrometresi
ES	Elektrik Stimülasyonu
ESC	Embriyonik Kök Hücre
FDM	Eriyik Yığılma Modellemesi
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GO	Grafen Oksit
hADMSC	İnsan Adipoz Dokudan Türetilmiş Mezenkimal Kök Hücre
HNO ₃	Nitrik Asit
IGF	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
MSC	Mezenkimal Kök Hücre
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
MTT	Metiltiazol Difenil Tetrazolyum
NGF	Sinir Büyüme Faktörü
NH ₄ OH	Amonyak
NSC	Nöral Kök Hücre
PANI	Polianalin
PCL	Polikaprolakton
PEG	Polietilen Glikol
PLA	Poli-Laktik Asit
PLGA	Poli-Laktit-ko-Glikolik Asit
PPY	Polipirol
PSS	Periferik Sinir Sistemi
SCI	Omurilik Yaralanması

SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SLA	Stereolitografi
UV	Ultraviyole
XRD	X-Işını Kırınımı



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1 Bir nöronun anatomik görünümü ve sinaptik süreçleri.....	2
Şekil 1.2 Omuriliğin anatomisine genel bakış.....	3
Şekil 1.3 Nöral doku mühendisliği bileşenleri.....	6
Şekil 1.4 Nöral doku iskele için tasarım kriterlerinin şematik gösterimi	7
Şekil 1.5 Elektroeğirme düzeneğinin şematik gösterimi.....	9
Şekil 1.6 Çalışma prensiplerine göre üç ana 3B biyoyazıcı teknolojisinin şematik gösterimi: (A) Ekstrüzyon biyoyazıcı (pnömatik, piston, vida); (B) Inkjet biyoyazıcı (termal, piezoelektrik); (C) Lazer-destekli biyoyazıcı.....	12
Şekil 1.7 Elektrik alanının hücre üzerindeki etkisinin ve kalsiyum dinamiğinin şematik görünümü	24
Şekil 1.8 Elektriksel stimülasyon yöntemleri: (A) Doğrudan bağlantı, (B) Kapasitif bağlantı ve (C) İndüktif bağlantı.....	25
Şekil 2.1 Polarizasyon-elektrik alan histerezis döngüleri.....	30
Şekil 2.2 Miknatıslanma-manyetik alan histerezis döngüleri	31
Şekil 2.3 Multiferroik malzemelerin genel sınıflandırması	32
Şekil 2.4 Perovskit yapısında BiFeO ₃	33
Şekil 2.5 BFO sentezleme yöntemleri	34
Şekil 2.6 Birlikte çökeltme metodu ile BFO sentez aşamaları.....	35
Şekil 3.1 Birlikte çökeltme yöntemi ile BiFeO ₃ üretim aşamaları: Bi(NO ₃) ₃ .5H ₂ O ve Fe(NO ₃) ₃ .9H ₂ O çözeltilerinin karıştırılması (a), birlikte çökeltme işlemi (b, c), filtreleme ve yıkama işlemi (d, e), kalsinasyon işleminden sonra elde edilen BiFeO ₃ tozları (f).....	38
Şekil 3.2 SolidWorks programında iskele tasarımı ve tasarlanan iskelenin Simplify programı ile ayarlanan simüle görüntüsü (a), modifiye edilmiş Ultimaker 2+ cihazı (b), biyoyazım işlemi (c), 3B basılmış PLA iskele (d), PLA/BFO kompozit iskele (e), PLA/BFO (hat) iskele	40
Şekil 3.3 BFO partikül boyutu ölçümünde kullanılan cihaz (Partica SZ-100Z, ABD)	41
Şekil 3.4 Taramalı elektron mikroskobu (SEM) (MA-EVO10, ZEISS, Almanya)	41
Şekil 3.5 Kaplama cihazı (SC7620, Quorum, ABD).....	42
Şekil 3.6 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi cihazı (JASCO, FT/IR-4700, Japonya)	42
Şekil 3.7 Diferansiyel tarama kalorimetre cihazı (DSC-60 Plus, Shimadzu, Japonya)	43

Şekil 3.8 X-ışını kırınımı cihazı (Shimadzu – 6100, Japonya)	44
Şekil 3.9 Çekme cihazı (EZ-LX, Shimadzu, Japonya).....	44
Şekil 3.10 Elektrik stimülasyon sistemi: elektrik stimülasyon cihazı (a), Ag/AgCl elektrotları yerleştirilmiş hücre kültür mikropalakası (b).....	46
Şekil 3.11 hADMSC kültürlü 3B basılmış BFO hatlı PLA iskelesine elektrik stimülasyonu için tasarlanan sistemin şematik gösterimi	47
Şekil 4.1 DLS metodu ile BFO partiküllerinin boyut analizi	49
Şekil 4.2 BFO nanopartiküllerinin SEM görüntüleri (a) ve EDX analizi (b)	50
Şekil 4.3 Saf PLA iskelesinin SEM görüntüleri (a) ve por boyutu dağılım grafiği (b)	51
Şekil 4.4 PLA/BFO iskelesinin SEM görüntüleri (a) ve por boyutu dağılım grafiği (b)	51
Şekil 4.5 PLA/BFO (hat) iskelesinin SEM görüntüleri (a) ve por boyutu dağılım grafiği (b)	52
Şekil 4.6 BFO nanopartiküllerinin ve 3B basılmış iskelelerin FTIR spektrumları: BFO (a), saf PLA (b), PLA/BFO (c), PLA/BFO (hat) (d).....	53
Şekil 4.7 BFO nanopartiküllerinin ve 3B basılmış iskelelerin DSC eğrileri: BFO (a), PLA/BFO (hat) (b), saf PLA (c), PLA/BFO (d)	54
Şekil 4.8 BFO nanopartiküllerinin ve 3B basılmış iskelelerin XRD spektrumları: BFO (a), PLA/BFO (b), PLA/BFO (hat) (c), saf PLA (d)	56
Şekil 4.9 3B basılmış PLA (a) ve PLA/BFO (b) iskelelerinin gerilme-gerinim grafiği	57
Şekil 4.10 3B basılmış doku iskeleleri ile kültürlenmiş hADMSC'lerin MTT test sonuçları.....	59
Şekil 4.11 Hücre büyümesinin 7. gününde kültürlenmiş 3B basılmış iskelelerin SEM görüntüleri: PLA (a), PLA/BFO (b), PLA/BFO (hat) (c)	60
Şekil 4.12 48 saat sonunda kontrol (uyarılmamış) ve uyarılmış PLA/BFO (hat) iskelelerinin görüntüleri.....	61

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1 Nöral doku mühendisliğinde doğal polimerler ve hücreler	14
Tablo 1.2 Nöral doku mühendisliğinde sentetik polimerler ve hücreler.....	15
Tablo 1.3 Nöral doku mühendisliğinde karbon nanomalzemelerin uygulamaları	18
Tablo 1.4 Nörotrofik faktörlere nöral yanıtlar	21
Tablo 1.5 Üç ES yönteminin avantajları ve dezavantajları	25
Tablo 4.1 PLA ve PLA/BFO iskelelerinin mekanik özellikleri	58



Nöral Doku Mühendisliği İçin Doku İskelesi Tasarımı Ve Geliştirilmesi

Tuba BEDİR

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Cem Bülent ÜSTÜNDAĞ

Nöral dokularda meydana gelen hasarlar, merkezi sinir sisteminin düşük rejeneratif kapasitesinden dolayı sinir fonksiyonunun kaybına neden olur. Kök hücre temelli tedavi, hasarlı sinirin rejenerasyonunda etkili bir yaklaşım olmasına rağmen bu hücrelerin doğrudan transplantasyonu, kısa süreli hücre sağkalımı ve mevcut nöral doku ile sınırlı entegrasyon gibi problemlere yol açar. Bu durum nöral dokuların hızlı ve tam rejenerasyonunu zorlaştırır. Ayrıca, nöral hasarların tedavisinde hücrelerin lezyon bölgesine yönlendirilmesi de kritik bir süreçtir. Bu problemlerin üstesinden gelebilmek için nöral doku mühendisliği etkili stratejiler sunmaktadır. 3B biyomimetik iskelelerin geliştirilmesi, hasarlı bölgede hücreler için gerekli fiziksel desteği sağlayarak, nöral doku ile daha iyi entegrasyon ve ardından yeni doku gelişimiyle sonuçlanabilir. 3B baskı, mikrometre aralığında ve istenilen yapıda nöral iskelelerin geliştirilmesinde öne çıkan bir teknolojidir. Elektriksel stimülasyon da fiziksel bir faktör olarak sinir rejenerasyon sürecinde büyük potansiyel gösterir. Nöral doku mühendisliği alanına katkı sağlaması amaçlanan bu çalışmada, 3B baskı tekniği kullanılarak poli-laktik asit (PLA) polimeri ve bizmut ferrit (BFO)

nanopartiküllerini içeren doku iskeleleri geliştirilmiştir. BFO nanopartikülleri basit ve düşük maliyetli bir yöntem olan birlikte   ekilme ile sentezlenmiştir. Üretilen BFO tozları ve 3B basılmış nöral iskelelerinin morfolojik, kimyasal, termal, mekanik ve sitotoksik özellikleri incelenmiş ve nöral doku mühendisliğinde kullanım için uygun olduğu g r lm ştir. Ayrıca, elektrik stim lasyonunun 3B basılmış nöral iskelede kültürlenmiş hücreler üzerindeki etkisi araştırılmış ve elektrik stim lasyonunun rasgele dizilmiş hücreleri hizaladığı; BFO nanopartiküllerinin de bu hizalanmış hücrelerin yönlendirilmesinde etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Bizmut ferrit, 3B baskı, nöral doku mühendisliği, elektrik stim lasyonu, hücre yönlendirmesi.



Design and Development of Scaffold for Neural Tissue Engineering

Tuba BEDİR

Department of Bioengineering

Master of Science Thesis

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Cem Bülent ÜSTÜNDAĞ

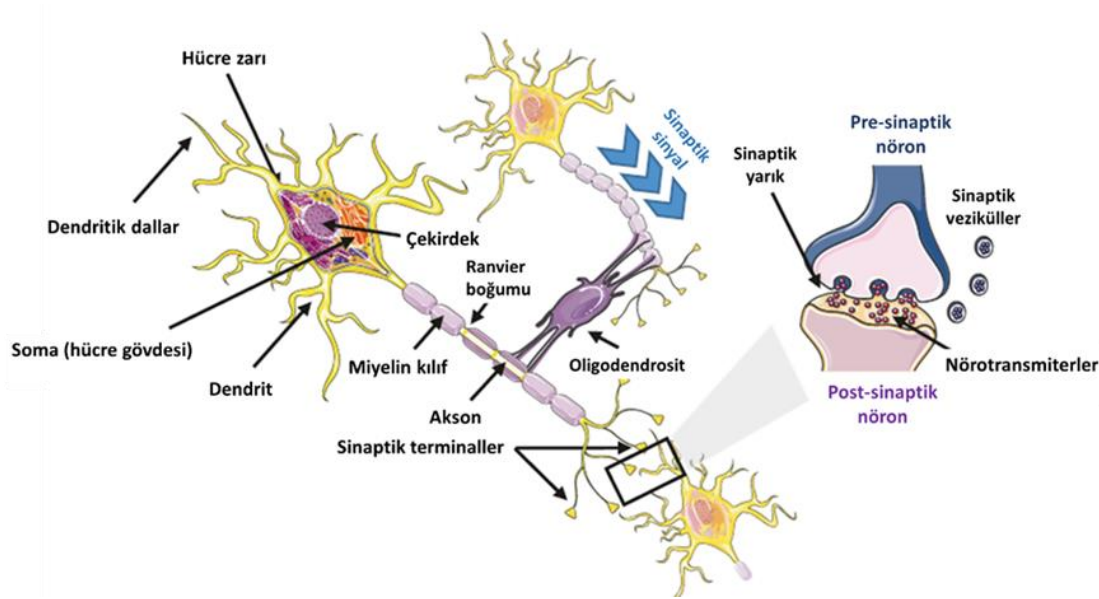
Damage to neural tissues results in loss of nerve function due to the low regenerative capacity of the central nervous system. Although stem cell-based therapy is an effective approach in regeneration of damaged nerve, direct transplantation of these cells causes problems such as short-term cell survival and limited integration with existing neural tissue. This complicates the rapid and complete regeneration of neural tissues. In addition, directing the cells to the lesion area is a critical issue for the treatment of neural damage. Neural tissue engineering offers effective strategies to overcome these problems. The development of 3D biomimetic scaffolds can provide the necessary physical support for cells in the damaged area, resulting in better integration with neural tissue and subsequently new tissue development. 3D printing is a prominent technology for the fabrication of neural scaffolds in the micrometer range and desired structure. Electrical stimulation also shows great potential for the process of nerve regeneration as a physical factor.

In this study, which is aimed to contribute to the field of neural tissue engineering, scaffolds containing poly-lactic acid (PLA) polymer and bismuth ferrite (BFO) nanoparticles were developed using 3D printing technique. BFO nanoparticles were synthesized by co-precipitation, which is a simple and cost-effective method. The morphological, chemical, thermal, mechanical and cytotoxic properties of the produced BFO powders and 3D printed neural scaffolds were characterized and found to be suitable for use in neural tissue engineering. In addition, the effect of electrical stimulation on 3D printed neural scaffold cultured cells were investigated and it was concluded that electrical stimulation aligns randomly sequenced cells and that BFO nanoparticles are effective in directing these aligned cells.

Keywords: Bismuth ferrite, 3D printing, neural tissue engineering, electrical stimulation, cell directing.

1.1 Literatür Özeti

Omurgalılarda sinir sistemi iki ana bölümden oluşur: periferik sinir sistemi (PSS) ve merkezi sinir sistemi (MSS). Beyin, omurilik, optik, koku alma ve işitme sistemlerini içeren MSS, sinyalleri iletir ve yorumlar, ayrıca PSS'ye uyarılar sağlar [1], [2]. PSS, MSS'ye bağlanan kraniyal, omurga ve otonom sinirleri içerir [3]. Sinir sisteminde iki hücre tipi vardır: nöronlar ve nöroglia. Nöronlar sinir sisteminin temel yapısal ve fonksiyonel elementleridir ve bir hücre gövdesi (soma) ve uzantılarından (aksonlar ve dendritler) oluşur. Ganglia olarak bilinen duyu sinir soma kümeleri, omurganın hemen dışında bulunur [1]. Dendritler elektriksel uyarıları nöron hücre gövdesine iletir ve akson, sinyalleri hücre gövdesinden çevre bölgelere, kaslara ve organlara iletir [3]. Nöronlar sinapslar yoluyla diğer nöronlara bilgi aktarırlar. Bir sinaptik öncesi akson, sinaptik sonrası dendrit veya hedef nöronun hücre gövdesi tarafından toplanan nörotransmitterleri serbest bırakır. Nörotransmitterler sinaptik yarık içine salınır ve sinaptik veziküller tarafından taşınır. Nöronların hepsi aralarında ve nöroglia ile birbirine bağlıdır, vücudun homeostazını koruyan ve günlük görevlerin yerine getirilmesine izin verebilecek milyonlarca sinaptik bağlantı kurarlar (Şekil 1.1) [4], [5].



Şekil 1.1 Bir nöronun anatomik görünümü ve sinaptik süreçleri [4]

Glial hücreler veya nöroglia, nöronların işlevine yardımcı olan, PSS'deki Schwann hücrelerini ve MSS'deki astrositleri ve oligodendrositleri içeren destek hücreleridir. Glial hücreler nöronlardan daha fazla miktarda bulunurlar ve mitozla uğrayamayan nöronlardan farklı olarak, hücre bölünme kapasiteleri bir miktar vardır. Nöronlar mitozla bölünemese de kesilmiş bir kısmı yeniden onarabilir veya belirli koşullar altında yeni çıkıntılar oluşturabilir [1], [6].

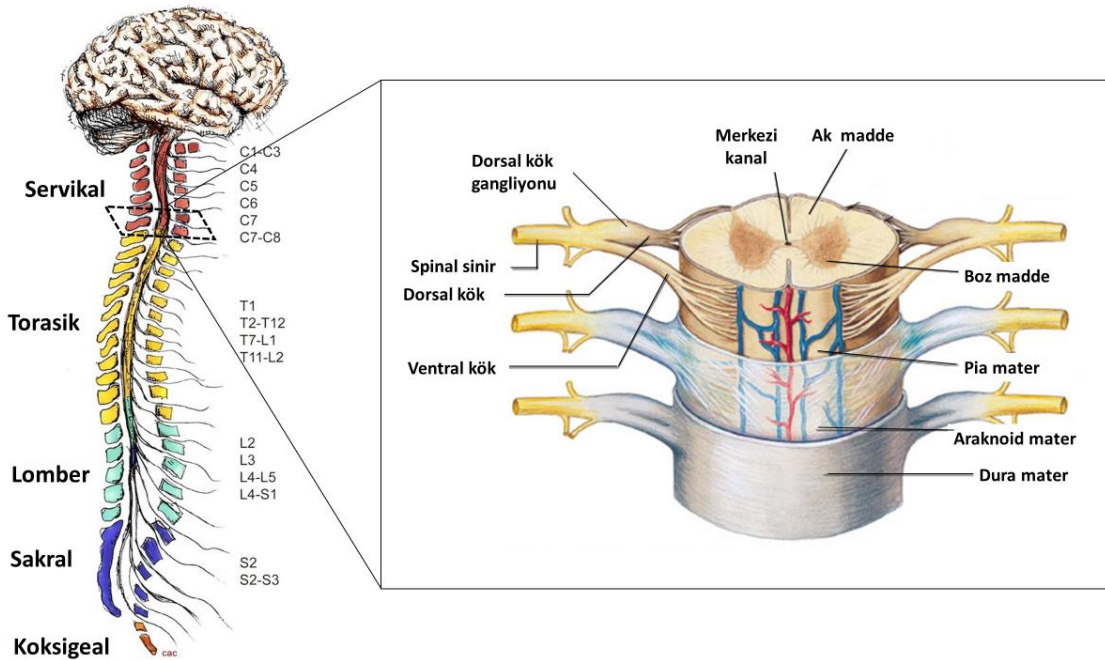
PSS'de bulunan Schwann hücrelerinin kılıfları tüm aksonları sarar. Bu Schwann hücre tabakasının dış yüzeyinde, epitel tabakalarında bulunana benzer bir bazal membran olan nörolemma bulunur. PSS'deki aksonların aksine, MSS aksonları bu bazal membran ve Schwann hücrelerinin kılıfına sahip değildir. Bunun yerine birçok akson, Schwann hücrelerinin (PSS) veya oligodendrositlerin (MSS) hücre zarının ardışık sargılarının yoğun katmanlarından oluşan yalıtıcı bir miyelin kılıf ile çevrilidir. Miyelin kılıf akson boyunca sinir impulsunun yayılma hızını artırır [1], [2].

1.1.1 Omuriliğin Yapısı

Omurilik; servikal, torasik, lomber, sakral ve koksigeal omurga bölgelerinden oluşur. Omuriliğin kesitine bakıldığında üç koruyucu zar ile çevrilidir; bunlar içeriden dışarıya doğru pia mater, araknoid mater ve dura materdir. Omurlar ve koruyucu zarlar tarafından iyi korunan sinirler, kordun her bir tarafından çıkar ve

vücutun sol ve sağ taraflarındaki innervasyon bölgelerine bağlanır. Her bir taraftaki sinirler de köklere bölünür. Ventral kök MSS'den kaslara ve bezlere motor sinyalleri taşırken, dorsal kök MSS'ye gelen duyuşal sinyalleri taşır. Dorsal kök gangliyonları, dorsal kök boyunca bulunur ve duyu nöronlarının hücre gövdelerini içerir (Şekil 1.2) [1].

Omurilik dendritler, aksonlar ve hücre gövdelerinden oluşur. Omuriliğin merkezi, boz madde olarak adlandırılan keşek şekilli bir bölgedir. Bu bölge uyarıcı nöronların hücre gövdelerini ayrıca glial hücreleri ve kan damarlarını içerir. Boz madde, omuriliğin korunmasına ve izole edilmesine yardımcı olan ak madde ile çevrilidir. Ak madde, oligodendrositler, astrositler ve mikroglia (bağışıklık hücreleri) dahil olmak üzere glial hücreler ve aksonlardan oluşur [2]. Oligodendrositler MSS'deki aksonları miyelinlemeye hizmet ederken, astrositler kan-beyin bariyerine katkıda bulunur ve MSS'yi kan proteinlerinden ve hücrelerden ayırır. Aksonlar, omurga kemiğinden çıkan, PSS-MSS geçiş bölgesinden geçen ve PSS'ye giren, fasiküller olarak bilinen, demetler halinde beyaz maddeden çıkıntı yapar. Geçiş bölgesi, MSS'deki glial hücrelerin PSS'dekilerden ayrıldığı tanımlanmış bir bölgedir [1], [7].



Şekil 1.2 Omuriliğin anatomisine genel bakış [8]

1.1.1.1 Omuriliğin Yaralanmaya Yanıtı

Omurilik yaralanması (SCI), beyin ve vücudun geri kalanı arasındaki sinir bağlantılarının kesintiye uğradığı ve yaralanma seviyesinin altında felç ve duyu kaybı ile sonuçlanan henüz etkili bir tedavisi olmayan bir hastalıktır [9]. Periferik sinirlerin yaralanma yanıtının aksine, omurilikte travmatik yaralanmalardan kaynaklanan fizyolojik olayların dizisi, aksonal rejenerasyonu teşvik etmek yerine engellemeye yöneliktir. Omurilik yaralanmasına iki aşamada yanıt gelişir. Olayların birincil veya akut fazı, omurilik dokusunda mekanik kuvvetlerin neden olduğu doğrudan hasardan kaynaklanır [8], [10]. Örneğin kırık bir omur, omuriliğin bir bölümünü ezebilir, sinir hücrelerini yok edebilir, aksonal bağlantıları kesebilir ve lokal vaskülatörü bozabilir [10]. İlk yaralanmadan birkaç dakika sonra, omurilik şişer, kan akışını bozar ve kontrolsüz nöral aktivite dalgaları bölgeye yayılır. Bu olaylar, normalde sıkı bir şekilde düzenlenen iyonik konsantrasyonları bozar, bu da lokal nöral fonksiyon kaybına ve kalan vaskülatürün düzenlenmesine yol açar. Bu birincil olay dizisine yanıt olarak, ikincil yaralanma olaylarının art arda gelişmesi, hücre ölümünü ve doku hasarını ilk yaralanma yerinin ötesine genişletir. Ödem ve iskemik hücre ölümü, vaskülatürün bozulması nedeniyle devam eder. Normalde sinapslar boyunca sinyal iletmek için kullanılan uyarıcı nörotransmitterler, ilk yaralanma sırasında nöronlardan toplu olarak salınır. Ortaya çıkan eksitotoksiste, zararlı serbest radikallerin üretimini tetikler ve ayrıca çeşitli mekanizmalarla hücre ölümüne aracılık eder. Bu olay zincirinde, uyarıcı transmitterler, programlanmış hücre ölüm yollarını (apoptoz) tetikleyen kalsiyum akışına izin vererek, geçirli membran kanallarını açar. İkincil olaylar dizisi rejenerasyonu önleyici engeller oluşturulmasına da katkıda bulunur. Hücre ölümü, kan omurilik bariyeri yoluyla hücrelerin infiltrasyonu ve diğer faktörlerle birleştiğinde yıkıcı bir inflamatuvar yanıtı tetikler. Yerleşik astrositler ve mikrogliya reaktif bir fenotip alır ve nekrotik hücre ölümü bölgesi çevresinde glial skar oluşumuna katkıda bulunur. Bu skar dokusu, yaralanma bölgesi boyunca aksonal rejenerasyonu engelleyen kondroitin sülfat proteoglikanlar (CSPG'ler) gibi büyüme engelleyici faktörler içerir. Diğer büyük büyüme engelleyici bileşenler, hasarlı miyelin kılıflarının içinden maruz kalan çeşitli molekülleri içerir [8], [10], [11]. Yaranın kronik fazında apoptoz demiyelinizasyon, doku atrofisi ve kist oluşumu ile birlikte devam eder. Sonuç

olarak, bu faktörler, lezyon boyunca aksonal yeniden büyüme için engelleyici bir ortam oluşturur. Buna rağmen yaralı MSS aksonlarının uygun bir mikro ortamda yenilenebilecekleri görülmüştür.

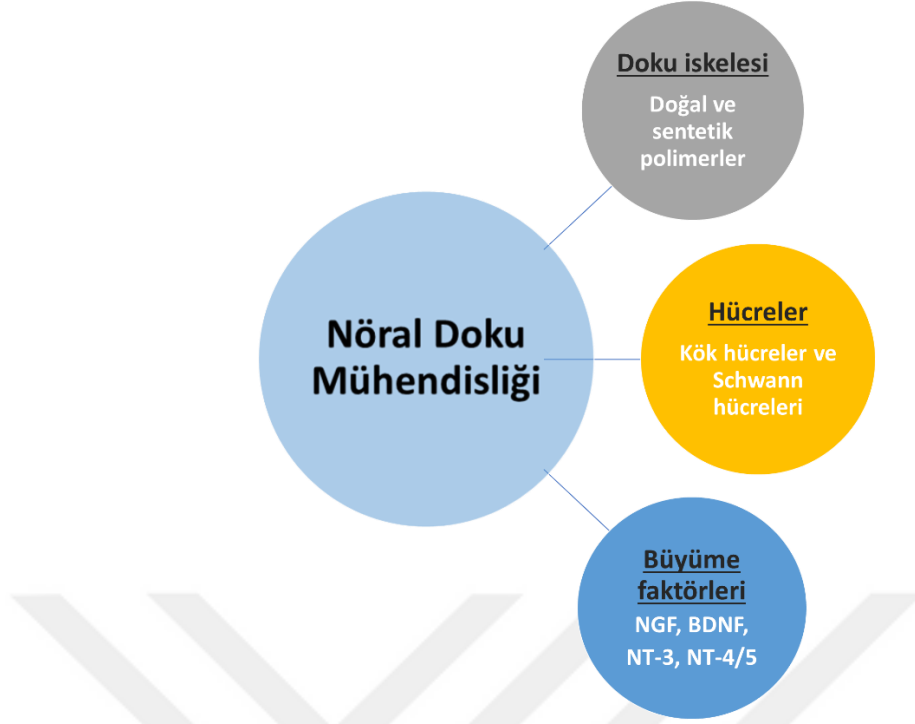
1.1.1.2 Omurilik Yaralanması Tedavisinde Güncel Klinik Yaklaşımlar

Omurilik onarımı ve rejenerasyonu için mevcut tedaviler sınırlıdır. Akut yaralanma olayları ilk hasardan sonra çok hızlı bir şekilde meydana geldiğinden, SCI için uygulanan ana klinik müdahalelerden biri, ikincil yaralanma süreçlerini hafifleten yüksek dozlarda metilprednizolon uygulanmasıdır. Bununla birlikte, bu tedavi mide kanaması, sepsis, pnömoni, akut kortikosteroid miyopati ve yara enfeksiyonu gibi birçok ciddi yan etkiye neden olduğu için tartışmalıdır ve nörolojik iyileşmede çok az ilerleme kaydetmiştir. SCI için kullanılan diğer tedaviler, omuriliği, hipotermiyi, yoğun çok sistemli tıbbi yönetimi ve rehabilitasyon bakımını stabilize etmek için cerrahi operasyon içerir [12], [13]. Birçok klinik tedavinin gelişmesine rağmen, terapötikler yaralı sinir boşluklarının başarılı bir şekilde köprülenmesi ve sinir fonksiyonlarının tam olarak iyileşmesinde fazla ilerleme kaydedememiştir.

1.1.2 Nöral Doku Mühendisliği

Doku mühendisliği; hücre biyolojisi, malzeme bilimi ve mühendisliğin ilke ve tekniklerini birarada kullanarak, hastalık veya yaralanmalardan etkilenen doku veya organın işlevini sürdürmek, onarmak veya iyileştirmek amacıyla doğal dokunun yapısal ve fizyolojik doğasını taklit eden biyolojik ikamelerin geliştirilmesine odaklanmaktadır [4].

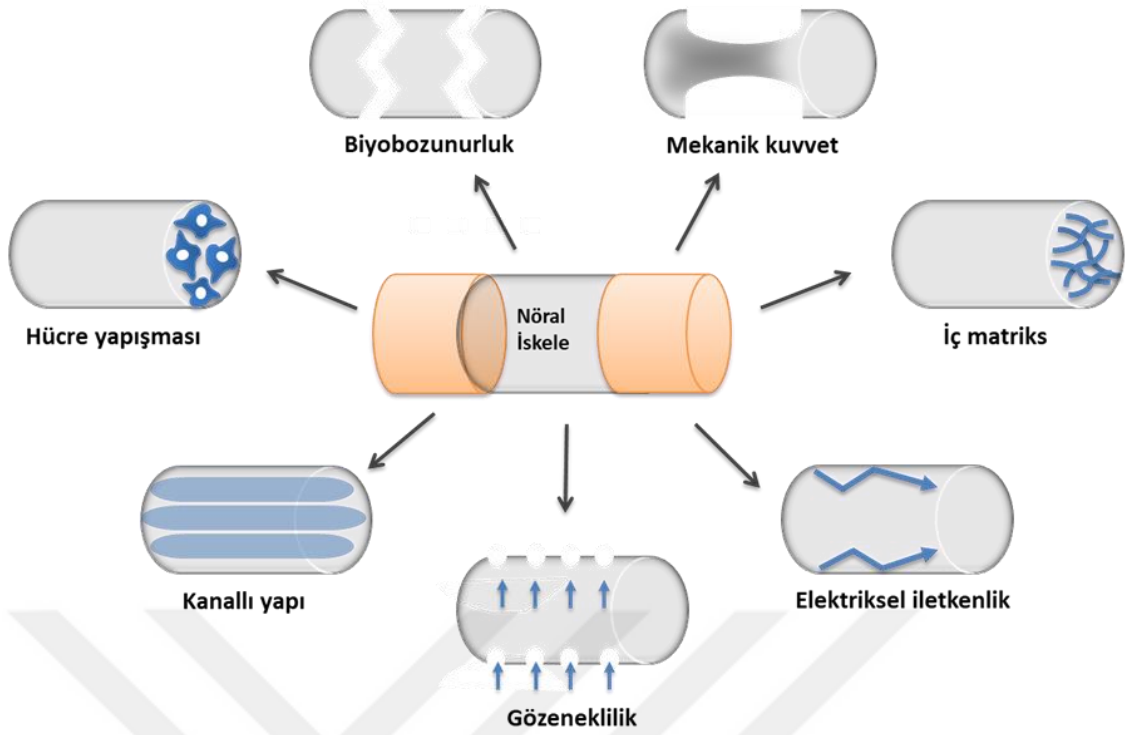
MSS'nin hastalık veya yaralanma sonrası kendini yenilemesi ve onarımı sınırlı olduğundan doku mühendisliğinde kritik zorluk oluşturmaya devam etmektedir. Nöral doku mühendisliği, biyolojik bir iskele, nörotrofik büyüme faktörleri ve uygun hücreleri kullanarak omurilik hasarlarını onarmak için yeni stratejiler geliştirmiştir (Şekil 1.3) [14]. Başarılı sinir rejenerasyonu için fiziksel destek, üç boyutlu (3B) iskele ve iskele benzeri malzemeler tarafından sağlanır. Bu, daha iyi konakçı doku engraftasyonu ve ardından hücre fonksiyonunu kolaylaştırmak için yeni doku gelişimi ile sonuçlanır [15].



Şekil 1.3 Nöral doku mühendisliği bileşenleri

1.1.3 Nöral Doku İskeleleri ve Özellikleri

İdeal olarak bir nöral doku iskelesi aşağıdaki kriterleri karşılamalıdır: (i) biyouyumluluk; iskele, hücre yapışmasını, çoğalmasını ve bağışıklık ve sitotoksik yanıtın yokluğunda farklılaşmayı desteklemelidir, (ii) biyolojik bozunabilirlik; iskele yeni doku oluşumuna çok yakın bir oranda bozunmalı ve sonunda vücuttan atılmalıdır, (iii) iletkenlik; sinirsel iletim sinapta üretilen aksiyon potansiyeline bağlıdır. İskelelerin elektriksel iletkenliği böylece nörit büyümesini ve sinir rejenerasyonunu teşvik edebilir, (iv) uygun mekanik özellikler; iskeleler lezyon bölgesindeki gerilimi artırmamalı veya düzenli hareket sırasında çökmemelidir, (v) gözenekli ara bağlantı; doğal dokunun hücre dışı matrisini (ECM) taklit eden gözenekli bir yapı, hücrelerin iyi uzamsal dağılımına ve besin ve atık alışverişine izin verir [16]. Ek olarak, yaralanmaların köprülenmesi ve sinir rejenerasyonunun kolaylaştırılması amacıyla dokunun geliştirilmiş aksonal yönlendirilmesi için morfolojik ve kimyasal özelliklerin dahil edilmesi teşvik edilir [15]. Şekil 1.4, ideal bir nöral iskelenin sahip olması gereken temel özellikleri göstermektedir.



Şekil 1.4 Nöral doku iskele için tasarım kriterlerinin şematik gösterimi [16]

Hem sentetik hem de doğal kaynaklı polimerler, nörit büyümesi, insan sinir kök hücrelerinin farklılaşması ve sinir boşluğu köprülemesi dahil olmak üzere nöral doku mühendisliğinde başarılı sonuçlar göstermiştir. MSS yaralanmalarının tedavisine yönelik yeni stratejiler arasında polimerik iskeleler, hidrojel, nanopartiküller ve sinir kanalları bulunmaktadır [14].

Periferik sinir greftleri, MSS onarımı için aksonal rejenerasyonun teşvik edilmesinde şu ana kadar ki en etkili stratejidir. Çoklu sinir greftleri, yaralı omurilikte rejenerasyon yollarına izin vermeyen beyaz maddeden izin veren gri maddeye yönlendirmek için kullanılmıştır [17]. Hüresiz kas greftleri, omurilik onarımını kolaylaştırabilen bir başka biyolojik greft kategorisidir. Bir çalışmada kas dokusu omuriliğin lezyon boşluğuna transplante edildiğinde aksonların büyüdüğü ve tüplerin uzunlamasına eksen boyunda yönlendirildiği görüldü. Lamina tüplerinin varlığı, yenilenen aksonların miyelinasıyona da yardımcı olmuştur [18]. Bir dizi fetal doku mini grefti de, omurilikteki lezyon boşluğunu köprülemek için ayrı ayrı veya demet halinde kullanılmıştır. Bu fetal omurilik segmentleri, lezyonlu omurilikteki kayıp doğal dokunun onarımında sadece yapısal bir çerçeve olarak

hizmet etmekle kalmaz, aynı zamanda nörotrofik faktörler üreterek rejenere aksonlara trofik destek sağlar [18].

Hidrojeller de omurilik onarımında kullanılmıştır. Üretim süreci sırasında jelasyon sıcaklığının ve mekanik özelliklerin ayarlanması kolaylığı, doğal omuriliğe mekanik olarak benzeyen ve lezyon bölgesinde düzensiz şekillere uyan hidrojeller üretmeyi mümkün kılmıştır [19]. Örneğin omurilikte lezyon boşluğuna implante edilen aljinat, çevredeki omurilik dokusu ile iyi entegre olmuştur. Makrofajların jele infiltre olduğu ve jel enjeksiyonundan belirli zaman sonra jel ile doldurulmuş lezyon bölgesinin enine kesitinde miyelinli aksonlar görülmüştür [18].

1.1.4 Nöral Doku İskelesi Üretim Yöntemleri

Vücutta, hücreler ve dokular üç boyutlu bir mimaride düzenlenir. Bu fonksiyonel doku ve organların oluşturmada iskelelerin, hücre dağılımını kolaylaştırmak ve büyümelerini üç boyutlu olarak yönlendirmek için farklı metodoloji ile üretilmesi gerekir. 3B iskelelerin üretim teknikleri, geleneksel üretim ve eklemeli imalat (AM) olarak ayrılmıştır [20].

1.1.4.1 Geleneksel Üretim Teknikleri

Geleneksel üretim teknikleri, hücrelerin tutunabilmesi için substratlar gibi gözenekli polimer yapılarının üretimini içerir. Ancak geleneksel yöntemler kullanılarak ayarlanabilir mikro ve makro ölçekli karmaşık yapılar elde etmek zordur [21]. Geleneksel üretim teknikleri elektroegirme, faz ayrımı, gaz köpürme, dondurarak kurutma ve çözücü dökümünü içermektedir.

Elektroegirme

Elektroegirme, nano ölçekli (<1000 nm) veya mikro ölçekli (>1 µm) çaplarda fiberleri üretmek için yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Bu teknikte, bir şırınga pompası, yüksek voltaj kaynağı ve bir toplayıcı gereklidir (Şekil 1.5). İlk olarak, yüzey gerilimi ile kılcal kısmın ucunda tutulan polimer çözeltisi ile doldurulmuş bir kılcal boruya çok yüksek bir voltaj uygulanır. Elektrik alanının uygulanmasından kaynaklanan karşılıklı yük itme, polimer çözeltisi içinde indüklenir. Elektrik alanının yoğunluğu arttığında, yük itme bir püskürtme oluşturmak için yüzey geriliminin üstesinden gelecektir. Son olarak, çıkan polimer çözeltisi püskürtülür ve

The diagram illustrates an electroosmotic flow setup. A power source (Güç kaynağı) is connected to a cylinder (Silindir). A needle (İğne) is positioned near the cylinder, and a syringe (Polimer çözeltisi) is connected to the needle. The setup is used for the electroosmotic flow of polymer solutions.

Faz Ayrımı

Gaz Köpürme

9

Dondurarak Kurutma

Dondurarak kurutma tekniği, gözenekli yapı iskelelerinin üretimi için kullanılır [23]. Bu teknik üç ana aşama içerir: çözelti düşük bir sıcaklıkta ($-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ila $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) dondurulur; dondurulmuş numune, birincil kurutma işlemi olarak bilinen kısmi bir vakum yoluyla basıncın düşürüldüğü (birkaç milibara kadar) bir odaya yerleştirilir. Burada malzeme içindeki buz doğrudan süblimleşme ile uzaklaştırılır ve malzemedeki donmamış suyun çoğı, ikincil bir kurutma işleminde desorpsiyon ile uzaklaştırılır [22].

Çözücü Döküm ve Parçacık Süzme

Bu teknikte, polimer çözeltisini çözmek için belirli bir boyutta düzgün dağılmış tuz parçacıkları ile birleştirilen bir çözücü kullanılır. Çözücü buharlaşarak tuz parçacıkları içeren bir matris bırakılır. Matris daha sonra suya batırılır ve tuz, yüksek gözenekliliğe sahip bir yapı oluşturmak için süzülür. Partikül süzme ile çözücü dökümü sadece ince duvarlı üç boyutlu örneklerin ince zarlarına uyar. Aksi takdirde, çözünür parçacıklar polimer matrisinin içinden ayrılamaz. Bu yöntemle geliştirilen iskeleler %50 ila %90 arasında bir gözenekliliğe sahiptir [24].

1.1.4.2 Eklemeli İmalat (AM)

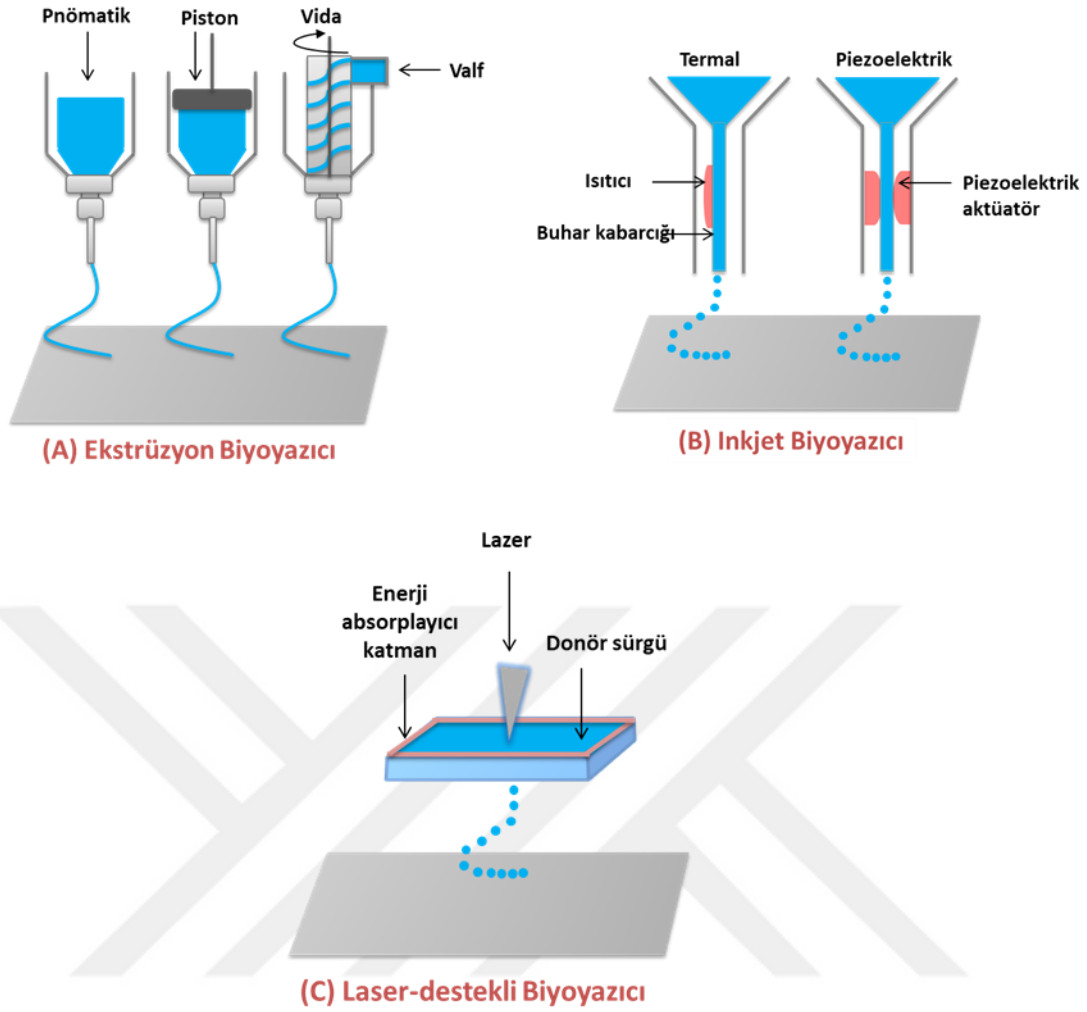
Eklemeli imalat iskele üretim tekniklerinin doku mühendisliğinde potansiyeli yüksektir. Makro ve mikro ölçekli özelliklerin bağımsız kontrolüne ve karmaşık doku fonksiyonları için gerekli olan çok hücreli yapıların üretilmesine izin verir. Klinik görüntüleme verilerini ve 3B üretim tekniklerini birleştirmek, özel iskele üretiminin yanı sıra iskele tasarımlarının seri üretimini de sağlayabilir [25], [26]. Temel AM teknolojileri, genel olarak 3B biyoyazıcı tekniklerini (ekstrüzyon, inkjet, eriyik yığıma modellemesi, stereolitografi) içermektedir.

3B Biyoyazıcı

3B biyoyazıcı teknolojisi, hücrelerin, büyüme faktörlerinin ve farklı biyomalzemelerin katmanlar halinde basılması için eklemeli imalat teknolojilerinin kullanılmasıdır. Bu teknoloji ile doğal doku/organ özelliklerini yüksek oranda taklit eden biyolojik yapılar üretilir. Geleneksek yöntemlere kıyasla, bu teknikle 3B iskelenin boyutu ve şekli kolayca kontrol edilebilir ve hücrelerle birlikte iskeleler

üretilebilir. Bir 3B biyoyazıcı ekipmanı, X-, Y-, Z- eksenli sürücü makinesi, bilgisayar, 3B modelleme yazılımı (CAD ya da CT) ve biyomürekkep içerir. CAD veya CT görüntüleri kullanarak bir tasarım oluşturduktan sonra, bilgisayara bağlı biyoyazıcı ekipmanı bir 3B iskele yapısı oluşturur [16]. Biyomürekkepler, biyoyazıcının önemli bir bileşenidir ve hücreleri kapsüllemek ve biyomolekülleri dahil etmek için kullanılabilen biyomalzemelerden oluşur. Hücre yüklü biyomürekkepler hidrojel bazlıdır. Çünkü hidrojeller, hücre canlılığı ve hücrelerin üretime bağlı kuvvetlerden korunmasında etkili olabilecek yüksek bir su içeriğine sahiptir. Yazdırmadan önce, bir biyomürekkebin çapraz bağlama, viskozite ve jelleşme gibi temel özellikleri dikkate alınmalıdır. Çünkü bu özellikler baskı kalitesi, morfoloji, hücre canlılığı ve proliferasyonu üzerinde önemli bir etkiye sahiptir [27].

Çalışma prensiplerine göre, üç temel 3B biyoyazıcı teknolojisi tanımlanmıştır: ekstrüzyon, mürekkep püskürtmeli (inkjet) ve lazer destekli (Şekil 1.6). Bu teknolojiler arasında, genellikle ticari iki boyutlu (2B) yazıcılardan uyarlanan inkjet biyoyazıcılar, hızlı ve küçük ölçekli ürünler için hücre yüklü sıvı damlaları basabilirken; ekstrüzyon temelli biyoyazıcı, hücre yüklü hidrojeller kullanarak katmanlar halinde büyük ölçekli 3B yapılar oluşturabilir. Lazer temelli biyoyazıcılar ise, güç olarak lazer kullanarak yüksek çözünürlüklü yapıları oluşturabilir [16].



Şekil 1.6 Çalışma prensiplerine göre üç ana 3B biyoyazıcı teknolojinin şematik gösterimi: (A) Ekstrüzyon biyoyazıcı (pnömatik, piston, vida); (B) Inkjet biyoyazıcı (termal, piezoelektrik); (C) Lazer-destekli biyoyazıcı [16]

3B biyoyazıcı yöntemleri arasında inkjet, mikro-ekstrüzyon, stereolitografi ve eriyik yığma modellemesi, nöral doku mühendisliği çalışmalarında daha fazla dikkat çekmiştir.

Eriyik Yığma Modellemesi (FDM)

FDM tekniğinde, 3B bir yapı oluşturmak için termoplastik polimerden yapılan filament kullanılır. Filament, sıcaklık ile yazdırılabilir formu (yarı sıvı durum) elde etmek için nozülde ısıtılır ve platforma ekstrüde edilir [28]. Yüksek sıcaklık kullanıldığı için bu yöntem doğrudan hücre baskısı için uygun değildir. Bu nedenle hücreler, baskı işleminden sonra yapı üzerine kültürlenir. FDM, düşük bir hassasiyete ($\pm 127 \mu\text{m}$) ve yüksek çözünürlüğe ($50\text{-}762 \mu\text{m}$) sahiptir. Bu yöntem için

herhangi bir çözücü gerekli olmadığından, malzemenin üretilmesi ve işlenmesi yolunda kolaylık sağlar. Ayrıca, besleme stoğunu değiştirmek zorunda kalmadan sürekli üretime izin verir [16].

Stereolitografi (SLA)

SLA yöntemi, bir ultraviyole (UV) lazerden oluşur ve lazeri, bir fotobaşlatıcı eklenerek foto-duyarlılaştırılmış bir hidrojel veya reçineye odaklama işlevine sahiptir. UV lazer sıvının katılaşmasını sağlar. Komşu polimer zincirleri arasındaki kovalent bağlar lazer tarafından sağlanan enerji tarafından oluşturulur. 3B yapıdaki katmanlar, platformu sıvı tankına daldırarak ve katmanın yüksekliğine olan mesafeye eşit olacak şekilde hareketini yukarıdan aşağıya doğru değiştirerek elde edilir. SLA, biyoyazıcı için en yüksek çözünürlüğe sahip yöntemdir [16], [29].

1.1.5 Nöral Doku Mühendisliği İçin Doğal Polimerler

Nöral doku mühendisliğinde doğal polimerlerin kullanımı, yüksek biyouyumlulukları ve kimyasal olarak ayarlanabilen özelliklerle beraber doğal biyolojik bozunma kinetikleri nedeniyle oldukça avantajlıdır. Çoğu zaman doğal polimerler, insan vücudunda bulunan maddelere benzerdir ve vücutta implantasyonda sitotoksikite ve immünojenik reaksiyon risklerini en aza indirir [30]. Nöral doku mühendisliğinde doğal polimerler, matris oluşturucular, jelleştirici ajanlar veya ilaç salım düzenleyicileri dahil olmak üzere farklı rolleri yerine getirebilir ve omurilik gibi zor bir fizyolojik geometride bir kusura uyacak şekilde kolayca ayarlanabilir [14], [31]. Ancak, karmaşık kimyasal yapıları nedeniyle zayıf mekanik özellikleri, termal duyarlılıkları ve işleme zorlukları, doğal polimerlerin etkinliğini engeller ve sentetik veya elektroiletken polimerler ile beraber kullanımlarını gerektirir. Nöral doku mühendisliğinde yaygın olarak kullanılan doğal polimerler kolajen, jelatin, hiyalüronik asit, kitosan, kitin, elastin ve aljinattır [14]. Tablo 1.1, nöral doku mühendisliğinde kullanılan ana doğal polimerleri ve birlikte kullanıldığı hücreleri özetlemektedir.

Tablo 1.1 Nöral doku mühendisliğinde doğal polimerler ve hücreler

Polimer	Avantaj	Dezavantaj	Kullanılan Hücreler	Ref.
Kolajen	Çok yönlülük, düşük antijenite, biyouyumluluk, enflamatuar ve sitotoksik yanıt oluşturmaması, iyi su alım kapasitesi, mekanik ve çapraz bağlanma özelliklerini ayarlama yeteneği.	Su alımı üzerine zayıf mekanik ve yapısal stabilite.	Kemik iliği türevi mezenkimal kök hücreler (BMSC) ve Schwann hücreleri.	[32], [33]
Hyalüronik Asit	İyi biyouyumluluk, yüksek su içeriği, güvenilir bozunmuş ürünler, sınırlı immünojenite, viskoelastik özellikler ve yara iyileşmesi, metastaz vb. etkileme yeteneği.	Hücrelerin bağlanmaması ve suda çözünürlüğü.	Fare mezenkimal kök hücreleri (MSC) ve Schwann hücreleri.	[34], [35]
Aljinat	Yüksek biyouyumluluk, yüksek biyobozunurluk, antijenik olmaması, şelatlama özelliği.	Kararsız mekanik özellikler, spesifik hücre tanıma sinyalinin eksikliği.	Nöral kök hücreler (NSC) ve Schwann hücreleri.	[33], [34]
Kitosan	Biyoyumluluk, biyobozunurluk, toksik olmama, mantar, maya ve bakterilerin büyümesinin inhibisyonu ve immünojenik olmayan özellikler.	Kitosanın bazı formları toksik olabilir.	Schwann hücreleri ve BMSC türevli Schwann hücreleri.	[38], [39]

1.1.6 Nöral Doku Mühendisliği İçin Sentetik Polimerler

Nöral uygulamalar için kullanılan sentetik polimerler, biyolojik olarak parçalanabilir veya biyolojik olarak parçalanamaz olabilir. Laktik ve glikolik asit poliesterleri (PLA, PGA) ve bunların kopolimeri PLGA, polietilen glikol (PEG) bazlı hidrojeller gibi biyolojik olarak bozunabilirken, metakrilat içeren biyomalzemeler genellikle biyolojik olarak bozunmaz [31]. Sentetik polimerlerin yüzey modifikasyon teknikleri ile işlevselleştirilmesi ve nörotrofik faktörlerin dahil edilmesi, MSS'ye ilaç salımında ve gen dağıtım araçlarında sentetik iskelelerin kullanımını genişletmiştir [40]. Sentetik polimerler, ıslak eğirme, dondurarak

kurutma ve elektroegirme gibi birçok üretim tekniği ile de uyumludur. Ancak, sentetik polimerlerin kullanımıyla ilgili bazı problemler vardır. Bu polimerler esas olarak toksik olmamasına rağmen tamamlanmamış polimerizasyonun, bozunma ürünlerinin ve plastikleştiricilerin toksik kalıntı monomerlerini bulundurabilir. Bu nedenle, sentetik polimerler kliniğe çevrilmeden önce yoğun ve kapsamlı testler gerektirir [14]. Nöral doku mühendisliğinde kullanılan ana sentetik polimerler ve birlikte kullanıldığı hücreler Tablo 1.2'de özetlenmiştir.

Tablo 1.2 Nöral doku mühendisliğinde sentetik polimerler ve hücreler

Polimer	Avantaj	Dezavantaj	Kullanılan Hücreler	Ref.
Poli-laktik asit (PLA)	Biyobozunur, ultra ince sürekli lifler, yüksek yüzey/hacim oranı, yüksek gözeneklilik, gözenek boyutunun 50-350 nm arasında değişen dağılımı.	Zayıf biyouyumluluk, bozunma sırasında asidik ürünlerin salımı, zayıf işleme kabiliyeti ve bozunma sırasında mekanik özelliklerin erken bozulması.	MSC'ler, NSC'ler ve Schwann hücreleri.	[41], [42]
Poli-laktit-ko-glikolik asit (PLGA)	Biyobozunurluk, toksik olmama ve film oluşturma yeteneği.	Plastik deformasyonu ve uzun süreli gerilime maruz kalmada başarısızlık, bozunmada asidik ürünlerin açığa çıkması.	NSC'ler, NPC'ler ve fare embriyonik fibroblastları.	[32], [43]
Polikaprolakton (PCL)	Biyobozunur, biyouyumlu, yüksek elastikiyete, düşük toksisiteye, iyi mekanik özelliklere ve yavaş degradasyon profiline sahiptir.	Organik çözücülerin kullanımı üzerine sitotoksik etkiler.	Adipoz türevli multipotent Schwann hücreleri, hMSC'ler, NSC'ler ve Schwann hücreleri.	[44], [45]

Tablo 1.2 Nöral doku mühendisliğinde sentetik polimerler ve hücreler (devamı)

Polietilen glikol (PEG)	Yüksek derecede biyouyumlu, biyobozunur, immünojenik olmama, nöro-koruyucu.	Yüksek oranda hidrofilik.	NPC'ler, NSC'ler.	[46]
Poli (2-hidroksietil metakrilat) pHEMA	Aşırı hidrofilik, biyouyumluluk ve düşük sıcaklıklarda polimerize olabilme (-20 °C ile +10 °C arasında).	Biyobozunur olmama.	PC12 hücreleri.	[14]
Polianalin (PANI)	Çok yönlülük, iletken, iyi biyouyumluluk ve artmış nörit büyümesi.	Bozunamama ve kronik inflamasyon.	hMSC'ler, NSC'ler.	[47], [48]
Polipirol (PPY)	İletken, sertlik, iyi biyouyumluluk ve hücre yapışma özellikleri, toksik olmayan, alerjik olmayan, mutajenik olmayan ve hemolitik olmayan özellikleri sergiler.	Çözünmeme, biyobozunmama ve zayıf işleme kararlılığı.	Schwann hücreleri.	[49], [50]

PLA, PGA ve bunların kopolimeri PLGA gibi poli (α -hidroksi asit) polimerleri, nöral doku mühendisliğinde bir dizi farklı biyomedikal uygulama için biyomalzeme olarak kullanılmıştır. Hem PLA hem de PGA in vivo absorbe edilebilir veya hidrolize edilebilir ve bunlar biyobozunurdur. PLA ve PGA, daha önce emilebilir bir dikiş materyali [51] ve yara iyileşmesi için aşılama materyali olarak kullanıldıklarından sinir doku rejenerasyonu çalışmaları için denenen ilk biyopolimerlerdir [52].

PLA, aksonların uzamasına izin veren ve vasküler büyümeyi desteklemek için Schwann hücrelerine destek sağlayan iskelelerin tasarlanmasında ve üretilmesinde başarıyla kullanılmıştır [53]. PLA iskeleleri boyutsal veya yapısal olarak kararsızdır ve çoğu zaman parçalanabilirler. Bu nedenle, PLA veya PGA kopolimerleri mekanik olarak daha güvenilir oldukları için tercih edilmektedir. Nanofibröz PLA bazlı çok kanallı iskeleler, NSC'lerin olgun nöronlara farklılaşmasını in vitro teşvik etmek için

kullanılmıştır [54]. Gelişmiş mekanik özelliklere rağmen, nanofiber mikro yapının çok hızlı bozunduğu gözlemlendi ve doğal bir polimer (jelatin sargı) kullanılarak stabilize edildi [55]. Ayrıca, PPY-PLA fiberlerinin akson yapışmasını, hizalanmasını ve uzamayı arttırdığı gösterilmiştir [56]. Bir çalışmada, PLA nanofibröz iskelesi mezenkimal kök hücrelerle kültürlenmiştir. Farklı nörojenik soylara farklılaşmanın indüklendiği gösterilmiştir [57]. Hizalı elektrospun PLA fiberlerinin nörit uzamasını ve akson rejenerasyonunu rastgele elektrospun fiberlerden daha iyi desteklediği gösterilmiş ancak rasgele ve hizalı fiberlerde NSC farklılaşması aynı sonuçları vermiştir [58].

PLA'nın Schwann hücreleri ve omurilikle emilebilirlik ve biyouyumluluk göstermesinden sonra [53] Miami Üniversitesi grubu tek kanallı Schwann hücresi yüklü iskeleleri kesilen sıçan omuriliğine yerleştirdi. PLA iskelesi yapısal olarak kararsız, parçalanmış ve çökmüştür, ancak aksonların genişlemesini ve vasküler büyümeyi greft içerisine desteklediği kanıtlanmıştır [59]. Başka bir çalışmada, uzunlamasına hizalanmış gözeneklerle yapılan makro gözenekli PLA köpük iskeleleri dondurarak kurutma tekniği kullanılarak üretilmiştir. BDNF, iskele matrisine çözündürüldü, ancak akson sayılarında genel olarak yüksek bir iyileşme göstermedi [60]. Bu çalışma, Schwann hücrelerini, BDNF ve NT-3 aktivitesi ile iki fonksiyonlu bir nörotrofin (D15A) salgılamak için genetik olarak tasarlanmış köpüğe eklenerek genişletildi [61]. Aksonal rejenerasyon 6. haftada normaldi ve iskele yerleştirilmesinin ilk haftasında birkaç Schwann hücresi hayatta kalmıştır [62]. PANI/PLA-PCL elektroaktif elektrospun fiberleri, PC12 hücrelerinin NGF indüklenmiş nörit büyümesini arttırmış ve etkili bir greft materyali olarak sinir rejenerasyonu için büyük bir potansiyel göstermiştir [63].

Karbon nanomalzemeler sinir stimülasyonu ve rejenerasyonu için umut verici adaylar olarak önerilmektedir. Karbon nanoyapılar benzersiz mekanik, elektriksel ve fizikokimyasal özelliklere sahiptir [64]. Özellikle nöral doku mühendisliği esas olarak iletkenlik, esneklik ve biyouyumluluk özellikleri nedeniyle grafen ve karbon nanotüpleri (CNT) kullanır [14]. Tablo 1.3, nöral doku mühendisliğinde grafen ve karbon nanotüplerin uygulamalarını özetlemektedir.

Tablo 1.3 Nöral doku mühendisliğinde karbon nanomalzemelerin uygulamaları

Doku iskelesi	Hücre tipi	Sonuçlar	Ref.
CNT	NSC'ler	Nöral kök hücre çoğalmasını ve erken nöronal farklılaşmayı teşvik etti.	[65]
Grafen oksit (GO)	Nöron	İskele gelişmiş nörit büyümesi ve anjiyojenik restorasyon gösterdi.	[66]
Grafen/PVA/Aljinat	Sıçan glioma hücreleri	Gelişmiş elektriksel ve mekanik özellikler sergiledi. Hücre bağlanması, yayılması ve hücrelerin çoğalmasında artış gözlemlendi.	[67]
Grafen	NSC'ler	Nöral çoğalma, stimülasyon, kök hücrelerin uyarılmış farklılaşması, bozunabilirlik ve implante edilebilir nöronal ağlar gözlemlendi.	[68]
3B yazdırılabilir Grafen/PLGA	hMSC'ler	In vivo çalışmalar, kompozitin en az 30 gün boyunca biyoyumlu olduğunu kanıtladı.	[69]
Grafen, GO and CNT	Fare ESC'leri	Sadece GO, grafen ve CNT'ye kıyasla dopaminerjik nöron farklılaşmasını destekleyebildi.	[70]

1.1.7 Nöral Doku Mühendisliğinde Destek Hücreleri

Periferik sinir hasarlarının onarımında, nöral iskeleler tek başına kullanılarak periferik sinirlerin küçük boşlukları yeniden oluşturulmuş ve başarı sağlanmıştır. Ancak sinir boşluklarının uzunluğu arttığında, destek hücreleri veya büyüme faktörleri dahil edilmedikçe nöral iskeleler tek başına yeterli olmayacaktır. Yaralı sinire implante edilen destek hücreleri, sinir rejenerasyonunu kolaylaştırmak için büyüme faktörleri veya ECM molekülleri üretebilir. Schwann hücreleri, nöral kök hücreler, embriyonik kök hücreler ve mezenkimal kök hücreler, diğerleri arasında en çok çalışılan destek hücreleridir [71].

1.1.7.1 Schwann Hücreleri

Schwann hücreleri, periferik sinir sistemindeki ana glial hücrelerdir ve nöronların fonksiyonları ve hayatta kalmasında önemli bir rol oynamaktadır. Sinir yaralanmasına yanıt olarak, Schwann hücreleri fenotipte hızlı değişiklikler yapar ve bunların bazal laminası, aksonların yeniden büyümesi için bir kanal sağlar [72]. Bu hücreler aynı zamanda sinir büyüme faktörü (NGF), beyin türevi nörotrofik faktör (BDNF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) ve duyuusal sistemdeki eritropoietin ve motor sistemdeki glial türevli büyüme faktörü gibi farklı büyüme faktörleri de üretmektedir [73]. Ek olarak, miyelin birikintisinin başlangıç temizlenmesinde rol alarak fagositoz özelliğine de sahiptir. Bu özellikler Schwann hücrelerini periferik sinir rejenerasyonunda ilk ve en yaygın kullanılan destek hücreleri yapar [74].

1.1.7.2 Embriyonik Kök Hücreler (ESC)

ESC'ler, sınırsız çoğalma ve çeşitli koşullar altında nöronlara farklılaşma açısından büyük potansiyele sahiptir ve bu nedenle sinirsel hasarlar için hücre temelli tedavilerde iyi bir destek hücresi adayıdır. ESC'ler, embriyonik blastosistin iç hücre kitlesinden türetilen farklılaşmamış pluripotent hücrelerdir; sınırsız kendini yenileme kapasitesine ve vücuttaki herhangi bir hücre tipine farklılaşma yeteneğine sahiptir [71]. ESC'lerin farklılaşması, büyüme faktörlerinin uyarılması ile modüle edilebilir. Retinoik asit (RA) ve sinir büyüme faktörünün, nöronal farklılaşmanın güçlü arttırıcıları olduğu ve nörona özgü moleküllerin ekspresyonunu ortaya çıkardıkları bulunmuştur [75].

1.1.7.3 Nöral Kök Hücreler (NSC)

NSC'ler, nöronlar, astrositler ve oligodendrositler dahil olmak üzere sinir sisteminin üç ana hücresel ögesine farklılaşma potansiyeline sahiptir ve sinir yaralanmalarına yanıt olarak sınırsız şekilde çoğalabilir ve hızlı hücresel büyümeye uğrayabilirler. Çok potansiyelli farklılaşma, güçlü plastisite, yüksek göç yeteneği, kolay izolasyon, in vitro kültür ve düşük immünojenite gibi özellikleri, NSC'leri doku mühendisliği yapılmış sinir greftleri için cazip bir destek hücresi kaynağı haline getirir [76].

1.1.7.4 Mezenkimal Kök Hücreler (MSC)

MSC'ler, mezenkimal dokuların yanı sıra epitelyal, endotelyal ve nöronal hücre soylarına farklılaşma potansiyeline sahip multipotent hücrelerdir. Erişkin ve yenidoğan dokusundaki çeşitli kök hücre nişlerinden temin edilir [77], [78], [79]. Erişkin doku kaynakları arasında birincil kaynak olarak, kemik iliği, yağ dokusu, periferik kan ve diş pulpu bulunur. Yenidoğan dokusunda ise amnion, plasenta, göbek bağı ve insan göbek kordonu kanı gibi dokulardan elde edilir [80]. MSC'lerin in vitro elde edilmesi, büyütülmesi ve manipüle edilmesi nispeten daha kolay olduğundan uygun bir hücre adayıdır [81]. MSC'ler daha az immünojeniktir; düşük tümörojenitesi, ESC'lerden ve fetal kökenli kök hücrelerden daha az etik probleme sahip olması nedeniyle otolog veya allojenik hücre kaynağı olarak kullanılabilirler [82]. Kompleks bir dizi faktörün ekspresyonuna dayanarak, MSC'ler beynin nörokorunması ve nörorejenerasyonunu çoklu mekanizmalarla destekler [83]. Bu faktörler, sitokinler ve büyüme faktörleri gibi çözünür sinyalleri ve ECM bileşenleri gibi çözünmeyen faktörleri içerir. MSC transplantasyonu ile inflamasyon, immünomodülasyon da azalma, çevre beyin hücrelerinin korunması ve ayrıca konak anjiyogenezin, nöroogenezin ve sinaptogenezin uyarılması sağlanabilir. İlaveten, MSC'lerin düşük bir yüzdesi, in vivo olarak nöral hücrelere transdiferansiye olabilir ve kayıp nöral dokunun yerini alabilir [84].

1.1.8 Büyüme Faktörleri

Büyüme faktörleri, hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını düzenleyebilen çeşitli hücreler tarafından üretilen proteinler ve polipeptitleri ifade eder. Sinir rejenerasyonu, hücreler, ECM molekülleri ve büyüme faktörleri arasındaki birçok karmaşık etkileşim tarafından modüle edildiğinden, sinir hasar bölgelerindeki büyüme faktörlerinin varlığı, sinir rejenerasyonunda ilgili çeşitli hücre tiplerinin hayatta kalma, çoğalma, göç ve farklılaşmasının kontrolünde hayati bir rol oynamaktadır [71].

Sinir hasarından sonra, sinir hücreleri tarafından salgılanan endojen büyüme faktörlerinin akson rejenerasyonunu destekleyebileceği ancak bu destekleyici etkinin, büyüme faktörleri üretiminde zamanla belirgin bir düşüş göstererek sürdürülemediği gösterilmiştir [85]. Bu nedenle, sürekli ve kontrollü bir büyüme

faktörü ihtiyacı duyulmuştur. Nöral iskele içindeki destek hücreleri tarafından dolaylı olarak sağlanan nörotrofik hareketlerin yanı sıra, eksojen büyüme faktörleri nöral iskeleyle doğrudan eklenebilir ve sinir greftlerinin temel bir bileşeni olarak görev yapabilir.

1.1.8.1 Nörotrofik Faktörler

İstenen bir hücresel yanıt ortaya çıkarmak için hidrojellere nörotrofik faktörler eklenebilir. Epidermal büyüme faktörü (EGF), FGF, HGF, IGF-1, PDGF, VEGF gibi nörotrofik faktörlerin yanı sıra NGF, BDNF, NT-3 ve NT 4/5 içeren nötrofinler etkilerini göstermek için tirozin kinaz reseptörlerine bağlanır. Nötrofinler ayrıca, TNF- α reseptörleri ailesinin bir üyesi olan p75'e bağlanarak etkilerini gösterirler. GDNF, neurturin, persephin ve artemin de dahil olmak üzere diğer nörotrofik faktörler, spesifik olarak glial hücre dizisinden türetilir ve etkilerini GDNF aile reseptörü GFR- α aracılığıyla uygular. Çoğu sinyalleme molekülü gibi, tüm bu nörotrofik faktörler genellikle in vivo peptidazların hızlı proteolizinden dolayı kısa ömre sahiptir. Ancak bu engel, nörotrofik faktörlerin hidrojellere tutunması sayesinde uzun süreli, lokalize olarak taşınması ile önlenir. Bu durum, gelişmiş nöronal hayatta kalma, çoğalma, göç, farklılaşma, akson büyümesi ve sinaptik plastisiteye izin verir. Ayrıca, çoklu nörotrofik faktörleri birleştirmenin karşılıklı etkiler oluşturduğu gösterilmiştir [86]. Nöral doku mühendisliğinde yaygın olarak kullanılan nörotrofik faktörler ve etkileri Tablo 1.4'de özetlenmiştir.

Tablo 1.4 Nörotrofik faktörlere nöral yanıtlar [1]

Nörotrofik faktörler	Desteklenen nöral yanıt
BDNF, NT-3, NT-4/5, CNTF, GDNF	Motor nöron sağkalımı ve büyümesi
NGF, NT-4/5, GDNF	Duyu nöron sağkalımı
NGF, BDNF, NT-3	Duyu nöron büyümesi
NGF, NT-3, CNTF, FGF	Omurilik rejenerasyonu
NGF, NT-3, NT-4/5, CNTF, GDNF, FGF	Periferik sinir rejenerasyonu
NGF, NT-3, GDNF, FGF	PSS-MSS geçiş bölgesinde duyu siniri büyümesi

1.1.9 Nöral Doku Mühendisliğinde Elektrik Stimülasyonu

1.1.9.1 Sinir Hücrelerinin Elektriksel Özellikleri

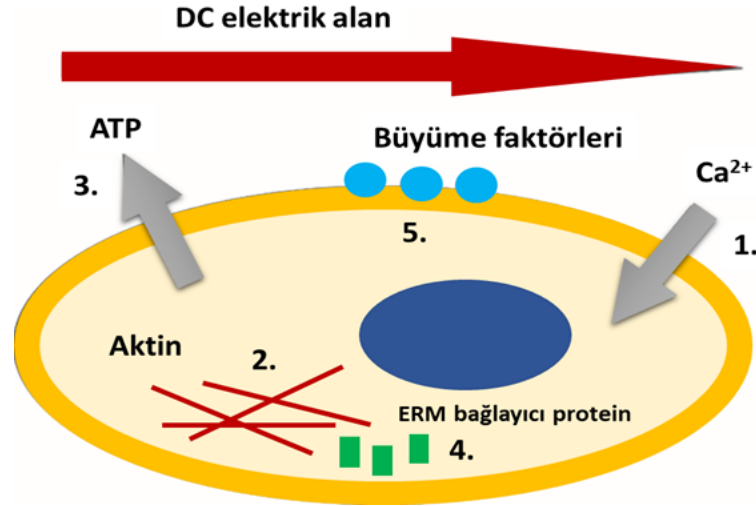
Elektriksel sinyal, sinir fonksiyonuna özgüdür. Tamamen gelişmiş nöronlar, motor fonksiyonları ve duyuşsal algılamayı sağlamak için vücut boyunca elektriksel uyarıların hızlı ve uzun mesafeli iletimini gerçekleştirir. Sinir sinyalleri, hızlı nöronal depolarizasyon kaskadlarını içeren aksiyon potansiyelleri sayesinde hızlı bir şekilde (120 ms^{-1} ye kadar) hareket eder [87]. Nöronlar gibi uyarılabilir hücrelerde bulunan bu özel elektriksel aktivite biçiminin yanı sıra, tüm canlı hücreler iyon akışları ve zar ötesi potansiyellerinin kontrolü yoluyla homeostazı korumak için elektrik sistemleri kullanır. Bu süreçler sinir sinyali iletiminden daha yavaş ve daha uzun zamanda meydana gelir. Na^+ , K^+ , H^+ , Ca^{2+} ve Cl^- gibi iyonlar endojen biyoelektrikliğin temelini oluşturur, ayrıca daha büyük yük taşıyan biyomoleküller de katkıda bulunabilir [88]. Bu yüklü türlerin yönlü hareketi akım üretirken, ayrışmaları elektriksel potansiyel farkı veya voltaj üretir. Endojen olarak üretilen elektrik sinyallerinin sinir sistemi dahil birçok doku tipinin embriyonik gelişimini kontrol ettiği bulunmuştur [89]. Hücre göçü, yara iyileşmesi ve doku rejenerasyonu da endojen elektrik alanları tarafından düzenlenmektedir [87], [88]. Örneğin, omuriliğin büyük ve kalıcı elektrik sinyalleri üreterek hasara tepki verdiği ve uygulanan elektrik stimülasyonunun insan ve diğer memelilerde omurilik onarımını teşvik edebileceği gösterilmiştir [90].

1.1.9.2 Elektrik Stimülasyonu ve Etkileri

Transplante edilen hücreler konakçı dokularda kolayca kaybedildiği ve düşük sağkalım oranlarına sahip olduğu için, doku veya organların hızlı ve tam rejenerasyonu çok zordur [91]. Ayrıca, yara bölgesine göç eden hasarlı hücreler daha ciddi sonuçlar doğuracaktır [92]. Bu nedenle hücre çoğalması, göçü, farklılaşması ve diğer hücresel süreçleri içeren in vitro ve in vivo hücre davranışının manipölasyonu gerekir [93]. Birçok büyüme faktörü ve nörotrofik faktörün hücre farklılaşması ve onarımında önemli bir biyokimyasal rol oynadığı bilinmektedir. Ancak, iskele topografyası ve sertliği, mekanik kuvvetler ve elektrik alanları gibi biyofiziksel faktörler de hücrelerin davranışını ve doku gelişimini etkileyebilir [87], [94].

Biyofiziksel bir faktör olarak, elektrik stimülasyonu (ES), yara iyileşmesi, doku onarımı, embriyogenez, organizmaların yeniden modellenmesi ve büyümesi gibi biyolojik süreçlerde önemli bir rol oynar [95], [96]. Klinik ortamda, sinir, kemik, bağ ve eklem kıkırdağı gibi yaralı dokuların iyileşmesini hızlandırmak için nöromüsküler sistemdeki hasarlı dokuları canlandırmak için elektriksel tedavi uygulanmıştır [96], [97]. Ayrıca, birçok çalışma ES'nin hücre davranışlarını in vitro ve in vivo etkili bir şekilde manipüle edebileceğini göstermektedir. Örneğin, insan MSC'leri, bir aya kadar darbeli elektromanyetik alanlara maruz kaldığında artan proliferasyon ve farklılaşma potansiyeli göstermiştir [98]. Ayrıca, ES, NSC'lerin nörit büyümesini geliştirebilir ve farklılaşmasını da manipüle edilebilir [99]. İnsan vücudunda, stimülasyona maruz kalan her hücre ve lokal biyoelektrik sinyaller çeşitli dokulardaki hücreleri etkiler [100]. ES, hücrelerin kendiliğinden sinyaller iletmelerini tetikler, bunun sonucunda göç, farklılaşma ve proliferasyon gibi doğrudan hücre aktivitelerine destekler. Ayrıca ES, diğer tekniklerle sinerjik olarak kullanılabilir, böylece tüm sürecin maliyetini azaltır [101], [102].

Hücresel düzeyde, bir elektrik alanı (DC veya düşük frekanslı AC) in vitro veya in vivo uygulandığında, hücre düzeyinde bazı durumlar meydana gelir (Şekil 1.7). İlk olarak hücrenin katoda bakan tarafının zarı depolarize edilir ve anoda bakan taraf hiperpolarize edilir. Bu, integrin sinyallerini uyaran voltaj kapılı K^+ kanallarının aktivasyonuna veya katot tarafında Ca^{2+} kanallarının açılmasına ve Ca^{2+} gradyanına neden olan anot tarafında kapatılmasına yol açar. Bu gradyan, Ca^{2+} salımını indükleyebilir ve sitozol kalsiyum konsantrasyonunda aktin hücre iskeletinin parçalanmasına yol açan bir artış vardır. Birkaç hücre tipine bağlı olarak kalsiyum salımlarını düzenler; iyon kanalları, fosfolipaz C (PLC), integrinler ve ATP, hücrelerin kalsiyum dinamiğinde rol oynar [103]. Uygulanan elektrik alanı, hücre içi ATP seviyelerinde azalmaya neden olur, bu da ERM bağlayıcı protein bağlanması inhibe edildiğinde aktin hücre iskeletinin hücre zarından ayrılmasına yol açar. Büyüme faktörleri, elektrik alanı nedeniyle yeniden dağıtılan reseptörlere bağlanır ve bu, aktin polimerizasyonunu tetikler. Sonuç olarak, hücre içi sinyal yolları etkinleştirilir [103], [104].

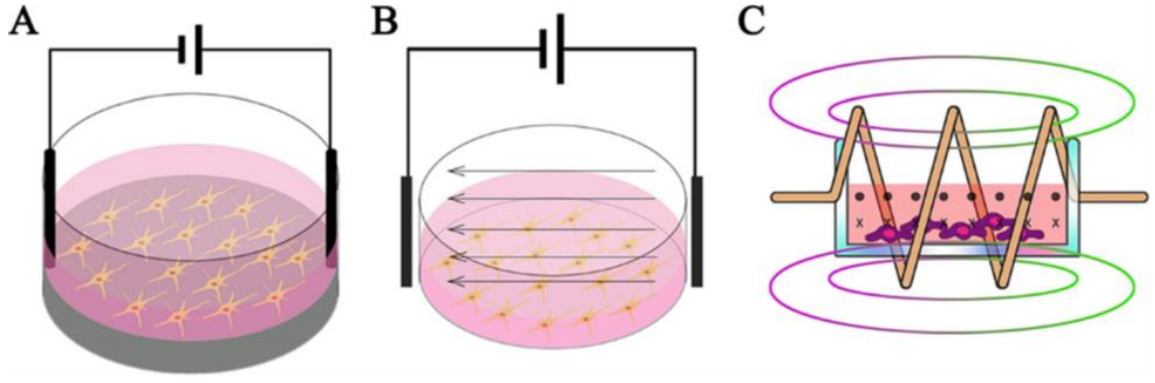


Şekil 1.7 Elektrik alanının hücre üzerindeki etkisinin ve kalsiyum dinamiğinin şematik görünümü [103]

1.1.9.3 Elektriksel Stimülasyon Yöntemleri Ve Parametreleri

ES yöntemleri temel olarak üçe ayrılabilir: doğrudan bağlantı, kapasitif bağlantı ve bir elektromanyetik alan kullanma. Doğrudan bağlantıda, elektrotlar doğrudan kültür ortamına yerleştirilir ve ES'yi vermek için iskeleye bağlanır (Şekil 1.8 (A)). Bu yöntem kolay kullanımı nedeniyle yaygın olarak kullanılır. Ancak elektrodun yetersiz biyoyumluluğu, ortamla temasın sıcaklık artışına, pH değişikliklerine ve zararlı yan ürünlerin oluşmasına neden olması gibi dezavantajları bulunmaktadır [105]. Bir çalışmada, elektrospun PLA/PANI iskelesinde kültürlenmiş NSC'lere uygulanan ES'nin artmış nörit büyümesi sergilediğini gösterilmiştir. Gümüş elektrot ve platin elektrot, ortama yerleştirilen nanofiber iskelenin karşı uçlarına yerleştirildi ve sabit tek kutuplu trapezoidal darbelere bağlandı. Stimülasyon ile NSC'lerden yayılan ortalama nörit uzunluğu, ES olmayanların ortalama uzunluğundan yaklaşık %100 daha yüksekti [106].

Kapasitif bağlantı, doğrudan bağlantıya kıyasla biyolojik olarak daha güvenlidir. Şekil 1.8 (B)'de gösterildiği gibi iki elektrot, iskele üzerine kültürlenmiş hücrelere düzgün bir elektrik alanı sağlamak için karşıt uçlara yerleştirilir. Bu sistem invaziv değildir ve homojen ES sağlamak için iletken bir iskele gerektirmez [107]. İlgili bir çalışmada, kondrositlere 4 mV/cm ES sağlamak için kapasitif bağlantı sistemi kullanılmış, bu hücre proliferasyonunu önemli ölçüde arttırmıştır [108].



Şekil 1.8 Elektriksel stimülasyon yöntemleri: (A) Doğrudan bağlantı, (B) Kapasitif bağlantı ve (C) İndüktif bağlantı [109]

Üçüncü tip bağlantı ise Şekil 1.8 (C)'de gösterildiği gibi indüktif bağlantıdır. İndüktif bağlantı genellikle hücre kültürü sisteminin etrafına yerleştirilmiş, darbeli elektromanyetik alan uyarımı (PEMF) adı verilen iletken bir bobin tarafından üretilen kontrol edilebilir bir elektromanyetik alan kullanır. Uyarı, insan vücudundaki doğal potansiyel aktarımını taklit etmek için darbe ile iletilir [109]. PEMF, hücrelere doğrudan ES uygulamak yerine hedef hücrenin yakınında potansiyel sağlar. PEMF tedavisinin temel dezavantajı zaman ve kaynak tüketimidir. Örneğin, bazı tedaviler için günde 10 saat ya da oldukça yüksek voltaj gerekir [107]. Tablo 1.5, yukarıda belirtilen her bir yöntemin avantajlarını ve dezavantajlarını listelemektedir.

Tablo 1.5 Üç ES yönteminin avantajları ve dezavantajları [107]

Yöntemler	Avantajlar	Dezavantajlar
Doğrudan bağlantı	Kolay operasyon.	Elektrotun yetersiz biyouyumluluğu, ortamla temasın sıcaklık artışına, pH değişikliklerine ve zararlı yan ürünlerin oluşumuna yol açması.
Kapasitif bağlantı	Biyolojik olarak daha güvenli.	Elektrotlar arasında yüksek voltaj, daha uzun işlem süresi.
İndüktif bağlantı	İnsan vücudundaki doğal potansiyel aktarımını taklit eder, hücrelere doğrudan temas etmez.	Beklenmedik bir bölgede tümör oluşumu, zaman ve kaynak tüketimi.

ES'nin farklı parametreleri, hücre davranışını düzenlemek için oldukça önemlidir. ES, dalga formunun darbe, sinüzoidal, kare, üçgen ve testere dişi desenine sahip olduğu monofazik ve bifazik formda olabilir. Kesik kesik veya sürekli stimülasyon kullanımı başka bir parametredir. Stimülasyon parametrelerine göre monofazik stimülasyon, hedef dokunun polarize edilmesinde etkilidir, ancak bir metal elektrodun yüzeyindeki Faradaik reaksiyonu nedeniyle oksidasyon-indirgeme işlemi yoluyla reaktif oksijen türleri oluşturabilir [110]. Özellikle uzun süreler veya yüksek frekanslarda iletilen büyük akım darbeleri durumunda, Joule ısıtma etkisinden hücre hasarı oluşabilir [111]. Aksine, bifazik stimülasyon, yük birikimini önlediğinden, elektrotlarda daha düşük seviyelerde elektroliz ürünleri ürettiğinden ve daha geniş periyotlarda ve daha yüksek voltajlarda uygulanabildiğinden daha avantajlı olabilir [112]. Örneğin az yük birikimi ve toksik yan ürünler nedeniyle nöral dokuyu uyarmak için klinik uygulamada genellikle bifazik stimülasyon tercih edilir ve nöronal kayıp olasılığı daha düşüktür. Monofazik stimülasyon ise kısa süreli deneyler için kullanılabilir, ancak uzun süreli uygulamalar bifazik stimülasyon gerektirir [107].

1.1.9.4 Elektriksel Stimülasyonun Hücre Hizalanması ve Göçüne Etkileri

Yönlendirilmiş hücre göçü ve hizalaması doku oluşumu, doku rejenerasyonu ve yara iyileşmesine katkıda bulunarak rejeneratif tıp için etkili olabilir [113]. Hücre hizalaması ve göçünün içerdiği voltaj geçişli iyon kanalları, G-protein birleştirme reseptörleri, integrinler, hücre polarizasyonu ve endojen elektrik alanları gibi mekanizmaların bu etkilerden sorumlu olduğu düşünülmektedir [114]. Yönlendirilmiş hücre göçü, hedefin yaralı sinir boşlukları boyunca nöronları yönlendirmek ve hücreleri desteklemek olduğu nöral doku mühendisliğinde özellikle önemlidir.

ES, hücre hizalaması üzerinde önemli bir etkiye sahiptir ve rastgele hücreleri hizalanacak şekilde yönlendirir, ES'nin yönü değiştikçe hücre hizalama yönü kademeli olarak değişir [115], [116]. Kardiyak yağ dokusundan türetilen progenitör hücreler, endotel progenitör hücreler, vasküler endotel hücreler, BMSC'ler, adipoz türevi stromal hücreler gibi bazı hücre tipleri, elektrik alan vektörlerinin yönüne dik

olarak hizalanır. ES hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesini sağladığı için ventriküler miyositler, kardiyomiyositler, miyoblastlar, PC-12 hücreleri, osteoblastlar gibi bazı hücreler ise alan vektörlerine paralel olarak hizalanır [107]. ES yoğunluğu genellikle <10 V/cm'dir ve ES yoğunluğu arttıkça hücreler daha iyi hizalanmış, ancak hücre aktivitesi nispeten azalmıştır [108], [109] .

Hücre hizalamasının yanı sıra ES, hücre göçünde önemli bir rol oynar. ES'ye yanıt olarak hücrelerin yönlü yer değiştirmesine elektrotaksis denir [118]. ES'nin hücre göçü üzerindeki yol gösterici etkisi de hücre tipine bağlı olarak değişir. NSC'ler, makrofajlar, fare nöral öncü hücreleri, osteoblastlar, endotelial progenitör hücreler katoda doğru iken, BMSC'ler ve insan dermal fibroblastları anoda doğrudur. ES polaritesinin ters çevrilmesi hücrelerin göç yönünü tersine çevirdi [117], [119]. ES yoğunluğu, hücre göçünü minimum 0.1 V/cm'den maksimum 12 V/cm'ye uyarabilir ve hücrelere önemli bir zarar vermez, hücre fenotipini veya farklılaşma potansiyelini etkilemez [120]. Aynı zamanda, daha yüksek ES kuvveti ile hücreler gittikçe artan göç hızı ve mesafe göstermiştir [120], [121]. Fizyolojik seviyenin üzerinde olan 1 V/cm ile 10 V/cm aralığında ES'nin insan BMSC'lerinin göç oranını arttırdığı gösterilmiştir. Bu davranış transplante edilen hücrelerin lezyon bölgesinde tutulması için gerekli olabilir [121], [122].

1.1.9.5 Elektriksel Stimülasyonun Hücre Çoğalması ve Farklılaşması Üzerine Etkileri

ES, hücre çoğalmasını etkilemede ve farklılaşmasını yönlendirmede de önemli bir rol oynamaktadır [123], [124]. Rejeneratif tıpta karşılaşılan en büyük zorluk, yaralanma veya hastalık sonucu kaybedilen hücreleri karşılamaktır [125]. Örneğin, aşırı hücre kaybından sonra, çoğu doku kalpteki fibröz kollajen skarlar gibi izler üretir, bu da iskemik bir ortama neden olur ve oksijen iletimini sınırlar [126]. Ayrıca implantasyon için yeterli hücrelerin toplanması da büyük bir zorluktur. Bu durumlarda, tohum hücrelerinin çoğalması ve çok satırlı farklılaşma yetenekleri çok dikkat çekmiştir [127].

Uygun ES, genellikle <1 V/cm sürekli stimülasyon altında hücre çoğalmasını teşvik edebilir [128]. ES yoğunluk aralığında, hücre proliferasyon hızı artan yoğunluk ile artar [129]. >100 V/cm'lik yüksek yoğunluklu ES, kısa sürede (<1 ms) tek bir

stimölasyonda hücre proliferasyonu için uygundur, ancak aşırı yüksek yoğunluk hücre ölümüne yol açar [107]. Zhu ve diğ., kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, NSC'lerin proliferasyonunun ES ile (100 μ A ve 24 s koşullarında) %35 arttığını ortaya koymuşlardır [130].

1.2 Tezin Amacı

Nörodejeneratif hastalıklar veya fiziksel yaralanmalar merkezi sinir sistemi fonksiyonunun kaybına neden olur. Sinir yenilenmesi, MSS'nin düşük rejeneratif kapasitesi ve karmaşıklığı nedeniyle zorlu bir klinik süreçtir. Kök hücre temelli tedavi, hasarlı sinirin rejenerasyonunda umut verici bir yaklaşım olmasına rağmen, bu hücrelerin doğrudan transplantasyonu, kısa süreli hücre sağkalımı ve konakçı doku ile sınırlı entegrasyon gibi problemlere neden olduğundan, nöral dokuların hızlı ve tam rejenerasyonunu zorlaştırmaktadır. Bunun dışında, nöral hasarların onarımında hücrelerin spesifik bölgelere yönlendirilmesi ve manipüle edilmesi de kritik bir sorundur. Bu noktada nöral doku mühendisliği yaklaşımıyla istenilen yapısal özelliklerde, doğal hücre dışı matrisi taklit eden, biyoyumlu, biyobozunur, elektroaktif 3B nöral iskelelerin geliştirilmesi, hasarlı bölgede hücreler için gerekli fiziksel desteği ve konakçı doku ile daha iyi entegrasyonu sağlayarak yeni doku gelişimiyle sonuçlanabilir. Ayrıca, elektriksel stimölasyon uygulanmasıyla da bu hücrelerin davranışı düzenlenerek hasarlı bölgede daha hızlı iyileşme sağlanabilir.

Bu tez çalışmasında 3B baskı tekniği kullanılarak bizmut ferrit (BFO) nanopartiküllerini içeren nöral doku iskelelerinin geliştirilmesi ve bu iskelelerin mezenkimal kök hücrelerle kültürlenerek biyoyumluluğunun değerlendirilmesi hedeflenmekte; ayrıca elektrik stimölasyonu uygulanarak, BFO nanopartiküllerinin varlığında, hücrelerin nöral iskele üzerinde davranışının belirlenmesi amaçlanmaktadır.

1.3 Hipotez

Sinir hücrelerinin içsel elektroaktivitesi nedeniyle, nöral doku mühendisliğinde elektroaktif malzemelerin kullanımı elektrik stimölasyonu uygulamasında önemlidir. Çünkü elektroaktif biyomalzemeler elektrik uyarınının lokal olarak taşınmasına izin verir, sinir hücresi büyümesi ve doku onarımı için fiziksel bir

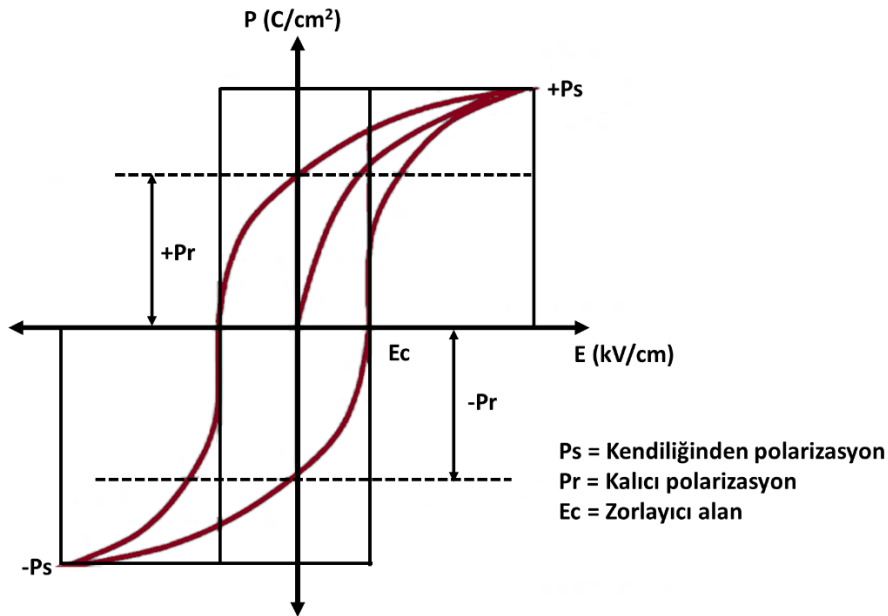
kılavuz sağlar ve stimölasyon seviyelerinin ve süresinin dışardan kontrolüne izin verir. Mekanik desteği, iletkenliği ve biyouyumluluğu arttırmak için polimerleri iletken nanopartiküller ile birleştirmek malzemelerin işlevlerini gerçekleştirmesinde etkili stratejilerden biridir [131]. Bu bağlamda, çalışmada iletken malzeme olarak BFO tercih edilmiştir. BFO nanopartikülleri, basit ve düşük maliyetli bir yöntem olan birlikte çökelme ile üretilmiş ve hücreleri elektrik stimölasyonunun etkisinde yönlendirmek amacıyla nöral iskelelere dahil edilmiştir.

Nöral iskelede ana malzeme olarak biyouyumluluğu, biyobozunurluğu ve nöral doku mühendisliği için uygun bir hücre ortamı oluşturmaları nedeniyle poli-laktik asit (PLA) kullanılmıştır. Geleneksel yöntemlere kıyasla, iskele şekil ve yapısının kolayca kontrolünü sağlayan, 3B baskı tekniği kullanılarak nöral iskeleler geliştirilmiştir. Üretilen 3B basılmış iskelelerin biyouyumluluğunu değerlendirmek için insan adipoz dokudan türetilmiş mezenkimal kök hücreler (hADMSC) kullanılmıştır.

Elektrik stimölasyonunun, yara iyileşmesindeki rolü ve farklı hücre tiplerinin çoğalmasını, farklılaşmasını ve göçünü uyarmada etkili olduğu doğrulanmıştır. Bu çalışmada elektrik stimölasyonunun etkisiyle, hücrelerin iskele üzerinde BFO nanopartiküllerine yönelim göstereceği öngörülmektedir. BFO nanopartiküllerinin varlığının, sinir dokusunun onarımı için nakledilen hücreleri lezyon bölgesine yönlendirilmesinde etkili olacağı düşünülmektedir.

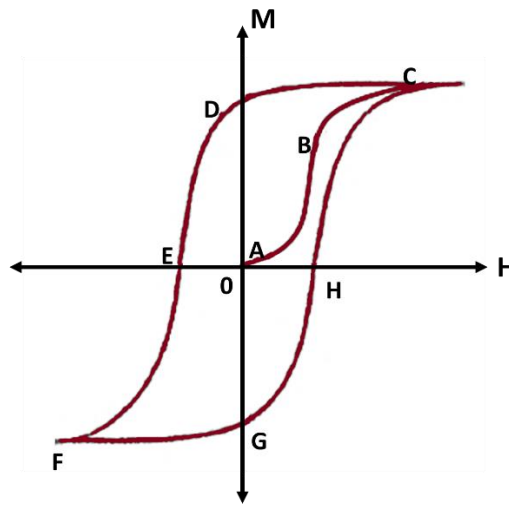
2.1 Ferroik Özellikler ve Multiferroikler

Ferroelektrik malzemeler sıcaklığa bağlı bir düzene sahiptir. Spesifik bir sıcaklık bölgesinde, merkez-simetrik faz (kübik faz), eşkenar dörtgen, ortorombik veya dörtgen faz gibi merkez-simetrik olmayan faza dönüştürülür. Paraelektrikten ferroelektriğe bu geçiş sıcaklığına Curie sıcaklığı (T_c) denir. Ferroelektrik malzemelerin tanımlayıcı bir özelliği, Şekil 2.1'de gösterilen polarizasyon elektrik alan (P-E) histerezis döngüsünden gelir. Polarizasyon, ferroelektrik malzemeye alternatif bir elektrik alanı uygulanarak değiştirilir. Kendiliğinden polarizasyon, büyük bir pozitif (+PS, -PS) değerinde doymuş polarizasyondan tanımlanır. Bu durumda, ferroelektrik alanlar polarizasyon yönüne hizalanır. Kalan polarizasyon, sıfır dışında elektrik alandaki polarizasyondan belirlenir. Sıfır polarizasyon durumuna ulaşmak için alan ters çevrilmelidir. Bu alan değerine zorlayıcı alan denir [132].



Şekil 2.1 Polarizasyon-elektrik alan histerezis döngüleri [132]

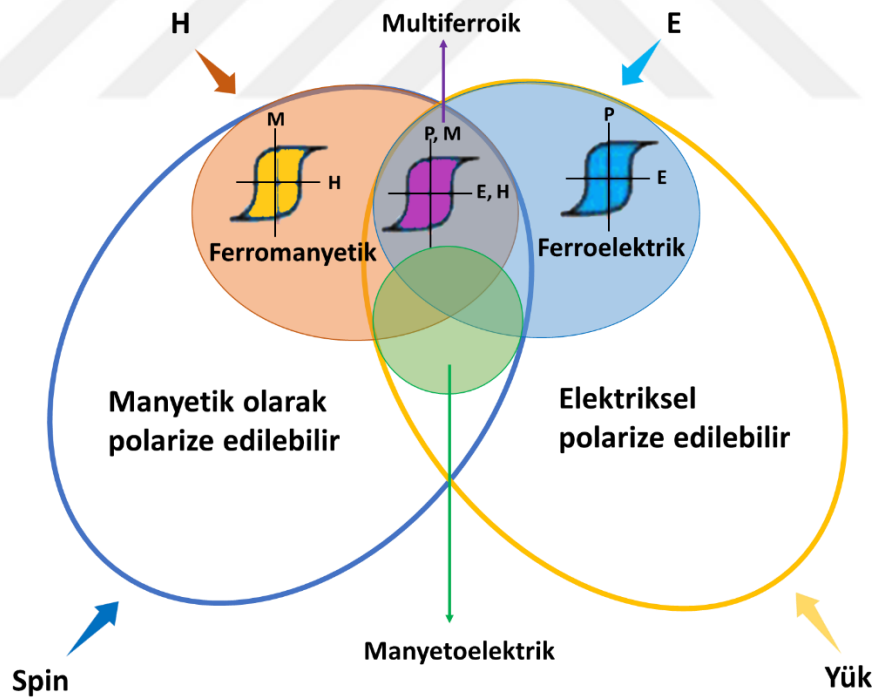
Ferromanyetik malzemeler geçiş (Ni, Co, Fe) ve nadir toprak (Sm, Nd) metal elementleri içerir. Geçiş elemanları, paralel dönme hizalaması için pozitif bir değişim integrali oluşturan uygun atomlar arası mesafeye ve d orbital yarıçapa sahip eşlenmemiş elektronlar içerir. Ferromanyetik (ferrimanyetik) malzemelerin manyetik alan bağımlılığını histerezis dğüsü gösterir (şekil 2.2). Manyetik olmayan durumdan başlayarak ($H = M = 0$) tipik bir ferromagnet için, manyetizasyon, 0ABC doğrusal olmayan izini takip eden uygulanan alanla artar ve doygunluk durumuna (M_s) ulaşır. Ham eğri olarak adlandırılan eğri 0ABC boyunca, küçük bir başlangıç kısmı 0A tersine çevrilebilir, burada dış alan çıkarıldığında mıknatıslanma sıfıra dönebilir. A noktasının ötesinde, mıknatıslanma değişimi geri döndürülemez hale gelir. Harici bir alan, pozitif ve negatif doygunluk alanları arasında değiştiğinde, ferromanyetik mıknatıslanma, CDEFGHC'de gösterildiği gibi histerezis dğsn gösterir. Tipik bir histerezis dğs için, mıknatıslama normalde $H=0$ 'da sıfır değildir (D, G), sıfır alanındaki mıknatıslanmanın büyüklüğü kalan mıknatıslanma (M_r) olarak adlandırılır. Manyetizasyonun sıfıra eşit olduğu alanın değerine, aynı zamanda histerezis dğsnn yarım genişliği olan zorlayıcı alan (H_c) denir. Ferromanyetizma, sıcaklığa bağlı olan elektron-elektron etkileşiminden gelir. Manyetik bir materyalin doyma mıknatıslanması sıcaklığa bağlıdır. Ferromanyetik bir materyalin M_0 olarak tanımlanan mutlak sıfır derecelerde doyma mıknatıslanmasıyla, yüksek bir M sıcaklığında doymuş mıknatıslanma azalacaktır [132].



şekil 2.2 Mıknatıslanma-manyetik alan histerezis dğleri [132]

Multiferroikler

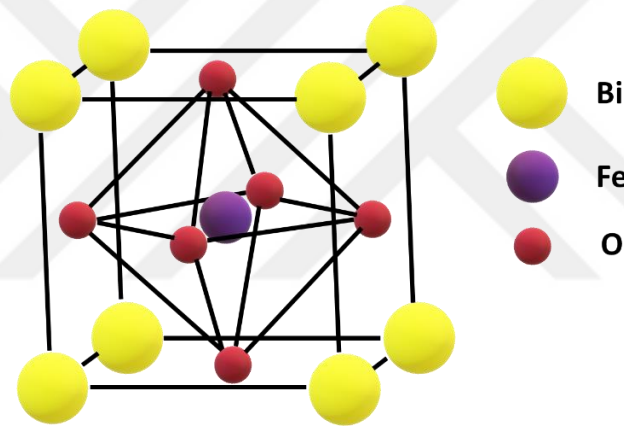
Multiferroikler; birleştirilmiş elektrik, manyetik, mekanik ve yapısal özelliklerin bir sonucu olarak ferroelektriklik, ferromanyetizma, ferroelastisite vb. etkileri eşzamanlı sergileyen çok işlevli bir malzeme sınıfıdır (Şekil 2.3) [133]. Bu malzemeler, dış elektrik alanının mıknatıslanmayı değiştirmesini ve bunun tersini mümkün kılan manyetoelektrik etki olarak bilinen, ferroelektriklik ve manyetizma arasında bağlantı gösterme potansiyeline sahiptir. Bu tür sistemler doğada nadirdir ve örnekler BiFeO_3 , BiMnO_3 ve YMnO_3 gibi perovskit oksitlerde bulunabilir. BiFeO_3 günümüzde oda sıcaklığında multiferroikliği nedeniyle çok daha fazla ilgi görmüştür. Elektrik polarizasyonu ile manyetik moment arasındaki birleşme nedeniyle verilerin elektrikle yazılmasına ve daha sonra manyetik olarak okunmasına izin verebilecek bu tür malzemelerin yeni nesil cihazların temeli olacağı öngörülmektedir. Spintronik cihazlarda, sensörlerde, çoklu durum hafıza elemanlarında, elektrikle kontrol edilebilen ferromanyetik rezonans cihazlarında ve manyetik olarak modüle edilmiş piezoelektrikli transdüserlerde bulunabilir [134].



Şekil 2.3 Multiferroik malzemelerin genel sınıflandırması

2.1.1 Bizmut Ferrit (BiFeO_3 – BFO)

Perovskit bizmut ferrit (BiFeO_3 -BFO), polar $R3c$ uzay grubu ile eşkenar dörtgen biçimsiz bir hücreye sahip tek fazlı en önemli multiferroik malzemelerden biridir (Şekil 2.4) [135]. Bu perovskit BFO oda sıcaklığında aynı anda güçlü ferroelektriklik ve zayıf G-tipi antiferromanyetizma gösterir [136]. Ferroelektrik Curie sıcaklığına $T_C=1103$ K ve antiferromanyetik Neel sıcaklığına $T_N = 643$ K sahiptir. 62 nm'lik uzun bir frekansa sahip manyetik sikloidal spin yapısından dolayı oda sıcaklığında zayıf ferromanyetizma sergiler [137]. Ferroelektriklik ve manyetizma geçiş metali iyonlarının d kabuklarının farklı doldurma durumları ile ilgilidir. Boş d kabukları esas olarak ferroelektrikte bulunurken, manyetizmada kısmen doldurulmuş d kabukları gereklidir. Bi^{3+} ün yalnız elektron çifti ferroelektrikliğe ve Fe^{3+} iyonlarının kısmen doldurulmuş 3d yörüngesi G-tipi antiferromanyetizmaya neden olur [138].



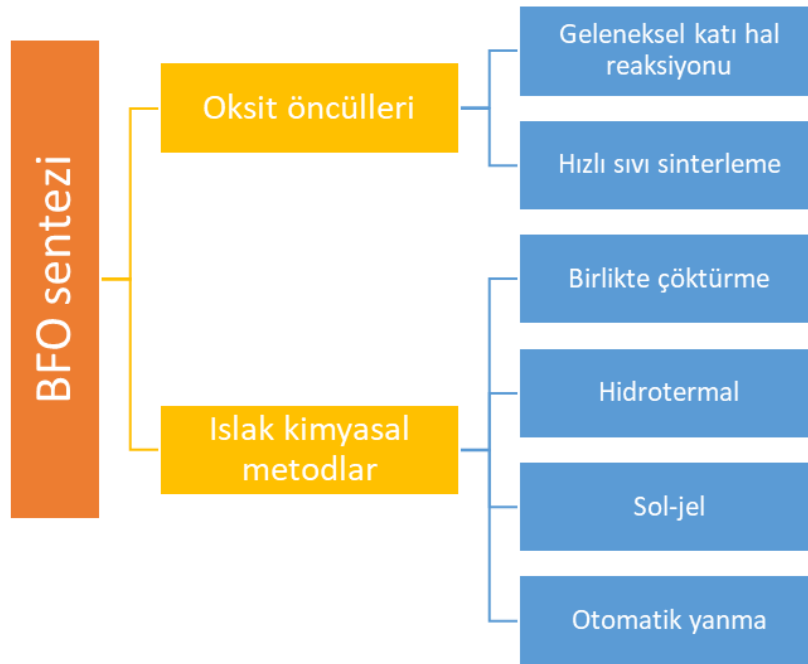
Şekil 2.4 Perovskit yapısında BiFeO_3

BFO'nun sentrosimetrik perovskit yapısı Şekil 2.4'de gösterilmektedir. Bizmut Ferrit, $A = \text{Bi}^{3+}$, $B = \text{Fe}^{3+}$ olan perovskit yapısında ABO_3 olarak da tanımlanır. Küçük B katyonu (mor), oksijen anyonlarının (kırmızı) oktahedronunun merkezindedir. Büyük A katyonları (sarı) birim-hücre köşelerinde yer alır. Sentrosimetrik olmayan yapıya, oksijen anyonlarına göre A veya B katyonlarının veya her ikisinin merkezden kaydırılmasıyla ulaşılır ve kendiliğinden polarizasyon büyük ölçüde bu kayma tarafından oluşturulan elektrik dipol momentinden kaynaklanır [139]. Bi^{3+} iyon köşe pozisyonunda, Fe^{3+} gövde merkezli pozisyonda ve O^{2-} tüm yüzey merkezli pozisyonda yer almaktadır. Kafes parametreleri $a = 5.58 \text{ Å}$, $b = 5.58 \text{ Å}$ ve $c = 13.9 \text{ Å}$ 'dir [140].

2.1.1.1 BFO Sentezleme Yöntemleri

BFO, 1960'larda keşfedilmesine rağmen, saf faz sentezindeki zorluklar nedeniyle endüstride uygulanamamıştır. Sentezi sırasında Bi_2O_3 , $\text{Bi}_2\text{Fe}_4\text{O}_9$ ve $\text{Bi}_{25}\text{FeO}_{39}$ gibi safsızlık fazları oluşur. Bu fazlar stokiometrisini değiştirir ve oksijen boşluğu oluşturur. Ayrıca, işlem sırasında demirin oksidasyon durumu değişebilir, bu da uygulamalarda istenmeyen kaçak akımlara yol açar. Saf faz BFO sentezi, Bi_2O_3 – Fe_2O_3 sisteminin kinetik ve termodinamik özellikleri nedeniyle oldukça zordur [134]. Bu nedenle partikül büyüklüğünü, boyutlarını kontrol ederek ve BFO'yu uygun dopantlarla değiştirerek saf BFO sentezlenmesi için çalışılmıştır [141].

BFO nanopartikülleri katı hal reaksiyonları, hızlı sıvı sinterleme ve ıslak kimyasal yöntemlerle (sol jel, otomatik yanma, hidrotermal, birlikte çökelme) sentezlenebilir (Şekil 2.5). Her sentez tekniğindeki temel amaç, endüstriyel uygulamalar için uygun maliyetli, basit bir prosedür ile mümkün olan en düşük sıcaklıkta en yüksek saflığı elde etmektir [134]. Tüm bu mevcut yöntemler, proses sıcaklığı, basınç, süre ve ayrıca kurutma, yanmalar ve sinterleme gibi çeşitli sıcaklık muamelesi aşamalarını içeren parametreler gerektirir. Ayrıca tek faz, safsızlık içermeyen BFO sentezi için etkin bir şekilde optimize edilmesi gereken farklı çözücüler, şelatlama ajanlarını, polimerizasyon ajanlarını vb. gerektirir [133].



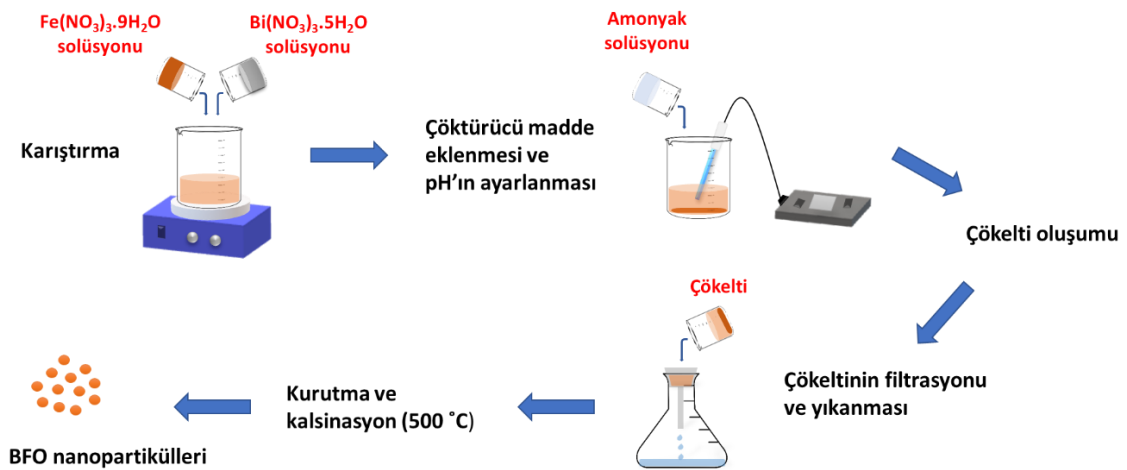
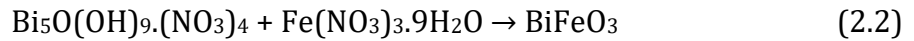
Şekil 2.5 BFO sentezleme yöntemleri

Birlikte çökelme

Birlikte çökelme, yaygın olarak kullanılan sentez yöntemlerinden biridir. Endüstriyel uygulamalar için daha büyük ölçekte kolayca aktarılabilen basit, uygun maliyetli ve hızlı bir süreç olarak öne çıkar. Bu yöntem ile tehlikeli organik çözücüler, yüksek basınç veya sıcaklık altında işlemler gerektirmeden çevre dostu bir yoldan yüksek saflıkta nanomalzeme üretilir [142]. Demir oksitlerin ve metal ferrit nanopartiküllerin birlikte çöktürme ile sentezinde, Fe(III) ve M(II) (reaksiyondaki M; Fe²⁺, Mn²⁺, Co²⁺, Cu²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺ ve Ni²⁺ katyonlarından biri olabilir) tuzlarının sulu çözeltileri genellikle bir alkalın çözeltisi içinde karıştırılır ve bu da manyetik çöktürmenin oluşumunu sağlar. Oluşan kimyasal reaksiyonun denklemi (2.1)'deki gibidir [143].



Ancak, parçacık boyutu, şekli, kristallik ve manyetik özelliklerin kontrolü gibi zorluklar bu yöntemi hala sınırlamaktadır [142]. Saf tek fazlı BiFeO₃, termodinamik yasalara dayanan parametreleri kontrol ederek, birlikte çöktürme metodu kullanılarak (2.2)'deki denklem sağlanarak sentezlenebilmektedir [144]. Birlikte çökelme metodu ile BFO sentez aşamaları Şekil 2.6'da gösterilmektedir.



Şekil 2.6 Birlikte çökelme metodu ile BFO sentez aşamaları

Sol-jel yöntemi

Sol-jel yöntemi, moleküler öncüllerin, metal alkoksitlerin, bir "sol" veya bir dispersiyon oluşturan etanol/su çözeltisi içinde kontrollü hidrolizine ve yoğunlaşmasına dayanır. Solventin uzaklaştırılması veya kimyasal reaksiyon yoluyla bir yoğunlaşma ve polimerizasyon ile sonuçlanan bir "jel" oluşur. Bu yöntem tipik olarak dört adımdan oluşur: (i) hidroliz, (ii) yoğunlaşma, (iii) kurutma ve (iv) ısıtma işlemi. Son ısıtma işlemi aşaması, son parçacıkların kristalli bir yapıya kavuşması için gereklidir, çünkü diğer üç aşama oda sıcaklığında meydana gelir [142]. İyi kristalize, saf perovskit BFO nanoparçacıkları elde etmek için, sol-jel yöntemi kullanılmaktadır. Çünkü moleküler düzeyde ve nispeten düşük bir sentez sıcaklığında kolayca düzgün bir bileşim elde edebilir [145]. Bu yöntemin dezavantajı karmaşık çözeltiler ve toksik reaksiyonlar içermesidir [134].

Hidrotermal yöntem

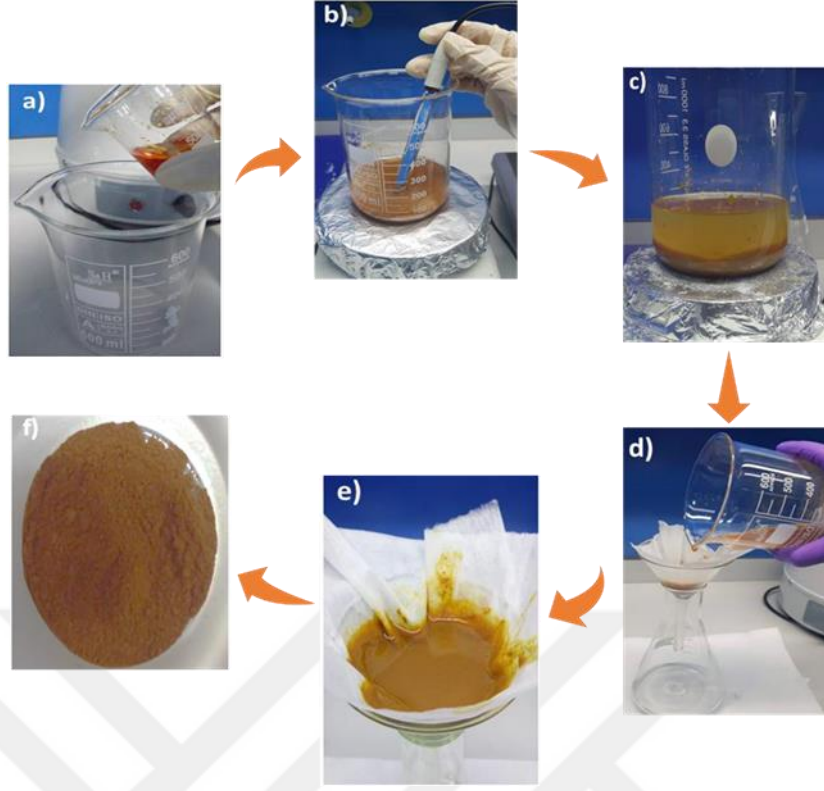
Hidrotermal işlem, yüzey aktif maddeler ile birlikte yüksek sıcaklıklarda (130 °C ila 250 °C) ve yüksek buhar basınçlarında (0.3 ila 4 MPa) çözündürülmüş sulu metal tuzu öncü çözeltilerinden kristal fazların oluşumuna dayanan kimyasal bir yöntemdir. Bu işlem partikül büyüklüğü ve şekli üzerinde kolay kontrol sağlar. Yüksek basınç ve sıcaklıklara duyulan ihtiyaç ve reaksiyon süresi dezavantajlarıdır [142]. Hidrotermal yöntem, sol-jel işlemi ile karşılaştırıldığında, BFO'yu nispeten daha düşük bir sıcaklıkta doğrudan sentezleyebilir. BFO malzemesinin saflığını, morfolojisini ve boyutunu daha iyi kontrol etme fırsatı sunar [145].

3.1 BiFeO₃ Nanopartiküllerinin Sentezi

3.1.1 Birlikte Çökelme Yöntemi İle BiFeO₃ Nanopartiküllerinin Sentezi

Hızlı ve uygun maliyetli bir yöntem olan birlikte çökelme yöntemi ile bizmut(III) nitrat (Bi(NO₃)₃.5H₂O, Mn=1.461,99 g/mol), demir(III) nitrat (Fe(NO₃)₃.9H₂O, Mn=403.95 g/mol), nitrik asit (HNO₃, %65) (Merck KGaA, Almanya) ve amonyak (NH₄OH, %25) (ISOLAB, Wertheim, Almanya) kimyasalları kullanılarak BiFeO₃ nanopartiküllerinin sentezi gerçekleştirilmiştir.

BFO sentezi için, 1.86 g Bi(NO₃)₃.5H₂O tartılarak 10 ml nitrik asit içerisine ve 2.58 g Fe(NO₃)₃.9H₂O tartılarak 10 ml distile su içerisine eklenmiştir. İki farklı beherde hazırlanan karışımların, manyetik karıştırıcıda 300 rpm'de 15 dk boyunca çözünmesi sağlanmıştır. Bu iki çözelti ayrı bir beherde biraraya getirilerek, homojen bir karışım elde etmek için 300 rpm'de 15 dk boyunca karıştırılmıştır (Şekil 3.1(a)). Sonrasında, çökelti oluşturmak için karışıma amonyak çözeltisi yavaşça eklenerek pH değerinin 10-12 aralığında olması sağlanmıştır (Şekil 3.1(b)). pH 10.6 olduğunda çökelti alınarak (Şekil 3.1(c)), filtre kağıdından geçirilmiş ve toksik ürünleri uzaklaştırmak için birkaç kez distile su ile yıkanmıştır (Şekil 3.1(d, e)). Çökelti içerisindeki suyun tamamen buharlaşması için etüvde 24 saat boyunca 100 °C'de kurutulmuştur. Son olarak, kristalize ve saf bizmut ferrit tozları elde etmek için 3 saat boyunca 550 °C'de kalsinasyonu sağlanmıştır (Şekil 3.1(f)).



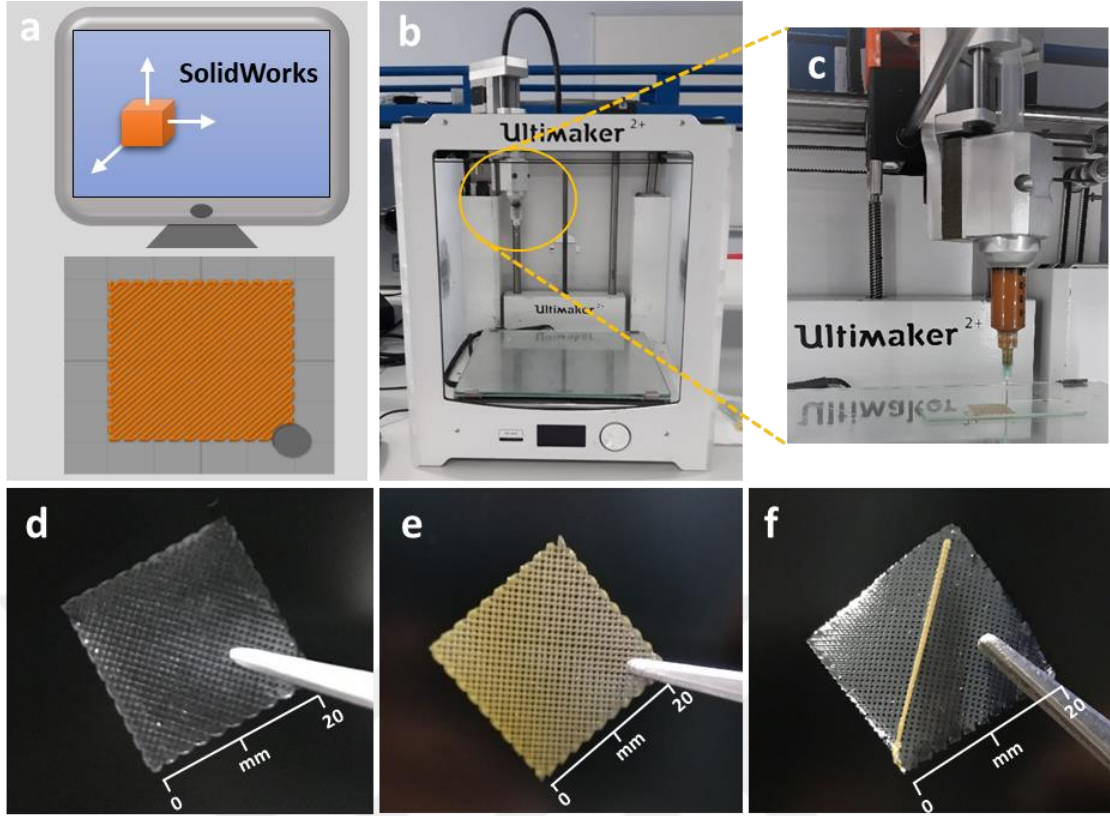
Şekil 3.1 Birlikte çökeltme yöntemi ile BiFeO_3 üretim aşamaları: $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ve $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ çözeltilerinin karıştırılması (a), birlikte çökeltme işlemi (b, c), filtrasyon ve yıkama işlemi (d, e), kalsinasyon işleminden sonra elde edilen BiFeO_3 tozları (f)

3.2 PLA ve PLA/BFO Çözeltilerinin Hazırlanması

Üretilcek olan doku iskelelerinin ana malzemesi olan PLA'nın (2003D, Nature Works LLC, Minnetonka, MN), 3B biyobaskı yöntemine uygun olacak şekilde çözeltileri hazırlanmıştır. İki ayrı beherde, 1 g PLA 10 ml kloroform (Merck KGaA, Almanya) içerisinde, manyetik karıştırıcı 300 rpm'de 1 saat boyunca karıştırılarak ağırlıkça %10'luk PLA çözeltileri elde edilmiştir. Beherlerden birine optimizasyon çalışmalarında en uygun miktar olarak belirlenen 0.2 g BFO eklenerek aynı karıştırma hızında 30 dk boyunca karıştırılmış ve ağırlıkça %10 PLA/%2 BFO çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler 3B baskı için 10 ml'lik şırıngalara doldurulmuştur.

3.3 PLA ve PLA/BFO İskelelerinin Tasarımı ve 3B Baskısı

Baskı işleminden önce SolidWorks yazılımı kullanılarak 20 mm × 20 mm × 5 mm boyutlarında bir kare prizma tasarlanmıştır. İskelenin baskı parametrelerinin ayarlanması için tasarım bir Stereolitografi (STL) dosyasına dönüştürülmüş ve 3B baskı cihazının yazılımına (Simplify) aktarılmıştır. Simplify programı ile iskelelerin iç özellikleri belirtilen baskı parametrelerine göre ayarlanmıştır: %70 doluluk oranı, 16.7 mm/s baskı hızı, 0.4 mm iğne çapı, 0.48 mm ekstrüzyon genişliği, %4 ekstrüzyon çarpanı ve 0.1 mm kalınlık (Şekil 3.2 (a)). Tüm deneyler oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Doku iskelelerinin 3B baskısı, laboratuvarında modifiye edilmiş Ultimaker 2+ cihazı ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2 (b)). Değişiklik olarak, Ultimaker 2+ cihazında bulunan nozul ve ısıtma bölgesi baskı kafasından çıkarılarak yerine Şekil 3.2(c)'de gösterilen, biyoyazım için şırınganın yerleştirilebilmesini sağlayacak kafa (nozul) monte edilmiştir. Cihazın sahip olduğu X-Y-Z eksenlerin hareketleri (X-Y eksenleri kafa hareketi, Z eksen ise tabla hareketi) ile de tasarlanan modelin basım işlemi tabla üzerinde gerçekleştirilmiştir. Baskı parametreleri optimize edildikten sonra, 3B biyoyazıcı ile üç farklı formda iskele basılmıştır. Şekil 3.2 (d, e, f) 'de gösterildiği gibi sırasıyla, %10 PLA, %10 PLA/%2 BFO kompozit ve %10 PLA/%2 BFO (hat). %10 PLA iskelesi kontrol grubu olarak; %10 PLA/%2 BFO kompozit iskelesi üç boyutlu yapıda BFO davranışını gözlemlemek için; %2 BFO hatlı %10 PLA iskelesi elektrik stimülasyonu ile hücre davranışının gözlemlenmesi için üretilmiştir. Elde edilen numuneler SEM, FTIR, DSC, XRD, çekme testi ve MTT hücre testleri yapılarak karakterize edilmiştir.



Şekil 3.2 SolidWorks programında iskele tasarımı ve tasarlanan iskelenin Simplify programı ile ayarlanan simüle görüntüsü (a), modifiye edilmiş Ultimaker 2+ cihazı (b), biyoyazım işlemi (c), 3B basılmış PLA iskele (d), PLA/BFO kompozit iskele (e), PLA/BFO (hat) iskele

3.4 Karakterizasyon

3.4.1 Partikül Boyutu Analizi (DLS)

Dinamik ışık saçılımı (DLS) (Partica SZ-100Z, ABD) ile çözelti içerisindeki BFO partiküllerinin boyut dağılımı ölçülmüştür (Şekil 3.3). Saçılan ışığın şiddetindeki değişim, parçacığın hareketine buna bağlı olarak da parçacığın büyüklüğüne, ortamın vizkozitesine ve sıcaklığa bağlıdır.



Şekil 3.3 BFO partikül boyutu ölçümünde kullanılan cihaz (Partica SZ-100Z, ABD)

3.4.2 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Taramalı elektron mikroskobu, malzemelerin morfolojik özelliklerinin belirlenmesinde kullanılan, yüksek çözünürlüklü görüntü elde etmeyi sağlayan bir cihazdır. BFO partiküllerinin ve 3B basılmış iskelelerin morfolojileri Şekil 3.4’de gösterilen taramalı elektron mikroskobu (SEM) (MA-EVO10, ZEISS, Almanya) ile incelenmiştir. SEM analizinden önce, doku iskeleleri elektriksel iletkenlik kazanabilmeleri için kaplama cihazı (SC7620, Quorum, ABD) ile 60 saniye boyunca Au ile kaplanmıştır (Şekil 3.5). BFO partiküllerinin kimyasal bileşiminin yarı kantitatif analizi için SEM’de bulunan enerji dağıtıcı X-ışını spektrometresi (EDX) kullanılmıştır.



Şekil 3.4 Taramalı elektron mikroskobu (SEM) (MA-EVO10, ZEISS, Almanya)



Şekil 3.5 Kaplama cihazı (SC7620, Quorum, ABD)

3.4.3 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

BFO partiküllerinin ve 3B basılmış iskelelerin kimyasal bağ yapıları, Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) (JASCO, FT/IR-4700, Japonya) cihazı ile analiz edilmiştir (Şekil 3.6). Tüm spektrumlar 4 cm^{-1} çözünürlük değerinde ve $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ dalga boyu aralığında alınmıştır. Analiz sırasında cihaz tarafından yayılan ışınlar, ölçümü yapılan numune tarafından absorbe edilir ve malzemedeki fonksiyonel gruplar absorpsiyon bandları yardımı ile tespit edilir.



Şekil 3.6 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi cihazı (JASCO, FT/IR-4700, Japonya)

3.4.4 Termal Analiz (DSC)

BFO partiküllerinin ve 3B basılmış iskelelerin termal davranışları, Şekil 3.7’de gösterilen diferansiyel tarama kalorimetre cihazı (DSC-60 Plus, Shimadzu, Japonya) ile karakterize edilmiştir. Her numune tartılarak alüminyum ölçüm kaplarına yerleştirilmiş ve nitrojen gazı altında, 25-300 °C sıcaklık aralığında çalışılmıştır. Isınma oranı 10 °C/dk olarak ayarlanmıştır.



Şekil 3.7 Diferansiyel tarama kalorimetre cihazı (DSC-60 Plus, Shimadzu, Japonya)

3.4.5 X-Işını Kırınımı (XRD) Analizi

X-ışını kırınımı (XRD) yöntemi ile BFO partiküllerinin ve 3B basılmış iskelelerin kristal yapıları analiz edilmiştir. Analiz için Cu-K α radyasyon kaynağına ($\lambda=1.54060$ Å) sahip, Shimadzu marka, 6100 model (Japonya) cihaz kullanılmıştır (Şekil 3.8).



Şekil 3.8 X-ışını kırınımı cihazı (Shimadzu – 6100, Japonya)

3.4.6 Mekanik Özelliklerin Analizi

Üretilen 3B iskelelerin mekanik özelliklerini incelemek için, Şekil 3.9’da verilen 5000 N’luk maksimum kapasiteye sahip çekme cihazı (EZ-LX, Shimadzu, Japonya) kullanılmıştır. Basılan tüm doku iskeleleri 9 mm × 18 mm dikdörtgen levhalar halinde kesilmiş ve her iki uçtan mekanik tokalarla tutturulmuştur. Çekme testi oda sıcaklığında (23 °C) ve 5 mm/dk hız ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.9 Çekme cihazı (EZ-LX, Shimadzu, Japonya)

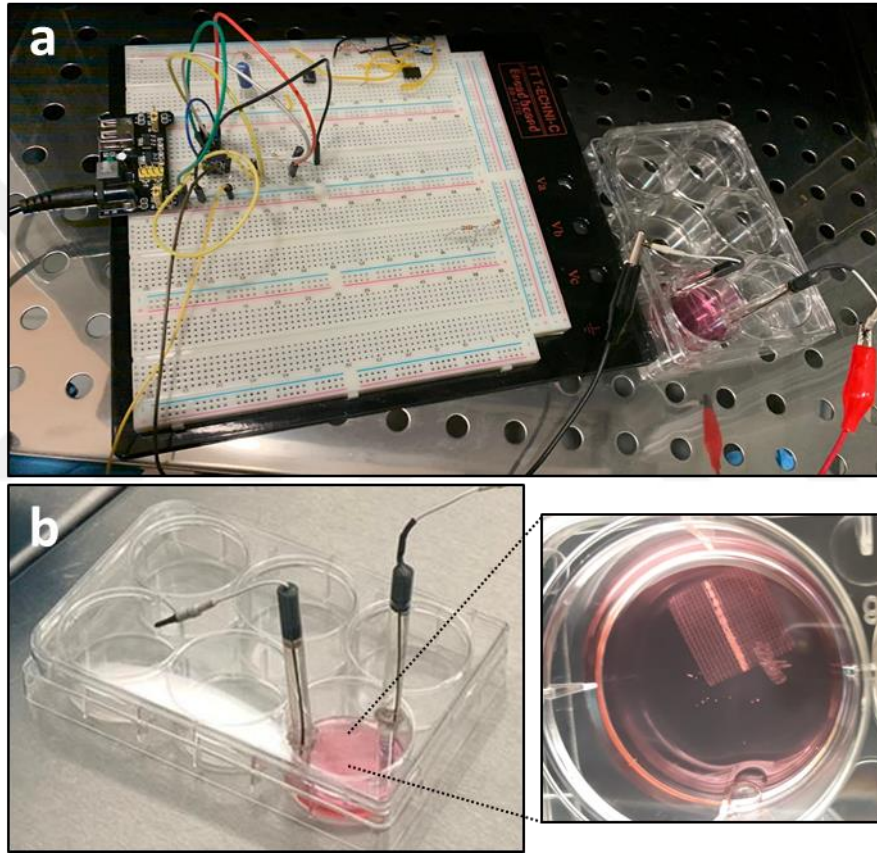
3.5 Hücre Kültürü

Bu çalışmada kullanılan insan adipoz dokudan türetilmiş mezenkimal kök hücreler (hADMSC), Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde (İstanbul), lomber omurga ameliyatında alınan derialtı yağ dokusundan izole edilmiş ve karakterizasyon testleri gerçekleştirildikten sonra hücre kültüründe kullanılmıştır. 3B basılmış iskeleler, 24 oyuklu hücre kültür plakalarında bir gece boyunca UV altında sterilize edilmiştir. Hücrelere mikro ortam oluşturmak için, iskeleler 37 °C'de %5 CO₂ ile bir saat boyunca %10 FBS (fetal sığır serumu), 0.1 mg/ml penisilin/streptomisin ile sağlanan DMEM büyüme ortamında inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, büyüme ortamı toplanmış ve kalan ortam bir mikropipet ile atılmıştır. 5×10⁴ hADMSC, 24 oyuklu plakalarda 3B basılmış iskeleler üzerine, standart hücre kültürü prosedürüne göre kültürlenmiştir. Aynı sayıda tek tabakalı hücreler (2B) de kontrol grubu olarak hücre-3B iskeleleri ile birlikte inkübatörde 37 °C'de, %5 CO₂ ile 7 gün boyunca inkübe edilmiştir. Verilen zaman aralığında iskelelerin sitotoksitesini belirlemek için Glentham Life Sciences'dan alınan MTT (Metiltiazol difenil tetrazolyum) sitotoksite saptama kiti kullanılmıştır. 560 nm dalga boyunda sitotoksite testinin absorbans değerlerini ölçmek için Elisa okuyucu (Perkin Elmer, Enspire) kullanılmıştır. Doğru sonuçları elde etmek için, deney üç kez tekrarlanmış ve sonuçların ortalama değerleri ortalama sonuç olarak alınmıştır. 3B basılmış iskelelerdeki hücrelerin morfolojileri, taramalı elektron mikroskobu (MA-EVO10, ZEISS, Almanya) ile gözlemlenmiştir. 1, 3 ve 7 günlük inkübasyondan sonra, büyüme ortamı alınmış ve iskeleler %4 glutaraldehid (Sigma Aldrich) ile fikse edilmiştir. Daha sonra, iskeleler bir dizi etanol seyreltikleri ile yıkanmış ve havada kurutulmuştur. Kurutulan iskeleler altınla kaplanmış ve SEM'de görüntülenmiştir.

3.6 Elektrik Stimülasyon Sisteminin Hazırlanması

Düşük maliyetli, bifazik bir cihaz son derece düşük frekansta (2 Hz (Delta dalga) & 7.83 Hz (Schumann Rezonans)) elektrik stimülasyonu ile mezenkimal kök hücre göçünü teşvik etmek üzere tasarlanmıştır. Tasarlanan cihaz, hücre kültürlerini eş zamanlı olarak uyaramaktadır. Cihaz; voltaj genlik kontrol devresi, frekans ve

zaman kontrol devresi, negatif voltaj dönüştürücü devresi bileşenlerinden oluşmaktadır (Şekil 3.10(a)). Elektrik stimülasyonu için, Ag/AgCl elektrotları (referans elektrotlar) kullanılarak stimülasyon cihazı ile 6 çukurlu hücre kültürü mikrolakaları arasında bağlantı kuran bir sistem oluşturulmuştur. Ag/AgCl elektrotları, biyouyumlu ve düşük maliyetli olduğu için tercih edilmiştir. Hücre plakası üzerine iki adet 7.3 mm'lik delik açılmış ve elektrotlar 3B iskele ile elektrik teması sağlamak üzere hücre plakasına yerleştirilmiştir (Şekil 3.10(b)). Elektrotlar, stimülatör çıkışlarına timsah klipsler ile bağlanmıştır.

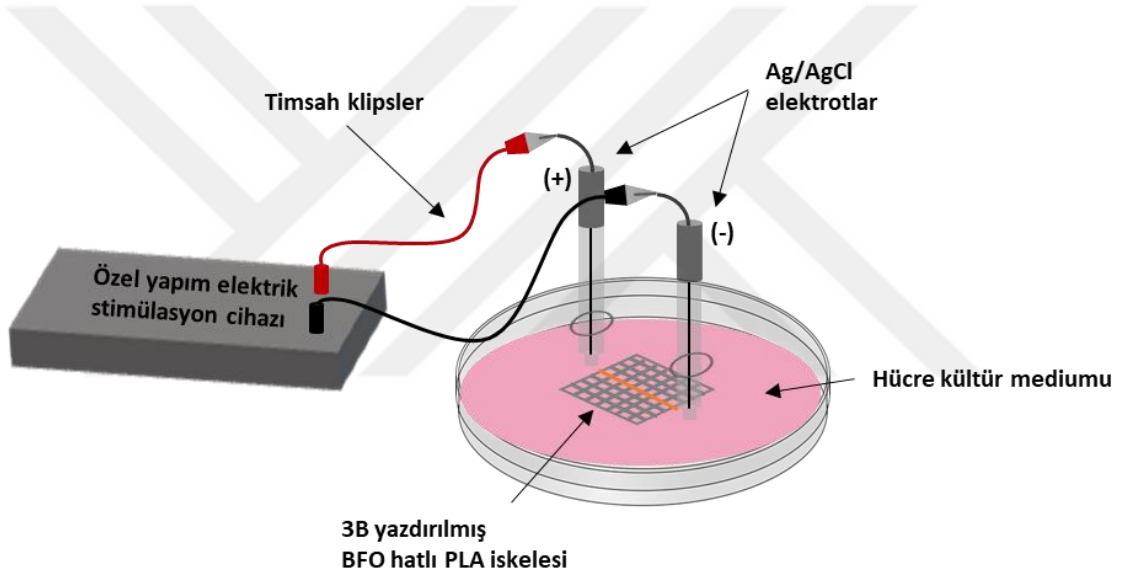


Şekil 3.10 Elektrik stimülasyon sistemi: elektrik stimülasyon cihazı (a), Ag/AgCl elektrotları yerleştirilmiş hücre kültür mikrolakası (b)

3.7 3B Basılmış İskelelerde Kültürlenen hADMSC'lere Elektrik Stimülasyonu Uygulanması

Elektrik stimülasyonunun hADMSC'ler üzerindeki etkisini araştırmak için 3B basılmış BFO hat içeren PLA iskeleleri kullanılmıştır. Stimülasyon deneyinden önce,

BFO hatlı PLA iskeleleri, %70 etanol çözeltisi içerisinde 1 saat boyunca sterilize edilmiş, ardından 24 saat UV ışığına maruz bırakılmıştır. Sterilize edilmiş iskeleler 24 oyuklu plakalara yerleştirilmiştir. Daha sonra hADMSC'ler, iskele başına 5×10^3 hücre yoğunluğunda kültürlenmiştir. Hücre kültürü iskeleler, 37 °C'de %5 CO₂ ile 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. Hücreler iskeleler üzerinde optimal büyümeye ulaştığında, kültürlenmiş iskeleler elektrik uyarımı için 6 oyuklu bir plakaya alınmıştır. Bu iskelelerden biri, elektrik stimülasyonuna tabi tutulmayan kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Diğer iskelenin bulunduğu hücre plakasına ise bölüm 3.6'da anlatıldığı gibi elektrik stimülasyon cihazına bağlı Ag/AgCl elektrotları yerleştirilmiştir. Elektrik stimülasyonu için tasarlanan sistemin şematik gösterimi Şekil 3.11'de verilmiştir.



Şekil 3.11 hADMSC kültürü 3B basılmış BFO hatlı PLA iskelesine elektrik stimülasyonu için tasarlanan sistemin şematik gösterimi

BFO hatlı PLA iskelesi; 48 saat boyunca inkübatör içerisinde elektrik stimülasyonuna (8V, 20 mA, 2 Hz frekans) maruz bırakılmıştır. Stimülasyon işleminin tamamlanmasının ardından, kontrol grubu ve uyarılmış iskelelere floresan boyama işlemi yapılmıştır.

3.8 Elektrik Stimölasyonu Sonrası 3B Basılmış İskelelerin Floresan Boyanması

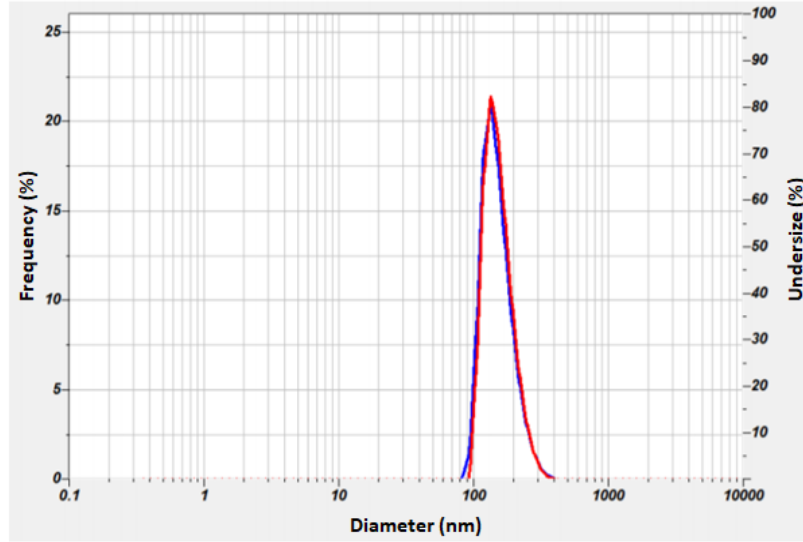
Elektrik stimölasyonu sonrası, hADMSC'lerin kontrol grubu ve uyarılmış iskelelere tutunmasını ve yönelimini gözlemlemek için hücre nükleus boyası olan DAPI boyaması gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada, iskeleler 20 dk boyunca %4 formaldehit ile fikse edilmiş ardından üç kez PBS ile yıkanmış ve çekirdeklerinin boyanması için 10 dk boyunca DAPI (1:5000) ile inkübe edilmiştir. İskeleler, nihai bir adım olarak PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra cam bir slayt üzerine monte edilmiş ve hücre/iskele etkileşimlerini gözlemlemek için lazer taramalı konfokal mikroskop (LSM 700, ZEISS, Almanya) kullanılmıştır.



4.1 Karakterizasyon

4.1.1 Partikül Boyutu Analizi (DLS)

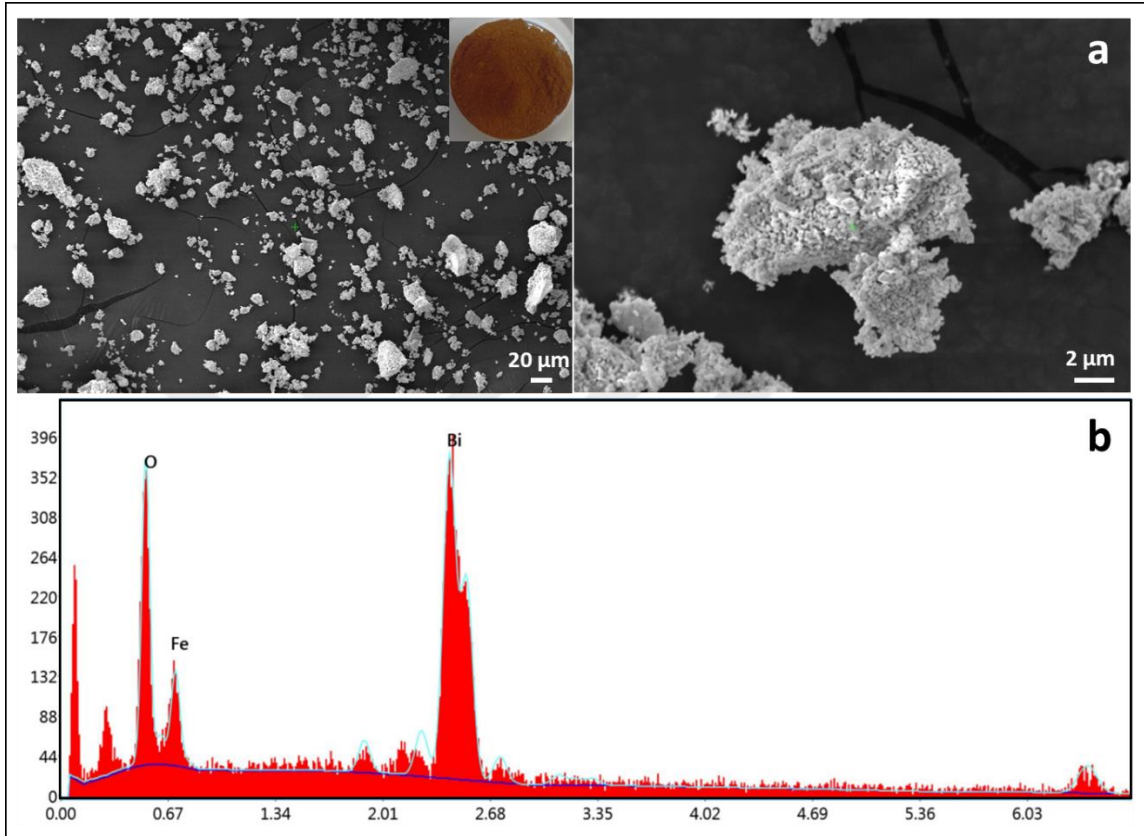
Dinamik ışık saçılması (DLS) yöntemi ile çözelti içerisindeki BFO partiküllerinin boyut dağılımı ölçülmüş ve sonucu Şekil 4.1'de verilmiştir. BFO tozları etanol içerisinde disperse edilmiş, ardından 1 dk boyunca sonike edilmiş ve 18400 RCF'de santrifüjlenmiştir. Çözelti içerisindeki partiküller brownian hareketi yaparlar. DLS tekniği, çözelti içerisindeki bu partiküllerden saçılan ışığın şiddetinin ve değişiminin ölçülmesi temeline dayanır. Büyük parçacıklar ışığın küçük açı ve yüksek şiddette kırılmasını; küçük parçacıklar büyük açı ve küçük şiddette kırılmasına sebep olurlar. Bu kırınım, cihazda tespit edilerek parçacık boyutlarının saptanması gerçekleşir [146]. Şekil 4.1'de verilen DLS ölçümüne göre, BFO partiküllerinin ortalama boyutu 144 nm olarak saptanmıştır. Bu sonuç, BFO'nun birlikte çökelme yöntemi ile nanopartikül olarak başarıyla sentezlendiğini göstermektedir.



Şekil 4.1 DLS metodu ile BFO partiküllerinin boyut analizi

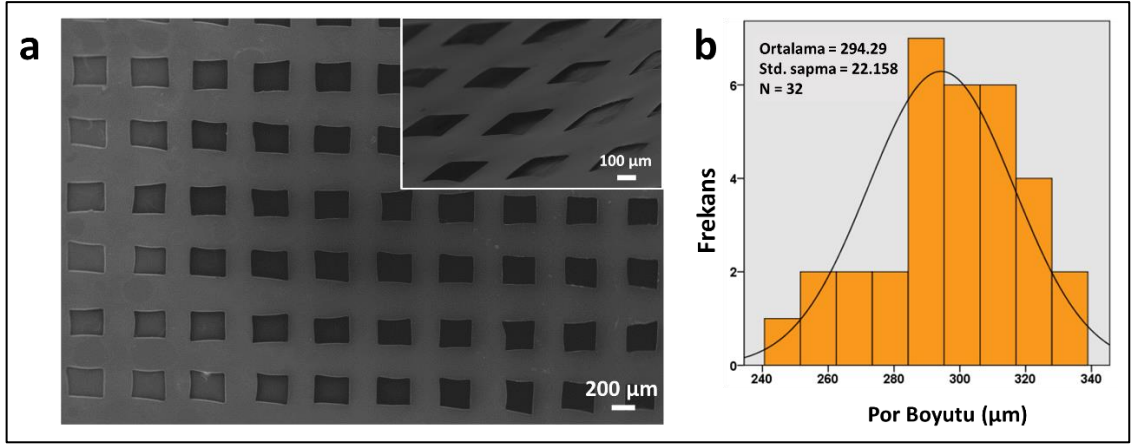
4.1.2 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Birlikte çökelme yöntemi ile üretilen BFO nanopartiküllerinin SEM görüntüleri ve EDX analizi Şekil 4.2’de gösterilmektedir. BFO nanopartiküllerinin nispeten üniform bir boyut dağılımına sahip olduğu görülmüştür (Şekil 4.2(a)). EDX analizine göre, tüm partiküllerde bizmut ağırlıkça %71.5 ve demir ağırlıkça %10 olarak bulunmuştur ve herhangi bir safsızlık gözlenmemiştir (Şekil 4.2(b)).



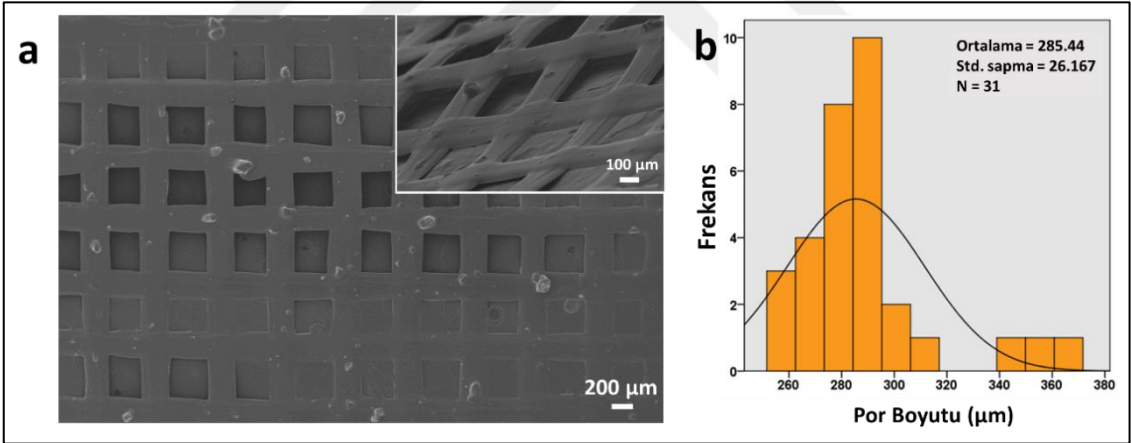
Şekil 4.2 BFO nanopartiküllerinin SEM görüntüleri (a) ve EDX analizi (b)

3B basılmış iskelelerin SEM görüntüleri ve por boyutu dağılım grafikleri Şekil 4.3; 4.4; 4.5’de gösterilmiştir. SEM görüntüleri, PLA ve kompozitlerinin üniform bir morfolojiye sahip olduğunu göstermektedir. Şekil 4.3(a)’da saf PLA iskelesinin SEM görüntüsü verilmiştir. PLA iskelesi kare gözenek şekli sergilemiş ve ortalama por boyutu 294.29 µm olarak ölçülmüştür (Şekil 4.3(b)).



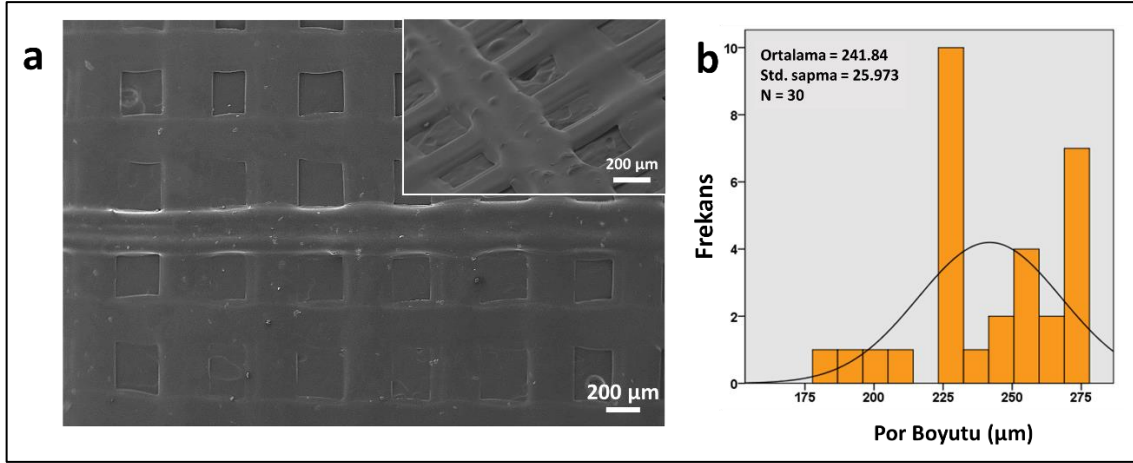
Şekil 4.3 Saf PLA iskelesinin SEM görüntüleri (a) ve por boyutu dağılım grafiği (b)

Şekil 4.4(a)'da verilen SEM görüntüsü, PLA/BFO iskelesinin düzgün gözenek şekline sahip olduğunu göstermiştir. PLA/BFO iskelesi için ortalama por boyutu 285.44 μm 'dir (Şekil 4.4(b)). PLA ve PLA/BFO doku iskeleleri arasında morfoloji ve yüzey dokusu açısından büyük farklılıklar yoktur, ancak PLA/BFO doku iskelesi BFO'nun varlığını gösteren daha pürüzlü bir yüzeye sahiptir [147].



Şekil 4.4 PLA/BFO iskelesinin SEM görüntüleri (a) ve por boyutu dağılım grafiği (b)

BFO hatlı PLA iskelesi, Şekil 4.5(a)'da görüldüğü gibi düzgün gözenek şekline sahiptir ve ortalama gözenek boyutu 241.84 μm olarak ölçülmüştür (Şekil 4.5(b)). Bu iskelenin, saf PLA iskelesinden morfolojik olarak tek farkı, ortasında 300 μm kalınlığında BFO hattı içermesidir. Tüm bu sonuçlara göre, 3B baskı istenen gözenek boyutu ve geometride iskelelerin üretimine izin verir [148]. Gözeneklerin varlığı ile besin ve atık difüzyonu gerçekleştirirken, hücre göçü ve proliferasyonunu da destekleyebilecek doku iskeleleri geliştirildiği kanıtlanmaktadır.

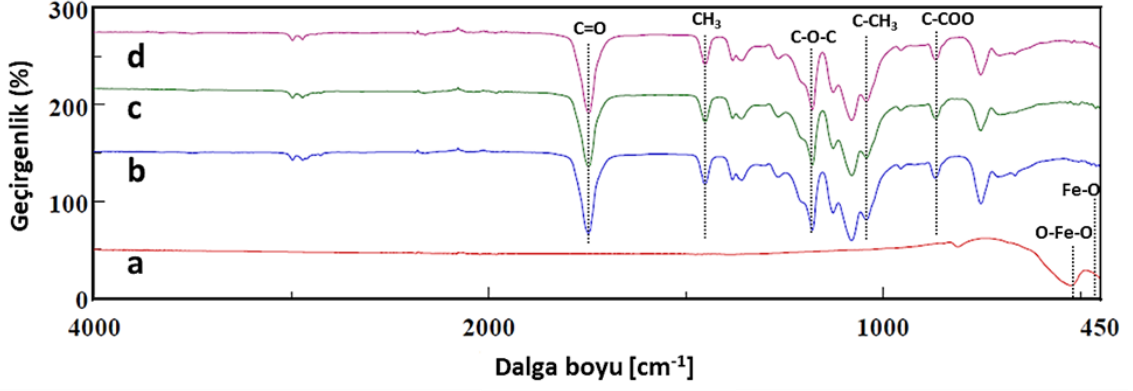


Şekil 4.5 PLA/BFO (hat) iskelesinin SEM görüntüleri (a) ve por boyutu dağılım grafiği (b)

4.1.3 Fourier Dönüştümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

Şekil 4.6, BFO nanopartikülleri ve 3B basılmış iskelelerde bulunan kimyasal bağların FTIR spektrumlarını göstermektedir. Şekil 4.6(a)'da, BFO için, yaklaşık 2369 cm^{-1} 'deki bant, örnekte bulunan atmosferik karbondioksitin varlığından kaynaklanmaktadır [149]. Yaklaşık 810 cm^{-1} ve 1388.5 cm^{-1} pozisyonlarındaki pikler tutulmuş nitratların varlığından kaynaklanmaktadır [150]. Spesifik olarak, yaklaşık 450 cm^{-1} ve 525 cm^{-1} 'deki iki güçlü absorpsiyon piki, perovskitlerde oktahedral FeO_6 gruplarının karakteristiği olan Fe-O gerilme titreşimleri ve O-Fe-O bükülme titreşimleri modlarına bağlanır. Metal-oksijen bandının varlığı, BFO'da perovskit yapısının oluşumunu destekler [151].

Şekil 4.6(b-d), sırasıyla PLA, PLA/BFO ve PLA/BFO (hat) iskelelerinin absorpsiyon piklerini göstermektedir. Saf PLA için karakteristik pikler, yaklaşık 1748 cm^{-1} (C=O gerilmesi), 1452 cm^{-1} ($-\text{CH}_3$ asimetrik deformasyon), 1180 cm^{-1} (C-O-C gerilmesi), 1042 cm^{-1} (C- CH_3 gerilmesi) ve 867 cm^{-1} (C-COO gerilmesi) de görülmüştür [152]. BFO ilavesiyle, PLA piklerinin pozisyonunda hafif kaymalar gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre, BFO partiküllerinin FTIR spektrumu, BFO'nun karakteristik titreşimlerini; iskelelerin FTIR spektrumları ise, partiküllerin PLA çözeltileri içinde iyi dağıldığını göstermiştir.

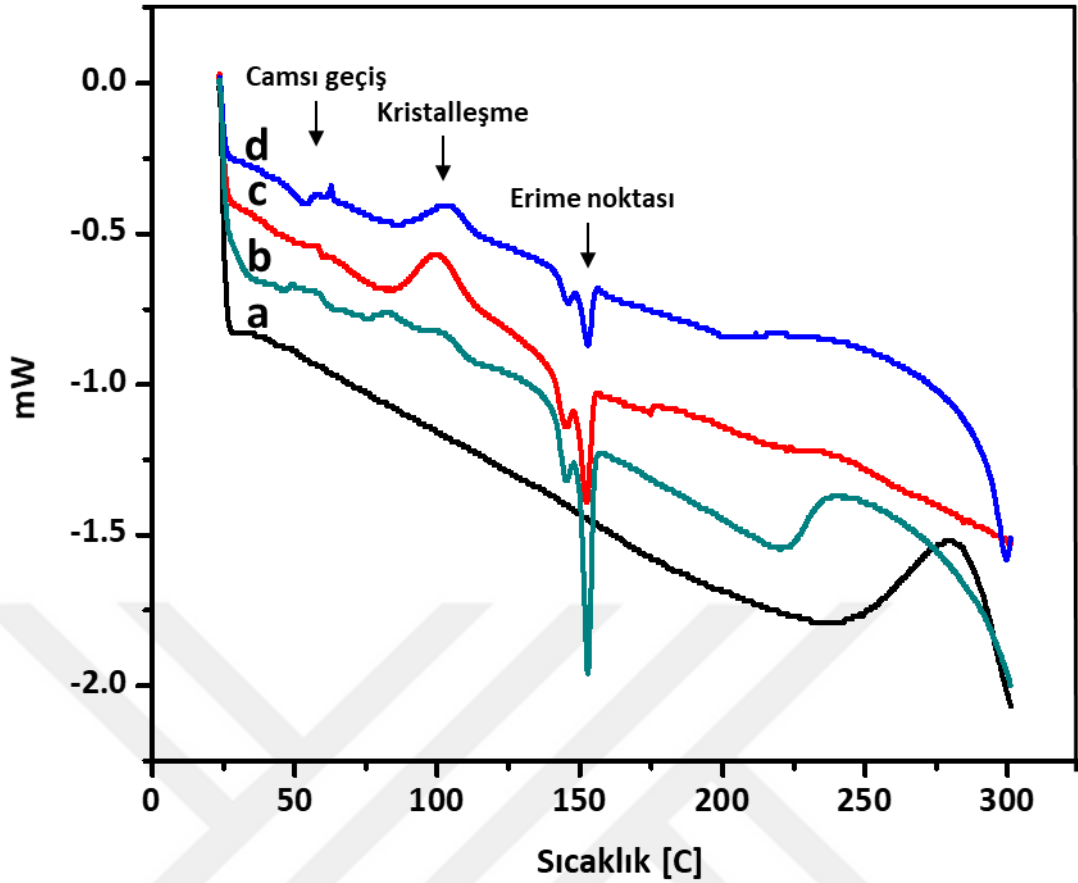


Şekil 4.6 BFO nanopartiküllerinin ve 3B basılmış iskelelerin FTIR spektrumları: BFO (a), saf PLA (b), PLA/BFO (c), PLA/BFO (hat) (d)

4.1.4 Termal Analiz (DSC)

BFO nanopartiküllerinin ve 3B doku iskelelerinin termal özellikleri Şekil 4.7'deki grafikte verilmiştir. 550 °C'de birlikte çökme işlemi ile hazırlanan BFO nanopartiküllerinin DSC eğrisi Şekil 4.7(a)'da gösterilmiştir. 285 °C'deki ekzotermik pik, Bi_2O_3 ve Fe_2O_3 faz oluşumuna atfedilir. Ayrıca, $\text{Bi}(\text{OH})_3$ ve $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 'ün metastabil bir faza ayrışması nedeniyle oluşan kütle kaybı da bu pike karşılık gelir [133], [153].

Şekil 4.7(b-d), PLA, PLA/BFO ve PLA/BFO (hat) iskeleleri için DSC eğrilerini göstermektedir. Şekil 4.7(c)'de saf PLA, yaklaşık 158 °C'de erime sıcaklığının (T_m) endotermik pikini ve yaklaşık 62 °C'de camsı geçiş sıcaklığının (T_g) ekzotermik pikini gösterir [154]. PLA kompozitleri için T_m ve T_g değerlerinde kaydadeğer değişiklikler görülmemiştir, çünkü BFO eklenmesi PLA'nın T_m ve T_g değerlerini önemli ölçüde etkilememiştir. Ayrıca, saf PLA için, yaklaşık 100.5 °C' de soğuk kristalleşme sıcaklığının (T_{cc}) ekzotermik piki gözlenmiştir. Şekil 4.7(b); 4.7(d)'de, BFO nanopartiküllerinin PLA'ya eklenmesi, soğuk kristalleşme sıcaklığını daha yüksek sıcaklığa kaydırmıştır. Bu, BFO içeriğinin soğuk kristalizasyon işlemi için daha güçlü bir inhibisyona neden olduğu anlamına gelir [155]. Bu fenomenin kesin nedeni henüz açık olmamakla beraber; nanopartiküllerin içeriği ve dağılımı, nanopartiküller ve matris arasındaki moleküller arası etkileşimler gibi faktörler etkili olmaktadır.



Şekil 4.7 BFO nanopartiküllerinin ve 3B basılmış iskelelerin DSC eğrileri: BFO (a), PLA/BFO (hat) (b), saf PLA (c), PLA/BFO (d)

4.1.5 X-Işını Kırınımı (XRD) Analizi

BFO nanopartiküllerinin ve 3B basılmış iskelelerin kristalinitesini karakterize etmek için, X-ışını kırınımı gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.8, BFO nanopartiküllerinin ve PLA, PLA/BFO ve PLA/BFO (hat) iskelelerinin kırınım patternlerini göstermektedir. Şekil 4.8(a)'da, BFO, $2\theta = 22.5, 32, 38, 45, 52, 56, 64$ ve 78° 'de keskin kırınım piklerine sahiptir. Bu keskin ve yüksek yoğunluklu pikler, sentezlenen BFO nanopartiküllerinin iyi bir kristalite derecesine sahip olduğunu gösterir. Çok düşük yoğunluklu pikler ise $\text{Bi}_2\text{Fe}_4\text{O}_9$, $\text{Bi}_{25}\text{FeO}_{39}$ gibi ikincil fazlara karşılık gelmektedir [156]. Ayrıca, bulunan tüm pikler, R3c uzay grubu ile bizmut ferritin rombohedral çarpık perovskit yapısı olarak tanımlanabilir [157].

BFO partikül büyüklüğü, XRD analiz verileri kullanılarak Debye-Scherrer formülü (4.1) ile hesaplanmıştır [158]. BFO için ortalama partikül büyüklüğü 15 nm olarak bulunmuştur. DLS'de elde edilen ortalama partikül boyutu (144 nm), XRD

analizinden elde edilene (15 nm) göre daha büyüktür. Bu farkın nedeni, DLS ölçümü için hazırlanan BFO süspansiyonunda meydana gelen aglomerasyonlar olabilir [159].

$$D = \frac{k \cdot \lambda}{\beta_{1/2} \cdot \cos \theta} \quad (4.1)$$

D = partikül büyüklüğü

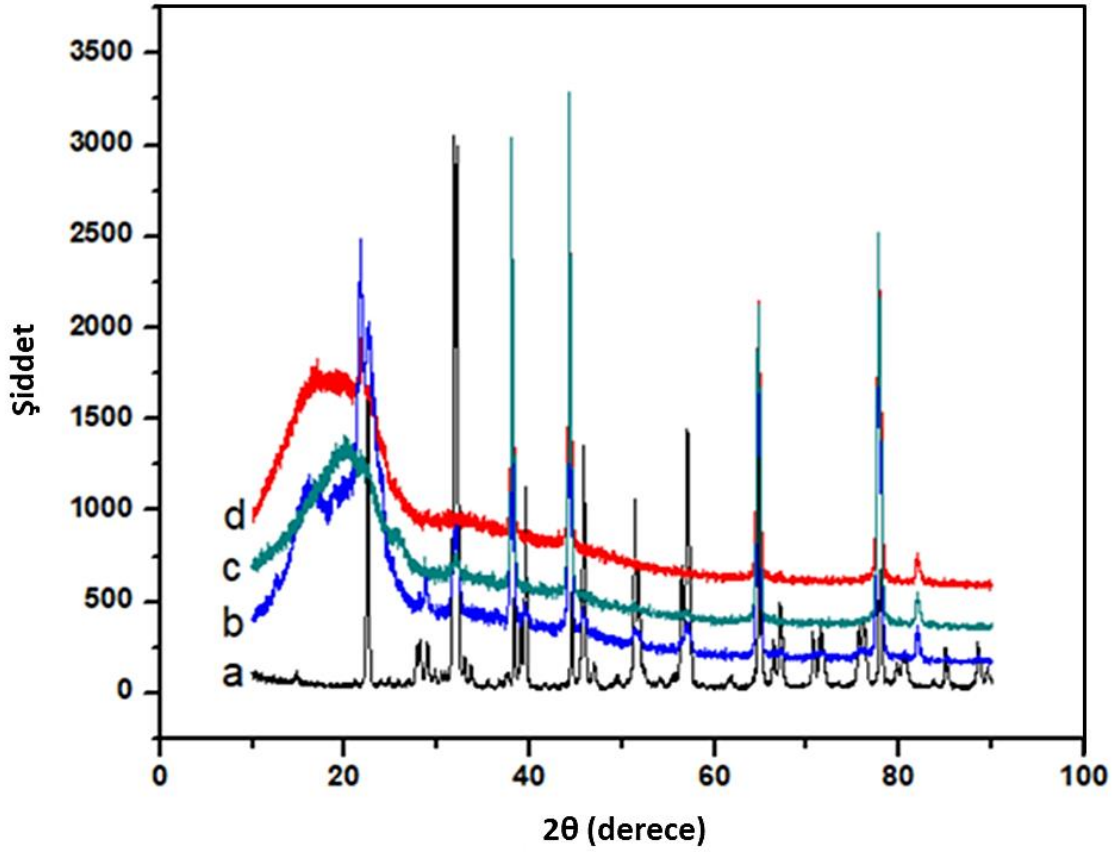
k = 0.9

$\lambda = 1.54060 \text{ Å}$

$\beta_{1/2}$ = maksimum yarıdaki tam genişlik

θ = Bragg kırınım açısı

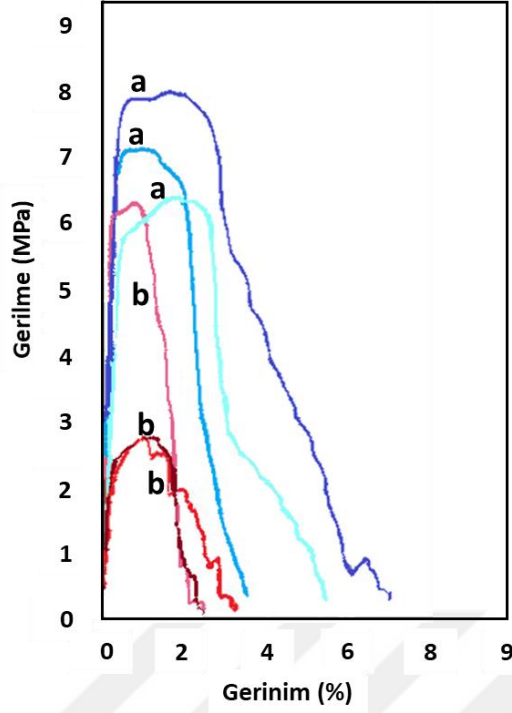
Şekil 4.8(d)'de PLA için, düşük yoğunluklu keskin pikler $2\theta = 22, 62, 78, 82^\circ$ 'de gözlenmiştir. $2\theta = 16^\circ$ 'deki geniş pik, PLA'nın karakteristik pikidir ve amorf yapısını gösterir [160], [161]. Ayrıca, bu amorf eğri, PLA iskelesinin düşük kristallik derecesine işaret eder [162]. Şekil 4.8(b)'de gösterilen PLA/BFO iskelesinin XRD patterni, BFO nanopartiküllerinin tüm kırınım piklerini ve PLA'nın iki karakteristik pikini göstermiştir. 15° 'de keskin olanı ve 83° 'de düşük yoğunluklu pikini göstermiştir. PLA/BFO iskelesinde hem BFO hem de PLA piklerinin gözlemlenmesi, homojen karışımın başarılı bir şekilde elde edildiğini kanıtlamaktadır. Şekil 4.8(c)'de PLA/BFO (hat) iskelesi, neredeyse tüm BFO piklerini ve düşük (83°) ve yüksek (18°) yoğunluk değerlerine sahip iki karakteristik PLA pikini göstermiştir. PLA'nın kırınım piki, BFO hattın eklenmesi ile 16° 'den 18° 'ye kayma göstermiştir. PLA'nın amorf bir yapıya sahip olduğu spektrumlarından çıkarılabilmektedir. Ancak kristalin BFO tozunun eklenmesi ile spektrumlar, hem amorf hem de kristalin pikleri içeren yarı kristal yapıları göstermiştir [163].



Şekil 4.8 BFO nanopartiküllerinin ve 3B basılmış iskelelerin XRD spektrumları: BFO (a), PLA/BFO (b), PLA/BFO (hat) (c), saf PLA (d)

4.1.6 Mekanik Özelliklerin Analizi

Mekanik mukavemet, nöral doku mühendisliği uygulamalarında iskelenin stabilitesinin ve bütünlüğünün belirlenmesinde önemli bir parametredir [164]. 3B doku iskelelerinin mekanik özellikleri Şekil 4.9'da gösterilmiş ve Tablo 4.1'de özetlenmiştir. İskelelerin elastisite modül değerleri, elastik deformasyon bölgesinin eğimi (%0.1-1 gerinim bölgesi) ile hesaplanmıştır.



Şekil 4.9 3B basılmış PLA (a) ve PLA/BFO (b) iskelelerinin gerilme-gerinim grafiği

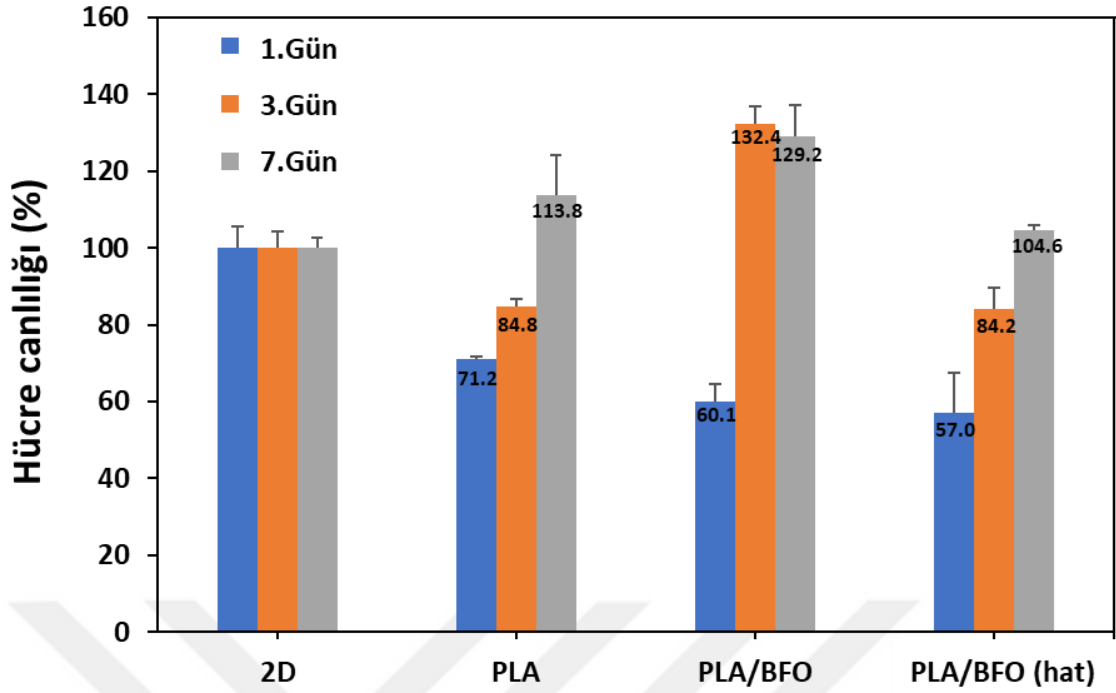
DeneySEL ölçümler, PLA/BFO kompozitlerinin saf PLA'dan daha düşük modüllere sahip olduğunu göstermektedir. PLA matrisine sert BFO nanopartiküllerinin eklenmesinin kompozitlerin modülünü arttırması gerektiği için bu beklenmedik bir gözlemdir. Çünkü, BFO nanopartiküllerinin elastisite modülü PLA matrisinden en az üç bin kat büyüktür. Bunun nedeni, BFO partiküllerinin varlığında PLA matrisinin kimyasal yapısının değişmiş olmasıdır. Sonuçlar ayrıca, BFO temelli kompozitlerin, saf PLA'dan daha düşük gerilme mukavemeti ile birlikte, kopmada çok daha düşük bir uzamaya sahip olduğunu (saf PLA'dan yaklaşık %50 daha az) göstermektedir. Bu gözlemler aşağıdakilere atfedilir: (i) saf PLA iskelesine kıyasla, PLA/BFO kompozitlerinin kesitlerinde gerçekleştirilen SEM analizinde görülen BFO partiküllerinin aglomere olması sonucu ortaya çıkan kusurların varlığı (Şekil 4.4), (ii) düşük elastisite modülü ile kopmada yetersiz uzama arasındaki sinerjinin düşük mukavemet ile sonuçlanması.

Tablo 4.1 PLA ve PLA/BFO iskelelerinin mekanik özellikleri

Doku iskelesi	Elastisite modülü (MPa)	Gerilme mukavemeti (MPa)	Uzama (%)
PLA	34.1 ± 5.3	0.30 ± 0.03	5.25 ± 1.73
PLA/BFO	21.5 ± 1.06	0.10 ± 0.04	2.69 ± 0.44

4.2 Hücre Canlılığı Analizi

MSC'ler, belirli bir yaralanma bölgesinden gelen sinyaller doğrultusunda çeşitli dokulara (kemik, kıkırdak, iskelet kası, sinir, yağ ve diğer dokular) farklılaşabilen çok potansiyelli hücrelerdir [165]. PLA, PLA/BFO ve PLA/BFO (hat) iskelelerinde hADMSC'lerin hücre canlılığı, MTT deneyi ile incelenmiştir. Şekil 4.10, inkübasyon dönemi (1, 3 ve 7 gün) boyunca hücre kültürü plakasında, iskele ile kültürlenен mezenkimal kök hücreler için MTT absorpsiyon değerlerini göstermektedir. In vitro test sonucunda, mezenkimal kök hücrelerin sitotoksik etki göstermediği açıkça görülmektedir ve 3B basılmış doku iskelelerinin hücreleri kültürlemek için iyi bir malzeme olabileceği söylenebilir. İnkübasyonun ilk gününde, tüm iskeleler için hücre canlılığı değerlerinin 2B hücre hattına kıyasla azaldığı gözlenmiştir. Bunun nedeni iskelelerdeki ölü hücreler olabilir [166]. İlk gün, maksimum canlılık değeri (%71) PLA'da; en düşük canlılık değeri (%57) ise PLA/BFO (hat) için gözlemlenmiştir. Sütunlar, 3. ve 7. günden itibaren hücre canlılığı değerlerinde tüm iskeleler için sabit bir artış göstermiştir. 3. günde, iskeleler üzerindeki hücre canlılığı önemli ölçüde artmıştır. PLA/BFO iskelesi için, maksimum artış (%132) gözlemlenmiştir. 7 günlük inkübasyondan sonra, PLA iskeleleri ile kültürlenен hücrelerin yaşayabilirliği %113'tür. BFO ile harmanlanmış iskeleler; kontrol ($p \leq 0.05$), saf PLA ve PLA/BFO (hat) ile karşılaştırıldığında en yüksek canlılık (%129) değerini göstermiştir. Bu, PLA ve BFO karışımının hADMSC'lerin tutunmasında daha etkili olduğunu gösterir. Tüm bu sonuçlar, 3B basılmış doku iskelelerinin hADMSC'lerin proliferasyonu için iyi bir aday olabileceğine işaret eder.

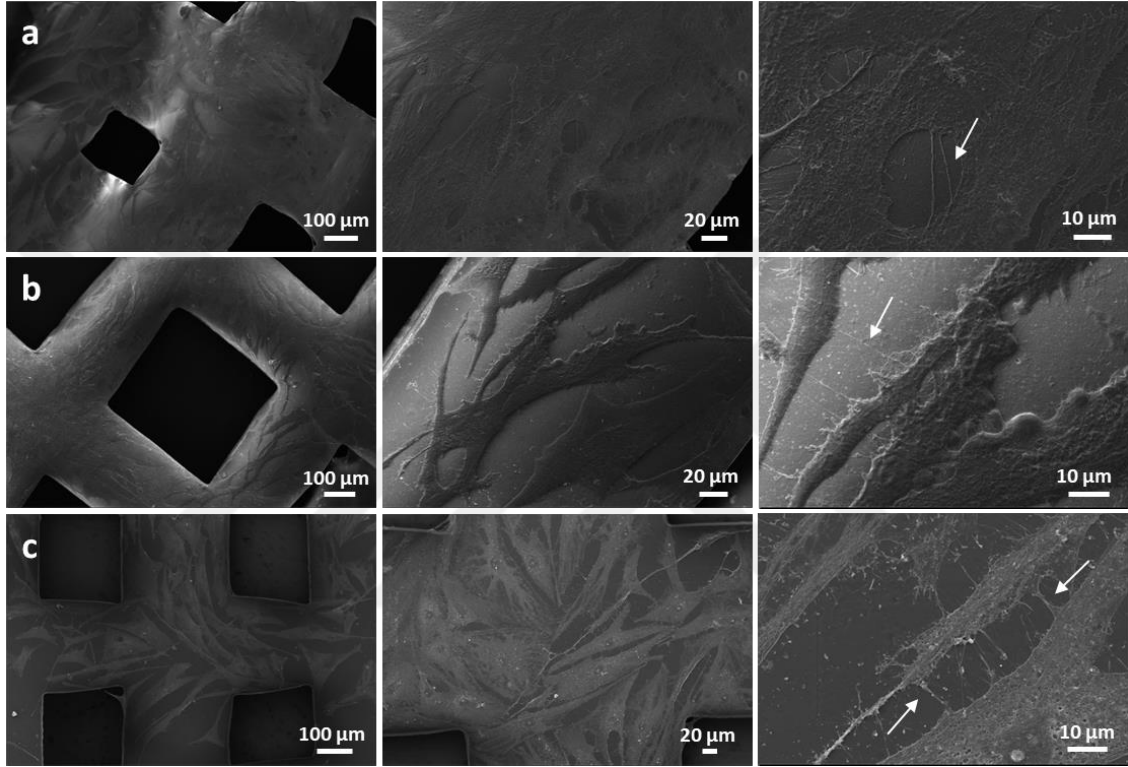


Şekil 4.10 3B basılmış doku iskeleleri ile kültürlenmiş hADMSC'lerin MTT test sonuçları

4.3 3B Basılmış İskelelerde Hücrelerin Tutunması ve Morfolojisi

Hücrenin bulunduğu ortam, farklı hücre davranışları için önemli bir parametredir [167]. hADMSC'lerin 3B doku iskelelerine bağlanması ve morfolojisi, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görüntülenmiştir. Hücre kültürünün 7. gününde, hADMSC'ler tüm iskelelere bağlanmış ve spesifik iğ benzeri bir morfoloji sergilemişlerdir (Şekil 4.11). Şekil 4.11(a)'da, hADMSC'lerle kültürlenmiş PLA iskeleleri, hücreler için iyi bir mikro ortam göstermiştir. Hücreler doku iskeleleri üzerinde büyümüş ve kısmi hücre-hücre etkileşimleri ile belirgin bir üç boyutlu morfoloji göstermiştir [168]. PLA/BFO ve PLA/BFO (hat) iskelelerinde hücreler, saf PLA iskelesine kıyasla daha belirgin bir yayılma morfolojisi göstermiştir (Şekil 4.11 (b,c)). Bu yayılma morfolojisi, fibroblastik dokunun karakteristik ağ benzeri yapısını göstermektedir [169]. Hücre dışı matris bu ağ yapısı ile ilişkilendirilebilir. Şekil 4.11 (b)'de, PLA/BFO kompoziti üzerindeki hücreler genişleyen sitoplazmik çıkıntılar ve çoklu filopodi ile yayılmış bir morfoloji göstermiştir [170]. Şekil 4.11(c)'de, PLA/BFO (hat) iskelesinde hücreler daha kalabalıktır ve hücre-hücre etkileşimleri ile hücre morfolojileri tam olarak görülmüştür. Hücre morfolojisindeki

değişikliklerin hücre aktivitesini gösterdiği ve bunun hücrelerin göç davranışını arttırdığı bilinmektedir [171]. Sonuç olarak, gözlenen güçlü yapışma ve proliferasyon ile tüm iskelelerin biyouyumluluğunun desteklendiği bu görüntülerden çıkarılabilir. Ayrıca, PLA/BFO (hat) iskelesi üzerindeki BFO hattı yakınında daha fazla hücre yoğunluğu ve hücre-hücre teması, BFO'nun hücre yönelimindeki etkisini göstermiştir.



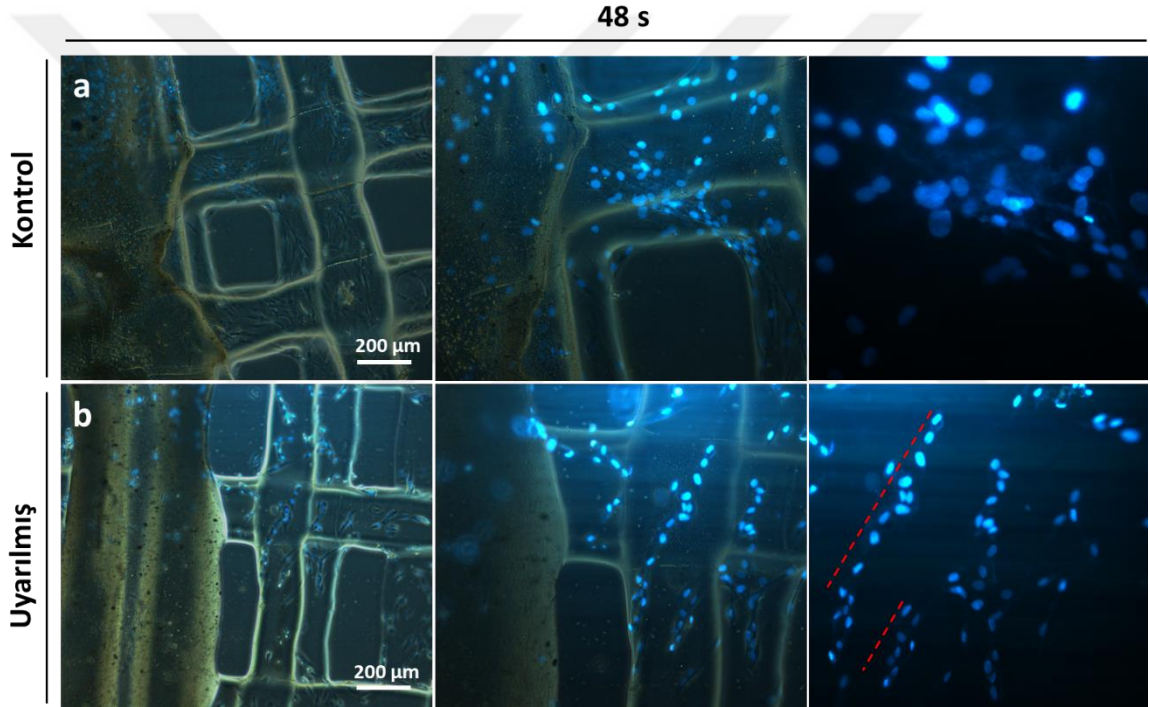
Şekil 4.11 Hücre büyümesinin 7. gününde kültürlenmiş 3B basılmış iskelelerin SEM görüntüleri: PLA (a), PLA/BFO (b), PLA/BFO (hat) (c)

4.4 3B Basılmış İskelelerde Kültürlenmiş hADMSC'lere Elektrik Stimülasyonu Uygulanması

Elektrik stimülasyonu, hADMSC ile kültürlenmiş 3B basılmış BFO hatlı PLA iskelesine uygulanmıştır. Elektrik uyarısını lokal olarak taşımak için BFO hatlı PLA iskelesi tercih edilmiştir. Deneysel bölümde belirtildiği gibi, 3B doku iskelesi 48 saat boyunca elektrik stimülasyonuna (8 V, 20 mA, 2 Hz frekans) maruz bırakılmıştır. Önceki çalışmalar, fizyolojik seviyenin üzerinde olan 1 V/cm ile 10 V/cm aralığında

elektrik stimölasyonunun, insan BMSC'lerinin göç oranını arttırdığını göstermiştir [122].

Şekil 4.12'deki mikroskop görüntüleri, 48 saat sonunda kontrol grubundaki hücrelerin iskelede rastgele bir dağılım sergilediğini (Şekil 4.12(a)); uyarılan hücrelerin ise BFO hattına doğru hizalandığını (Şekil 4.12(b)) açıkça göstermektedir. Bu, elektrik stimölasyonunun hücre hizalaması üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu ve rastgele hücreleri hizalanacak şekilde yönlendirdiğini kanıtlamaktadır [115], [116], [172]. Ayrıca BFO nanopartiküllerinin, nöral dokunun onarımı için transplante edilen hücreleri lezyon bölgesine yönlendirilmesinde etkili olduğu sonucuna varılabilir.



Şekil 4.12 48 saat sonunda kontrol (uyarılmamış) ve uyarılmış PLA/BFO (hat) iskelelerinin görüntüleri. Şekil 4.12(b)'deki çizgi, elektrik stimölasyonu ile hücrelerin BFO hattına doğru hizalanmasını gösterir.

5.1 Sonuçlar

Bu tez çalışmasında nöral doku mühendisliği uygulamaları için 3B baskı tekniği kullanılarak poli-laktik asit (PLA) polimeri ve bizmut ferrit (BFO) nanopartiküllerini içeren doku iskeleleri geliştirilmiştir. BFO nanopartikülleri basit ve düşük maliyetli bir yöntem olan birlikte çökelme ile sentezlenmiş ve hücreleri elektrik stimülasyonu ile yönlendirmek için doku iskelesine dahil edilmiştir. Üretilen BFO tozları ve 3B basılmış PLA, PLA/BFO ve PLA/BFO (hat) nöral iskelelerinin morfolojik, kimyasal, termal, mekanik ve sitotoksik özellikleri ayrıntılı olarak incelenmiş ve sonuçlar değerlendirilmiştir. Ayrıca elektrik stimülasyonunun, 3B basılmış BFO hatlı PLA iskelesinde kültürlenmiş hücreler üzerindeki etkisi de gözlemlenmiş ve değerlendirilmiştir.

DLS analizine göre, BFO partiküllerinin ortalama boyutu 144 nm olarak ölçülmüştür. Bu sonuç, BFO'nun birlikte çökelme yöntemi ile nano boyutta başarılı bir şekilde sentezlendiğini göstermektedir. BFO nanopartiküllerinin nispeten üniform bir boyut dağılımına sahip olduğu SEM analizinde görülmüştür. Ayrıca, EDX analizinde tüm partiküllerde bizmut ağırlıkça %71.5 ve demir ağırlıkça %10 olarak saptanmıştır.

3B basılmış PLA ve kompozitlerinin SEM görüntülerine göre, tüm iskeleler istenen gözenek boyutunda olup üniform bir morfoloji sergilemişlerdir. 3B baskı tekniği ile istenen gözenek boyutu ve geometride iskeleler başarılı bir şekilde üretilmiştir. Elde edilen görüntülerden, üretilen doku iskelelerinin hücre tutunması, göçü ve proliferasyonu destekleyebileceği; besin difüzyonu ve atık eliminasyonu sağlayabileceği sonucuna varılmıştır.

FTIR analizi sonucunda, BFO tozlarının ve PLA'nın karakteristik bantları görülmüştür. İskeleye BFO ilavesi, PLA piklerinin pozisyonunu hafif bir şekilde

kaydırmıştır. Bu, partiküllerin PLA çözeltileri içinde iyi bir şekilde dağıldığını göstermektedir.

DSC analizi, BFO tozlarının Bi_2O_3 ve Fe_2O_3 faz oluşumunu destekleyen ekzotermik pikini göstermiştir. BFO'nun PLA iskelesine eklenmesi, PLA'nın DSC eğrisinde soğuk kristalleşme sıcaklığını daha yüksek bir sıcaklığa kaydırmıştır. Bu, BFO'nun soğuk kristalizasyon işlemi için daha güçlü bir inhibisyona neden olduğunu göstermektedir.

XRD sonuçları, BFO nanopartiküllerinin karakteristik kristal yapısını ve BFO ve PLA arasındaki etkileşimlerin varlığını desteklemiştir. BFO'nun ortalama partikül büyüklüğü, XRD analiz verileri kullanılarak Debye-Scherrer formülü ile hesaplanmış ve 15 nm olarak bulunmuştur. Elde edilen sonucun DLS verilerinden farklı olması, DLS ölçümü için hazırlanan BFO süspansiyonunda meydana gelen aglomerasyonlardan kaynaklanmaktadır.

Çekme testi sonucunda, PLA iskelesine BFO eklenmesi PLA'nın elastisite modülünde düşüşe neden olmuştur. Bu düşüş, BFO varlığında PLA'nın kimyasal yapısının değişmesinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca BFO temelli kompozitler, saf PLA'dan daha düşük gerilme mukavemeti ile birlikte, kopmada çok daha düşük bir uzama sergilemiştir.

In vitro çalışmalar, 3B basılmış iskelelerin sitotoksik etkisinin olmadığını ve insan adipoz dokudan türetilmiş mezenkimal kök hücrelerin (hADMSC) proliferasyonunu desteklediğini göstermiştir. En yüksek hücre canlılığı, BFO ile harmanlanmış 3B basılmış iskelelerde gözlenmiştir. Ayrıca, hADMSC'lerin tüm iskelelere bağlandığı ve spesifik iş benzeri morfolojiler sergilediği SEM görüntüleri ile de desteklenmiştir.

BFO hatlı doku iskelesinin 48 saat boyunca elektrik stimülasyonuna maruz bırakılması sonucunda, uyarılan hücrelerin BFO hattına doğru hizalandığı görülmüştür. Bu, elektrik stimülasyonunun hücre hizalaması üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu ve BFO nanopartiküllerinin, nöral dokunun onarımı için hücreleri lezyon bölgesine yönlendirmede potansiyeli olduğunu gösterir.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında nöral doku mühendisliğinde kullanılmak üzere 3B basılmış BFO katkılı doku iskeleleri başarılı bir şekilde üretilmiş ve BFO

nanopartiküllerinin hücrelerle biyouyumluluğu ve hücre yönlendirme uygulamalarındaki potansiyeli gösterilmiştir.

5.2 Öneriler

- BFO partikül boyutu ölçümü, Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile desteklenebilir.
- Farklı elektrik stimülasyonu parametrelerinin mezenkimal kök hücreler üzerindeki etkisi araştırılabilir.
- Mezenkimal kök hücrelerin nöral dokulara farklılaşması için spesifik hücre farklılaştırma markerleri kullanılarak daha ileri in vitro çalışmalar yapılabilir.
- Çalışmanın nöral hasarlarının tedavisinde etkisini daha iyi araştırabilmek için in vivo çalışma ile desteklenebilir.

- [1] C. E. Schmidt and J. B. Leach, "Neural Tissue Engineering: Strategies for Repair and Regeneration," *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 5, no. 1, pp. 293–347, 2003.
- [2] C. R. Noback, N. L. Strominger, R. J. Demarest, and D. A. Ruggiero, *The Human Nervous System Structure and Function*, Sixth Edit. Humana Press Inc., 2005.
- [3] N. Zhang and X. Wen, "Neural tissue engineering and regenerative medicine," *Fundam. Tissue Eng. Regen. Med.*, pp. 271–288, 2009.
- [4] E. P. Oliveira, J. Silva-Correia, R. L. Reis, and J. M. Oliveira, "Biomaterials Developments for Brain Tissue Engineering," *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 1078, pp. 323–346, 2018.
- [5] M. B. Sandilyan and T. Dening, "Brain function, disease and dementia," *Nurs. Stand.*, vol. 29, no. 39, pp. 36–42, 2015.
- [6] L. Squire, D. Berg, and F. Bloom, *Fundamental Neuroscience*, Third Edit. 2008.
- [7] K. Chandar and B. K. Freeman, "Spinal Cord Anatomy," *Encycl. Neurol. Sci.*, vol. 4, pp. 254–263, 2014.
- [8] C. Gumerá, B. Rauck, and Y. Wang, "Materials for central nervous system regeneration: bioactive cues," *J. Mater. Chem. View*, vol. 21, 2011.
- [9] X. Li, E. Katsanevakis, X. Liu, N. Zhang, and X. Wen, "Engineering neural stem cell fates with hydrogel design for central nervous system regeneration," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 37, no. 8, pp. 1105–1129, 2012.
- [10] R. V. Bellamkonda, I. P. Clements, and J. M. Munson, *Neuronal Tissue Engineering*, Third Edit. Elsevier, 2013.
- [11] M. T. Fitch and J. Silver, "CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure," *Exp. Neurol.*, vol. 209, no. 2, pp. 294–301, 2008.
- [12] T. Qian, X. Guo, A. D. Levi, S. Vanni, R. T. Shebert, and M. L. Sipski, "Original Article High-dose methylprednisolone may cause myopathy in acute spinal cord injury patients," pp. 199–203, 2005.
- [13] Z. Liu *et al.*, "High-dose methylprednisolone for acute traumatic spinal cord injury," pp. 1–11, 2019.
- [14] R. Boni, A. Ali, A. Shavandi, and A. N. Clarkson, "Current and novel polymeric biomaterials for neural tissue engineering," *J. Biomed. Sci.*, vol. 25, no. 1, pp. 1–21, 2018.
- [15] W. Zhu, N. J. Castro, and L. G. Zhang, *Nanotechnology and 3D bioprinting for neural tissue regeneration*, 1st Editio. Elsevier Inc., 2015.
- [16] T. Bedir, S. Ulag, C. B. Ustundag, and O. Gunduz, "3D bioprinting applications in neural tissue engineering for spinal cord injury repair," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 110, p. 110741, 2020.

- [17] H. Cheng, Y. Cao, and L. Olson, "Spinal cord repair in adult paraplegic rats: Partial restoration of hind limb function," *Science (80-.)*, vol. 273, no. 5274, pp. 510–513, 1996.
- [18] U. Meyer, J. Handschel, T. Meyer, and H. P. Wiesmann, *Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2009.
- [19] K. Suzuki, Y. Suzuki, K. Ohnishi, K. Endo, M. Tanihara, and Y. Nishimura, "Regeneration of transected spinal cord in young adult rats using freeze- dried alginate gel," *Neuroreport*, vol. 10, no. 14, pp. 2891–2894, 1999.
- [20] L. Roseti *et al.*, "Scaffolds for Bone Tissue Engineering : State of the art and new perspectives," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 78, pp. 1246–1262, 2017.
- [21] V. Liu and T. Sangeeta, "Fabrication of Three-Dimensional Tissues," *Adv Biochem Engin/Biotechnol*, vol. 103, pp. 189–205, 2005.
- [22] T. Lu, Y. Li, and T. Chen, "Techniques for fabrication and construction of three-dimensional scaffolds for tissue engineering," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 8, pp. 337–350, 2013.
- [23] B. Subia, J. Kundu, and S. C., "Biomaterial Scaffold Fabrication Techniques for Potential Tissue Engineering Applications," *Tissue Eng.*, 2010.
- [24] A. Eltom, G. Zhong, and A. Muhammad, "Scaffold Techniques and Designs in Tissue Engineering Functions and Purposes: A Review," *Adv. Mater. Sci. Eng.*, vol. 2019, no. 4, pp. 1–13, 2019.
- [25] O. Abdelaal and S. M. H. Darwish, "Review of Rapid Prototyping Techniques for Tissue Engineering Scaffolds Fabrication," in *Characterization and Development of Biosystems and Biomaterials*, 2014, pp. 33–54.
- [26] H. N. Chia and B. M. Wu, "Recent advances in 3D printing of biomaterials," *J. Biol. Eng.*, vol. 9, no. 4, pp. 1–14, 2015.
- [27] Ž. P. Kačarević *et al.*, "An introduction to 3D bioprinting: Possibilities, challenges and future aspects," *Materials (Basel)*, vol. 11, no. 11, 2018.
- [28] O. A. Mohamed, S. H. Masood, and J. L. Bhowmik, "Optimization of fused deposition modeling process parameters : a review of current research and future prospects," *Adv. Manuf.*, vol. 3, pp. 42–53, 2015.
- [29] T. Billiet, M. Vandenhaute, J. Schelfhout, S. Van Vlierberghe, and P. Dubruel, "Biomaterials A review of trends and limitations in hydrogel-rapid prototyping for tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 33, no. 26, pp. 6020–6041, 2012.
- [30] J. Ai *et al.*, "Polymeric Scaffolds in Neural Tissue Engineering: A Review," *Arch. Neurosci.*, vol. 1, no. 1, pp. 15–20, 2013.
- [31] N. N. Madigan, S. McMahon, T. O'Brien, M. J. Yaszemski, and A. J. Windebank, "Current tissue engineering and novel therapeutic approaches to axonal regeneration following spinal cord injury using polymer scaffolds," *Respir. Physiol. Neurobiol.*, vol. 169, no. 2, pp. 183–199, 2009.
- [32] R. L. Dahlin, F. K. Kasper, D. Ph, A. G. Mikos, and D. Ph, "Polymeric Nanofibers

- in Tissue Engineering," *Tissue Eng. - Part B*, vol. 17, no. 5, pp. 349–364, 2011.
- [33] H. Patel, M. Bonde, and G. Srinivasan, "Biodegradable Polymer Scaffold for Tissue Engineering," *Trends Biomater. Artif. Organs*, vol. 25, no. 1, pp. 20–29, 2011.
 - [34] M. P. Prabhakaran, J. R. Venugopal, and S. Ramakrishna, "Biomaterials Mesenchymal stem cell differentiation to neuronal cells on electrospun nanofibrous substrates for nerve tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 30, no. 28, pp. 4996–5003, 2009.
 - [35] D. J. Responde, R. M. Natoli, and K. A. Athanasiou, "Identification of potential biophysical and molecular signalling mechanisms underlying hyaluronic acid enhancement of cartilage formation," *J. R. Soc. Interface*, vol. 9, pp. 3564–3573, 2012.
 - [36] S. M. Willerth, "Neural tissue engineering using embryonic and induced pluripotent stem cells," *Willerth Stem Cell Res. Ther.*, vol. 2, no. 17, pp. 1–9, 2011.
 - [37] V. Vindigni, R. Cortivo, L. Iacobellis, G. Abatangelo, and B. Zavan, "Hyaluronan Benzyl Ester as a Scaffold for Tissue Engineering," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 10, no. 7, pp. 2972–2985, 2009.
 - [38] E. K. Purcell, D. Ph, A. Singh, B. Tech, D. R. Kipke, and D. Ph, "Alginate Composition Effects on a Neural Stem Cell – Seeded Scaffold," *Tissue Eng. Part C*, vol. 15, no. 4, pp. 541–550, 2009.
 - [39] S. K. Vishwakarma, A. Bardia, S. K. Tiwari, S. A. B. Paspala, and A. A. Khan, "Current concept in neural regeneration research: NSCs isolation, characterization and transplantation in various neurodegenerative diseases and stroke : A review," *J. Adv. Res.*, vol. 5, no. 3, pp. 277–294, 2014.
 - [40] B. P. M. George, D. A. Lavan, J. A. Burdick, C. Chen, E. Liang, and R. Langer, "Electrically Controlled Drug Delivery from Biotin-Doped Conductive Polypyrrole," *Adv. Mater.*, vol. 18, pp. 577–581, 2006.
 - [41] A. Wang *et al.*, "Induced pluripotent stem cells for neural tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 32, no. 22, pp. 5023–5032, 2011.
 - [42] S. Y. Chew, R. Mi, A. Hoke, and K. W. Leong, "The effect of the alignment of electrospun fibrous scaffolds on Schwann cell maturation," *Biomaterials*, vol. 29, no. 6, pp. 653–661, 2008.
 - [43] D. Gupta *et al.*, "Aligned and random nanofibrous substrate for the in vitro culture of Schwann cells for neural tissue engineering," *Acta Biomater.*, vol. 5, no. 7, pp. 2560–2569, 2009.
 - [44] Q. Ao *et al.*, "The regeneration of transected sciatic nerves of adult rats using chitosan nerve conduits seeded with bone marrow stromal cell-derived Schwann cells," *Biomaterials*, vol. 32, no. 3, pp. 787–796, 2011.
 - [45] L. Flynn, P. D. Dalton, and M. S. Shoichet, "Fiber templating of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) for neural tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 24, no. 23, pp. 4265–4272, 2003.

- [46] X. Li, E. Katsanevakis, X. Liu, N. Zhang, and X. Wen, "Engineering neural stem cell fates with hydrogel design for central nervous system regeneration," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 37, no. 8, pp. 1105–1129, 2012.
- [47] G. A. A. Saracino, D. Cigognini, D. Silva, A. Caprini, and F. Gelain, "Nanomaterials design and tests for neural tissue engineering," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 42, no. 1, pp. 225–262, 2013.
- [48] G. Q. Chen and Q. Wu, "The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials," *Biomaterials*, vol. 26, no. 33, pp. 6565–6578, 2005.
- [49] D. Daranarong, R. T. H. Chan, N. S. Wanandy, R. Molloy, W. Punyodom, and L. J. R. Foster, "Electrospun polyhydroxybutyrate and poly(L-lactide-co- ϵ -caprolactone) composites as nanofibrous scaffolds," *Biomed Res. Int.*, vol. 2014, 2014.
- [50] X. Y. Xu *et al.*, "The behaviour of neural stem cells on polyhydroxyalkanoate nanofiber scaffolds," *Biomaterials*, vol. 31, no. 14, pp. 3967–3975, 2010.
- [51] C. Lou and Y. Chen, "Manufacturing and Properties of PLA Absorbable Surgical Suture Abstract," vol. 78, no. 11, pp. 958–965, 2008.
- [52] E. J. Chong, T. T. Phan, I. J. Lim, Y. Z. Zhang, and B. H. Bay, "Evaluation of electrospun PCL/gelatin nanofibrous scaffold for wound healing and layered dermal reconstitution," *Acta Biomater.*, vol. 3, pp. 321–330, 2007.
- [53] S. E. Gautier *et al.*, "Poly (α -hydroxyacids) for application in the spinal cord : Resorbability and biocompatibility with adult rat Schwann cells and spinal cord," *John Wiley Sons, Inc.*, vol. 42, no. 4, pp. 642–54, 1998.
- [54] C. Zeng, Y. Xiong, G. Xie, P. Dong, and D. Quan, "Fabrication and Evaluation of PLLA Multichannel Conduits with Nanofibrous Microstructure for the Differentiation of NSCs In Vitro," *Tissue Eng. - Part A*, vol. 20, no. 5, pp. 1038–1048, 2014.
- [55] S. Liu, X. Sun, T. Wang, S. Chen, C. Zeng, and G. Xie, "Nano- fibrous and ladder-like multi-channel nerve conduits : Degradation and modification by gelatin," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 83, pp. 130–142, 2018.
- [56] X. Zhou, A. Yang, Z. Huang, G. Yin, X. Pu, and J. Jin, "Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Enhancement of neurite adhesion , alignment and elongation on conductive polypyrrole-poly (lactide acid) fibers with cell-derived extracellular matrix," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 149, pp. 217–225, 2017.
- [57] J. M. Karp, P. D. Dalton, and M. S. Shoichet, "Scaffolds for tissue engineering," *MRS Bull.*, vol. 28, no. 4, pp. 301–306, 2003.
- [58] D. Y. Kim *et al.*, "In vivo effects of adipose-derived stem cells in inducing neuronal regeneration in Sprague-Dawley rats undergoing nerve defect bridged with polycaprolactone nanotubes," *J. Korean Med. Sci.*, vol. 29, pp. 183–192, 2014.
- [59] M. Oudega *et al.*, "Axonal regeneration into Schwann cell grafts within resorbable poly (α -hydroxyacid) guidance channels in the adult rat spinal

- cord," *Biomaterials*, vol. 22, pp. 1125–1136, 2001.
- [60] C. M. Patist, M. B. Mulder, S. E. Gautier, V. Maquet, R. Jérôme, and M. Oudega, "Freeze-dried poly(D,L-lactic acid) macroporous guidance scaffolds impregnated with brain-derived neurotrophic factor in the transected adult rat thoracic spinal cord," *Biomaterials*, vol. 25, no. 9, pp. 1569–1582, 2004.
 - [61] B. Blits, A. Hurtado, L. D. F. Moon, R. Je, and M. Oudega, "Poly (D,L-lactic acid) macroporous guidance scaffolds seeded with Schwann cells genetically modified to secrete a bi-functional neurotrophin implanted in the completely transected adult rat thoracic spinal cord," *Biomaterials*, vol. 27, pp. 430–442, 2006.
 - [62] H. B. Wang *et al.*, "Creation of highly aligned electrospun poly-L-lactic acid fibers for nerve regeneration applications," *J. Neural Eng.*, vol. 6, pp. 1–15, 2009.
 - [63] S. H. Bhang *et al.*, "Electroactive Electrospun Polyaniline/Poly [(L-lactide)-co-(caprolactone)] Fibers for Control of Neural Cell Function," *Macromol. Biosci.*, vol. 12, pp. 402–411, 2012.
 - [64] A. Fraczek-Szczypta, "Carbon nanomaterials for nerve tissue stimulation and regeneration," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 34, no. 1, pp. 35–49, 2014.
 - [65] Se-Jun Lee *et al.*, "3D printing nano conductive multi-walled carbon nanotube scaffolds for nerve regeneration," *J. Neural Eng.*, vol. 15, no. 1, pp. 0–12, 2018.
 - [66] Y. Qian *et al.*, "3D Fabrication with Integration Molding of a Graphene Oxide/ Polycaprolactone Nanoscaffold for Neurite Regeneration and Angiogenesis," *Adv. Sci.*, vol. 5, no. 4, p. 1700499, 2018.
 - [67] N. Golafshan, M. Kharaziha, and M. Fathi, "Tough and conductive hybrid graphene-PVA : Alginate fibrous scaffolds for engineering neural construct," *Carbon N. Y.*, vol. 111, pp. 752–763, 2017.
 - [68] O. Akhavan, "Graphene scaffolds in progressive nanotechnology/stem cell-based tissue engineering of the nervous system," *J. Mater. Chem. B*, vol. 4, no. 19, pp. 3169–3190, 2016.
 - [69] A. E. Jakus, E. B. Secor, A. L. Rutz, S. W. Jordan, and M. C. Hersam, "Three-Dimensional Printing of High-Content Graphene Scaffolds for Electronic and Biomedical Applications," *ACS Nano*, vol. 9, no. 4, pp. 4636–4648, 2015.
 - [70] C. Yang *et al.*, "Graphene oxide promotes the differentiation of mouse embryonic stem cells to dopamine neurons," *Nanomedicine*, vol. 9, no. 16, pp. 2445–2455, 2014.
 - [71] X. Gu, F. Ding, Y. Yang, and J. Liu, "Progress in Neurobiology Construction of tissue engineered nerve grafts and their application in peripheral nerve regeneration," *Prog. Neurobiol. J.*, vol. 93, pp. 204–230, 2011.
 - [72] K. R. Jessen and R. Mirsky, "The origin and development of glial cells in peripheral nerves," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 6, no. 9, pp. 671–682, 2005.
 - [73] X. Li, S. L. Gonias, and W. M. Campana, "Schwann cells express erythropoietin receptor and represent a major target for Epo in peripheral nerve injury," *Glia*,

vol. 51, no. 4, pp. 254–265, 2005.

- [74] A. Mosahebi, B. Woodward, M. Wiberg, R. Martin, and G. Terenghi, “Retroviral labeling of Schwann cells: In vitro characterization and in vivo transplantation to improve peripheral nerve regeneration,” *Glia*, vol. 34, no. 1, pp. 8–17, 2001.
- [75] M. Schuldiner, R. Eiges, A. Eden, O. Yanuka, and J. Itskovitz-eldor, “Induced neuronal differentiation of human embryonic stem cells,” *Brain Res.*, vol. 913, pp. 201–205, 2001.
- [76] G. Alessandri, C. Emanuelli, and P. Madeddu, “Genetically engineered stem cell therapy for tissue regeneration,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1015, pp. 271–284, 2004.
- [77] R. Hass, C. Kasper, S. Böhm, and R. Jacobs, “Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC,” *Cell Commun. Signal.*, vol. 9, no. 12, pp. 1–14, 2011.
- [78] R. J. Waddington, S. J. Youde, C. P. Lee, and A. J. Sloan, “Isolation of Distinct Progenitor Stem Cell Populations from Dental Pulp,” *Cells Tissues Organs*, vol. 189, pp. 268–274, 2009.
- [79] A. Alhadlaq and J. J. Mao, “Mesenchymal Stem Cells: Isolation and Therapeutics,” *Stem Cells Dev.*, vol. 13, pp. 436–448, 2004.
- [80] F. S. Y. Wong and A. C. Y. Lo, “Collagen-Based Scaffolds for Cell Therapies in the Injured Brain,” *J. Stem Cell Res. Ther.*, vol. 5, no. 2, pp. 1–10, 2015.
- [81] A. I. Caplan and J. E. Dennis, “Mesenchymal Stem Cells as Trophic Mediators,” *J. Cell. Biochem.*, vol. 98, pp. 1076–1084, 2006.
- [82] J. R. Thonhoff, D. I. Lou, P. M. Jordan, X. Zhao, and P. Wu, “Compatibility of human fetal neural stem cells with hydrogel biomaterials in vitro,” *Brain Res.*, vol. 1187, pp. 42–51, 2007.
- [83] A. Hasan, G. Deeb, R. Rahal, K. Atwi, and S. Mondello, “Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Traumatic Brain Injury,” *Front. Neurol.*, vol. 8, no. 28, pp. 1–15, 2017.
- [84] Y. Li and M. Chopp, “Marrow stromal cell transplantation in stroke and traumatic brain injury,” *Neurosci. Lett.*, vol. 456, pp. 120–123, 2009.
- [85] T. Gordon, “The role of neurotrophic factors in nerve regeneration,” *Neurosurg Focus*, vol. 26, no. 2, pp. 1–10, 2009.
- [86] C. Deister and C. E. Schmidt, “Optimizing neurotrophic factor combinations for neurite outgrowth,” *J. Neural Eng.*, vol. 3, pp. 172–179, 2006.
- [87] S. Grossemy, P. P. Y. Chan, and P. M. Doran, “Electrical stimulation of cell growth and neurogenesis using conductive and nonconductive microfibrillar scaffolds,” *Integr. Biol.*, pp. 1–16, 2019.
- [88] R. H. W. Funk, “Endogenous electric fields as guiding cue for cell migration,” *Front. Physiol.*, vol. 6, pp. 1–8, 2015.
- [89] M. Levin, “Molecular bioelectricity: how endogenous voltage potentials control cell behavior and instruct pattern regulation in vivo,” *Mol. Biol. Cell*,

vol. 25, pp. 3835–3850, 2014.

- [90] B. Song, Y. Gu, J. Pu, B. Reid, Z. Zhao, and M. Zhao, “Application of direct current electric fields to cells and tissues in vitro and modulation of wound electric field in vivo,” *Nat. Protoc.*, vol. 2, no. 6, pp. 1479–1789, 2007.
- [91] F. Ma *et al.*, “Accelerating proliferation of neural stem/progenitor cells in collagen sponges immobilized with engineered basic fibroblast growth factor for nervous system tissue engineering,” *Biomacromolecules*, vol. 15, no. 3, pp. 1062–1068, 2014.
- [92] M. Zhao, “Electrical fields in wound healing-An overriding signal that directs cell migration,” *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 20, no. 6, pp. 674–682, 2009.
- [93] M. R. Love, S. Palee, S. C. Chattipakorn, and N. Chattipakorn, “Effects of electrical stimulation on cell proliferation and apoptosis,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 233, no. 3, pp. 1860–1876, 2018.
- [94] S. Yao, X. Liu, X. Wang, A. Merolli, X. Chen, and F. Cui, “Directing neural stem cell fate with biomaterial parameters for injured brain regeneration,” *Prog. Nat. Sci. Mater. Int.*, vol. 23, no. 2, pp. 103–112, 2013.
- [95] P. M. George *et al.*, “Electrical preconditioning of stem cells with a conductive polymer scaffold enhances stroke recovery,” *Biomaterials*, vol. 142, pp. 31–40, 2017.
- [96] S. Song *et al.*, “Controlling properties of human neural progenitor cells using 2D and 3D conductive polymer scaffolds,” *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–12, 2019.
- [97] M. P. Willand, “Electrical stimulation enhances reinnervation after nerve injury,” *Eur. J. Transl. Myol.*, vol. 25, no. 4, p. 243, 2015.
- [98] S. K. Boda, G. Thrivikraman, and B. Basu, “Magnetic field assisted stem cell differentiation - Role of substrate magnetization in osteogenesis,” *J. Mater. Chem. B*, vol. 3, no. 16, pp. 3150–3168, 2015.
- [99] N. Li *et al.*, “Three-dimensional graphene foam as a biocompatible and conductive scaffold for neural stem cells,” *Sci. Rep.*, vol. 3, pp. 1–6, 2013.
- [100] T. A. Rando and F. Ambrosio, “Regenerative Rehabilitation: Applied Biophysics Meets Stem Cell Therapeutics,” *Cell Stem Cell*, vol. 22, no. 3, pp. 306–309, 2018.
- [101] C. Chen, X. Kong, and I. S. Lee, “Modification of surface/neuron interfaces for neural cell-type specific responses: A review,” *Biomed. Mater.*, vol. 11, no. 1, p. 14108, 2015.
- [102] S. Ding, P. Kingshott, H. Thissen, M. Pera, and P. Y. Wang, “Modulation of human mesenchymal and pluripotent stem cell behavior using biophysical and biochemical cues: A review,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 114, no. 2, pp. 260–280, 2017.
- [103] C. Jaatinen, “The Effect of an Applied Electric Current on Cell Proliferation, Viability, Morphology, Adhesion, and Stem Cell Differentiation,” 2017.
- [104] I. Titushkin and M. Cho, “Regulation of cell cytoskeleton and membrane

- mechanics by electric field: Role of linker proteins," *Biophys. J.*, vol. 96, no. 2, pp. 717–728, 2009.
- [105] H. Samadian, S. S. Zakariaee, M. Adabi, H. Mobasheri, M. Azami, and R. Faridi-Majidi, "Effective parameters on conductivity of mineralized carbon nanofibers: an investigation using artificial neural networks," *RSC Adv.*, vol. 6, no. 113, pp. 111908–111918, 2016.
- [106] M. P. Prabhakaran, L. Ghasemi-Mobarakeh, G. Jin, and S. Ramakrishna, "Electrospun conducting polymer nanofibers and electrical stimulation of nerve stem cells," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 112, no. 5, pp. 501–507, 2011.
- [107] C. Chen, X. Bai, Y. Ding, and I. S. Lee, "Electrical stimulation as a novel tool for regulating cell behavior in tissue engineering," *Biomater. Res.*, vol. 23, no. 1, pp. 1–12, 2019.
- [108] J. J. Vaca-González, J. M. Guevara, J. F. Vega, and D. A. Garzón-Alvarado, "An In Vitro Chondrocyte Electrical Stimulation Framework: A Methodology to Calculate Electric Fields and Modulate Proliferation, Cell Death and Glycosaminoglycan Synthesis," *Cell. Mol. Bioeng.*, vol. 9, no. 1, pp. 116–126, 2016.
- [109] R. Balint, N. J. Cassidy, and S. H. Cartmell, "Electrical stimulation: A novel tool for tissue engineering," *Tissue Eng. - Part B Rev.*, vol. 19, no. 1, pp. 48–57, 2013.
- [110] M. Sommer, T. Kamm, F. Tergau, G. Ulm, and W. Paulus, "Repetitive paired-pulse transcranial magnetic stimulation affects corticospinal excitability and finger tapping in Parkinson's disease," *Clin. Neurophysiol.*, vol. 113, pp. 944–950, 2002.
- [111] J. Kim, H. Joo, Y. Tae, H. Cho, and S. Eun, "Enhanced regeneration of rabbit mandibular defects through a combined treatment of electrical stimulation and rhBMP-2 application," *Med Biol Eng Comput*, vol. 51, pp. 1339–1348, 2013.
- [112] D. Siegel, S. M. Baca, D. C. Thompson, M. M. Huntsman, M. M. Mower, and D. Ross, "The effect of anodal/cathodal biphasic electrical stimulation on insulin release," *J Cell Physiol.*, vol. 234, no. 9, pp. 16389–16399, 2019.
- [113] C. L. Ross, "The use of electric, magnetic, and electromagnetic field for directed cell migration and adhesion in regenerative medicine," *Biotechnol. Prog.*, vol. 33, no. 1, pp. 5–16, 2017.
- [114] Y. Li *et al.*, "Engineering cell alignment in vitro," *Biotechnol. Adv.*, vol. 32, no. 2, pp. 347–365, 2014.
- [115] U. H. Ko, S. Park, H. Bang, M. Kim, H. Shin, and J. H. Shin, "Promotion of Myogenic Maturation by Timely Application of Electric Field Along the Topographical Alignment," *Tissue Eng. - Part A*, vol. 24, no. 9–10, pp. 752–760, 2018.
- [116] Y. Ganji, Q. Li, E. S. Quabius, M. Böttner, C. Selhuber-Unkel, and M. Kasra, "Cardiomyocyte behavior on biodegradable polyurethane/gold nanocomposite scaffolds under electrical stimulation," *Mater. Sci. Eng. C*, vol.

- 59, pp. 10–18, 2016.
- [117] Z. Zhao, L. Qin, B. Reid, J. Pu, T. Hara, and M. Zhao, "Directing migration of endothelial progenitor cells with applied DC electric fields," *Stem Cell Res.*, vol. 8, no. 1, pp. 38–48, 2012.
 - [118] R. Tzoneva, "Influence of electric field on cell behavior . Electrotreatment of cells for biomedical applications," *Asian J. Phys.*, vol. 23, no. 6, pp. 789–814, 2014.
 - [119] J. F. Feng *et al.*, "Brief report: Guided migration of neural stem cells derived from human embryonic stem cells by an electric field," *Stem Cells*, vol. 30, no. 2, pp. 349–355, 2012.
 - [120] S. N. Iwasa, R. Babona-Pilipos, and C. M. Morshead, "Environmental Factors That Influence Stem Cell Migration: An 'electric Field,'" *Stem Cells Int.*, vol. 2017, pp. 1–9, 2017.
 - [121] K. Jezierska-Woźniak *et al.*, "Migration of human mesenchymal stem cells stimulated with pulsed electric field and the dynamics of the cell surface glycosylation," *Adv. Clin. Exp. Med.*, vol. 27, no. 9, pp. 1181–1193, 2018.
 - [122] T. A. Banks, P. Luckman, J. E. Frith, and J. J. Cooper-White, "Effects of electric fields on human mesenchymal stem cell behaviour and morphology using a novel multichannel device," *Integr. Biol.*, vol. 7, no. 6, pp. 693–712, 2015.
 - [123] B. Kapeller, J. Mueller, U. Losert, B. K. Podesser, and K. Macfelda, "Microcurrent stimulation promotes reverse remodelling in cardiomyocytes," *ESC Hear. Fail.*, vol. 3, no. 2, pp. 122–130, 2016.
 - [124] F. Pires, Q. Ferreira, C. A. V. Rodrigues, J. Morgado, and F. C. Ferreira, "Neural stem cell differentiation by electrical stimulation using a cross-linked PEDOT substrate: Expanding the use of biocompatible conjugated conductive polymers for neural tissue engineering," *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 1850, no. 6, pp. 1158–1168, 2015.
 - [125] J. Kobolak, A. Dinnyes, A. Memic, A. Khademhosseini, and A. Mobasheri, "Mesenchymal stem cells: Identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro-engineering of their niche," *Methods*, vol. 99, pp. 62–68, 2016.
 - [126] A. V. Naumova, M. Modo, A. Moore, C. E. Murry, and J. A. Frank, "Clinical imaging in regenerative medicine," *Nat. Biotechnol.*, vol. 32, no. 8, pp. 804–818, 2014.
 - [127] C. Zhao, A. Tan, G. Pastorin, and H. K. Ho, "Nanomaterial scaffolds for stem cell proliferation and differentiation in tissue engineering," *Biotechnol. Adv.*, vol. 31, no. 5, pp. 654–668, 2013.
 - [128] Y. Wang *et al.*, "Modulation of Osteogenesis in MC3T3-E1 Cells by Different Frequency Electrical Stimulation," *PLoS One*, vol. 11, no. 5, p. e0154924, 2016.
 - [129] A. Kumar, K. C. Nune, and R. D. K. Misra, "Electric field-mediated growth of osteoblasts-the significant impact of dynamic flow of medium," *Biomater. Sci.*,

vol. 4, no. 1, pp. 136–144, 2016.

- [130] W. Zhu *et al.*, “Enhanced neural stem cell functions in conductive annealed carbon nanofibrous scaffolds with electrical stimulation,” *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 14, no. 7, pp. 2485–2494, 2018.
- [131] Z. Huang, Z. Guo, M. Sun, H. Li, and S. Fang, “A study on graphene composites for peripheral nerve injury repair under electrical stimulation,” *RSC Adv.*, vol. 9, pp. 28627–28635, 2019.
- [132] J. F. Scott, *Ferroelectric Memories*. Springer, 2000.
- [133] M. Sakar, S. Balakumar, P. Saravanan, and S. N. Jaisankar, “Annealing temperature mediated physical properties of bismuth ferrite (BiFeO_3) nanostructures synthesized by a novel wet chemical method,” *Mater. Res. Bull.*, vol. 48, no. 8, pp. 2878–2885, 2013.
- [134] M. Y. Shami, M. S. Awan, and M. Anis-ur-rehman, “Phase pure synthesis of BiFeO_3 nanopowders using diverse precursor via co-precipitation method,” *J. Alloys Compd.*, vol. 509, pp. 10139–10144, 2011.
- [135] J. Wang, J. B. Neaton, H. Zheng, V. Nagarajan, and S. B. Ogale, “Epitaxial BiFeO_3 Multiferroic Thin Heterostructures,” *Science (80-.)*, vol. 299, no. 5613, pp. 1719–1722, 2012.
- [136] J. Dho and M. G. Blamire, “Controlling the exchange bias in multiferroic BiFeO_3 and NiFe bilayers Controlling the exchange bias in multiferroic BiFeO_3 and NiFe bilayers,” *J. Appl. Phys.*, vol. 106, pp. 1–5, 2009.
- [137] Y. P. Wang, L. Zhou, M. F. Zhang, X. Y. Chen, J. Liu, and Z. G. Liu, “Room-temperature saturated ferroelectric polarization in BiFeO_3 ceramics synthesized by rapid liquid phase sintering,” *Appl. Phys. Lett.*, vol. 84, no. 10, pp. 1731–1733, 2004.
- [138] V. Khomchenko, V. Shvartsman, P. Borisov, and W. Kleemann, “Crystal structure and magnetic properties,” *J. Phys. D Appl. Phys.*, vol. 42, p. 6, 2009.
- [139] A. J. C. Buurma, G. R. Blake, T. T. M. Palstra, and U. Adem, “Multiferroic Materials: Physics and Properties,” in *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*, Elsevier Ltd., 2016, pp. 1–17.
- [140] A. G. Gavriliuk, V. V. Struzhkin, I. S. Lyubutin, M. Y. Hu, and H. K. Mao, “Phase Transition with Suppression of Magnetism,” *JETP Lett.*, vol. 82, no. 4, pp. 243–246, 2005.
- [141] P. Taylor and J. Silva, “An BiFeO_3 : A Review on Synthesis , Doping and Crystal Structure BiFeO_3 : A Review on Synthesis , Doping and Crystal Structure,” *Integr. Ferroelectr.*, vol. 126, no. 1, pp. 37–41, 2011.
- [142] C. Freire and C. Pereira, “Multifunctional Ferrite Nanoparticles: From Current Trends Toward the Future 3.1,” in *Magnetic Nanostructured Materials*, 2018, pp. 59–116.
- [143] R. Massart, “Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media,” *IEEE Trans. Magn.*, vol. 17, no. 2, pp. 1980–1981, 1981.

- [144] L. Tamayo, H. Palza, J. Bejarano, and P. A. Zapata, "Polymer Composites With Metal Nanoparticles: Synthesis, Properties, and Applications. Synthesis, Properties, and Applications," in *Polymer Composites with Functionalized Nanoparticles: Synthesis, Properties, and Applications*, Elsevier Inc., 2018, pp. 249–286.
- [145] T. Gao, Z. Chen, Q. Huang, F. Niu, X. Huang, and L. Qin, "A review: Preparation of bismuth ferrite nanoparticles and its applications in visible-light induced photocatalyses," *Rev. Adv. Mater. Sci.*, vol. 40, no. 2, pp. 97–109, 2015.
- [146] Malvern Panalytical Ltd., "Dynamic light scattering: An introduction in 30 minutes. Tecnical note (MRK656-01)," 2018.
- [147] S. Vijayavenkataraman, S. Thaharah, S. Zhang, W. F. Lu, and J. Y. H. Fuh, "3D-Printed PCL/rGO Conductive Scaffolds for Peripheral Nerve Injury Repair," *Artif. Organs*, vol. 43, no. 5, pp. 515–523, 2019.
- [148] S. D. Adams, A. Ashok, R. K. Kanwar, J. R. Kanwar, and A. Z. Kouzani, "Integrated 3D printed scaffolds and electrical stimulation for enhancing primary human cardiomyocyte cultures," *Bioprinting*, vol. 6, pp. 18–24, 2017.
- [149] C. Aydin, H. Aydin, and M. Taskin, "Low-temperature Synthesis and Characterization of Bismuth Ferrite/Graphene Oxide Nano electroceramics by the Hydrothermal Method," *J. Phys. Chem. Funct. Mater.*, vol. 1, no. 1, pp. 102–116, 2018.
- [150] M. Muneeswaran, P. Jegatheesan, and N. V. Giridharan, "Synthesis of nanosized BiFeO₃ powders by co-precipitation method," *J. Exp. Nanosci.*, vol. 8, no. 3, pp. 341–346, 2013.
- [151] Y. She, W. Luo, L. Zhu, N. Wang, H. Tang, and M. Cao, "Efficient Removal of Organic Pollutants with Magnetic Nanoscaled BiFeO₃ as a Reusable Heterogeneous Fenton-Like Catalyst," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 44, no. 5, pp. 1786–1791, 2010.
- [152] A. M. Pandele, A. Constantinescu, I. C. Radu, F. Miculescu, S. I. Voicu, and L. T. Ciocan, "Synthesis and Characterization of PLA-Micro-structured Hydroxyapatite Composite Films," *Materials (Basel)*, vol. 13, no. 2, pp. 1–13, 2020.
- [153] A. V. Mikhailov, N. A. Gribchenkova, E. N. Kolosov, A. R. Kaul, and A. S. Alikhanyan, "Mass Spectrometric Investigation of Vaporization in the Bi₂O₃ – Fe₂O₃ System," *Chem. Thermodyn. Thermochem. mass*, vol. 85, no. 1, pp. 31–35, 2011.
- [154] B. W. Chieng, N. A. Ibrahim, Y. Y. Then, and Y. Y. Loo, "Epoxidized Vegetable Oils Plasticized Poly(lactic acid) Biocomposites: Mechanical, Thermal and Morphology Properties," *Molecules*, vol. 19, pp. 16024–16038, 2014.
- [155] H. Zhang *et al.*, "Preparation, characterization and properties of PLA/TiO₂ nanocomposites based on a novel vane extruder," *RSC Adv.*, vol. 5, no. October, pp. 4639–4647, 2014.
- [156] S. Godara, N. Sinha, G. Ray, and B. Kumar, "Combined structural, electrical,

- magnetic and optical characterization of bismuth ferrite nanoparticles synthesized by auto-combustion route," *J. Asian Ceram. Soc.*, vol. 2, no. 4, pp. 416–421, 2014.
- [157] S. K. Srivastav and N. S. Gajbhiye, "Low temperature synthesis, structural, optical and magnetic properties of bismuth ferrite nanoparticles," *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 95, no. 11, pp. 3678–3682, 2012.
- [158] A. Hartono, S. Satira, M. Djamal, R. Ramli, H. Bahar, and E. Sanjaya, "Effect of Mechanical Treatment Temperature on Electrical Properties and Crystallite Size of PVDF Film," *Adv. Mater. Phys. Chem.*, vol. 03, no. 01, pp. 71–76, 2013.
- [159] D. C. Jia, J. H. Xu, H. Ke, W. Wang, and Y. Zhou, "Structure and multiferroic properties of BiFeO₃ powders," *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 29, no. 14, pp. 3099–3103, 2009.
- [160] J. E. Oliveira, L. H. C. Mattoso, W. J. Orts, and E. S. Medeiros, *Structural and Morphological Characterization of Micro and Nanofibers Produced by Electrospinning and Solution Blow Spinning : A Comparative Study*, vol. 1. 2013.
- [161] M. Puchalski, S. Kwolek, G. Szparaga, and M. Chrzanowski, "Investigation of the Influence of PLA Molecular Structure on the Crystalline Forms (α' and α) and Mechanical Properties of Wet Spinning Fibres," *Polymers (Basel)*, vol. 9, no. 18, pp. 1–13, 2017.
- [162] S. Jia, D. Yu, Y. Zhu, Z. Wang, L. Chen, and L. Fu, "Morphology, Crystallization and Thermal Behaviors of PLA-Based Composites: Wonderful Effects of Hybrid GO/PEG via Dynamic Impregnating," *Polymers (Basel)*, vol. 9, no. 528, pp. 1–18, 2017.
- [163] T. Farid, V. N. Herrera, and O. Kristiina, "Investigation of crystalline structure of plasticized poly(lactic acid)/Banana nanofibers composites Investigation of crystalline structure of plasticized poly (lactic acid)/Banana nanofibers composites," *Mater. Sci. Eng.*, vol. 369, p. 012031, 2018.
- [164] C. Hsu, A. Serio, N. Amdursky, C. Besnard, and M. M. Stevens, "Fabrication of Hemin-Doped Serum Albumin-Based Fibrous Scaffolds for Neural Tissue Engineering Applications," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 10, p. 5305–5317, 2018.
- [165] M. Gordon, N. Levicar, M. Pai, P. Bachellier, and I. Dimarakis, "Characterization and Clinical Application of Human CD34+ Stem/Progenitor Cell Populations Mobilized into the Blood by Granulocyte Colony-Stimulating Factor," *Stem Cells*, vol. 24, pp. 1822–1830, 2006.
- [166] S. Intaraprasit, A. Faikrua, A. Sittichokechaiwut, and J. Viyoch, "Efficacy evaluation of the fibroblast-seeded collagen/chitosan scaffold on application in skin tissue engineering," *ScienceAsia*, vol. 38, no. 3, pp. 268–277, 2012.
- [167] M. Alksne *et al.*, "The effect of larger than cell diameter polylactic acid surface patterns on osteogenic differentiation of rat dental pulp stem cells," *J Biomed Mater Res Part A*, vol. 9999, pp. 1–13, 2018.
- [168] S. J. Heo, S. E. Szczesny, D. H. Kim, K. S. Saleh, and R. L. Mauck, "Expansion of

- mesenchymal stem cells on electrospun scaffolds maintains stemness, mechano-responsivity, and differentiation potential,” *J. Orthop. Res.*, vol. 36, no. 2, pp. 808–815, 2018.
- [169] H. Dennaoui, E. Chouery, H. Rammal, Z. Abdel-Razzak, and C. Harmouch, “Chitosan/hyaluronic acid multilayer films are biocompatible substrate for wharton’s jelly derived stem cells,” *Stem Cell Investig.*, vol. 5, no. 47, pp. 1–8, 2018.
- [170] M. Chatzinikolaidou *et al.*, “Adhesion and growth of human bone marrow mesenchymal stem cells on precise-geometry 3D organic-inorganic composite scaffolds for bone repair,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 48, pp. 301–309, 2015.
- [171] S. Shi and S. Gronthos, “Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells,” *Stem Cells Craniofacial Dev. Regen.*, pp. 223–239, 2013.
- [172] S. Shao *et al.*, “Osteoblast function on electrically conductive electrospun PLA/MWCNTs nanofibers,” *Biomaterials*, vol. 32, no. 11, pp. 2821–2833, 2011.

İletişim Bilgisi: tubabedirr@gmail.com

Makale

1. T. Bedir, S. Ulag, C. B. Ustundag, and O. Gunduz, "3D bioprinting applications in neural tissue engineering for spinal cord injury repair," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 110, p. 110741, 2020.

