



**T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GELİŞMİŞ ÖZELLİKLERİ OLAN SİNİR
KILAVUZLARININ 3B BASIMI**

SEVDE YILMAZ

**TEZ DANIŞMANI
DR. ÖĞR. ÜYESİ AYDIN TAHMASEBİFAR**

**DOKU MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI
DOKU MÜHENDİSLİĞİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
HAZİRAN/2021**

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince ve tez çalışmamın tüm aşamalarında engin bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren tez danışmanım ve sevgili hocam Dr. Öğr. Üyesi Aydın Tahmasebifar’a,

Lisansüstü eğitimim boyunca akademik bilgi ve deneyimlerini bana aktaran tüm hocalarıma,

Tez çalışmam süresince her daim yardımlarını esirgemeyen tüm arkadaşlarıma,
Hayatım boyunca beni maddi ve manevi her konuda destekleyen değerli aileme,
Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma S.B.Ü. BAP Birimi tarafından 2019/072 no’lu Yüksek Lisans Tez Projesi kapsamında desteklenmiştir

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
ÇİZELGELER LİSTESİ.....	vii
RESİMLER LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
ÖZET	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. PERİFERİK SİNİR ANATOMİ VE FİZYOLOJİSİ	3
2.2. SİNİR DOKU MÜHENDİSLİĞİ.....	5
2.2.1. Sinir Tüpü Tasarımları	7
2.2.2. Sinir Tüpü Üretimi İçin Kullanılan Malzemeler.....	8
2.3. SİNİR DOKU MÜHENDİSLİĞİNDE 3B BASIM TEKNOLOJİSİ.....	13
2.3.1. 3B Basım İçin Kullanılan Malzemeler.....	15
2.4. SİNİR DOKU MÜHENDİSLİĞİ İÇİN ELEKTROEĞİRME YÖNTEMİ.....	16
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	20
3.1. MALZEMELER	20
3.2. 3 BOYUTLU SİNİR TÜPÜ ÜRETİMİ	20
3.2.1. 3B Yazıcı ile Plla Tüpün Basılması	20
3.2.2. 3B Basılmış Plla Tüpler Üzerine Jelatin/Pedot:Pss Fiber Membranın Elektroeğirilmesi.....	20
3.3. JELATİN/PEDOT:PPS FİBR KARAKTERİZASYONU	22
3.3.1. Taramalı Elektron Mikroskopisi (Tem)	22
3.3.2. FTIR (Fouirer Transform Infrared Spectroscopy)	22
3.3.3. Fosfat Tamponlu Salın (Pbs) İçinde Şişme Testi.....	23
3.3.4. <i>In-Vitro</i> Bozunma Testi.....	23
3.3.5. Sınır Tüplerinin Elektriksel, Kimyasal Ve Mekanik Değerlendirmesi	24
3.4. JELATİN/PEDOT:PSS FİBRER MEMBRAN İLE KAPLANMIŞ PLLA TÜPLER İLE <i>İN-VITRO</i> HÜCRE ÇALIŞMALARI	24
3.5. HÜCRELERİN FLORESAN MİKROSKOBU ANALİZİ	25

3.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	25
4. BULGULAR.....	27
4.1. SİNİR TÜPLERİNİN 3B BASIMI	27
4.2. ELEKTROEĞİRME SONUÇLARI	29
4.2.1. Elektroeğirme Yöntemiyle Üretilen Fiberlerin Morfolojisinin İncelenmesi...	33
4.2.2. Fiberlerin Yarıçaplarının İncelenmesi.....	37
4.2.3. <i>İn-Vitro</i> Bozunma Testi Sonuçları	38
4.2.4. FTIR Sonuçları.....	39
4.2.5. Sinir Tüplerinin Elektriksel İletkenlikleri	40
4.3. <i>İn-Vitro</i> HÜCRE DENEY SONUÇLARI	41
4.8. HÜCRELERİN FLORESAN MİKROSKOBU SONUÇLARI	45
5. TARTIŞMA	47
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	54
KAYNAKLAR	55
ÖZ GEÇMİŞ	63

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 2.1: Farklı malzemeler kullanılarak üretilmiş sinir kılavuzu örnekleri.....	10
Çizelge 2.2: Elektroğirme uygulama parametreleri (147, 153–155)	19
Çizelge 4.1: Farklı parametrelerle sinir tüpü 3B basımı (B: Birinci tabaka, İ: İkincil tabakalar)	28
Çizelge 4.2: Farklı parametrelerle elektroğirme	32
Çizelge 4.3: Değişik polimer yoğunluklarında hazırlanmış çözeltiler kullanılarak üretilen fibröz matrislerin elektrik iletkenlik test sonuçları	41

RESİMLER LİSTESİ

Resim 3.1: Üniversitemiz Validebağ Araştırma Parkı'nda bulunan FYTRONIX 9000 marka elektroegirme cihazı.	21
Resim 4.1: Şırınganın ucunda donan çözelti.....	29
Resim 4.2: a) 80% nem oranında elde edilen sonuç, b)50% nem oranında elde edilen sonuç.	30
Resim 4.3: %20 jelatin çözeltisinden elde edilen fiberlerin morfolojisini göstermektedir. Büyütmeler (A)10000X, (B)5000X, (C)2500X ve (D)500X	33
Resim 4.4: %30 jelatin çözeltisiyle elektroegirme yöntemi kullanılarak üretilen fiber membranın morfolojisi gösterilmektedir. Büyütmeler (A)10000X, (B)5000X, (C)2500X ve (D)500X.....	34
Resim 4.5: %40 jelatin çözeltisinden elde edilen fiberlerin morfolojisini göstermektedir. Büyütmeler(A)10000X, (B)5000X, (C)2500X ve (D)500X	35
Resim 4.6: A) %40 jelatin-%0,5 PEDOT:PSS ve B) %40 jelatin-%1 PEDOT:PSS çözeltisinden elde edilen fiberlerin morfolojisini göstermektedir. C) %20 jelatin-%0,5 PEDOT:PSS ve D) %20 jelatin-%1 PEDOT:PSS çözeltisinden elde edilen fiberlerin yapısını göstermektedir.....	36
Resim 4.7: (A)%40 jelatin-%0,5 PEDOT:PSS, (B)%40 jelatin- %1 PEDOT:PSS ve (C) %20 jelatin-%0,5 PEDOT:PSS ve %20 jelatin-%1 PEDOT:PSS çözeltilerinden 9000 RPM hızında tüpün üzerine sarılan fiberlerin yapısını göstermektedir.....	37
Resim 4.8: (A) %20Jelatin-%0,5 PEDOT:PSS (800X), (B) %20Jelatin-%0,5 PEDOT:PSS (2500X) içeren örneklerin üzerindeki hücre morfolojisini 7. Günün sonunda göstermektedir.....	43
Resim 4.9: (A) %40Jelatin-%0,5 PEDOT:PSS (250X), (B) %40Jelatin-%0,5 PEDOT:PSS (3000X) içeren örneklerin üzerindeki hücre morfolojisini 7. Günün sonunda göstermektedir.....	44
Resim 4.10: (A) %20Jelatin-%1 PEDOT:PSS (400X), (B) %20Jelatin-%1 PEDOT:PSS (1200X), (C) %20Jelatin-%1 PEDOT:PSS (1300X), (D) %20Jelatin-%1 PEDOT:PSS (2200X), içeren örneklerin üzerindeki hücre morfolojisini 7. Günün sonunda göstermektedir.....	44

Resim 4.11: (A) %40Jelatin-%1 PEDOT:PSS (200X), (B) %40Jelatin-%1 PEDOT:PSS (400X), (C) %40Jelatin-%1 PEDOT:PSS (500X), (D) %40Jelatin-%1 PEDOT:PSS (2000X), içeren örneklerin üzerindeki hücre morfolojisini 7. Günü sonunda göstermektedir.....	45
Resim 4.12: (A) %20Jelatin-%0,5 PEDOT:PSS (20x), (B) %40Jelatin-%0,5 PEDOT:PSS (20X), 7. Gün sonundaki hücre görüntüleri	46
Resim 4.13: (A) %20Jelatin-%1 PEDOT:PSS, (B) %40Jelatin-%1 PEDOT:PSS, 7. Gün sonundaki hücre görüntüleri.....	46



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Normal bir periferik sinir anatomisi (10).....	4
Şekil 2.2: Sinir iskelelerin imalatı için çeşitli sentetik yaklaşımlar ve fabrikasyon yöntemleri (25).....	6
Şekil 4.1: Değişik oranlarda polimer çözeltileri ile üretilen fibrli membranların lif(fiber) çapı karşılaştırmaları.....	38
Şekil 4.2: Farklı yoğunlukta çözeltiler kullanılarak üretilen fibröz membranların farklı çapraz bağlama prosedürlerindeki bozunma davranışları	39
Şekil 4.3: FTIR sonuçları	40
Şekil 4.4: Farklı çözelti gruplarıyla hazırlanmış fibröz membranlar üzerinde hücre canlılığı gösterilmektedir (n=3, P< 0,01).....	42

SİMGELER VE KISALTMALAR

3B: 3 Boyutlu

BDNF: Brain-derived Neurotrophic Factor

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimethyl Sulfoxide

ECM: Extracellular Matrix

FDM: Fused Deposition Modelling

FTIR: Fourier Transform Infrared Spectroscopy

GDNF: Glial Cell Line-derived Neurotrophic Factor

GelMA: Methacrylated Gelatin

KİMKH: Kemik İliği Kökenli Mezenkimal Kök Hücre

MKH: Mezenkimal Kök Hücre

NGF: Nerve Growth Factor

NKH: Nöral Kök Hücre

PBS: Phosphate Buffered Saline

PEDOT: Poly(3,4-ethylenedioxythiophene)

PGA: Poly (glycolic acid)

PHB: Polyhydroxybutyrate

PLA: Polylactic Acid

PLGA: Poly (lactic-co-glycolic acid)

PLLA: Poly (L-lactic acid)

PPy: Polypyrrole

PS: Periferik sinir sistemi

PSS: Poly (styrenesulfonate)

PU: Polyurethane

SH: Schwann Hücresi

TEM: Taramalı Elektron Mikroskopisi

TPP: Two Photon Polymerization



GELİŞMİŞ ÖZELLİKLERİ OLAN SİNİR KILAVUZLARININ 3B BASIMI

ÖZET

Amaç: Bu yüksek lisans tez çalışmasında, periferik sinir yaralanmalarının tamiri ve tedavisi için klasik cerrahi yöntemlere alternatif olabilecek, gelişmiş elektrokimyasal mekanik özellikleri olan yapay sinir kılavuzu tasarımı ve üretimi hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntem: 3B yazıcı ile PLLA polimeri kullanılarak sinir tüpleri basılmış, jelatin/PEDOT:PSS polimer karışımı kullanılarak elektroegirme ile üretilen fibröz membran PLLA tüpler üzerine sarılmıştır. Daha sonra in vitro hücre çalışmaları yapılmıştır. Jelatin, hücre canlılığı için tercih edilmiştir. PEDOT:PSS, elektrik iletken polimer olarak tercih edilmiştir.

Bulgular: 3B basım için optimum mekanik basınç 75 PSİ, termoplastik başlık sıcaklığı 170°C, birincil tabaka baskı hızı 45 (mm/sn) ve ikinci tabakalar için 7 (mm/sn) olarak belirlenmiştir. Elektroegirme için ideal akış hızı 500 µl/h, tabla ile şırınga arası uzaklık 10 cm ve voltaj 20-30 kV olarak seçilmiştir. PBS içinde bozunma testleri sonucunda, 24 saatlik çapraz bağlamanın yeterli olmadığı, ancak 72 saat boyunca çapraz bağlanan örneklerde 3 saat sonunda %1'den daha az bozunma olduğu görülmüştür. Sinir tüplerinde en yüksek iletkenlik %40 jelatin ve %1 PEDOT:PSS ile oluşan yapıda gözlemlenmiştir.

Sonuç: Fiberlerin homojen morfolojiye sahip olduğu görülmüş ve yapıda boncuk oluşması gözlemlenmemiştir. Fiberlerin morfolojisi çapraz bağlanma işleminden sonra düzgündür. 72 saatlik çapraz bağlama işlemi uygun bir bozunma yüzdesi sağlamıştır. Sinir doku mühendisliğinde önemli olan iletkenliği sağlamak için PEDOT:PSS polimerinin güçlü bir aday olduğu gösterilmiştir. İletkenliği artırarak daha düşük voltajlarda üretime imkan vermiştir. Hücre yayılımı ve canlılığını artırmıştır, PEDOT:PSS polimerinin %1 orana kadar toksik olmadığı böylece gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: iletkenlik, jelatin, poli (l-laktik asit), PEDOT:PSS, sinir doku mühendisliği, sinir tüpü.

3D PRINTING OF NERVE GUIDES WITH ENHANCED PROPERTIES

ABSTRACT

Aim: In this master's thesis, it is aimed to design and manufacture an artificial nerve guide with advanced electrochemical mechanical properties, which can be an alternative to classical surgical methods for the repair and treatment of peripheral nerve injuries.

Materials and Methods: Nerve conduits were printed using PLLA polymer with 3D printer, the fibrous membrane produced by electrospinning using a gelatin/PEDOT:PSS polymer mixture was wrapped on PLLA tubes. Later, in vitro cell studies were conducted. Gelatin is preferred for cell viability. PEDOT:PSS polymer is preferred as an electrically conductive polymer.

Results: The optimum mechanical pressure for 3D printing is 75 PSI, thermoplastic head temperature 170°C, primary layer printing speed 45 (mm/sec) and 7(mm/sec) for second layers. For electrospinning of gelatin solutions, voltage of 30 kV was chosen as 20 kV with the addition of PEDOT:PSS. As a result of the degradation tests in PBS, there was less than 1% degradation after 3 hours in samples that were cross-linked for 72 hours. The highest conductivity was observed in the structure formed by 40% gelatin and 1% PEDOT:PSS.

Conclusion: Fibers had homogeneous morphology and no bead formation was observed. The 72 hours of crosslinking provided a suitable percentage of degradation. The PEDOT:PSS polymer has been shown to be a strong candidate to provide conductivity. It has increased cell invasion and viability, thus demonstrating that the PEDOT:PSS polymer is non-toxic up to 1%.

Keywords: conductivity, gelatin, nerve tissue engineering, neural conduit, PEDOT:PSS, poly (l-lactic acid).

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Periferik sinir lezyonu, sinirsel uyarı iletimini bozan veya bloke eden periferik sinir sistemine zarar veren ve genellikle sinirin uyarım yaptığı alanda duyu/motor açıklara neden olan bir durumdur. Periferik sinirler yaralanmadan sonra kendini yenileme özelliğine sahiptir. Periferik sinir hasarını tedavi etmenin temel amacı, sinir devamlılığını mümkün olan en kısa sürede yeniden sağlamaktır.

Sinir hasarlarının köprüleme materyali kullanılarak onarımı 1800'lü yıllara dayanırken, sinir hasarı yönetiminin mevcut standardı sinir otogreftinin kullanılışı 1970'lerde başladı ve o zamandan beri, sinir kusurlarının onarımı için birkaç alternatif klinik olarak onaylanmıştır. Genel olarak, tüm doku tipleri için, otogreft, kusurları değiştirmek için en iyi yöntemdir, ancak konakçı donör sahasındaki donör saha kusurları (yapısal veya fonksiyonel) problemi hiçbir zaman aşılmamıştır. Bağışıklık baskılayıcı ajanların gelişimi, allogreft kullanımını kolaylaştırmış olsada, mükemmel şekilde eşleşen donör sayısı hala sınırlıdır.

Bu doğal olarak ortaya çıkan zorlukların bir sonucu olarak, doku kusurlarını otogreftler veya allogreftler yerine biyokimyasal olarak işleyen materyallerle değiştirme olasılığı odak noktası olmuştur. Periferik sinir kusurlarının onarımı için mühendislik stratejilerindeki odak noktalarının çoğu, sinir otogreftlerine alternatif olarak doğal veya sentetik tübüler sinir yönlendirme kanalları oluşturmaya odaklanmıştır.

Bu tez çalışmasında, hücrelerin yaralanma bölgesine göç etmesi ve dokuyu onarması için platformlar oluşturmak üzere iskele olarak bilinen harici biyomateriyal destekleri üretip kullanarak, sinir hücrelerinin işlevini nörolojik bozukluklardan ve yaralanmalardan kurtulmaya doğru yönlendirebilen ve kontrol edebilen, hassas bir şekilde kontrol edilen, ayarlanabilir yüzey yapısı, biyokimyasal yönlendiriciler ve yüzey enerjisine sahip sinir tüpü üretimi amaçlanmıştır.

Bu iyileştirilmiş özellikte sinir kılavuz tüpü üretimi çalışmasında, iyi mekanik özellikleri nedeniyle tüpün temel destek iskelesi PLLA polimerinden üretilmiştir. Doğal bir polimer olan jelatin, çalışmanın ilerleyen aşamalarında yapılacak hücre deneyleri ve büyüme faktörü kullanımı için uygun bir zemin oluşturmaktadır. Tez

kapsamında sinir dokusu üretimi hedeflendiğinden matrisin üretiminde elektrik iletken malzeme kullanımı önemlidir, bu amaca yönelik olarak, yüksek elektrik iletkenliği ve diğer iletken polimerlere kıyasla daha yüksek kimyasal kararlılığı ve termal stabilitesi nedeniyle PEDOT: PSS polimeri kullanılmıştır

Üretilen bu iyileştirilmiş ve işlevselleştirilmiş, sinir tüplerinin, hücresel ve moleküler süreçlerin yenilenmesi yoluyla aksonal çoğalmayı ve yönelimi destekleyen kimyasal ve yapısal biyoaktivite yoluyla siniri desteklemeye yardımcı olacağı düşünülmektedir.

Tüpün basımı için temel malzeme olarak kullanılan PLLA polimerinin yüksek biyouyumluluk ve biyobozunurluk özelliği nedeniyle, tüpün uygun bozunma göstererek iyileşme uyarımı sonrası vücut içinde toksik madde bırakmadan yok olacağı öngörülmektedir. Bu hipotezi desteklemek ve bozunma düzeyini belirlemek amacıyla in vitro bozunma testleri çalışma sonunda yapılacaktır.

Basılan 3 boyutlu (3B) iskele üzerine kaplanacak jelatin/PEDOT:PSS fibröz membranın hücre dışı ortam benzeri bir yapı sağlayarak hücre yayılması ve canlılığını tetikleyeceği öngörülmektedir. Bu hipotezin desteklenmesi için hücre yayılımı ile canlılığı testlerle belirlenerek, aksonal büyüme ve iyileşme için yeterli seviyede hücre aktivitesi olup olmadığı tespit edilecektir.

Elektriksel iletimin çok önemli olduğu sinir sistemi iyileşmesi ve sinirsel normal aktivitenin tetiklenmesi için elektrik iletken PEDOT:PSS polimeri fibröz membran yapısında kullanılacak ve çalışma sonunda elde edilen sinir kılavuz tüplerinin elektriksel iletkenliği çeşitli testlerle belirlenecektir.

2. GENEL BİLGİLER

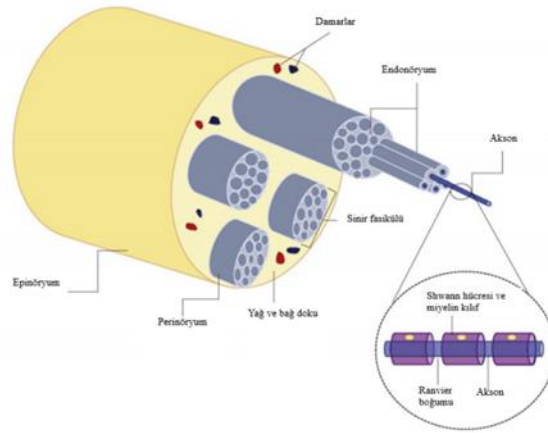
2.1. PERİFERİK SİNİR ANATOMİ VE FİZYOLOJİSİ

Periferik sinir sistemi (PS), sinir sisteminin beyin ve omurilik dışındaki bölümlerini ifade eder. Kraniyal sinirleri, omurilik sinirlerini ve bunların köklerini ve dallarını, periferik sinirleri ve nöromusküler (sinir-kas) bağlantıları içerir. PS’de, sinir demetleri veya akson demetleri, merkezi sinir sisteminden bilgi alır ve çevreden bilgi iletir (1). Nöronlar ve glial hücreler, sinir sisteminin iki ana hücre sınıfıdır. Ana glial hücre tipleri, merkezi sinir sisteminde astrositler ve oligodendrositler, periferik sinir sisteminde Schwann hücreleri (SH), enterik glial hücreler ve uydu hücreleridir (2). PS’deki temel glial hücreler ‘Schwann’ hücreleridir. Tüm aksonları periferik sinirlerde sararlar ve iki tipte bulunurlar, miyelin oluşturan ve miyelin oluşturmeyen; miyelin üreten SH’ler, yapı ve işlev olarak merkezi sinir sisteminde aksonların etrafında yalıtım kılıfları oluşturan oligodendrositlere benzerdir. Miyelin üretmeyen SH’ler ise metabolik ve mekanik destek fonksiyonları ile astrositler ile benzerlikler gösterir (3).

Sinir sisteminin özel hücrelerine nöron adı verilir. Bir nöron, hücre gövdesi (çekirdek ve sitoplazmalı), hücreye elektriksel uyarılar taşıyan dendritler ve uyarıları hücreden uzaklaştıran uzun bir aksondan oluşur. Bir nöronun aksonu ve bir sonraki nöronun dendritleri aslında birbirine değmez. Nöronlar arasındaki boşluğa sinaps denir. Çoğu nöron, tek bir akson ve birçok dendritten oluşur (4). Dendritler gelen sinaptik bilgiyi alır ve sinir hücresi gövdesine iletir, aksonlar nöronun sinaptik terminaline impulsları (sinirsel uyarı) iletir. Çoğunlukla aksonlar için verimli lifler, beyin ve omurilikten çevredeki kaslara, bezlere vb. Motor fonksiyonla ilgili uyarıları iletir. Öte yandan, çoğunlukla dendritler, genellikle duyu uyarılarını merkezi sinir sistemine aktarır (5). Periferik sinirler, merkezi sinir sistemiyle beraber (beyin ve omurilik) vücudun geri kalanıyla homeostazi (iç denge) sürdürüp, duyu, hareket ve koordinasyona aracılık etmektedir.

Periferik sinirler, bir kollajen matriks (endonörium) içine gömülü, bağ dokusu (perinörium) ile kaplanmış ve bir dış bağ tabakası (epinörium) ile sarılmış akson demetlerinden oluşur (6). Endonörium, her bir sinir lifi veya aksonu çevreleyen

gevşek bir bağ dokusu tabakasıdır. SH'lerin dışına ve etrafına yerleşmiştir. Endonörium, uzunlamasına bir yönde ince kollajenöz liflerden oluşur. Bu kollajen lifleri, SH'lerin bazal membranına çok yakında bulunur (7). Bireysel endonöral kılıfları olan birçok akson, fasiküller adı verilen demetler halinde bir araya toplanır. Bu sinir lifi demetlerini çevreleyen dokuya perinörium denir. Lifleri dairesel, eğik ve uzunlamasına yönde yerleştirilmiş birkaç kollajen tabakadan oluşur, fasikülün boyutuna bağlı olarak perinöral lamellerin sayısı değişebilmektedir (8). Perinörium ile çevrelenmiş fasikülleri çevreleyen kalın areolar bağ dokusu tabakası epinöriumdur. Elektron mikroskopik çalışmalar, epinöriumun kollajen ve elastin lifleri içeren bağ dokusundan oluştuğunu göstermiştir. Ek olarak, bir sinir etrafındaki epinörium miktarı, birçok fasikül içeren bir sinirde daha fazladır. Epinörium içinde, kollajen lifleri esas olarak uzunlamasına sinir boyunca yönlendirilir. Epinöryumda, özellikle perinöryuma bitişik elastik lifler de mevcuttur (9). Bir periferik sinir lifinin genel görünümü Şekil 2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1: Normal bir periferik sinir anatomisi (10)

Periferik sinirler, çok sayıda ve küçük çaplı sinir lifleri ile karakterize edilen benzersiz yapılardır. Sinirlerin iletim hızı büyük ölçüde değişir ve doğrudan lif çapı ile ilgilidir periferik sinirlerin hücresel bileşenleri arasında SH'ler, fibroblastlar, endotel benzeri hücreler ve makrofajlar bulunur (4). Aksonlar, aksolemma isimli membranla kaplı silindirik bir sitoplazma tüpünden oluşur. Aksonun içinden geçen

nörofilamentler ve mikrotübüller hücre iskeletini oluşturur ve hızlı aksonal taşıma için çerçeve sağlar. En küçük aksonlar miyelinsiz olmasına rağmen, periferik bir sinirdeki çoğu akson, SH tarafından üretilen, lipitten zengin, biyokimyasal olarak modifiye edici plazma membranının çoklu katmanları ile miyelinlidir (11). Bir aksonun fonksiyonel ve anatomik bütünlüğü sinir hücresi gövdesi tarafından korunur (12, 13).

Periferik sinir sistemindeki miyelin, SH'den gelişir (14). Miyelin kılıfı impuls iletimini güçlendirir. En büyük ve en ağır miyelinli liflerde iletim hızlı olur, daha az miyelinli ve miyelinsiz liflerde iletim daha yavaş olur (15).

Günümüzde, SH'ler vücuttaki ultra yapısal olarak en karmaşık hücrelerden biri olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte, gelişim ve yaralanmada çok hızlı bir dönüşüm ve yayılım süreci gösterebilmektedir (16). Yeni gelişmeler göstermiştir ki, SH'ler sinir lifleriyle ilişki içindedir ve birçok nörotrofik faktörün salınmasından sorumludur (11). Bunlardan bazıları sinir büyüme faktörü (NGF), beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), gliyal hücre kaynaklı nörotrofik faktör (GDNF), nörotrofin 3 (NT3)tür ve aksonal büyüme ve yön bulmada etkilidirler (17). Miyelin oluşturan SH'lerin farklılaşması, kroX20 eksik farelerin *in vitro* ve *in vivo* miyelin kılıfları oluşturmadaki yetersizliği ile kanıtlandığı üzere kroX20 transkripsiyon faktörü (egr2) tarafından kontrol edilir (18). PS'nin miyelinleyici gliyası olan SH'lerin plastisitesi (rejenerasyon yeteneği), travmatik yaralanmalar ve periferik nöropatilerin ardından periferik sinir rejenerasyonu bağlamında kritik öneme sahiptir (19).

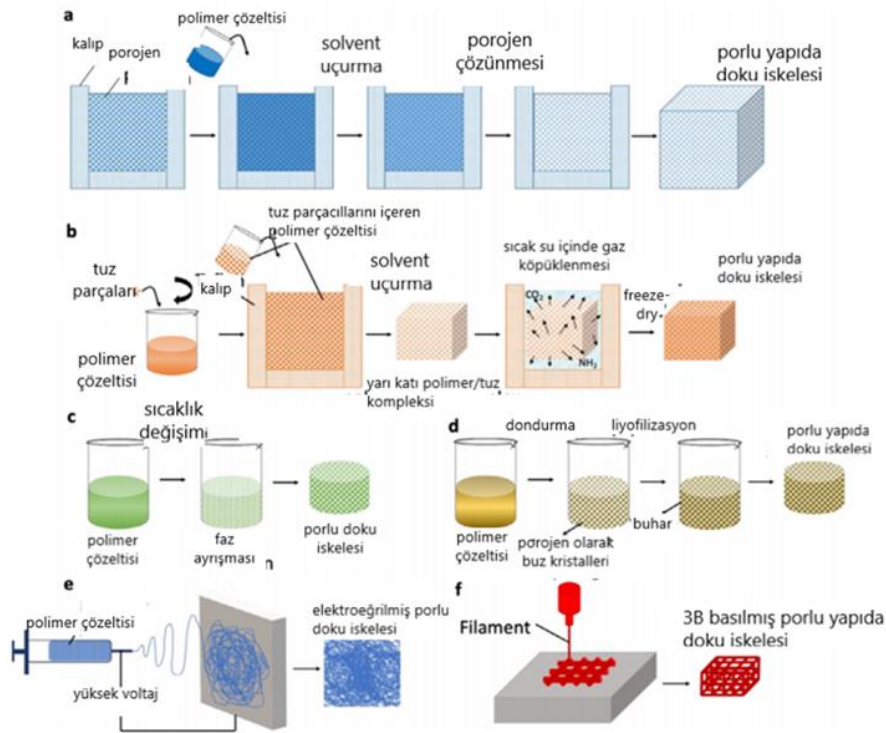
2.2. SINIR DOKU MÜHENDİSLİĞİ

Diğer doku türlerinden farklı olarak, sinir dokusu, çok sayıda farklı biyokimyasal ve topolojik uyarıcı sağlayan geniş ve karmaşık bir ortama uzanır, bu da bu dokunun gelişmiş işlevlere sahip olması demektir (20). Bu tür karmaşıklığın bir sonucu olarak, geleneksel transplantasyon terapötik yöntemleri oldukça etkisizdir; bu nedenle, periferik ve merkezi sinir sistemi yaralanmalarının restorasyonu, sürekli bir bilimsel zorluk olmuştur (21).

Sinir sistemindeki doku mühendisliği ve rejeneratif tıp, yeni alternatif tıbbi yaklaşımlar sağlamıştır. Bu yöntemler, hücrelerin yaralanma bölgesine göç etmesi ve dokuyu onarması için platformlar oluşturmak üzere iskele olarak bilinen harici

biyomateryal destekleri kullanır (22). Sinir doku mühendisliğindeki zorluk, nöronal hücrelerin işlevini nörolojik bozukluklardan ve yaralanmalardan kurtulmaya doğru yönlendirebilen ve kontrol edebilen, hassas bir şekilde kontrol edilen, ayarlanabilir topografya, biyokimyasal ipuçları ve yüzey enerjisine sahip iskelelerin üretilmesidir (23). Aynı zamanda sinir doku mühendisliği çalışmalarının, özellikle uygun hayvan modellerini elde etmenin zor olduğu durumlarda, nörolojik hastalıkları *in vitro*, özellikle çip üzerinde laboratuvar sistemleri aracılığıyla modelleme potansiyeli sağladığı gösterilmiştir (24).

Sahadaki yoğun araştırma faaliyetinin bir sonucu olarak, sinir iskelelerin imalatı için çeşitli sentetik yaklaşımlar ve fabrikasyon yöntemleri (Bkz. Şekil 2.2) geliştirilmiştir. Gerçekten de, üçüncü nesil işlevselleştirilmiş sinir kanalları, hücresel ve moleküler süreçlerin yenilenmesi yoluyla aksonal çoğalmayı ve yönelimi destekleyen kimyasal ve yapısal biyoaktivite yoluyla siniri desteklemeye yardımcı olur (25).



Şekil 2.2: Sinir iskelelerin imalatı için çeşitli sentetik yaklaşımlar ve fabrikasyon yöntemleri (25)

2.2.1. Sinir Tüpü Tasarımları

Sinir doku çalışmalarında sinir tüpleri basitçe içi boş tüp, çentikli, gözenekli(por), çok kanallı fiber dolgulu, hidrojel dolgulu olarak üretilir denebilir. Sinir iskelesinin malzeme özelliğinin yanı sıra biyomateryalin yapısı ve yüzey özelliği de yaralanan periferik sinirlerin tamiri için oldukça önemlidir (26). Ortaya çıkan çalışmalar, sinirsel iskelenin üç boyutlu şekli ve dokusunun yalnızca mekanik destek için pasif bir yapı sağlamadığını, aynı zamanda hücresel bağlanmayı ve hücre kaderini de doğrudan etkilediğini göstermektedir (23).

Sinirlerin tüp benzeri yapısı göz önünde bulundurularak, sinir iskelesi tasarımında ilk günlerde tek bir içi boş lümen sinir yönlendirme kanalı olarak tasarlanmıştır (27). Oluşturulan tek içi boş kanal genellikle kısa sinir boşluğunu onarmak için yeterlidir. Bununla birlikte, uzun mesafeli boşluğu onarıırken, örneğin insanda 2–3 cm uzunluğunda sinir boşluğu ve sıçanda 1 cm uzunluğunda sinir boşluğu olduğunda, silindirik sinir yönlendirme kanalı içi boş yapısı nedeniyle yenilenen aksonların dağılmasına yol açabilir (28). İntralüminal kanallar veya mikrotüpler, sinir fasiküllerinin mimarisini taklit eden çok kanallı bir sinir kanalı oluşturmak için tek içi boş kanala dahil edilir (29). Bununla birlikte, çok kanallı sinir tüplerinin geçirgenliği, esnekliği ve malzeme dejenerasyonu, tek içi boş kanallar kadar iyi olmayabilir (30). Bu dezavantajların üstesinden gelmek için, fiziksel lümen dolgulu sinir kanalları, doğrudan sinir tüplerinin iç boşluğuna filamentler yerleştirilerek oluşturulur (31). Bu modifikasyon, aksonların birleşik lümen dolgu maddeleri boyunca büyümesine ve uzamasına izin verir ve böylece büyük ölçüde uygunsuz akson dağılımını ve karşılık gelen hatalı hedefi önler. Ayrıca bu modifikasyon, yüzey alanını genişleterek destekleyici hücrelerin ve nörotrofik faktörlerin yeniden inervasyonuna (sinirsel uyarım) fayda sağlar.

Günümüzde, sinir doku mühendisliği için tipik bir sinir iskelesi, normalde bir harici sinir kanalından ve birçok yerleşik fiziksel lümen dolgusundan oluşur (32). Dış boru ve iç filament aynı malzemedir, farklı malzemelerden veya harmanlanmış malzemelerden yapılabilir. Sentetik polimerler ve doğal malzemeler, sentetiklerin üstün mekanik özelliklerinden ve bozunma yeteneklerinden, doğal malzemelerin mükemmel biyouyumluluklarından yararlanmak için birlikte kullanılır (33).

2.2.2. Sinir Tüpü Üretimi İçin Kullanılan Malzemeler

Yapay sinir kanalları oluşturmak için en uygun maddeyi belirlemek için çok fazla araştırma yapılmıştır çünkü kullanılan malzeme türü sinir dokusu rejenerasyonunun başarısını sağlamada önemli bir rol oynamaktadır (34). Yapay sinir materyali, uygun bir bozunma (degradasyon) hızı ile onun içsel mekanik özellikleri arasında bir denge kurmalıdır, bu da enflamatuvar tepkileri en aza indirmeli ve sinir sıkışmasını önlemelidir (33). Doku mühendisliğinde malzeme seçimi önemli bir husustur (35). Doku mühendisliği iskelelerine uygun bir malzemenin temel beklentileri arasında biyouyumluluk, biyolojik olarak parçalanabilirlik ve uygun mekanik özellikler bulunur (36).

En çok kullanılan malzemeler doğal ve sentetik polimerlerdir. Doğal polimerler ya kolajen, jelatin, trombin ve fibrinojen gibi protein esaslıdır ya da selüloz, kitin ve kitosan gibi polisakkarit esaslıdır (37). Doğal polimerler biyomimetik ve hücre dostu bir ortam sağlar, ancak zayıf mekanik özelliklere sahiptir (38). Sentetik polimerler, poli (ϵ kaprolakton) (PCL), polilaktik asit (PLA), poliglikolik asit (PGA) ve poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) gibi insan yapımı polimerlerdir. Sentetik polimerler iyi mekanik özelliklere sahiptir ama hücre dostu değildir (38). Genellikle, hücreler için biyomimetik bir ortam sağlayan doğal polimerler ve uygun yapısal/mechanik destek sağlayan sentetik polimerlerle birlikte, doğal ve sentetik polimerlerin bir karışımı şeklinde kullanılmıştır (39).

Üretim için hem doğal hem de sentetik polimerler başarılı sonuçlar ortaya çıkarmaktadır (40). 3B kolajen iskelesi kullanan bir çalışma (41), kapsamlı aksonal rejenerasyon gösterdi. Georgiou ve arkadaşları (42), 10 mm uzunluğunda bir sıçan siyatik sinir yaralanmasında in vivo nöronal büyümeyi desteklemek için SH ile ekilmiş kolajen tip-1 matrisi kullandı. Wu ve arkadaşları (43), sıçan SH içeren jelatin/aljinat hidrojelinden oluşan bir sinir iskelesi inşa etmek için 3B biyoyazıcı kullandı. Sonuçlar, 3B biyobasılmış jelatin-sodyum aljinat/SH kompozit yapı iskeletinin hücre yapışmasını ve ilgili faktör ekspresyonunu iyileştirdiğini gösterdi. Bu 3B biyobasılmış kompozit yapı iskelesi, iyi biyouyumluluk gösterdi ve gelecekte sinir dokusu mühendisliğinde umut verici bir aday olabileceği düşünülüyor. Başka bir çalışma (44), selüloz ve soya proteini izolatına dayalı yapay sinir kılavuzları geliştirdi

ve bunları 10 mm uzunluğunda siyatik sinir hasarı olan sıçanlarda *in vivo* test etti. Selüloz bazlı bu malzeme, sinir boşluğunu köprüleme ve onarmada başarılı oldu.

Bununla birlikte, doğal polimerlerin zayıf mekanik özellikleri ve bunları 3B yapılara dönüştürmedeki zorluk nedeniyle, sentetik polimerler esas olarak yapay sinir kılavuzlarının üretiminde kullanılır. PCL, yapay sinir kılavuzlarının üretimi için en yaygın kullanılan sentetik polimerlerden biridir (45). PCL, olağanüstü mekanik özelliklere, kolay işlenebilirliğe ve karışım uyumluluğuna sahip Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) onaylı bir malzemedir (46). Birkaç çalışmada (47–49) PCL’den düzenli fiber iskeleler oluşturulmuş ve bu düzenli yapının aksonların düzgün yerleşimi ve uzamasını desteklediği, *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda ise periferik sinir rejenerasyonuna uygun bir ortam sağladığı görülmüştür. Elektroeğrilmiş PCL yavaş bir biyobozunma hızına sahiptir (2-4 yıl) ve bu bir dezavantaj olarak görülebilmektedir (50). Sinir doku mühendisliği ile farklı malzemelerden üretilmiş sinir kılavuzu örnekleri Çizelge 2.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1: Farklı malzemeler kullanılarak üretilmiş sinir kılavuzu örnekleri

İskele malzemesi	Polimer sınıfı
Kitozan (51)	Doğal
Kolajen (42)	Doğal
Aljinat (52)	Doğal
İpek fibroini (53)	Doğal
PCL (54)	Sentetik
PLLA (55)	Sentetik
PLGA (56)	Sentetik
PGA (57)	Sentetik
PU (58)	Sentetik
GelMA (59)	Sentetik
PCL/Jelatin (60)	Sentetik/doğal kompozit
PLGA/Kitozan/laminin (61)	Sentetik/doğal kompozit
Kitozan/kolajen (62)	Doğal/doğal kompozit
PCL/ipek fibroini (63)	Sentetik/doğal kompozit
PLLA/PPy (64)	Sentetik/iletken kompozit
Kolajen/PEDOT:PSS (65)	Doğal/iletken kompozit

Zhang ve arkadaşları (66), SH kullanarak yapılacak çalışma için PLLA ile düzenli elektroğrilmiş bir iskele ürettirler. PLLA, FDA tarafından onaylanmıştır. Yenilenebilir kaynaklardan elde edilir ve uygun mekanik özelliklere sahiptir, ancak yüksek hidrofobik doğası nedeniyle biyouyumluluğu azalır (67). PLLA, PCL'den daha hızlı bir bozunma oranına sahip olduğu, ancak yüksek kristallik nedeniyle parçalanan kısımların zararlı hale gelebileceği ve vücutta iltihaplanmaya yol açabileceği ihtimali üzerinde duran çalışmalar da vardır (68).

PLGA, PLLA ve PGA'nın bir kombinasyonudur ve bozunması PLLA/PGA oranı ayarlanarak kontrol edilebilir; PGA içeriği ne kadar yüksekse, bozulma o kadar hızlıdır.

PLGA sinir kılavuzu üretimi için sık kullanılan bir malzemedir. Wu ve arkadaşları (69), çift iğneli elektroegirme sistemi aracılığıyla bir laminin/PLGA sinir kılavuzu ürettir. Bu kılavuz, sinir dokusu mühendisliği için SH'lerin çoğalmasını teşvik etmede ve SH göçünü indüklemeye umut verici bir potansiyel gösterdi. PLGA'nın bozunma yan ürünleri, yani laktik asit ve glikolik asit toksik olmamakla birlikte, oldukça asidiktir ve büyük miktarlara ulaştığında metabolizasyonu zorlaşır (70).

Poli-3-hidroksibutirat (PHB) da sinir kılavuzu üretimi için potansiyel bir biyomateriyal olarak araştırılmaktadır. Özer ve arkadaşları (71), 10 mm sıçan siyatik sinir kesisinde onarımı artırmak için insan kemik iliğinden türetilmiş mezenkimal kök hücre (MKH) ile tohumlanmış kitozan kaplı poli-3-hidroksibutirat sinir kanallarını kullanmanın etkinliğini değerlendirmek için tasarlanmıştır.

Elektriksel uyarı, sinir hücreleri arasındaki hücre çoğalmasını, göçünü, farklılaşmasını ve sinyal bağlantılarını geliştirir, böylece sinir yenilenmesini artırır ve kök hücrelerin sinir hücrelerine farklılaşmasını destekler (72). Sinir sisteminde, sinir uyarılarının iletimi nöronlar arası bir elektriksel aktiviteye bağlı oluşmaktadır, dolayısıyla elektrik iletkenliği sinir doku mühendisliği uygulamaları için önemle ele alınması gereken bir noktadır (73). Bu nedenle, iletkenlik özelliği olan polimerler sinir doku mühendisliği başta olmak üzere birçok doku mühendisliği uygulaması için son zamanlarda çokça tercih edilmektedir (74). İletken polimerler, doku rejenerasyonu için biyoaktif yapı iskeleleri olarak umut verici bir iletkenlik sergiler ve iletken yapıları, üzerlerinde kültürlenmiş hücrelerin veya dokuların elektrik sinyalleri ile uyarılmasına izin verir, fakat mekanik kırılabilirlikleri ve zayıf işlenebilirlikleri, uygulamalarını kısıtlar (74). Bu dezavantajları elimine etmek amacıyla iletken polimerler genellikle, başka biyomalzemelerle kompozit şeklinde uygulanmaktadır (73). Karbon bazlı biyomalzemeler (karbon nanotüpler, karbon nanolifler, grafen, polipirol (PPY), polianilin, poli(3,4-etilendioksitiyofen) (PEDOT) doku mühendisliği için en umut verici iletken polimerlerdir (75).

Bu tez çalışmasında kullanacağımız PEDOT iletken polimeri yüksek elektrik iletkenliği ve diğer iletken polimerlere kıyasla daha yüksek kimyasal kararlılığı ve termal stabilitesi nedeniyle son zamanlarda en umut verici iletken polimer olarak kabul edilmeye başlamıştır (76, 77). Moleküler ağırlığını artırmak için genellikle polistiren sülfonat (PSS) ile eşleştirilerek kullanılır. PEDOT'un PSS ile birlikte kullanımı, çözünürlük, hidrofilite, işlenebilirlik ve esneklik performanslarını daha da zenginleştirerek elektriksel uyarım ve

iletim temelli uygulamalarda PEDOT kullanılmasını avantajlı hale getirir (78). PEDOT:PSS'nin biyomedikal(örneğin; biyosensör (79), fototermal tedavi ajanı (80), birçok alan için elektrot üretiminde (81) ve esnek elektronik parça üretiminde (82), termoelektrik tabanlı uygulamalarda (83), akıllı kumaş ve kıyafet üretimi (84) gibi birçok alanda yaygın kullanımı vardır. Özellikle yüzey modifikasyonu uygulamaları için kaplama malzemesi olarak da kullanılmaktadır (79). Son yıllarda doku mühendisliği alanında da kullanımı yaygınlaşmıştır (85, 86). PEDOT:PSS polimerinin doku mühendisliği için uygun bir malzeme olmasının nedenlerinden biri de toksik özellik göstermemesidir (87). Kemik doku mühendisliği (88), kalp doku mühendisliği (89) deri doku mühendisliği (90), için kullanımı mevcut olan PEDOT:PSS, sinir doku mühendisliği uygulamaları için de umut verici bir polimer olarak karşımıza çıkmaktadır. Sinir sisteminin elektriksel bir temele dayanması ve PEDOT:PSS'nin doku mühendisliği için yukarıda belirttiğimiz avantajları, bu polimeri sinir doku mühendisliği için önemli bir malzeme durumuna getirmiştir (77).

Farklı polimerlerin avantajlarından yararlanmak için, doğal ve sentetik polimerler iki veya daha fazla olacak şekilde harmanlanır ve doku mühendisliği iskeletlerinin imalatında kullanılır. Bir çalışmada (91), karıştırılmış PCL ve kolajen kullanılarak elektroğirme yöntemiyle sinir kılavuzları üretildi. SH'leri kullanan *in vitro* çalışmalar ve yetişkin sıçanlarda kopmuş siyatik sinirde yapılan *in vivo* çalışmalar, saf PCL iskelelerine göre kolajen/PCL iskeletlerinin üstün performansını göstermiştir. Başka bir çalışmada (92), hem doğal hem de sentetik polimerler kullanılarak, bakteriyel selüloz/PCL karışımı nanofiber iskeleler, sinir dokusunun neden olduğu onarım için elektroğirme ile hazırlandı. Sonuçlara göre, bakteriyel selüloz/PCL (ağırlıkça %50:50) nanofibröz iskeleler sinir benzeri dallanma gösterdi ve sinir dokusu mühendisliği rejenerasyonunda potansiyel biyomimetik uygulamalar için mükemmel bir aday olduğu anlaşıldı.

İpek fibroin, nispeten iyi mekanik özelliklere ve biyoyumluluğa sahip bir yapıdadır (93). Genişletilmiş oryantasyon ve gözenekli 3B nanofiber sünger iskeleler ilk olarak PLA/ipek fibroin nano fiber sünger kullanılarak elektroğirme ve gaz köpürtme tekniği ile üretildi, hafif bir inflamatuvar reaksiyona sebep olmasına rağmen yüksek biyoyumluluk görüldü (94).

Diğer bir çalışmada (59) ise iskele olarak 3B yazıcıyla üretilmiş jelatin metakrilat (GelMA) hidrojel kullanılmıştır. PC12 hücrelerinin *in vitro* birlikte kültürlenmesi, sinir kılavuzunun kanal boyunca sinir hücrelerinin hayatta kalmasını, çoğalmasını ve göçünü desteklediğini gösterdi. Sonuçlar ayrıca gösterdi ki, sinir öncül kök hücrelerinin, yapay kılavuzlar üzerinde nöron hücrelerine farklılaşmaları indüklenebilmektedir. Vishnoi ve arkadaşları (95), sıçanların siyatik sinirinde 1.5 cm'lik sinir boşluğunun sinir dokusu rejenerasyonu için polipirol ile birleştirilmiş kitosan ve jelatinden bir kriyojel matrisi sentezledi ve bu çalışma, kriyojel matrisinin periferik sinir rejenerasyonu için rejeneratif potansiyelini ortaya koydu.

Farklı sinir kılavuzlarının üretimi için birçok sentetik polimer birbiriyle karıştırılarak kullanılabilir. Sinir kılavuzlarının imalatı için PCL ve PLGA (96), PLGA ve poliüretan (PU) (97), poliüretan ve jelatin (98), PLLA ve PLGA (99), poli (l-laktik asit-ko-kaprolakton) (PLCL) ve polipropilen glikol (PPG) gibi kompozitleri doku mühendisliğinde kullanılmıştır.

Hızalanmış kitosan-jelatin kriyojel ile doldurulmuş PU kanal (100), ipek fibroin/PLCL/grafen oksit (101) ve PLA/PLGA/aljinat hidrojel (102) gibi daha karmaşık üç bileşenli polimer karışımları da çalışmalarda kullanılmıştır.

2.3. SINIR DOKU MÜHENDİSLİĞİNDE 3B BASIM TEKNOLOJİSİ

Doku mühendisliği uygulamaları için eklemeli üretimle elde edilen (3B basım) biyomalzemeler ve/veya iskeleler, iskele/biyomateryal tasarımına daha sistematik bir yaklaşım sağlar gözenek boyutu ve yüzey alanı gibi nesne özelliklerini ayrı ayrı değiştirebilme (103), hatta anatomik yapıları birebire yakın kopyalama imkanı yaratmaktadır (104). Ayrıca, 3B basım, geleneksel yaklaşımlar kullanılarak üretilmesi zor olan karmaşık yapıların üretilmesine izin verir (105). 3B basım, erimiş biriktirme modelleme (FDM), 3B biyobasım, stereolitografi (SLA), dijital ışık işleme (DLP), eriyik elektrolitik çizme (MEW), mikro ekstrüzyon ve seçici lazer sinterlemeyi içerir (106).

Sinir kılavuzu mekanik olarak uygun bir üst yapı sağlarken, daha uzun boşluklarda rejenerasyon için sinir kılavuz lümenine bir maddenin dahil edilmesi gerekir (107). Ayrıca, en etkili sinir kılavuzunun muhtemelen birden fazla tedavinin

kombinasyonunu veya bir yaklaşımın geliştirilmesinde önemli bir ilerlemeyi içerdiğini gösteren önemli kanıtlar vardır.

Burada, biyomalzemelerin 3B baskı yoluyla otomatik olarak üretilmesi, çoklu terapötik (tedavi hedefli) sinir kılavuzu araştırması için gereken karmaşık permütasyonlara yardımcı olabilir (108). 3d baskı yaklaşımları giderek daha fazla araştırılmaya, çalışılmaya ve insanlar tarafından merakla takip edilmeye başlandı. 3B basım tekniğinin, periferik sinir yaralanmaları ve tedavisinde; sinir kılavuzları (109) doku iskeleleri (110), hücre taşıyıcı (111) ve kimyasal/fiziksel ortamlar oluşturulması (112) şeklinde uygulanabilirliği vardır. 3b basım daha fazla araştırıldıkça ve geliştikçe, önceden var olan sinir kılavuzuna dayalı yaklaşımın, ciddi şekilde hasar görmüş periferik sinirleri onarmak için daha etkili yapıların keşfedileceği sağlam bir bilgi platformu sağlayacağı öngörülebilmektedir (113). Yapay sinir tüpleri(kondüit), sinir uçları arasındaki boşluğu doldurmak için şu andaki en uygun yöntem olarak görülebilir (114). 3B basım sinir iskeleleri ve 3b biyo-basımla üretilmiş sinir parçaları, karmaşık periferik sinir tüplerinin doğal, biyolojik ve sentetik biyoyumlu malzemelerden hızlı bir şekilde üretilmesini sağlar ve biyobasım sinir kondüitleri, birçok durumda tedavi için mükemmel bir çözüm olabilir (115). Biyoloji ile eklemeli katmanlı üretimin bir arada kullanıldığı, 3b basım ve biyobasımın sürecin ayrılmaz parçaları olduğu sinir doku mühendisliği son zamanlarda oldukça ivme kazandı (116). Hızlı biyobasım yöntemleri sayesinde yaralı sinir dokusu biyobasımla üretilmiş yapay sinir dokularıyla tamir edilebilmektedir (114).

3b biyoyazıcı sayesinde, biyolojik, doğal ve sentetik malzemelerin karışımıyla üretilen biyomürekkep kullanarak ölçülebilen ve kontrol edilebilen birimlerde periferik sinir matrisleri üretilmektedir (117). Biyomürekkepte biyolojik materyaller, uyarılmış pluripotent kök hücreler, NKH, SH, astrositler, glial hücreler, motor nöronlar ve duyu nöronları gibi hücresel bileşenler bile kullanılabilir (118). Tasarım ve biyobasım süreci, kompozitin mekanik özelliklerini düzene koymanın yanı sıra sinir mimarisi, kullanılacak malzemeler, destekleyici hücreler ve büyüme faktörleri hakkında kapsamlı bilgi gerektirir (119).

Özellikle kolajen (120) ve jelatin (121) olmak üzere hidrojel, 3b biyomürekkep üretiminde yaygın olarak kullanılırlar. Sanjairaj ve arkadaşları (202), yaptıkları çalışmada kolajen ve PCL/PPY kopolimeri bazlı bir hidrojel biyobasım için uygun bir

biyomürekkep üretmişlerdir. Sinir doku mühendisliğinde kullanılan çeşitli malzemeler tabloda gösterilmiştir.

2.3.1. 3B Basım İçin Kullanılan Malzemeler

Hidrojeller, 3B basımda yaygın olarak kullanılan, çok hidrofilik üç boyutlu ağısı yapıda jeldir (123). 3B basım için hidrojel kullanırken, genellikle hidrojellerin reolojik özelliklerini ve çapraz bağlanma mekanizmasını (fiziksel, kimyasal) dikkate alırız (124). Hölzl ve arkadaşları (125), biyobasım uygulamasının tüm aşamalarındaki fiziksel özelliklerini incelemişlerdir. Hidrojellerin çapraz bağlanma mekanizmaları fiziksel veya kimyasaldır, ancak genellikle fiziksel çapraz bağlı hidrojel mekanik özelliklerde zayıftır, esas olarak kimyasal çapraz bağlama kararlı hidrojel yapılarının üretiminde kullanılır (126). Genellikle hidrojellerin polimer öncülerini değiştirmek için fotopolimerize edilebilen fonksiyonel gruplar yapıya eklenir (127). Hidrojeller doğal (aljinat, selüloz, kitozan, gelatin, ipek kozası vb.), sentetik (PCL, PGA, PU vb.) ve daha karmaşık olan kompozit hidrojeller olarak basitçe üçe ayrılır (128). Doğal hidrojeller mekanik olarak dayanıksızdır, ancak düşük inflamasyon oluşturma riski, kolay elde edilebilir olması, yüksek biyoyum ve biyobozunurluk özelliklerinden dolayı avantajlıdır (129). Sentetik hidrojeller ise mekanik açıdan çok daha dayanıklı olması ve daha kontrollü biyobozunma sağlanabilmesi açısından avantajlı olmasına rağmen, vücutta inflamasyon oluşturma riskleri çok fazladır (130). Bu nedenlerle son zamanlarda en çok, doğal ve sentetik hidrojellerin beraber kullanıldığı kompozit hidrojeller doku mühendisliği için tercih edilmektedir (131).

Basit operasyon süreci ve düşük maliyet avantajları nedeniyle FDM gibi 3B basım ile üretilen polyester iskele, sinir dokusu mühendisliğinde de yaygın olarak kullanılmaktadır (106). Polimer omurgasında PLA, PGA, PLGA, PCL, PU vb. Ester fonksiyonel grupları vardır (132). Polyesterler, yüksek biyoyumluluğu, kabul edilebilir biyolojik olarak parçalanabilirliği ve termoplastik işlenebilirliği nedeniyle çeşitli doku mühendisliği uygulamalarında büyük ilgi görmüştür (133). Hidrojel iskelelerin mekanik stabilitesi sınırlıdır ve şişme riskleri vardır, ancak polyesterler hidrojellerden daha yüksek sertliğe ve kararlılığa sahiptir (134). Polyester mürekkep eritilerek veya organik çözücüler içinde çözülerek elde edilebilir. Erimiş polyester, ekstrüzyon ile bir 3B bir iskele olarak basılabilir. Hammadde, metal bir ağızlığa bağlı bir ısıtma cihazına yerleştirildikten sonra

polyester eritilir ve ekstrüde edilir. Oda sıcaklığındaki ısı dağılımı nedeniyle, ekstrüde edilmiş desen hızla katılaşır, böylece polyester iskele katman inşa edilebilir (135).

İletken polimer malzemeler, sinir dokusu iskelelerinde yaygın olarak kullanılmaktadır çünkü sinirlerin temel işlevlerinden biri elektrik sinyallerinin iletilmesidir (122).

Yukarıda sunulan hidrojel ve hidrojel, polyester ve polyester kombinasyonuna ek olarak, hidrojel veya polyester eklenmiş veya katkılı yeni fonksiyonel malzemeler içeren birçok kompozit yapı iskelesi vardır (136). Kompozitler yalnızca iki malzemenin özelliklerini birleştirmekle kalmaz, aynı zamanda bazı yeni veya gelişmiş özellikler de gösterirler (mekanik özellikler, elektriksel özellikler, uyaran tepkisi, hücre yapışması, vb.) (137). Şu anda, sinir dokusu mühendisliğinde en yaygın kullanılan malzemeler iletken polimerler ve karbon bazlı nanomalzemelerdir (138).

2.4. SİNİR DOKU MÜHENDİSLİĞİ İÇİN ELEKTROEĞİRME YÖNTEMİ

Lifli iskeleleri imal etmek için kullanılan bir teknik olan elektroegirme, hücre dışı matrise mimari benzerliklere sahip doku mühendisliği yapılmış greftler üretmek için bir yöntem olarak son yıllarda popülerlik kazanmıştır (139). Doku mühendisliğinde, gözenekli lifler doğal hücre dışı matrisi (ECM) taklit edebilir ve yüzey gözenekleri, hasarlı doku ve organların restorasyonu ve rejenerasyonu için önemli olan hücre bağlanmasını kolaylaştırır (140).

Bu tekniğin, geniş yüzey alanına sahip mikro ila nanometre ölçekli liflerin üretimini sağlamak gibi çeşitli avantajları vardır (141). Ayarlanabilirliğinin ötesinde, görece düşük maliyetli ve basit elektroegirme kurulumu, onu iskele imalatı için popüler bir seçim haline getirmiştir (139).

Bu teknik, 3 nm'den 5 um'den büyük çaplara sahip polimer fiberlerin(liflerin) üretimine izin verir. Nanofiberler, ayarlanabilir gözeneklilik ile yüksek bir yüzey alanı-hacim oranına sahiptir ve biyolojik moleküllerle kolayca işlevselleştirilebilir. Nanofiber üretimi için ilaç olarak doğal ve sentetik polimerler, inorganik nanomateryaller, kompozitler ve biyomoleküller gibi çok çeşitli malzemelerin seçimi, onları birçok gelişmiş biyomedikal uygulama için sağlam ve çekici bir aday haline getirmektedir (142).

Nanofiber üretiminde zengin malzemeler olarak polimerler, seramikler, küçük moleküller ve bunların kombinasyonları kullanılmaktadır. Katı nanoliflere ek olarak, nanoliflerin ikincil bir yapısı gözenekli, içi boş veya çekirdek-kılıf yapıları da dahil olmak üzere üretilmiştir ve yapının yüzeyi, elektroğirme işlemi sırasında veya sonrasında farklı moleküler parçalarla işlevselleştirilebilir (143). Nanofiberler, DNA, RNA ve büyüme faktörleri için umut verici terapötik uygulamalara sahiptir, örneğin, protein ve steroid hormon iletimi (142).

Metal iğneli düze, şırınga pompası, yüksek voltajlı güç kaynağı ve topraklanmış bir toplayıcı, standart bir elektroğirme sisteminin ana bileşenleridir (144). Elektroğirme'de, enjeksiyon iğnesi ile toplama süzgeci arasında bir güç kaynağı ve elektrotlar kullanılarak yüksek voltajlı bir elektrik alanı oluşturulur. Yavaş yavaş polimer çözeltisinden dışarı çıkmaya zorlandıktan sonra, iğnenin ucunda yarım küre şeklindeki bir polimer çözeltisi damlacığı şekillendirilir (145). Bu polimer damlacık, 'Taylore' konisi olarak bilinen konik bir şekle uzanır ve polimer damlacık üzerindeki yüzey yükü, voltajı artırarak zamanla artar (146). Polimer damlacığının yüzey yükünün üstesinden geldikten hemen sonra bir polimer jet oluşmaya başlar. Çözelti polimer jet içinde buharlaştırdıktan sonra, jet üzerindeki yüzey yükü artar ve bu da polimer jetinin dengesini bozar (141).

Lif morfolojisi, tipik olarak çözeltinin kendine özgü özelliklerine (örneğin, polimer, konsantrasyon, iletkenlik, polarite, çözücünün yüzey gerilimi), işleme koşullarına (ör. Uygulanan voltaj, toplayıcı, akış hızı) ve çevresel koşullar (örn. Nem, sıcaklık) bağlıdır. Fiber morfolojisine katkıda bulunan parametrelerin sayısı göz önüne alındığında, teknik, çeşitli kurulum modifikasyonları yoluyla fiber geometrisini, toplama ve oryantasyonu değiştirme yeteneği ile son derece ayarlanabilir bir teknik olarak karşımıza çıkmaktadır (139). Çözelti özelliklerinin etkilerinin izole edilmesi zor olabilir çünkü bir parametrenin değiştirilmesi genellikle diğer çözelti özelliklerini etkileyebilir (örneğin, iletkenliğin değiştirilmesi viskoziteyi de değiştirebilir) (147). Jet, artan yüksek çaplı bir döngü ile daha uzun ve daha ince büyür, bu da çözücünün buharlaşması nedeniyle polimerin katılaşmasına neden olur. Katılaşan nanolifler daha sonra hedef üzerinde toplanır (142). Değişen parametrelerin fiber morfolojisi ve üretilen matriks üzerine etkileri Çizelge 2.2'te özetlenmiştir.

İskelenin fiziksel ve biyolojik özellikleri, elektroğirme için kullanılan malzemeye ve yüzey ıslatılabilirliği, mekanik özellikler ve bozunma gibi özelliklerine bağlıdır. Yapı iskeletlerinin özellikleri, çeşitli biyolojik olarak parçalanabilen, biyolojik olarak parçalanamayan, sentetik ve/veya doğal malzemelerin kopolimerizasyonu veya polimer harmanlanmasıyla manipüle edilebilir (148).

PCL, PLA, PGA, PLGA ve PLCL gibi geleneksel sentetik biyolojik olarak parçalanabilen polyesterler, iyi işlenebilirlikleri ve kararlı mekanik özellikleri nedeniyle elektroğrılmış fibröz yapılar için kullanılan ve tercih edilen malzemelerdir (149). Kolajen, jelatin ve elastin gibi doğal polimerler de kullanılmıştır ve genellikle iyi biyouyumluluk ve biyoaktivite göstermiştir (150).

Elektroğirme, onarımı desteklemek için fiziksel ve kimyasal olarak ayarlanabilen bir dizi nöral iskenin imalatı için birçok avantaj sunar. İşleme parametreleri, polimer türü ve moleküler ağırlık ve biyoaktif moleküllerin dahil etme ve verme yöntemleri gibi özel gereksinimleri karşılayacak şekilde uyarlanabilir (151). Sinir doku mühendisliği için, Christopherson ve ark., elektroğrılmış poli (eter sülfon) fiber çapının nöral kök hücreler üzerindeki etkisini değerlendirdi. Daha küçük lif çapına sahip ağlarda artan yayılım ve hücre yayılma derecesinin yanı sıra daha düşük bir hücre agregasyonu derecesi bildirdiler. Yang ve arkadaşları, sinir doku mühendisliği amacıyla poli (l-laktik asit) (PLLA) tabanlı elektroğrılmış nanofibröz yapı iskeletlerinin potansiyelini inceledi. Çalışmaları, nanofibröz yapı iskeletlerinin NKH üzerindeki etkisini anlamayı içeriyordu. Sonuçlar, rastgele yönlendirilmiş nanofiberlerin (150-350 nm) yalnızca NKH yapışmasını desteklemekle kalmayıp aynı zamanda NKH farklılaşmasını da teşvik ettiğini gösterdi (152).

Çizelge 2.2: Elektroeğirme uygulama parametreleri (147, 153–155)

Parametre	Lif morfolojisi üzerine etkisi
Viskozite / konsantrasyon	• Düşük konsantrasyonlar / viskoziteler, boncuk şeklinde kusurlar ve yapışma alanları oluşturur; artan konsantrasyon / viskozite kusurları azaltır • Artan konsantrasyon / viskozite ile lif çapları artar
İletkenlik / çözelti yük yoğunluğu	İletkenlik artışı düzgün formlu fiber oluşumunu artırır ve fiber çapları küçülür.
Yüzey gerilimi	Yüzey gerilimi ile lif morfolojisi arasında kesin bir bağlantı bulunmamıştır.
Polimerin moleküler ağırlığı	Moleküler ağırlık artışı boncuk ve damlacık oluşumunu azaltır.
Akış hızı	• Düşük akış hızı küçük çaplı fiberlerin oluşmasını sağlar. • Yüksek akış hızı sonucu çözelti toplayıcıya kurumadan gider ve damlacıklar oluşabilir.
Voltaj	• Yok yüksek voltajlarda boncuklu fiber oluşumu görülür. • Voltajla fiber çapı arasındaki bağlantı belirsizdir.
Şırınga ucu ile toplayıcı arasındaki mesafe	• İdeal uzaklık düzgün ve kuru bir şekilde toplayıcıya çözeltinin ulaştığı uzaklıktır. • Çok yakın ya da çok uzak mesafelerde boncuklu fiber oluşumu gözlenmiştir
Nem	Yüksek nem fiberler üzerinde dairesel gözenekler oluşturur.
Sıcaklık	Sıcaklıktaki artış fiber çapının azalmasına neden olur.

Sinir yönlendirme kanalları olarak elektroeğrilmiş nanofiber malzemelerin kullanımına ilişkin ilk çalışmalar, bu tür sinir kılavuzlarının tam potansiyelinin belirlenmesiyle bu malzemelerin periferik sinir dokusunun onarımı ve rejenerasyonu için umut verici olduğunu göstermektedir (156).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. MALZEMELER

PEDOT:PSS polimeri PEDOT içeriği %0,5 wt., PSS içeriği %0,8 wt. (su içinde &1.3 wt. dispersiyon şeklinde, Sigma-Aldrich, ABD) olacak şekildedir. PEDOT:PSS polimerine çözücü olarak dimetil sülfoksit(DMSO, saflık oranı $\geq 99,9$, Sigma-Aldrich, ABD) kullanılmıştır. Jelatin (BioBasic, Newyork, ABD) temin edilmiştir. Asetik asit (Saflık %100, Sigma-Aldrich, ABD) %50 wt. su ile karıştırılmış ve jelatine çözücü olarak kullanılmıştır. PLLA polimeri (ortalama Mn 40,000, Sigma, ABD) ve sıçan kuyruğu tip I kolajen Sigma, Merck KGaA, Darmstadt, Almanya'dan temin edilmiştir. Çözücü olarak, asetik asit (saflık oranı ≥ 99 , Isolab GmbH, Almanya) ve 1,1,1,3,3,3-hekzafluoro-2-propanol (HFIP, saflık oranı ≥ 99 , Sigma, ABD) kullanılmıştır. Fetal sığır serumu (FBS, Gibco, Almanya), glutraldehid çözeltisi (Biobasic, Kanada), prestoblue çözeltisi (R&d, Kanada) hücre çalışmalarında kullanılacaktır.

3.2. 3 BOYUTLU SİNİR TÜPÜ ÜRETİMİ

3.2.1. 3B Yazıcı ile Plla Tüpün Basılması

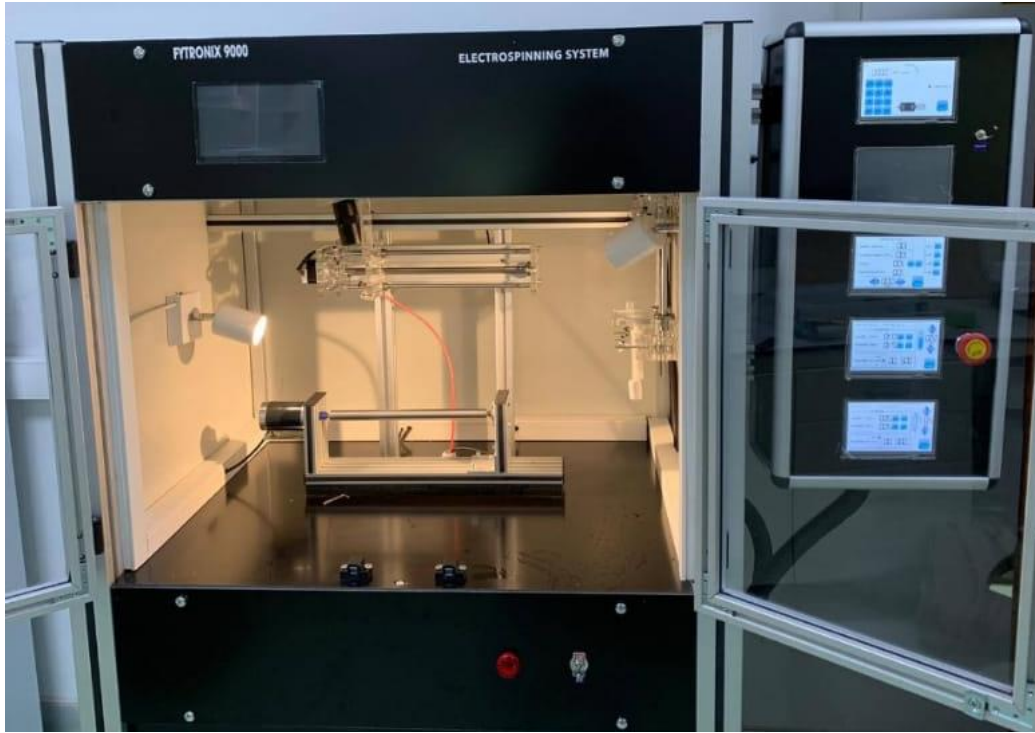
PLLA sinir tüpleri bir 3B yazıcı ile FDM metoduyla basılmıştır. Ekstruderin sıcaklığı PLLA'ın basıma uygun hale gelebilmesi için 210°C'ye ayarlanmıştır ve çevre sıcaklığı oda sıcaklığındayken basım yapılmıştır. Sinir tüpleri 'SolidWorks' programıyla sanal olarak tasarlanmış ve STL formatına dönüştürülerek bilgisayar bağlantılı yazıcı ile basılmıştır. Tüpler 0,3 cm çapında ve 1 cm yüksekliğindedir.

3.2.2. 3B Basılmış Plla Tüpler Üzerine Jelatin/Pedot:Pss Fiber Membranın Elektroeğrılması

Elektroeğirme yöntemi, yukarıda bahsedildiği gibi polimer esaslı mikro ve nanoliflerin üretimi için en etkin yöntemlerden biridir. Üniversitemiz DETUAM Validebağ Araştırma Parkı'nda bulunan FYTRONIX 9000 marka elektroeğirme cihazı bu projede kullanılmaktadır. İki şırınga kapasitesine sahip olduğundan koaksiyel elektroeğirme

yapılabilmektedir. Cihaz 30 kV'ye kadar gerilim uygulayabilmektedir. Bu çalışmada döner toplayıcı tabaka kullanılmıştır.

Elektroeğirme sisteminde, voltaj, çözeltinin pompalanma hızı (akış hızı), iğne ile hedef arasındaki mesafe değiştirilerek farklı fiber morfolojileri ve fiber çapları oluşturulmaya çalışılmıştır. Ortam sıcaklığı ve havadaki nem endeksi, oda koşullarında ortalama 25°C ve %50 olarak raporlanmıştır.



Resim 3.1: Üniversitemiz Validebağ Araştırma Parkı'nda bulunan FYTRONIX 9000 marka elektroeğirme cihazı

Elektroeğirme işlemi için çözelti hazırlamak amacıyla, PEDOT:PSS sulu çözeltisi (su içinde &1,3 wt. dispersiyon şeklinde, Sigma-Aldrich, ABD) 6 saat boyunca kuvvetlice karıştırıldıktan sonra DMSO (DMSO, Sigma-Aldrich), son çözeltini %50'si olacak miktarda eklendi. Çözeltideki PEDOT:PSS yoğunluğu değiştirilerek (son çözeltinin %0,5'i, %1'i, %2,5'u, %5'i, %10'u) farklı çalışma grupları oluşturuldu. Oda sıcaklığında 24 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılan çözelti daha sonra düz propilen bir tabakanın üzerine yayılarak 60°C'de 24 saat kurumaya bırakıldı. Tamamen kurumasını sağlamak amacıyla her döngü 30 dakika olacak şekilde 130°C'lik 3 döngü kurutma işlemi

uygulandı. Yüzeyden soyulan PEDOT:PSS filmler elektroëğirme için hidrojel formunda elde edildi.

Daha önce 3B yazıcı ile basılmış olan PLLA tüpler döner bir rotora baēlı uca sabitlendi ve yukarıda anlatılan şekilde hazırlanan hidrojel elektroëğirme polimeri, direkt olarak PLLA tüplerin üzerine elektroëğirme şeklinde uygulandı.

3.3. JELATİN/PEDOT:PPS FİBR KARAKTERİZASYONU

3.3.1. Taramalı Elektron Mikroskobisi (Tem)

Elektroëğirme süreci boyunca denenen parametrelerin arasında en iyi fiber yapısının elde edilmesine izin veren üretim parametrelerinin tespit edilmesi için taramalı elektron mikroskopisi (SU7000, HITACHI, Japonya) ile yüzey karakterizasyon ve fiber morfolojisinin belirlenmesi sağlanmıştır. Bunun için, elektroëğirme işlemi sonunda folyo hedeften ayrılmış ve fiber mat, elektrik iletkenliēi sağlanabilmesi amacıyla püskürtmeli kaplama yöntemi (sputter coating) ile altın/paladyum (Au/Pd) kaplanarak 12 kV hızlandırma voltajında incelenmiştir.

Enerji dağılımlı X-ışını spektrometresi (EDS), TEM ve geçirimli elektron mikroskopları için çok farklı uygulamalarda kullanılmak üzere üretilmiş, malzemenin farklı bölgelerinde elemental kimyasal analiz, çizgi analizi, faz tespiti ve haritalaması, renkli kompozisyon görüntülemesi gibi tekniklere olanak sağlayan bir yöntemdir. Üretilen fiberlerdeki altın nano parçacıkların miktarının saptanmasında kullanılmıştır.

3.3.2. FTIR (Fouirer Transform Infrared Spectroscopy)

FTIR analizleri ATR ve KBr-tablet formlarında yapılarak doku iskelesinde kullanılan polimerlerin transmisyon bandlarındaki deēişiklikler incelenmiştir.

Yapısında Jelatin ve PEDOT:PSS bulunan numunelerde kimyasal baēlara ait kızılötesi spektrum bantları ve polimerik fiberlere ait bantlar, projede önerildiēi gibi Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR, Nicolete, THERMO-FISHER, ABD) ile incelenmiştir. Kullanılan cihaz üzerinde entegre zayıflatılmış toplam yansıma (attenuated total reflection, ATR) ünitesi bulunmaktadır. ATR modunda, saf ve kompozit fiberlerin kızılötesi spektrumları 650-4000 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında kaydedilmiştir.

3.3.3. Fosfat Tamponlu Salın (Pbs) İçinde Şişme Testi

Fosfat tamponlu salin (PBS) çözeltisi bir tampon çözelti olup, laboratuvar ortamında insan vücut sıvılarının iyon konsantrasyonunu, ozmolarite ve pH açısından benzer ortam oluşturulması için özellikle değerlidir. 1 litre 1×PBS hazırlamak için, sırasıyla şu adımlar takip edilmiştir: 1) 800 ml damıtılmış su, 1 litrelik bir behere koyulmuştur ve manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirilmiştir. 2) 8 g NaCl eklenmiştir. 3) 0,2 g KCl eklenmiştir. 4) 1,44 g Na₂HPO₄ eklenmiştir. 5) 0,24 g KH₂PO₄ eklenmiştir. 6) HCl ile çözeltinin pH'ı 7,4'e ayarlanmıştır. 7) Toplam hacim 1 litreye tamamlanacak şekilde çözeltiye distile su eklenmiştir.

Üretilen fibröz membranın şişme davranışı, dairesel numunelerde gravimetrik yöntemle belirlenmiştir. Her numune, farklı zaman aralıkları için bir fanlı fırın içerisinde 37°C'de sabit tutulan PBS (pH = 7,4) içerisine daldırılmıştır. Her zaman noktasında, numunelerin üzerinden fazla tampon çözeltisi bir filtre kağıdıyla alındıktan sonra hassas terazide (Axis, Gdańsk, Polonya) ağırlıkları ölçülmüştür. Şişme derecesi (%) aşağıdaki Eşitlik 3.1'e göre hesaplanmıştır:

$$\text{Şişme}(\%) = \frac{W_s - W_d}{W_d} \times 100 \quad (\text{Eşitlik 3.1})$$

Burada W_s numunenin PBS'ye daldırıldıktan sonra şişmiş (swollen) haldeki ağırlığını ve W_d ise kuru haldeki numunenin ağırlığını belirtir.

3.3.4. In-Vitro Bozunma Testi

Standart bozunma testi için örnekler 3 mm uzunluğunda hazırlandı ve tartıldı. Tüm numuneler etanol ve PBS içine daldırıldı ve yaklaşık 81.00 mbar'da 30 dakika boyunca beklemeye bırakıldı. PBS'den çıkarıldıktan sonra, numuneler PBS ile üç kez yıkanıp tekrar 3 ml PBS çözeltisine daldırılmış ve 37°C'lik sabit sıcaklık su banyosunda salınım yapılmıştır. Eppendorf tüpündeki PBS çözeltisi her 7 günde bir yenilendi. Numuneler, belirlenen zaman noktalarında (2 gün, 4 gün, 7 gün, 2 hafta, 4 hafta) çıkarıldı

ve deiyonize su (üç kez) kullanılarak PBS tuzu taneleri temizlendi, sonra liyofilize edildi ve tartıldı. Her örnek için her zaman noktasında üç ölçüm gerçekleştirildi ve veriler ortalama $\pm$ SD ($n = 3$) olarak sunuldu. Bozunma için, numunenin kütle kaybı aşağıdaki Eşitlik 3.2'ye göre hesaplanmıştır.

$$K\ddot{u}tle\ Kayb\ddot{ı} = \frac{m_t - m_0}{m_0} \times 100 \quad (\text{Eşitlik 3.2})$$

Burada m_t , örneğin belirli bozunma zaman noktasındaki ağırlığı, m_0 ise örneğin başlangıç ağırlığıdır.

3.3.5. Sınır Tüplerinin Elektriksel, Kimyasal Ve Mekanik Değerlendirmesi

Kanalların iletkenlik ölçümü standart dört noktalı prob yöntemi kullanarak ortam sıcaklığında 0,5 mA akım ile yapıldı. Dört nokta prob aleti voltajın değerini ölçer. Voltaj değeri, tüplerin kalınlık ve elektriksel direnç değerleri aşağıdaki denklem üzerinde kullanılarak sinir tüplerinin elektrik iletkenliği aşağıdaki Eşitlik 3'e göre hesaplandı.

$$\sigma = \frac{\ln 2}{\pi t} \left(\frac{I}{V} \right) \quad (\text{Eşitlik 3.3})$$

Burada, σ = elektriksel iletkenlik (S / cm), t = tüpün kalınlığı (cm), I = akım (A) ve V = voltaj (V). Her bir tüp için en az beş ölçüm yapıldı ve ortalama değerler rapor edildi.

3.4. JELATİN/PEDOT:PSS FIBER MEMBRAN İLE KAPLANMIŞ PLLA TÜPLER İLE *İN-VITRO* HÜCRE ÇALIŞMALARI

Hücreler 5 mL bazal ortamda yeniden süspansiyon edildi (B27 takviyesi içeren DMEM (20 mL / mL; Gibco) ve bFGF (20 ng/mL; Invitrogen)). Hücreler 75 mL'lik kültür flasklarına kaplanmıştır. Ortam medyumunu 3 günde bir değiştirildi. Hücreler haftada bir

pasajlanmıştır. Hücreler daha sonra bazal ortamda süspanse edildi (%10 FBS içeren DMEM). İskeleye nörosferleri ekmek için $3,1 \times 10^6$ hücre, 20 ml kültür ortamına (DMEM, %10 FBS ve 50 mg/ml askorbik asit) NGF eklenmiş ve tüpler üzerine hücreler ekilmiştir. Hücre ekilmiş tüpler, 35 mm kültür kaplarında kültür medyumunu her 2 günde bir değiştirilerek 14 gün boyunca inkübe edilmiştir. Hücre ekiminden 1, 3, 5 ve 7. gün sonra örnekler ve kontrollere 'PrestoBlue' ile hücre proliferasyon(yayılma) testi uygulanmıştır. Hücre kültürü hacminin %10'u olacak şekilde 'Prestoblue' eklenmiştir. 37°C'de plakalar 4 saat daha inkübe edilmiştir ve ardından renk kompleksinin absorbanası, 'PrestoBlue' için 600 nm'ye ayarlanmış bir referans dalga boyu ile 570 nm'de okunmuştur.

İskelelerdeki hücrelerin morfolojisini incelemek için farklı inkübasyon dönemlerinin sonunda SEM analizi yapıldı. Örnekler 3 kez PBS ile yıkandı ve hücreler, oda sıcaklığında 1 saat boyunca 4% paraformaldehit ile sabitlendi. Daha sonra iskeleler 3 kez PBS ile yıkandı ve kurutuldu. Son olarak, heksametildisilazan içine daldırıldılar ve altınla (5 nm) kaplamadan önce kurutuldular.

3.5.HÜCRELERİN FLORESAN MİKROSKOBU ANALİZİ

İskelelerin üzerine ekilen sinir hücrelerinin morfolojisini incelemek için 1. Ve 7. günün sonunda invert floresan mikroskobu (DMI 8, Leica Microsystems, Almanya) analizi yapıldı. Hücreler fiksasyondan sonra Falloidin-FITC ve DAPI (Abcam, ABD) ile boyandı. Falloidin-FITC'nin stok çözeltisi, 0.1-5 mg / ml'de PBS içinde hazırlandı. Örnekler PBS ile yıkandıktan sonra %4 formaldehit kullanılarak 10 dakika boyunca fiksleildi. Bu aşamayı takiben, örnekler PBS'e batırıldı ve PBS içinde% 0.1 Triton X-100 ile 10 dakika süreyle dehidre edildi ve dehidrasyon aşamasından sonra PBS ile yıkandı. Örnekler, 40 dakika boyunca oda sıcaklığında Falloidin-FITC (50 ug / ml) ile boyandı. Daha sonra, boyanan hücreler üç kez PBS ile yıkanmalıdır. Son olarak, hücre çekirdiğini boyamak için DAPI (50 ug / ml) eklenerek 15 dakika beklenir ve görüntülemenden önce 3 defa PBS ile yıkanır.

3.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Verilerin istatistiksel analizi için SPSS yazılımı (ver. 23.0; IBM Corporation, NY, ABD) kullanılarak çoklu karşılaştırmalar için Tukey post hoc testi ile tek yönlü varyans

analizi (ANOVA) kullanıldı. Farklar $p \leq 0.01$ 'de önemli kabul edildi. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak ifade edildi.



4. BULGULAR

4.1. SİNİR TÜPLERİNİN 3B BASIMI

Yöntem kısmında anlatıldığı gibi sinir tüplerinin basımı için mekanik ekstrüzyon yöntem ile çalışan Renovo 3B biyoyazıcı kullanılmıştır. Bu yöntemde elde edilen son ürünü etkileyen faktörler sırasıyla: termoplastik başlığın sıcaklığı, baskı tabaksının sıcaklığı, baskı hızı ve uygulanan mekanik basınç olarak bilinmektedir. Bu çalışmada ilk basım katmanının yüzeye tutulmasını sağlamak için baskı tabakasının sıcaklığı 45°C olarak ayarlanmıştır. Optimum basım koşullarını elde etmek için diğer basım etkenleri Çizelge 4.1’de gösterildiği gibi optimize edilmiştir.

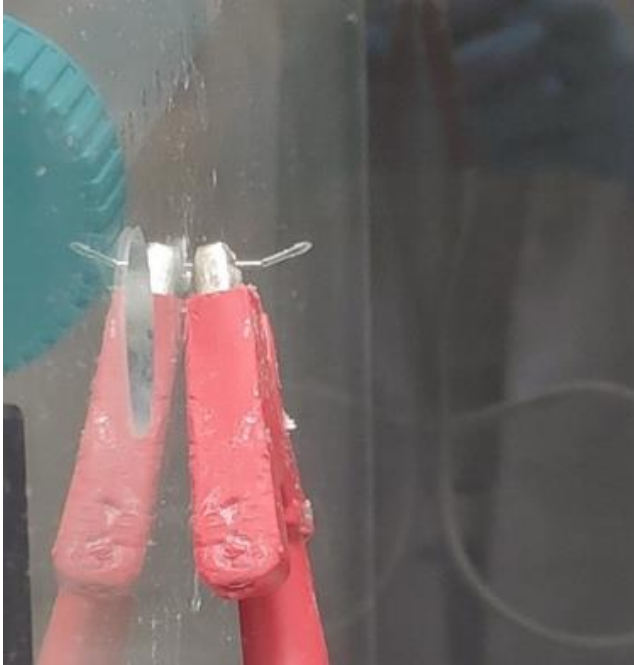
Çizelge 4.1: Farklı parametrelerle sinir tüpü 3B basımı (B: Birinci tabaka, İ: İkincil tabakalar)

Deneme	Mekanik Basınç (PSİ)	Sıcaklık (°C)	Basım hızı (mm/sn)	3B basım sonucu
1	80	200	B: 100 İ: 10	Polimer yapısında bozulma ve renk değişimi
2	80	180	B: 100 İ: 7	İstenilen akışkanlık sağlanmış fakat polimer katı faza geçmediği için katmanlarda bozulma meydana gelmiş.
3	80	170	B: 50 İ: 7	Net lümen boşlukları, kısmi düzensizlikler ve bozulmalar
4	70	170	B: 50 İ: 7	Katmanlar arası kısmi kaymalar
5	70	170	B: 45 İ: 7	Dış çevre ideal, lümen boşlukları tamamen belirgin ve herhangi bozulma yok

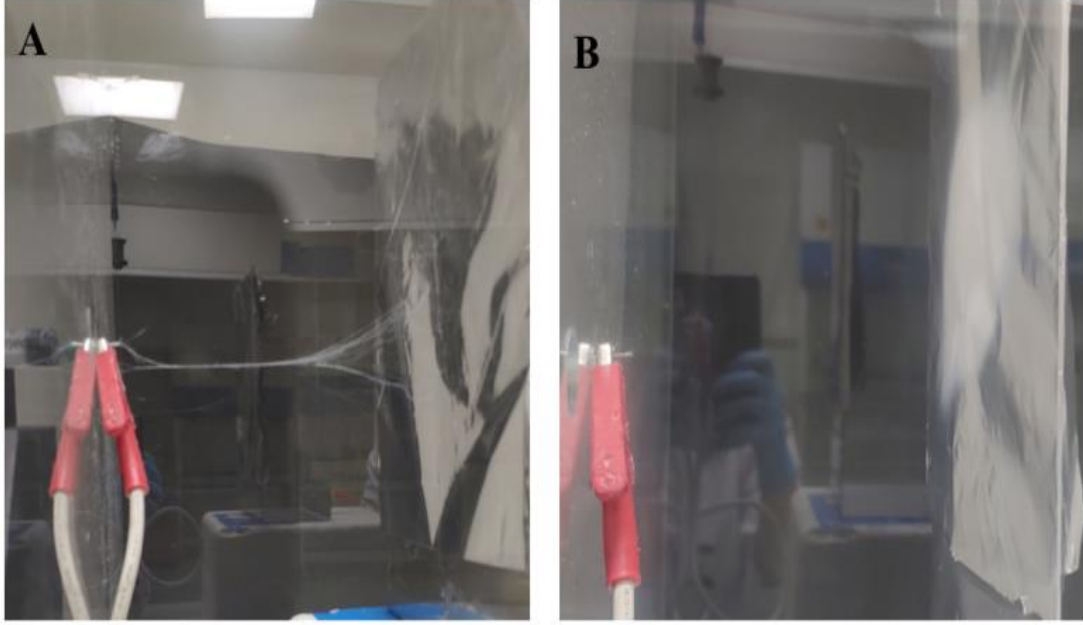
Çizelgede gösterildiği gibi optimum mekanik basınç 75 PSİ, termoplastik başlık sıcaklığı 170°C, birincil tabaka baskı hızı 45 (mm/sn) ve ikinci tabakalar için 7 (mm/sn) olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda elde edilen sinir tüpünün dış çevresi ideal olmasının yanı sıra lümen boşlukları istenilen boyutlarda oluşturulmuş olup ve son ürün tasarlanan ürüne en yakın benzerliği göstermektedir.

4.2. ELEKTROEĞİRME SONUÇLARI

Elektroeğirme işlemi ve sonuçları çevre koşullarına bağlı değişkenlik göstermektedir. Çevre koşullarında oluşacak birçok değişken elektroeğirme sürecini ve oluşan fiber matrisi etkilemektedir. Elektroeğirme yapılan odanın sıcaklığı ve göreceli nem oranındaki değişiklikler oluşan matris yapısını, bütünlüğünü, fiber morfolojilerini, fiber çaplarını ve bazı fiziksel özelliklerini değiştirmektedir. Bu çalışma kapsamında yaptığımız elektroeğirme çalışmaları esnasında oda sıcaklığındaki değişim ve özellikle nem oranının yüksek olduğu günlerde artan göreceli nem oranları fiber oluşumunu etkilemiştir. Oda sıcaklığının 25°C'nin altına düştüğü koşullarda şırınga ucundan çıkan solüsyonda jelleşme meydana gelmiş ve elektroeğirme işlemine devam edilememiştir (Bkz. Resim 4.2). Özellikle yağmurlu günlerde meydana gelen göreceli nem oranındaki artış ise tabla üzerinde tabaka oluşumu olmamıştır ya da normal şartlara göre daha ince ve düzensiz olmuştur. Bu nedenlerle, elektroeğirme yapılan odanın koşulları her örnek için aynı olmalıdır. Bu parametrelerdeki farklılıklar dikkat edilmediği sürece deney sonuçlarını etkileyebilmektedir.



Resim 4.1: Şırınganın ucunda donan çözelti



Resim 4.2: a) 80% nem oranında elde edilen sonuç, b)50% nem oranında elde edilen sonuç.

Resim 4.2’de Ortam neminin ‘Taylore’ konisi üzerindeki etkisini göstermektedir. Nemin artması, fiber çaplarının artmasına ve sistemin dengesinin bozulmasına yol açmıştır.

Jelatin kolay elektroğrilebilen bir malzemedir ve asetik asit ve HFIP başta olmak üzere birçok çözücüyle elektroğrilebilmektedir. %100 asetik asit içinde çözülerek hazırlanan jelatin çözeltisinin viskozitesi elektroğirme için uygun olmadığı gözlenmiştir. %100 asetik asit doğal polimer olan jelatin polimer zincirlerini kırarak polimer yapısını değiştirmektedir. Bu nedenle asetik asit seyreltilerek kullanılmış ve böylece polimer zincirlerinin kırılması önlenmiştir. Sırayla %7 wt., %20wt., %30 wt., %35 wt., %40 wt. ve %50 wt. Asetik asit içinde jelatin çözeltileri hazırlanarak, çözeltilerin akışkanlığı incelenmiştir. %50 wt. altındaki sulu çözeltiler yüksek yeterli iletkenliği sağlayamamalarından dolayı elektroğrilme için uygun olmadıkları tespit edilmiştir. Diğer taraftan polimer zincirlerinin kırılmasını önlemek için asetik asit oranının düşük tutulması gerekmektedir.

Elektroegirme koşullarını optimize etmek için yapılan denemeler çizelge 4.2’de (Bkz. Çizelge 4.2) özetlenmiştir. Tüm örnekler 28°C oda sıcaklığında ve %50 nem oranında elektroegrilerek oluşturulmuştur. Tabla üzerinde fiberlerin toplanarak tabaka oluşturabilmesi için, fiber oluşumu gözlenmeye başladıktan sonra 30 dakika boyunca elektroegirmeye devam edildi ve tabla üzerine sarılmış alüminyum folyo üzerinde örnekler toplandı.

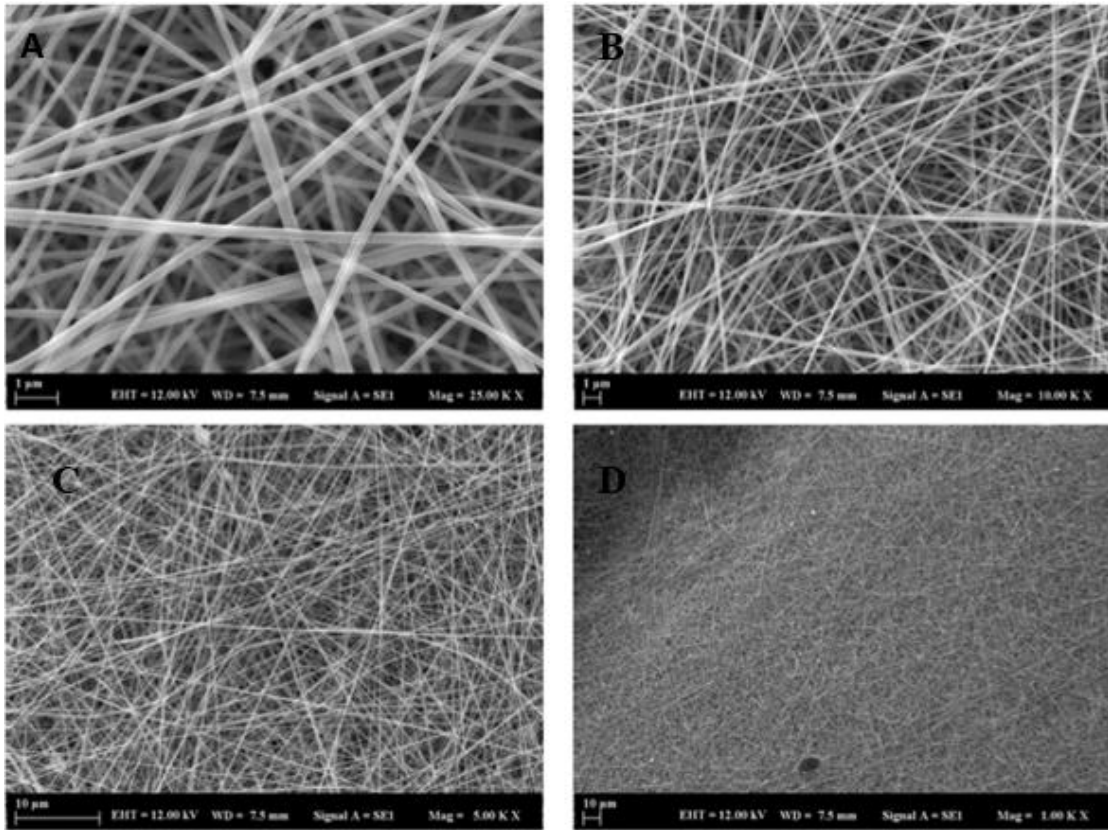
Tablodaki sonuçlara bakılacak olursa iletken bir polimer olarak bilinen PEDOT:PSS polimerinin çözeltilere eklenmesiyle birlikte fiber oluşturmak için gerekli olan voltaj düşmüştür ve böylece daha kolay fiber elde etmek mümkün olmuştur. Sadece %30 ve %40 jelatin çözeltilerinin elektroegrilmesi için gereken 30 kV olan voltaj PEDOT:PSS polimerinin eklenmesiyle birlikte %30 civarında düşerek 20 kV olarak seçilmiştir. Ayrıca elde edilen sonuçlara göre akış hızı olarak 500 µl/h ideal akış hızı olarak seçilmiştir. Hedef tablasının, şırınga ucundan 10 cm uzaklıkta olması çözücünün buharlaşması ve fiber oluşması için yeterli olduğu gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.2: Farklı parametrelerle elektroëirme

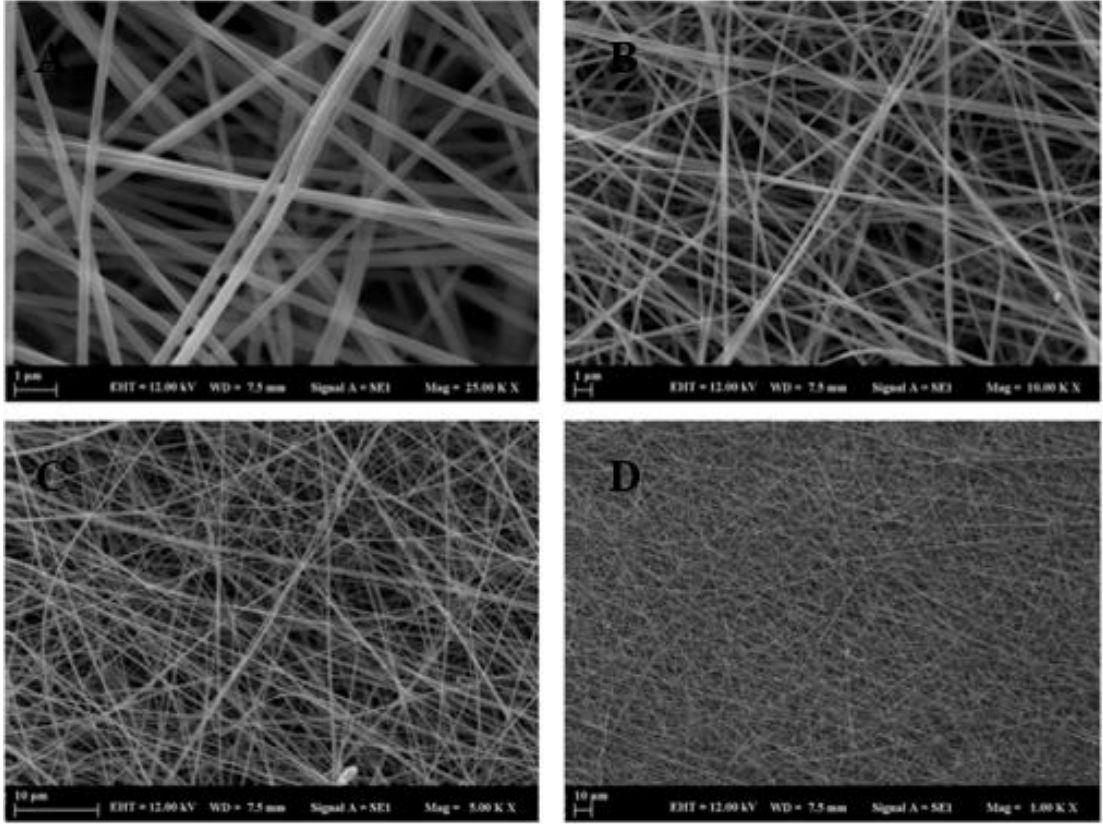
	Çözelti	Volt (kV)	Akış Hızı (ml/saat)	İğne ucu- tabla Mesafesi (Cm)	Sonuç
1	%20 (w/v) jelatin	25	0,5	10	Tabla üzerinde homojen tabaka oluşumu gözlemlendi.
2	%30 (w/v) jelatin	30	0,5	10	Tabla üzerinde homojen tabaka oluşumu gözlemlendi.
3	%40 (w/v) jelatin	30	0,5	10	Tabla üzerinde homojen tabaka oluşumu gözlemlendi.
4	%20 (w/v) jelatin , %0,5 (w/v) PEDOT:PSS	25	0,5	10	Tabla üzerinde damlacıklarla birlikte tabaka oluşumu gözlemlendi.
5	%30 (w/v) jelatin, %0,5 (w/v) PEDOT:PSS	30	0,5	10	Tabla üzerinde damlacıklarla birlikte tabaka oluşumu gözlemlendi.
6	%40 (w/v) jelatin, %0,5 (w/v) PEDOT:PSS	30	0,5	10	Tabla üzerinde damlacıklarla birlikte tabaka oluşumu gözlemlendi.
7	%20 (w/v) jelatin , %0,5 (w/v) PEDOT:PSS	20	0,5	10	Tabla üzerinde homojen tabaka oluşumu gözlemlendi.
8	%30 (w/v) jelatin, %0,5 (w/v) PEDOT:PSS	25	0,5	10	Tabla üzerinde homojen tabaka oluşumu gözlemlendi.
9	%40 (w/v) jelatin, %0,5 (w/v) PEDOT:PSS	25	0,5	10	Tabla üzerinde homojen tabaka oluşumu gözlemlendi.
10	%20 (w/v) jelatin , %1 (w/v) PEDOT:PSS	20	0,5	10	Tabla üzerinde tabaka oluşumu gözlemlendi.
11	%30 (w/v) jelatin, %1 (w/v) PEDOT:PSS	20	0,5	10	Tabla üzerinde homojen tabaka oluşumu gözlemlendi.
12	%40 (w/v) jelatin, %1 (w/v) PEDOT:PSS	20	0,5	10	Tabla üzerinde homojen tabaka oluşumu gözlemlendi.

4.2.1. Elektroeğirme Yöntemiyle Üretilen Fiberlerin Morfolojisinin İncelenmesi

Resim 4.3'te, %20 jelatin çözeltisinden elde edilen fiberlerin morfolojisini göstermektedir. Fiberlerin homojen morfolojiye sahip olduğu açık bir şekilde resimlerde gösterilmektedir. Ayrıca yapıda elektroeğirme yönteminin en büyük sorunlarından olan boncuk oluşması gözlemlenmemiştir.



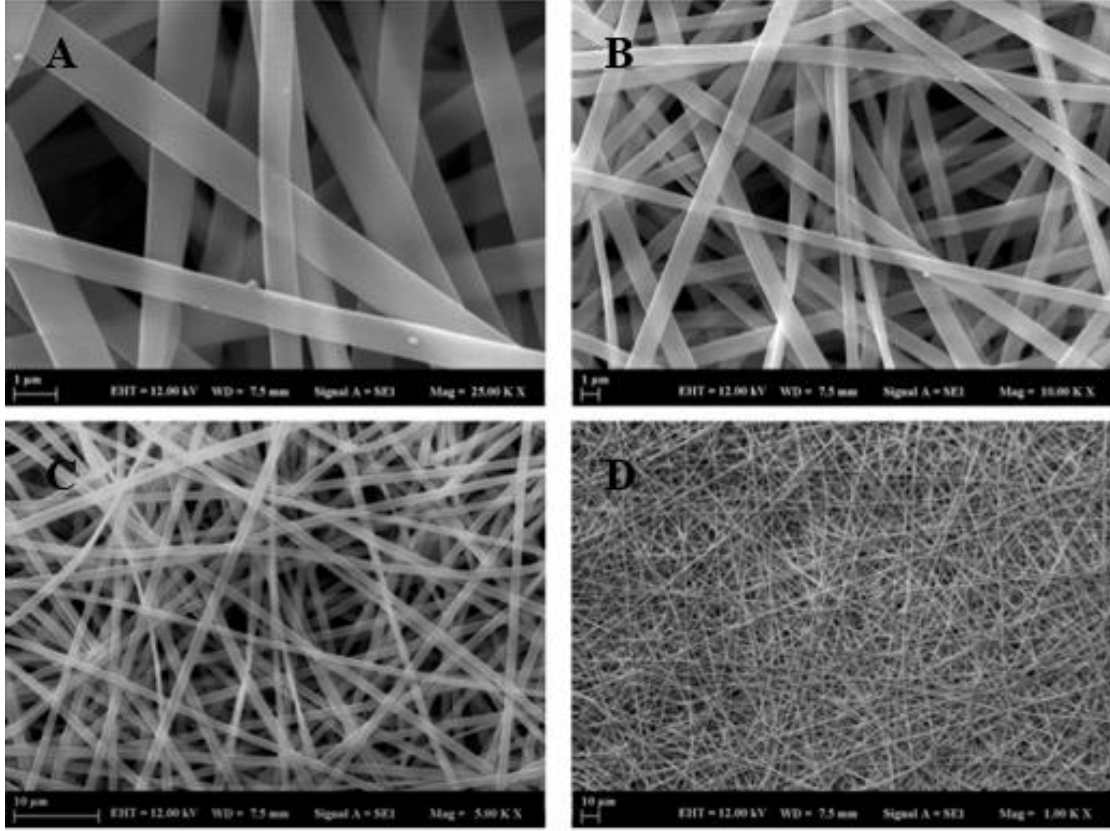
Resim 4.3: %20 jelatin çözeltisinden elde edilen fiberlerin morfolojisini göstermektedir. Büyütmeler (A)10000X, (B)5000X, (C)2500X ve (D)500X



Resim 4.4: %30 jelatin çözeltisiyle elektroğirme yöntemi kullanılarak üretilen fiber membranın morfolojisi gösterilmektedir. Büyütmeler (A)10000X, (B)5000X, (C)2500X ve (D)500X

Jelatin konsantrasyonunun artmasıyla birlikte çözeltinin viskozitesinde gözle görünür bir artış olmuştur ve böylece fiber oluşturmak için voltaj 30 Kv olarak seçilmiştir. Resim 4.4'te görüldüğü gibi %30 jelatin çözeltisiyle de homojen ve boncuksuz fiber yapısı elde edilmiştir ve böylece bu konsantrasyonda jelatinin elektroğirilebilir olduğu gösterilmiştir.

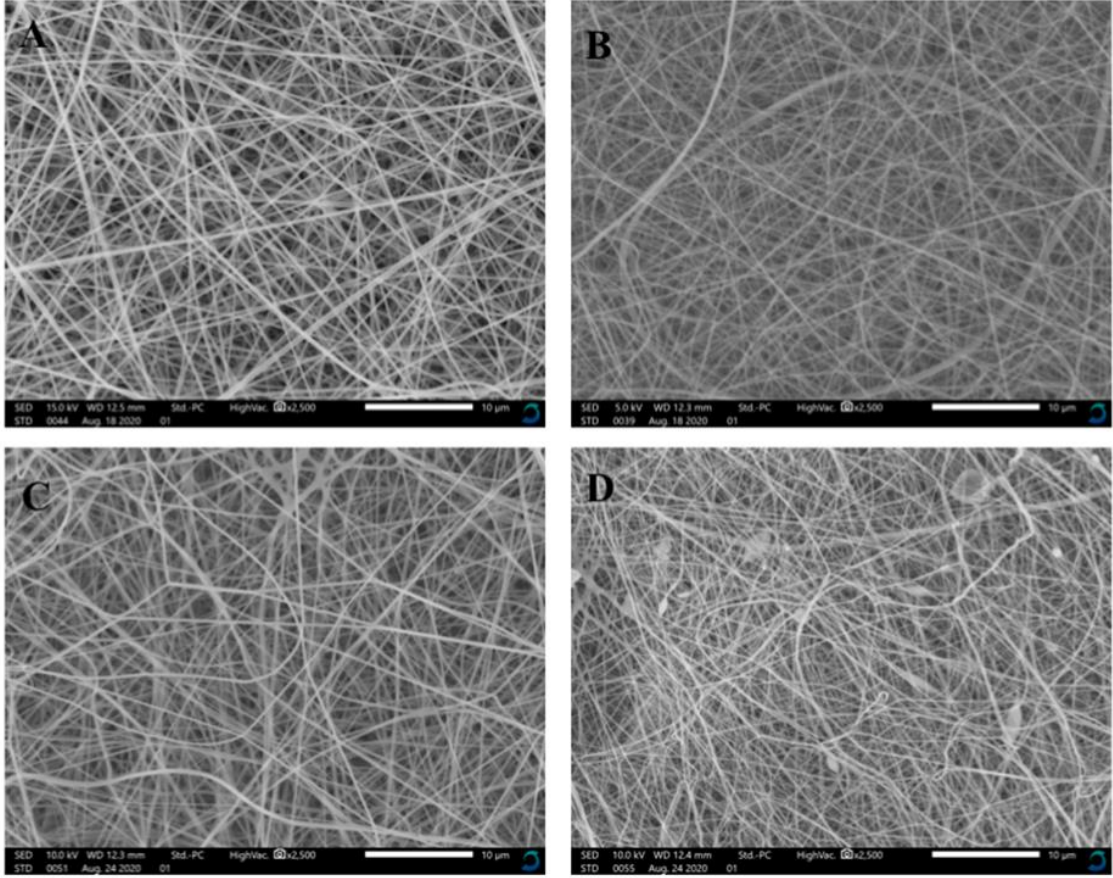
Resim 4.5'te, %40 jelatin (10000X, 5000X, 2500X ve 500X büyüme) çözeltisinden elde edilen fiberlerin morfolojisini gösterilmektedir. Görüldüğü gibi fiberlerin yüzeyi pürüzsüz bir şekilde oluşmuştur ve böylece çözeltinin ideal bir hızda buharlaştığını ve fiberlerin yüzeyinde kalıntı bırakmadığını göstermektedir. Ayrıca tüm grupların SEM görüntüleri fiberlerin morfolojisinin çapraz bağlanma işleminden sonra düzgün olduğuna ve fiberlerin %3 glutaraldehit buharından dolayı erimeğini göstermektedir.



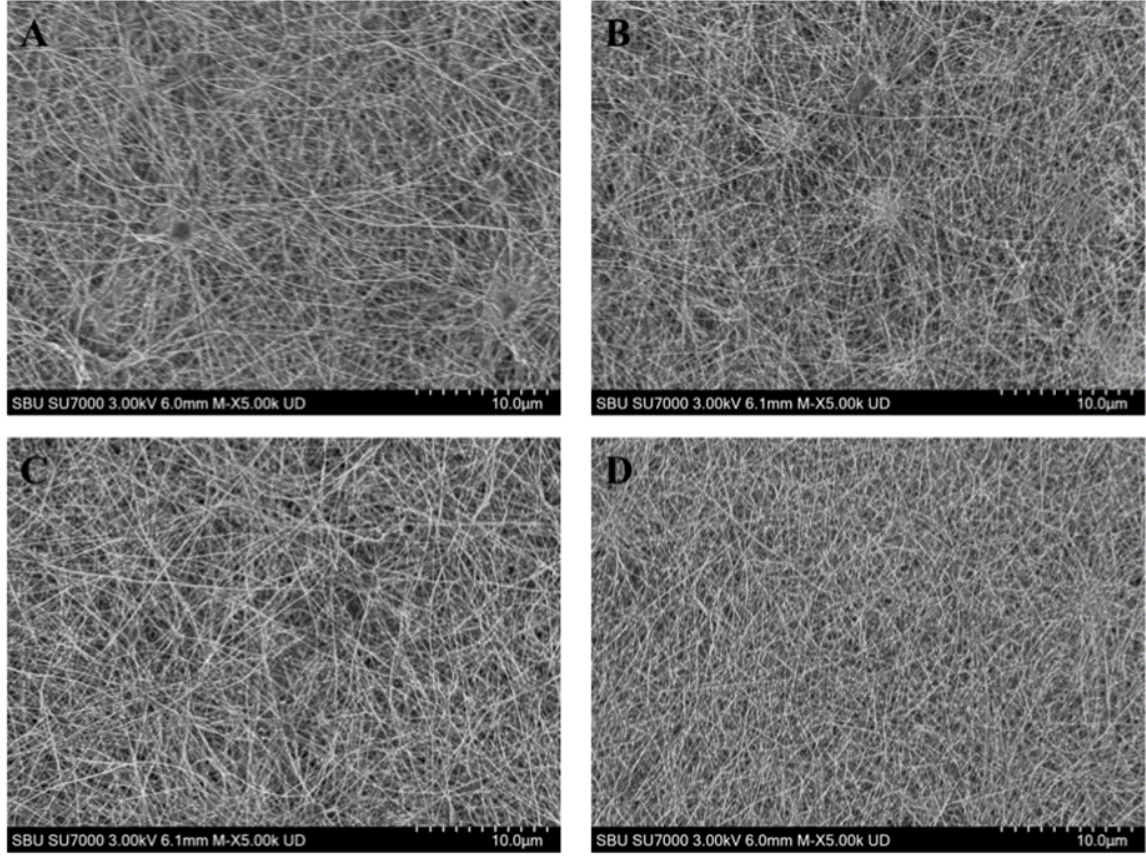
Resim 4.5: %40 jelatin çözeltisinden elde edilen fiberlerin morfolojisini göstermektedir. Büyütmeler(A)10000X, (B)5000X, (C)2500X ve (D)500X

Resim 4.6’da jelatin/PEDOT:PSS kompozit malzemeyle üretilmiş fiberlerin TEM görüntüleri gösterilmektedir. PEDOT:PSS polimerin eklenmesiyle birlikte çözeltilerin viskozitesinin düştüğü görülmüştür ama diğer taraftan iletkenliğin artmasıyla birlikte daha düşük voltajlarda fiber yapısı elde etmek mümkün olmuştur. Böylece elektroegirme yönteminde iletkenliğin önemli bir faktör olduğu ve üretim koşullarını ve fiber yapısını etkilediği gösterilmiştir.

Resim 4.7’de döner rotorla, daha önceden basılmış PLLA tüplerin üzerine 9000 RPM hızla sarılan jelatin/PEDOT:PSS membranın morfolojisi gösterilmektedir. Şekillerden görüldüğü gibi yüksek hızda sarılmasına rağmen fiberlerde herhangi bir yönelme görünmemektedir. Tüplerin çapının küçük olması burada etkili bir faktör olduğu düşünülmektedir, böylece bu çaptaki tüpleri kaplarken yönlendirmeyi sağlamak için 9000 RPM’in üstüne çıkılması gerektiği gösterilmiştir.



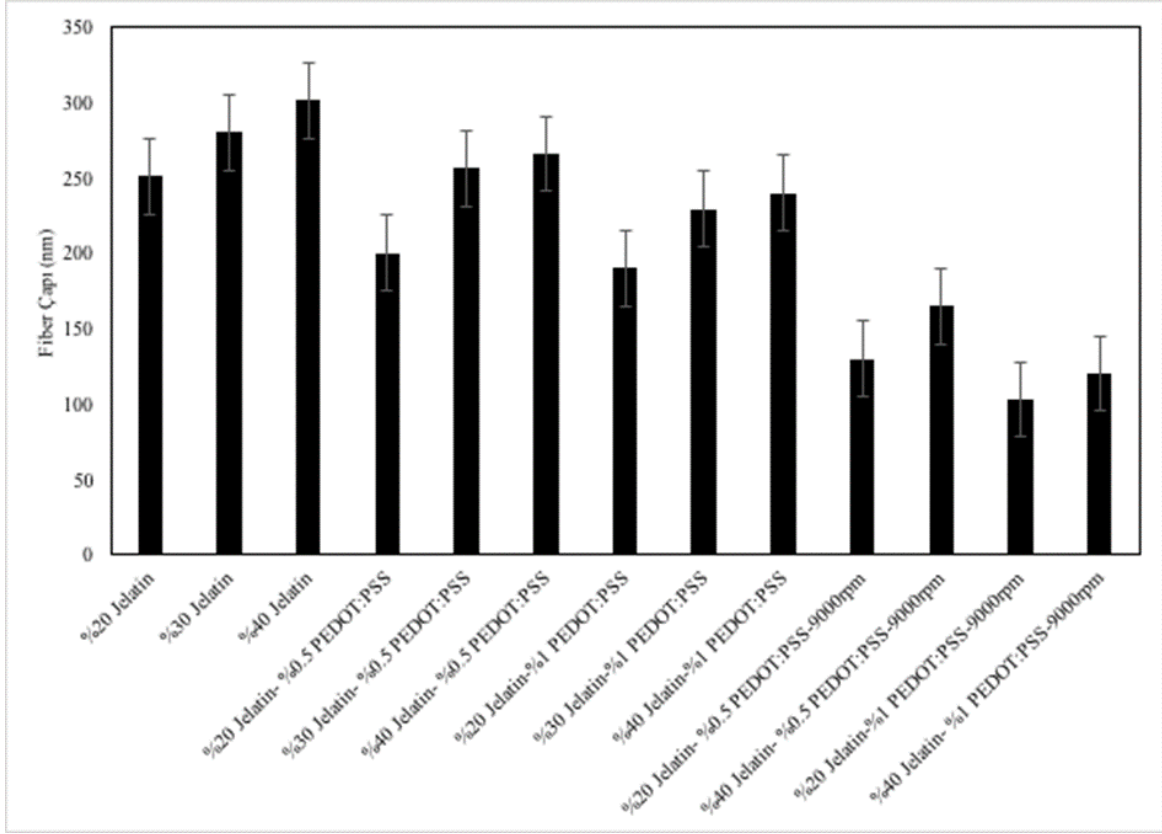
Resim 4.6: A) %40 jelatin-%0,5 PEDOT:PSS ve B) %40 jelatin-%1 PEDOT:PSS çözeltisinden elde edilen fiberlerin morfolojisini göstermektedir. C) %20 jelatin-%0,5 PEDOT:PSS ve D) %20 jelatin-%1 PEDOT:PSS çözeltisinden elde edilen fiberlerin yapısını göstermektedir



Resim 4.7: (A)%40 jelatin-%0,5 PEDOT:PSS, (B)%40 jelatin- %1 PEDOT:PSS ve (C) %20 jelatin-%0,5 PEDOT:PSS ve (D) %20 jelatin-%1 PEDOT:PSS çözeltilerinden 9000 RPM hızında tüpün üzerine sarılan fiberlerin yapısını göstermektedir

4.2.2. Fiberlerin Yarıçaplarının İncelenmesi

Üretim yöntemi, çözelti konsantrasyonu ve iletkenlik gibi faktörlerin fiber çapını nasıl etkilediğini araştırmak için ‘Image J’ programı kullanılarak fiberlerin çapları incelenmiştir (Bkz. Şekil 4.1). Sonuçlar konsantrasyonun artmasıyla birlikte fiber çapların önemli bir artış eğilimi gösterdiğini ispatlamaktadır, diğer taraftan PEDOT:PSS polimerin eklenmesi ile üretim voltajının düşmesine rağmen tüm guruplardaki fiber çaplarında gözle görünür bir düşüş olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, 9000 RPM’de sarılan fiberlerde herhangi bir yönlenme olmamasına rağmen fiber çapları kayda değer bir düşüş göstermiştir. Böylece bir yönlenme olmamasına rağmen fiber çaplarının 100 nm civarlarına düşmesiyle beraber yüzey alanında büyük bir artış olmuştur ve sonuç olarak hücre tutunması ve yayılımının artmasına yol açması beklenmektedir.

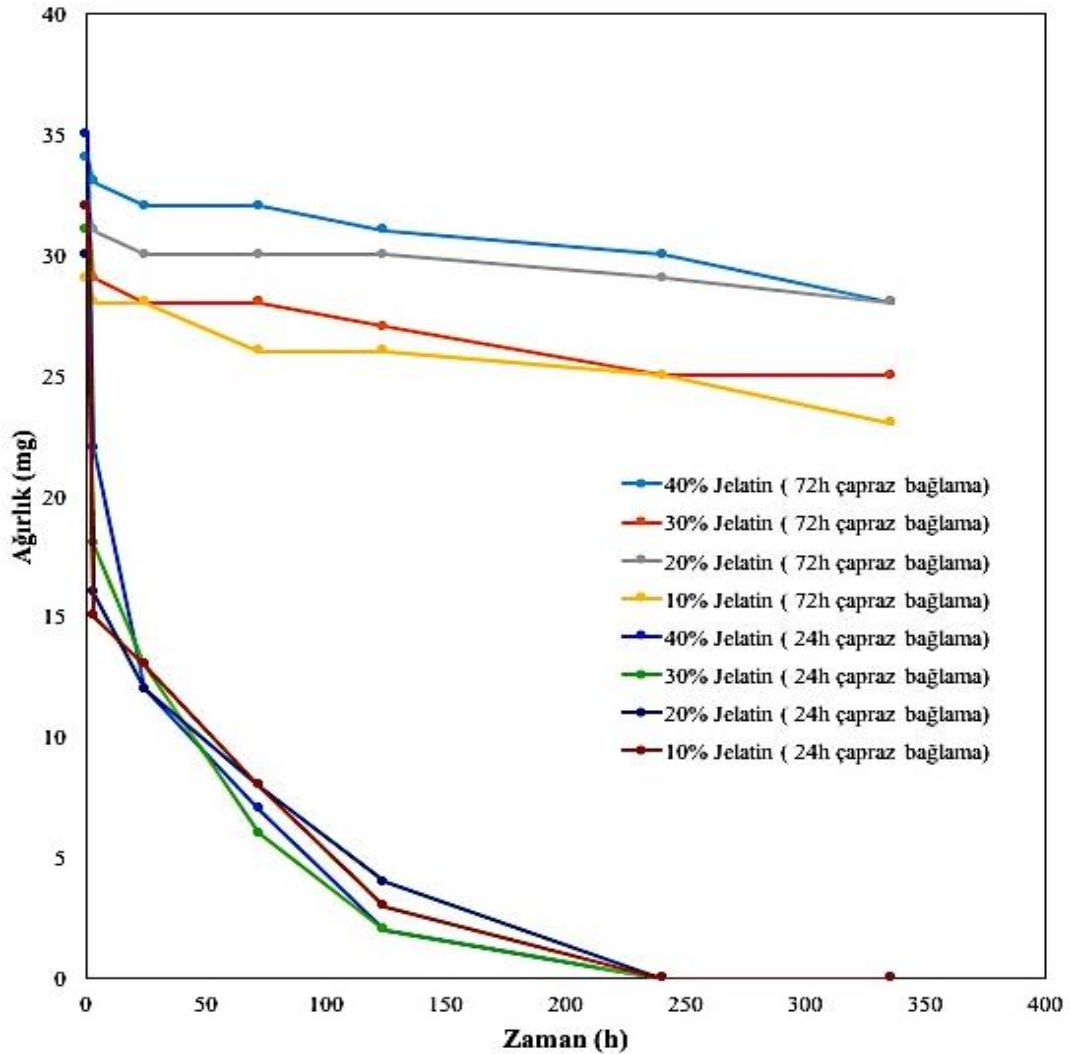


Şekil 4.1: Değişik oranlarda polimer çözeltileri ile üretilen fibrli membranların lif(fiber) çapı karşılaştırmaları

4.2.3. *In-Vitro* Bozunma Testi Sonuçları

Bu çalışmada jelatin kullanmanın amacı bir ECM elde ederek hücre tutunmasını ve yayılımını arttırmaktır ama jelatin suda çözünabilir doğal polimer olduğu için ve nano fiber yapının yüzey alanı yüksek olduğu için çözünme hızı daha da artmaktadır. Bozunma hızını düşürmek için glutaraldehit buharıyla çapraz bağlanmıştır. Aşağıdaki grafikteki sonuçlara bakıldığında (Bkz. Şekil 4.2) 24 saat boyunca çapraz bağlama işleminin yeterli miktarda başarılı olmadığını göstermiştir, öyle ki PBS çözeltisinde 3 saat bekletildikten sonra %50 civarında çözünme tüm gruplarda kayıt edilmiştir ve bu da proteindeki serbest amin grupları ve glutaraldehit arasında bağların oluşması için 24 saat çapraz bağlamanın yeterli olmamasından kaynaklanır. Diğer taraftan, 72 saat boyunca 37°C’de glutaraldehit buharında çapraz

bağlanan örneklerde serbest amin gruplarının bağlanmasından kaynaklanan hafif renk değişimi olmuştur ve ayrıca 3 saat sonunda %1'den daha az bozunma olmuştur. 72 saatlik çapraz bağlama işlemine tabi tutulan jelatin membranları 14 gün sonunda %15 oranında bir ağırlık kaybı gösterirken, 24 saat boyunca glutaraldehit buharında çapraz bağlanan örnekler 7. güne gelmeden önce PBS çözeltisinde tamamen bozunmaya uğramışlardır.

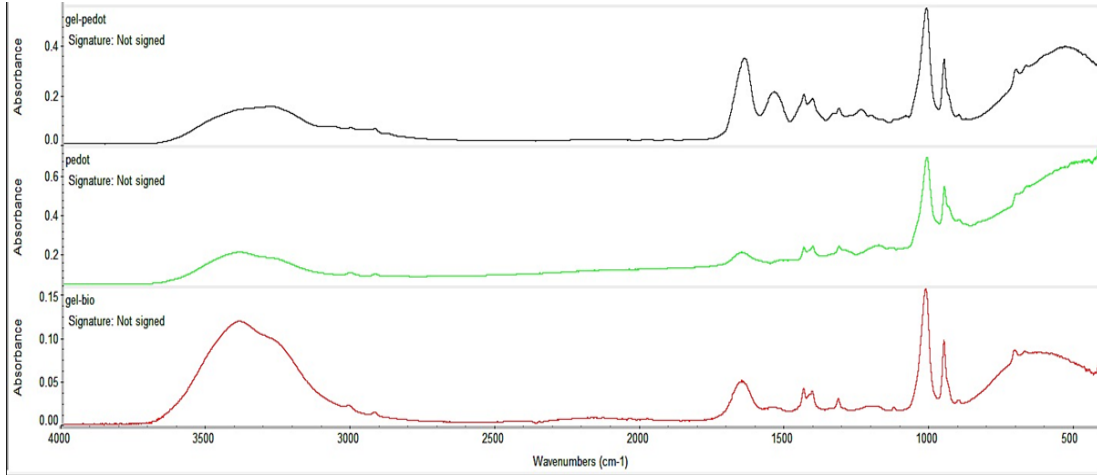


Şekil 4.2: Farklı yoğunlukta çözeltiler kullanılarak üretilen fibröz membranların farklı çapraz bağlama prosedürlerindeki bozunma davranışları

4.2.4. FTIR Sonuçları

Fiber membranlardaki fonksiyonel grupların belirlenmesi için, Jelatin/PEDOT:PSS, saf PEDOT:PSS ve saf Jelatin yapıları FTIR spektrometresi kullanılarak karakterize edilmiştir. 380 ile 4000 cm^{-1} arasında taranmıştır. Bu 3 gruba

ait absorbans değerleri ve arasındaki farklılıklar Şekil 4.3'te gösterilmektedir. 1000 cm^{-1} dalga boyunda ekstra pik görölmektedir. Jelatin ile PEDOT:PSS'nin birlikte üretilmesi sonucunda 1000 cm^{-1} 'de saf PEDOT:PSS'ye oranla daha yüksek absorbans saptanmıştır.



Şekil 4.3: FTIR sonuçları

4.2.5. Sinir Tüplerinin Elektriksel İletkenlikleri

Üretilen tüplerin elektrik iletken componentini oluşturacak jelatin/PEDOT:PSS fibröz membranının elektrik iletkenlikleri 4 kanallı prob yöntemi kullanılarak test edilmiş ve elde edilen sonuçlar aşağıdaki çizelgede (Bkz. Çizelge 4.3) listelenmiştir.

Çizelge 4.3: Değişik polimer yoğunluklarında hazırlanmış çözeltiler kullanılarak üretilen fibröz matrislerin elektrik iletkenlik test sonuçları

	Malzeme	İletkenlik ($\mu\text{s/cm}$)
1	PLLA	188 $\pm$ 15
2	%20 Jelatin	200 $\pm$ 31
3	%30 Jelatin	230 $\pm$ 11
4	%40 Jelatin	255 $\pm$ 17
5	%20 Jelatin-%0.5 PEDOT:PSS	350 $\pm$ 9
6	%40 Jelatin-%0.5 PEDOT:PSS	475 $\pm$ 12
7	%20 Jelatin-%1 PEDOT:PSS	640 $\pm$ 23
8	%40 Jelatin-%1 PEDOT:PSS	739 $\pm$ 16

%20 jelatinden oluşan nano fiber yapıda 200 $\mu\text{s/cm}$ olan iletkenlik sırasıyla %0,5 ve %1 PEDOT:PSS eklenmesiyle beraber 350 ve 640 $\mu\text{s/cm}$ kadar artış göstermiştir. Üretilen sinir tüplerinin arasında en yüksek iletkenlik %40 jelatin ve %1 PEDOT:PSS ile oluşan yapıda gözlemlenmiştir. İletkenlik ve fiber çapı sonuçlarını karşılaştırdığımızda açık bir şekilde iletkenliğin artmasıyla birlikte fiber çaplarının küçüldüğü görülmüştür. Ayrıca %0,5 PEDOT:PSS polimerinin eklenmesiyle birlikte %40 jelatin ve PEDOT:PSS ten oluşan yapıda 475 $\mu\text{s/cm}$ yükselerek %86 artış göstermiştir. Böylece sinir doku mühendisliğinde önemli bir gereksinim olan iletkenliği sağlamak için PEDOT:PSS polimerinin güçlü bir aday olduğu gösterilmiştir. Ayrıca iletkenliği artırarak elektroegirme yöntemiyle üretimde daha düşük voltajlarda üretime imkan vermiş ve fiber çaplarının küçülmesiyle birlikte yüzey alanın artmasına yol açmıştır. Yüzey alanın artmasının hücre tutunması ve artışı beraberinde getirmesi beklenmektedir.

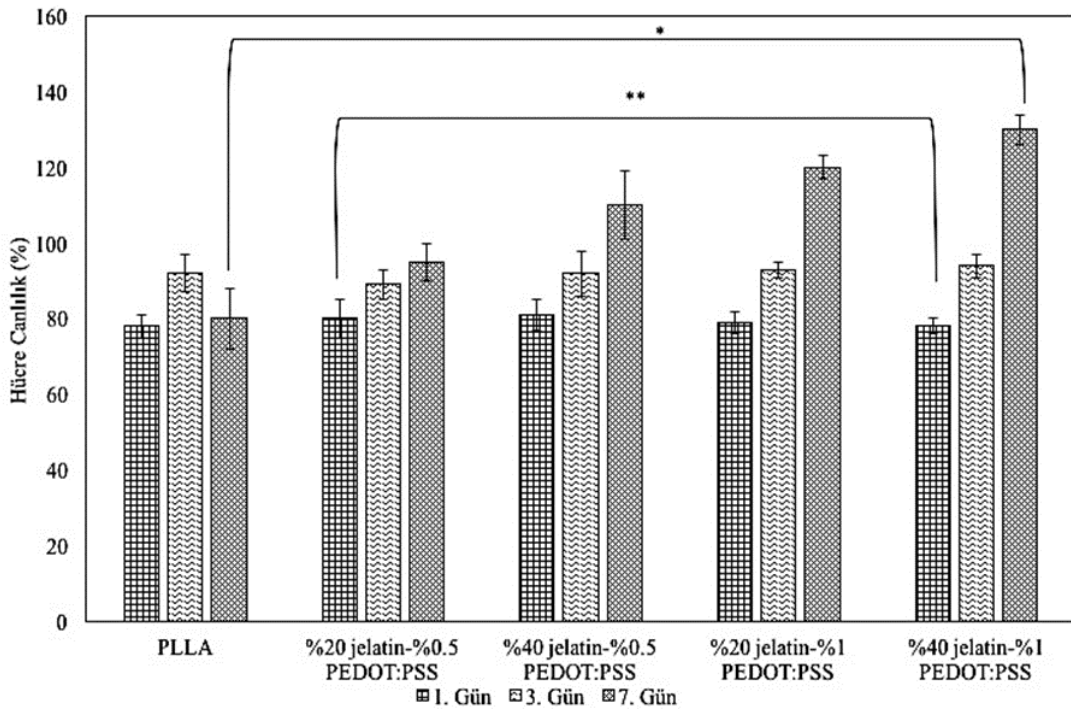
Ayrıca sinir doku mühendisliğinde, sinir hücrelerinin farklılaştırılmasında önemli bir rol oynaması ve hücrelerin farklılaşmasını artırması beklenmektedir.

4.3. *In-Vitro* HÜCRE DENEY SONUÇLARI

İn-vitro hücre deneylerin sonucuna göre (Bkz. Şekil 4.4) birinci günün sonunda tüm guruplarda canlılık oranı %80 civarında görünmektedir, böylece tüm guruplar arasında hücre yapışma oranları arasında büyük bir fark gözlemlenmemiştir. 3B basımdan sonra jelatin fiberleriyle kaplanmamış olan PLLA tüp üzerine tutunmuş olan hücreler 3.gün sonunda tepe noktalarına ulaşmış olup ve bu oran 7.gün sonunda kayda

değer bir düşüş göstererek tekrar %82 oranlarına gerilemiştir. Bu düşüşe neden olan ana etken hücrelerin tüp yüzeyini tamamen kaplaması ve hücre doluluk oranının %100 ulaşması olduğu düşünülmektedir. Diğer taraftan jelatin- PEDOT:PSS nano fiber ağlarıyla sarılan tüm gruplarda 7.günün sonunda hücre canlılık oran artmaya devam etmektedir. Ayrıca, PEDOT:PSS iletken polimer oranının artmasıyla birlikte hücre çoğalması önemli bir artış göstererek %40 jelatin ve %1 iletken polimerden oluşan grupta 7.gün sonunda hücre canlılık oranı %130 gibi yüksek bir orana ulaşmıştır. Bu artışın ana nedeni fiber çaplarının 100 nm civarlarına düşerek yüzey alanının artması olduğu düşünülmektedir. Jelatin oranının %100 artması hücre canlılık oranını etkilediği deney sonuçlarıyla ispatlanmıştır.

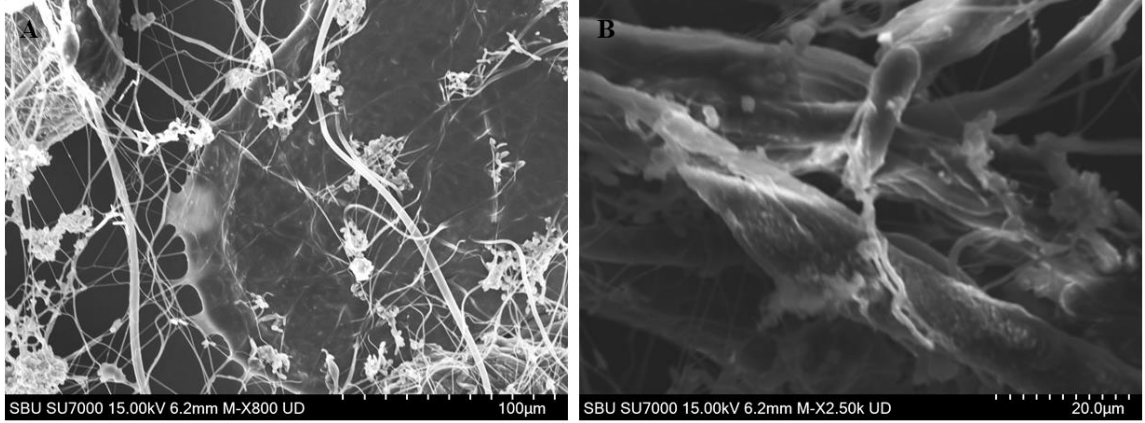
Hücre canlılık sonuçları açık şekilde nano-fiber yapıların yüzey alanını arttırarak hücrelerin tutunması ve çoğalması için ideal bir ortam hazırladığını göstermiştir. Ayrıca, PEDOT:PSS polimerinin %1 orana kadar toksik olmadığı böylece gösterilmiştir.



Şekil 4.4: Farklı çözelti gruplarıyla hazırlanmış fibröz membranlar üzerinde hücre canlılığı gösterilmektedir (n=3, P< 0,01)

Resim 4.8 de görüldüğü gibi %20 jelatin ve %0,5 PEDOT:PSS içeren fiberlerin üzerinde 7.günün sonunda hücrelerin yüzeye tutundukları ve bir film

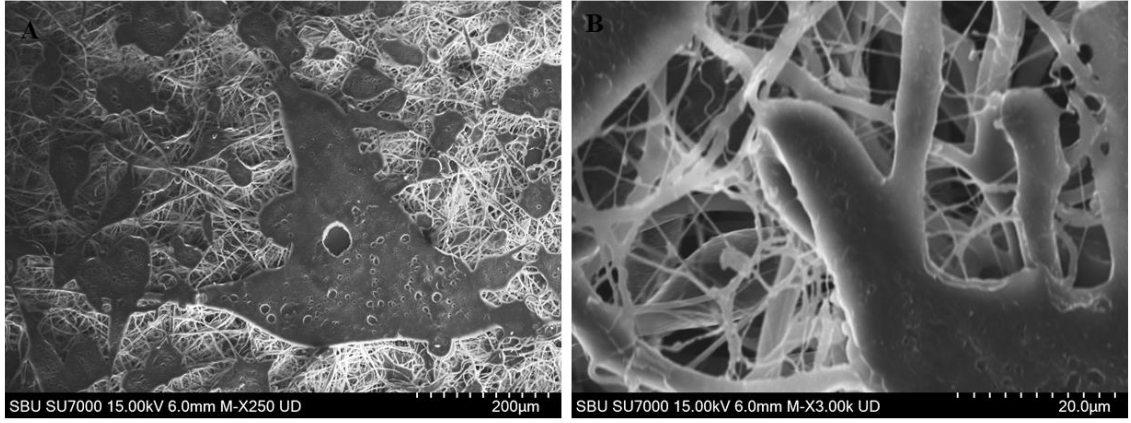
ölüştürdükleri açık bir şekilde görünmektedir. Ayrıca şekil B’de görüldüğü gibi sinir hücreleri gözenekli yapıdan faydalananarak, fiberlerin arasına göç etme eylemi göstermiştir.



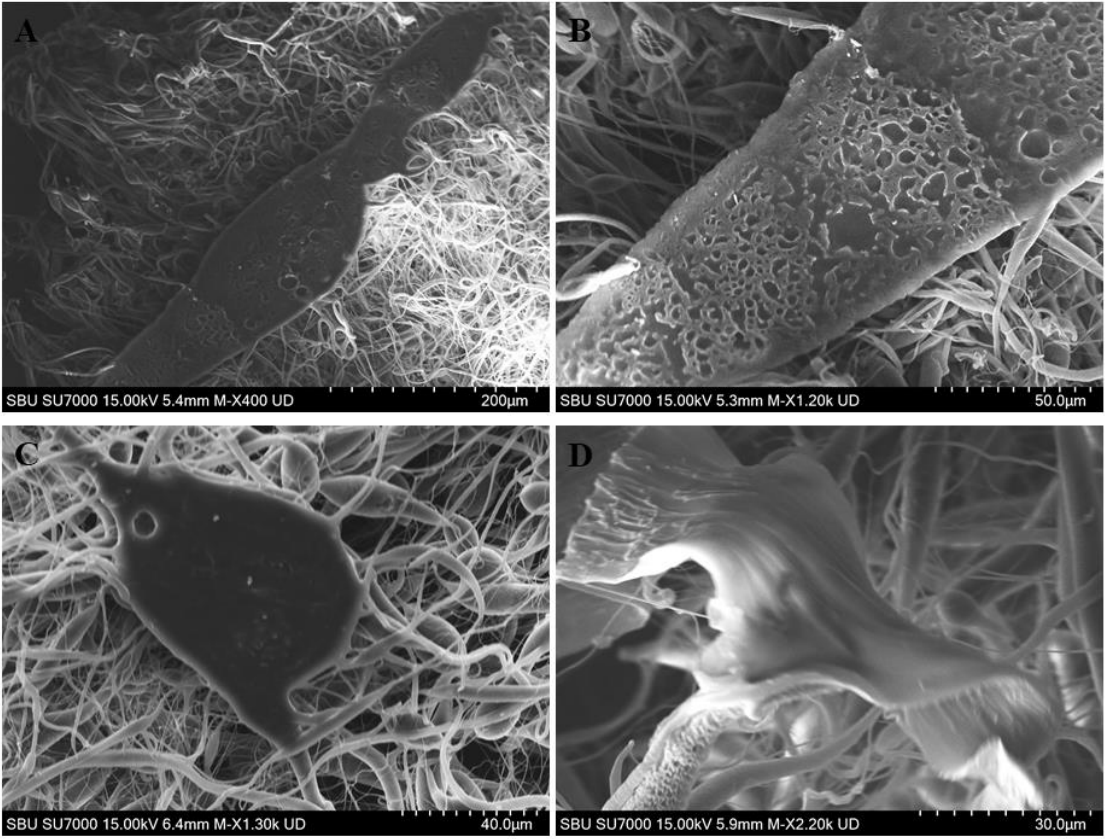
Resim 4.8: (A) %20Jelatin-%0,5 PEDOT:PSS (800X), (B) %20Jelatin-%0,5 PEDOT:PSS (2500X) içeren örneklerin üzerindeki hücre morfolojisini 7. Günün sonunda göstermektedir

İn-vitro hücre deneylerinin sonuçlarına paralel olarak jelatin oranının artmasıyla, PEDOT:PSS oranının sabit kalmasına rağmen hücre tutunması ve çoğalması arttığı gözlenmektedir (Resim 4.9). Hücrelerin yüzeyde küresel şekilde kalmamaları ve filopodiyalarının uzaması hücrelerin çoğalma ve bölünme eyleminde olduklarını açık bir şekilde göstermektedir. Resim 4.9 (A) da görüldüğü gibi hücreler tek bir noktada kümelenmemiş ve fiber yüzeyinde yayılarak tüm yüzeyi kaplamaya başlamıştır. Elde edilen fiber yapı hücrelerin sadece yayılmasında etkili olduğu düşünülmektedir.

Resim 4.10, %20 jelatin ve %1 PEDOT:PSS’den oluşan yapı üzerindeki sinir hücrelerinin morfolojisini 7.günün sonunda göstermektedir. SEM görüntülerinde görüldüğü gibi PEDOT:PSS iletken polimerinin artmasıyla birlikte sinir hücreleri şekilsel olarak değişim göstererek daha silindirik bir yapıya sahip olmuşlardır. Ayrıca burdaki diğer bir önemli faktör fiber yarıçaplarının önemli düşüşüdür. Fiber yarıçaplarının düşmesiyle birlikte örneklerin yüzey alanı artmıştır ve böylece hücrelerin aktivitesinde önemli bir değişim meydana gelmiştir.

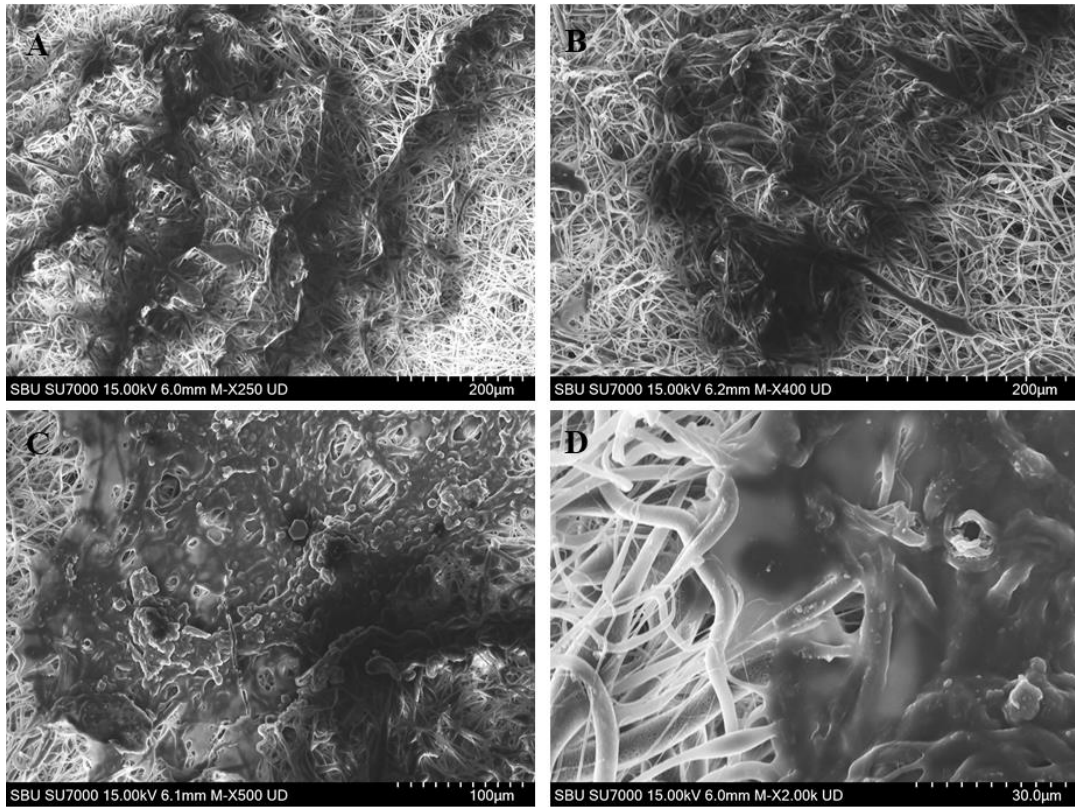


Resim 4.9: (A) %40Jelatin-%0,5 PEDOT:PSS (250X), (B) %40Jelatin-%0,5 PEDOT:PSS (3000X) içeren örneklerin üzerindeki hücre morfolojisini 7. Günün sonunda göstermektedir



Resim 4.10: (A) %20Jelatin-%1 PEDOT:PSS (400X), (B) %20Jelatin-%1 PEDOT:PSS (1200X), (C) %20Jelatin-%1 PEDOT:PSS (1300X), (D) %20Jelatin-%1 PEDOT:PSS (2200X), içeren örneklerin üzerindeki hücre morfolojisini 7. Günün sonunda göstermektedir

Resm 4.11’de %40 jelatin ve %1 PEDOT:PSSten oluşan sinir tüpünün üzerindeki hücrelerin morfolojisi görünmektedir. Resimde g r ld ğ gibi 7. günün sonunda yüzeyin büyük bir kısmı sinir hücreleriyle sarılmış olup ve hücreler farklı yönlerde g   etmeye başlamışlardır. Hücrelerin yüzeye yayılması ve gözeneklerin arasına penetre etmesi *in-vitro* deneylerinden elde edilen so  ları açık bir şekilde doğrulamaktadır.

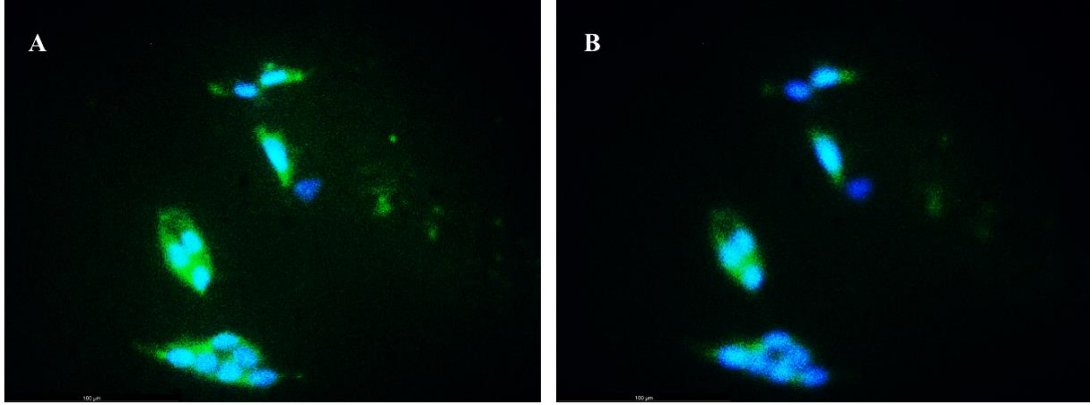


Resim 4.11: (A) %40Jelatin-%1 PEDOT:PSS (200X), (B) %40Jelatin-%1 PEDOT:PSS (400X), (C) %40Jelatin-%1 PEDOT:PSS (500X), (D) %40Jelatin-%1 PEDOT:PSS (2000X), içeren örneklerin üzerindeki hücre morfolojisini 7. Günün sonunda göstermektedir

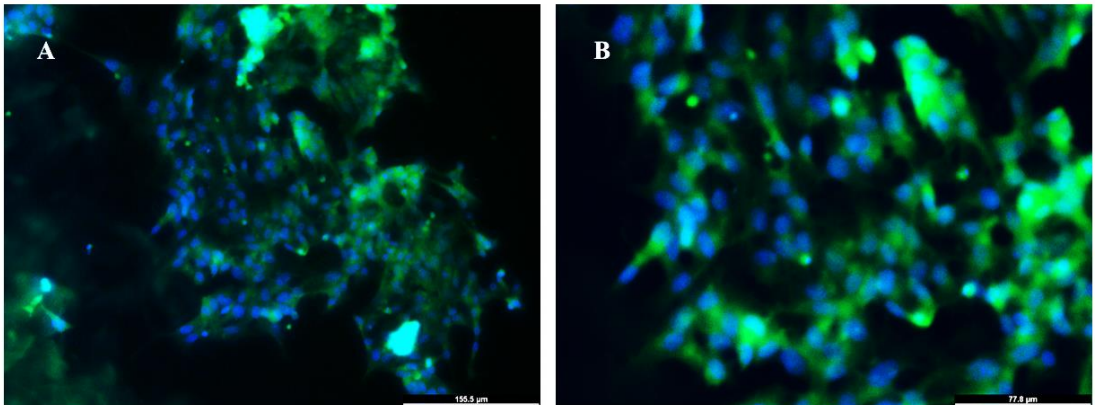
4.8. HÜCRELERİN FLORESAN M KROSKOBU SONUÇLARI

Floresan mikroskopu görüntülerinden elde edilen s n  lara göre jelatin ve PEDOT:PSS oranının artmasıyla birlikte hücrelerin aktivitesi açık bir şekilde artmıştır (Resim 4.12 ve 4.13). Görüntülerde Fallodin-FITC boyasının etkili olduğu bölümler yeşil renkle gösterilmiştir. Fallodin-FITC hücre zarını ve aktin filamentlerini

boyayarak sinir hücrelerini etiketlemiştir. Ama hücrelerin sağlıklı olduğuna göstermek için DAPI boyası kullanılarak boyanan hücre çekirdekleri de incelenmiştir.



Resim 4.12: (A) %20Jelatin-%0,5 PEDOT:PSS (20x), (B) %40Jelatin-%0,5 PEDOT:PSS (20X), 7. Gün sonundaki hücre görüntüleri



Resim 4.13: (A) %20Jelatin-%1 PEDOT:PSS, (B) %40Jelatin-%1 PEDOT:PSS, 7. Gün sonundaki hücre görüntüleri

5. TARTIŞMA

Elektroeğirme yönteminde, çözelti veya erimiş formdaki polimer sıvılar, birkaç mikrondan birkaç nanometreye kadar çaplara sahip ultra ince lifler haline gelmek için yüksek bir DC voltajı altında zorlanır. Polimer çözeltisini hazırlamak için kullanılan çözücü, eğrile bilirlik üzerinde baskın bir etkiye sahiptir. Jelatin, sulu bir çözelti olarak 40°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda suda kolayca çözülebilir. Böylece bir sulu çözelti olarak makro yapıda jelatin fiberleri üretmek için kolaylıkla kullanılabilir ama mikro/nano fiber üretimi için su çözeltisi yeteri kadar iletkenlik sağlamadığı için voltajın artırılması gerektir ve voltajın artmasıyla birlikte fiber çaplarında artacaktır (157).

Jelatinin fiber oluşturma kabiliyetinin mikro veya nano fiber oluşturmak için yeterli olmama nedeniyle, bu özelliğini geliştirmek için önceki çalışmalarda başka sentetik polimerler eklenir ve böylece eğrile bilirlik artırılmış olur (157–159).

Jelatinin polielektrolit özelliği nedeniyle suda çözünen jelatinin iklimlendirilmiş elektroeğirme cihazı kullanarak jelleşmemesi sağlansa bile nano fiber elde edilmesi mümkün değildir. Genelde iyonik olmayan ve organik çözücüler içinde çözücü ve çözücüler arasındaki noniyonik etkileşimler yoluyla çözülebilen sentetik polimerlerin aksine, jelatin, birçok iyonize edilebilir gruba sahip olan bir tür polielektrolit polimerleridir. Jelatindeki amin ve karboksilik fonksiyonel grupları, asidik reaktiflerle iyonize edilebilir veya pozitif/negatif yükler taşımak için hidrolize edilebilir. Sulu çözeltide, bu tür pH'a bağlı iyonizeysen, küçük karşı iyonların eşlik ettiği birçok yük taşıyan bir poliyona yol açar. Ayrıca, jelatin güçlü hidrojen bağlarından oluşan 3B makro molekül yapısı polimer molekül zincirlerinin hareketliğinin büyük ölçüde azalmasına neden oluyor. Tüm bunları göz önünde alındığı zaman çözücü olarak bir organik çözücü kullanılarak jelatinin eğrile bilme özelliğinin artırılması gerekmektedir. Jelatin, güçlü polariteye sahip bir biyopolimerdir ve onu çözmek için yüksek polariteli organik çözücü kullanmak daha iyi sonuçlara yol açacaktır. Önceki çalışmalarda, Trifloroetanol ve HFIP gibi florlu alkollerin, kolajen gibi polipeptit biyopolimerler için iyi çözücüler olduğu gösterilmiştir (160). Jelatinin denatüre edilmiş kolajen olduğu düşünüldüğünde florlu alkollerin jelatin için uygun olacağı düşünülebilir. Gomes ve arkadaşları, soğuk su

balığından elde edilen jelatin kaynağını çözmek için su ve %90 asetik asit kullanılarak iki farklı solüsyon hazırlanmıştır (159).

Bu çalışmada elektroegirme parametreleri olarak bilinen voltaj, hedefin uzaklığı, akış hızı, sıcaklık ve nem oranları sırasıyla 15 kV, 15 cm, 0,3 ml/h, 24 °C ve %46 olarak ayarlanmıştır ve fiber çapları 300 nm civarında raporlanmıştır. Balık jelatini, sığır kaynaklı jelatinleriyle karşılaştırdığımızda daha düşük sıcaklıklarda jelleşmeye başladığı görülmektedir. Bu çalışmadan farklı olarak bizim çalışmada sıcaklık 28 °C olarak optimize edilmiştir ve bunun ana nedeni sığır kaynaklı jelatinlerin jelleşme sıcaklığıdır. Ayrıca, polimer zincirlerini zarar vermemek ve jelatinin moleküler ağırlığını düşürmemek için daha seyreltilmiş asit kullanılmıştır. Burada çözeltinin elektroegirme için uygun viskozite ve iletkenliğe ulaşmak için %50 asetik asit + %1 HFIP kullanılmıştır.

Başka bir çalışmada Huang ve arkadaşları, jelatin mikro/nano fiber elde etmek için çözücü olarak 2,2,2-triflorotanol kullanmışlar. Bu çalışmadaki amaç çözücünün ve jelatin konsantrasyonunun elektro egirme potansiyelini araştırmaktır. Elde edilen sonuçlara göre homojen fiber elde etmek için jelatinin oranın önemli bir etken olduğu gösterilmiştir. Bu gurubun elde ettikleri sonuçlara göre boncuksuz bir fiber yapı elde etmek için alt limit %7,5 jelatin ve diğer taraftan üst limit olarak %12 jelatin gösterilmiştir. Bu çalışmaya paralel olarak, bizim çalışmada da jelatin oranının alt limiti %7 olarak elde edilmiştir ama diğer taraftan %40 oranına kadar arttırılmasına rağmen homojen ve boncuksuz fiber elde edilmiştir. Ayrıca, Ratanavaraporn ve arkadaşları, jelatin çözeltisinin %20-40 w/v konsantrasyonunun, fiber uzunluğu boyunca pürüzsüz yüzeyli jelatin lifleri üretmek için optimize edilmiş aralık olduğu göstermişler, bu sonuç , çalışmada elde edilen sonuçla birebir örtüşmektedir (161).

Bu çalışmada, iletkenliği arttırmak için ve sinir dokusunun gereksinimlerinden birini taklit etmek için jelatinin yanısıra PEDOT: PSS polimeri de yapının içine eklenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre bu polimerin eklenmesiyle birlikte daha düşük voltajlarda fiber yapısı oluşturulmuş. Daha düşük voltajlarda fiberlerin elde edilmesi elektro eğrile bilme özelliğinin arttığını göstermektedir. Çalışma esnasında PEDOT:PSS polimerinin eklenmesiyle birlikte viskozitede önemli bir düşüş olduğu için diğer taraftan eğrile bilme potansiyelinin düşmesine yol açmıştır. Bu sorunun önüne geçmek için PDOT:PSS yöntem kısmında detaylı bir şekilde açıklandığı gibi

PDOT:PSS hidrojelini kullanılması bu özelliği etkili bir şekilde arttırdığı gösterilmiştir.

Yang ve arkadaşlarının çalışmasına göre hizalanmış fiberlerin sinir doku mühendisliğinde etkili bir faktör olduğu gösterilmiştir (162). PLLA hizalı fiber elde etmek için 1000 RPM'de mil üzerine elektroegirme yapılmıştır. Bu çalışmaya göre 1000 RPM tamamen hizalanmış fiber yapısı mümkün olmuştur. Bu çalışmanın aksine, bizim çalışmamızda 10000 RPM hıza çıkmamıza rağmen hala hizalanma sağlanmamış ve sadece fiber çaplarının düştüğü gözlemlenmiştir. Bu sonuca neden olan faktör PLLA tüpünün iletkenliği ve fiber toplama süresinin uzunluğu olabilir.

Katta ve arkadaşları, hizalanmış nano fiberler elde etmek için bakır kablolar kullanarak bir faradı kafası benzeri toplama hedefi oluşturmuşlar (163). Bu çalışmaya göre toplama zamanının artmasıyla birlikte, hedefin iletkenliği düşüyor ve bu da yeterli hizalanmayı sağlayamıyor.

Diğer taraftan, fiber çaplarının jelatin oranıyla doğrusal olarak değiştiği gösterilmiştir. Fiber çapları jelatin konsantrasyonunun artmasıyla birlikte önemli bir artış göstermiştir. Bunun en önemli sebebi, jet tarafından taşınan yükler arasındaki itmenin neden olduğu normal gerilmeyi engelleyen ve daha kalın fiberlerin oluşmasına neden olan, birbirine bağlı moleküler zincirleri olan bir çözeltiyi elektroegirmemiz olduğunu düşünüyoruz. Thompson ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre, hacimsel yük yoğunluğu, hedefin şiringadan uzaklığı, ilk jet/orifis yarıçapı, relaksasyon süresi ve viskozite fiber yarıçapı üzerinde en önemli etkiye sahip olan faktörlerdir (164). Bunlara ek olarak, polimer konsantrasyonu, çözelti yoğunluğu, elektrik potansiyeli, pertürbasyon frekansı ve çözücü buhar basıncı gibi parametrelerin fiber yarıçapı üzerinde orta derecede etkili olduklarını göstermişlerdir. Fiber yarıçapı üzerinde küçük etkileri olan parametreleriyse bağıl nem, yüzey gerilimi ve buhar yayılımı olarak gösterilmiştir. Bu faktörler göz önünde alındığı zaman fiber yarıçaplarındaki değişiklikler viskozite, hacimsel yük yoğunluğu ve konsantrasyon gibi parametreleriyle açıklana bilmektedir. Sonuçlara göre, jelatin konsantrasyonunun artmasıyla ve viskozitenin düşmesiyle birlikte fiber yarıçapları artmıştır. Diğer taraftan, PEDOT:PSS oranının artmasıyla birlikte fiber çaplarında çok büyük bir düşüş olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuçlara göre, çalışmadaki fiber yarıçapını etkileyen en önemli ve baskın faktörün hacimsel yük yoğunluğunun artması olmuştur.

Jelatin suda çözünür olduğu için, membranların üzerindeki bir damla su bile nanofiber yapıyı anında yok etmek için yeterli olabilir. Bu çalışmadaki bozunma sonuçlarına göre 24 saatten daha kısa süre glutaraldehit buhranda çapraz bağlama etkili olmamıştır, ögleki bunun altındaki sürelerde çapraz bağlanan örnekler PBS tamponunun içinde dakikalar içinde çözünmüş olup ve herhangi bir çapraz bağlanma göstermemişlerdir. Glutaraldehit, özellikle proteinler için en popüler çapraz bağlama reaktiflerinden biridir. Bunun nedeni oda sıcaklığında bile reaktifin aldehit grubunun, bir 'Schiff' bazı oluşturmak için protein zincirinin lizin kalıntılarının amino grubu ile reaksiyona girmesidir. Fiber yapıların rengi çapraz bağlama işleminden sonra hafif sararma göstermektedir. Renk değişikliği, protein ve glutaraldehitin serbest amino grupları arasında aldimin bağlantılarının (CH=N) kurulmasından kaynaklanmaktadır.

Dehidrotermal işlem, plazma işlemi ve bunların kombinasyonu gibi fiziksel çapraz bağlama yöntemleri, yalnızca fiber yapının yüzeyinde meydana gelen çapraz bağlanmaya bağlı olarak jelatin fiber matların düşük çapraz bağlanma derecesine yol açtı önceki çalışmalarda gösterilmiştir ama 1-etil-3- (3-dimetilamino propil) karbodiimid hidroklorür veya glutaraldehit kullanılarak dehidrotermal ve kimyasal çapraz bağlamanın kombinasyonu, fiber yapısının hem yüzeyi hem de kütlesi çapraz bağlandığından daha yüksek çapraz bağlanma derecesi göstermektedir (161).

Bigi ve arkadaşları, glutaraldehit konsantrasyonun jelatin filmlerinin üzerindeki etkiyi araştırmıştır (165). Kurutulmuş olan filmler, ağırlıkça %0,05 ila %2,5 arasında değişen konsantrasyonlarda glutaraldehit solüsyonları ile çapraz bağlanma işlemine tabi tutulmuştur. Çalışma sonuçlarına göre, %0,05 gibi oranlarda başarı oranı %60 olarak belirlenmiş ve bu oran %80lere kadar konsantrasyonun artmasıyla ulaşmıştır. Bizim çalışmamızda, konsantrasyon oranı %4,5 olarak seçilmiş bunun nedeni toksik etkiyi azaltmak için glutaraldehit buharını kullanılmasıdır.

Önceki çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre, çapraz bağlama elde edilen ürünün mekanik ve bozunma özelliklerinin yansırı gözeneklilik ve fiber morfolojisinde etkilidir. Bilindiği gibi, biyomalzeme ve doku mühendisliği alanında kullanılacak olan ürünlerde gözeneklilik ve bu gözeneklerin birbirine bağlı olması malzemenin performansında önemli bir rol oynamaktadır. Optimize edilmeyen bir çapraz bağlama işlemi gözeneklerin kısmı veya tamamen kapanma yol açabilir ve böylece negatif bir etki yarata bilir. Bu çalışmada, SEM ve bozunma sonuçlarını göz

önünde aldığımız zaman, fiberlerin bozunma hızının düşmesinin yansısı fiberlerde çapraz bağlanmadan dolayı bir kaynama olmamıştır ve gözenekli bir yapı elde edilmiştir. Bu gözenekli yapının hücre yapışmasında ve çoğalmasında etkili olması beklenmektedir.

Literatürde jelatin için tipik FTIR bantları olarak bilinen bantlar 3300, 1640, 1535, 1554 ve 1240 cm^{-1} pozisyonlarda görünmektedir. FTIR spektrasına göre 3300 cm^{-1} 'de amid A (N — H germe titreşimi); 1640 cm^{-1} 'de amid I (C O streç); 1535 ile 1554 cm^{-1} arasında amid II ve 1240 cm^{-1} 'de amid III bantları görünmektedir. Amid II ve amid III bantları, N — H gruplarının bükülme titreşiminden ve C—N gruplarının gerilme titreşimlerinden ve bu iki mod arasındaki etkileşimden kaynaklanmaktadır (166). Çalışmadaki FTIR spektrum sonuçlarına bakıldığı zaman asetik asitte çözüldükten sonra jelatin karakteristik spektrumlarından hiçbirini kaybetmemiştir.

Saf PEDOT:PSS örneğinde, tepe noktası 3100 cm^{-1} , 1730 cm^{-1} ve 1450-1600 cm^{-1} , PSS aromatik halkada C — H bağının gerilmesi, tiyofen halkasında C=C bağının gerilmesi ve aromatik bağda C=C bağının gerilmesi ile ilgilidir. Parmak izi bölgesinde olan 800 cm^{-1} 'deki tepe, C-H bağının bükülmesiyle ilgilidir. PEDOT'un tiyofen halkalarındaki C — S bağı: PSS ile 700 cm^{-1} civarında tespit edilebilir.

İletken polimerler yapılarındaki konjuge π -elektronun omurgasına sahip olmaları nedeniyle yüksek iletkenlik özellik gösterirler ve bu sayede elektronik endüstrisi, güneş panelleri ve biyomedikal endüstrisinde birçok uygulama alanına sahipler. PPy, PANi, PEDOT:PSS ve polytiyofen türevli iletken polimerler, kalp, sinir ve kemik doku mühendisliği alanında halihazırda kullanılmaktadır. İletken olmayan malzemeler ve yarı iletkenler için iletkenlik aralığı sırasıyla 10^{-16} - 10^{-5} S/m ve 10^{-5} - 10 S/m'dir. İletken polimerler genellikle yarı iletken bölgede yer almaktadırlar. Sinir dokusunun iletkenliği $2,3 \times 10^{-3}$ ile $3,9 \times 10^{-3}$ S/m olarak raporlanmıştır. Bu çalışmadaki iletkenlik sonuçlarına bakıldığında %0,5 PEDOT:PSS eklenmesi istenilen iletkenliğe ulaşmak için yeterli olduğunu göstermiştir. En yüksek iletkenlik kalp dokusu için rapor edilmiştir ve bu değer $1,9 \times 10^{-2}$ ile 2×10^{-2} S/m değişmektedir. Önceki çalışmalarda, Yarı iletken PANi/jelatinden oluşan yapılar kalp dokusu mühendisliği ve iletken PCL/PPy, PANi/PG ve SIBS/PPy, sinir dokusu mühendisliği için kullanılmıştır ve bu iskelelerin hücre büyümesi, çoğalması için umut verici olduğu ispatlanmıştır.

Magaz ve arkadaşları, iletken sinir tüpü oluşturmak için elektro eğirme yöntemi kullanarak silk fibrin nano fiber yapısı oluşturmuşlar. Daha sonra iletkenliği sağlamak için DMSO’da çözülmüş olan PEDOT:PSS polimerini daldırma yöntemiyle bu fiberlerin üzerine kaplamışlar (167). PEDOT, yüksek elektrik iletkenliği ve kimyasal stabilitesi nedeniyle en çok çalışılan politiyofen türevidir. Diğer iletken polimerlerin aksine, PSS ile katkılanan PEDOT, sulu çözelti içinde kolayca dağılır ve ayrıca fizyolojik koşullarda iletken özelliklerinin önemli bir miktarını korur. PEDOT:PSS hem iyon hem de elektron/delik değişimi ile yükü değiştirir. PEDOT:PSS polimerinin iletkenliği DMSO gibi bir polar çözeltiyle işlenerek optimize edilebilir, DMSO ile işlenme sürecinde aniyonik PSS kabukları yıkanarak uzaklaşır ve PEDOT:PSS yapısında zincirler arası kaymaya yol açarak verimli yörünge örtüşmesi sağlar ve böylece iletkenliğin daha da artmasına yol açar. Çözülmüş PEDOT:PSS, yörüngesel örtüşmede değişikliklere ve daha verimli zincirler arası paketlemeye yol açarak π -yığın lamellerinin oluşumunu teşvik eder ve yük taşınması için daha iyi bir yol oluşturarak iletkenliği artırır. Magaz ve arkadaşlarının elde ettiği sonuçlara göre iletkenliğin artması PEDOT:PSS konsantrasyonun artmasıyla doğru orantıdadır (167-169).

Bizim çalışmamızda kullanılan PEDOT:PSS polimeri çözeltiye eklenmeden önce DMSO ile işlenerek bir hidrojel haline getirilerek kullanılmıştır. Böylece elde edilen tüplerin iletkenliğinde artışının ana sebebi polimer zincirinin yörüngesel örtüşmesinin değişiklikleri ve daha verimli zincirler arası paketlemeye yol açarak π -yığın lamellerinin oluşumu olduğu düşünülmektedir.

Doku mühendisliği alanının en önemli hedefi doğal organ yapılarını fiziksel, mekanik ve biyolojik olarak taklit etmektir. Bunun için fiber yapılar hücre tutunmasını ve çoğalmasını teşvik ettikleri için bu alanda çok fazla kullanılmaktadırlar. Mikro ve nano fiberden oluşan yapılar birçok organın hücre dışı matrisini taklit ettiği için hücre yapışmasını arttırmaktadırlar. Hücreler kendi çaplarından daha küçük olan fiberlerin etrafına fiziksel olarak kolayca sarılarak tutuna bilirler.

Bu çalışmada da görüldüğü gibi fiber yapıyla kaplanmayan PLLA tüplerde hücre tutunmasına rağmen, hücre çoğalması görünememiştir bunu anda neden yapının yüzey alanın küçük olması ve gözenekli olmaması düşünülmektedir. Ögleki, yüzey

alanı tamamen kaplandıktan sonra hücreler yapıya giremedikleri için kendilerine alan bulamamış ve apoptoza uğramışlardır.

Fiber çapının düşmesiyle birlikte hücre canlılığındaki artışın ana nedeni yüzey alanının artmasıdır. Ayrıca, önceki çalışmalarda da gösterildiği gibi PEDOT:PSS polimeri hücre aktivitesini arttırmaktadır. Magaz ve arkadaşlarının çalışmasına göre NG 108-15 sinir hücrelerinin aktivitesi ve farklılaşması PEDOT:PSS polimerinin oranının artmasıyla birlikte kayda değer bir artış göstermiştir. Bu çalışmaya göre PEDOT:PSS polimeri doğal bir polimer olarak bilinen silk fibrinin aktivitesini önemli bir şekilde arttırmıştır. Bizim çalışmamızda buna paralel olarak iletken polimerin oranının artmasıyla birlikte hücre aktivitesinde artış gözlemlenmiştir.

Hücre aktivitesi için diğer bir önemli faktör ise iskelenin gözenekliliğidir. Gözenekli yapı hücrenin yapının içine nüfuz etmesini sağlayarak hücrelerin çoğalmasını arttırır. Bu çalışmada elde edilen fiberlerin homojen boyutta olması gözenekliliği arttırarak hücre aktivitesinin artmasına neden olmuştur.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Sığır kaynaklı jelatin kullanılarak başarılı bir şekilde elektroegirme yöntemiyle 300 nm ile 200 nm arasında değişen fiber yapısı elde edilmiştir. PEDOT:PSS polimerinin eklenmesiyle birlikte elde edilen fiberlerin yarıçapları 100 nm'lere kadar incelmıştır. Bozunma deneylerinde glutaraldehit buharıyla çapraz bağlanan örneklerin 14. Günü sonunda yapılarını korudukları ve bozunma hızının %10'un altında olduğu gösterilmiştir.

PEDOT:PSS polimerinin %0,5 artırılmasıyla birlikte elde edilen tüplerin iletkenliği yarı iletken bölgesine varmış ve sinir dokusun iletkenliğine ulaşmıştır. %1 PEDOT:PSS'in eklenmesiyle birlikte kalp kası iletkenliğinde bile yüksek olan bir iletkenlik elde edilmiştir. Sonuç olarak %0,5 PEDOT:PSS oranının iletkenliği sağlanmak için yeterli olduğu ispatlanmıştır. İn-vitro hücre deneyleri tüm grupların toksik olmamasıyla beraber en yüksek hücre aktivitesi %40 jelatin-%1 PEDOT:PSS'den oluşan grupta ölçülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Catala, M., & Kubis, N. (2013). Gross anatomy and development of the peripheral nervous system. *Clinical neurology*, 115, 29-41.
2. Jessen, K.R. (2004). Glial cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36, 1861–1867.
3. Carr, M.J. and Johnston, A.P. (2017). Schwann cells as drivers of tissue repair and regeneration. *Glial Biology*, 47, 52–57.
4. Stewart, J. (2003). Book reviews. *International Journal of Training and Development*, 7, 138–141.
5. Topp, K.S. and Boyd, B.S. (2012). Peripheral Nerve: From the Microscopic Functional Unit of the Axon to the Biomechanically Loaded Macroscopic Structure. *Journal of Hand Therapy*, 25, 142–152.
6. Vanderkooi, G. (1972). Molecular Architecture Of Biological Membranes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 195, 6–15.
7. Hiller, F. (1948). The role of the endoneurium in the regeneration of nerve grafts as compared with nerve traumas. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 7, 94-99.
8. Battista, A.F. and Lusskin, R. (1986). The Anatomy and Physiology of the Peripheral Nerve. *Foot & Ankle*, 7, 65–70.
9. Thomas, P.K. (1963). The connective tissue of peripheral nerve: an electron microscope study. *Journal of Anatomy*, 97, 35–44.
10. Rodriguez-Fontan, F., Reeves, B., Tuaño, K., Colakoglu, S., D’Agostino, L. and Banegas, R. (2020). Tobacco use and neurogenesis: A theoretical review of pathophysiological mechanism affecting the outcome of peripheral nerve regeneration. *Journal of orthopaedics*, 22, 59–63.
11. Bray, G.M., Rasminsky, M. and Aguayo, A.J. (1981). Interactions between axons and their sheath cells. *Annual Review of Neuroscience*, 4, 127–162.
12. Quarles, R.H. (2002). Myelin sheaths: glycoproteins involved in their formation, maintenance and degeneration. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 59, 1851–1871.
13. Scherer, S.S. and Arroyo, E.J. (2002). Recent progress on the molecular organization of myelinated axons. *Journal of the Peripheral Nervous System*, 7, 1–12.
14. Inouye, H. and Krischner, D. (2016). Evolution of myelin ultrastructure and the major structural myelin proteins. *Brain research*, 1641-1650.
15. Liu, B., Xin, W., Tan, J. R., Zhu, R. P., Li, T., Wang, D., He, T. C. (2019). Myelin sheath structure and regeneration in peripheral nerve injury repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(44), 22347-22352.
16. Hopf, A., Schaefer, D.J., Kalbermatten, D.F., Guzman, R. and Madduri, S. (2020). Schwann Cell-Like Cells: Origin and Usability for Repair and Regeneration of the Peripheral and Central Nervous System. *Cells*, 9, 1990.
17. Armati, P.J. and Mathey, E.K. (2013). An update on Schwann cell biology — Immunomodulation, neural regulation and other surprises. *Journal of the Neurological Sciences*, 333, 68–72.
18. Topilko, P., Schneider-Maunoury, S., Levi, G., Baron-Van Evercooren, A., Chennoufi, A.B., Seitanidou, T., (1994). Krox-20 controls myelination in the peripheral nervous system. *Nature*, 371, 796–799.
19. Armati, P.J. and Mathey, E.K. (2014). Clinical implications of Schwann cell biology. *Journal of the peripheral nervous system: JPNS*, 19, 14–23.
20. Franze, K. and Guck, J. (2010). The biophysics of neuronal growth. *Reports on Progress in Physics*, 73, 094601.
21. Ronchi, G., Nicolino, S., Raimondo, S., Tos, P., Battiston, B., Papalia, I., (2009). Functional and morphological assessment of a standardized crush injury of the rat median nerve. *Journal of Neuroscience Methods*, 179, 51–57.
22. Vijayavenkataraman, S. (2020). Nerve guide conduits for peripheral nerve injury repair: A review on design, materials and fabrication methods. *Acta Biomaterialia*, 106, 54–69.
23. Papadimitriou, L., Manganas, P., Ranella, A. and Stratakis, E. (2020). Biofabrication for neural tissue engineering applications. *Materials Today Bio*, 6, 100043.
24. Mobini, S., Song, Y.H., McCrary, M.W. and Schmidt, C.E. (2019). Advances in ex vivo models and lab-on-a-chip devices for neural tissue engineering. *Biomaterials*, 198, 146–166.
25. Sarker, M.D., Naghieh, S., McInnes, A.D., Schreyer, D.J. and Chen, X. (2018). Regeneration of peripheral nerves by nerve guidance conduits: Influence of design, biopolymers, cells, growth factors, and physical stimuli. *Progress in Neurobiology*, 171, 125–150.

26. Ghorbani, F., Ghalandari, B., Ghorbani, F. and Zamanian, A. (2020). Effects of lamellar microstructure of retinoic acid loaded-matrixes on physicochemical properties, migration, and neural differentiation of P19 embryonic carcinoma cells. *Journal of Polymer Engineering*, 1, 110–125.
27. Struzyna, L.A., Adewole, D.O., Gordián-Vélez, W.J., Grovola, M.R., Burrell, J.C., Katiyar, K.S., (2017). Anatomically Inspired Three-dimensional Micro-tissue Engineered Neural Networks for Nervous System Reconstruction, Modulation, and Modeling. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 55609.
28. Valmikinathan, C.M., Tian, J., Wang, J. and Yu, X. (2008). Novel nanofibrous spiral scaffolds for neural tissue engineering. *Journal of Neural Engineering*, 5, 422–432.
29. De Ruiter, G.C., Spinner, R.J., Malessy, M.J.A., Moore, M.J., Sorenson, E.J., Currier, B.L., (2008). Accuracy of motor axon regeneration across autograft, single-lumen, and multichannel poly (lactic-co-glycolic acid) nerve tubes. *Neurosurgery*, 63, 144–153.
30. De Ruiter, G.C., Onyeneho, I.A., Liang, E.T., Moore, M.J., Knight, A.M., Malessy, M.J.A., (2008). Methods for in vitro characterization of multichannel nerve tubes. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 84, 643–651.
31. Ezra, M., Bushman, J., Shreiber, D., Schachner, M. and Kohn, J. (2016). Porous and Nonporous Nerve Conduits: The Effects of a Hydrogel Luminal Filler With and Without a Neurite-Promoting Moiety. *Tissue Engineering. Part A*, 22, 818–826.
32. Chen, M.B., Zhang, F. and Lineaweaver, W.C. (2006). Luminal fillers in nerve conduits for peripheral nerve repair. *Annals of plastic surgery*, 57, 462–471.
33. Jiang, H., Qian, Y., Fan, C. and Ouyang, Y. (2020). Polymeric Guide Conduits for Peripheral Nerve Tissue Engineering. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8.
34. Bakhshandeh, B., Zarrintaj, P., Oftadeh, M.O., Keramati, F., Fouladiha, H., Sohrabi-Jahromi, S., et al. (2017). Tissue engineering; strategies, tissues, and biomaterials. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 33, 144–172.
35. Jiang, H., Qian, Y., Fan, C. and Ouyang, Y. (2020). Polymeric Guide Conduits for Peripheral Nerve Tissue Engineering. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8.
36. Lee, E.J., Kasper, F.K. and Mikos, A.G. (2014). Biomaterials for Tissue Engineering. *Annals of biomedical engineering*, 42, 323–337.
37. Wang, Y., Naleway, S.E. and Wang, B. (2020). Biological and bioinspired materials: Structure leading to functional and mechanical performance. *Bioactive Materials*, 5, 745–757.
38. Mutlu, H. and Lutz, J. (2014). Reading polymers: sequencing of natural and synthetic macromolecules. *Angewandte Chemie International Edition*, 53, 13010–13019.
39. Müllner, M. (2019). Functional Natural and Synthetic Polymers. *Macromolecular rapid communications*, 40, 1970021.
40. Sionkowska, A. (2011). Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials: Review. *Progress in Polymer Science*, 36, 1254–1276.
41. Coenen, A., Bernaerts, K., Harings, J., Jockenhoevel, S. and Ghazanfari, S. (2018). Elastic materials for tissue engineering applications: Natural, synthetic, and hybrid polymers. *Acta Biomaterialia*, 79.
42. Sun, Y., Yang, C., Zhu, X., Wang, J.J., Liu, X.Y., Yang, X.P., (2019). 3D printing collagen/chitosan scaffold ameliorated axon regeneration and neurological recovery after spinal cord injury. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 107, 1898–1908.
43. Muangsantit, P., Day, A., Dimiou, S., Atac, A.F., Kayal, C., Park, H., (2020). Rapidly formed stable and aligned dense collagen gels seeded with Schwann cells support peripheral nerve regeneration. *Journal of Neural Engineering*, 17, 046036.
44. Wu, Z., Li, Q., Xie, S., Shan, X. and Cai, Z. (2020). In vitro and in vivo biocompatibility evaluation of a 3D bioprinted gelatin-sodium alginate/rat Schwann-cell scaffold. *Materials Science and Engineering: C*, 109, 110530.
45. Gan, L., Zhao, L., Zhao, Y., Li, K., Tong, Z., Yi, L., (2016). Cellulose/soy protein composite-based nerve guidance conduits with designed microstructure for peripheral nerve regeneration. *Journal of Neural Engineering*, 13, 056019.
46. Wang, Y., Zhang, Y., Zhang, Z., Su, Y., Wang, Z., Dong, M., (2020). An injectable high-conductive bimaterial scaffold for neural stimulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 195, 111210.
47. Luciani, A., Coccoli, V., Orsi, S., Ambrosio, L. and Netti, P.A. (2008). PCL microspheres based functional scaffolds by bottom-up approach with predefined microstructural properties and release profiles. *Biomaterials*, 29, 4800–4807.
48. Chong, E.J., Phan, T.T., Lim, I.J., Zhang, Y.Z., Bay, B.H., Ramakrishna, S., (2007). Evaluation of electrospun PCL/gelatin nanofibrous scaffold for wound healing and layered dermal reconstitution. *Acta Biomaterialia*, 3, 321–330.

49. Asheghali, D., Lee, S.-J., Furchner, A., Gruz, A., Larson, S., Tokarev, A., (2020). Enhanced neuronal differentiation of neural stem cells with mechanically enhanced touch-spun nanofibrous scaffolds. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 24, 102152.
50. Nezakati, T., Tan, A., Lim, J., Cormia, R.D., Teoh, S.H. and Seifalian, A.M. (2019). Ultra-low percolation threshold POSS-PCL/graphene electrically conductive polymer: Neural tissue engineering nanocomposites for neurosurgery. *Materials Science and Engineering: C*, 104, 109915.
51. Cipitria, A., Skelton, A., Dargaville, T., Dalton, P. and Hutmacher, D. (2011). Design, fabrication and characterization of PCL electrospun scaffolds—a review. *Journal of Materials Chemistry*, 21, 9419–9453.
52. Salehi, M., Bagher, Z., Kamrava, S.K., Ehterami, A., Alizadeh, R., Farhadi, M., (2019). Alginate/chitosan hydrogel containing olfactory ectomesenchymal stem cells for sciatic nerve tissue engineering. *Journal of Cellular Physiology*, 234, 15357–15368.
53. Homaeigohar, S., Tsai, T.-Y., Young, T.-H., Yang, H.J. and Ji, Y.R. (2019). An electroactive alginate hydrogel nanocomposite reinforced by functionalized graphite nanofilaments for neural tissue engineering. *Carbohydrate Polymers*, 224, 115112.
54. Utech, S., Prodanovic, R., Mao, A. S., Ostafe, R., Mooney, D. J., Weitz, D. A. (2015). Microfluidic generation of monodisperse, structurally homogeneous alginate microgels for cell encapsulation and 3D cell culture. *Advanced healthcare materials*, 4(11), 1628–1633.
55. Zhang, Z., Jorgensen, M.L., Wang, Z., Amagat, J., Wang, Y., Li, Q. (2020). 3D anisotropic photocatalytic architectures as bioactive nerve guidance conduits for peripheral neural regeneration. *Biomaterials*, 253, 120108.
56. Sun, X., Bai, Y., Zhai, H., Liu, S., Zhang, C., Xu, Y. (2019). Devising micro/nano-architectures in multi-channel nerve conduits towards a pro-regenerative matrix for the repair of spinal cord injury. *Acta Biomaterialia*, 86, 194–206.
57. Jahromi, M., Razavi, S., Seyedebrabimi, R., Reisi, P., Kazemi, M. (2021). Regeneration of Rat Sciatic Nerve Using PLGA Conduit Containing Rat ADSCs with Controlled Release of BDNF and Gold Nanoparticles. *Journal of Molecular Neuroscience*, 71(4), 746–760.
58. Fujimaki, H., Matsumine, H., Osaki, H., Ueta, Y., Kamei, W., Shimizu, M. (2019). Dedifferentiated fat cells in polyglycolic acid-collagen nerve conduits promote rat facial nerve regeneration. *Regenerative Therapy*, 11, 240–248.
59. Hsu, S., Chang, W. and Yen, C. (2017). Novel flexible nerve conduits made of water-based biodegradable polyurethane for peripheral nerve regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 105, 1383–1392.
60. Ye, W., Li, H., Yu, K., Xie, C., Wang, P., Zheng, Y. (2020). 3D printing of gelatin methacrylate-based nerve guidance conduits with multiple channels. *Materials & Design*, 192, 108757.
61. Mohammadi, M., Ramazani SaadatAbadi, A., Mashayekhan, S. and Sanaei, R. (2020). Conductive multichannel PCL/gelatin conduit with tunable mechanical and structural properties for peripheral nerve regeneration. *Journal of Applied Polymer Science*, 137, 49219.
62. Li, Y., Men, Y., Wang, B., Chen, X. and Yu, Z. (2020). Co-transplantation of Schwann cells and neural stem cells in the laminin-chitosan-PLGA nerve conduit to repair the injured recurrent laryngeal nerve in SD rats. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 31, 1–8.
63. Huang, L., Zhu, L., Shi, X., Xia, B., Liu, Z., Zhu, S. (2018). A compound scaffold with uniform longitudinally oriented guidance cues and a porous sheath promotes peripheral nerve regeneration in vivo. *Acta Biomaterialia*, 68, 223–236.
64. Pillai, M.M., Kumar, G.S., Houshyar, S., Padhye, R. and Bhattacharyya, A. (2020). Effect of nanocomposite coating and biomolecule functionalization on silk fibroin based conducting 3D braided scaffolds for peripheral nerve tissue engineering. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine*, 24, 102131.
65. Gopalakrishnan-Prema, V., Mohanan, A., Shivaram, S.B., Madhusudanan, P., Raju, G., Menon, D. (2020). Electrical stimulation of co-woven nerve conduit for peripheral neurite differentiation. *Biomedical Materials*, 15, 65–78.
66. Kumar, M.R. and Freund, M.S. (2015). Electrically conducting collagen and collagen-mineral composites for current stimulation. *Rsc Advances*, 5, 57318–57327.
67. Zhang, K., Zheng, H., Liang, S. and Gao, C. (2016). Aligned PLLA nanofibrous scaffolds coated with graphene oxide for promoting neural cell growth. *Acta biomaterialia*, 37, 131–142.
68. Salehi, M., Farzamfar, S., Bastami, F., Tajerian, R. (2016). Fabrication and characterization of electrospun PLLA/collagen nanofibrous scaffold coated with chitosan to sustain release of aloe vera gel for skin tissue engineering. *Biomedical Engineering: Applications, Basis and Communications*, 28, 1650035.

69. Salehi, M., Farzamfar, S., Bozorgzadeh, S. and Bastami, F. (2019). Fabrication of Poly(L-Lactic Acid)/Chitosan Scaffolds by Solid-Liquid Phase Separation Method for Nerve Tissue Engineering: An In Vitro Study on Human Neuroblasts. *The Journal of Craniofacial Surgery*, 30, 784–789.
70. Wu, T., Li, D., Wang, Y., Sun, B., Li, D., Morsi, Y. (2017). Laminin-coated nerve guidance conduits based on poly(L-lactide-co-glycolide) fibers and yarns for promoting Schwann cells' proliferation and migration. *Journal of Materials Chemistry B*, 5, 3186–3194.
71. Kerimoğlu, O. and Alarcin, E. (2012). Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid) Based Drug Delivery Devices For Tissue Engineering And Regenerative Medicine. *ANKEM Dergisi*, 26, 86–98.
72. Ozer, H., Bozkurt, H., Bozkurt, G. and Demirbilek, M. (2018). Regenerative potential of chitosan-coated poly-3-hydroxybutyrate conduits seeded with mesenchymal stem cells in a rat sciatic nerve injury model. *The International Journal of Neuroscience*, 128, 828–834.
73. Pires, F., Ferreira, Q., Rodrigues, C.A., Morgado, J. and Ferreira, F.C. (2015). Neural stem cell differentiation by electrical stimulation using a cross-linked PEDOT substrate: expanding the use of biocompatible conjugated conductive polymers for neural tissue engineering. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1850, 1158–1168.
74. Ghasemi-Mobarakeh, L., Prabhakaran, M.P., Morshed, M., Nasr-Esfahani, M.H., Baharvand, H., Kiani, S. (2011). Application of conductive polymers, scaffolds and electrical stimulation for nerve tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 5, 17–35.
75. Guo, B. and Ma, P.X. (2018). Conducting polymers for tissue engineering. *Biomacromolecules*, 19, 1764–1782.
76. Balint, R., Cassidy, N.J. and Cartmell, S.H. (2014). Conductive polymers: Towards a smart biomaterial for tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 10, 2341–2353.
77. Fan, Z. and Ouyang, J. (2019). Thermoelectric properties of PEDOT: PSS. *Advanced Electronic Materials*, 5, 1–23.
78. Rahimzadeh, Z., Naghib, S.M., Zare, Y. and Rhee, K.Y. (2020). An overview on the synthesis and recent applications of conducting poly (3, 4-ethylenedioxythiophene)(PEDOT) in industry and biomedicine. *Journal of Materials Science*, 55, 7575–7611.
79. Rahimzadeh, Z., Naghib, S.M., Zare, Y. and Rhee, K.Y. (2020). An overview on the synthesis and recent applications of conducting poly (3, 4-ethylenedioxythiophene)(PEDOT) in industry and biomedicine. *Journal of Materials Science*, 55, 7575–7611.
80. Liao, J., Si, H., Zhang, X. and Lin, S. (2019). Functional Sensing Interfaces of PEDOT:PSS Organic Electrochemical Transistors for Chemical and Biological Sensors: A Mini Review. *Sensors*, 19, 218.
81. Yu, C., Xu, L., Zhang, Y., Timashev, P.S., Huang, Y. and Liang, X.J. (2020). Polymer-Based Nanomaterials for Noninvasive Cancer Photothermal Therapy. *ACS Applied Polymer Materials*, 2, 4289–4305.
82. Hu, L., Song, J., Yin, X., Su, Z. and Li, Z. (2020). Research Progress on Polymer Solar Cells Based on PEDOT:PSS Electrodes. *Polymers*, 12, 145.
83. Fan, X., Nie, W., Tsai, H., Wang, N., Huang, H., Cheng, Y. (2019). PEDOT: PSS for flexible and stretchable electronics: modifications, strategies, and applications. *Advanced Science*, 6, 1900813.
84. Wang, Y., Yang, L., Shi, X.-L., Shi, X., Chen, L., Dargusch, M.S. (2019). Flexible Thermoelectric Materials and Generators: Challenges and Innovations. *Advanced Materials*, 31, 1807916.
85. Tseghai, G.B., Mengistie, D.A., Malengier, B., Fante, K.A. and Van Langenhove, L. (2020). PEDOT: PSS-based conductive textiles and their applications. *Sensors*, 20, 1881.
86. Lari, A., Sun, T. and Sultana, N. (2016). PEDOT: PSS-containing nanohydroxyapatite/chitosan conductive bionanocomposite Scaffold: Fabrication and evaluation. *Journal of Nanomaterials*, 2016.
87. Chang, H.C., Sun, T., Sultana, N., Lim, M.M., Khan, T.H. and Ismail, A.F. (2016). Conductive PEDOT:PSS coated polylactide (PLA) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) electrospun membranes: Fabrication and characterization. *Materials Science and Engineering: C*, 61, 396–410.
88. Khan, S., Ul-Islam, M., Ullah, M.W., Kim, Y. and Park, J.K. (2015). Synthesis and characterization of a novel bacterial cellulose–poly(3,4-ethylenedioxythiophene)–poly(styrene sulfonate) composite for use in biomedical applications. *Cellulose*, 22, 2141–2148.
89. Guex, A.G., Puetzer, J.L., Armgarth, A., Littmann, E., Stavrinidou, E., Giannelis, E.P., (2017). Highly porous scaffolds of PEDOT: PSS for bone tissue engineering. *Acta biomaterialia*, 62, 91–101.
90. Roshanbinfar, K., Vogt, L., Greber, B., Diecke, S., Boccaccini, A.R., Scheibel, T., (2018). Electroconductive biohybrid hydrogel for enhanced maturation and beating properties of engineered cardiac tissues. *Advanced Functional Materials*, 28, 1–10.

91. Mahmoudinezhad, M.H., Karkhaneh, A. and Jadidi, K. (2018). Effect of PEDOT: PSS in tissue engineering composite scaffold on improvement and maintenance of endothelial cell function. *Journal of biosciences*, 43, 307–319.
92. Heo, D.N., Lee, S.-J., Timsina, R., Qiu, X., Castro, N.J. and Zhang, L.G. (2019). Development of 3D printable conductive hydrogel with crystallized PEDOT:PSS for neural tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 99, 582–590.
93. Farzamfar, S., Salehi, M., Tavangar, S.M., Verdi, J., Mansouri, K., Ai, A. (2019). A novel polycaprolactone/carbon nanofiber composite as a conductive neural guidance channel: An in vitro and in vivo study. *Progress in biomaterials*, 8, 239–248.
94. Altun, E., Aydogdu, M.O., Togay, S.O., Sengil, A.Z., Ekren, N., Haskoylu, M.E. (2019). Bioinspired scaffold induced regeneration of neural tissue. *European Polymer Journal*, 114, 98–108.
95. Jang, S.R., Kim, J.I., Park, C.H. and Kim, C.S. (2020). The controlled design of electrospun PCL/silk/quercetin fibrous tubular scaffold using a modified wound coil collector and L-shaped ground design for neural repair. *Materials Science and Engineering: C*, 111, 110776.
96. Rao, F., Yuan, Z., Li, M., Yu, F., Fang, X., Jiang, B. (2019). Expanded 3D nanofibre sponge scaffolds by gas-foaming technique enhance peripheral nerve regeneration. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 47, 491–500.
97. Vishnoi, T., Singh, A., Teotia, A.K. and Kumar, A. (2019). Chitosan-gelatin-polypyrrole cryogel matrix for stem cell differentiation into neural lineage and sciatic nerve regeneration in peripheral nerve injury model. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 5, 3007–3021.
98. Nguyen, H.T., Sapp, S., Wei, C., Chow, J.K., Nguyen, A., Coursen, J. (2014). Electric field stimulation through a biodegradable polypyrrole-co-polycaprolactone substrate enhances neural cell growth. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 102, 2554–2564.
99. Kim, J.I., Hwang, T.I., Aguilar, L.E., Park, C.H. and Kim, C.S. (2016). A controlled design of aligned and random nanofibers for 3D bi-functionalized nerve conduits fabricated via a novel electrospinning set-up. *Scientific reports*, 6, 1–12.
100. Salehi, M., Ehtami, A., Bastami, F., Farzamfar, S., Hosseinpour, S., Vahedi, H. (2019). Polyurethane/Gelatin nanofiber neural guidance conduit in combination with resveratrol and schwann cells for sciatic nerve regeneration in the rat model. *Fibers and Polymers*, 20, 490–500.
101. Nelson, K.D., Romero, A., Waggoner, P., Crow, B., Borneman, A. and Smith, G.M. (2003). Technique paper for wet-spinning poly(L-lactic acid) and poly(DL-lactide-co-glycolide) monofilament fibers. *Tissue Engineering*, 9, 1323–1330.
102. Singh, A., Shiekh, P.A., Das, M., Seppälä, J. and Kumar, A. (2019). Aligned Chitosan-Gelatin Cryogel-Filled Polyurethane Nerve Guidance Channel for Neural Tissue Engineering: Fabrication, Characterization, and In Vitro Evaluation. *Biomacromolecules*, 20, 662–673.
103. Wang, J., Cheng, Y., Wang, H., Wang, Y., Zhang, K., Fan, C. (2020). Biomimetic and hierarchical nerve conduits from multifunctional nanofibers for guided peripheral nerve regeneration. *Acta Biomaterialia*, 117, 180–191.
104. Quigley, A.F., Bulluss, K.J., Kyratzis, I.L.B., Gilmore, K., Mysore, T., Schirmer, K.S.U. (2013). Engineering a multimodal nerve conduit for repair of injured peripheral nerve. *Journal of Neural Engineering*, 10, 1-17.
105. Mandrycky, C., Wang, Z., Kim, K. and Kim, D.H. (2016). 3D bioprinting for engineering complex tissues. *Biotechnology Advances*, 34, 422–434.
106. Zhang, X. and Zhang, Y. (2015). Tissue engineering applications of three-dimensional bioprinting. *Cell biochemistry and biophysics*, 72, 777–782.
107. Zhang, Y.S., Yue, K., Aleman, J., Mollazadeh-Moghaddam, K., Bakht, S.M., Yang, J. (2017). 3D bioprinting for tissue and organ fabrication. *Annals of biomedical engineering*, 45, 148–163.
108. Yu, X., Zhang, T. and Li, Y. (2020). 3D Printing and Bioprinting Nerve Conduits for Neural Tissue Engineering. *Polymers*, 12, 1-27.
109. Pabari, A., Yang, S.Y., Mosahebi, A. and Seifalian, A.M. (2011). Recent advances in artificial nerve conduit design: strategies for the delivery of luminal fillers. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 156, 2–10.
110. Jeong, C.G. and Atala, A. (2015). 3D Printing and Biofabrication for Load Bearing Tissue Engineering. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 881, 3–14.
111. Joung, D., Lavoie, N.S., Guo, S.-Z., Park, S.H., Parr, A.M. and McAlpine, M.C. (2020). 3D Printed Neural Regeneration Devices. *Advanced Functional Materials*, 30.
112. Vijayavenkataraman, S., Thaharah, S., Zhang, S., Lu, W.F. and Fuh, J.Y.H. (2019). 3D-Printed PCL/rGO Conductive Scaffolds for Peripheral Nerve Injury Repair. *Artificial Organs*, 43, 515–523.

113. Tomaskovic-Crook, E., Zhang, P., Ahtiainen, A., Kaisvuo, H., Lee, C. Y., Beirne, S., Crook, J. M. (2019). Human neural tissues from neural stem cells using conductive biogel and printed polymer microelectrode arrays for 3D electrical stimulation. *Advanced healthcare materials*, 8(15), 10-35.
114. Lee, Y.-B., Polio, S., Lee, W., Dai, G., Menon, L., Carroll, R.S. (2010). Bio-printing of collagen and VEGF-releasing fibrin gel scaffolds for neural stem cell culture. *Experimental neurology*, 223, 645–652.
115. Zhu, W., O'Brien, C., O'Brien, J.R. and Zhang, L.G. (2014). 3D nano/microfabrication techniques and nanobiomaterials for neural tissue regeneration. *Nanomedicine*, 9, 859–875.
116. Lee, S., Esworthy, T., Stake, S., Miao, S., Zuo, Y.Y., Harris, B.T. (2018). Advances in 3D bioprinting for neural tissue engineering. *Advanced Biosystems*, 2, 32-52.
117. Rider, P., Kačarević, Ž.P., Alkildani, S., Retnasingh, S. and Barbeck, M. (2018). Bioprinting of tissue engineering scaffolds. *Journal of tissue engineering*, 9, 1-16.
118. Zhang, B., Gao, L., Ma, L., Luo, Y., Yang, H. and Cui, Z. (2019). 3D Bioprinting: A Novel Avenue for Manufacturing Tissues and Organs. *Engineering*, 5, 777–794.
119. Xu, H., Casillas, J. and Xu, C. (2019). Effects of printing conditions on cell distribution within microspheres during inkjet-based bioprinting. *AIP Advances*, 9, 1-11.
120. Zimmermann, R., Hentschel, C., Schrön, F., Moedder, D., Büttner, T., Atallah, P. (2019). High resolution bioprinting of multi-component hydrogels. *Biofabrication*, 11, 30-42.
121. Tytgat, L., Dobos, A., Markovic, M., Van Damme, L., Van Hoorick, J., Bray, F. (2020). High-resolution 3D bioprinting of photo-cross-linkable recombinant collagen to serve tissue engineering applications. *Biomacromolecules*, 21, 3997–4007.
122. Kumar, H., Sakthivel, K., Mohamed, M.G., Boras, E., Shin, S.R. and Kim, K. (2021). Designing Gelatin Methacryloyl (GelMA)-Based Bioinks for Visible Light Stereolithographic 3D Biofabrication. *Macromolecular Bioscience*, 21, 1-18.
123. Sanjairaj, V., Vialli, N., Fuh, J. and Lu, W.F. (2019). Conductive Collagen/PPy-b-PCL hydrogel for bioprinting of neural tissue constructs. *International Journal of Bioprinting*, 5.
124. Demirtaş, T.T., Irmak, G. and Gümüşderelioğlu, M. (2017). A bioprintable form of chitosan hydrogel for bone tissue engineering. *Biofabrication*, 9, 12-36.
125. Jiang, L., Wang, Y., Liu, Z., Ma, C., Yan, H., Xu, N. (2019). Three-dimensional printing and injectable conductive hydrogels for tissue engineering application. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 25, 398–411.
126. Hölzl, K., Lin, S., Tytgat, L., Van Vlierberghe, S., Gu, L. and Ovsianikov, A. (2016). Bioink properties before, during and after 3D bioprinting. *Biofabrication*, 8, 15-34.
127. Lu, L., Yuan, S., Wang, J., Shen, Y., Deng, S., Xie, L. (2018). The formation mechanism of hydrogels. *Current stem cell research & therapy*, 13, 490–496.
128. Alemdar, N., Leijten, J., Camci-Unal, G., Hjortnaes, J., Ribas, J., Paul, A. (2017). Oxygen-generating photo-cross-linkable hydrogels support cardiac progenitor cell survival by reducing hypoxia-induced necrosis. *ACS biomaterials science & engineering*, 3, 1964–1971.
129. Seliktar, D. (2012). Designing cell-compatible hydrogels for biomedical applications. *Science*, 336, 1124–1128.
130. Jabbari, E. (2019). Challenges for natural hydrogels in tissue engineering. *Gels*, 5, 30-45.
131. Ding, X., Zhao, H., Li, Y., Lee, A.L., Li, Z., Fu, M. (2020). Synthetic peptide hydrogels as 3D scaffolds for tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 160, 78–104.
132. Rial, R., Soltero, J.A., Verdes, P.V., Liu, Z. and Ruso, J.M. (2018). Mechanical properties of composite hydrogels for tissue engineering. *Current topics in medicinal chemistry*, 18, 1214–1223.
133. Yu, X., Zhang, T. and Li, Y. (2020). 3D Printing and Bioprinting Nerve Conduits for Neural Tissue Engineering. *Polymers*, 12, 16-37.
134. Ye, H., Zhang, K., Kai, D., Li, Z. and Loh, X.J. (2018). Polyester elastomers for soft tissue engineering. *Chemical Society Reviews*, 47, 4545–4580.
135. Gruber, S.M.S., Ghosh, P., Mueller, K.W., Whitlock, P.W. and Lin, C.-Y. (2019). Novel Process for 3D Printing Decellularized Matrices. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 58, 1-6.
136. Jiang, B., Akar, B., Waller, T., Larson, J., Appel, A. and Brey, E. (2014). Design of a composite biomaterial system for tissue engineering applications. *Acta Biomaterialia*, 10, 1177–1186.
137. Siddiqui, N., Asawa, S., Birru, B., Baadhe, R. and Rao, S. (2018). PCL-based composite scaffold matrices for tissue engineering applications. *Molecular Biotechnology*, 60, 506–532.
138. Ho, C.M.B., Mishra, A., Lin, P.T.P., Ng, S.H., Yeong, W.Y., Kim, Y. (2017). 3D printed polycaprolactone carbon nanotube composite scaffolds for cardiac tissue engineering. *Macromolecular bioscience*, 17, 16-35.
139. Lee, S.-J., Nowicki, M., Harris, B. and Zhang, L.G. (2017). Fabrication of a highly aligned neural scaffold via a table top stereolithography 3D printing and electrospinning. *Tissue Engineering Part A*, 23, 491–502.

140. Lee, S.J., Zhu, W., Nowicki, M., Lee, G., Heo, D.N., Kim, J. (2018). 3D printing nano conductive multi-walled carbon nanotube scaffolds for nerve regeneration. *Journal of neural engineering*, 15, 1-28.
141. Kishan, A.P. and Cosgriff-Hernandez, E.M. (2017). Recent advancements in electrospinning design for tissue engineering applications: A review: Advancements in electrospinning design for tissue engineering applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 105, 2892–2905.
142. Huang, C. and Thomas, N.L. (2018). Fabricating porous poly(lactic acid) fibres via electrospinning. *European Polymer Journal*, 99, 464–476.
143. Rahmati, M., Mills, D. K., Urbanska, A. M., Saeb, M., Venugopal, J. R., Ramakrishna, S., & Mozafari, M. (2020). Electrospinning for tissue engineering applications. *Progress in Materials Science*, 101-125.
144. Shahriar, S., Mondal, J., Hasan, M., Revuri, V., Lee, D. and Lee, Y.K. (2019). Electrospinning Nanofibers for Therapeutics Delivery. *Nanomaterials*, 9, 532-545.
145. Xue, J., Xie, J., Liu, W. and Xia, Y. (2017). Electrospun nanofibers: new concepts, materials, and applications. *Accounts of chemical research*, 50, 1976–1987.
146. Wang, H., Feng, Y., Fang, Z., Xiao, R., Yuan, W. and Khan, M. (2013). Fabrication and characterization of electrospun gelatin-heparin nanofibers as vascular tissue engineering. *Macromolecular Research*, 21, 860–869.
147. Liu, W., Thomopoulos, S. and Xia, Y. (2012). Electrospun nanofibers for regenerative medicine. *Advanced Healthcare Materials*, 1, 10–25.
148. Garg, K. and Bowlin, G.L. (2011). Electrospinning jets and nanofibrous structures. *Biomicrofluidics*, 5, 013403.
149. Pham, Q., Sharma, U. and Mikos, A. (2006). Electrospinning of Polymeric Nanofibers for Tissue Engineering Applications: A Review. *Tissue engineering*, 12, 1197–211.
150. Lee, Y.S. and Livingston Arinzeh, T. (2011). Electrospun Nanofibrous Materials for Neural Tissue Engineering. *Polymers*, 3, 413–426.
151. Rim, N.G., Shin, C.S. and Shin, H. (2013). Current approaches to electrospun nanofibers for tissue engineering. *Biomedical Materials*, 8, 1-22.
152. Li, J., He, A., Zheng, J. and Han, C.C. (2006). Gelatin and gelatin-hyaluronic acid nanofibrous membranes produced by electrospinning of their aqueous solutions. *Biomacromolecules*, 7, 2243–2247.
153. Chen, P., Rodda, A. E., Parkington, H. C., & Forsythe, J. S. (2017). Electrospun scaffolds for neural tissue engineering. In *Electrospun Materials for Tissue Engineering and Biomedical Applications* (pp. 299-320). Woodhead Publishing.
154. Vasita, R. and Katti, D.S. (2006). Nanofibers and their applications in tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine*, 1, 15–30.
155. Jiang, H., Fang, D., Hsiao, B.S., Chu, B. and Chen, W. (2004). Optimization and characterization of dextran membranes prepared by electrospinning. *Biomacromolecules*, 5, 326–333.
156. NG, C. C. S. J. T. (2003). Chase DB Rabolt JF Controlling surface morphology of electrospun polystyrene fibers: effect of humidity and molecular weight in the electrospinning process. *Macromolecules*, 37, 573.
157. Ryu, Y. J., Kim, H. Y., Lee, K. H., Park, H. C., & Lee, D. R. (2003). Transport properties of electrospun nylon 6 nonwoven mats. *European Polymer Journal*, 39(9), 1883-1889.
158. Xie, J., MacEwan, M.R., Schwartz, A.G. and Xia, Y. (2010). Electrospun nanofibers for neural tissue engineering. *Nanoscale*, 2, 35–44.
159. Huang, Z.M., Zhang, Y.Z., Ramakrishna, S. and Lim, C.T. (2004). Electrospinning and mechanical characterization of gelatin nanofibers. *Polymer*, 45, 5361–5368.
160. Tonda-Turo, C., Cipriani, E., Gnani, S., Chiono, V., Mattu, C., Gentile, P. (2013). Crosslinked gelatin nanofibres: Preparation, characterisation and in vitro studies using glial-like cells. *Materials Science and Engineering: C*, 33, 2723–2735.
161. Gomes, S.R., Rodrigues, G., Martins, G.G., Henriques, C.M.R. and Silva, J.C. (2013). In vitro evaluation of crosslinked electrospun fish gelatin scaffolds. *Materials Science and Engineering: C*, 33, 1219–1227.
162. Matthews, J.A., Wnek, G.E., Simpson, D.G. and Bowlin, G.L. (2002). Electrospinning of Collagen Nanofibers. *Biomacromolecules*, 3, 232–238.
163. Ratanavaraporn, J., Rangkupan, R., Jeeratawatchai, H., Kanokpanont, S. and Damrongsakkul, S. (2010). Influences of physical and chemical crosslinking techniques on electrospun type A and B gelatin fiber mats. *International Journal of Biological Macromolecules*, 47, 431–438.
164. Yang, F., Murugan, R., Wang, S. and Ramakrishna, S. (2005). Electrospinning of nano/micro scale poly(l-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering. *Biomaterials*, 26, 2603–2610.

165. Katta, P., Alessandro, M., Ramsier, R.D. and Chase, G.G. (2004). Continuous Electrospinning of Aligned Polymer Nanofibers onto a Wire Drum Collector. *Nano Letters*, 4, 2215–2218.
166. Thompson, C.J., Chase, G.G., Yarin, A.L. and Reneker, D.H. (2007). Effects of parameters on nanofiber diameter determined from electrospinning model. *Polymer*, 48, 6913–6922.
167. Bigi, A., Cojazzi, G., Panzavolta, S., Rubini, K., & Roveri, N. (2001). Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. *Biomaterials*, 22(8), 763–768.
168. Gomes, S.R., Rodrigues, G., Martins, G.G., Henriques, C.M.R. and Silva, J.C. (2013). In vitro evaluation of crosslinked electrospun fish gelatin scaffolds. *Materials Science and Engineering: C*, 33, 1219–1227.
169. Tripathy, A., Kumar, A., Sreedharan, S., Muralidharan, G., Pramanik, A., Nandi, D. (2018). Fabrication of Low-Cost Flexible Superhydrophobic Antibacterial Surface with Dual-Scale Roughness. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 4, 2213–2223.

