

**3D BİYOYAZICI ORTAMINDA SELÜLOZ İÇEREN BİOİNK KULLANARAK
SİNİR HÜCRESİ GELİŞİMİNE YARDIMCI KILIF VE YAMALARIN
GELİŞTİRİLMESİ**

Yiğitcan SÜMBELLİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyokimya Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Arzu ERSÖZ

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Aralık 2018

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Yiğitcan Sümbelli'nin “3D Biyoyazıcı Ortamında Selüloz İçeren Bioink Kullanarak Sinir Hücresi Gelişimine Yardımcı Kılıf Ve Yamaların Geliştirilmesi” başlıklı tezi .../.../2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek “Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği” nin ilgili maddeleri uyarınca, Kimya Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. Arzu ERSÖZ	
Üye	: Prof. Dr. Adil DENİZLİ	
Üye	: Doç. Dr. Sibel Emir DİLTEMİZ	

.....

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Ersin YÜCEL

ÖZET

3D BİYOYAZICI ORTAMINDA SELÜLOZ İÇEREN BİOİNK KULLANARAK SİNİR HÜCRESİ GELİŞİMİNE YARDIMCI KILIF VE YAMALARIN GELİŞTİRİLMESİ

Yiğitcan SÜMBELLİ

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Bilim Dalı

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Aralık 2018

Danışman: Prof. Dr. Arzu ERSÖZ

Yapılan çalışmada hasarlı sinir dokusunun yenilenmesine yardımcı 3 boyutlu kılıflar geliştirilmiştir. Üretilen kılıfların elektriksel iletkenlik özelliğine sahip olması, hasarlı sinir bölgesinin yenilenmesini hızlandıracaktır. Bu amaçla; elektriksel iletkenlik özelliğine sahip modifiye selüloz nano-kristaller sentezlenmiş ve bozunabilir biyomürekkep formuna getirmek için jelatin ve karragenandan oluşan biyomalzemenin içine eklenmiştir. Sentezlenen selüloz nano-kristallerin karakterizasyonu için FT-IR, SEM, XRD, TGA ve iletkenlik testleri kullanılırken hazırlanan biyomürekkep mekanik test ve basılabilirlik testleri ile karakterize edilmiştir.

Hazırlanan biyomürekkep, 3B biyoyazıcı kullanılarak literatürden farklı şekilde yeni yapısal özelliklere sahip bir kılıf formunda basılmış ve yapı glutaraldehit ile çapraz bağlanmıştır. Üretilen 3B kılıf SEM, optik mikroskop, biyobozunum, şişme ve biyouyumluluk testleri ile karakterize edilmiştir.

Tez çalışması sonunda üretilen sinir doku yenilenmesine yardımcı 3B kılıflar sahip olduğu yenilikçi yapısal özellikleri ve üstün elektriksel iletkenlik özelliği sayesinde doku ve organ mühendisliği literatürüne yeni bir bakış açısı kazandırmıştır.

Anahtar Sözcükler: 3B biyoyazıcı, doku ve organ mühendisliği, karragenan, selüloz nano-kristal, sinir dokusu yenilenmesi

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF CELLULOSE-BASED 3D CONDUITS AND PATCHES BY USING 3D BIOPRINTER FOR NEURAL TISSUE REGENERATION

Yiğitcan SÜMBELLİ

Department of Chemistry

Programme in Biochemistry

Anadolu University, Graduate School of Sciences, December 2018

Supervisor: Prof. Dr. Arzu ERSÖZ

In this study, cellulose nano-crystal based 3D conduits have been developed in terms of neural tissue regeneration. To fasten the regeneration process, the developed conduits have gained electrical conductivity. In that aim, sulphate modified cellulose nano-crystals (CNC) have been synthesized and added into gelatin-carrageenan bioink mixture. The synthesized CNCs have been characterized by using FT-IR, SEM, XRD, TGA and conductivity tests. The final bio ink has been also characterized by using mechanical and bioprintability tests.

The prepared bio ink has been 3D bioprinted in a novel conduit shape and was cross-linked by glutaraldehyde. The conduit has been characterized by using SEM, optical microscopy, biodegradability, swelling and biocompatibility tests.

At the end, the 3D conduit that helps the neural tissue regeneration has been developed in that thesis study. Thanks to its novel structure and its high conductivity property, a novel approach for neural tissue engineering has been suggested to tissue and organ engineering applications.

Keywords: 3D bioprinter, tissue and organ engineering, carrageenan, cellulose nano-crystal, neural tissue regeneration

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca ilgisini ve desteğini her an hissettiğim, deneyimlerinden faydalandığım çok sevgili tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Arzu ERSÖZ’e,

Tez konumun belirlenmesinden çalışmalarımın sonuçlanmasına kadar her an beni yönlendiren ve destekleyen çok sevgili hocam Sayın Prof. Dr. Rıdvan SAY’a,

Çalıştığım konu ile ilgilenmeye başladığım ilk andan itibaren bütün bilgi ve deneyimlerini paylaşmaktan çekinmeyen, akademik gelişimimdeki yerini kelimeler ile tarif edemeyeceğim, bugün olduğum yerde olmamı sağlayan en önemli kişilerden olan çok sevgili hocam Sayın Doç. Dr. Sibel Emir DİLTEMİZ’e,

Yükseköğrenim hayatımın başladığı ilk günden beri beni yönlendiren ve laboratuvar çalışmalarımda desteğini hiçbir zaman eksik etmeyen çok sevgili hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Özlem ÜNLÜER’e,

Akademik gelişimimde benim için çok önemli bir yer kaplayan staj çalışmalarımda beni yönlendiren, yalnızca danışman olarak değil aynı zamanda bir arkadaş gibi desteklerini her zaman hissettiğim çok sevgili dostlarım Dr. Dafydd O. Visscher ve Dr. Ludo van Haasterecht’e,

Laboratuvara ilk adımımı attığım andan itibaren her konuda desteğini hissettiğim, gerek akademik gerekse de okul dışındaki hayatımda her zaman önemli bir yeri olan çok sevgili dostum Semra Özgün GÜNAY KÖSE’ye,

Laboratuvar çalışmalarımda bana yardımcı olan sevgili dostlarım Çiçek KIR ve Kardelen ECEVİT’e,

Hem maddi hem manevi anlamda beni her zaman destekleyen ve motive eden, başta sevgili annem Figen SİPAHİ, sevgili babam Mehmet SÜMBELLİ ve sevgili kardeşim Umay SÜMBELLİ olmak üzere sevgili dayım Gökhan SİPAHİ’ye

Ve burada adını saymadığım fakat hayatımın her anında benimle olan herkese,

En içten dileklerimle teşekkür ederim.

Yiğitcan SÜMBELLİ

Aralık 2018

....../....../20....

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmamın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

.....
Yiğitcan Sümbelli

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Yenilenebilir Tıp	3
1.1.1. Güncel ve yaygın klinik uygulamaları	7
1.2. Doku ve Organ Mühendisliği	9
1.2.1. Tarihi	11
1.2.2. Karşılaşılan sorunlar ve gelecek hedefleri	12
1.2.3. 2 boyutlu (2B) ve 3 boyutlu (3B) hücre kültürü	14
1.2.4. Biyofabrikasyon	17
1.2.4.1. 3B biyoyazıcı teknolojisi	18
1.2.5. 3B biyoyazıcı uygulamalarında biyomürekkep seçimi	19
1.2.5.1. Biyolojik polimerler	20
1.2.5.2. Sentetik polimerler	23
1.2.5.3. Polimerik karışımlar	24
1.3. Sinir Dokusu Mühendisliği	25

1.3.1. Sinir sistemi ve hasarları	25
1.3.2. ÇSS mühendisliği	27
1.3.3. MSS mühendisliği	29
2. MATERYAL ve YÖNTEM	30
2.1. Materyal	30
2.2. Hücre Çoğaltılması ve 3B Hücre Kültürü	31
2.3. Selüloz Nano-Kristallerin (CNC) Hazırlanması ve Karakterizasyonu	31
2.3.1. CNC hazırlanması	31
2.3.2. CNC karakterizasyonu	32
2.3.2.1. <i>Fourier dönüşümlü kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi</i>	32
2.3.2.2. <i>Taramalı elektron mikroskobu (SEM)</i>	32
2.3.2.3. <i>X-ışınları kırınım (XRD) yöntemi</i>	32
2.3.2.4. <i>Termogravimetrik analiz (TGA)</i>	32
2.3.2.5. <i>İletkenlik</i>	33
2.4. 3B Biyobasım	33
2.4.1. Biyomalzeme hazırlanması	33
2.4.2. Biyomalzeme karakterizasyonu	33
2.4.2.1. <i>Basılabilirlik ve biyouyumluluk</i>	34
2.4.3. Nöronal yenilenmeye yardımcı kılıf ve yama üretimi ve karakterizasyonu	34
2.4.3.1. <i>Nöronal yenilenmeye yardımcı kılıf ve yama üretimi</i>	34
2.4.3.2. <i>Nöronal yenilenmeye yardımcı kılıf ve yama karakterizasyonu</i>	35
3. SONUÇLAR	36
3.1. CNC Karakterizasyonu	36

3.1.1. Fourier dönüşümlü kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi	36
3.1.2. Taramalı elektron mikroskobu (SEM)	37
3.1.3. X-ışını kırınım (XRD) yöntemi	37
3.1.4. Termogravimetrik analiz (TGA)	38
3.1.5. İletkenlik	38
3.2. 3B Biyobasım	39
3.2.1. Biyomalzeme karakterizasyonu	39
3.2.1.1. <i>Basılabilirlik ve biyouyumluluk</i>	39
3.2.2. Nöronal yenilenmeye yardımcı kılıf ve yama üretimi ve karakterizasyonu	41
4. TARTIŞMA	43
KAYNAKÇA	46
ÖZGEÇMİŞ	

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1.1. 2018 yılı Kasım ayı itibariyle Türkiye'de organ nakli bekleyen hasta sayıları ve ihtiyaç duyulan organ türü	7
Tablo 1.2. 2018 yılı Kasım ayı itibariyle Türkiye'de bağışlanan organ sayısı ve bağışlanan organ türü	7
Tablo 1.3. 2B hücre kültürü ile 3B hücre kültürü arasındaki hücresel özellik düzeyinde farklılıklar	15
Tablo 1.4. 3B biyoyazıcı uygulamalarında biyomalzeme olarak yaygın şekilde kullanılan biyolojik polimerler ve işlevleri	20
Tablo 1.5. 3B biyoyazıcı uygulamalarında biyomalzeme olarak kullanılan sentetik polimerler ve uygulama alanları	24
Tablo 1.6. Nörodejeneratif hastalıklar ve hasar gören hücre toplulukları ...	26
Tablo 3.1. Hücre çoğaltılması ve sayımı sonuçları	40
Tablo 3.2. Biyouyumluluk testi sonuçları	40

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1. Michelangelo “Adem'in yaratılışı”	3
Şekil 1.2. Klonlanmış koyun Dolly (solda) ve kaynak hücrelerin alındığı anne (sağda)	4
Şekil 1.3. İndüklenmiş pluripotent kök hücrelerin elde edilişi ve kullanımı şeması	5
Şekil 1.4. Hasarlı dokuda yenilenme ve tamir mekanizması (a) hasarlı epidermis, (b) yenilenmiş epidermis, (c) hasarlı dermis, (d) tamir edilmiş dermis	6
Şekil 1.5. Kopan kertenkele kuyruğunun zamanla yenilenmesi	6
Şekil 1.6. Doku ve organ mühendisliğinin bağlı olduğu çalışma alanları	9
Şekil 1.7. Doku ve organ mühendisliği akış şeması	10
Şekil 1.8. Tarihsel süreçte doku ve organ mühendisliği uygulamaları; (A) Vacanti Mouse, (B) yapay mesane, (C) kalp kapakçığı ve (D) hiperelastik kemik	12
Şekil 1.9. 2B ve 3B hücre kültürü yöntemleri (A) 2B hücre kültürü, (B) 3B biyomateryal üzerine ekili hücre kültürü, (C) 3B biyomateryal içine gömülü hücre kültürü ve (D) hücre kültürü ortamı içinde süspanse halde 3B hücre kültürü	15
Şekil 1.10. Farklı doku iskeleleri (A) Hexagonal poröz, (B) femur şekilli ve (C) kare gözenekli	16
Şekil 1.11. Farklı doku iskelesi üretim teknikleri	17
Şekil 1.12. 3 boyutlu biyoyazıcı teknolojileri	18
Şekil 1.13. Jelatinin kimyasal yapısı	21

Şekil 1.14. Selülozun kimyasal yapısı	22
Şekil 1.15. Doğada bir arada bulunan selüloz, hemiselüloz ve lignin ve selülozun kristalik yapısı	22
Şekil 1.16. Farklı karragenan yapıları	23
Şekil 1.17. Cajal'in sinir hücresi çizimlerinden bir örnek	25
Şekil 1.18. (A) Nöron anatomisi ve (B) sinir anatomisi	26
Şekil 1.19. ÇSS mühendisliğinde (A) nöronal yenilenmeye yardımcı kılıf kullanımında akson yenilenme mekanizması ve (B) rat siyatik siniri üzerinde in vitro kılıf kullanımı	28
Şekil 2.1. Nöronal yenilenmeye yardımcı kılıf tasarımı (A) yan görünüm, (B) iç görünüm ve (C) dik görünüm	35
Şekil 3.1. Sentezlenen CNC FTIR spektrumu	36
Şekil 3.2. CNC yapıların SEM mikrografı	37
Şekil 3.3. Selüloz nano-kristallerin x-ışını kırınım (XRD) analizi sonuçları ...	37
Şekil 3.4. CNC TGA eğrisi	38
Şekil 3.5. İletkenlik ölçümü sonuçları	38
Şekil 3.6. Jelatin-Karraeenan biyoink (A) (w/w) 7:3 jelatin:karragenan 20°C 25G iğne ucu, (B) (w/w) 7:3 jelatin:karragenan 26°C 25G iğne ucu, (C) (w/w) 8:2 jelatin:karragenan 20°C 25G iğne ucu, (D) (w/w) 8:2 jelatin:karragenan 26°C 25G iğne ucu ve (E) (w/w) 8:2 jelatin:karragenan 26°C 22G iğne ucu, (F)) (w/w) 8:2 jelatin:karragenan 26°C 22G iğne ucu (büyütülmüş) değerleri ile basılmış doku iskeleleri	39
Şekil 3.7. Hücre kültürü ortamında çoğaltılan hücre canlılığı ve sayımı	40
Şekil 3.8. Hücre sayısına göre kalibrasyon grafiği	40

Şekil 3.9. Biyouyumluluk testi ile görüntülenen doku iskelesi üzerinde üremeyi sürdüren hücreler	41
Şekil 3.10. Üretilen 3B yapıların CAD ile uyumu	41
Şekil 3.11. Üretilen 3B kılıflar	42
Şekil 3.12. 3B kılıfların SEM mikrografları	42
Şekil 3.13. Biyobozunum testi	43



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

2B	: 2 Boyutlu
3B	: 3 Boyutlu
CAD	: Bilgisayar Destekli Tasarım (Computer Aided Design)
CNC	: Selüloz nano-kristal (Cellulose Nano-Crystal)
ÇSS	: Çevresel Sinir Sistemi
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
FBS	: Fetal Bovin Serum
FT-IR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (Fourier Transformed Infrared)
MTT	: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscope)
TGA	: Termogravimetrik Analiz (Thermogravimetric Analysis)
XRD	: X-Işını Kırınım (X-Ray Diffraction)

1 GİRİŞ

*“Look there’s a gleam! – Now hope may be fulfilled,
That hundreds of ingredients, mixed, distilled –
And mixing is the secret – give us power
The stuff of human nature to compound
If in a limbeck we now seal it round
And cohobate with final care profound,
The finished work may crown this silent hour
It works! The substance stirs is turning clearer!
The truth of my conviction passes nearer
The thing in Nature as high mystery prized,
This has our science probed beyond a doubt
What Nature by slow process organized,
That have we grasped, and crystallized it out.” [1]*

Doku ve organ mühendisliği 19. yy. sonlarından itibaren yaşanan teknolojik gelişmelerle beraber yenilenebilir tıp uygulamalarında önemli bir yere sahip olmuştur. Önceki zamanlarda kullanılan yenilenebilir tıp uygulamalarında karşılaşılan sorunlar, yeni teknolojilerin getirilerinden faydalanan yeni uygulamalar sayesinde aşılmaya başlanmıştır [2].

Doku ve organ mühendisliği araştırmalarında yaygın bir şekilde kullanılan elektrospinning ve litografi temelli uygulamaların hücre içeren biyomürekkepler ile kullanımında yaşanan sorunlara alternatif bir çözüm getiren yeni uygulamalardan birisi de 3 boyutlu (3B) biyoyazıcı teknolojisidir. Çeşitli farklı çalışma prensibine sahip farklı 3B biyoyazıcılar, yüksek hassasiyette 3B yapı üretebilme, yüksek çeşitlilikte biyomürekkep seçeneği ve neredeyse her denemede birbirinin aynı yapıların elde edilebilmesi gibi avantajlar sayesinde doku ve organ mühendisliği uygulamalarında kendisine önemli bir yer edinmiştir [3,4].

3B biyoyazıcı teknolojisinde sıklıkla kullanılan biyomürekkep malzemelerinin başında hidrojeller gelmektedir. Hidrojeller, yüksek porözite özelliklerinden dolayı yüksek su tutma kapasiteleri, kolay ve hızlı bir şekilde üretilibilmeleri, kullanılan biyomalzemeye bağlı olarak yüksek biyoyuymululuk ve sahip oldukları fizikokimyasal

özellikleri sayesinde 3B biyoyazıcılar ile basılabilirlik özelliklerinin ideale yakın olması sebebiyle en yaygın şekilde kullanılan biyomürekkep malzemesidir [5,6].

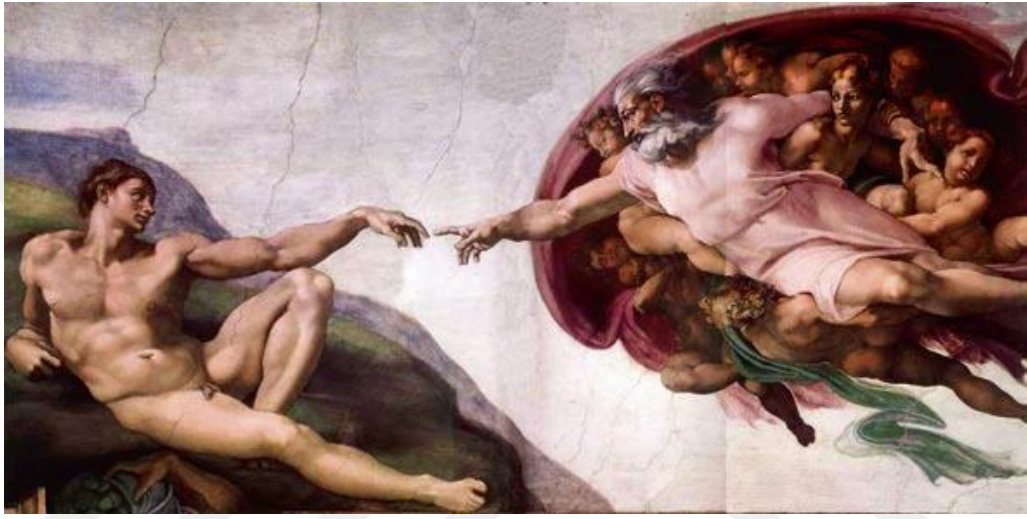
Biyomalzeme olarak kullanılan hidrojellerin üretiminde kullanılan polimerik yapılar, doğal ve sentetik polimerler olarak iki ana gruba ayrılabilir [7]. Bu tez kapsamında yapılan çalışmalarda yüksek biyouyumluluk ve hücre tutunmasını sağlayıcı özelliklerinden dolayı jelatin, elektriksel iletkenliğinin yanında hazırlanan biyomalzemeye basılabilirlik ve yapısal mukavemet özelliği kazandıran karragenan ve sülfat grubu modifikasyonuyla birlikte yüksek seviyede elektriksel iletkenlik özelliği kazanan ve aynı zamanda fizyolojik koşullarda uzun süre bozunmadan yapısını koruyabilen selüloz nano-kristaller kullanılmıştır.

3B biyoyazıcıların doku ve organ mühendisliği uygulamalarında kullanılması ile birlikte, araştırma konusu olan doku çeşitliliği de artmıştır. Günümüzde kıkırdak dokusu, kemik dokusu ve kas dokusu yaygın şekilde üzerinde araştırma yapılan doku çeşitleridir. Bunların yanı sıra sinir dokusunda karşılaşılan hasarın neredeyse tüm vakalarda geri dönüşümü olmayan sonuçlarının olması sebebiyle sinir dokusu mühendisliği, günümüzde olduğu kadar gelecekte de yenilenebilir tıp uygulamalarının odak noktalarından birisi olacaktır [8–10]. Bu sebeple bu tez kapsamında yapılan çalışmalar, sinir dokusu mühendisliği üzerine gerçekleştirilmiştir.

Hazırlanan jelatin – karragenan – selüloz nano-kristal biyomalzeme karışımı, sinir dokusu hasarının onarılmasına yardımcı olacak yapıda bir kılıf şeklinde 3B şekilde basılmıştır. Üretilen kılıf, sahip olduğu yenilikçi yapısal özellikleri sebebiyle sinir dokusu mühendisliği uygulamalarına yeni bir bakış açısı getirmektedir. Bunun yanı sıra kullanılan selüloz bazlı biyomalzeme, hücre içeren biyomürekkep malzemesi olarak kullanılabilme potansiyeli taşımaktadır. Selülozun fizyolojik koşullarda uzun süre bozunmadan yapısal özelliklerini koruyabilmesi sebebiyle sinirsel hasarın uzun süre sonunda giderilebilmesine olanak sağlayan bir biyomürekkep malzemesi geliştirilmiştir.

1.1 Yenilenebilir Tıp

Canlılığı baştan yaratma olgusu ve yenilenebilir tıp insanlık var olduğundan beri yazılı edebiyat ve bilimsel araştırmaların odak noktalarından ikisi olmuştur. Yunan mitolojisinde Prometheus ve insanın yaratılışı mitinden başlayarak 3. yy. tablolarında bile görülebilecek şekilde, özellikle Rönesans dönemi eserlerinde yoğunlaşarak her dönemde ve toplumda *yaratılış ve yeniden doğuş* temaları işlenmiştir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Michelangelo “Adem'in yaratılışı”, 2,8 m x 5,7 m, Boya alçı, 1511, Sistine Şapeli, Vatikan

Bilim insanları ise protez uygulamaları başlangıcıyla birlikte 16. yy’ dan itibaren hız kazanarak, özellikle 18. yy' da yoğun bir şekilde organ ve doku nakilleri denemiş, 20. yy başlarına kadar oldukça fazla sayıda deneme yapmışlardır [11]. Modern tıbbın gelişmesi ile birlikte geçmişte temelleri atılmış olan çalışmalar *yenilenebilir tıp ve doku mühendisliği* adı altında birleşmiş ve etik kurallar çerçevesinde ilerlemeye başlamıştır. Özellikle 2. Dünya Savaşı sonrasında “Guinea Pigs” de denilen 649 gazi üzerinde yaptığı çalışmalar ile Sir Archibald McIndoe, yenilenebilir tıp ve doku mühendisliği çalışmalarında cerrahi anlamda yeni bir kapı açmıştır [2,12]. Sözü edilmesi gereken bir diğer uygulama da 1955 yılında gerçekleştirilen böbrek nakli ameliyatıdır [13]. Bu nakil, günümüzdeki gibi verimli bir bağışıklık sistemi baskılayıcı teknolojinin olmaması, organ reddinin takibinin ve kontrolünün yapılamaması gibi sebeplerden dolayı taşıdığı potansiyel etkiyi gösterememiştir [14].

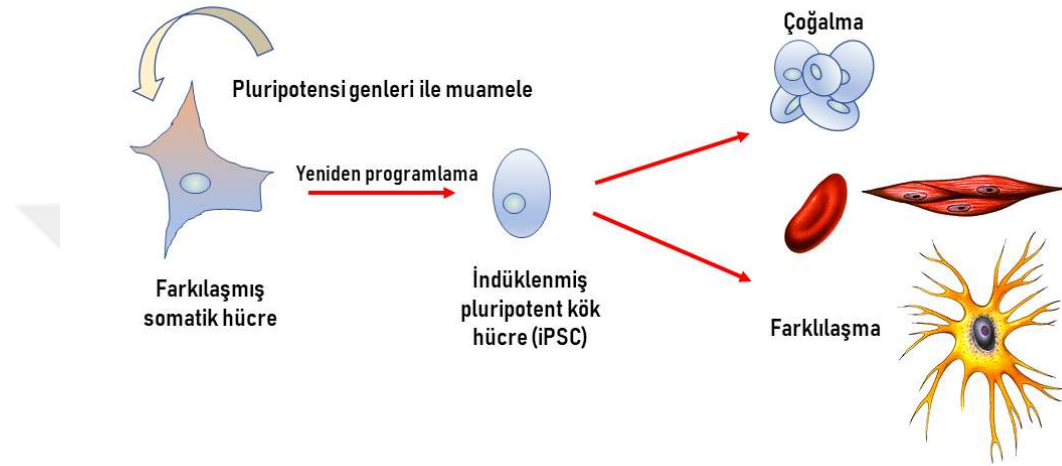
Yenilenebilir tıp ve doku mühendisliği araştırmalarının odağı, yeni teknikler keşfedildikçe doku nakli anlayışını terk etmeye başlamış ve canlı organizmaların oluşumu evresinde en önemli rolü üstlenen kök hücreler üzerine yoğunlaşmıştır [15]. Bu araştırmaların modern dönem içerisinde öncülü sayılabilecek en bilindik örneklerinden birisi 1997 yılında Ian Wilmut ve arkadaşlarının çalışmalarının sonucu olan klonlanmış koyun Dolly'dir (Şekil 1.2) [16].



Şekil 1.2. Klonlanmış koyun Dolly (solda) ve kaynak hücrelerin alındığı anne (sağda) [16]

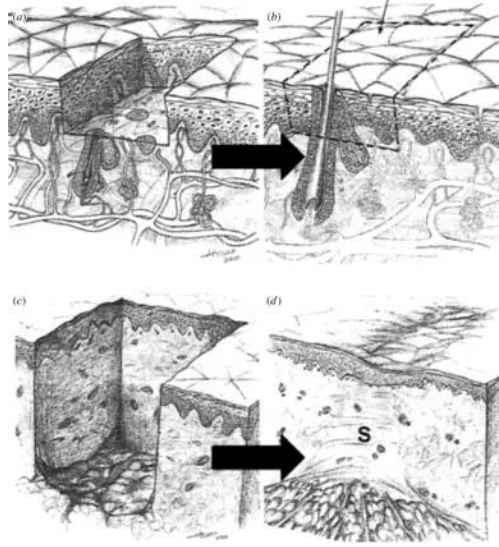
Bu çalışma kök hücre çalışmaları için bir ilk niteliğinde olmasıyla birlikte beraberinde “insanların klonlanarak yeni diktatörler yaratılması” gibi art niyetli yorumları da getirmesi sebebiyle oldukça uzun bir süre gündemde kalmıştır. Dolly'nin klonlanmasından yalnızca 1 yıl sonra ise Japon araştırmacılar 8 adet inek yavrusu klonladıklarını duyurmuş [17] ve kamuoyu, bu araştırmaların “artan insan nüfusunun yaratacağı aşırı gıda ihtiyacı gibi problemlerin önüne geçebilmek için kullanılabileceği” yorumunu paylaşarak bu alanda çalışmayan kişilerin olumsuz bakış açısını değiştirmeye çalışmıştır [18]. Koyun Dolly ve açtığı yolda getirilen “kök hücre araştırmaları modern dünyanın simya çalışmalarıdır” [19] tanımlaması, çalışmanın kendisinden sonra yapılacak kök hücre araştırmalarının önünü açması sebebiyle yenilenebilir tıp alanında oldukça önemli bir yere sahiptir.

Kök hücre araştırmalarının modern dönemde yarattığı etki bakımından en bilindik örneklerden bir diğeri ise Shinya Yamanaka'nın 2012 yılında kendisine Nobel Fizyoloji veya Tıp ödülü kazandıran çalışmasıdır. Yamanaka bu çalışmada farklılaşmış deri hücrelerinden kök hücre elde etmeyi başararak (Şekil 1.3) bu alandaki en büyük sorunlardan birisi olan kök hücrelerin elde edildiği kaynak / kök hücrenin elde edilmesi ve etik kurallar konusuna yeni bir bakış açısı getirmiştir [20].



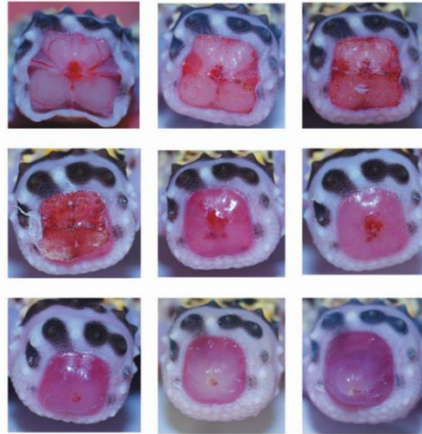
Şekil 1.3. İndüklenmiş pluripotent kök hücrelerin elde edilişi ve kullanımı şeması

Modern dönem öncesi simya çalışmalarından başlayarak günümüze kadar ulaşan yenilenebilir tıp ve doku mühendisliği çalışmalarının temelinde yatan olgu, canlılığın devamlılığıdır. Yeryüzünde canlılığın devamlılığı, organizmanın dokuları tamir ve yenileyebilme mekanizmaları ile doğrudan ilgilidir. Hasar almış bir dokunun, hasarlı bölgenin kenarları arasında oluşturulan yara dokusu sayesinde devamlılığının sağlanması *tamir mekanizması* tarafından sağlanırken hasar sebebiyle kaybedilen dokunun yara dokusu oluşmadan tekrar sentezlenmesi *yenilenme mekanizması* sayesinde gerçekleşmektedir. Yenilenme mekanizması dokunun normal işlev ve yapısını tekrar oluştururken tamir mekanizmasında bu görülmez [21,22]. Yenilenmiş doku, morfolojik özelliklerini hasardan önceki gibi geri kazanabilirken (Şekil 1.4 a-b) tamir edilmiş dokuda bölgesel bir yara izi oluşmaktadır (Şekil 1.4 c-d).



Şekil 1.4. Hasarlı dokuda yenilenme ve tamir mekanizması (a) hasarlı epidermis, (b) yenilenmiş epidermis, (c) hasarlı dermis, (d) tamir edilmiş dermis [23]

Kertenkelelerin kopan kuyruklarını eskisi ile aynı yapısal özellikleri taşıyacak şekilde yenilemeleri, dokulardaki yenilenme mekanizmasının bir başka örneğidir (Şekil 1.5) [24] .



Şekil 1.5. Kopan kertenkele kuyruğunun zamanla yenilenmesi [24]

Pek çok organ, 3 temel doku türünden oluşmaktadır. Bunlar *epitel doku*, *bazal membran* ve *stroma*dır. Epitel dokular yalnızca hücre içermektedirken, bazal membran hücre dışı ortam, stroma ise çeşitli hücreleri, bağ dokuyu ve dolaşımdaki kanı içermektedir. Bu 3 doku grubu *doku üçlüsü* (*tissue triad*) şeklinde isimlendirilmektedir. Epitel doku gibi bazı doku türlerinde yenilenme kendiliğinden gelişebilir. Bunun dışında yenilenme, dışarıdan yapılan bir müdahale sayesinde de gerçekleşebilir. *İndüklenmiş yenilenme* adı verilen bu olay genellikle hasarlı bölgeye uygun hücre, hücre dışı ortam, sitokinler veya benzeri biyolojik unsurların bileşiminin uygulanması ile sağlanır [21].

1.1.1 Güncel ve yaygın klinik uygulamaları

Günümüzde klinik anlamda yenilenebilir tıp ve doku mühendisliği uygulamaları 2 ana başlık altında toplanabilir. Bunlar organ ve doku nakli ve protez kullanımıdır.

Organ ve doku nakli

Yenilenebilir tıp uygulamalarının önem kazanmasının en önemli sebeplerinden birisi olarak organ yetmezliği ve yarattığı sorunların önüne geçilebilmesi amacı sayılabilir. Bu hedef doğrultusunda Bölüm 1.1’de adı geçen Sir Archibald McIndoe gibi pek çok cerrah ve bilim insanı bu alanda denemeler yapmış ve günümüz teknolojisinin gelişmesine önemli katkılarda bulunmuştur. Pek çok nakil uygulaması tamir mekanizmasının veya indüklenmiş yenilenme mekanizmasının harekete geçirilmesi temelinde çalışır. Ülkemiz organ veya doku nakli bekleyen hasta sayısı istatistiklerine göre 2018 yılında Kasım ayı itibariyle toplam 25836 kişi nakil sırasında bulunmaktadır (Tablo 1.1) [25]. Buna karşılık aynı tarih itibariyle canlı ve kadaverik bağışçılar tarafından bağışlanan organ veya doku sayısı toplamı 4602’dir (Tablo 1.2) [26]. Nakil ihtiyacı duyulan her organın ve dokunun bulunamaması sorunu bir yana, bekleyen hasta sayısının bağışlanan organ ve doku sayısına göre yaklaşık 6 kat fazla olması sorunun büyüklüğü hakkında önemli bir veridir.

Tablo 1.1. 2018 yılı Kasım ayı itibariyle Türkiye’de organ nakli bekleyen hasta sayıları ve ihtiyaç duyulan organ türü [25]

Akciğer	Böbrek	Böbrek Pankreas	Bacak veya Kol	İnce Barsak	Kalp	Kalp Kapakçığı	Karaciğer	Pankreas	Yüz ve Saçlı Deri	Toplam
63	22357	10	74	5	1072	4	2145	284	1	25836

Tablo 1.2. 2018 yılı Kasım ayı itibariyle Türkiye’de bağışlanan organ sayısı ve bağışlanan organ türü [26]

2018	Akciğer	Böbrek	Kalp	Karaciğer	Pankreas	Toplam
Canlı	-	2491	-	948	-	3439
Kadaverik	37	695	72	1304	3	1163

Nakil uygulaması organın veya dokunun kaynağına göre 3 grup altında incelenebilir; nakil yapılacak kişinin vücudunun farklı bir bölgesinden alınan organın veya dokunun kullanımı (*autograft*), farklı bir kişiden alınan organın veya dokunun kullanımı (*allograft*) ve hayvan organı veya dokusu kullanımı (*xenograft*).

Autograft uygulaması immün sistem tepkisi oluşturmaması (organ reddi) ve istatistiksel olarak en başarılı sonuçların alınması sebebiyle nakil işlemlerinde tercih sebebidir. Fakat her doku ve organın autograft uygulamaya uygun olmaması ve yüksek cerrahi maliyetler gibi sebeplerden dolayı her zaman uygulanamamaktadır. Deri ve kemik nakli bu uygulama için verilebilecek en yaygın örneklerdir.

Allograft uygulaması alıcı – donör arasındaki biyolojik uyuma göre doku ve organ bağışlanması ve nakli olarak tanımlanabilir. Bu yöntem organ reddine karşı oluşturulan immün tepkiyi baskılayan ilaçların kullanımının yardımıyla tercih edilebilir görölse de yöntemin en önemli sorunu bağışlanan organ ve doku sayısının Tablo 1.2’de de görülebileceği gibi, yetersiz olmasıdır. Bu uygulama için kalp, kornea, karaciğer nakli gibi örnekler gösterilebilir.

Xenograft uygulaması ise immün tepki ile karşılaşılma riski en yüksek olan yöntemdir. Bu yöntemde bir hayvan donörden alınan doku veya organlar kullanılmaktadır. Hayvanların klinik kullanımındaki etik kurallar yöntemin sık sık tercih edilmesinin önüne geçmektedir. Buna rağmen DNA biliminin gelişmesinin de yardımıyla organları insanlara nakledilmeye uygun hayvanların üretilmesi gelecekte daha olası görünmektedir. Bazı dinsel inançların bu uygulamaya karşı çıkıyor olması da yöntemin önündeki engellerden birisidir.

Protez ve tıbbi cihazlar

Herhangi bir tamir veya yenilenme mekanizması ile hasarın giderilemediği durumlarda hastanın yaşam kalitesinin yükseltilebilmesi amacıyla protez veya tıbbi cihaz uygulamaları kullanılmaktadır. Protez veya tıbbi cihazlar kişinin hayati fonksiyonlarını sürdürebilmesi amacıyla kalıcı veya geçici olarak, eksikliği hissedilen organın veya dokunun işlevinin yerine getirildiği uygulamalardır. Kalça implantları, koklear implant, diş implantları, diyaliz cihazı veya yapay kalp kapakçıkları kullanılan yaygın örneklerdendir [4,21,27].

1.2 Doku ve Organ Mühendisliği

Bir çok hücreli canlı organizmada aynı işleve yönelik özelleşmiş ve çoğalmış hücre topluluklarının oluşturduğu yapıya *doku* adı verilmektedir. Dokular yalnızca hücrelerden oluşabileceği gibi hücreler ve hücre dışı ortamdan da oluşabilir. Bu şekilde oluşmuş dokuların bir araya gelmesi ile de *organ* adı verilen özelleşmiş yapılar meydana gelmektedir [21]. Bu tanım çerçevesinde yenilenebilir tıp alanında yaşanan sorunların çözülebilmesi amacıyla *doku ve organ mühendisliği* adı verilen yeni bir disiplinler arası çalışma alanı oluşmuştur. Bu alan, kimya, biyoloji, fizik ve tıp temeline oturtulmuş mühendislik uygulamaları ile ilerlemekte ve gelişmektedir (Şekil 1.6). Hücre – materyal etkileşimini temel alarak yapılan *in vivo* veya *in vitro* çalışmalar neticesinde yenilenebilir tıp uygulamaları farklı bir bakış açısı kazanmış olup gelecekte, günümüzde yaşanan pek çok sorunu ortadan kaldırmayı hedeflemektedir [28].



Şekil 1.6. Doku ve organ mühendisliğinin bağlı olduğu çalışma alanları

Doku ve organ mühendisliği uygulamalarının çalışma prensibi Şekil 1.7’de gösterildiği gibi özetlenebilir.



Şekil 1.7. Doku ve organ mühendisliği akış şeması

Belirli bir kaynaktan toplanan hücreler uygun kültür ortamında çoğaltılır. Çeşitli uyarıcı faktörlere maruz bırakılarak farklılaşan ve buna bağlı olarak hücre dışı ortam üreten hücreler kültür ortamında belirli bir süre sonra hedeflenen dokunun oluşmasını sağlar. Daha sonra kültür ortamından alınan doku, uygun bölgeye nakledilir. Bu sayede nakil yapılan hasarlı bölgede indüklenmiş yenilenme mekanizması çalışarak *in vitro* üretilen doku, *in vivo* gelişimine devam ederek bulunduğu ortam ile bütünleşir. Bu tekniğin en önemli avantajı, organ naklinde görülen ve Bölüm 1.1.1’de bahsedilen organ reddi riskinin ortadan kaldırılabilmesidir. Dokuya kaynak olan hücreler, nakil yapılacak kişinin kendisinden toplandığı için nakil sonrasında vücut, eklenen parçayı yabancı bir madde olarak görmeyecek ve bağışıklık sistemi devreye girmeyecektir. Tüm bu süreç boyunca uygulanan işlemler 3 ana grup altında toplanabilir. Bunlar;

➤ **Malzeme bilimi**

Bölüm 1.2.3’te anlatılacak olan 3 boyutlu (3B) hücre kültürü ortamı için hedeflenen dokuya uygun malzemelerin seçilmesi ve birden fazla malzeme var ise uygun karıştırma oranlarının belirlenmesi; devamında uygun çapraz bağlayıcı ajanları kullanılarak uygun çapraz bağlanma oranının bulunması; 3B şekilde basılan nesnenin mekanik testlerinin yapılması

➤ **Biyoloji**

Hedeflenen dokuya yönelik hücrelerin kaynaktan toplanması ve çoğaltılması; devamında çoğalan hücrelerin 3B kültür ortamına alınması ve gerekli uyarıcı faktörlerin eklenmesi ile hedeflenen dokunun oluşturulması.

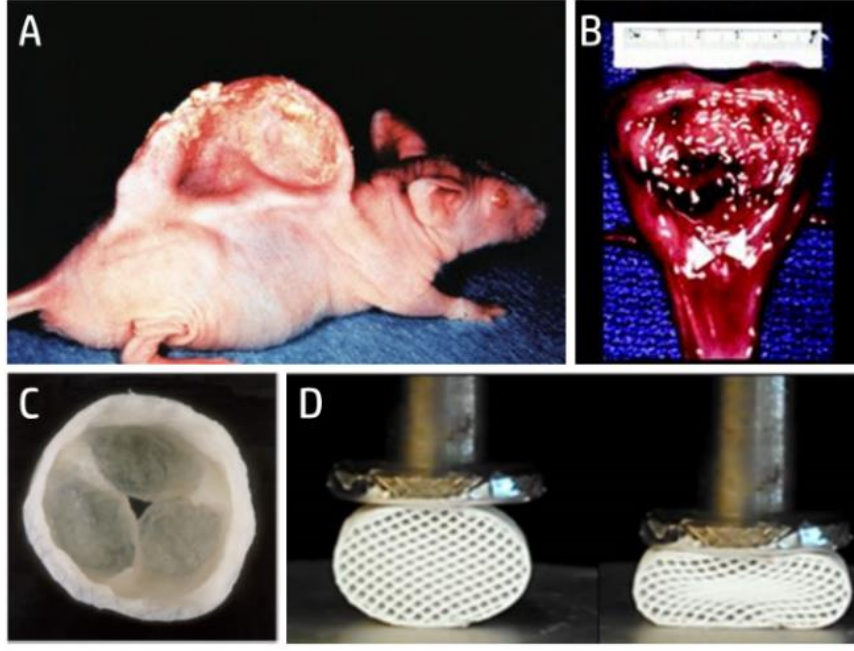
➤ **Biyokimya**

Uygun kültür süresi sonunda elde edilen dokuların toplanması ve histolojik ve biyokimyasal analizlerin yapılması [9].

1.2.1 Tarihi

İlk olarak 1980’li yılların ortalarında kullanılmaya başlanan *doku mühendisliği* tabiri o zamanlarda ameliyat esnasında doku ve organların manipülasyonunu tarif etmekteydi [4]. 1987 yılında yapılan tanıma göre doku mühendisliği “Mühendislik ve doğa bilimlerinin uygulama ve temellerini, normal ve patolojik memeli dokuları arasındaki ilişkinin anlaşılması ve işlevin yeniden kazanılması veya geliştirilmesine yönelik biyolojik ürünlerin geliştirilmesi” şeklinde tanımlanmıştır [10,28]. Yenilenebilir tıp uygulamalarının bir alt sınıfı sayılabilecek alanın tarihi için çoğu kaynak, yenilenebilir tıp çalışmalarının geçmişi ile paralel bir gelişme göstermektedir. Fakat yenilenebilir tıp gelişmelerinin tarihinden farklı olarak doku mühendisliğinin kökeni 1970’li yıllarda Dr. Green’in kondrositleri kıkırdak üretmeleri için manipüle etmesiyle başlatılabilir [29]. Dr. Green çalışmalarında başarısız olmuş olsa bile birkaç yıl sonra Dr. Yannas ve Dr. Burke’nin [30] keratinosit ve fibroblast kullanarak kültür ortamında deri üretmeyi başarmaları ve bu üretilen dokunun yanık hastaları üzerinde kullanılması, doku mühendisliği için dönüm noktası olmuştur.

1993 yılında Robert Langer ve Joseph Vacanti’nin yazmış olduğu “Tissue Engineering” adlı makale ise bu alanın doğumunun resmi bir belgesi niteliğindedir [31]. Bu tarihten itibaren hızlı bir gelişim gösteren alan, kısa bir geçmişe sahip olmasına rağmen oldukça önemli yeniliklerin açığa çıkmasına sebep olmuştur. *Vacanti Mouse* adıyla bilinen kobay ve sırtına dikili insan kulağı görseli ile tanınan çalışma uzun bir süre gündemde kalmayı başarmıştır (Şekil 1.8 A) [32]. 1999 yılında Dr. Atala’nın ürettiği yapay mesaneyi başarılı bir şekilde hastaya nakletmesi ve tarih itibariyle hastanın hala sağlıklı bir şekilde hayatına devam ediyor olması, doku ve organ mühendisliğinin önemli ilk uygulamalarındandır (Şekil 1.8 B) [33]. 1 yıl sonra üretilen yapay kalp kapakçığı (Şekil 1.8 C) uygulaması ile doku ve organ mühendisliğinin klinik uygulamalarına önemli bir örnek eklenmiştir [34]. 2016 yılında yayınlanan hiperelastik kemik çalışması (Şekil 1.8 D) [35] ile yalnızca 20 yıl gibi bir sürede teknolojinin varabileceği nokta gözler önüne serilmiş olup alan araştırmacılar için bir cazibe merkezi konumunda olma özelliği sürdürmektedir.



Şekil 1.8. Tarihsel süreçte doku ve organ mühendisliği uygulamaları; (A) Vacanti Mouse [32], (B) yapay mesane [33], (C) kalp kapakçığı [34] ve (D) hiperelastik kemik [35]

1.2.2 Karşılaşılan sorunlar ve gelecek hedefleri

Doku ve organ mühendisliği görece kısa bir geçmişe sahip olmasına rağmen her bilimsel çalışmada olduğu gibi yaşanan her gelişme, peşinde yeni tartışmalar getirmektedir. Bu tartışmaların bir kısmı bazı dayanaksız ve çeşitli inançlara fazla bağımlı kimseler tarafından karalama kampanyaları çerçevesinde oluşturulmuş olsa da bilimsel dayanağı olan eleştirilerin büyük bir kısmı etik sorunlar sınırları içerisinde birleşmektedir. Kök hücre çalışmalarının ortaya çıktığı ilk anlardan itibaren özellikle kök hücrelerin elde edilme yöntemleri ve kök hücre elde etmek için kullanılan kaynaklar hakkında yaşanan etik tartışmaları Bölüm 1.1’de sözü geçen araştırmacı Yamanaka’nın indüklenmiş pluripotent kök hücreleri keşfetmesinden sonra azalmıştır. Fakat farklı olarak, üretilen doku ve organların canlı organizma üzerinde denenmesi konusunda yaşanan etik tartışmalar hala güncelliğini korumaktadır. Alan, kendi içinde yaşanan bu tartışmalara yine kendi içinden bir çözüm getirmiş ve doku ve organ mühendisliğinin tarih itibarıyla en güncel çalışma konularından birisinin oluşmasına önayak olmuştur [36].

Şekil 1.6’da görüldüğü üzere disiplinler arası bir çalışma şeması içinde ilerleyen doku ve organ mühendisliğinde deneyimlenen sorunların büyük bir çoğunluğu farklı disiplinlerin bir arada çalışma özelliğinden dolayı ortaya çıkmaktadır. Her biri kendi içerisinde dahi henüz yanıtlanmamış sorular barındıran disiplinlerin bir araya gelerek yeni araştırmalar ortaya koyması, çözülmemiş sorunlarla doğan araştırmaları gerektirmektedir. Bunlar arasında en temel sorunlardan birisi hücre – biyomateryal etkileşiminin tam olarak bilinmiyor olmasıdır. Bu sebeple geliştirilen yeni biyomateryallerin hücre ile etkileşimi ve hücrelerin buna vereceği cevapların (farklılaşma, çoğalma gibi) sorgulanma aşaması bazı araştırmalarda belirsizliklere sebep olabilmektedir [37,38].

Konu organ mühendisliği ve organ üretimi noktasına geldiği zaman ise karşılaşılan en önemli sorun, üretilmesi hedeflenen yapıların karmaşıklığıdır. Bölüm 1.2’de bahsedildiği gibi organlar, farklı tipte dokuların bir araya gelmesiyle oluşmuş kompleks yapılardır. Günümüz teknolojisi tek tip dokuların üretimi aşamasında dahi yukarıda bahsedilen hücre – biyomateryal etkileşimi gibi belirsizliklerden ötürü sorun yaşıyorken birden fazla farklı dokunun yekpare bir yapı halinde üretilmesi aşaması çok daha büyük bir sorundur. En basit organlarda dahi damarlaşmanın kontrollü ve istenen şekilde sağlanması noktasında sorun yaşanıyor olması, “bütün halde üretilecek tam işlevsel bir organ” konusunu doku ve organ mühendisliğinin nihai hedeflerinden birisi haline getirmiştir [37].

Bu sebeplerden dolayı bölümün başında bahsedilen, alanın kendi içerisinde kendi sorunlarına getirdiği çözüm, model sistemlerin üretilmesi ve çalışmaların bu modeller üzerinde gerçekleştirilmesidir. Klinik anlamda kullanılabilecek doku ve organların henüz üretilmiyor olması sebebiyle istenen doku ve organla aynı işlevi gören daha basit model sistemler üretilmektedir [10,14,39].

1.2.3 2 boyutlu (2B) ve 3 boyutlu (3B) hücre kültürü

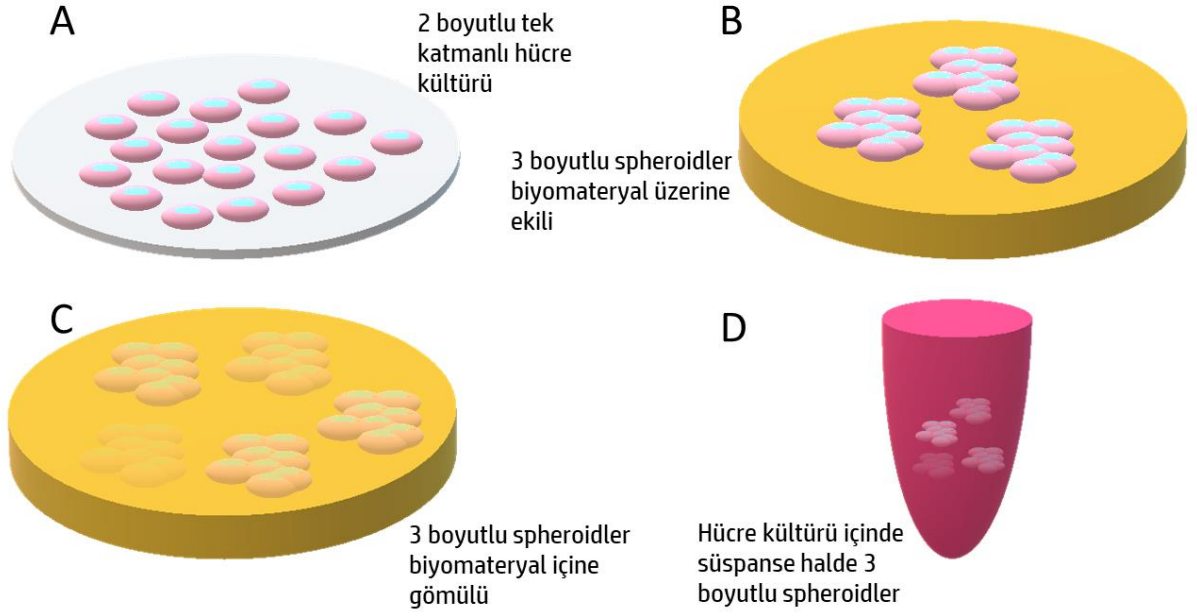
Hücre kültürü çalışmaları Harrison'ın ilk hücre kültürü çalışmasından [40] günümüze oldukça değişime uğramıştır. Çok da uzak olmayan bir geçmişe kadar yapılan çalışmalar 2B *in vitro* hücre kültürü başlığı altında toplanırken günümüzde 3B hücre kültürü çalışmaları yaygınlaşmaktadır (Şekil 1.9) [41].

Standartlaşmış 2B hücre kültürü çalışmalarında hücreler bir petri kabı veya kültür flaskı içerisinde tek katmanlı olarak, plastik veya cam zemine yapışmış halde çoğaltılırlar [42]. Bu yöntem uygulanma basitliği ve hücrelerin homojen bir ortam içerisinde bulunarak kontrol edilebilir bir şekilde manipüle edilebilmeleri sebebiyle araştırmacılar tarafından sık sık tercih edilmektedir [43,44].

Ucuz ve kolay uygulanabilir olması 2B hücre kültürünün en büyük avantajları olmasına karşılık ortamdaki hücrelerin, bütün bir dokunun özelliklerini tamamen karşılayamaz oluşu yöntemin en önemli dezavantajıdır. Ayrıca; yüksek sayıda tekrar ile kültürlenmiş hücrelerin gen ekspresyon mekanizmalarının bozulduğu ve biyokimyasal özelliklerinin değiştiği gözlemlenmiştir [45].

3B kültür yöntemlerinde ise hücreler kültür ortamı içinde süspansiyon halinde, bir biyomateryalin içinde veya üzerinde olacak şekilde farklı yöntemler ile kültürlenebilir (Şekil 1.9) [46]. 2B kültür yönteminde karşılaşılan, hücrelerin, hücre dışı ortam üretimi gibi *in vivo* doku özelliklerini tam olarak karşılayamaması sorunu, 3B kültür yöntemlerinde büyük ölçüde aşılmıştır. Yöntemin bu özelliğine rağmen farklı dokular arası etkileşim gibi organların tam işlevsel hale gelmesi için hayati önem taşıyan bazı özelliklerin birebir taklit edilemiyor oluşu, 3B kültür tekniklerinde karşılaşılan sorunlardan birisidir (Tablo 1.3) [47].

3B hücre kültüründe bir araya gelen hücre toplulukları, *spheroid* adı verilen yapıları oluşturur. Sferoidler bir hücre topluluğunun taşıdığı özellikleri gösterir ve hücrelerin bir arada tutunarak hayatta kalmalarına olanak sağlar. Geçmişte farklı anlamlarda kullanılsa bile günümüzdeki anlamıyla *organoid* adı verilen yapılar ise sferoidlerden farklı olarak, genellikle kök hücrelerden yola çıkarak oluşmuş, farklılaşmış hücrelerin oluşturduğu ve bir dokunun özelliklerini sferoidlere göre daha fazla taşıyan yapılardır. Buna rağmen organoidlerin olgun hücre fenotipi göstermemesi veya içlerinde kan akışının olmaması, doku ve organ mühendisliği uygulamalarında organoid kullanımında karşılaşılan sorunlardandır [44,48,49].



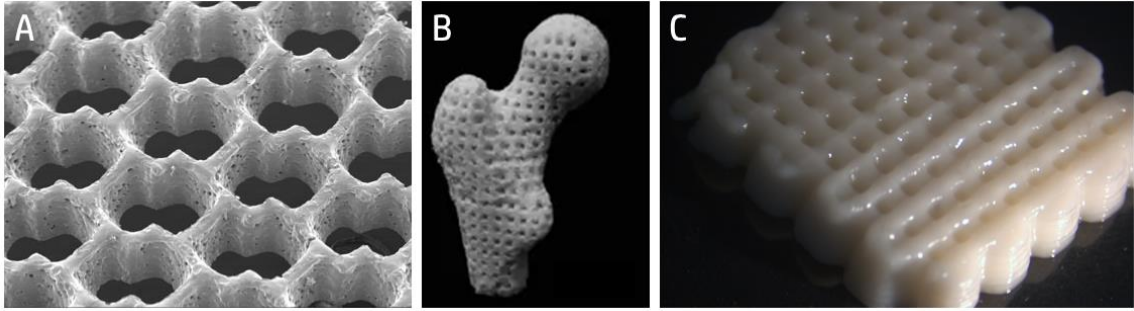
Şekil 1.9. 2B ve 3B hücre kültürü yöntemleri (A) 2B hücre kültürü, (B) 3B biyomateryal üzerine ekili hücre kültürü, (C) 3B biyomateryal içine gömülü hücre kültürü ve (D) hücre kültürü ortamı içinde süspansiyon halinde 3B hücre kültürü

Tablo 1.3. 2B hücre kültürü ile 3B hücre kültürü arasındaki hücresel özellik düzeyinde farklılıklar [42]

Hücresel Özellik	2 boyutlu hücre kültürü	3 boyutlu hücre kültürü
<i>Morfoloji</i>	Tabaka görünlü düz ve esnemiş/uzamış tek katmanlı hücreler	Sferoid/organoid yapıda doğal görünlü hücreler
<i>Çoğalma</i>	<i>in vivo</i> çoğalmadan daha hızlı	Hücre tipine ve 3 boyutlu model sisteme bağlı olarak 2 boyutlu kültüre göre daha hızlı veya daha yavaş olabilir
<i>Kültür ortamı ile etkileşim</i>	Tek katmanlı hücreler kültür ortamındaki bileşenler ile eşit oranda etkileşir	Sferoid/organoid yapının iç tabakalarında bulunan hücreler kültür ortamındaki bileşenlere yeteri kadar maruz kalmayabilir
<i>Gen/Protein ekspresyonu</i>	<i>in vivo</i> gen/protein ekspresyonuna göre daha farklıdır	<i>in vivo</i> gen/protein ekspresyonu ile daha fazla benzerlik gösterir

Kültür ortamı içinde süspanse halde sferoid/organoid oluşumu dışında 3B kültür uygulamalarında hücre dışı ortamı taklit eden bir biyomateryalin kullanımı oldukça yaygındır. Hücreler bu biyomateryalin üzerine ekilebileceği gibi içine de gömülebirlirler. Kullanılan biyomateryal, 3B poröz yapıların kültür ortamında fiziksel destek görevi görerek hücrelerin yapıya bağımlı doku oluşumunu sağlamalarına yardımcı olur. Yapının geçirgenliği, kültür ortamında bulunan ve hücrelerin hayati fonksiyonlarını devam ettirebilmeleri ve çoğalabilmeleri için gerekli olan biyokimyasal maddelerin hücrelere ulaşabilmesi için önemlidir [50].

3B kültür ortamında hücre çoğalması ve doku oluşumuna destek olarak kullanılan biyomateryaller, kullanılan üretim yöntemine göre farklılık göstermekle birlikte, *scaffold* adı verilen doku iskeleleri şeklinde kullanılır (Şekil 1.10).

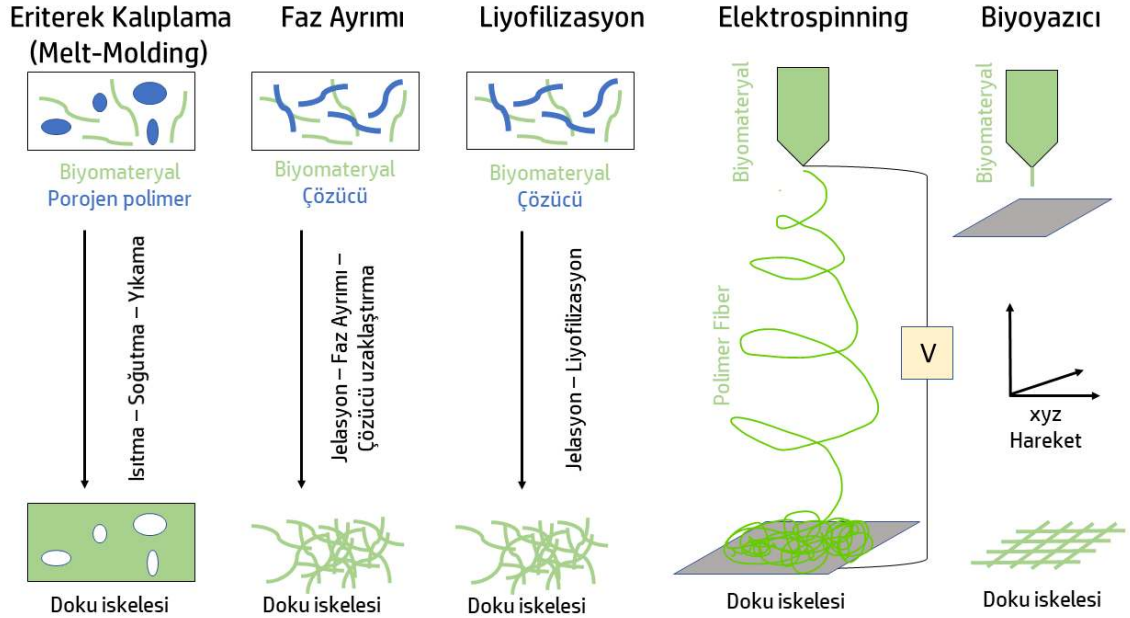


Şekil 1.10. Farklı doku iskeleleri (A) Hexagonal poröz [51], (B) femur şekilli [52] ve (C) kare gözenekli

Doku iskelesi, biyomateryalin morfolojik özelliklerinden kaynaklanan poröz yapının yanında yapısal anlamda sahip olduğu gözenekler sayesinde kültür ortamındaki bileşenlerin 3B yapının iç katmanlarında bulunan hücreler ile kolay bir şekilde etkileşime geçmesine olanak sağlar. Kullanılan doku iskelesinin gözenekleri arasındaki boşluk, yapının yüksekliği ve iskele örgü yapısının düzeni gibi parametreler iskelenin kullanılacağı doku türüne göre değişiklik göstermektedir [6,53]. Yapı, hücrelerin tutunabileceği ve herhangi bir strese maruz kalmadan çoğalabilecekleri bir ortam görevi görmektedir. İmplantasyonu yapılan doku iskelesi, kullanılan biyomateryal ve çapraz bağlama yöntemine göre kontrollü bir şekilde bozunur ve geriye çoğalan hücrelerin oluşturduğu doku kalır. Olması gerekenden daha hızlı şekilde bozunan doku iskelesi, hücrelerin hücre dışı ortam üreterek doku oluşturmalarının önüne geçecektir. Gereğinden fazla süre bozunmadan kalan bir doku iskelesi ise hücrelerin stres altına girmesine sebep olacak ve hücre ölümüne yol açacaktır [5].

1.2.4 Biyofabrikasyon

3B doku iskelesi üretim yöntemleri doku mühendisliği araştırmaları ilerledikçe çeşitlenmiştir [54,55] (Şekil 1.11).



Şekil 1.11. Farklı doku iskelesi üretim teknikleri

Bu teknikler, farklı yöntemler yardımıyla çalışıyor olmasına rağmen doku mühendisliği uygulamaları için aynı amacı temel almaktadır; hücrelerin yaşaması ve çoğalabilmesi için gerekli olan hücre dışı ortamı biyomateriyal kullanarak taklit edebilmek. Hücre dışı ortamda yer alan proteinlerin büyük bir çoğunluğu nano boyutlu ipliksi yapıda bulunmaktadır. Bu sebeple kullanılan üretim tekniğinin nano boyutlu yapılar oluşturmaya uygun olması gerekmektedir [56].

Geleneksel olarak uygulanan doku mühendisliği yöntemleri “yukarıdan-aşağıya” yaklaşımını temel almaktadır. Bu yaklaşımda hücreler, önceden üretilmiş bir doku iskelesi üzerine ekilir (Bkz. Şekil 1.9 B). Bu yöntemin dezavantajı, üretilen doku iskelelerinin çok sayıda hücre içeren büyük ve karmaşık dokuların yüksek metabolik ihtiyaçlarını karşılayabilecek derecede difüzyon kabiliyetine sahip olmaması/yetersiz kalmasıdır.

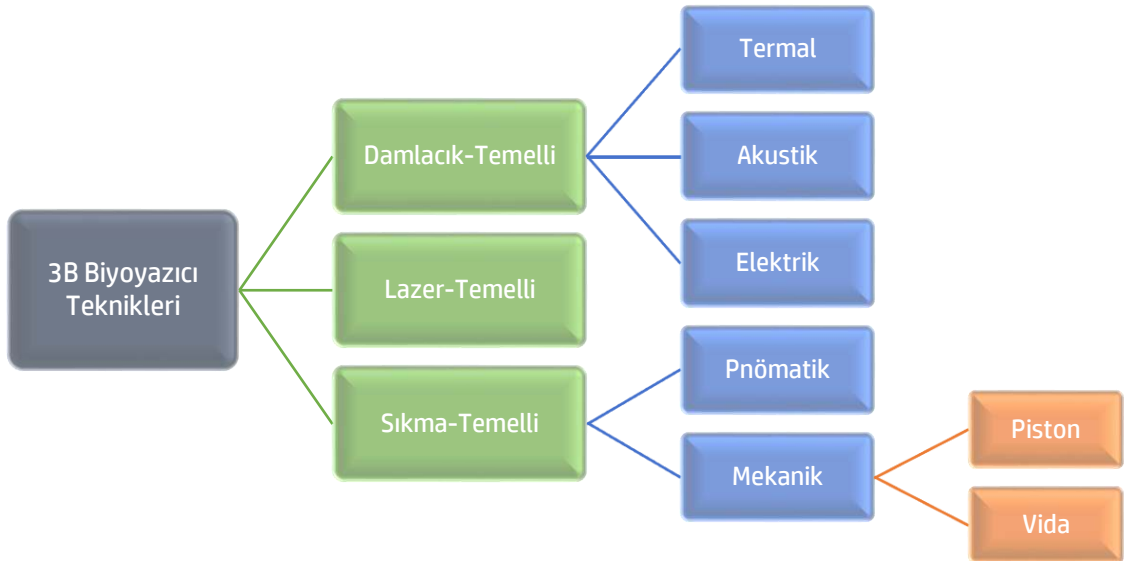
Buna alternatif olarak geliştirilen “aşağıdan-yukarıya” yaklaşımı ise kendi mikro-yapılarına sahip küçük boyutlu mikro-doku-bloklarının bir araya getirilerek daha büyük dokuların oluşturulması temelinde çalışmaktadır. Mikro-doku-blokları hücre yakalayan hidrojel (microgel) kullanımı, hücre agregasyonu, hücre tabakalarının elde edilmesi veya hücrelerin direkt olarak basılması ile elde edilebilir [56].

Doku mühendisliği araştırmalarında kullanılan en güncel uygulamalardan birisi 3B biyoyazıcı teknolojisidir. 3B biyoyazıcı ve 3B hücre kültürü uygulamalarının temelini kullanarak bilgisayar destekli tasarımların (Comuputer Aided Design – CAD) canlı doku öncülleri halinde üretilmesi işlemi *biyofabrikasyon* olarak adlandırılmaktadır. [57].

1.2.4.1 3B biyoyazıcı teknolojisi

Güncel haliyle 3B biyoyazıcı teknolojisi, bilgisayar destekli tasarımlar kullanılarak hücre ve uygulamaya göre büyüme faktörü gibi ek biyomoleküller içeren biyomürekkebin (*biyoink*), katman katman birbiri üzerine eklemesi (printing/basım) temelinde çalışır [37]. Teknolojinin kökeni ise ilk olarak 1986 yılında Charles W. Hull [58] tarafından kullanılan *stereolitografi* tekniğine dayanmaktadır. [59].

Çalışma prensiplerine göre 3B biyoyazıcılar 3 ana başlık altında toplanabilir (Şekil 1.12).



Şekil 1.12. 3B biyoyazıcı teknolojileri [5]

Damlacık-Temelli Biyoyazıcı

Damlacık temelli biyoyazıcı uygulamaları termal, akustik veya elektrik enerjisi kullanılarak hücrelerin damlacık halindeki biyomürekkep içine enkapsüle edilmiş halde, katman katman basılması temeline dayanır. Sistemin ucuz ve hızlı olması en büyük avantajıdır.

Lazer-Temelli Biyoyazıcı

Lazer temelli biyoyazıcı uygulamaları 3B basım işlemi için lazer enerjisini kullanır. Bu yöntemde ışık ile etkileşime giren (*photocurable*) biyomürekkep üzerine “z” eksenini boyunca lazer ışını gönderilir. Katman katman aynı işlem uygulanarak nihai yapı elde edilir. Yöntemde bir iğne ucu kullanımına ihtiyaç duyulmadığı için hücreler biyobasım esnasında stres altında kalmaz. Bu sebeple lazer-temelli biyoyazıcı sistemlerinde ilk anda elde edilen canlılık oranı iğne ucu kullanılan biyoyazıcı tekniklerine göre daha yüksek olmaktadır.

Sıkma-Temelli Biyoyazıcı

Sıkma temelli biyoyazıcılar ise bir şırınga içerisinde yer alan biyomürekkebin pnömatik veya mekanik kuvvet ile bir iğne ucundan akıtılması prensibiyle çalışır. Mekanik kuvvet kullanılan biyoyazıcılarda şırınga içerisindeki piston veya vida yardımıyla akıtılan biyomürekkep, pnömatik kuvvet kullanılan biyoyazıcılarda şırınga içerisine uygulanan basınç ile iğne ucundan akar. Sıkma-temelli biyoyazıcılar en yaygın kullanılan biyoyazıcılardır. Basım işlemi esnasında hücrelerin stres altında kalma ihtimali yöntemin önemli dezavantajlarından [5,59,60].

1.2.5 3B biyoyazıcı uygulamalarında biyomürekkep seçimi

3B biyoyazıcı kullanılarak yapılacak doku mühendisliği uygulamasında kullanılacak biyomürekkep ve bileşenlerinin seçimi, uygulamanın başarısı açısından hayati öneme sahiptir. Seçilen biyomalzemelerin sahip olması gereken özellikler şu şekilde sıralanabilir:

- Hücre – hücre ve hücre – biyomalzeme etkileşimine elverişli olmalı, aynı zamanda kültür ortamındaki bileşenlerin hücrelere ulaşabilmesini sağlayarak yeni doku oluşumuna olanak sağlamalıdır

- Bozunabilir olmalı ve hücrelerin farklılaşma ve çoğalmalarına izin vererek hücre dışı ortam üretimine uygun bir ortam sağlamalıdır
- Kullanılan biyomalzeme ve çapraz bağlayıcı sitotoksik etki göstermemelidir
- Hedeflenen doku yapısının biyoyazıcı ile oluşturulabilmesine imkan verecek fizikokimyasal özelliklere sahip olmalıdır, bu sebeple nihai yapı oluşturulduğunda polimerik yapıda olması gerekmektedir

Bu özellikleri sağlayan bir biyomürekkep geliştirmek için kullanılan biyomalzemeler 3 ana grup altında toplanabilir; biyolojik polimerler, sentetik polimerler ve polimerik karışımlar [61,62]. Bu malzemeler kullanılarak hazırlanan biyomürekkep, yaygın olarak hidrojel formunda kullanılmaktadır. Yüksek şişme kapasiteleri, poröz yapıları sebebiyle yüksek geçirgenlikleri, kolay hazırlanabilmeleri ve 3 boyutlu biyoyazıcı sistemlerinde kullanıma uygun viskozite özelliklerinin kolayca ayarlanabilmesi gibi fizikokimyasal özelliklerinden dolayı hidrojeller biyomürekkep hazırlanmasında en sık tercih edilen biyomalzeme formudur [3].

1.2.5.1 Biyolojik polimerler

Biyolojik polimerler canlı organizmalar tarafından üretilen biyopolimerlerdir. Bazı biyolojik polimerlerin hem canlı organizmalar tarafından doğal yollarla üretiliyor olması hem de laboratuvar ortamında kimyasal sentez reaksiyonları sonucu üretilebiliyor olması polimerlerin biyolojik – sentetik şeklinde keskin bir çizgi ile ayrılmasının önüne geçmektedir. Buna rağmen istisnalar dışında *peptid ve proteinler, polisakkaridler, polinükteotidler ve hücresizleştirilmiş hücre dışı ortam* 3B biyoyazıcı uygulamalarında biyomalzeme olarak sıklıkla kullanılan biyolojik polimerler olarak sınıflandırılabilir. Biyolojik polimerlerin en yaygın şekilde kullanılan örnekleri Tablo 1.4’de gösterilmiştir.

Tablo 1.4. 3B biyoyazıcı uygulamalarında biyomalzeme olarak yaygın şekilde kullanılan biyolojik polimerler ve işlevleri [62,63]

Adı	Türü	3 Boyutlu Biyoyazıcı Uygulamalarındaki İşlevi
Kolajen	Protein	Yapısal mukavemet kazandırır ve hücre tutunmasına ve büyümesine yardımcı olur
Jelatin	Protein	Yapısal mukavemet kazandırır ve 3B hücre kültüründe hücrelere uygun ortam sağlar
Elastin	Protein	Dokuya esneklik kazandırır
Silk fibroin	Protein	Hücre kültüründe substrat işlevi vardır

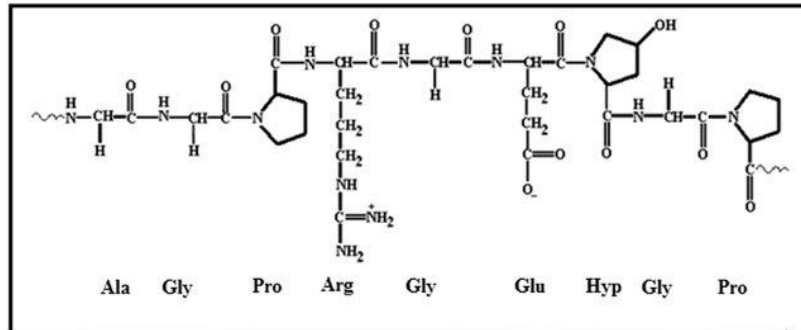
Tablo 1.4. (Devam) 3B biyoyazıcı uygulamalarında biyomalzeme olarak yaygın şekilde kullanılan biyolojik polimerler ve işlevleri [62,63]

Proteoglikanlar	Protein	Hücre – ortam etkileşiminde ve hücre çoğalmasında etkilidir
Selüloz	Polisakkarid	Yapısal mukavemet kazandırır
Aljinat	Polisakkarid	Yapısal mukavemet kazandırır
Kitin/Kitosan	Polisakkarid	Yapısal mukavemet kazandırır

Bu tez kapsamında yapılan çalışmalarda kullanılan selüloz, karragenan ve jelatin biyolojik polimerler sınıfına girmektedir.

Jelatin

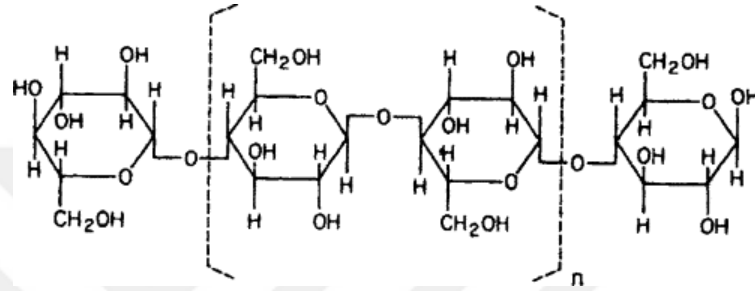
Jelatin, kolajenin denatürasyona uğramış bir halidir (Şekil 1.13). Düşük sıcaklıklarda yapısı helikal yapıdadır ve viskoz özellik göstermektedir. Sıcaklık yükseldikçe helikal yapı düzensiz katlanmalara dönüşür. Kollajen ve jelatinin doku mühendisliği uygulamalarında sık sık kullanılmasının en önemli sebeplerinden birisi protein yapılarında bulunan Arjinin – Glisin – Aspartik asit (Arg – Gly – Asp, RGD) aminoasit dizisidir [64–66]. Bu dizi, hücrelerin yapıya tutunmasını sağlamaktadır ve hücre çoğalmasına uygun ortamın oluşmasına yardımcı olur [67,68]. Buna ek olarak jelatinin fizyolojik sıcaklıkta jelleşmesi, biyomalzeme olarak kullanımında avantaj sağlamasına rağmen doku iskelesi olarak kullanılabilmesi için çapraz bağlanmanın gerçekleştirilerek stabil yapının elde edilmesi gerekmektedir. Glutaraldehit gibi yapıdaki boş amin uçları üzerinden çapraz bağlanma gerçekleştiren çapraz bağlayıcı ajanların kullanımı çalışmalarda sık sık kendisine yer edinmektedir [69].



Şekil 1.13. Jelatinin kimyasal yapısı [70]

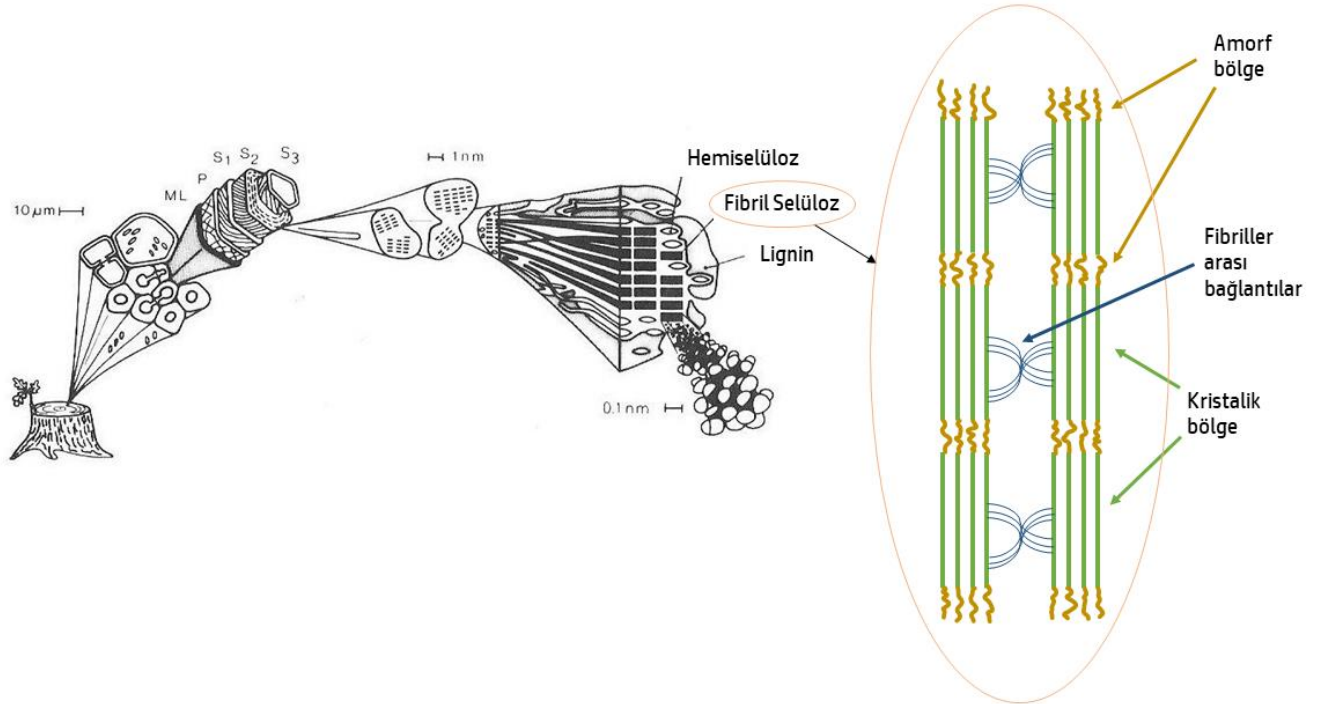
Selüloz

Selüloz doğada en yoğun şekilde bulunan polimerik polisakkarid materyaldir. Fibröz yapıdaki formu bitki hücre duvarında bulunmakta olup suda çözünmeyen özelliğe sahiptir. β -(1 $\rightarrow$ 4) glikozidik bağları ile birbirine bağlı D-glikoz ünitelerinden oluşan selüloz (Şekil 1.14), biyobozunumunun düşük olması sebebiyle doku mühendisliği çalışmalarında sık tercih edilmemelidir. Buna karşılık modifiye edilmiş selüloz türevleri, sahip olduğu özelliklere bağlı olarak çeşitli çalışmalarda kullanılmaktadır [71–73].



Şekil 1.14. Selülozun kimyasal yapısı [74]

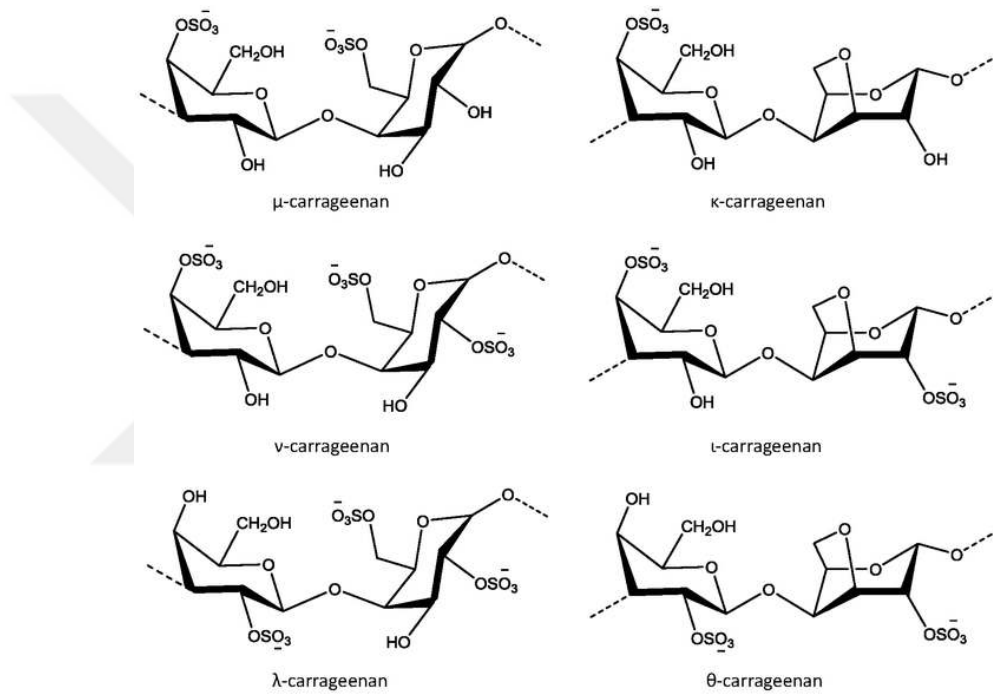
Fibröz yapısı hemiselüloz ve ligninin birbirleriyle etkileşimi ile oluşan selüloz, belli reaksiyonlara sokularak nano boyutta kristalik yapıda elde edilebilir (Şekil 1.15). Uygun yöntemler kullanılarak modifiye edilebilen nano-selüloz kristalleri elektriksel iletkenlik özelliği kazanarak farklı doku mühendisliği uygulamalarında kullanılabilir.



Şekil 1.15. Doğada bir arada bulunan selüloz, hemiselüloz ve lignin [75] ve selülozun kristalik yapısı

Karragenan

Kırmızı su alglerinden elde edilen bir polisakkarid grubu olan karragenan, yapısında bulunan moleküllere göre farklı şekillerde isimlendirilir (Şekil 1.16). Yapısında bulundurduğu sülfat grubu sayesinde elektriksel iletkenlik özelliğine sahip olan karragenan, suda çözünbilme özelliği sebebiyle de doku mühendisliği uygulamalarında tercih edilmektedir. Soğutulduğu zaman oluşan helikal yapının katyonik etkileşimler sayesinde agrağı olmasıyla jelleşen karragenanın viskozitesi ise derişim, sıcaklık ve kullanılan karragenan tipine göre değışiklik göstermektedir [76].



Şekil 1.16. Farklı karragenan yapıları [77]

1.2.5.2 Sentetik polimerler

Sentetik polimerler, ilk kullanımı 18. yüzyılın başlarına dayansa da medikal anlamda işlevselliğini 2. Dünya Savaşı döneminde kazanmıştır. Biyobozunabilir sentetik polimerlerin bu alandaki kullanımı ise 1969 yılında ilk bozunur medikal dikiş ipi ile başlamıştır. Biyobozunur ve *in vivo* toksikoloji çalışmalarının sınırlı sayıda sentetik polimer üzerinde yapılmış olması, 3B biyoyazıcı uygulamalarında kullanılan sentetik polimer sayısının artmamasına neden olmuştur (Tablo 1.5). Bu sebepten dolayı biyomürekkep olarak kullanıma uygun olduğu bilinen sentetik polimerlerin modifikasyonu ile elde edilen yeni polimerlerin kullanımı oldukça yaygındır [62].

Tablo 1.5. 3B biyoyazıcı uygulamalarında biyomalzeme olarak kullanılan sentetik polimerler ve uygulama alanları [61,62]

Adı	Uygulama Alanı
Poli(glikolik asit)	Damar
Poli(laktik asit)	Deri, kırık, kemik, tendon
Poli(kaprolakton)	Kemik, sinir, kırık, deri
Biyobozunabilir poliüretan	Kırık, damar
Polianhidridler	Kemik
Poli(etilen glikol)	Deri, damar, sinir

1.2.5.3 Polimerik karışımlar

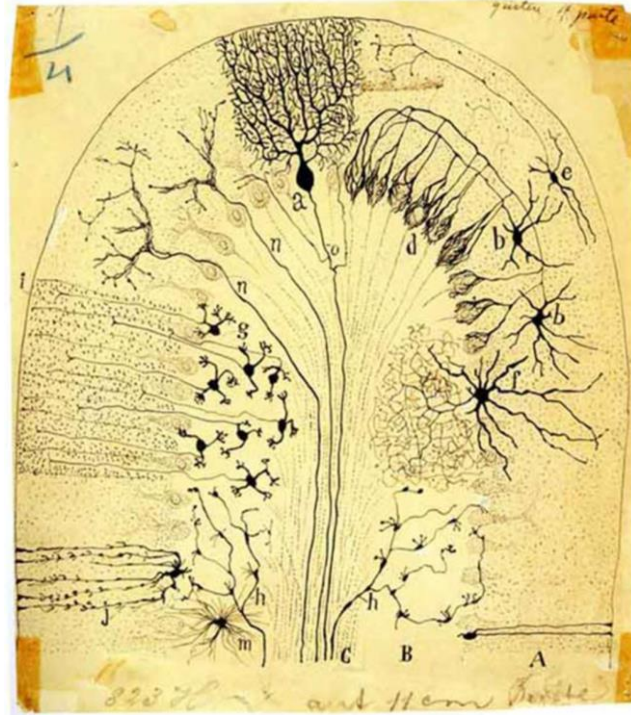
Biyomalzeme olarak biyolojik polimer kullanımı biyouyumluluk anlamında oldukça üstünlük sağlasa da 3B biyoyazıcı tekniklerinin çoğunlukla yüksek sıcaklık veya basınç gerektiriyor olması sebebiyle özellikle protein ve peptidlerin degradasyona uğrama riski oldukça yüksektir. Polisakkaridlerin ise hücre tutunmasını sağlayacak protein uçları olmadığı için tek başlarına biyomalzeme olarak kullanımları dezavantaj yaratmaktadır. Bu nedenle biyomalzemenin biyouyumluluğunu arttıracak bir polimerin yanında, mukavemetini arttıracak bir farklı bir polimer kullanımı biyomürekkep geliştirme araştırmalarında sıklıkla karşılaşılan bir durumdur. Kullanılan hibrit polimerin aynı zamanda uygun bir çapraz bağlayıcı yardımıyla çapraz bağlanarak hücre farklılaşması ve çoğalması basamakları boyunca doku iskelesinin bozunmadan yapısal mukavemetinin korunması sağlanmalıdır. Bu hedef çerçevesinde uygun oranlarda karıştırılarak genellikle hidrojel formuna getirilen polimer karışımlarının kullanımı, alanın en güncel ve yaygın araştırma konusudur [7,62,78].

1.3 Sinir Dokusu Mühendisliği

1.3.1 Sinir sistemi ve hasarları

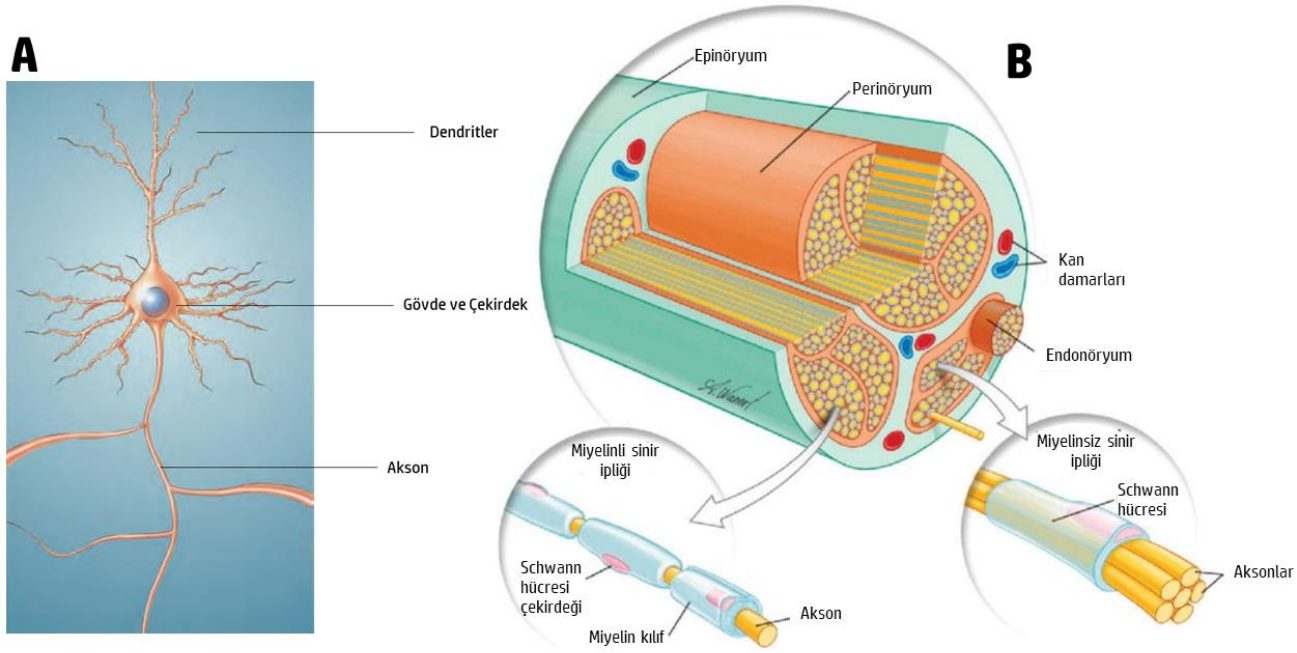
Canlı vücudunun farklı bölgelerinin sinyal gönderimi/alımı aracılığı ile etkileşim ve iletişim halinde bulunmasını sağlayan sinir sistemi iki ana parçadan oluşur; çevresel sinir sistemi (ÇSS) ve merkezi sinir sistemi (MSS). Beyin, omurilik ile birlikte MSS'yi oluşturur ve canlı vücudunun işleyiş merkezi görevini görür. ÇSS ise merkezi sinir sistemine bağlanmış durumda olan diğer sinirlerden oluşur [79].

Sinir sisteminin işlevi ile ilgili çalışmalar özellikle 1849'da Phineas Gage isimli hastanın kafasının bir demir çubuk ile delindiği kazadan sonra kişiliğindeki değişikliklerin fark edilmesi ile hız kazanmıştır. Gage örneğinde olduğu gibi sinir sisteminde travma sonrası oluşan değişikliklerin takibi ile sinir sisteminin işlevinin çözülmesi, hasta odaklı bir ilerleyiş ile günümüzde dahi sürmektedir. Bu yaklaşımdan farklı olarak sinir dokuları üzerinde araştırma yaparak çalışan bilim insanları, alandaki çalışmaların çok daha hızlı ilerlemesine öncülük etmiştir. Santiago Ramon y Cajal'in Camilo Golgi ile paylaştığı Nobel Ödülü [80] ve Cajal'in Golgi'nin yöntemini kullanarak yaptığı hücre boyaması çizimleri (Şekil 1.17) ile sinir sistemi ile ilgili araştırmalar dikkat çekmeye başlamıştır [81].



Şekil 1.17. Cajal'in sinir hücresi çizimlerinden bir örnek [81]

Bir sinir hücresi (nöron) gövde ve çekirdeğe bağlı dendritler ve aksondan oluşmaktadır (Şekil 1.18 A). Aksonlar etrafına sarılan Schwann hücreleri ile oluşan miyelin kılıf, sinir hücresi üzerindeki elektriksel aktarımın hızlı gerçekleşmesini sağlar (Şekil 1.18 B). Sinirsel aktarım iki nöron veya nöron ile doku arasında kurulan sinaptik bağlantılar sayesinde gerçekleşir. Sinirsel hasar, bir nöronun elektrik iletiminde yaşanan işlev bozukluğu veya sinaptik aktarımdaki bozukluktan kaynaklanabilir [8,82].



Şekil 1.18. (A) Nöron anatomisi [79] ve (B) sinir anatomisi [83]

Günümüzde sinir sisteminin işleyişi çözülebilmüş olsa bile sinir sistemi rahatsızlıklarının bir çoğu için kesin tedavi yöntemi geliştirilememiş durumdadır (Tablo 1.6).

Tablo 1.6. Nörodejeneratif hastalıklar ve hasar gören hücre toplulukları [82]

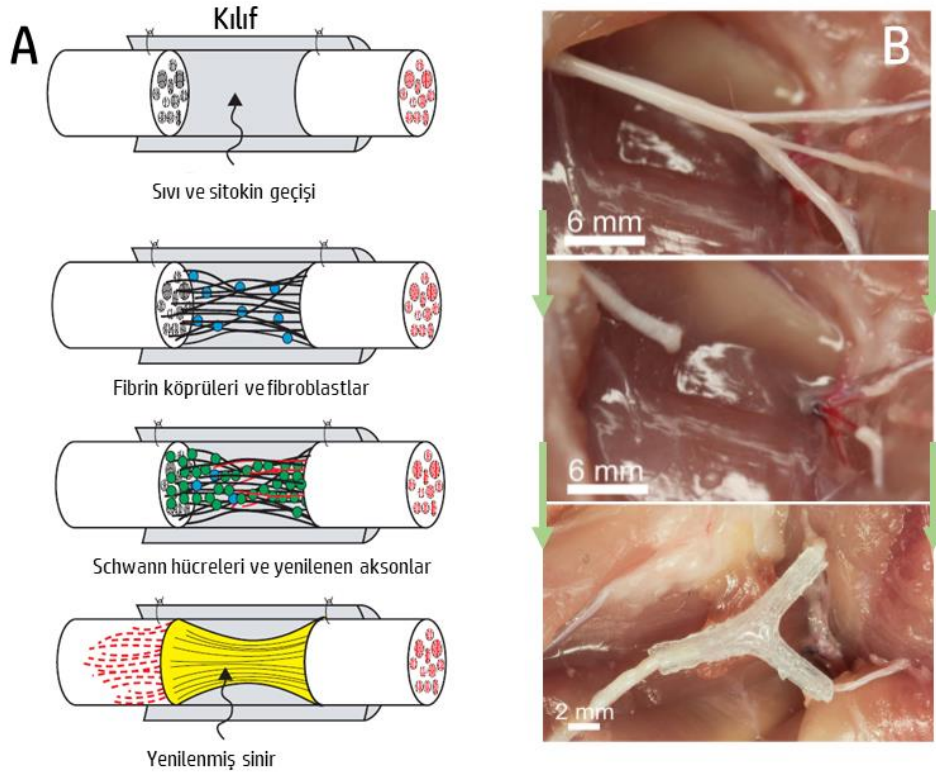
Nörodejeneratif Hastalık	Etkilenen Hücre Topluluğu
Parkinson	Dopaminerjik nöron dejenerasyonu
Huntington	Kortikal ve striatal nöronlar dahil olmak üzere pek çok nöronal topluluk
Alzheimer	Beyin etrafında nöron kaybı
Epilepsi	Serebral korteks nöron kaybı, nöron hasarı
Multipl Skleroz	Oligodendrosit dejenerasyonu
Lou Gehrig (ALS)	Omurilik boynuz hücre atrofisi ve büyük motor nöronların fibröz astrositler ile yer değiştirmesi, miyelin hücre dejenerasyonu

Hasar görmüş sinir hücrelerinin yenilenebilme kabiliyeti büyük oranda hasarın bulunduğu yere (ÇSS-MSS, MSS-MSS veya ÇSS-ÇSS arasındaki bağlantıyı sağlayan sinirler) bağımlıdır. ÇSS üzerindeki hasarlarda uygulanabilecek tedavi yöntemi hasarın büyüklüğüne göre değişmektedir. Duruma göre hasar görmüş sinirin cerrahi müdahale ile birbirine bağlanması veya hasarlı bölgeye otolog sinir nakli uygulamaları yapılabilir. Bu tedavi yöntemlerine rağmen sinir hasarının tamir ve yenilenmesi, sinirin eski işlevini geri kazanabilmesi bakımından yeterli olmaktan oldukça uzaktır. MSS üzerindeki hasarlar için ise geliştirilmiş güncel bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır. Bu sebeplerden dolayı gelişen teknoloji ile birlikte sinir dokusu mühendisliği de önemli araştırma konularından birisi haline gelmiştir [82].

1.3.2 ÇSS mühendisliği

ÇSS hasarı tüm dünyada yaygın bir şekilde karşılaşılan sağlık sorunlarından birisidir. Çevresel sinirler üzerinde gerçekleşen hasar sonucu aksonlarda oluşan dejenerasyon, makrofaj ve monositlerin hasarlı bölgedeki miyelin kılıf ve akson kalıntılarını temizlemesine yol açar. Bu esnada akson rejenerasyonunun sağlanabilmesi için Schwann hücreleri çoğalarak nörotrofik faktör ve hücre dışı ortamın oluşumunu indükler. Arada kurulan Bungner Bantları sonucu aksonun rejenerasyonu, aksonun sinaptik hedefine ulaşana kadar uzaması ile devam eder. Buna rağmen bu yenilenme mekanizması sinirsel iletimin hasar öncesindeki kadar verimli olmasını sağlayamaz [84].

Bölüm 1.3.1’de bahsedildiği gibi birkaç milimetreden küçük nöronal hasarlar cerrahi müdahale ile birbirlerine dikilebilir. Bu yöntemin mümkün olmadığı daha büyük hasarlarda ise tübüler bir yapının (*conduit – kılıf*) *in vivo* kullanımı gerekmektedir (Şekil 1.19). Bu yaklaşımda hasarlı sinirin ayrı uçları kılıfın iki ucundan içeri sokularak rejenerasyonun sağlanması beklenir. Kullanılan kılıf rejenerasyonun sağlanmasına yardımcı olurken aynı zamanda sinire gerekli biyokimyasalların iletimi görevini de görür. Bu amaçla yapıya hücre, çeşitli proteinler ve büyüme faktörleri ilave edilebilir. Doku mühendisliği çalışmalarında yeni tekniklerin geliştirilmesi ile hasarın tamirinde kullanılan tübüler kılıf yerine 3B doku iskelesi kullanımı da mümkündür [85].



Şekil 1.19. ÇSS mühendisliğinde (A) nöronal yenilenmeye yardımcı kılıf kullanımında akson yenilenme mekanizması [8] ve (B) rat siyatik siniri üzerinde *in vitro* kılıf kullanımı [86]

ÇSS mühendisliği uygulamalarında kullanılan destek materyalleri (doku iskelesi veya tübüler kılıf) silikon elastomer üzerine yoğunlaşmıştır. Yeni doku mühendisliği teknikleri geliştirildikçe kullanılan sentetik polimer malzemeleri de çeşitlenmiş ve bazı elektriksel iletkenliği olan polimerler destek materyali işlevi görmüştür [87,88]. Destek materyali olarak kolajen, aljinat, poli(2-hidroksietil metakrilat) gibi malzemelerin kullanımı yaygınlaşmaktadır. Bölüm 1.2.5.3'te bahsedildiği gibi tek çeşit polimer kullanımının yetersizliğinin önüne geçebilmek amacıyla bahsedilen polimerik malzemelerin yanına heparin, fibrin, agarose, selüloz gibi farklı destek materyalinin eklenmesiyle birlikte daha gelişmiş doku iskelesi ve kılıflar geliştirilmektedir. Polimerik karışımın içeriğine büyüme faktörü ve hücre dışı ortam proteinleri gibi biyolojik destek materyallerinin eklenmesinin bölümün başında bahsedilen yenilenme hızını arttırdığı da yapılan çalışmalar ile kanıtlanmıştır [89–92]. Bu tür klinik geçerliliği olabilecek uygulamaların yanı sıra ÇSS hasarı *in vitro* olarak modellenerek geliştirilen ilaç ve yeni tedavi yöntemlerinin test edilmesi de mümkün kılınmıştır. Bu tür araştırmalar lab-on-chip uygulamaları temelinde ilerleyebildiği gibi model üretiminde *in vitro* üretilen organoidlerin kullanımı da mümkündür [93–100].

1.3.3 MSS mühendisliği

ÇSS ve MSS hasarı sonrasında gerçekleşen mekanizmadaki temel farklılık yenilenebilme kapasitesinde yatmaktadır. Bölüm 1.3.2’de bahsedilen yenilenme mekanizmasından farklı olarak MSS, hasar sonrasında nadiren yapısal ve işlevsel özelliklerini geri kazanabilir [82].

MSS doku biyolojisi beyaz ve gri maddeden oluşur. Omurilik örneğinde gri madde nöron gövdelerinin bulunduğu bir kelebek şeklindedir ve kan damarı ve glial hücreleri içerir. Beyaz madde ise çoğunlukla aksonlar ve kan damarları ve glial hücrelerden oluşmaktadır. Yapılan bir çalışmaya göre MSS yenilenmesinin başarısız olmasının altında yatan sebeplerden birisi beyaz madde varlığıdır [101]. Bu duruma beyaz maddenin, çoğunlukla oligodendrositler ve miyelin bileşenleri tarafından sağlanan, akson uzaması ve hücre tutunmasını inhibe etmesi sebep olmaktadır. Buna ek olarak glial yara oluşumunun gözlemlenmediği durumda sinir liflerinin uzanma düzeninde görülen bozulmanın erişkin omurilik beyaz maddede akson yenilenmesini engellediği bilinmektedir [102,103]. Düzenli doku yapılanmasının akson uzamasını olumlu yönde etkilemesi bilinmekle birlikte glial yara oluşumunun gözlemlenmediği durumlarda yenilenme mekanizmasının işleyebilmesi için yapılması gereken hamle, yeni oluşacak nöronların hasarlı bölge boyunca uzanarak düzenli doku oluşumuna yardımcı bir köprü görevi görmelerine yardımcı olmaktır [103,104]. Bu kapsamda yapılan doku mühendisliği çalışmalarında kullanılan doku iskelesi, aksonların düzenli yapıda uzamalarına yardımcı olacak köprüyü destekler nitelikte ajanlar içermelidir. Bu ajanlar akson rejenerasyonunu desteklemeli, hasarın büyümesini engellemeli, yeniden miyelinlenmeye ve varsa, kök hücrelerin doğru yönde farklılaşmalarına yardımcı olmalıdır [82].

Bu bağlamda; MSS mühendisliği alanında yapılan çalışmalar beyin dokusunu taklit edebilecek model üretimi ve kullanımı [105–110] ve omurilik üzerinde yapılan doku iskelesi ve model üretimi çalışmaları [111–115] üzerine yoğunlaşmıştır.

2 MATERYAL ve YÖNTEM

2.1 Materyal

Yapılan çalışmada kullanılan selüloz, ticari pamuk kullanılarak sülfürik asit hidrolizi yöntemiyle sentezlenmiştir. Sentez basamağında kullanılan sülfürik asit (H_2SO_4) ve diğer kimyasallar olan sodyum hidroksit (NaOH) ve hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroliz basamağında safsızlıkların giderilmesi aşamasında kullanılan snake-skin diyaliz tüpü (3500 kDa) Sigma Aldrich'ten satın alınmıştır.

Sentezlenen selüloz nano-kristallerin karakterizasyonunda Fourier dönüşümlü kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi (Perkin Elmer Spectrum 100), x-ışını kırınımı (XRD, Bruker D8 Advance) yöntemi, termogravimetrik analiz (TGA, TA Instrumenss Q500), taramalı elektron mikroskobu (SEM, ZEISS Ultraplus) ve kondüktometre (Thermo Scientific Orion 145A+) ve zeta potansiyeli ölçümü (Malvern Instruments, Model 3000 HSA) kullanılmıştır.

Biyomürekkep yapımında kullanılacak hidrojel karışımı biyomalzemenin hazırlanması için kullanılan sığır jelatini (Tip-B) Santa Cruz Biotechnology firmasından, karragenan ise Alfasol'den satın alınmıştır. Biyomalzemenin karakterizasyonu mekanik test cihazı (TA Instruments ARES Rheometer) ile yapılmıştır.

3B kılıfların üretiminde sıkma temelli pnömatik 3B biyoyazıcı (EnvisionTEC 3D-Bioplotter® Developer Series, 4. nesil) kullanılmış olup basım aşamasında 22G ve 25G iğne uçları denenmiştir. Basıldıktan sonra yapıların çapraz bağlanması için kullanılan glutaraldehit Sigma Aldrich'ten satın alınmıştır.

Üretilen 3B yapıların karakterizasyonunda SEM (ZEISS Ultraplus) mikrografları ve optik mikroskop (Leica Microsystems MZ6) kullanılmıştır.

Hücre çalışmalarında kullanılan 3T3 hücreleri American Type Culture Collection (ATCC)'dan satın alınmış olup, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Gibco'dan, fetal bovin serum (FBS) Merck Millipore'dan, tripsin/EDTA çözeltisi ise Sigma'dan satın alınmıştır. Kullanılan 12-hücreli plakalar Corning'den satın alınmış olup absorbans taramaları mikroparka tarayıcı (BioTek Synergy H1 hydrid reader) kullanılarak yapılmıştır.

Hücre sayımı için kullanılan trypan blue boyası Thermo Fisher'den satın alınmış olup sayma işlemi otomatik cihaz ile yapılmıştır (Logos Biosystems LUNA-II).

2.2 Hücre Çoğaltılması ve 3B Hücre Kültürü

Yapılan çalışmalarda fare fibroblast (3T3) hücreleri kullanılmıştır. Hücreler DMEM içerisine eklenen %10 (v/v) ısı ile aktiveleştirilmiş FBS ve %1 (v/v) penisilin-streptomisinden oluşan hücre kültürü ortamında %5 CO₂ içeren ortamda 37°C sıcaklık altında polistiren kaplarda çoğaltılmıştır. Hücre yoğunluğu %90 seviyesine geldiği zaman kaplardaki hücreler alt kültürler ayrışmış ve uygun pasaj sayısındaki hücreler deneysel çalışmalarda kullanılmıştır. Hücreler deneysel çalışmalarda kullanılmak için bulundukları kaplardan %0.25 (v/v) tripsin-EDTA çözeltisi ile kaldırılmış ve yıkama ve santrifüj işlemlerinden sonra doku iskeleleri üzerine ekilmiştir.

Ekim işleminden önce doku iskeleleri 4 saat süreyle UV ışık altında steril hale getirilmiş ve steril fosfat tamponu (pH:7.2) kullanılarak yıkanmıştır. Daha sonra steril 12-hücreli plakalara yerleştirilen doku iskeleleri üzerine 1 cm² alana yaklaşık 1,5x10⁶ hücremL⁻¹ olacak şekilde 100 µL hücre süspansiyonu damlatılmıştır. Hücre ekili doku iskeleleri %5 CO₂ içeren ortamda 37°C sıcaklık altında inkübasyona bırakılmıştır.

2.3 Selüloz Nano-Kristallerin (CNC) Hazırlanması ve Karakterizasyonu

2.3.1 CNC hazırlanması

CNC'ler ticari pamuktan asit hidrolizi yöntemiyle sentezlenmiştir. Bu amaç doğrultusunda ticari pamuk asit hidrolizi dışında çeşitli ön ve son işlemlere maruz bırakılmıştır. Deney kurgusu temelde meriserizasyon-ağartma/mum çıkartma-asit hidrolizi basamakları doğrultusunda kurgulanmıştır.

Bu doğrultuda ilk basamak olarak yapıdaki selüloz liflerinin birbirlerinden ayrılması amacıyla meriserizasyon işlemi uygulanmıştır. Bu amaç doğrultusunda 4 g pamuk, %20 (w/v) sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi ile 1,5 saat muamele edilmiş, deiyonize su ile yıkanarak nötral pH değerine getirilmiş ve 1 gece 50°C sıcaklık altında kurutulmuştur. Mum çıkartma ve ağartma basamağında yapıdaki lignin ve hemiselüloz uzaklaştırılmıştır. Bunun için numune, pH 11,5'a ayarlanarak 1,5 saat süreyle, 50°C sıcaklık altında %5 (v/v) hidrojen peroksit (H₂O₂) çözeltisi ile karıştırılmış ve pH, deiyonize su ile yıkama yapılarak nötral değere getirilmiştir. 1 gece kurutulan numune 1:1 (v/v) H₂SO₄:dH₂O asidik karışım ile 50°C altında 5 saat karıştırılarak hidroliz edilmiştir. Asit hidrolizi sayesinde amorf bölgelerden kırılarak elde edilen CNC'ler 3500

kDa snake-skin diyaliz tüpü kullanılarak ortamda bulunan fazlalık iyonlardan ve kirlilikten arındırılmıştır. Kristallerin boyut dağılımının homojen olması amacıyla 5 dakika boyunca %40 enerji akımı ile ultrasonikasyon (Bandelin Sonopuls UW 2070) uygulanmış ve elde edilen kristaller kullanım öncesinde 50°C altında kurutulmuştur.

2.3.2 CNC karakterizasyonu

Sentezlenen CNC yapıların fiziksel ve kimyasal özellikleri FT-IR spektroskopisi, SEM, XRD yöntemi, TGA ve kondüktometrik ölçümler kullanılarak belirlenmiştir.

2.3.2.1 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi

FT-IR spektroskopisi ölçümleri 30 mg CNC ile 30 mg KBr karışımı ile basınç altında hazırlanan pellet kullanılarak yapılmıştır. Ölçümler 400-4000 cm⁻¹ aralığında gerçekleştirilmiştir. FT-IR analizi, CNC yapıların kimyasal özelliklerinin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır.

2.3.2.2 Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

Sentezlenen CNC yapıların morfolojik özellikleri ve boyutları SEM ile belirlenmiştir. Bu amaçla örnekler püskürtmeli kaplayıcı (Electron Microscopy EMS 550X) ile 50 mA akım altında 1 dakika boyunca 20 nm kalınlıkta altın ile kaplanmış ve analiz gerçekleştirilmiştir. Görüntüler 15000x ve 50000x büyütme oranlarında, SE2 dedektörü ile 20 kV gerilim uygulanarak elde edilmiştir.

2.3.2.3 X-ışınları kırınım (XRD) yöntemi

Sentezlenen CNC'lerin kimyasal ve yapısal özellikleri XRD cihazı ile analiz edilmiştir. Ölçümler 0,4°/dakika tarama hızı ve 5°-60° tarama aralığında, 40 kV gerilim ve 40 mA akım altında 1,54 nm dalga boyunda Cu K α karakteristik radyasyonu ile yapılmıştır.

2.3.2.4 Termogravimetrik analiz (TGA)

Sentezlenen CNC'lerin kimyasal özellikleri termogravimetrik ölçümler ile analiz edilmiştir. Ölçümler 5 mg katı CNC numunesi ile 25°C - 480°C sıcaklık aralığında yapılmıştır.

2.3.2.5 İletkenlik

Aynı hacimli jelatin, jelatin + karragenan ve jelatin + karragenan + CNC karışımlarının iletkenlik ölçümleri kondüktometre kullanılarak ayrı ayrı yapılmış ve CNC varlığının iletkenlik üzerindeki etkisi incelenmiştir. Tüm ölçümler 50°C sıcaklıkta yapılmıştır.

2.4 3B Biyobasım

2.4.1 Biyomalzeme hazırlanması

CNC'ler, katı destek malzemesi ve hücre tutunmasını sağlayıcı protein olarak kullanılan jelatin ve iletkenliği arttırıcı destek malzemesi olarak kullanılan karragenan biyomalzeme karışımının içerisine gömülerek 3B yapılar halinde basılmıştır. Bu amaçla kullanılacak biyomalzeme karışımları, biyobasılabilirlik anlamında optimum bileşen derişimlerinin belirlenebilmesi amacıyla farklı derişimlerde (%7-8 jelatin, %2-3 karragenan) bileşenler kullanılarak hazırlanmıştır.

%7 (w/v) ve %8 (w/v) olacak şekilde hazırlanan iki farklı jelatin çözeltisi 2 saat boyunca 70°C sıcaklıkta karıştırılmıştır. Aynı şekilde %2 (w/v) ve %3 (w/v) olacak şekilde hazırlanan iki farklı karragenan çözeltisi 2 saat boyunca 70°C sıcaklıkta karıştırılmıştır. Daha sonra hazırlanan karragenan çözeltileri, 8:2 ve 7:3 jelatin:karragenan (w/w) olacak şekilde jelatin çözeltilerinin üzerine eklenmiş ve her iki karışım da 2 saat boyunca 70°C sıcaklıkta karıştırılmıştır. Her iki biyomalzeme karışımına da 50 mg/mL olacak şekilde CNC ilave edilerek karışımlar 50°C sıcaklıkta 1 saat karıştırılmıştır. Hazırlanan karışımların jelleşme reaksiyonlarının tamamlanması için karışımlar 4°C sıcaklıkta 1 gece bekletilmiştir. Tüm biyomalzeme karışımlarının hazırlanması için deiyonize su kullanılmıştır.

2.4.2 Biyomalzeme karakterizasyonu

Hazırlanan biyomalzemelerin basılabilirlik özellikleri ve optimum basılabilirlik parametreleri belirlenmiştir.

2.4.2.1 Basılabilirlik ve biyouyumluluk

Hazırlanan biyomalzemelerin optimum 3B basılabilirlik parametreleri Bölüm 2.4.1’de hazırlanan karışımların 20°C ve 26°C sıcaklıkta, 0,5-3,0 bar basınç aralığında 25G ve 22G iğne uçları kullanılarak gerçekleştirilen biyobasım işlemi ile belirlenmiştir.

Hücre kültürü ortamında çoğaltılan hücreler trypan blue boyama yöntemi ile sayılmıştır. Bu amaçla 30 µL trypan blue boyası ile 30 µL hücre süspansiyonu dikkatli bir şekilde karıştırılmış ve hücre sayım cihazı ile analiz yapılmıştır.

Hazırlanan biyomalzemenin biyouyumluluğu 3T3 hücreleri ile 7 gün sürdürülen hücre yaşayabilirliği testi ile belirlenmiştir. Bu test kapsamında uygulanan MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) testi uyarınca 5 mgmL⁻¹ MTT çözeltisi hazırlanmıştır. 1., 3. ve 7. günlerde hücre ekili farklı doku iskeleleri üzerine 15 µL MTT çözeltisi eklenmiş ve 3 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Reaksiyonun durdurulması amacıyla doku iskeleleri üzerine 100 µL DMSO eklenmiş ve oluşan MTT-formazan kristallerinin çözünmesi için numuneler 37°C sıcaklık altında 10 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Doku iskelelerinin üzerinden alınan renk değiştirmiş sıvı numunelerin absorbansları 545 nm dalga boyunda ölçülmüş ve farklı hücre sayılarına karşı hazırlanan kalibrasyon grafiğine göre karşılaştırma yapılmıştır.

2.4.3 Nöronal yenilenmeye yardımcı kılıf ve yama üretimi ve karakterizasyonu

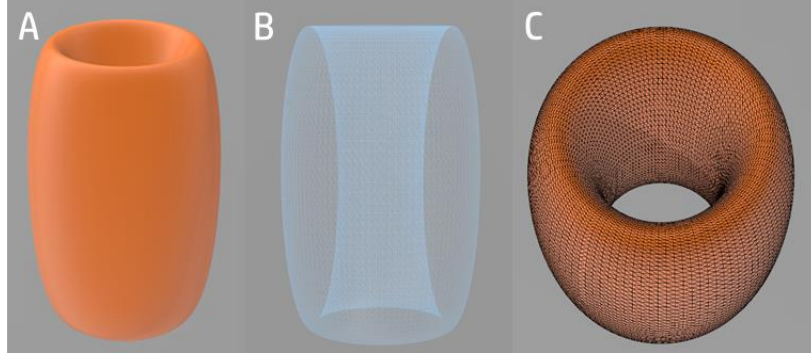
2.4.3.1 Nöronal yenilenmeye yardımcı kılıf ve yama üretimi

Bölüm 2.4.2.1’de yapılan çalışma ile belirlenen optimum basım parametreleri dahilinde nöronal yenilenmeye yardımcı kılıf ve yamalar CNC içeren biyomalzemeler kullanılarak üretilmiştir.

Üretilmesi hedeflenen kılıfların yapısal özellikleri bugüne kadar kullanılan düz yapılı tüp şeklinden farklı olarak;

- ❖ Bağlantı kurulması amaçlanan sinir uçlarının kılıfın içine gireceği bölümler geniş ve cerrahi dikiş uygulanmasına elverişli,
- ❖ Nöronal yenilenmenin gerçekleşeceği kılıfın orta-iç bölümleri dar,
- ❖ Kılıfın orta-dış bölümleri, yenilenmeye yardımcı biyomateryallerin fazla miktarda bulunması amacıyla dışa doğru geniş,

❖ Dış ortamda ve kılıfın içeriğinde bulunan biyomalzemelerin nöronal yenilenmenin gerçekleştiği iç bölümlere ulaşabilmesini sağlayacak porözite, özelliklerini içerecek şekilde tasarlanmıştır (Şekil 2.1)



Şekil 2.1. Nöronal yenilenmeye yardımcı kılıf tasarımı (A) yan görünüm, (B) iç görünüm ve (C) dik görünüm

2.4.3.2 Nöronal yenilenmeye yardımcı kılıf ve yama karakterizasyonu

Hazırlanan kılıf ve yamalar şişme testi, mekanik test, biyobozunum testleri, optik mikroskop görüntüleri ve SEM ile karakterize edilmiştir. Şişme testi için hazırlanan yapının kuru ağırlığı belirlendikten sonra yapı 1 gece boyunca oda sıcaklığında deiyonize su içerisinde bekletilerek şişirilmiştir. Daha sonra yapının şişmiş ağırlığı belirlenerek Denklem 2.1 kullanılarak şişme derecesi belirlenmiştir. Denklem 2.1 içerisinde w_s doku iskelesinin şişmiş ağırlığını ifade ederken w_d aynı doku iskelesinin kuru ağırlığını ifade etmektedir.

$$\text{Şişme derecesi (\%)} = \frac{w_s - w_d}{w_d} \times 100 \quad (2.1)$$

Biyobozunum testi için hazırlanan doku iskeleleri 21 gün boyunca fosfat tamponu (pH 7,2) çözeltisi içerisinde bekletilmiş ve yapısal özelliklerindeki değişiklikler incelenmiştir.

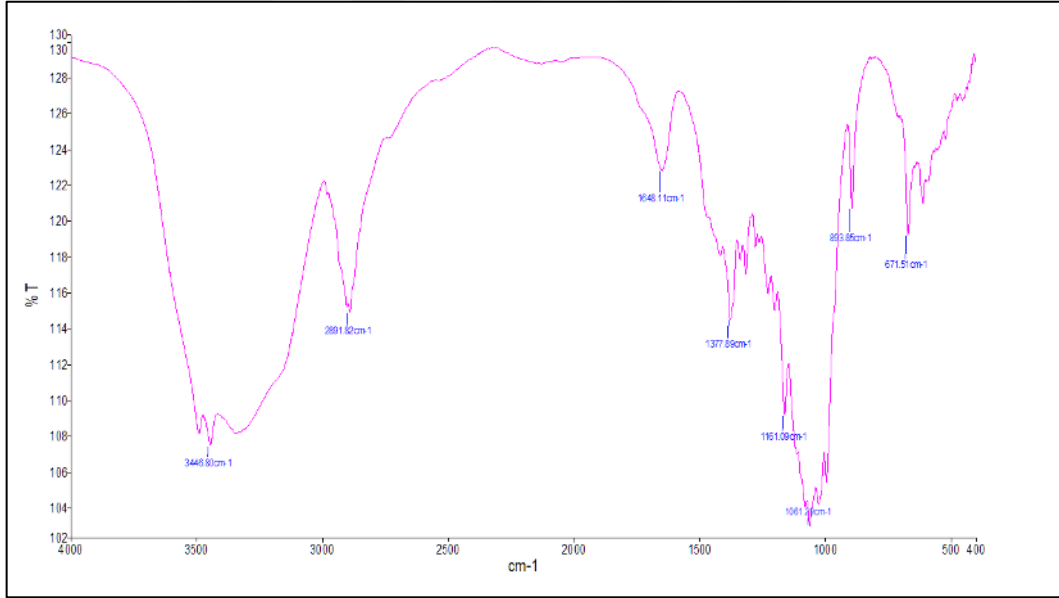
Optik mikroskop görüntüleri 0,63x ile 4x aralığında büyütme değerlerinde üretilen kılıfların yapısal özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

3 SONUÇLAR

3.1 CNC Karakterizasyonu

3.1.1 Fourier dönüşümlü kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi

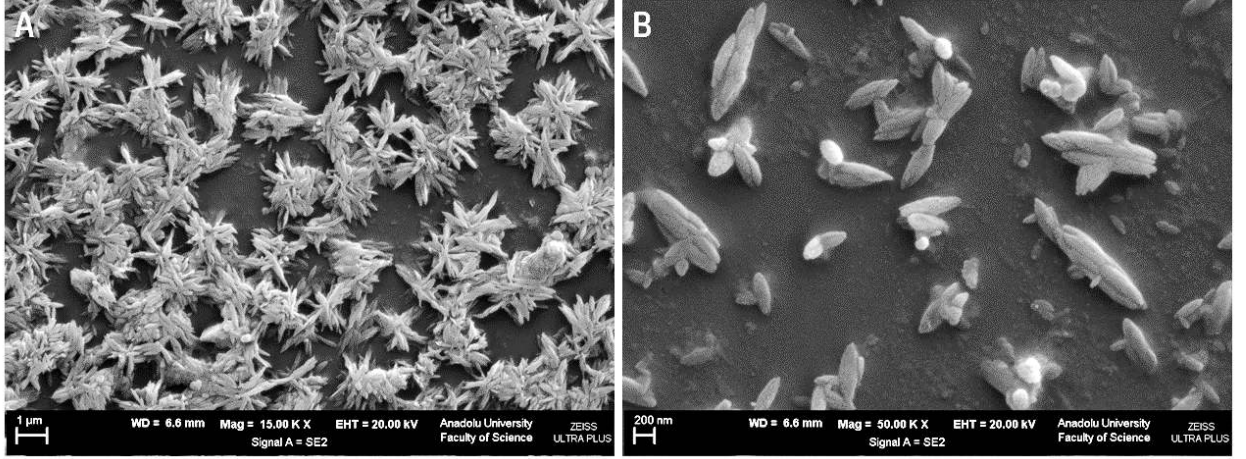
Sentezlenen CNC yapıların FTIR spektrumu (Şekil 3.1) incelendiği zaman 3650-3000 cm^{-1} aralığında gözlemlenen geniş bantın O-H gerilmesine ve 2900 cm^{-1} 'de gözlemlenen pikin C-H gerilmesine ait olduğu görülmektedir. 1400 cm^{-1} 'de gözlemlenen selüloz yapısındaki CH_2 molekülüne ait makaslama hareketine ait bant ve anhidroglukopiranoz molekülünden kaynaklanan pikler 1800-600 cm^{-1} aralığında görülmektedir. 1200 cm^{-1} 'de görülen pik CNC yapısında bulunan sülfat grubundan (S=O) kaynaklanmaktadır. Spektrumda gözlemlenen sülfat grubu, sülfürik asit hidrolizi sonucunda elde edilen CNC yapıların sülfat modifiye halde bulunduklarını ve bu sayede elektriksel iletkenlik özelliği taşıyacağını göstermektedir. Anhidroglukopiranoz molekülüne ait pikler ise selüloz iskeletin bozulmadan korunduğunu ifade etmektedir.



Şekil 3.1. Sentezlenen CNC FTIR spektrumu

3.1.2 Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

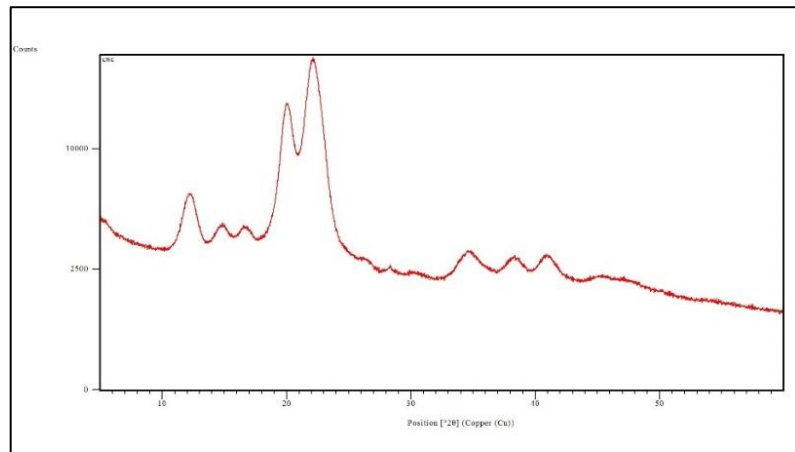
CNC yapıların SEM mikrografları incelendiğinde üretilen kristalik yapılar ve morfolojik özellikleri net bir şekilde görülebilmektedir (Şekil 3.2 A-B). Selüloz zincirleri arasında kolayca oluşan hidrojen bağlarından kaynaklanan agregasyon problemi kristallerin bir araya gelmesi şeklinde gözlemlenmiştir (Şekil 3.2 A).



Şekil 3.2. CNC yapıların SEM mikrografi

3.1.3 X-ışını kırınım (XRD) yöntemi

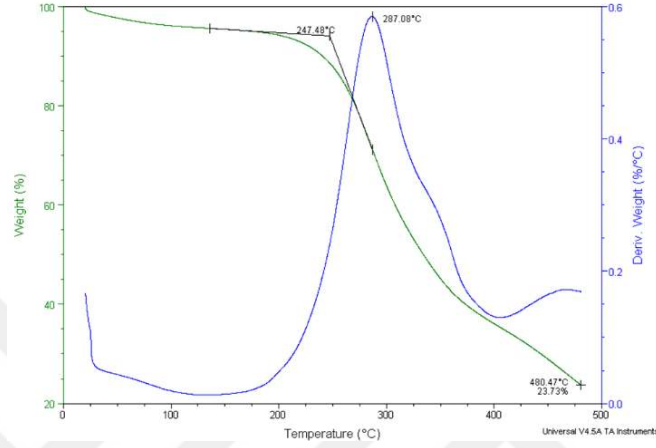
Yapılan XRD analizi (Şekil 3.3) sonunda elde edilen veriler, sentezlenen CNC'lerin kristal yapıda olduklarını göstermektedir. $2\theta=13^\circ$, 23° ve 35° 'de gözlemlenen pikler selüloz kristallerinin karakteristik pikleridir [116–118]. CNC'ler arasında meydana gelen agregasyon problemi, XRD analizi sonuçlarında kaymalara ve yapıların mikro boyut özelliği gösteriyor gibi görünmesine sebep olmuştur.



Şekil 3.3. Selüloz nano-kristallerin x-ışını kırınım (XRD) analizi sonuçları

3.1.4 Termogravimetrik analiz (TGA)

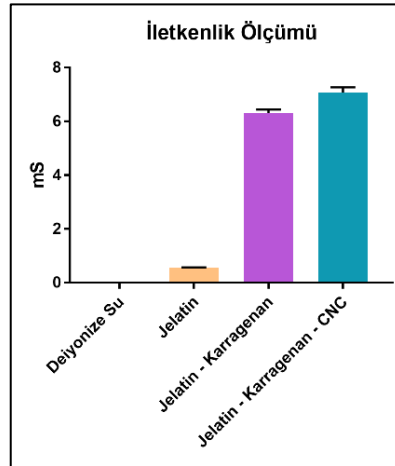
Sentezlenen CNC'ler kullanılarak elde edilen TGA eğrileri (Şekil 3.4) incelendiği zaman karakteristik CNC bozunma eğrisi görülmektedir [119]. 250°C sıcaklıkta başlayan bozunma 350°C sıcaklığa kadar hızlı bir şekilde devam etmiş ve bu noktadan sonra yavaşlamıştır.



Şekil 3.4. CNC TGA eğrisi

3.1.5 İletkenlik

Yapılan ölçümler sonucunda jelatin çözeltisine eklenen karragenanın, yapısında sahip olduğu sülfat grupları sayesinde biyomalzeme karışımının iletkenliğini yaklaşık 5,5 mS arttırdığı görülmüştür. Jelatin + karragenan çözeltisine eklenen CNC'ler ise çözeltinin iletkenliğini yaklaşık 1 mS daha arttırmıştır (Şekil 3.5). Bu sonuçlar, sülfürik asit hidrolizi yöntemi ile sentezlenen CNC'lerin yapısında içerdiği sülfat gruplarının elektriksel iletkenlik özelliğini arttırdığını göstermektedir. Bu sayede jelatin + karragenan + CNC kullanılarak hazırlanan nihai 3B yapıların iletken özellik taşıdığı gösterilmiştir.



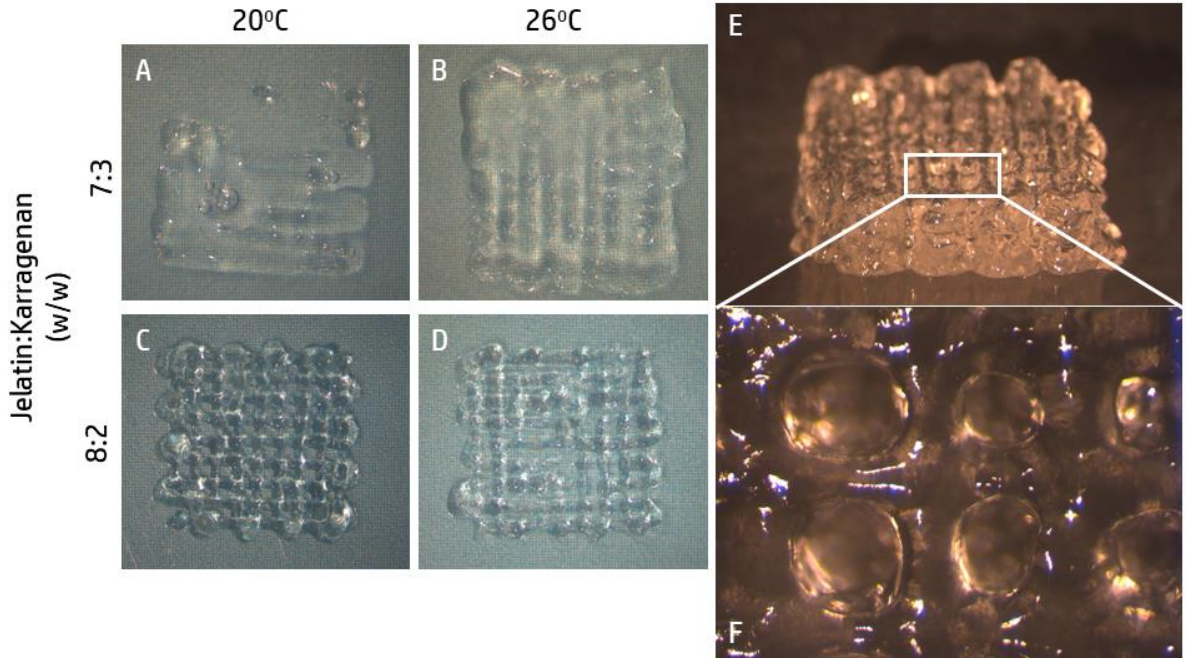
Şekil 3.5. İletkenlik ölçümü sonuçları

3.2 3D Biyobasım

3.2.1 Biyomalzeme karakterizasyonu

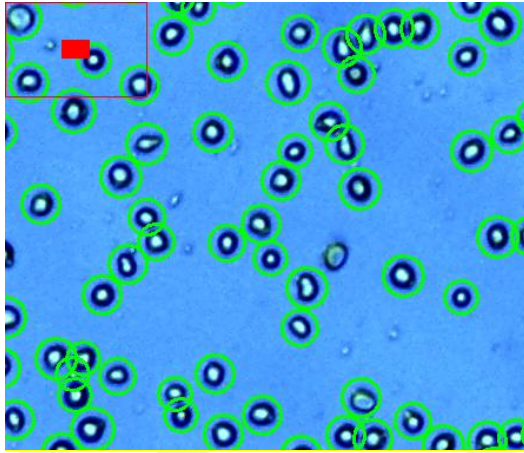
3.2.1.1 Basılabilirlik ve biyouyumluluk

Optimum biyomalzeme karışımının belirlenebilmesi amacıyla Bölüm 2.4.1’de anlatıldığı gibi hazırlanan farklı derişimlerde jelatin ve karragenan çözeltileri içeren karışımlar farklı sıcaklıklarda 25G iğne ucu kullanılarak basılmıştır. Yapılan denemeler sonucunda 8:2 jelatin:karragenan (w/w) karışımının optimum karışım olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.6 A-D). Optimum sıcaklığın belirlenmesi çalışmasında seçilen biyomalzeme karışımının basılabilmesi için gereken basınç, hücrelerin biyobasım aşamasında zarar görmemesi için gerekli olan “ $\leq 1,5$ bar” değerinden çok büyük olduğu için (3 bar) kullanılan 25G iğne ucu değiştirilerek 22G iğne ucu kullanılmıştır. Bu denemelerin sonucunda oda sıcaklığında düşük basınç değerlerinde ($\leq 1,5$ bar) doku iskeleleri basılabilmiştir (Şekil 3.6 E-F)



Şekil 3.6. Jelatin-Karraeenan biyomalzeme (A) (w/w) 7:3 jelatin:karragenan 20°C 25G iğne ucu, (B) (w/w) 7:3 jelatin:karragenan 26°C 25G iğne ucu, (C) (w/w) 8:2 jelatin:karragenan 20°C 25G iğne ucu, (D) (w/w) 8:2 jelatin:karragenan 26°C 25G iğne ucu ve (E) (w/w) 8:2 jelatin:karragenan 26°C 22G iğne ucu, (F)) (w/w) 8:2 jelatin:karragenan 26°C 22G iğne ucu (büyütülmüş) değerleri ile basılmış doku iskeleleri

Hücre kültürü ortamında çoğaltılan hücreler 3B hücre kültürü için doku iskeleleri üzerine ekilmeden önce %99 canlılık göstermiştir (Şekil 3.7 ve Tablo 3.1).



Şekil 3.7. Hücre kültürü ortamında çoğaltılan hücre canlılığı ve sayımı

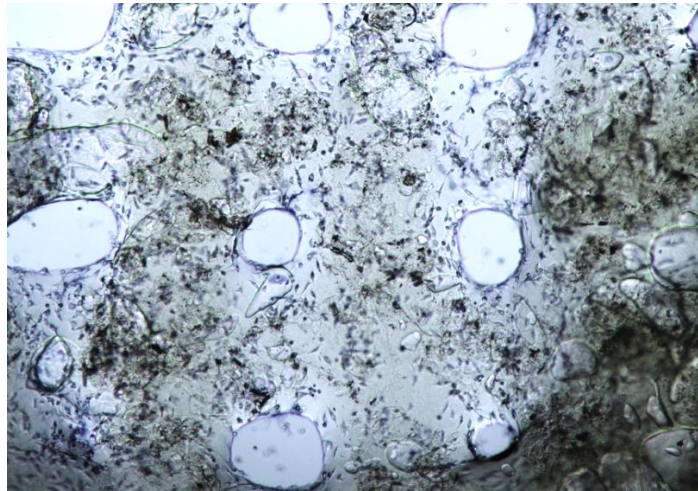
Tablo 3.1. Hücre çoğaltılması ve sayımı sonuçları

Toplam Hücre Yoğunluğu	9.55x10 ⁶ hücre/mL
Canlı Hücre Yoğunluğu	9.48 x10 ⁶ hücre/mL
Ölü Hücre Yoğunluğu	7.77 x10 ⁶ hücre/mL
Canlılık Oranı (%)	99.2
Ortalama Hücre Boyutu	17.5 µm
Toplam Hücre Sayısı	2090
Canlı Hücre Sayısı	2073
Ölü Hücre Sayısı	17

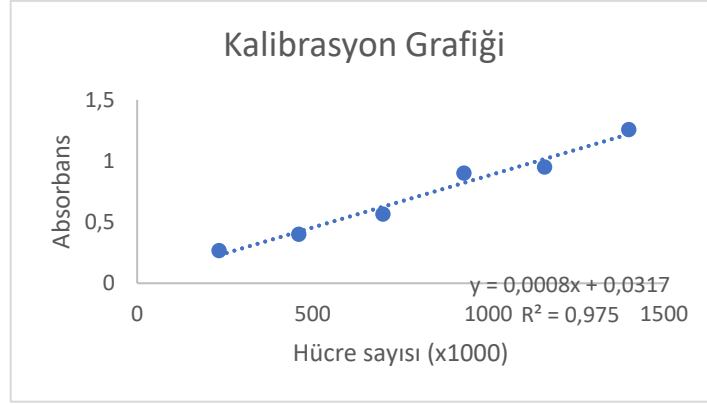
Biyouyumluluk testi sonuçlarına göre (Tablo 3.2 ve Şekil 3.8) doku iskeleleri üzerine ekilen hücrelerin 5. gün sonunda sitotoksik etkiye maruz kalmadıkları ve canlılıklarını sürdürerek üremeye devam ettikleri görülmektedir. Ölçülen absorbans değerlerinin ifade ettiği hücre sayıları çizilen kalibrasyon grafiği kullanılarak hesaplanmıştır (Şekil 3.9).

Tablo 3.2. Biyouyumluluk testi sonuçları

	Absorbans	~ Hücre Sayısı
1. Gün	0,149	1.5 x 10 ⁵
3. Gün	0,549	6.5 x 10 ⁵
5. Gün	1,101	1.4 x 10 ⁶



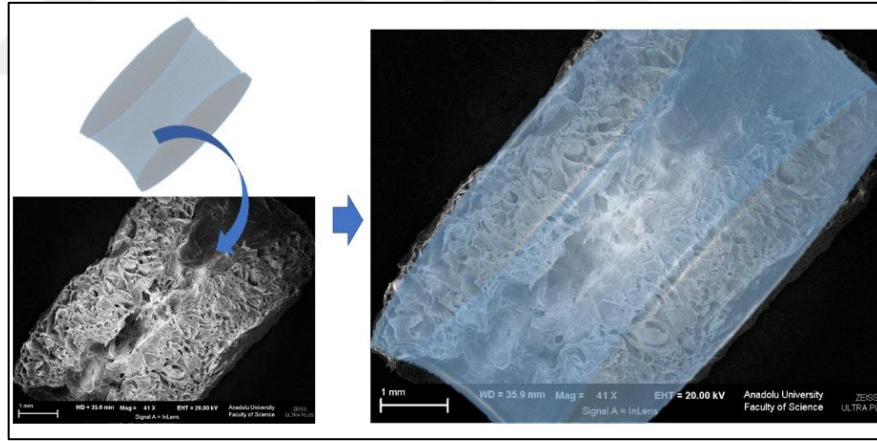
Şekil 3.8. Biyouyumluluk testi ile görüntülenen doku iskelesi üzerinde üremeyi sürdüren hücreler



Şekil 3.9. Hücre sayısına göre kalibrasyon grafiği

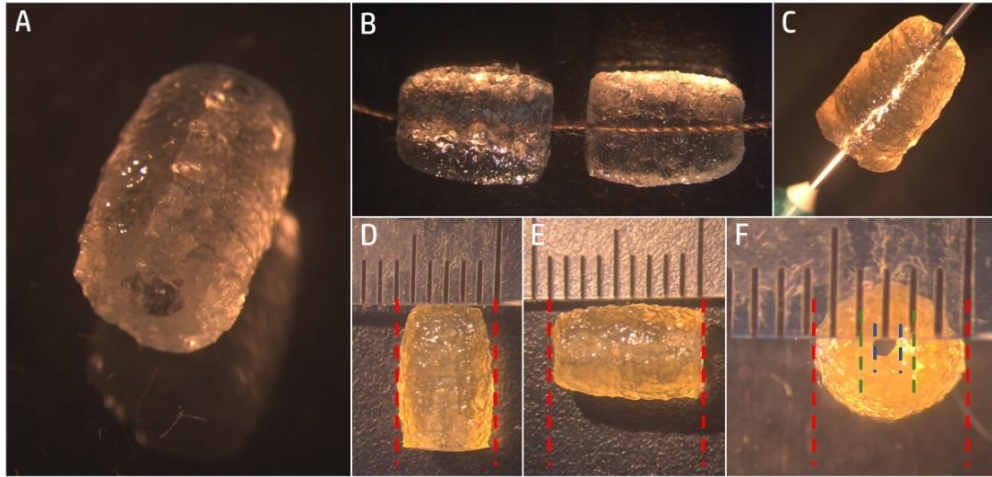
3.2.2 Nöronal yenilenmeye yardımcı kılıf ve yama üretimi ve karakterizasyonu

Bölüm 3.2.1.1’de belirlenen optimum biyomalzeme derişimi ve optimum basım parametreleri kullanılarak üretilen 3B kılıflar CAD ile belirlenen 7,5 mm uzunluk, 5,5 mm en geniş bölgede dış çeper çapı 1,5 mm giriş delik çapı ve 1 mm iç delik çapı ölçülerinde elde edilmiştir (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. Üretilen 3B yapıların CAD ile uyumu

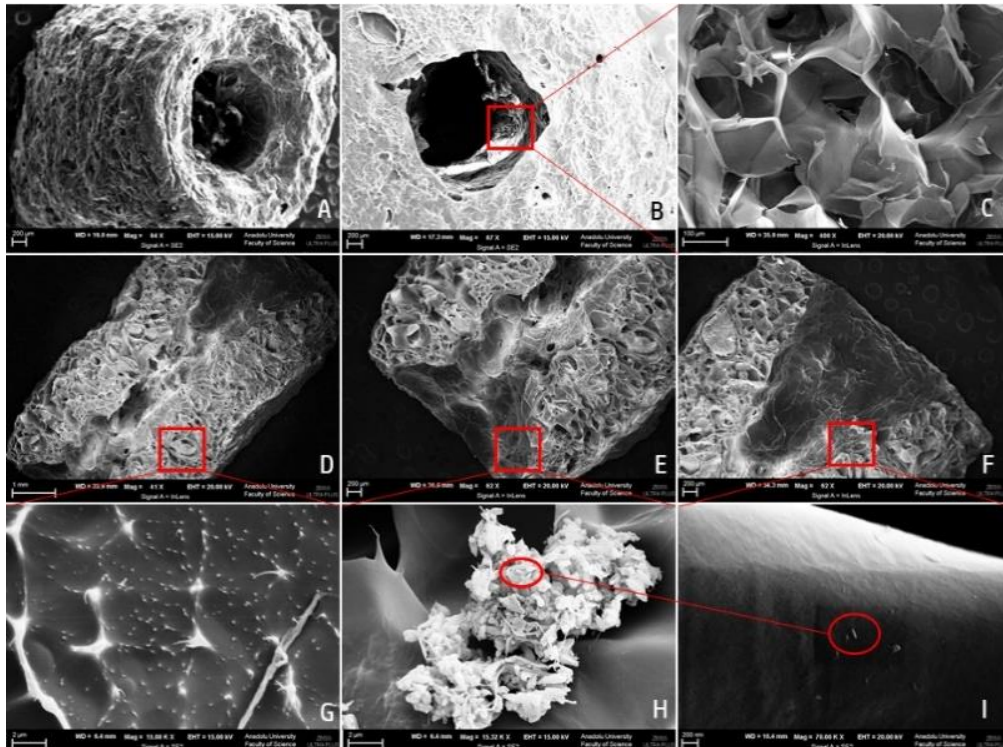
Yapıların boyutlarında gözlemlenen yaklaşık %10’luk sapma (Şekil 3.11 D-F), kullanılan biyomalzemenin hidrojel özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Biyobasım aşamasında yapı üzerinde çökme ve yayılmalar meydana gelmektedir. Bu sorunun önüne geçmek amacıyla biyobasım işleminden hemen sonra yapılar %1 (v/v) glutaraldehit çözeltisi ile 1 saat süreyle oda sıcaklığında çapraz bağlanmıştır. Çapraz bağlanma sonrasında deiyonize su ile yıkanan yapıların boyut özelliklerini test edilen 3 hafta boyunca korudukları gözlemlenmiştir (Şekil 3.11 A-C).



Şekil 3.11. Üretilen 3B kılıflar

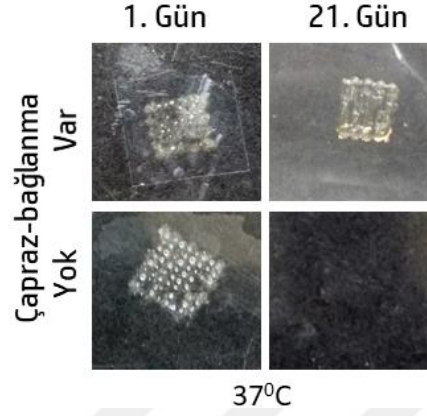
Çapraz bağlanma sonrasında 3B yapıların poröz özellikleri SEM ile gözlemlenmiştir (Şekil 3.12 A-F). CNC'ler arasında karşılaşılan agregasyon problemi, yapı içerisine gömülü CNC'ler arasında da görülebilmektedir (Şekil 3.12 G-H).

Yapıların yüksek porözite özellikleri şişme testi sonuçları ile desteklenmiştir. Yapılan şişme testi sonucunda kuru ağırlığı (w_d) 4,6 mg olan yapının şişmiş ağırlığı (w_s) 67,8 mg bulunmuştur. Denklem 1 kullanılarak yapılan hesaplamalar sonucunda yapının şişme derecesi %1373,91 olarak hesaplanmıştır. Bu değer yapının yüksek su tutma kapasitesinin bir göstergesidir.



Şekil 3.12. 3B kılıfların SEM mikrografları

Üretilen 3B yapıların biyobozunum testi sonuçları, %1 glutaraldehit çözeltisi ile 1 saat süreyle çapraz-bağlanmış yapıların yapısal özelliklerini test süresi olan 21 gün boyunca korudukları görülmüştür (Şekil 3.13).



Şekil 3.13. Biyobozunum testi

4 TARTIŞMA

Bu tez kapsamında insanlığın tıp ve iyileşme arasındaki bağlantıyı keşfettiği günden bu yana ilgi duyduğu yenilenebilir tıp alanında bir çalışma yapılmıştır. Yenilenebilir tıp çalışmaları kapsamında son yıllarda önemini arttırmış olan doku ve organ mühendisliği çalışmaları ilerleyişini hızla sürdürmekte ve gelişime açık özelliğini korumaktadır.

Doku ve organ mühendisliği araştırmaları kapsamında kaydedilen başarıların tamamına yakını doku düzeyindedir. Bunun sebebi olarak organların, dokulara göre çok daha karmaşık yapılar olması gösterilebilir. Doku düzeyinde yapılan çalışmalar, birden fazla farklı hücre tipini içeren dokuların karmaşık gelişim mekanizmalarının keşfedilememiş olmasından dolayı tek tip hücre içeren dokular üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu dokulara örnek olarak kıkırdak gösterilebilir. Hücresel düzeyde gelişim ve yenilenme mekanizmasının tam olarak aydınlatılamadığı sinir dokusu üzerine yapılan çalışmalar ise dünya çapında keşfedilmeyi bekleyen önemli yenilikler barındırmaktadır [96,120,121].

Bu bilgiler ışığında, bu tez kapsamında yapılan çalışma, nöronal yenilenme konusu üzerinde şekillenmiştir.

Doku ve organ mühendisliği araştırmalarında kullanılan cihazlar, çalışmanın konusuna göre değişiklik göstermektedir. Yüksek detaylı üretim olanağı, hücrelerin üretim esnasında zarar görmeden yaşamlarını sürdürebilme imkanlarının olması ve

Üretim aşamasında kullanılabilecek biyomalzemelerin çeşitliliğinin oldukça fazla olması gibi sebeplerden ötürü pnömatik temelli 3B biyoyazıcı sistemi, tez kapsamında yapılan çalışmalarda kullanılmıştır.

Nöronal yenilenme mekanizmasında hücrelerin içinde bulunduğu ortamın elektriksel iletkenlik özellik gösteriyor olmasının olumlu etkisi daha önce yapılan çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir [84,122–124]. Buna bağlı olarak tez kapsamında yapılan çalışmalarda elektriksel iletkenlik özelliği yüksek olan sülfat grupları ile modifiye edilmiş selüloz nano-kristal yapılar kullanılmıştır. Sülfat modifiye selüloz nano-kristal yapılar ticari pamuk kullanılarak sülfürik asit hidrolizi yöntemi ile sentezlenmiştir. Sentezlenen yapıların kimyasal zellikleri IR spektroskopisi, XRD analizi, TGA analizi ve kondüktometrik ölçümler ile iletkenlik özelliklerinin incelenmesi ile aydınlatılmıştır. Kristallerin morfolojik özellikleri ise SEM mikrografları ile analiz edilmiştir. XRD analizi sonuçlarında gözlemlenen selüloz kristallerine ait karakteristik pikler selüloz-kristalik yapının bozulmadığını, IR spektrumunda gözlemlenen sülfat grubuna ait pikler ise sülfat modifikasyonunun başarılı olduğunu göstermektedir. TGA sonuçlarında görülen yapının sıcaklığa bağlı bozunma eğrilerinin karakteristik CNC yapılara ait eğrilerin özelliklerini taşıyor olması, CNC sentezinin başarı göstergelerini desteklemektedir. Kondüktometrik ölçümlerin sonucu ise sülfat modifiye selüloz nano-kristallerin elektriksel iletkenlik özelliğini göstermektedir. SEM mikrografları ile selüloz nano-kristal üretiminde karşılaşılan en önemli sorun olan agregasyon probleminin gözlemlenmesi, XRD analizi sonuçlarında karşılaşılan sapmalara bir açıklama getirmiştir. Ayrıca görüntülerde kristalik yapıların nano boyutlarda görülmesi, sentez basamağının başarısını kanıtlamaktadır.

Nöronal yenilenme çalışmalarında yaygın şekilde kullanılan kılıfların en önemli sorunlarının başında yapısal özellikleri gösterilebilir. Kılıfın iinin tamamen boş veya tamamen dolu olması nöronal yenilenmeyi olumsuz yönde etkilerken maksimum yenilenme başarımı için geliştirilmiş bir optimum yapı verisi bulunmamaktadır [112,125–128]. Bu sebeple bu tez kapsamında yapılan çalışmalarda, nöronal yenilenmeye yardımcı kılıf yeni yapısal ölçülerde üretilmiştir. Hasarlı sinir uçlarının kılıf içerisine yerleştirileceği kılıfın iki ağzı geniş ve cerrahi dikiş uygulamasına uygun, yenilenmenin gerçekleşeceği kılıfın iç kısımları ise yüksek oranda biyomalzeme etkileşimine uygun olarak dar, kılıfın orta bölgesinin dışı ise biyomalzeme içeriğinin arttırılabilmesi amacıyla

geniş olacak şekilde CAD ile biçimlendirilmiş ve bu tasarıma uygun bir şekilde üretim gerçekleştirilmiştir. Tarih itibariyle yapılmış olan çalışmalar sinir hasarının 1 cm'den daha uzun olduğu durumlarda yenilenme başarımının %50'den daha düşük olduğunu göstermektedir [89,129,130]. Bu sebeple tez kapsamında üretilen kılıfların uzunluğu 7,5 mm olarak belirlenmiştir. Yapı, iç kanal çapı girişte 1,5 mm ve ortada 1 mm, dış çapı ise en geniş bölgede 5,5 mm olacak şekilde tasarlanmıştır.

Kılıf üretiminde kullanılan biyomalzemeler, yüksek biyouyumluluk göstermesi ve hücre tutunmasını sağlayan aminoasit dizilimini içermesi sebebiyle jelatin temelinde geliştirilmiş olup, iletkenliği artırıcı etki göstermesi amacıyla yapısında sülfat grubu içeren biyouyumlu karragenanın jelatine yardımcı destek malzemesi olarak eklenmesiyle şekillenmiştir. Jelatin – karragenan karışımına eklenen selüloz nano-kristaller ile oluşturulan nihai biyomalzeme karışımının basılabilirlik özellikleri farklı sıcaklıklarda, farklı iğne uçları kullanılarak farklı basınç değerleri ile belirlenmiştir. Sonuç olarak, geliştirilen iletken biyomalzeme, hücre içeren biyomürekkep kullanılarak yapılacak çalışmalarda kullanılabilecek basılabilirlik parametreleri sınırları çerçevesinde geliştirilmiştir. Literatürde yer alan çalışmalarda kullanılan polimerik yapılar sentetik polimerler çevresinde yoğunlaşmış olmakla beraber hibrit polimerik karışımların kullanımının azlığı göze çarpmaktadır [131–134].

Üretilen nöronal yenilenmeye yardımcı kılıfların gerekli biyomoleküllerin yapı içine geçişine olanak sağlayacak şekilde sahip olduğu porözite, detaylı SEM mikrografları ile gözlemlenmiş olup yapısal mukavemet özellikleri, biyobozunum testi uygulanarak gösterilmiştir.

Kullanılan biyomalzemelerin ve çapraz bağlama yönteminin hücre yaşayabilirliğine olumsuz etki göstermediği ise yapılan biyouyumluluk testleri ile gösterilmiştir

Sonuç olarak, doku ve organ mühendisliği çalışmalarında yeni gelişmelere en açık alanlardan birisi olan sinir dokusu mühendisliği araştırmalarında kullanılabilecek, gerekli özelliklere sahip olduğu kanıtlanmış, yeni tasarımlı bir kılıf bu tez kapsamında yapılan çalışmalar sonucunda üretilmiştir. Üretilen kılıfın ülkemiz ve dünya literatürüne yenilikçi bir bakış açısı getiriyor olması, tez kapsamında yapılan çalışmaların en önemli hedef ve sonuçlarından birisidir.

KAYNAKÇA

- [1] J. Goethe, Faust (Part 2) Act 1: Laboratory, Harmondsworth Penguin, 1831.
- [2] S.F. Badylak, A.J. Russell, M. Santin, Introduction: History of Regenerative Medicine, in: Strateg. Regen. Med., Springer New York, New York, NY, 2009: pp. 1–13. doi:10.1007/978-0-387-74660-9_1.
- [3] S. V Murphy, A. Atala, 3D bioprinting of tissues and organs, Nat. Biotechnol. 32 (2014) 773–785. doi:10.1038/nbt.2958.
- [4] C.K. Chua, W.Y. Yeong, Bioprinting: Principles and Applications, 2014. doi:10.1142/9193.
- [5] I.T. Ozbolat, Introduction, in: 3D Bioprinting, Elsevier, 2017: pp. 1–12. doi:10.1016/B978-0-12-803010-3.00001-9.
- [6] D. Hutmacher, T. Woodfield, P. Dalton, J. Lewis, Scaffold design and fabrication, in: Tissue Eng., Elsevier, 2008: pp. 403–454. doi:10.1016/B978-0-12-370869-4.00014-8.
- [7] I.T. Ozbolat, The Bioink, in: 3D Bioprinting, Elsevier, 2017: pp. 41–92. doi:10.1016/B978-0-12-803010-3.00003-2.
- [8] P.D. Dalton, A.R. Harvey, M. Oudega, G.W. Plant, Tissue Engineering of the Nervous System, in: Tissue Eng., Elsevier, 2014: pp. 583–625. doi:10.1016/B978-0-12-420145-3.00017-1.
- [9] C.A. van Blitterswijk, Tissue Engineering - an introduction, in: Tissue Eng., 2008: pp. xiv–xxxvi. doi:10.1016/B978-0-12-370869-4.00014-8.
- [10] J.P. Vacanti, C.A. Vacanti, The History and Scope of Tissue Engineering, in: Princ. Tissue Eng., Academic Press, 2014: pp. 3–8. doi:10.1016/B978-0-12-398358-9.00001-X.
- [11] U. Meyer, The History of Tissue Engineering and Regenerative Medicine in Perspective, in: Fundam. Tissue Eng. Regen. Med., Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2009: pp. 5–12. doi:10.1007/978-3-540-77755-7_1.
- [12] J.P. Bennett, A history of the Queen Victoria Hospital, East Grinstead, Br. J. Plast.

- Surg. 41 (1988) 422–440. doi:10.1016/0007-1226(88)90088-4.
- [13] J.P. Merrill, J.H. Harrison, J. Murray, W.R. Guild, Successful Homotransplantation of the Kidney in an Identical Twin, *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* (1956) 166–173.
 - [14] S.V. Murphy, A. Atala, Organ engineering - combining stem cells, biomaterials, and bioreactors to produce bioengineered organs for transplantation, *BioEssays*. 35 (2013) 163–172. doi:10.1002/bies.201200062.
 - [15] National Research Council and Institute of Medicine, *Stem Cells and the Future of Regenerative Medicine*, National Academies Press, Washington, D.C., 2002. doi:10.17226/10195.
 - [16] I. Wilmut, A.E. Schnieke, J. McWhir, A.J. Kind, K.H.S. Campbell, Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells, *Nature*. 385 (1997) 810–813. doi:10.1038/385810a0.
 - [17] Y. Kato, Eight Calves Cloned from Somatic Cells of a Single Adult, *Science* (80-.). 282 (1998) 2095–2098. doi:10.1126/science.282.5396.2095.
 - [18] D. Normile, Here's the Beef: Japan Clones Adult Cows, (1998). <https://www.sciencemag.org/news/1998/12/heres-beef-japan-clones-adult-cows>.
 - [19] M.S. Rutenberg, T. Hamazaki, A.M. Singh, N. Terada, Stem Cell Plasticity, Beyond Alchemy, *Int. J. Hematol.* 79 (2004) 15–21. doi:10.1007/BF02983528.
 - [20] K. Takahashi, S. Yamanaka, Y. Zhang, Y. Li, C. Feng, X. Li, L. Lin, L. Guo, H. Wang, C. Liu, Y. Zheng, C. Luo, Q. Liu, F. Wang, H. Sun, L. Liang, L. Li, H. Su, J. Chen, D. Pei, H. Zheng, K. Takahashi, S. Yamanaka, S. Nishikawa, R. Goldstein, C. Nierras, M. Li, M. Chen, W. Han, X. Fu, M. Ieda, J. Fu, P. Delgado-Olguin, V. Vedantham, Y. Hayashi, B. Bruneau, T. Vierbuchen, A. Ostermeier, Z. Pang, Y. Kokubu, T. Sudhof, M. Wernig, J. Xu, Y. Du, H. Deng, O. Torper, U. Pfisterer, D. Wolf, M. Pereira, S. Lau, J. Jakobsson, Y. Xue, K. Ouyang, J. Huang, Y. Zhou, H. Ouyang, H. Li, Z. Guo, L. Zhang, Z. Wu, Y. Chen, F. Wang, G. Chen, P. Hou, Y. Li, X. Zhang, C. Liu, J. Guan, H. Li, L. Wang, L. Wang, W. Huang, H. Su, Y. Xue, Z. Su, X. Li, X. Zuo, J. Jing, Y. Ma, J. Wang, D. Liu, W. Hu, B. Qiu, W. Guan, Q. Wang, M. Wang, W. Li, S. Kaech, G. Banker, J. Weng, X. Du, S.

- Geng, Y. Peng, Z. Wang, Z. Lu, S. Panula, R.R. Pera, L. Wang, L. Wang, W. Huang, H. Su, Y. Xue, Z. Su, H. Su, L. Wang, W. Huang, D. Qin, J. Cai, X. Yao, H. Suh, A. Consiglio, J. Ray, T. Sawai, K. D'Amour, F. Gage, G. Baltus, M. Kowalski, H. Zhai, A. Tutter, D. Quinn, D. Wall, O.B.U. Halbach, T. Ng, V. Fortino, D. Pelaez, H. Cheung, Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors, *Cell*. 126 (2006) 663–676. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024.
- [21] I. V. Yannas, The Irreversibility of Organ Injury, in: *Tissue Organ Regen. Adults*, 2nd ed., Springer New York, New York, NY, 2015: pp. 1–25. doi:10.1007/978-1-4939-1865-2_1.
- [22] R.A. Brown, *Extreme Tissue Engineering*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 2013. doi:10.1002/9781119941064.
- [23] I. V. Yannas, Similarities and differences between induced organ regeneration in adults and early foetal regeneration, *J. R. Soc. Interface*. 2 (2005) 403–417. doi:10.1098/rsif.2005.0062.
- [24] K. Jacyniak, R.P. McDonald, M.K. Vickaryous, Tail regeneration and other phenomena of wound healing and tissue restoration in lizards, *J. Exp. Biol.* 220 (2017) 2858–2869. doi:10.1242/jeb.126862.
- [25] TC Sağlık Bakanlığı, Organ Nakli Bekleyen Hasta Sayıları, 2018. <https://organkds.saglik.gov.tr/KamuyaAcikRapor.aspx?q=ORGANBEKLEME>.
- [26] TC Sağlık Bakanlığı, Organ Bağışı Sayıları, 2018. <https://organkds.saglik.gov.tr/KamuyaAcikRapor.aspx?q=ORGANNAKLI>.
- [27] E.T. Pashuck, M.M. Stevens, Designing Regenerative Biomaterial Therapies for the Clinic, 4 (2012) 1–12.
- [28] A. Vishwakarma, P. Sharpe, S. Shi, M. Ramalingam, An Introduction to Stem Cell Biology and Tissue Engineering, in: *Stem Cell Biol. Tissue Eng. Dent. Sci.*, Elsevier Inc., 2014: pp. 1–13. doi:10.1016/B978-0-12-397157-9.00001-1.
- [29] H. Green, The birth of therapy with cultured cells, *BioEssays*. 30 (2008) 897–903. doi:10.1002/bies.20797.

- [30] I. V. Yannas, J.F. Burke, Design of an artificial skin. I. Basic design principles, J. Biomed. Mater. Res. 14 (1980) 65–81. doi:10.1002/jbm.820140108.
- [31] R. Langer, J.P. Vacanti, Tissue Engineering, Science (80-.). 260 (1993) 920–926. doi:10.1080/00131725009342110.
- [32] Y. Cao, J.P. Vacanti, K.T. Paige, J. Upton, C.A. Vacanti, Transplantation of Chondrocytes Utilizing a Polymer-Cell Construct to Produce Tissue-Engineered Cartilage in the Shape of a Human Ear, Plast. Reconstr. Surg. 100 (1997) 297–302.
- [33] F. Oberpenning, J. Meng, J.J. Yoo, A. Atala, De novo reconstitution of a functional mammalian urinary bladder by tissue engineering, Nat. Biotechnol. 17 (1999) 149–155. doi:10.1038/6146.
- [34] S.P. Hoerstrup, R. Sodian, S. Daebritz, J. Wang, E.A. Bacha, D.P. Martin, A.M. Moran, K.J. Guleserian, J.S. Sperling, S. Kaushal, J.P. Vacanti, F.J. Schoen, J.E. Mayer Jr., Functional living trileaflet heart valves grown in vitro, Circulation. 102 (2000) III44-III49. doi:10.1161/01.CIR.102.SUPPL_3.III-44.
- [35] A.E. Jakus, A.L. Rutz, S.W. Jordan, A. Kannan, S.M. Mitchell, C. Yun, K.D. Koube, S.C. Yoo, H.E. Whiteley, C. Richter, R.D. Galiano, W.K. Hsu, S.R. Stock, E.L. Hsu, R.N. Shah, Hyperelastic “ bone ” : A highly versatile , growth factor – free , osteoregenerative , scalable , and surgically friendly biomaterial, Sci. Transl. Med. 8 (2016) 1–16.
- [36] F. Gilbert, C.D. O’Connell, T. Mladenovska, S. Dodds, Print Me an Organ? Ethical and Regulatory Issues Emerging from 3D Bioprinting in Medicine, Sci. Eng. Ethics. 24 (2018) 73–91. doi:10.1007/s11948-017-9874-6.
- [37] T. Woodfield, K. Lim, P. Morouço, R. Levato, J. Malda, F. Melchels, Biofabrication in Tissue Engineering, 2017. doi:10.1016/B978-0-12-803581-8.10221-8.
- [38] M.E. Furth, A. Atala, Current and Future Perspectives of Regenerative Medicine, in: Princ. Regen. Med., Elsevier, 2008: pp. 2–15. doi:10.1016/B978-012369410-2.50003-6.
- [39] C.Y. Tachibana, Stem-cell culture moves to the third dimension, Nature. 558

- (2018) 329–331. doi:10.1038/d41586-018-05380-x.
- [40] R.G. Harrison, M.J. Greenman, F.P. Mall, C.M. Jackson, Observations of the living developing nerve fiber, *Anat. Rec.* 1 (1907) 116–128. doi:10.1002/ar.1090010503.
 - [41] V. Paramesh, S.R. Kaviya, E. Anuradha, F.D.P. Solomon, 3D Cell Culture Systems : Advantages and Applications, (2015) 16–26. doi:10.1002/jcp.24683.
 - [42] R. Edmondson, J.J. Broglie, A.F. Adcock, L. Yang, Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors, *Assay Drug Dev. Technol.* 12 (2014) 207–218. doi:10.1089/adt.2014.573.
 - [43] R.I. Freshney, *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*, 6th ed., 2010.
 - [44] E. Fennema, N. Rivron, J. Rouwkema, C. van Blitterswijk, J. De Boer, Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues, *Trends Biotechnol.* 31 (2013) 108–115. doi:10.1016/j.tibtech.2012.12.003.
 - [45] M. Kapałczyńska, T. Kolenda, W. Przybyła, M. Zajączkowska, A. Teresiak, V. Filas, M. Ibbs, R. Bliźniak, Ł. Łuczewski, K. Lamperska, 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures, *Arch. Med. Sci.* 14 (2018) 910–919. doi:10.5114/aoms.2016.63743.
 - [46] K. Duval, H. Grover, L. Han, Y. Mou, A.F. Pegoraro, J. Fredberg, Z. Chen, Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture, *Physiology.* 32 (2017) 266–277. doi:10.1152/physiol.00036.2016.
 - [47] D. Huh, G.A. Hamilton, D.E. Ingber, From 3D cell culture to organs-on-chips, *Trends Cell Biol.* 21 (2011) 745–754. doi:10.1016/j.tcb.2011.09.005.
 - [48] Y. Lou, A.W. Leung, Next generation organoids for biomedical research and applications, *Biotechnol. Adv.* 36 (2018) 132–149. doi:10.1016/j.biotechadv.2017.10.005.
 - [49] J.A. Davies, Organoids and mini-organs, in: *Organs and Organoids*, Elsevier, 2018: pp. 3–23. doi:10.1016/B978-0-12-812636-3.00001-8.

- [50] Y. Luo, G. Engelmayer, D.T. Auguste, L. da Silva Ferreira, J.M. Karp, R. Saigal, R. Langer, 3D Scaffolds, in: *Princ. Tissue Eng.*, Elsevier, 2014: pp. 475–494. doi:10.1016/B978-0-12-398358-9.00024-0.
- [51] G.C. Engelmayer, M. Cheng, C.J. Bettinger, J.T. Borenstein, R. Langer, L.E. Freed, Accordion-like honeycombs for tissue engineering of cardiac anisotropy, *Nat. Mater.* 7 (2008) 1003–1010. doi:10.1038/nmat2316.
- [52] B. Duan, M. Wang, Customized Ca-P/PHBV nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering: design, fabrication, surface modification and sustained release of growth factor, *J. R. Soc. Interface.* 7 (2010) S615–S629. doi:10.1098/rsif.2010.0127.focus.
- [53] S.J. Hollister, E.E. Liao, E.N. Moffitt, C.G. Jeong, J.M. Kemppainen, Defining Design Targets for Tissue Engineering Scaffolds, in: *Fundam. Tissue Eng. Regen. Med.*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2009: pp. 521–537. doi:10.1007/978-3-540-77755-7_38.
- [54] Y. Deng, J. Kuiper, *Functional 3D Tissue Engineering Scaffolds, Materials, Technologies, and Applications*, 2017.
- [55] R.N. Babita Mahanta, An Overview of Various Biomimetic Scaffolds: Challenges and Applications in Tissue Engineering, *J. Tissue Sci. Eng.* 05 (2014). doi:10.4172/2157-7552.1000137.
- [56] T. Lu, Y. Li, T. Chen, Techniques for fabrication and construction of three-dimensional scaffolds for tissue engineering, *Int. J. Nanomedicine.* (2013) 337. doi:10.2147/IJN.S38635.
- [57] F. Guillemot, V. Mironov, M. Nakamura, Bioprinting is coming of age: report from the International Conference on Bioprinting and Biofabrication in Bordeaux (3B'09), *Biofabrication.* 2 (2010) 010201. doi:10.1088/1758-5082/2/1/010201.
- [58] C.W. Hull, Apparatus for production of three-dimensional objects by stereolithography, US4575330A, 1986. <https://patents.google.com/patent/US4575330A/en>.
- [59] Y.S. Zhang, R. Oklu, M.R. Dokmeci, A. Khademhosseini, Three-dimensional

- bioprinting strategies for tissue engineering, Cold Spring Harb. Perspect. Med. 8 (2018). doi:10.1101/cshperspect.a025718.
- [60] A. Skardal, Bioprinting essentials of cell and protein viability, Elsevier Inc., 2015. doi:10.1016/B978-0-12-800972-7.00001-3.
- [61] S.K. Williams, J.B. Hoying, Bioinks for Bioprinting, in: Bioprinting Regen. Med., 2015: pp. 1–31. doi:10.1007/978-3-319-21386-6_1.
- [62] Z. Zhang, O. Ortiz, R. Goyal, J. Kohn, Biodegradable Polymers, in: Princ. Tissue Eng., Elsevier, 2014: pp. 441–473. doi:10.1016/B978-0-12-398358-9.00023-9.
- [63] M. Gomes, H. Azevedo, P. Malafaya, S. Silva, J. Oliveira, G. Silva, R. Sousa, J. Mano, R. Reis, Natural Polymers in tissue engineering applications, in: Tissue Eng., Elsevier, 2008: pp. 145–192. doi:10.1016/B978-0-12-370869-4.00006-9.
- [64] D. Nandan, G.A. Cates, E.H. Ball, B.D. Sanwal, A collagen-binding protein involved in the differentiation of myoblasts recognizes the Arg-Gly-Asp sequence, Exp. Cell Res. 179 (1988) 289–297. doi:10.1016/0014-4827(88)90368-0.
- [65] M.D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, Variants of the cell recognition site of fibronectin that retain attachment-promoting activity., Proc. Natl. Acad. Sci. 81 (1984) 5985–5988. doi:10.1073/pnas.81.19.5985.
- [66] R.O. Hynes, Integrins: A family of cell surface receptors, Cell. 48 (1987) 549–554. doi:10.1016/0092-8674(87)90233-9.
- [67] M. Araghi, Z. Moslehi, A. Mohammadi Nafchi, A. Mostahsan, N. Salamat, A. Daraei Garmakhany, Cold water fish gelatin modification by a natural phenolic cross-linker (ferulic acid and caffeic acid), Food Sci. Nutr. 3 (2015) 370–375. doi:10.1002/fsn3.230.
- [68] S. Sakai, K. Hirose, K. Taguchi, Y. Ogushi, K. Kawakami, An injectable, in situ enzymatically gellable, gelatin derivative for drug delivery and tissue engineering, Biomaterials. 30 (2009) 3371–3377. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.03.030.
- [69] D. Hellio, M. Djabourov, Physically and Chemically Crosslinked Gelatin Gels, Macromol. Symp. 241 (2006) 23–27. doi:10.1002/masy.200650904.
- [70] N. Devi, M. Sarmah, B. Khatun, T.K. Maji, Encapsulation of active ingredients in

- polysaccharide–protein complex coacervates, *Adv. Colloid Interface Sci.* 239 (2017) 136–145. doi:10.1016/j.cis.2016.05.009.
- [71] A.C. O’Sullivan, Cellulose: the structure slowly unravels, *Cellulose*. 4 (1997) 173–207. doi:10.1023/A:1018431705579.
- [72] T. Bosch, B. Schmidt, W. Samtleben, H.J. Gurland, Biocompatibility and clinical performance of a new modified cellulose membrane., *Clin. Nephrol.* 26 Suppl 1 (1986) S22-9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3829464>.
- [73] A. Svensson, E. Nicklasson, T. Harrah, B. Panilaitis, D.L. Kaplan, M. Brittberg, P. Gatenholm, Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage, *Biomaterials*. 26 (2005) 419–431. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.02.049.
- [74] R.M. Rowell, R.A. Young, Structure, Swelling and Bonding of Cellulose Fibers, in: *Cellul. Struct. Modif. Hydrolys.*, Wiley, 1986: pp. 91–128.
- [75] P. Hoffmann, M.A. Jones, Structure and Degradation Process for Waterlogged Archaeological Wood, in: 1989: pp. 35–65. doi:10.1021/ba-1990-0225.ch002.
- [76] V.L. Campo, D.F. Kawano, D.B. da Silva, I. Carvalho, Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis – A review, *Carbohydr. Polym.* 77 (2009) 167–180. doi:10.1016/j.carbpol.2009.01.020.
- [77] J.G. Ortiz-Tena, D. Schieder, V. Sieber, Carrageenan and More: Biorefinery Approaches with Special Reference to the Processing of Kappaphycus, in: *Trop. Seaweed Farming Trends, Probl. Oppor.*, Springer International Publishing, Cham, 2017: pp. 155–164. doi:10.1007/978-3-319-63498-2_10.
- [78] K. Hölzl, S. Lin, L. Tytgat, S. Van Vlierberghe, L. Gu, A. Ovsianikov, Bioink properties before, during and after 3D bioprinting, *Biofabrication*. 8 (2016) 032002. doi:10.1088/1758-5090/8/3/032002.
- [79] M.F. Bear, B.W. Connors, M.A. Paradiso, *Neuroscience: Exploring the Brain*, Lippincott Williams & Wilkins, 2007.
- [80] R.S. Fishman, The Nobel Prize of 1906, *Arch. Ophthalmol.* 125 (2011) 690. doi:10.1001/archophth.125.5.690.

- [81] S. Willerth, Introduction to the nervous system, in: *Eng. Neural Tissue from Stem Cells*, Elsevier, 2017: pp. 17–38. doi:10.1016/B978-0-12-811385-1.00002-9.
- [82] N. Zhang, X. Wen, *Neural Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, in: *Fundam. Tissue Eng. Regen. Med.*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2009: pp. 271–288. doi:10.1007/978-3-540-77755-7_21.
- [83] B.M. Ilfeld, J. Preciado, A.M. Trescot, Novel cryoneurolysis device for the treatment of sensory and motor peripheral nerves, *Expert Rev. Med. Devices*. 13 (2016) 713–725. doi:10.1080/17434440.2016.1204229.
- [84] X. Gu, F. Ding, D.F. Williams, Neural tissue engineering options for peripheral nerve regeneration, *Biomaterials*. 35 (2014) 6143–6156. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.04.064.
- [85] S.-J. Lee, T. Esworthy, S. Stake, S. Miao, Y.Y. Zuo, B.T. Harris, L.G. Zhang, Advances in 3D Bioprinting for Neural Tissue Engineering, *Adv. Biosyst.* 2 (2018) 1700213. doi:10.1002/adbi.201700213.
- [86] B.N. Johnson, K.Z. Lancaster, G. Zhen, J. He, M.K. Gupta, Y.L. Kong, E.A. Engel, K.D. Krick, A. Ju, F. Meng, L.W. Enquist, X. Jia, M.C. McAlpine, 3D Printed Anatomical Nerve Regeneration Pathways, *Adv. Funct. Mater.* 25 (2015) 6205–6217. doi:10.1002/adfm.201501760.
- [87] V. Chiono, C. Tonda-Turo, Trends in the design of nerve guidance channels in peripheral nerve tissue engineering, *Prog. Neurobiol.* 131 (2015) 87–104. doi:10.1016/j.pneurobio.2015.06.001.
- [88] M.T. Dell’Anno, S.M. Strittmatter, Rewiring the spinal cord: Direct and indirect strategies, *Neurosci. Lett.* 652 (2017) 25–34. doi:10.1016/j.neulet.2016.12.002.
- [89] A. Faroni, S.A. Mobasser, P.J. Kingham, A.J. Reid, Peripheral nerve regeneration: Experimental strategies and future perspectives, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 82 (2015) 160–167. doi:10.1016/j.addr.2014.11.010.
- [90] M. Anderson, N.B. Shelke, O.S. Manoukian, X. Yu, L.D. McCullough, S.G. Kumbar, Peripheral Nerve Regeneration Strategies: Electrically Stimulating Polymer Based Nerve Growth Conduits, *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 43 (2015) 131–

159. doi:10.1615/CritRevBiomedEng.2015014015.
- [91] A. Pabari, S.Y. Yang, A. Mosahebi, A.M. Seifalian, Recent advances in artificial nerve conduit design: Strategies for the delivery of luminal fillers, *J. Control. Release.* 156 (2011) 2–10. doi:10.1016/j.jconrel.2011.07.001.
 - [92] B.N. Johnson, M.C. Mcalpine, From Print to Patient: 3D-Printed Personalized Nerve Regeneration, 38 (2016) 28–31.
 - [93] S. Kim, J. Park, A. Han, J. Li, Microfluidic systems for axonal growth and regeneration research, *Neural Regen. Res.* 9 (2014) 1703–1705. doi:10.4103/1673-5374.143412.
 - [94] M. Karimi, S. Bahrami, H. Mirshekari, S.M.M. Basri, A.B. Nik, A.R. Aref, M. Akbari, M.R. Hamblin, Microfluidic systems for stem cell-based neural tissue engineering, *Lab Chip.* 16 (2016) 2551–2571. doi:10.1039/c6lc00489j.
 - [95] M.J. Moore, J.A. Friedman, E.B. Lewellyn, S.M. Mantila, A.J. Krych, S. Ameenuddin, A.M. Knight, L. Lu, B.L. Currier, R.J. Spinner, R.W. Marsh, A.J. Windebank, M.J. Yaszemski, Multiple-channel scaffolds to promote spinal cord axon regeneration, *Biomaterials.* 27 (2006) 419–429. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.07.045.
 - [96] P. Zhuang, A.X. Sun, J. An, C.K. Chua, S.Y. Chew, 3D neural tissue models: From spheroids to bioprinting, *Biomaterials.* 154 (2018) 113–133. doi:10.1016/j.biomaterials.2017.10.002.
 - [97] D.Y. Wong, J.-C. Leveque, H. Brumblay, P.H. Krebsbach, S.J. Hollister, F. LaMarca, Macro-Architectures in Spinal Cord Scaffold Implants Influence Regeneration, *J. Neurotrauma.* 25 (2008) 1027–1037. doi:10.1089/neu.2007.0473.
 - [98] C. Owens, F. Marga, G. Forgacs, Bioprinting of Nerve, in: *Essentials 3D Biofabrication Transl.*, Elsevier, 2015: pp. 379–394. doi:10.1016/B978-0-12-800972-7.00023-2.
 - [99] S. Knowlton, S. Anand, T. Shah, S. Tasoglu, Bioprinting for Neural Tissue Engineering, *Trends Neurosci.* 41 (2018) 31–46. doi:10.1016/j.tins.2017.11.001.
 - [100] Z. Xu, P. Fang, B. Xu, Y. Lu, J. Xiong, F. Gao, X. Wang, J. Fan, P. Shi, High-

- throughput three-dimensional chemotactic assays reveal steepness-dependent complexity in neuronal sensation to molecular gradients, *Nat. Commun.* 9 (2018) 4745. doi:10.1038/s41467-018-07186-x.
- [101] T. Savio, M.E. Schwab, Rat CNS white matter, but not gray matter, is nonpermissive for neuronal cell adhesion and fiber outgrowth., *J. Neurosci.* 9 (1989) 1126–33. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2467969>.
- [102] D.B. Pettigrew, K.P. Shockley, K.A. Crutcher, Disruption of spinal cord white matter and sciatic nerve geometry inhibits axonal growth in vitro in the absence of glial scarring., *BMC Neurosci.* 2 (2001) 8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11399204>.
- [103] S.J. Davies, D.R. Goucher, C. Doller, J. Silver, Robust regeneration of adult sensory axons in degenerating white matter of the adult rat spinal cord., *J. Neurosci.* 19 (1999) 5810–22. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10407022>.
- [104] N. Zhang, H. Yan, X. Wen, Tissue-engineering approaches for axonal guidance, *Brain Res. Rev.* 49 (2005) 48–64. doi:10.1016/j.brainresrev.2004.11.002.
- [105] G. Potjeydy, S. Moxon, T. Wang, M. Domingos, N.M. Hooper, Tissue Engineering 3D Neurovascular Units: A Biomaterials and Bioprinting Perspective, *Trends Biotechnol.* 36 (2018) 457–472. doi:10.1016/j.tibtech.2018.01.003.
- [106] A.M. Hopkins, E. DeSimone, K. Chwalek, D.L. Kaplan, 3D in vitro modeling of the central nervous system, *Prog. Neurobiol.* 125 (2015) 1–25. doi:10.1016/j.pneurobio.2014.11.003.
- [107] M.D. Tang-Schomer, J.D. White, L.W. Tien, L.I. Schmitt, T.M. Valentin, D.J. Graziano, A.M. Hopkins, F.G. Omenetto, P.G. Haydon, D.L. Kaplan, Bioengineered functional brain-like cortical tissue, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111 (2014) 13811–13816. doi:10.1073/pnas.1324214111.
- [108] R. Lozano, L. Stevens, B.C. Thompson, K.J. Gilmore, R. Gorkin, E.M. Stewart, M. in het Panhuis, M. Romero-Ortega, G.G. Wallace, 3D printing of layered brain-like structures using peptide modified gellan gum substrates, *Biomaterials.* 67 (2015) 264–273. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.07.022.

- [109] M. Heide, W.B. Huttner, F. Mora-Bermúdez, Brain organoids as models to study human neocortex development and evolution, *Curr. Opin. Cell Biol.* 55 (2018) 8–16. doi:10.1016/j.ceb.2018.06.006.
- [110] M.D. Tang-Schomer, W.B. Wu, D.L. Kaplan, M.J. Bookland, In vitro 3D regeneration-like growth of human patient brain tissue, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 12 (2018) 1247–1260. doi:10.1002/term.2657.
- [111] T. Koechling, H. Khalique, E. Sundström, J. Ávila, F. Lim, A culture model for neurite regeneration of human spinal cord neurons, *J. Neurosci. Methods.* 201 (2011) 346–354. doi:10.1016/j.jneumeth.2011.08.024.
- [112] S. Mobini, Y.H. Song, M.W. McCrary, C.E. Schmidt, Advances in ex vivo models and lab-on-a-chip devices for neural tissue engineering, *Biomaterials.* xx (2018) 1–21. doi:10.1016/j.biomaterials.2018.05.012.
- [113] A.P. Weightman, M.R. Pickard, Y. Yang, D.M. Chari, An in vitro spinal cord injury model to screen neuroregenerative materials, *Biomaterials.* 35 (2014) 3756–3765. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.01.022.
- [114] T. Fernandez-Zafra, S. Codeluppi, P. Uhlén, An ex vivo spinal cord injury model to study ependymal cells in adult mouse tissue, *Exp. Cell Res.* 357 (2017) 236–242. doi:10.1016/j.yexcr.2017.06.002.
- [115] D. Joung, V. Truong, C.C. Neitzke, S. Guo, P.J. Walsh, J.R. Monat, F. Meng, S.H. Park, J.R. Dutton, A.M. Parr, M.C. McAlpine, 3D Printed Stem-Cell Derived Neural Progenitors Generate Spinal Cord Scaffolds, *Adv. Funct. Mater.* 28 (2018) 1801850. doi:10.1002/adfm.201801850.
- [116] S. Thambiraj, D. Ravi Shankaran, Preparation and physicochemical characterization of cellulose nanocrystals from industrial waste cotton, *Appl. Surf. Sci.* 412 (2017) 405–416. doi:10.1016/j.apsusc.2017.03.272.
- [117] W. Neng, D. Enyong, C. Rongshi, Preparation and liquid crystalline properties of spherical cellulose nanocrystals, *Langmuir.* 24 (2008) 5–8. doi:10.1021/la702923w.
- [118] A. Kumar, Y. Singh Negi, V. Choudhary, N.K. Bhardwaj, Characterization of

Cellulose Nanocrystals Produced by Acid-Hydrolysis from Sugarcane Bagasse as Agro-Waste "Characterization of Cellulose Nanocrystals Produced by Acid-Hydrolysis from Sugarcane Bagasse as Agro-Waste, *J. Mater. Phys. Chem.* 2 (2014) 1–8. doi:10.12691/jmpc-2-1-1.

- [119] G. Fu, A. He, Y. Jin, Q. Cheng, J. Song, Fabrication of hollow silica nanorods using nanocrystalline cellulose as templates, *BioResources.* 7 (2012). doi:10.15376/biores.7.2.2319-2329.
- [120] M. Thomas, S.M. Willerth, 3-D Bioprinting of Neural Tissue for Applications in Cell Therapy and Drug Screening, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 5 (2017) 1–11. doi:10.3389/fbioe.2017.00069.
- [121] F.Y. Hsieh, S. hui Hsu, 3D bioprinting: A new insight into the therapeutic strategy of neural tissue regeneration, *Organogenesis.* 11 (2015) 153–158. doi:10.1080/15476278.2015.1123360.
- [122] M. Gajendiran, J. Choi, S.J. Kim, K. Kim, H. Shin, H.J. Koo, K. Kim, Conductive biomaterials for tissue engineering applications, *J. Ind. Eng. Chem.* 51 (2017) 12–26. doi:10.1016/j.jiec.2017.02.031.
- [123] F. Kanaya, J.C. Firrell, W.C. Breidenbach, Sciatic function index, nerve conduction tests, muscle contraction, and axon morphometry as indicators of regeneration., *Plast. Reconstr. Surg.* 98 (1996) 1264–71, discussion 1272-4. doi:10.1097/00006534-199612000-00024.
- [124] M. Marcus, K. Baranes, M. Park, I.S. Choi, K. Kang, O. Shefi, Interactions of Neurons with Physical Environments, *Adv. Healthc. Mater.* 6 (2017). doi:10.1002/adhm.201700267.
- [125] B. Schlosshauer, L. Dreesmann, H.E. Schaller, N. Sinis, Synthetic nerve guide implants in humans: A comprehensive survey, *Neurosurgery.* 59 (2006) 740–747. doi:10.1227/01.NEU.0000235197.36789.42.
- [126] L.A. Struzyna, K. Katiyar, D.K. Cullen, Living scaffolds for neuroregeneration, *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* 18 (2014) 308–318. doi:10.1016/j.cossms.2014.07.004.

- [127] A.J. Reid, A.C. de Luca, A. Faroni, S. Downes, M. Sun, G. Terenghi, P.J. Kingham, Long term peripheral nerve regeneration using a novel PCL nerve conduit, *Neurosci. Lett.* 544 (2013) 125–130. doi:10.1016/j.neulet.2013.04.001.
- [128] E.B. Petcu, R. Midha, E. McColl, A. Popa-Wagner, T. V. Chirila, P.D. Dalton, 3D printing strategies for peripheral nerve regeneration, *Biofabrication.* 10 (2018). doi:10.1088/1758-5090/aaaf50.
- [129] A.M. Moore, R. Kasukurthi, C.K. Magill, F.H. Farhadi, G.H. Borschel, S.E. Mackinnon, Limitations of conduits in peripheral nerve repairs, *Hand.* 4 (2009) 180–186. doi:10.1007/s11552-008-9158-3.
- [130] H. Yurie, R. Ikeguchi, T. Aoyama, Y. Kaizawa, J. Tajino, A. Ito, S. Ohta, H. Oda, H. Takeuchi, S. Akieda, M. Tsuji, K. Nakayama, S. Matsuda, The efficacy of a scaffold-free bio 3D conduit developed from human fibroblasts on peripheral nerve regeneration in a rat sciatic nerve model, *PLoS One.* 12 (2017) 1–16. doi:10.1371/journal.pone.0171448.
- [131] S. Wang, L. Cai, Polymers for fabricating nerve conduits, *Int. J. Polym. Sci.* 2010 (2010). doi:10.1155/2010/138686.
- [132] K. Pawar, B.J. Cummings, A. Thomas, L.D. Shea, A. Levine, S. Pfaff, A.J. Anderson, Biomaterial bridges enable regeneration and re-entry of corticospinal tract axons into the caudal spinal cord after SCI: Association with recovery of forelimb function, *Biomaterials.* 65 (2015) 1–12. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.05.032.
- [133] C.A. Sundback, J.Y. Shyu, Y. Wang, W.C. Faquin, R.S. Langer, J.P. Vacanti, T.A. Hadlock, Biocompatibility analysis of poly(glycerol sebacate) as a nerve guide material, *Biomaterials.* 26 (2005) 5454–5464. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.02.004.
- [134] J.N. Hanson Shepherd, S.T. Parker, R.F. Shepherd, M.U. Gillette, J.A. Lewis, R.G. Nuzzo, 3D microperiodic hydrogel scaffolds for robust neuronal cultures, *Adv. Funct. Mater.* 21 (2011) 47–54. doi:10.1002/adfm.201001746.