

**GRAFEN/GELMA/PCL SİNİR KONDUİT BENZERİ  
YAPILARDA ELEKTRİKSEL STİMÜLASYON ALTINDA  
TEMEL HÜCRE ETKİLEŞİMİNİN İNCELENMESİ**

**INVESTIGATION OF BASIC CELL INTERACTION  
UNDER ELECTRICAL STIMULATION IN  
GRAPHENE/GELMA/PCL NERVE CONDUIT-LIKE  
STRUCTURES**

**BERKAY KÖSE**

**PROF. DR. İBRAHİM VARGEL**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

Mayıs 2024

# ÖZET

## GRAFEN/GELMA/PCL SİNİR KONDUİT BENZERİ YAPILARDA ELEKTRİKSEL STİMÜLASYON ALTINDA TEMEL HÜCRE ETKİLEŞİMİNİN İNCELENMESİ

**Berkay KÖSE**

**Yüksek Lisans, Biyomühendislik Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. İbrahim VARGEL**

**Mayıs 2024, 73 sayfa**

Periferik sinir yaralanmalarının sıklığı, yaralanmanın tipine ve yerine göre yaşam standartlarını etkileyen sonuçları, biyolojik greft materyalleri aracılığıyla geleneksel cerrahi tedavi yöntemleri ile karşılaşılan güçlükleri, periferik sinir doku mühendisliği yöntemleri ile mühendislik ürünü biyomateryallerin geliştirilmesine ve bu alanda çeşitli araştırmaların yapılmasında lokomotif rol oynamıştır. Periferik sinir yaralanmasının tipine göre değişmekle birlikte onarımdaki temel amaç bütünlüğü bozulmuş periferik sinir kılıfının bütünlüğünün sağlanmasıyla, rejenerasyon için gereken uygun mikroçevrenin doğala yakın şekilde sunulmasıyla akson uzamasının kontrollü bir şekilde devam ettirilmeye çalışılmasıdır. Bu amaçla geçmişten günümüze konduit ve konduit benzeri doku iskeleleri tasarlanarak, bu bütünlüğü sağlamaya yönelik içi boş veya kompozit yapıda farklı yeteneklerde, farklı özelliklerde doku mühendisliği ürünleri geliştirilmiştir ve geliştirilmeye devam edilmektedir. Bu tez çalışması, grafenin iletkenlik özelliğini ön

plana çıkararak geliştirilen kompozit yapıdaki hidrojel konduit öncülü bir doku iskelesi üzerinde yoğunlaşmaktadır. İskele, iletkenlik özelliğinin kendi avantajlarına ek olarak, dışarıdan kapasitif yolla uygulanan elektriksel stimülasyonun nöronal hücre davranışları üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla tasarlanmıştır. Bu plana göre üretilmiş indirgenmiş grafen oksit (rGO), jelatin metakrilat (GelMA) ve polikaprolaktondan (PCL) oluşan kompozit yapıdaki hidrojel malzemenin karakterizasyon analizi yapılmıştır. Kompozit yapıyı oluşturan materyallerin hücre ve hidrojel ile uyumu ayrı ayrı ve birlikte değerlendirilmiştir. Karakterizasyon işlemi takiben, bir kare dalga üretici marifeti ile sağlanan elektriksel stimülasyonun uygulandığı ve uygulanmadığı gruplar birbirleriyle karşılaştırılmıştır. Başta rGO içeren gruplar olmak üzere elektriksel stimülasyon verilen tüm gruplarda proliferasyon lehine sonuçlar alınmıştır. Ayrıca üretilen malzemelerin sitotoksik olmadığı ve biyouyumlu olduğu gözlemlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Periferik Sinir Yaralanmaları, Periferik Sinir Doku Mühendisliği, Grafen Oksit, Jelatin Metakrilat, Polikaprolakton, Elektriksel Stimülasyon

# **ABSTRACT**

## **INVESTIGATION OF BASIC CELL INTERACTION UNDER ELECTRICAL STIMULATION IN GRAPHENE/GELMA/PCL NERVE CONDUIT-LIKE STRUCTURES**

**Berkay KÖSE**

**Master of Science, Bioengineering Division**

**Supervisor: Prof. Dr. İbrahim VARGEL**

**May 2024, 73 pages**

The frequency of peripheral nerve injuries, the consequences affecting living standards depending on the type and location of the injury, the difficulties encountered with traditional surgical treatment methods through biological graft materials, have played a leading role in the development of engineered biomaterials with peripheral nerve tissue engineering methods and the conduct of various research in this field. Although it varies depending on the type of peripheral nerve injury, the main purpose of repair is to ensure the integrity of the damaged peripheral nerve sheath and to try to continue axon growth in a controlled manner by providing the appropriate microenvironment required for regeneration in a close to natural way. For this purpose, conduit and conduit-like tissue scaffolds have been designed from past to present, and tissue engineering products with different capabilities and different features in hollow or composite structures have been developed and continue to be developed to ensure this integrity. This thesis study focuses

on a hydrogel conduit-produced tissue scaffold with a composite structure developed by highlighting the conductivity feature of graphene. In addition to the advantages of its conductive properties, the scaffold was designed to examine the effects of externally capacitively applied electrical stimulation on neuronal cell behavior. Characterization analysis of the composite structured hydrogel material consisting of reduced graphene oxide (rGO), gelatin methacrylate (GelMA) and polycaprolactone (PCL) produced according to this plan was performed. The compatibility of the materials forming the composite structure with the cell and hydrogel was evaluated both separately and all together. Following the characterization process, the groups in which electrical stimulation was applied by a square wave generator and those in which it was not applied were compared with each other. Results with better proliferation were obtained in all groups that received electrical stimulation, especially in groups containing rGO. Moreover, it has been observed that the produced materials are non-cytotoxic and biocompatible.

**Keywords:** Peripheral Nerve Injuries, Peripheral Nerve Tissue Engineering, Graphene Oxide, Gelatin Methacrylate, Polycaprolactone, Electrical Stimulation

## TEŞEKKÜR

Akademik yolculuğumun her adımında bana ışık tutan, sabrı ve anlayışıyla rehberliğini esirgemeyen, bilimsel düşünceye giden yolda bana cesaret veren ve kendisinin öğrencisi olabildiğim için büyük onur duyduğum, kıymetli hocam ve tez danışmanım Sayın Prof. Dr. İbrahim VARGEL'e,

Bana laboratuvarını açıp takıldığım noktalarda yardımlarını esirgemeyen, bilgi birikimi ve tecrübelerinden faydalanabildiğim ve kendisini tanıyabildiğim için çok şanslı hissettiğim, değerli hocam Sayın Doç. Dr. Sedat ODABAŞ'a,

Bilgeliği, pozitif enerjisi, sabrı ve pratik çözüm önerileriyle ihtiyacım olduğunda her zaman yanımda olan, değerli hocam Sayın Doç. Dr. Soner ÇAKMAK'a,

Birlikte aynı ortamı paylaşmaktan keyif aldığım, samimi dostlukları ve yardımları için değerli çalışma arkadaşlarım Süveydanas KOCACIK'a, Melek İpek ERTUĞRUL'a, Zeliha Esra ÇAKMAK'a, Şükrü Kaan KONAKLI'ya ve Öğr. Gör. Fulya ÖZDEMİR'e,

Bana gönülden inanan ve gerekli durumlarda önemli yönlendirmeleri tarafıma sunan değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Aysun KILIÇ SÜLOĞLU'na, Sayın Prof. Dr. Nuran ÇİÇEK'e ve Sayın Uzm. Dr. Serpil YANDI VARGEL'e,

Bu çalışmanın elektriksel stimülasyon aşamalarını kapsayan teknik sorularımı sabırla ve muntazam bir şekilde yanıtlayan Sayın Dr. Ahmet ÜNAL'a,

Hiçbir karşılık beklemeden, varlıklarını her saniye arkamda hissettiğim canım aileme; babam Harun KÖSE, annem Kadem KÖSE ve abim Dr. Ümit Emre KÖSE'ye,

Beni moral ve motivasyon olarak hep yukarıda tutan, her zaman yanımda olan kıymetli arkadaşlarım Lada HASANOVA, Halide CANSU, Batuhan ERSOY, Mükremin ÇAKMAK, Dt. Hasan Nadir ÖZER ve Dr. Muhammet AVCI'ya,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

Berkay KÖSE

Mayıs 2024, Ankara

# İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR .....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Sinir Sistemi .....	4
2.2. Periferik Sinir Sistemine ve Yaralanmalarına Tarihsel Bakış.....	4
2.3. Periferik Sinir Sistemi ve Anatomisi.....	6
2.4. Periferik Sinir Yaralanmaları .....	10
2.5. Doku Mühendisliği.....	11
2.5.1 Periferik Sinir Doku Mühendisliği.....	12
2.5.2 Otojen Sinir Konduitleri.....	13
2.5.3 Otojen Olmayan Sinir Konduitleri .....	13
2.5.4 Polimerik Sinir Konduitleri.....	14
2.5.5 İyileştirilmiş Sinir Konduiti Tasarımları .....	15
2.5.6 İletken Sinir Konduitleri.....	17
2.5.7 Elektriksel Stimülasyon.....	19
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR .....	23
3.1 Hidrojellerin Yapımı .....	23
3.1.1 Metakrilatlanmış Jelatinin Sentezi .....	23
3.1.2 Grafen Oksitin Sentezi .....	25
3.1.4 Polikaprolaktonun Fiber Haline Getirilmesi .....	27

3.1.5 Metakrilatlanmış Jelatinin Fotopolimerizasyona Hazırlanması .....	29
3.1.6 Metakrilatlanmış Jelatinin Fotopolimerizasyonu ve Hidrojel Haline Getirilmesi .....	30
3.5. Hidrojellerin Şişme Testi .....	31
3.6. Hidrojellerin Bozunma Testi .....	32
3.7. Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi .....	33
3.8. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi .....	34
3.9. Hücre Kültürü Çalışmaları .....	34
3.9.1 Hücre Canlılık Testi .....	35
3.9.2 Elektriksel Stimülasyon .....	35
3.9.3 Hücre Proliferasyon Testi .....	38
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....	39
4.1. Hidrojellerin Karakterizasyonları .....	39
4.1.1 Hidrojellerin Şişme Testlerinin Değerlendirilmesi .....	40
4.1.2 Hidrojellerin Bozunma Süreçlerinin Değerlendirilmesi .....	41
4.1.3 Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopilerinin Karşılaştırması .....	44
4.1.4 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopilerinin Karşılaştırılması .....	45
4.2. Malzeme ve Elektriksel Stimülasyonun Temel Hücre Etkileşimlerine Etkisinin İncelenmesi .....	50
4.2.1 Hücre Canlılıklarının Analizi .....	52
4.2.2 Hücre Çoğalma Davranışının Analizi .....	53
5. YORUM .....	56
6. KAYNAKLAR .....	59
EKLER .....	70
EK 1 – Tek Faktörlü ANOVA Sonuçları .....	70
EK 1.1 – MTT 24 Saat Canlılık İçin Tek Faktörlü ANOVA Sonuçları .....	70
EK 1.2 – MTT 48 Saat Canlılık İçin Tek Faktörlü ANOVA Sonuçları .....	70
EK 1.3 – 1. Gün İçin ES Uygulanan ve Uygulanmayan Örneklerin Proliferasyon Değerlerinin Oranının (E1/E0) Tek Faktörlü ANOVA Sonuçları .....	70
EK 1.4 – 3. Gün İçin ES Uygulanan ve Uygulanmayan Örneklerin Proliferasyon Değerlerinin Oranının (E1/E0) Tek Faktörlü ANOVA Sonuçları .....	71



EK 1.5 – 5. Gün İçin ES Uygulanan ve Uygulanmayan rneklerin Proliferasyon Değerlerinin Oranının (E1/E0) Tek Faktörlü ANOVA Sonuçları .....	71
EK 2 – Tez alışması Orijinallik Raporu .....	72
ZGEMİş .....	73

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Sinir yaralanmalarının Sunderland Sınıflandırması [23].....	6
Şekil 2.2. Nöronun şematik resmi* .....	8
Şekil 2.3. Periferik sinir kanlanması* .....	9
Şekil 2.4. Aksonun dejenerasyon, rejenerasyon ve yeniden yapılanmasının resmi [39]	11
Şekil 2.5. Doku mühendisliğinin temel elemanlarını gösteren diyagram.....	12
Şekil 2.6. İyileştirilmiş sinir konduiti tasarımlarını ve genel implantasyonu gösteren resim [75].....	17
Şekil 2.7. Çok fonksiyonlu iletken grafen tabanlı sinir konduiti illüstrasyonu [76].....	18
Şekil 2.8. Elektriksel stimülasyon uygulamasını gösteren diyagram [87].....	19
Şekil 2.9. ES altında sinir iyileşmesinin moleküler yolunun şematik gösterimi .....	21
Şekil 2.10. Temel ES yöntemlerinin şematik gösterimi [108].....	22
Şekil 3.1. 55°C’de ayarlanmış manyetik karıştırıcıda jelatinin CBS’de çözündürülmesi ve homojen hale gelmiş çözelti. ....	23
Şekil 3.2. GelMA çözeltilerinin diyaliz membrana koyulması ve distile su içerisinde bekletilmesi.....	24
Şekil 3.3. Buz banyosu altında kahverengi grafen oksit çözeltisi (A), çökeltmenin meydana geldiği ve reaksiyonun durdurulduğu grafen oksit çözeltisi (B) ve koyu renkli indirgenmiş grafen oksit çözeltisi (C) .....	26
Şekil 3.4. Süpernatant atıldıktan sonra kalan indirgenmiş grafen oksit çökeltisi .....	26
Şekil 3.5. Vakum pompasında çekilen indirgenmiş grafen oksit çözeltisi (A), filtreye tutulan indirgenmiş grafen oksit partikülleri (B) ve filtre kağıdı kurutulduktan sonra toplanmaya hazır indirgenmiş grafen oksit partikülleri (C).....	27
Şekil 3.6. Polikaprolaktonun kloroform ve etanol içerisinde çözündürülmesi (solda) ve ıslak eğirme için hazırlanan deney düzeneği (sağda).....	28
Şekil 3.7. Kullanıma hazır polikaprolakton fiberleri .....	29
Şekil 3.8. GelMA hidrojelleri (B), GelMA ve rGO’dan oluşan hidrojeller (A), GelMA, rGO ve PCL’den oluşan hidrojeller (C).....	31
Şekil 3.9. Şişme testi için bölmeli petride distile su içerisine koyulan GelMA hidrojel örnekleri .....	32

Şekil 3.10. Biyobozunma testleri sürecinde kuru ağırlık ölçümü almak için kurumaya bırakılan hidrojel örnekleri.....	33
Şekil 3.11. SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinin ışık mikroskobu altında görüntüsü ...	34
Şekil 3.12. 20Hz ve %1 döngü ayarlarında ZK-PP1K kare dalga üretici ön yüzü.....	36
Şekil 3.13. Elektriksel stimülasyon uygulama anında petri kaplara yapıştırılan bakır bantlar ve onlara tutturulan timsah elektrotların görüntüsü .....	37
Şekil 3.14. Elektriksel stimülasyon uygulama anında ZK-PP1K (üstte) ve osiloskop (altta) görüntüsü.....	37
Şekil 4.1. PBS ile biyobozunmada günlere göre ortalama ağırlık değişimi grafiği .....	42
Şekil 4.2. Lizozim ile biyobozunmada günlere göre ortalama ağırlık değişimi grafiği..	42
Şekil 4.3. Jelatin ve GelMA'nın nükleer manyetik rezonans spektroskopilerinin karşılaştırması.....	44
Şekil 4.4. Jelatin ve GelMA'nın fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopilerinin karşılaştırılması .....	47
Şekil 4.5. PCL'nin fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi .....	48
Şekil 4.6. Grafen oksit (GO) ve indirgenmiş grafen oksit (rGO) fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopilerinin karşılaştırılması.....	50
Şekil 4.7. SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinin yüzde canlılık grafiği .....	52
Şekil 4.8. SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinin proliferasyon grafiği * .....	54
* E0: elektrik stimülasyonu uygulanmayan, E1: elektrik stimülasyonu uygulanan .....	54

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Ticari isimleriyle FDA tarafından onaylanan sinir konduitleri [60,61].....	15
Çizelge 3.1. Kütlece GelMA/Irgacure 2959 oranı (Cellink GelMA Casting Protocol). 29	
Çizelge 4.1. Hidrojellerin zamana bağlı şişme yüzdelerinin gösterimi .....	40

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

dk	Dakika
s	Saniye
ms	Milisaniye
mV	Milivolt
V	Volt
Hz	Hertz
MHz	Megahertz
g	Gram
mg	Miligram
mL	mililitre
L	litre
%	Yüzde
°C	Santigrat Derece
cm	Santimetre
mm	Milimetre
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı

### Kısaltmalar

PSS	Periferik Sinir Sistemi
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
GelMA	Jelatin Metakrilat

GO	Grafen Oksit
rGO	İndirgenmiş Grafen Oksit
PCL	Polikaprolakton
PLA	Polilaktik Asit
PLGA	Poli(laktik-ko-glikolik asit)
PGA	Poliglikolik Asit
PVA	Polivinil Alkol
PLCL	Poli(L-laktid-ko-ε-kaprolakton)
UV	Ultraviyole
ES	Elektriksel Stimülasyon
PWM	Darbe Genişliği Modülasyonu
MTT	3-(4,5-Dimetiltiyazol2-Yl)-2,5-Difeniltetrazolyum-Bromür
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
CO <sub>2</sub>	Karbondiyoksit
PBS	Fosfat Tamponu
CBS	Karbonat-Bikarbonat Tamponu
MAA	Metakrilik Anhidrit

# 1. GİRİŞ

Periferik sinir yaralanmaları başta trafik kazaları olmak üzere, ateşli silah yaralanmaları, delici ve kesici alet yaralanmaları, deprem vb. doğal yıkımlar gibi çeşitli nedenlerle meydana gelmektedir. Delici ve kesici alet yaralanmaları, ateşli silah yaralanmaları gibi durumlarda çoğunlukla sinirde devamlılık bozulmakla birlikte, deprem vb. nedenlerle göçük altında kalma, trafik kazaları gibi künt travma durumlarında da sinir anatomik bütünlüğünün bozulduğu ezici yaralanmalar oluşmaktadır. Sinir devamlılığının bozulduğu durumlarda “primer nörorafi” adı verilen, devamlılığı geri kazanmaya yönelik, kayıplı bölgenin proksimal ve distal ucunun uç uca dikilmesiyle onarım sağlanır ve ilk tercihtir. Ancak uçların karşı karşıya getirilemediği veya kaybın fazla olduğu vakalarda primer onarım mümkün olmamaktadır. Oysa sinir kaybının kısa olduğu vakalarda, gerilim oluşmayacak şekilde sinir uçlarının bir araya getirilmesi yani epinöral-perinöral nörorafi ile fonksiyonel-duyu kayıplarının geri kazanımları sağlanabilmektedir. Fakat kaybın fazla olduğu durumlarda ya uç uca onarım yapılamamakta ya da yapılan bu onarım işleminin yaratacağı gerginlik periferik sinirin dolaşımında bozulmaya yol açmaktadır. Buna bağlı olarak aksonun rejenerasyon kapasitesi azalmakta veya ortadan kalkmaktadır [1]. Böyle durumlarda periferik sinir kaybını yerine koymak ve gerilim faktörünü ortadan kaldırmak amacıyla halen otojen grefler (hastanın kendisinden alınan) altın standarttır ve klinikte otojen sinir greftleri kullanılmaktadır. Ancak sinir greftinin verici bölgeden alınma işleminin yaratacağı riskler-sorunlar (duyu ve fonksiyon kaybı, ameliyat süresinin uzamasına bağlı anestezi risk ve maliyetleri, verici bölgede ek skar oluşumu, hayat kalitesini etkileyen nöromaların oluşabilmesi vs.) nedeniyle otojen greftler de ek sorunlara yol açabilir [2]. Otojen periferik sinir greftinin verici bölgeden alınmasının getirdiği bu problemleri elimine edebilmek için başka bireyden alınan allojenik sinir greftleri de denenmiştir. Ancak bu durumda, rejenerasyon tamamlanıncaya kadar immün yanıt ve reaksiyonları baskılamak için yüksek doz medikal tedavi gerekmektedir. Bu tür sorunlar allojenik sinir grefti kullanımını geri plana düşürmüştür. Kayıplı periferik sinir yaralanmalarının onarımında kullanılan farklı yöntemlerin getirdiği bu ve benzeri ek sorunlar, doku mühendisliği yöntemleriyle üretilmiş içi boş veya dolu konduit yani borucuklar ile “tübülasyon tekniğini” öne çıkarmıştır. Konduitler, kayıplı yaralanma bölgesinde sinirin etrafını saracak şekilde yerleştirildiğinde proksimal sinir ucundaki akson filizlerinin distal uca doğru saçılmadan ulaşmasını sağlayarak, rejenera aksonların

distal uçtaki sinir güdüğüne ulaşmasını sağlamayı amaçlamaktadır [3]. Başarılı sonuçlar alınsa da kondüitler ile halen özellikle uzun kayıplı periferik sinir yaralanmalarında, otojen sinir grefti kadar başarı sağlanamamaktadır [4]. Bu nedenle uzun kayıplı (3mm'den uzun) periferik sinir yaralanmalarında vaskülerize sinir greftleri sorgulanmaya başlanmıştır. Otojen veya allojenik sinir grefti kadar rejenere aksona doku desteği sağlayabilen, aksonal filizlenmeyi yönlendirebilen konduitlerin üretimine yönelik çalışmalar halen devam etmektedir.

Bu konduit tiplerinden bir türü de iletken tipte konduitlerdir. Elektriksel sinyal haberleşmesi ve sinir dokusunun iletken yapıda olması, iletken sinir konduitlerini öne çıkaran en önemli nedenlerdir [5]. Hayvan modellerinde ve insanlarda yapılan çalışmalar, elektriksel stimülasyonun akson büyümesini, rejenerasyonunu ve hedef organ reinnervasyonunu belirgin şekilde teşvik ettiğini göstermektedir [6]. Bu yüzden özellikle son zamanlarda, iletken sinir konduitleri tasarımı üzerine çalışmalar oldukça hız kazanmıştır. İletken bir polimer olan ve petrolü endüstrisi dahil birçok alanda oldukça dikkat çeken grafenin, iletkenliği ile birlikte akson mikroçevresini taklit edebilen girintili çıkıntılı yüzey morfolojisi, grafenin sinir konduiti olarak kullanımında oldukça ilgi çekmektedir [5]. Grafen tabanlı doku iskeleleri üzerinde yapılan çalışmalarda da moleküler düzeyde akson onarımını ve rejenerasyonunu teşvik ettiğine dair olumlu sonuçlar alınmıştır [7].

Elektriksel stimülasyon (ES) ise, çok eskiden beri araştırmacıların dikkatini çekmektedir. Yüzeysel elektrotlar kullanılarak fizyoterapi amaçlı ya da iletim amaçlı oldukça fazla çalışmalar mevcuttur [8]. Fakat doku mühendisliği seviyesinde, hücrel ve davranışsal manipülasyonları ve bunların sonuçlarını karşılaştırmalı olarak gösteren çalışmalar, özellikle periferik sinir doku mühendisliğinde görece az sayıdadır ya da kısıtlıdır. Buna karşın periferik sinir yaralanmalarında doku mühendisliği uygulamaları olmadan, sadece ES kullanımıyla bile olumlu sonuçlara ulaşılmıştır. Örneğin, karpal tünel sendromunda baskıyı azaltma ameliyatından sonra, sıkışmış median sinire elektriksel stimülasyon (ES) uygulanmadığında, ameliyat öncesi anlamlı bir motor ünite sayısına çıkma eğilimi gözlenmemiştir. Ancak median siniri 1 saat boyunca 20 Hz frekansta sürekli olarak elektriksel olarak uyarıldığı durumlarda, normal motor ünite sayısının restorasyonu



sağlanarak tüm tenar kasın yeniden sinir ile beslendiği gösterilmiştir [9]. Bununla birlikte, periferik sinir yaralanmalarının gecikmiş onarımlarında bile ES ile faydalı sonuçlar alınabilmiştir. Örneğin, onarımı geciktirilmif bir siyatik sinir yaralanması durumunda, 5mm uzunluğundaki içi boş sinir konduiti ile yapılan onarım sonrasında, 20 dakikalık düşük frekanslı ES periyoduna tabi tutulan sinirlerde, motor ve duyu nöron aksonu rejenerasyonu kontrol gruplarına göre sırasıyla %10 ve %3 oranında artış göstermiştir [10,11].

Bu tez çalışmasında, grafenin iletkenlik özelliğine dayanarak oluşturulmuş indirgenmiş grafen oksit (rGO), jelatin metakrilat (GelMA) ve polikaprolakton (PCL)'dan oluşan konduit öncülü bir doku iskelesi üretilmiştir. Doku iskelesi üretilirken grafit tozunun çeşitli kimyasal modifikasyonu ile grafen oksit elde edilmiştir. Sonrasında ise elektriksel iletkenliği arttırmak ve yapısal sorunları minimize etmeye yönelik, grafen oksitten, indirgenmiş grafen oksit elde edilmiştir. PCL, uygun çözücülerde çözüldükten sonra, uygun şırınga ve uç kullanılarak ıslak eğirme işlemine tabi tutulmuş ve soğuk etanolde çöktürülmüştür. Çöktürme işlemi sırasında PCL fiberleri sarmal hale getirilip kurutulularak son haline getirilmiştir. Son olarak, GelMA çözeltisine rGO partikülleri ve PCL fiberleri eklenerek UV ile çapraz bağlama işlemi uygulanmış ve iletken bir kompozit hidrojel doku iskeleleri oluşturulmuştur. Tez çalışmasının hücre kültürü aşamasında, üretilen bu doku iskelelerine 4 yaşındaki bir nöroblastomalı kız çocuğunun kemik iliğinden izole edilmiş SH-SY5Y kodlu (nörodejeneratif hastalıklar ve nörotoksisite çalışmalarında sıklıkla kullanılan) nöronal hücreler ekilmiştir. Sonrasında *in-vitro* ortamda bir dalga genişliği modülasyonu (PWM) jeneratörü aracılığıyla 20Hz frekans ve 3 olt gücünde kare dalga üretilip, kapasitif yöntemle ES uygulandığında bu nöronal hücrelerin ES verilmeyen gruba göre çoğalma ve farklılaşma dereceleri incelenmiştir. ES'nin, iletken ve iletken olmayan hidrojel doku iskelelerinde, temel hücre etkileşimleri üzerine nasıl bir etkisi olduğu kantitatif olarak incelenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Sinir Sistemi

Sinir sistemi iki temel bölümden oluşur: merkezi sinir sistemi (MSS) ve periferik sinir sistemi (PSS). MSS, beyin ve omurilik gibi ana sinir merkezlerini içerir. PSS ise MSS'nin dışında kalan ve vücuttaki diğer bölgelere uzanan sinir ağını, yani spinal ve kranial sinirleri, gangliyonları ve diğer sinir dokularını kapsar [12].

Sinir sistemi, bilgiyi kodlayan ve ileten nöronlar ile bu süreci destekleyen glia hücrelerinden oluşur. Nöronlar, aksiyon potansiyeli adı verilen elektriksel sinyallerle bilgiyi uzun mesafeler boyunca taşır. Bu bilgiler, sinapslar ve nöromusküler kavşaklar aracılığıyla diğer hücelere veya hedef organlara aktarılır [13]. MSS'de, glial hücrelerin çeşitli alt tipleri bulunur ve bunlar genellikle mikroglia ve makroglia olarak iki ana gruba ayrılır. Mikroglia, beyindeki bağışıklık hücreleri olarak işlev görürken, makroglia; astrositler, oligodendrositler ve endipimal hücreler gibi diğer glial hücre tiplerini içerir. Bu hücreler, sinir sisteminin sağlığı ve homeostazı için kritik roller oynarlar. Bir yaralanma durumunda ise, remiyelinizasyonu da kapsayan rejeneratif süreçlere katılırlar [14]. Öte yandan periferik sinir sisteminde, Schwann hücreleri ana glial hücre tipidir ve periferik sinirlerin miyelin kılıfını oluşturarak aksonların etrafını sararlar. Bu hücreler, sinir hasarından sonra rejenerasyon ve onarım süreçlerinde önemli bir rol oynarlar [15].

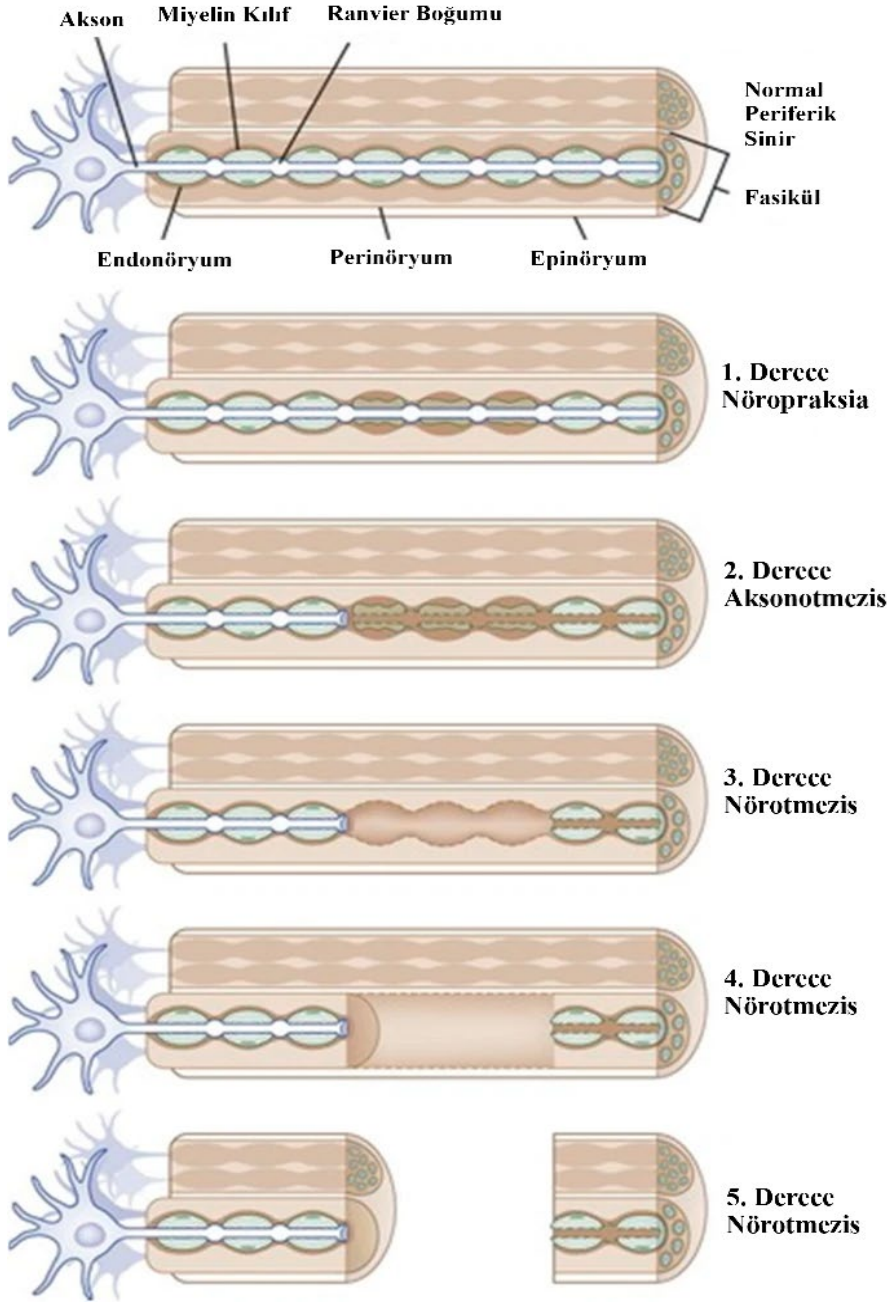
### 2.2. Periferik Sinir Sistemine ve Yaralanmalarına Tarihsel Bakış

Periferik sinir sistemi hakkındaki bilgilerin tarihsel kökenleri, Antik Yunan dönemine ve özellikle Galen'in çalışmalarına kadar uzanır.

Waller'in periferik sinir dejenerasyon sürecini keşfetmesi ve tanımlamasının ardından, periferik sinir dokusunun histolojik olarak tanınması ve anlaşılmasında önemli bir adım, 19. yüzyılda Cajal ve Golgi'nin Nobel ödülü kazanan çalışmaları ile atılmıştır. Bu iki bilim insanı, sinir dokusunun karmaşık yapısını aydınlatmak için geliştirdikleri gümüş impregnasyon tekniği sayesinde, sinir hücrelerinin ve liflerinin detaylı görünürlüklerini sağlamışlardır [16]. Bu teknik, periferik sinir hücrelerinin ve sinir liflerinin daha net görünürlüğünü sağlamanın yanı sıra, periferik sinir dokusunun daha iyi anlaşılmasını da

sağlamıştır. Elektrofizyolojik çalışmalar yoluyla sinir liflerinin fonksiyonlarını açıklayarak bu alanda 2. Nobel Ödülü'nü kazanan bilim insanları Erlanger ve arkadaşı Gasser, 1944 yılında farklı türdeki duyuşal sinir liflerinin çeşitli uyarılara verdiği tepkileri keşfetmişlerdir. Örneğin, acı verici veya acı vermeyen dokunuşlara verilen yanıtlarda farklı sinir lifi türlerini tanımlamışlardır. Bu keşifler, sinir liflerinin farklı uyarıları nasıl algıladığı ve ilettiği konusunda önemli bilgiler sağlamıştır ve bu alandaki araştırmalara büyük katkıda bulunmuştur [17].

Ayrıca, William Cumberland Cruikshank'ın 1795 yılında yaptığı deneysel çalışmada, bir köpeğin servikal vagus sinirinden 15 mm'lik bir bölümü çıkarılmış ve köpeğin hayatta kaldığı gözlenmiştir. Ancak, karşı taraftaki servikal vagus sinirinin bir bölümü daha çıkarıldığında ise köpek ölmüştür [18]. Bu çalışma, periferik sinirlerin rejenerasyon ve onarım potansiyelini keşfetme yolunda önemli bir basamak olmuştur. 20. yüzyılın ortalarında ise Sir Herbert Seddon, özellikle İkinci Dünya Savaşı sırasında ve sonrasında periferik sinir yaralanmaları üzerine yoğun bir şekilde çalışmış ve kapsamlı bir sınıflandırma sistemi geliştirmiştir. Bu sınıflandırma, günümüzde de halen kullanılan Seddon sınıflandırması olarak bilinir ve periferik sinir yaralanmalarının anlaşılmasında temel bir referans noktasıdır [19]. Benzer bir diğer öncü çalışma ise, Sir Sydney Sunderland tarafından gerçekleştirilmiştir. Sunderland, 1945 yılında 301 periferik sinir yaralanması vakasının analizini ilk defa yayınlamış ve 1947'de gözlem süreleri 5 yıla kadar olan 339 sinir yaralanması vakasının bir derlemesini yapmıştır [20]. Ayrıca Sunderland sinirlerin fasiküler yapısını tanımlamış ve sinir yaralanmalarının 5 seviyeli sınıflandırmasını geliştirmiştir (Şekil 2.1) [21]. Bu sınıflandırma, sinir yaralanmalarının prognozunu ve potansiyel tedavi stratejilerini belirlemede klinikte halen kullanılmaktadır [22].



Şekil 2.1. Sinir yaralanmalarının Sunderland Sınıflandırması [23]

### 2.3. Periferik Sinir Sistemi ve Anatomisi

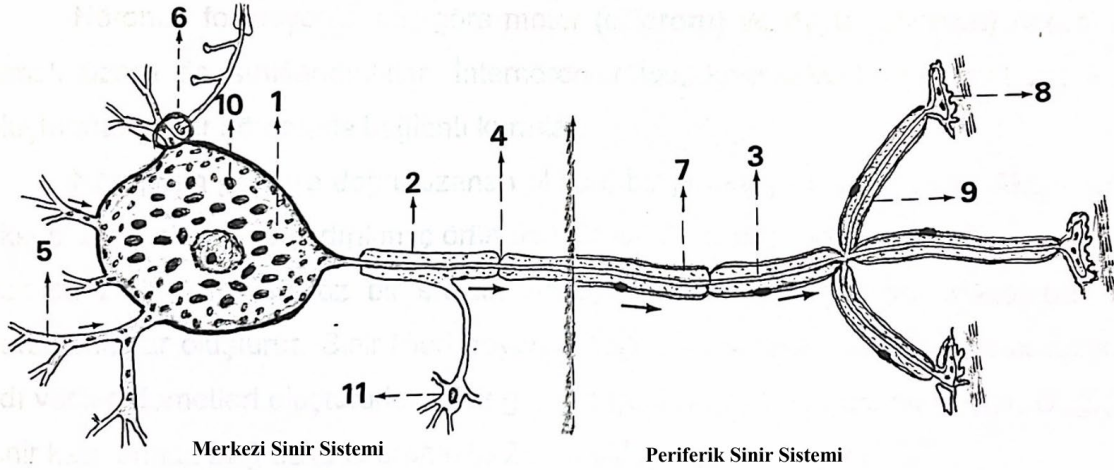
Sinir dokusu, çeşitli tiplerdeki nöronlar ve bu nöronları yapısal ve fonksiyonel olarak destekleyen birkaç farklı türde glial hücrelerden oluşur. Bu hücreler arasında ventriküler boşlukları döşeyen ependimal hücreler, duysal ve otonom gangliyonlarda bulunan uydu hücreler ve periferik sinir miyelinini oluşturan Schwann hücreleri bulunur. Tüm bu glial

hücreler ise nöronların beslenmesi, desteklenmesi ve korunması gibi işlevleri üstlenir [24].

Periferik sinir gövdesi, çeşitli önemli bileşenlerden oluşur. Bu bileşenler arasında: motor ve duyuşal sinir lifleri, otonom sinir lifleri, Schwann hücreleri, endonöryum, perinöryum ve epinöryum bulunur. Motor sinir lifleri kaslara sinyal gönderirken (afferent), duyuşal sinir lifleri vücuttan beyne uyarı taşır (efferent). Otonom sinir lifleri ise iç organların işlevlerini düzenler. Schwann hücreleri, sinir liflerinin etrafını saran ve miyelin kılıfı oluşturan hücrelerdir. Endonöryum, her bir sinir lifini saran ince bir bağ dokusu tabakasıdır. Perinöryum, sinir lifi demetlerini gruplandıran ve koruyan daha kalın bir bağ dokusu tabakasıdır. Epinöryum ise tüm sinir demetini saran en dıştaki koruyucu tabakadır [25,26]. Bu bileşenlerin her biri sinir dokusunun işlevselliği ve bütünlüğü için hayati öneme sahiptir ve sinirlerin vücutta uyarı iletiminde oynadığı rolü destekler [27].

Medulla spinalisin (omurilik) değişik seviyelerinden çıkan sinirler, çoğunlukla pleksus formasyonu şeklinde bir arada bulunurlar. Bu sinirler, servikal (C1-C4), brakial (C5-T1) ve lumbosakral (T12-S5) pleksuslar gibi farklı pleksusları oluşturacak şekilde çoklu ve karmaşık anastomozlarla birleşir [28].

Nöronlar genellikle üç ana bölümden oluşur: bunlar dendritler, perikaryon (soma) ve aksonlardır (Şekil 2.2). Dendritler çevreden gelen uyarıları alır; hücre gövdesi bu uyarıları işler, akson ise işlenmiş sinyalleri diğer nöronlara veya hedef hücrelere iletir [29,30].



Şekil 2.2. Nöronun şematik resmi\*

\* 1: Perikaryon (soma), 2: Miyelin kılıf, 3: Akson, 4: Ranvier Boğumu, 5: Dendritler, 6: Sinaps, 7: Schwann Hücresi, 8: Motor son plak, 9: Kollateral dal, 10: Nissl Cisimciği, 11: Oligodendrosit

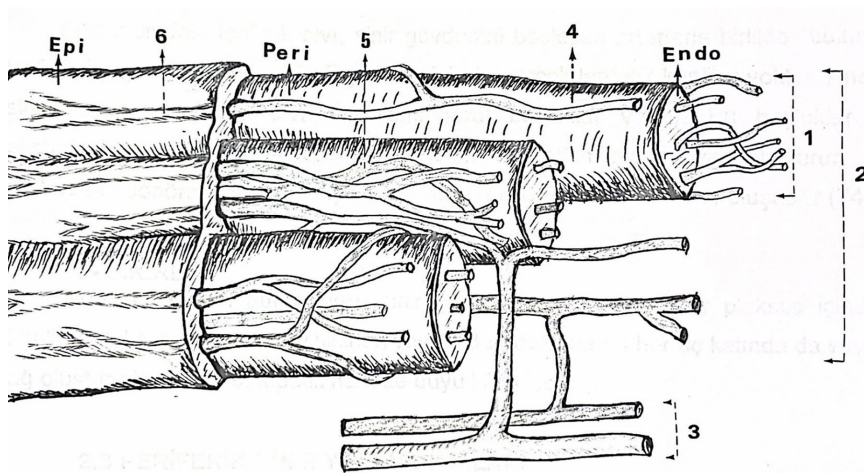
Perikaryon, bir nöronun hücre gövdesini ifade ediyor olup, nöronun metabolik ve genetik merkezidir. Perikaryon, nöronun çekirdeğini, çekirdekçiyi ve çeşitli organelleri (endoplazmik retikulum, golgi kompleksi ve mitokondriler) içeren sitoplazmayı barındırır [31].

Akson, nöronun tekli bir uzantısı olarak sinir impulsunu (aksiyon potansiyelini) nöronun hücre gövdesinden diğer nöronlara, kas hücrelerine veya bezlere (ter, gözyaşı vb.) iletmek üzere özelleşmiştir. Aksonlar, bu elektriksel sinyalleri uzun mesafelere hızlı ve etkin bir şekilde taşıyabilen, yapısal ve fonksiyonel özelliklere sahiptir. Perikaryon ve dendritlerde bulunan granüllü endoplazmik retikulum (ER) ve ribozomlar, genellikle akson tepeceğinde (axon hillock) bulunmaz. Akson tepeceği, aksiyon potansiyellerinin başladığı yerdir ve burada bulunan yapılar sinyal iletimi için özelleşmiştir. Buna karşın akson tepeceğindeki mitokondri sayısı fazladır ve enerji üretimi için kritik öneme sahiptir [32]. Aksonun plazma membranı “aksolemma” olarak adlandırılır ve aksonun içeriğindeki organel ve sitoplazmayı çevreler [33]. Aksonun içeriği ise “aksoplazma” olarak adlandırılır. Aksoplazma sinir hücresinin işlevsel bileşenlerini içerir ve aksiyon potansiyellerinin iletiminde kritik rol oynar. Aksoplazma içerisinde enerji üretimi ve hücresel taşıma (mikrotübül, nöroflament) işlevlerini destekleyen mitokondri gibi

organeller bulunur [34]. Aksonun, poliribozomlar ve granüllü ER içermemesi, aksonun protein sentezi ve diğer metabolik süreçler için hücre gövdesine ve dendritlere bağımlı kılabilir. Aksonlar genellikle uzun mesafeler boyunca uzanırlar ve bu yüzden, protein sentezi gibi yerel olarak gerçekleşmesi gereken işlevler için gerekli yapısal bileşenleri taşıma kapasiteleri yoktur. Aksonlar, hücre gövdesinde üretilen proteinlerin ve diğer moleküllerin aktif taşınması yoluyla ihtiyaçlarını karşılarlar [32]. Wallerian dejenerasyonunun altında yatan temel biyolojik neden budur.

Periferik sinirler, iki farklı temel kan dolaşımı sistemine sahiptirler (Şekil 2.3). Bunlardan bir tanesi ekstranöral dolaşım olarak isimlendirilir. Ekstranöral dolaşım; periferik sinir boyunca uzunlamasına adventisya içerisinde yol alan, arteria nervorum ve bölgesel damarları içerir. Bu damarlar esas olarak ekstranöral dokuları beslerler. Yüzeysel olmasından dolayı sempatik uyarılardan ve lokal ilaçlardan etkilenirler.

İkincisi ise intranöral dolaşım olarak bilinir. Intranöral dolaşım bağ dokusu içinde (epinöryum, perinöryum, endonöryum) bulunan damar ağından oluşmaktadır. Bu damar ağı, intranöral yapı boyunca ilerlediğinden sempatik uyarılardan ve lokal ilaçlardan etkilenmezler. Bu iki farklı sistem, birlikte periferik siniri beslerken sempatik uyarılara karşı tepkide belirleyicidirler [35].



Şekil 2.3. Periferik sinir kanlanması\*

\* 1: Endonöral pleksus, 2: Intranöral dolaşım 3: Ekstranöral dolaşım, 4: Venüller, 5: Lenfatikler, 6: Perinöral damarlar Endo: Endonöryum, Peri: Perinöryum, Epi: Epinöryum

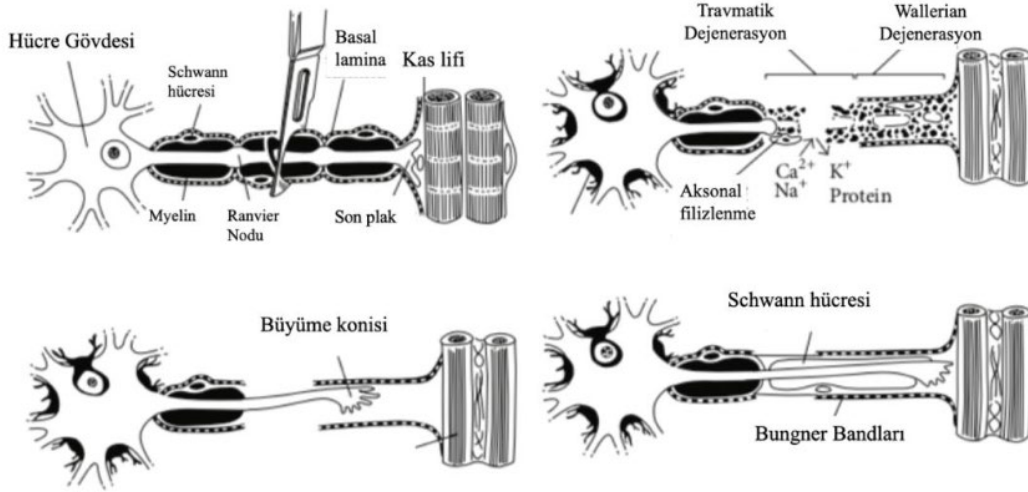
## 2.4. Periferik Sinir Yaralanmaları

Periferik sinir yaralanması sonrasında, nöronlar, aksonlar ve destekleyici hücrelerde çeşitli değişiklikler meydana gelir. Yaralanma sonrasında süreç, dejenerasyon, rejenerasyon ve yeniden yapılanma aşamalarını takip etmektedir. Özellikle Schwann hücreleri, periferik sinir sisteminde önemli bir rol oynar ve yaralanma sonrasında plastisite sergilerler. Schwann hücreleri, yaralanma sonrasında miyelin proteinlerinin mRNA üretimini azaltır, nörotrofik faktörler ve sitokinlerin üretimini artırarak aksonal rejenerasyonu destekler [36]. Bu süreçte, Schwann hücreleri demiyelinizasyona katılır, miyelin kalıntılarını temizler, makrofajları yaralanma bölgesine toplar ve hasarlı hücrelerin yerini almak için çoğalırlar [36].

Periferik sinir yaralanmasında, nöron gövdesinde meydana gelen değişiklikler, genellikle akson reaksiyonu veya retrograd nöron reaksiyonu olarak adlandırılır. Bu süreçte, Nissl cisimcikleri akson yaralanmasına bağlı olarak belirgin bir şekilde azalır (çözülür). Bu durum kromatoliz olarak da adlandırılır ve akson yaralanmasının bir sonucu olarak Nissl cisimciklerinin kaybolması anlamına gelir [37]. Nissl cisimcikleri, nöronun protein sentezinde rol oynayan ve ribozomlarla dolu endoplazmik retikulumun bölümleridir. Yaralanma sonrası, bu yapılar dağılır ve nöron gövdesi genişler. Bu süreç, nöronun hasar gören aksonunu onarmaya çalıştığı bir işarettir. Ayrıca, nöron gövdesindeki mitokondri sayısında artış ve hücre çekirdeğinin, hücre periferine doğru taşınması gibi değişiklikler de gözlemlenir. Bu değişiklikler, nöronun rejeneratif kapasitesini artırmak ve hasarlı aksonun yeniden büyümesini desteklemek için metabolik aktivitesini değiştirmesinin bir sonucudur. Kromatoliz, nöronun hasar sonrası iyileşme sürecinin aktif bir parçasıdır ve aksonal rejenerasyon için gerekli olan moleküler ve hücresel mekanizmaların başlatılmasında önemli bir rol oynar [38].

Aksonlar açısından, Wallerian dejenerasyonu olarak bilinen bir süreç başlar; aksonal dejenerasyon ve miyelin yıkımı meydana gelir, ardından Schwann hücrelerinin dediferansiyasyonu (daha olgunlaşmamış bir fenotipe dönüşümü) ve çoğalması gerçekleşir [36,38]. Schwann hücreleri ayrıca, Bungner bandlarını oluşturarak aksonal büyümeyi yönlendirir ve ikincil aksonal hasara karşı koruma sağlar (Şekil 2.4) [36].





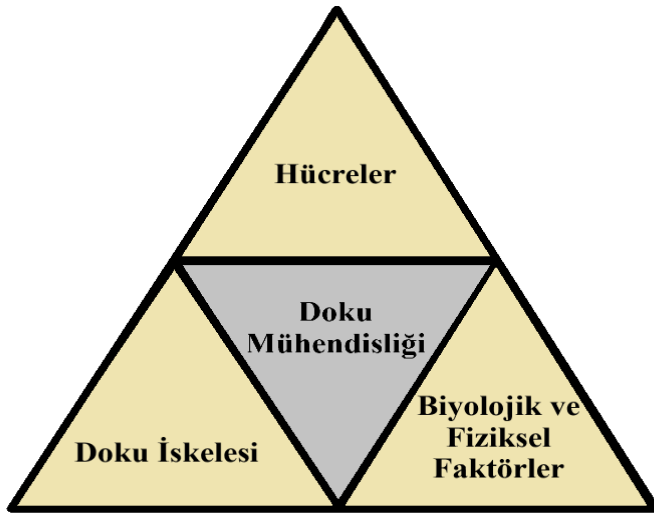
Şekil 2.4. Aksonun dejenerasyon, rejenerasyon ve yeniden yapılanmasının resmi [39]

Periferik sinir yaralanmasını takiben ilk 24 saat içinde, akson uçlarında aksoplazmik büyüme konisi oluşumu gözlemlenir. Bu süreç, hasarlı aksonun rejenerasyonu için kritik bir adımdır ve aksonun hedef dokulara doğru büyümesini sağlar. Büyüme konisi, aktin ve mikrotübüller gibi hücre içi iskeletsel elemanlarının dinamik olarak yeniden düzenlenmesiyle oluşur ve hücre uzantılarının ilerlemesini yönlendirir [40]. Büyüme konisinin oluşumu, çeşitli moleküler sinyaller ve hücre mekanizmaları tarafından düzenlenir. Örneğin; büyüme faktörleri, ekstrasellüler matriks proteinleri ve hücre yüzey reseptörleri, büyüme konisinin navigasyonu ve aksonal büyümenin modülasyonunda rol oynar [41]. Ayrıca, hasar sonrası hızlı bir şekilde aktin polimerizasyonunu artıran ve büyüme konisinin ilerlemesini hızlandıran proteinlerin ifadesi de artabilmektedir [42]. Bu moleküler süreç, periferik sinir yaralanmalarının tedavisinde ve sinir rejenerasyonu stratejilerinin geliştirilmesinde önemli bir rol oynayarak; aksonal büyüme ve büyüme konisi dinamiklerinin anlaşılması, sinir hasarı ve hastalıklarının tedavisinde yeni yaklaşımların geliştirilmesine katkıda bulunabilir. Fakat bilinenlerin bilinmeyenlerden az olduğuna inanılmaktadır.

## 2.5. Doku Mühendisliği

Doku mühendisliği, hasar görmüş veya işlevini yitirmiş dokuları onarmak veya yeniden oluşturmak için hücreler, doku iskeleleri, uygun biyokimyasal veya fiziksel faktörleri bir

araya getiren multidisipliner bir bilim dalıdır (Şekil 2.5) [43]. Doku mühendisliğinde kullanılan doku iskeleleri genellikle otojen, allojenik, ksenojenik veya sentetik kaynaklardan elde edilir [43]. Doku iskeleleri, hücrelerin büyümesi ve farklılaşması için gerekli üç boyutlu yapıyı ve mekanik desteği sağlar. Bu iskeleler, doğal-sentetik polimerlerden, hücreleştirilmiş ekstrasellüler matriksten (dECM), seramiklerden veya çeşitli kompozit malzemelerden üretilir [43].



Şekil 2.5. Doku mühendisliğinin temel elemanlarını gösteren diyagram

### 2.5.1 Periferik Sinir Doku Mühendisliği

Periferik sinir hasarlarının onarımında otojen sinir greftleri uzun süredir ve halen altın standart olarak kabul edilmekte olup, bu yöntem ile sağlanan başarılı sonuçlar literatürde geniş bir şekilde belgelenmiştir [44,45]. Ancak donör alan morbiditesi gibi olumsuz sonuçlar nedeniyle, alternatif tedavi stratejilerine ihtiyaç duyulmuştur. Bu bağlamda, doku mühendisliğini alanında yapılan çalışmalar ile periferik sinir defektlerinin onarımında sinir konduitlerinin önemli bir potansiyele sahip olduğu kanaati oluşmuştur [46]. Bu çalışmalar, sinir rejenerasyon sürecinde aksonların büyümesine optimal kılavuzluk edecek sinir konduitlerini belirlemeye odaklanmıştır. Optimal sinir konduiti, ince ve esnek olmalı, biyolojik olarak uyumlu ve bozunabilir malzemelerden yapılmalı ve sinir dokusunun mikroçevresini taklit edebilen gözenekli bir yapıya sahip olmalıdır [47].

### **2.5.2 Otojen Sinir Konduitleri**

Doğrudan otojen sinir grefti kullanımı, donör alanda motor fonksiyon ve duyu kaybına yol açtığı için, araştırmacılar başlangıçta yine otojen olan ancak arter, ven veya kas gibi yapıları içeren ve konduit olarak kullanılan greft materyallerine yönelmişlerdir.

Bu konduitlerden arteriyel sinir konduitlerinin kullanımı, 19. yüzyılın sonlarında literatürde yer almaya başlamıştır. Ancak bu yöntemin donör bölgesinde oluşturduğu komplikasyonlar, klinik uygulamalarda bu yaklaşımın yaygınlaşmasını sınırlamıştır [3].

Venöz konduitlerin de otojen konduit olarak klinikteki kullanımı çeşitli olumsuz özellikler nedeniyle sınırlı kalmıştır. Bu konduitlerin arterlere kıyasla daha ince duvar yapısına sahip olmaları ve düşük mekanik dirençleri, çevre dokuların basıncı altında kolayca sıkışıp daralmalarına neden olabilmektedir. Bu durum, sinir rejenerasyonu sürecinde filizlenen aksonların distale ilerlemesini engelleyebilmektedir [3].

Konduit olarak iskelet kasının kullanımı ise vücutta bol miktarda bulunması ve temini kolay olması nedeniyle ve mekanik direnci sayesinde oldukça yaygın olarak tercih edilmektedir. Araştırmalar iskelet kası greftlerinin, özellikle 3 cm'den daha kısa sinir kayıplarının onarımında etkili olduğunu göstermiştir. Bu çalışmalar, kas konduitlerinin yeniden filizlenen aksonların üç boyutlu yerleşimi ve ilerlemesini destekleyebileceğini göstermektedir; bu da sinir rejenerasyonu için etkili bir alternatif olarak değerlendirilmektedir [23,46].

### **2.5.3 Otojen Olmayan Sinir Konduitleri**

Otojen olmayan sinir konduitleri, periferik sinir hasarlarının onarımında kullanılan ve hastanın kendi dokusundan elde edilmeyen, tübülayon için alternatif tedavi yöntemleridir. Bu konduitler, genellikle kollajen, jelatin, fibroin, selüloz, dECM veya allojenik malzemelerden üretilir [48]. Kollajen, jelatin, dECM'den yapılan konduitler, biyouyumlulukları ve biyobozunurlukları nedeniyle tercih edilmektedir. Allojenik konduitler ise aynı türün farklı bireyinden alınan greft materyalleridir. Fakat Schwann hücreleri ve miyelin kılıfları immün sistem tarafından reaksiyonel bir yanıt oluşturacağı için ya deselülerizasyon gibi birtakım işlemlerden geçirilmesi gerekir ya da alıcının

bağışıklık sisteminin baskılanmasını gerektirir [49,50]. FDA tarafından onaylanıp Tip 1 kollajen kullanılan ilk kollajen temelli konduit “NeuraGen” ticari adıyla 2001 yılında sunulmuştur [51]. Yine FDA tarafından onaylanıp, deselülerize kadavra siniri kullanılan ilk allojenik konduit ise “Avance Nerve Graft” ticari adıyla 2007 yılında sunulmuştur [52]. Başarılı sonuçlar alınsa da, büyük kayıplı periferik sinir yaralanmalarında allojenik greftlerin başarısı yine düşmektedir [53,54]. Kadavradan greft almak ve öncesinde deselülerizasyon gibi işlemlerin gerekliliği, ticari açıdan oldukça maliyetlidir ve allojenik greftlerin bir diğer sorununu oluşturur [55].

#### **2.5.4 Polimerik Sinir Konduitleri**

Otojen ve allojenik greftlerin yukarıda bahsedilen problemleri, otojen greftlere alternatif olarak sunulan allojenik greftlerin ekstra maliyetleri nedeniyle, doğal veya sentetik polimerlerden oluşan sinir konduitleri araştırmaları hem hastanın hem de cerrahın beklentilerini karşılama amacıyla daha fazla ilgi çekmiştir. Kayıplı bir periferik sinir yaralanması durumunda, yaralanmanın proksimal ve distal uçlarını tübülerize etmek üzere çoğunlukla içi boş olarak tasarlanan ve FDA tarafından onaylanıp piyasaya sürülen çok sayıda ve farklı tipte polimerik sinir konduiti vardır [56]. Doğal polimer olarak çoğunlukla Tip 1 Kollajen, kitosan, domuz ince bağırsağından elde edilen ECM ticari olarak kullanılmıştır. Ayrıca doğal polimer olarak jelatinin kullanıldığı ve *in-vivo* düzeyde başarılı sonuçların alındığı çalışmalar da vardır [57]. Sentetik polimer olarak da çoğunlukla PVA (polivinil alkol), PGA (poliglikolik asit), PLCL (Poli(L-laktid-ko-ε-kaprolakton)) ve silikon, ticari olarak kullanılmıştır. Silikon konduitlerin kullanıldığı birçok hastada, yeterince yumuşak olmayan yapısı nedeniyle irritasyona yol açtığı ve bu sebeple daha sonra çıkarılması gerektiği gözlemlenmiştir; bu durum, silikon konduitlerin popülerliğini azaltmıştır [58]. PVA dışındaki birçok polimer değişken oranlarda biyobozunur özelliğe sahiptir.

Yukarıda özetlendiği gibi, polimerlerden üretilmiş çok sayıda konduitler vardır ve ticari ürün olarak satılmaktadır (Çizelge 2.1). Yüksek mekanik dayanımları, biyouyumlulukları, silikon hariç irritasyona neden olmamaları, yeterli geçirgenliğe sahip olmaları sayesinde 3cm’ye kadar olan kayıplı periferik sinir yaralanmalarında bu ürünler bir otojen ya da allojenik greft kadar başarı sağlayabilmektedir. Fakat 3cm’den büyük

kayıplarda bu konduitler halen tam fonksiyonel sinir iyileşmesi için yetersiz kalmaktadırlar [59].

Çizelge 2.1. Ticari isimleriyle FDA tarafından onaylanan sinir konduitleri [60,61].

Ürün İsmi	Bileşim	Defekt	Biyobozunma Süresi	FDA Onay Yılı
NeuroTube	PGA	2.0–4.0cm	3 ay	1999
SaluBridge	PVA	4.0– 6.35cm	Biyobozunur değil	2000
NeuraGen	Tip 1 Kolajen + Glikozaminoglikan	0.5–1.7cm	4 yıl	2001
NeuroMatrix	Tip 1 Kolajen	2.5–3.0cm	4-8 ay	2001
SaluTunnel	PVA	4.0– 6.35cm	Biyobozunur değil	2010
Neurolac	PLCL	Maks. 2cm	16 ay	2005-2011
NeuroMend	Tip 1 Kolajen	0.9–2.5cm	4-8 ay	2006
Avance	Deselülerize Kadavra Siniri	2.5–3.0cm	Allojenik greft	2007
NeuroFlex	Tip 1 Kolajen	2.5cm	4-8 ay	2014
NeuraGen 3D	Tip 1 Kolajen + Glikozaminoglikan	2.5cm	4-8 ay	2014
Reaxon Plus	Kitosan	Maks. 1cm	1-1.5yıl	2015
AxoGuard	Domuz İnce Bağırsak Submukozası	0.5–1.0cm	3-4 ay	2016

### 2.5.5 İyileştirilmiş Sinir Konduiti Tasarımları

3cm'den uzun kayıplı periferik sinir yaralanmalarında, doğal veya sentetik içi boş konduitlerle yapılan tübüasyonların yetersiz kalması, sinir liflerinin intranöral karmaşık pleksiform yapılarını desteklemeye yönelik çalışmalara odaklanılmasına neden olmuştur. Intranöral tübüler formasyonun taklit eden yapıların; hücre tutunmasına,

proliferasyonuna, büyümesine ve göçüne olan olumlu etkileri literatürde ayrıca yer almıştır [62]. Bu nedenle içi boş konduit tasarımları geliştirilerek, gözenekli-poröz, paralel oluklu, çoklu kanallı ve içi hidrojel veya fiberler ile doldurularak desteklenmiş, iyileştirilmiş konduit tasarımları üzerinde çalışılmıştır (Şekil 2.6) [63]. Bu tasarımların da hiçbirisi mükemmel değildir ve kendi içlerinde birbirlerine göre avantajları ve dezavantajları vardır.

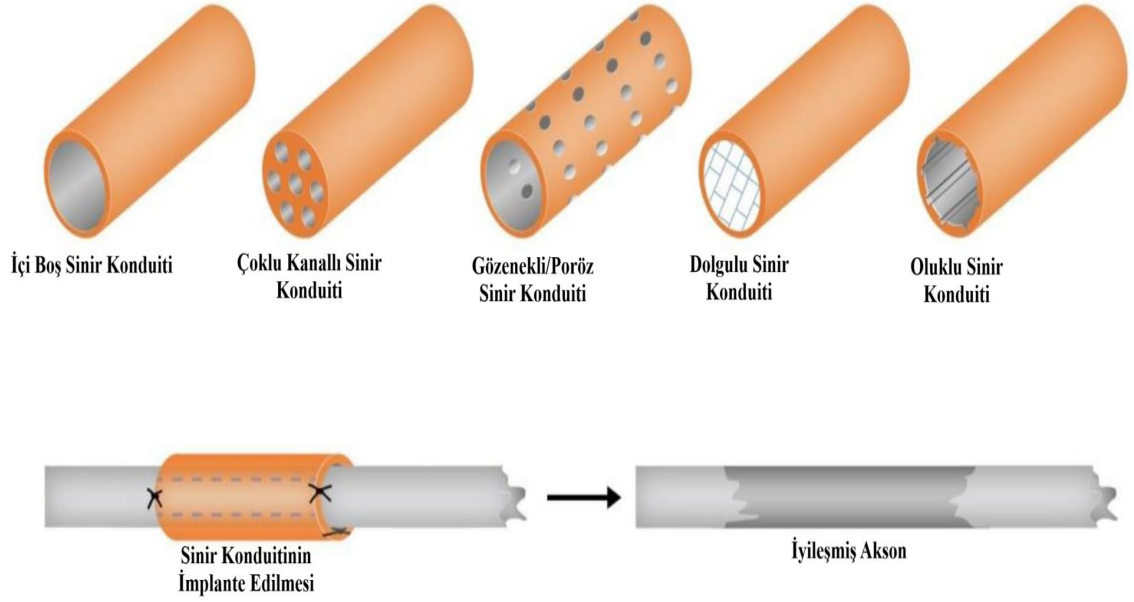
Gözenekli yapı besin ve oksijen transferine izin vermekte, hücrel atıkların uzaklaştırılmasını sağlamakta, fibroblast birikimini önleyerek akson uzamasının durmasını önlemekte ve lümene doğru vaskülarizasyonu sağlamakta fakat üretimi esnasında ideal gözenek yapısının korunamaması, tam olarak ideal gözenek büyüklüğünün bilinmemesi gibi bazı sorunları vardır [64–66].

Paralel oluklu kondüitlerle alakalı literatürde yaklaşık 10-20µm olukların kullanıldığı ve Schwann hücreleri tarafından tutunmanın desteklediğine dair olumlu çalışmalar vardır ancak ideal bir mikrokanal yapı oluşturabilmek için karmaşık litografik mikrofabrikasyon teknikleri bu kondüitlerin üretimini zorlaştırmaktadır [67,68].

Çoklu kanallı konduitler, içi boş konduit içerisinde daha küçük tübüler yapı organizasyonu içermektedir ve temel olarak bir sınıf lifinde bulunan doğal anatomik fasikülleri taklit edilmesi amaçlanmıştır. Bu sayede de konduitin daha efektif bir kılavuzluk yapması hedeflenmiştir [69,70]. Ancak çoklu kanal yapısı bu konduitlerin esneklik ve esnemeye bağlı mekanik dayanım kapasitesini azaltmaktadır [71]. Konduit içerisindeki bu küçük tübüler yapıların ideal çapının optimal ve kararlı olarak sağlanamıyor oluşu ise halen bir soru işaretidir [72].

İçerideki dolgu sinir kondüitleri temel olarak doğal ECM yapısını biyolojik ve yapısal olarak taklit etmeye yönelik geliştirilmiştir. Kolajen, fibrin, jelatin, laminin vb. doğal polimerlerin hidrojel, filament veya sünger formuna getirilmesiyle yapılabileceği gibi PLGA (Poli(laktik-ko-glikolik asit)), PLA (polilaktik asit), PGA vb. sentetik polimerlerin

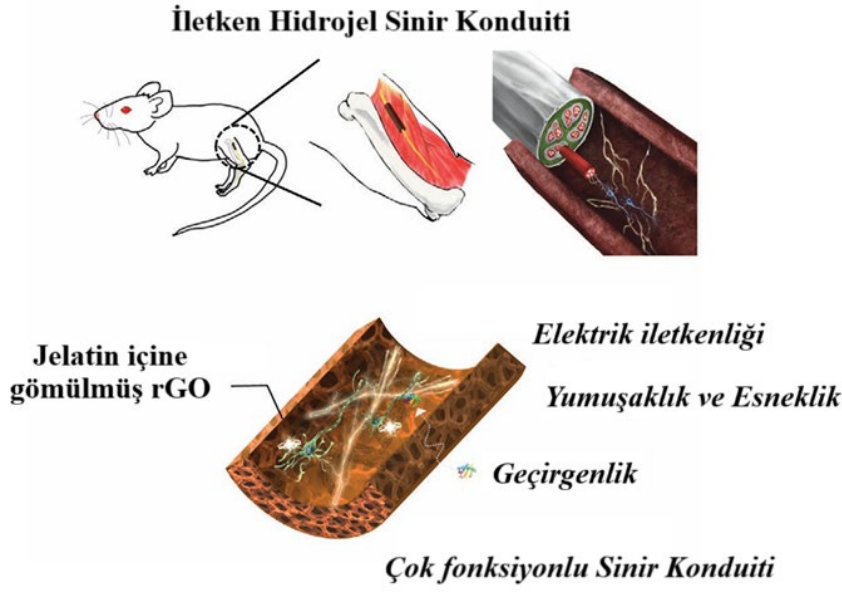
fiber haline getirilmesiyle de yapılabilir [73,74]. Dolgulu sinir konduitlerinin en büyük problemi defekt büyüklüğüne göre etkilerinin oldukça farklılık gösterebilmesidir [73].



Şekil 2.6. İyileştirilmiş sinir konduitleri tasarımlarını ve genel implantasyonu gösteren resim [75]

### 2.5.6 İletken Sinir Konduitleri

Sinir sisteminin doğal elektrokimyasal mekanizmasının varlığına ek olarak, doku mühendisliğinde iletken materyallerin başarısı göz önüne alındığında, iletken sinir konduitlerine yönelik çalışmalar başlamıştır. Doku mühendisliğinde kullanılan ve elektrik iletkenliği olan çoğu materyaller sinir konduiti tasarımında ve üretiminde kendi başlarına kullanıldığında yumuşaklık, esneklik ve geçirgenlik olarak yetersiz kalabilmektedir. Bu sebeple, iletken materyallerin uygun biyobozunur biyopolimerler ile birlikte kullanılmasına yönelik bir eğilim oluşmuştur. Böylece, hem elektrik iletkenliği sağlayan hem de yumuşaklık ve geçirgenlik gibi özellikler açısından başarılı olan konduitlerin üretilmesi amaçlanmıştır (Şekil 2.7) [76]. Bu hedef doğrultusunda bu biyopolimerler (selüloz, kitosan, hyaluronik asit, jelatin vb.) ile kompozit yapıda sinir konduitleri denenmiş ve iletken konduit tasarımlarına olan katkısı literatüre sunulmuştur [77].



Şekil 2.7. Çok fonksiyonlu iletken grafen tabanlı sinir konduiti illüstrasyonu [76]

Bu amaçla en çok çalışılan iletken polimerler; polipiroller (PPy), polianilinler (PANI), politiyofen (PTh), poli(3,4-etilendioksitiyofen) (PEDOT)'dir [78]. PPy mükemmel elektrik iletkenliğine sahip olması, ucuz olması, sentezinin kolay olması gibi avantajlarıyla öne çıkmakla birlikte zayıf çözünürlük ve biyobozunma karakteri gibi olumsuz yanları vardır [79]. Bu nedenle de tek başına kullanılması konduit gereksinimlerini karşılamamaktadır ve çeşitli biyobozunur polimerler (PLA, PLCL, PCL) ile kombine edilerek kullanılmaktadır [80]. PANI de tıpkı PPy gibi ucuz, kolay sentezlenmekte ve yüksek biyoyumluluğa sahiptir ama yine zayıf çözünürlük ve yetersiz tasarımsal özelliklerinden dolayı tek başına kullanımından ziyade kombinasyonlarla birlikte kullanılmaktadır [81].

Yukarıda bahsedilen iletken polimerler dışında karbon tabanlı olan ve yüksek elektrik iletkenliğine, kimyasal kararlılığa, esnekliğe, mekanik dirence ve yüksek yüzey alanı/hacim oranına sahip grafen ve grafen tabanlı iskeleler sinir doku mühendisliğinde çalışılmıştır [82]. Karbon nanotübüler yapılar olarak grafenin kullanıldığı çok katmanlı karbon nanotüp veya tek katmanlı karbon nanotüp, içi boş grafen tabanlı konduitler hücre adhezyonunu desteklemesi, büyümeyi ve farklılaşmayı teşvik etmesi ve başarılı sonuçları

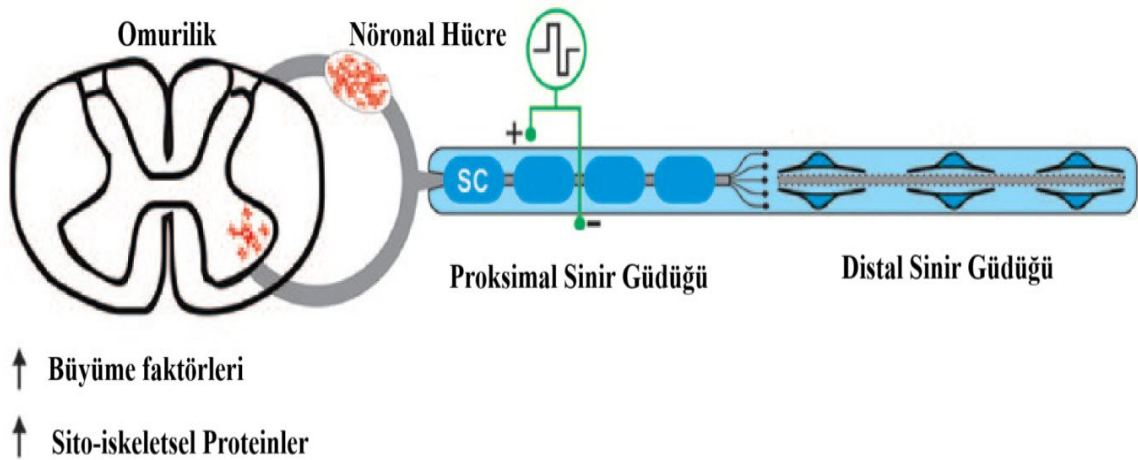


ile dikkat çekmiştir [83,84]. Grafenin indirgenmiş formu, daha iyi elektrik iletkenliği ve stabilite gösterdiği için indirgenerek de kullanılabilir [76].

### 2.5.7 Elektriksel Stimülasyon

Elektriksel stimülasyon (ES)'nin hücresel ve moleküler düzeyde doğrudan etkileri farklı doku tiplerinde, farklı araştırmacılar tarafından uzun zamandır mercek altında olmuştur. ES, çoğunlukla rejeneratif tıp alanında kullanılmasının yanı sıra, doku mühendisliğinde de büyük ilgi görmektedir; çünkü hücre proliferasyonunu, kök hücre farklılaşmasını teşvik etmekte, ayrıca doku mühendisliği ürünlerinin uygulandığı bölgede yeniden yapılanma ve olgunlaşmayı tetiklemektedir [85].

Periferik sinir doku mühendisliğinde ES geniş çapta incelenmiştir. ES'nin periferik sinir iyileşmesi üzerindeki etkisi, temelde nörit ve aksonun hızlandırılmış ve yönlendirilmiş desteklenmesine, ayrıca embriyonik kök hücrelerin nöral hücrelere farklılaşmasına dayanır. (Şekil 2.8) [86,87]. Bu temele dayanarak, sadece elektrik iletkenliği olan hücresel substratların kullanımı ve ES ile desteklenmesiyle bile *in-vitro* ortamda olumlu yönde sonuç alınabilmektedir [88,89]. Bununla birlikte hayvanlarda ve klinikte, primer onarım (sinir uçlarının uç uca getirilerek onarılması) sonrasında, sadece ES (20Hz veya daha az) uygulandığında fonksiyonel iyileşmenin daha iyi olduğu saptanmıştır [87].

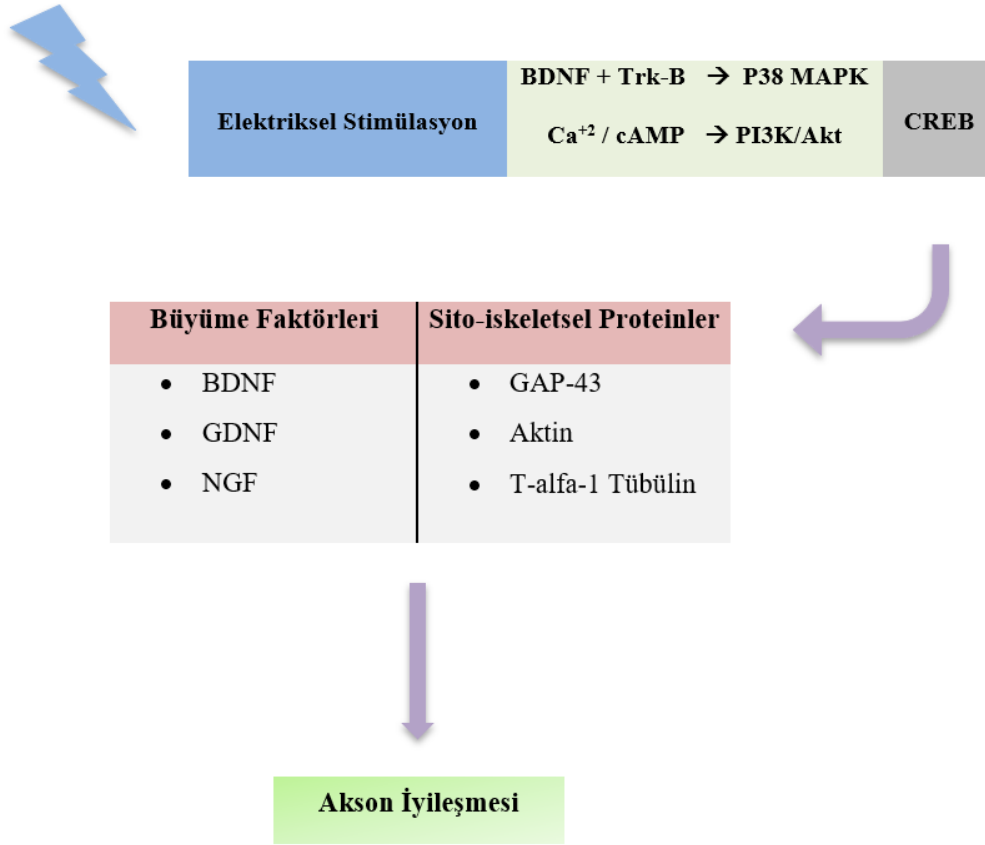


Şekil 2.8. Elektriksel stimülasyon uygulamasını gösteren diyagram [87]

Periferik sinir iyileşmesi için ES, elektrotların pozisyonu ve uygulama biçimine göre direkt kasa veya sinire uygulanabilir. Temel amaç aynı olsa da mekanizma olarak birbirlerine göre farkları vardır. Periferik sinir yaralanması sonrası felç durumunda kasa uygulanan ES ile miyozin zinciri gen ifadesi yüksek miktarda artmaktadır ve bu kas gücü ile doğru orantılıdır [90]. Kontrollü klinik çalışmalarda da (clinicaltrials.gov) bir kasa ES uygulandığında miyofibrillerin genişlediğini ve miyozin zinciri gen ifadesinin arttığını destekleyen makro-mikro bulgular gözlenmiştir [91].

Periferik sinir yaralanması sonrası sinire uygulanan ES ise beyin kökenli büyüme faktörü (BDNF) [10,92], glial hücre kökenli büyüme faktörü (GDNF) [93], tirozin kinaz reseptör B (Trk-B)[94] ve adenozin monofosfat (cAMP)[95] seviyelerini artırarak etki etmektedir (Şekil 2.9). Bu etki mekanizmasının temeli, kalsiyum iyonlarının ES etkisinde derişiminin artmasına ve artan bu kalsiyum iyonu derişiminin de proksimal sinir güdüğünde BDNF ve TrkB salınımını arttırmasına dayanmaktadır [96]. BDNF'in salınımının artmasını takiben hücre içinde fosfodiesteraz aktivitesi inhibe olmaktadır, bu da finalde cAMP seviyelerinin artmasına neden olmaktadır [92,97].

cAMP, kayma hareketi yapan sito-iskeletsel elemanlar için çok önemlidir. cAMP seviyeleri yükseldiğinde, CREB (cAMP yanıt elemanı bağlayıcı protein) bağlanarak cAMP-CREB aktif kompleksi oluşur, bunu takiben T-alfa-1 Tübülün ve GAP-43 (büyüme ile ilişkili/growth associated protein-43) gibi proteinler sentezlenerek devreye girer [98], transkripsiyon durdurucu bir protein olan Rho inhibe olur [99]. Trk-B de aynı amaçla ama farklı bir yolla, P38 mitojenle aktifleştirilen protein kinaz (P38 MAPK) ve Fosfatidilinositol 3 kinaz/Akt (PI3K/Akt) yolu ile etkili olur [100,101]. Tüm bu moleküler yolların amacı, sinir hücrelerinin yaralanma sonrası rejenerasyonunu ve dolayısıyla hücre iskeletinin oluşumunu desteklemektir.



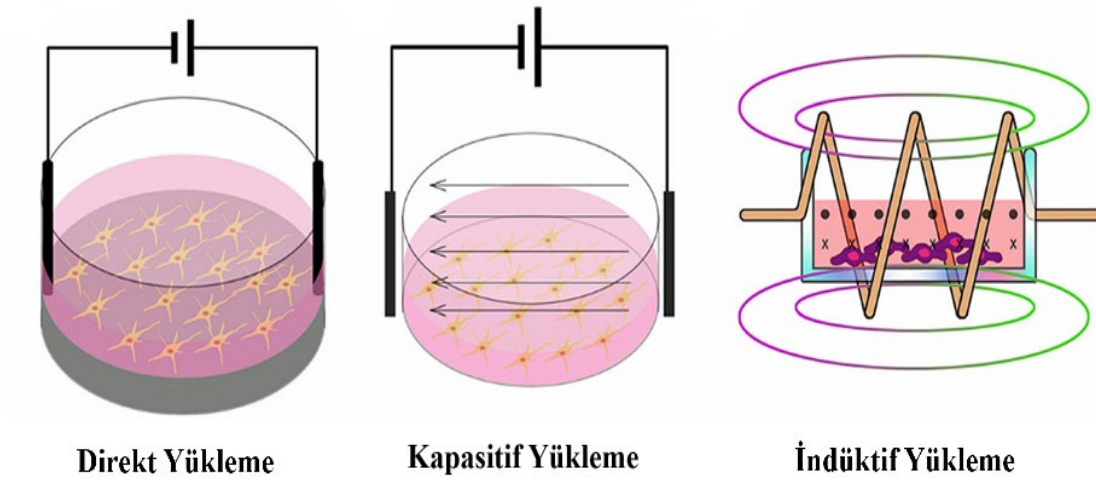
Şekil 2.9. ES altında sinir iyileşmesinin moleküler yolunun şematik gösterimi

ES, basit elektrik akım uygulama prensiplerine dayanarak *in-vivo* veya *in-vitro* olarak 3 farklı temel yöntem ile uygulanabilir (Şekil 2.10).

Bu yöntemlerden ilki elektrotların direk hücre kültürü ortamında, besiyerinin içinde veya dokuya gömülü olduğu “direkt yükleme” yöntemidir. Bu yöntem kolay uygulanabilirlik açısından tercih edilir. Ancak elektrotların direkt olarak besiyerinin veya doku ortamının içinde olmasının getireceği bazı olumsuz yan etkiler vardır. Örneğin, besiyeri ile elektrotun teması sonucunda çözelti içinde anot veya katotta gerçekleşen Faraday reaksiyonu nedeniyle oksidasyon ve zararlı yan ürünlerin oluşması mümkündür; bu da kültür ortamının pH ve sıcaklık değerlerinde değişikliklere yol açabilir [102,103].

ES için ikinci bir diğer yöntem ise “kapasitif yükleme” yöntemidir. Bu yöntemde iki elektrot karşılıklı olacak şekilde besiyeri ortamının dışında konumlandırılır, yani dolaylı bir tekniktir. Bu yöntemde elektrotlar arasında eşit ve düzenli bir yük dağılımı oluşturularak kültür ortamında hücrelerin konumu fark etmeksizin bütün hücreler ES’den eşit fayda görür [104].

Üçüncü bir ES yöntemi ise “indüktif yükleme” yöntemidir. Bu yöntemde hücre kültürü ortamı bir bobin çemberi içerisine alınır ve akım bobinden geçirildiğinde oluşan elektromanyetik alanın etkisi ile çalışır. Çoğunlukla doğal işleyişi taklit etmesi nedeniyle PEMF (atımlı elektromanyetik alan stimülasyonu) şeklinde uygulanır [105] [106]. Tüm hücrelerin manyetik alandan eşit düzeyde etki görmesi için Helmholtz düzeninde manyetik alan uygulanır [107].



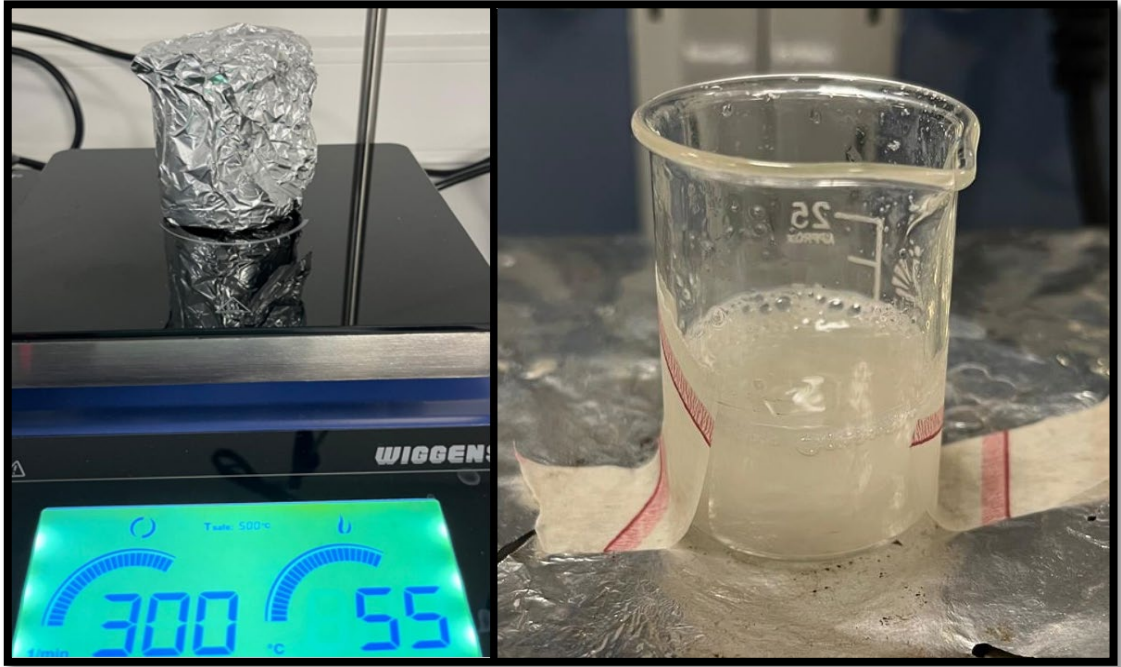
Şekil 2.10. Temel ES yöntemlerinin şematik gösterimi [108]

### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

#### 3.1 Hidrojellerin Yapımı

##### 3.1.1 Metakrilatlanmış Jelatinin Sentezi

Jelatin metakrilat (GelMA)'ın hazırlanmasında kullanılan sığır jelatini ticari olarak önceden satın alınmıştır. 1L distile suda 0,075M sodyum karbonat ve 0,175M sodyum bikarbonat çözündürülmesiyle 0,25M CBS hazırlanıp stok edilmiştir. Daha sonra 55°C'de ayarlanmış manyetik karıştırıcıda jelatinin CBS'e eklenmesiyle hazırlanan çözelti homojen olana kadar karıştırılmıştır (Şekil 3.1).

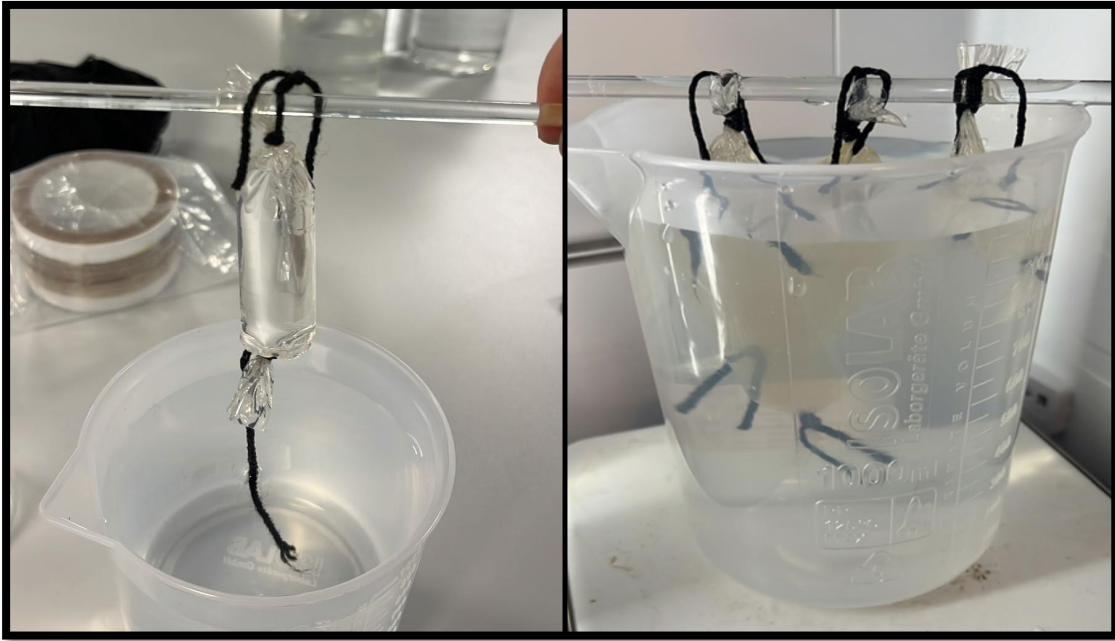


Şekil 3.1. 55°C'de ayarlanmış manyetik karıştırıcıda jelatinin CBS'de çözündürülmesi ve homojen hale gelmiş çözelti.

Çözeltinin homojen olduğundan emin olunduktan ve pH yaklaşık 9 seviyesine çekildikten sonra, karıştırma devam ederken 1gr jelatin başına 0,1mL olacak şekilde kontrollü olarak damla damla MAA (Metakrilik Anhidrit) eklenmiştir. Işığa duyarlı bir yapıda olan MAA'nın ışıktan etkilenmesini engellemek için bütün işlemler folyo ile kaplanmış beherlerde gerçekleştirilmiştir. Çözelti 3 saat boyunca bu şekilde karıştırıcıda bırakılarak reaksiyonun tamamlanması sağlanmıştır. 3 saat sonunda pH yaklaşık 7,4 seviyelerine

çekilmiştir ve reaksiyon durdurulmuştur. Çözeltinin pH'sını ayarlama işlemlerinin hepsinde 6M hidroklorik asit ve 5M sodyum hidroksit kullanılmıştır.

Reaksiyon durdurulduktan sonra çözelti diyaliz membranlara doldurulup ağzları bağlanarak paket haline getirilmiştir. Bu diyaliz membran paketleri, 5 gün boyunca karıştırıcı desteğiyle distile su içinde diyalize edilmiş ve böylece membran içerisindeki çözelti, fazla MAA'dan arındırılmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. GelMA çözeltilerinin diyaliz membrana koyulması ve distile su içerisinde bekletilmesi

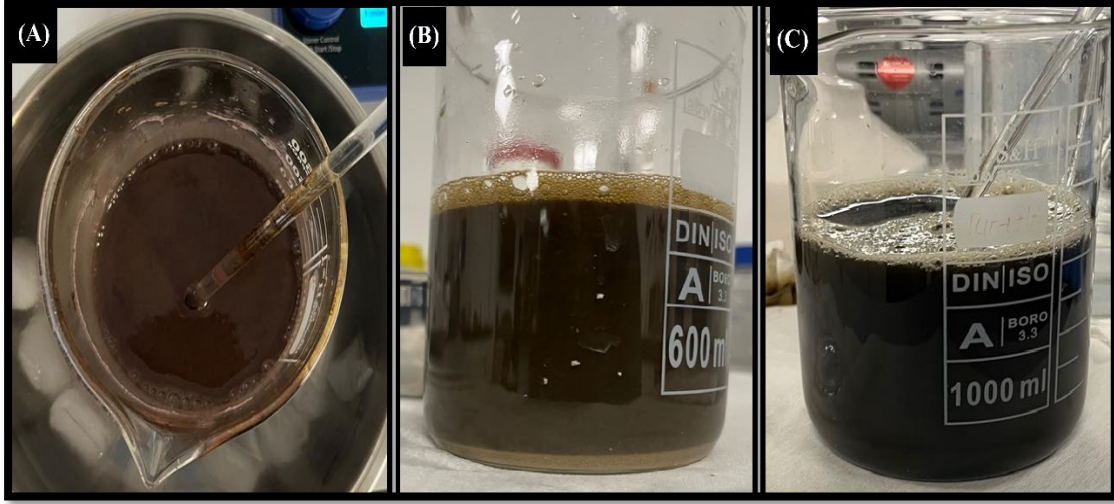
Son olarak, diyaliz işlemini takiben ürünler petrilere alınmıştır. Petrilere olan ürünler liyofilizasyon işlemi ile kurutulduktan sonra kurutulan malzemeler öğütücüde toz haline getirilmiş ve falkonlara koyularak kullanıma hazır halde 4°C'de karanlık ortamda saklanmıştır.

### 3.1.2 Grafen Oksitin Sentezi

Grafen oksit üretmek için 2,08M grafit, sürekli buz banyosu desteğiyle 200mL sülfürik asitte 1 saat boyunca karıştırılarak bekletilmiştir. Daha sonra 0,00095M potasyum permanganat, hazırlanan çözeltiye yavaş yavaş eklenmiştir. Karıştırmaya 24 saat boyunca devam edilmiştir ve bu süreçte grafit, grafen oksite modifiye edilmiştir. Karışım, çözeltinin tamamen homojen bir hale gelmesini sağlamak için yaklaşık 2 saat boyunca karıştırıcıda karıştırılmıştır ve sonuç olarak homojen, koyu kahverengi bir çözelti elde edilmiştir (Şekil 3.3, (A)).

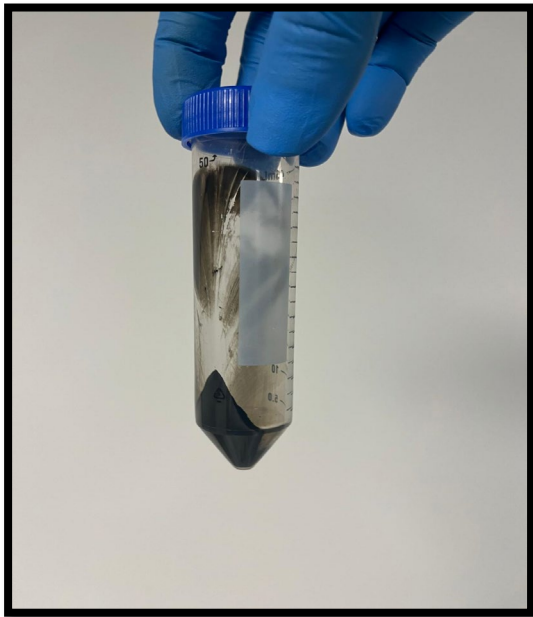
Daha sonra 100mL distile su yavaşça bu kahverengi çözeltiye eklenmiştir ve yaklaşık 30°C'de 5 saat boyunca ultrasonikasyon işlemine tabi tutulmuştur. Ultrasonikasyon işleminden sonra karışım 90°C'de 1 saat daha ısıtılıp ve karıştırılmıştır. 1 saat sonra ise reaksiyonu durdurmak için karışıma 30mL hidrojen peroksit eklenmiştir. Çökelmenin olduğu gözlenerek reaksiyonun durdurulduğundan emin olunmuştur (Şekil 3.3, (B)).

Son aşamada, grafen oksitin indirgenip rGO elde edilebilmesi için L-askorbik asit ile kimyasal indirgeme işlemi gerçekleştirilmiştir. Öncelikle 10g L-askorbik asit 100mL distile suda çözündürülmüştür. Daha sonra elde edilen çözelti, grafen oksit çözeltisi ile birleştirilmiştir. Birleştirme işleminden sonra karışım 95°C de 1 saat karıştırılarak ısıtılmıştır. Isıtma ve karıştırma işleminden hemen sonra karışım 15 dk boyunca ultrasonikasyona tabi tutulmuştur. Kahverengi çözeltinin indirgeme işleminden sonra daha koyu bir görüntü aldığı gözlenmiş ve askorbik asidin çalıştığından emin olunmuştur (Şekil 3.3, (C)).



Şekil 3.3. Buz banyosu altında kahverengi grafen oksit çözeltisi (A), çökelmenin meydana geldiği ve reaksiyonun durdurulduğu grafen oksit çözeltisi (B) ve koyu renkli indirgenmiş grafen oksit çözeltisi (C)

Elde edilen çözelti falkonlara koyularak 8000 rpm'de 20 dk boyunca santrifüj işlemine tabi tutulmuştur ve indirgenmiş grafen oksit partikülleri çöktürülmüştür (Şekil 3.4). Dipte kalan çökelti sırasıyla 1M hidroklorik asit ve distile su ile yıkanmış ve pH nötrlenmiştir.

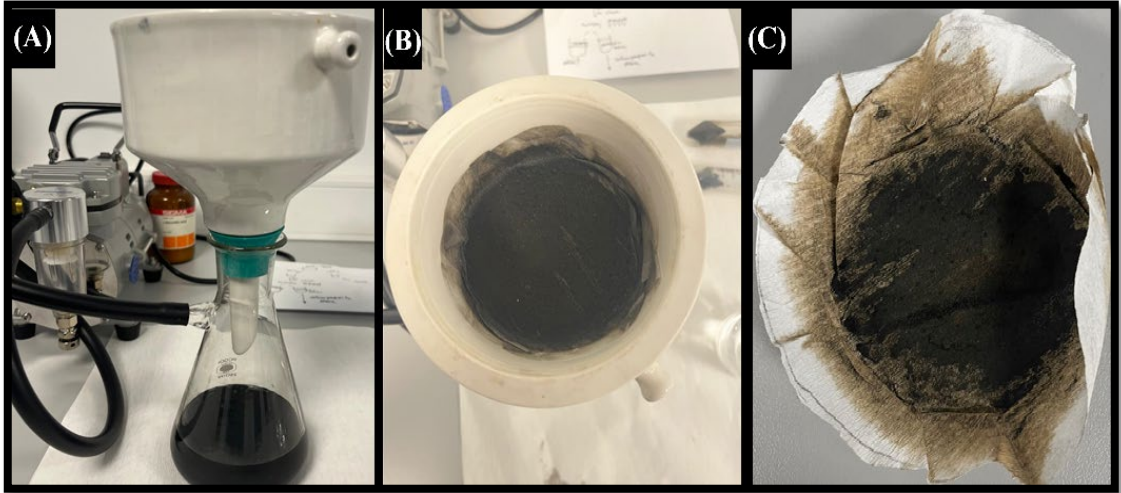


Şekil 3.4. Süpernatant atıldıktan sonra kalan indirgenmiş grafen oksit çökeltisi



Yıkama işleminde sonra, vakum pompasında filtre kağıdıyla indirgenmiş grafen oksit partikülleri tutulmuştur (Şekil 3.5, (A), (B)). Santrifüj ile çöktürme ve vakumlama işlemlerinden sonra filtreden geçirilmiş çözelti, falkonlarda çökelti kalmayana kadar tekrar santrifüj ve vakumlama işlemlerinden geçirilmiştir.

Vakumlama işlemleri sonlandıktan sonra, indirgenmiş grafen oksit partiküllerinin tutulduğu filtre kağıtları, yırtılmayacak şekilde ve dikkatlice vakum kasesinden ayrılmıştır. Ayrılan filtre kağıtları fırında kurumaya bırakılmıştır (Şekil 3.5, (C)). Kurutulma işlemini takiben de partiküller filtre kağıdından kazınarak toplanmış ve ependorf tüplere koyularak kullanıma hazır hale gelmiştir.

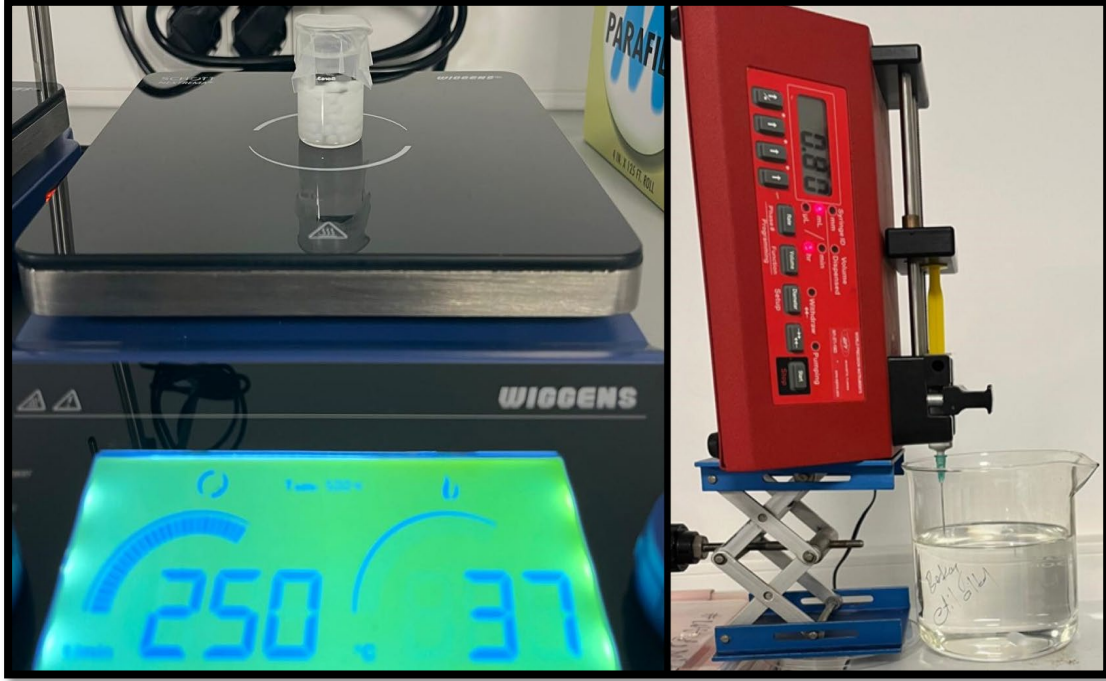


Şekil 3.5. Vakum pompasında çekilen indirgenmiş grafen oksit çözeltisi (A), filtreye tutulan indirgenmiş grafen oksit partikülleri (B) ve filtre kağıdı kurutulduktan sonra toplanmaya hazır indirgenmiş grafen oksit partikülleri (C)

### 3.1.4 Polikaprolaktonun Fiber Haline Getirilmesi

Ticari olarak önceden satın alınmış PCL, 9:1 oranında kloroform ve etanol içerisinde, 250rpm ve 37°C’de manyetik karıştırıcı ile çözdürülmüştür. Oluşan homojen çözelti 24G şırıngaya çekilmiş ve ıslak eğirme işlemi için hava kalmayacak şekilde cihaza takılmıştır. Behere koyulan 4°C’deki soğuk etanole iğnenin ucu yaklaşık 3mm girecek şekilde cihaz

yüksekliği ayarlanmıştır. Optimal pozisyon elde edildikten sonra saatte 0,8mL akış hızına ayarlanan cihaza başla komutu verilmiştir (şekil 3.6).



şekil 3.6. Polikaprolaktonun kloroform ve etanol içerisinde zdrlmesi (solda) ve ıslak eğirme için hazırlanan deney düzeneği (sağda)

Başla komutunun ardından iğnenin ucundan soğuk etanole szlen katı PCL fiberleri bir çubuk yardımıyla mümkün olduğunca sabit bir hızda sarılarak dikkatlice toplanmıştır. Daha sonra, bu PCL fiberleri kurutularak son halini almış ve kullanıma hazır hale getirilmiştir (şekil 3.7).



Şekil 3.7. Kullanıma hazır polikaprolakton fiberleri

### 3.1.5 Metakrilatlanmış Jelatinin Fotopolimerizasyona Hazırlanması

Bu tez çalışmasında jelatin metakrilat (GelMA) hidrojellerinin elde edilmesi için ultraviyole (UV) çapraz bağlama yöntemi tercih edilmiştir. UV çapraz bağlama yöntemi için “Cellink GelMA Casting” protokolündeki adımlar izlenmiştir ve bu bağlamda foto başlatıcı olarak Irgacure 2959 kullanılmıştır [109].

Çizelge 3.1. Kütlece GelMA/Irgacure 2959 oranı (Cellink GelMA Casting Protocol).

GelMA(%wt)	GelMA(g)	Irgacure 2959(%wt)	Irgacure 2959(g)
3	0.3	0.5	0.05
5	0.5	0.5	0.05
7	0.7	0.5	0.05

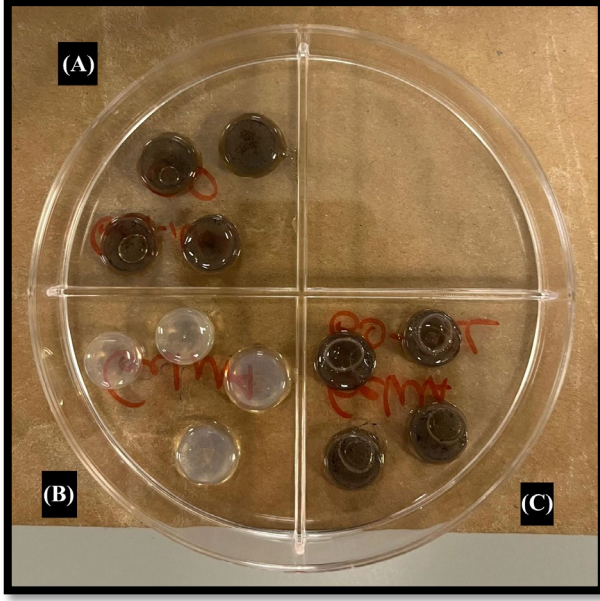
Bu protokole göre (Çizelge 3.1), kütlece %5’lik GelMA çözeltisi hazırlamak için bir falkona 8mL CBS çözeltisi eklenmiştir ve içerisine 0.5gr GelMA tozu ilave edilmiştir. Eş zamanlı olarak bir diğer falkona da 2mL CBS çözeltisi eklenmiştir ve içerisine 0.05gr Irgacure 2959 tozu ilave edilmiştir. Hazırlanan bu iki falkon vorteksleme işlemine tabi tutularak karıştırılmıştır. Devamında, önceden ısıtılmış 70°C’deki su çalkalayıcıda 30 dk

çalkalama işlemine tabi tutularak çözeltinin iyice çözündürülmesi sağlanmıştır. 30 dk sonra ise her iki falkondaki çözeltinin çözündüğünden emin olunduğunda, her iki falkondaki çözelti büyük olan tek falkona alınıp çözeltiler birleştirilmiştir. Birleştirme işleminden sonra çözeltinin iyice karışmasını sağlamak için de 15 dk daha 45°C’de çalkalama işlemine tabi tutulmuştur. 15 dk sonunda da UV ile çapraz bağlamaya hazır bu çözeltiler bir sonraki aşamalarda kullanım için folyoya sarılarak karanlık ortamda ve 4°C’de saklanmıştır.

### **3.1.6 Metakrilatlanmış Jelatinin Fotopolimerizasyonu ve Hidrojel Haline Getirilmesi**

Bir önceki aşamada hazırlanan ve Irgacure 2929 ile birleştirilen tüm jelatin metakrilat (GelMA) çözeltileri 48-kuyucuklu plaka içerisine 200 mikrolitre olacak şekilde pipetle eşit olarak koyulmuş ve 365nm ultraviyole (UV) ışık altında 10 dk bekletilmiştir. Fotopolimerizasyon işlemleri için yapılan tüm UV uygulamaları, ışığın dışarıdan sızmasını engellemek için mümkün olduğunca dikkatli bir şekilde karanlık bir odada gerçekleştirilmiştir.

İndirgenmiş grafen oksit (rGO) ve polikaprolakton (PCL) ile birlikte hidrojel elde etmek için kütlege %0,25wt oranında rGO kullanılmıştır. Bu bağlamda istenen karışım çözelti miktarına uygun olarak tartılan rGO partikülleri GelMA çözeltisi içerisine eklenmiştir. Şekil 3.7’deki gibi hazırlanan PCL sarmal fiberleri eşit genişlikte ve uzunlukta makasla kesilerek 48-kuyucuk plaka tabanına, çeperele degecek şekilde yerleştirilmiştir. Daha sonra GelMA-rGO çözeltisi iyice vortekslenerek rGO partiküllerinin mümkün olduğunca çözelti içerisinde dağılması sağlanmıştır. Vorteksleme işleminden sonra daha iyi bir homojenizasyon sağlamak amacıyla da çözelti 20 dk ultrasonikasyona maruz bırakılmıştır. Ultrasonikasyondan sonra GelMA-rGO çözeltisi, rGO partiküllerinin tekrar çökmemesi için hızlı bir şekilde PCL fiberlerinin de olduğu 48-kuyucuklu plakaya koyularak ve 10 dk UV’ye maruz bırakılarak karışımın çapraz bağlanması sağlanmıştır. Böylece, sonuç olarak GelMA, rGO ve PCL kombinasyonun oluşan hidrojeller elde edilmiştir (Şekil 3.8, (C)).



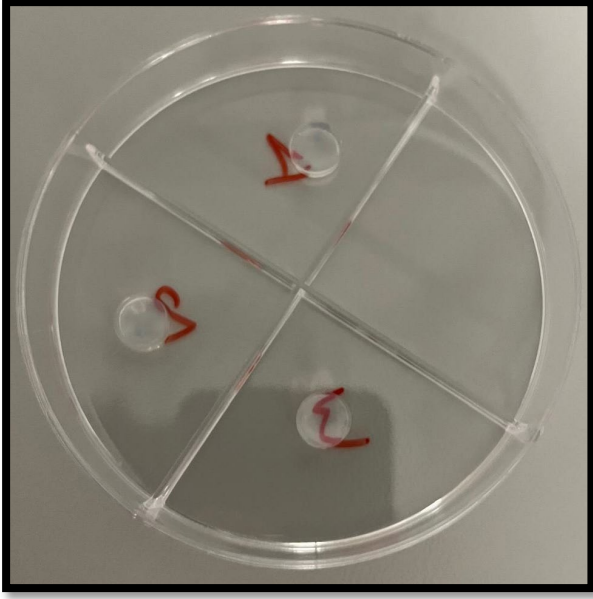
Şekil 3.8. GelMA hidrojelleri (B), GelMA ve rGO'dan oluşan hidrojeller (A), GelMA, rGO ve PCL'den oluşan hidrojeller (C)

### 3.5. Hidrojellerin Şişme Testi

GelMA, GelMA/rGO ve GelMA/rGO/PCL'den oluşan hidrojellerin özelliklerinin karakterizasyonu açısından şişme testi uygulanmıştır.

Bu test için gereken hidrojeller; 1. Grup olarak GelMA, 2. Grup olarak GelMA ve rGO kombinasyonu halinde ve 3. Grup olarak da GelMA, rGO ve PCL kombinasyonu halinde ve her gruptan da 3 tane örnek olacak şekilde hazırlanmış eşit miktarda çözeltilerin 365nm UV altında 10 dk tutulmasıyla yapılmıştır.

Çapraz bağlanarak hazırlanan bu hidrojellerin öncelikle başlangıç ağırlıkları tartılmıştır. Sonrasında sırasıyla 1, 3 ve 5. Dk'larda distile suda bekletilerek şişme testine maruz bırakılmıştır (Şekil 3.9). Belirtilen her dk sonunda hidrojellerin ağırlıkları ölçülmüş ve kaydedilmiştir.



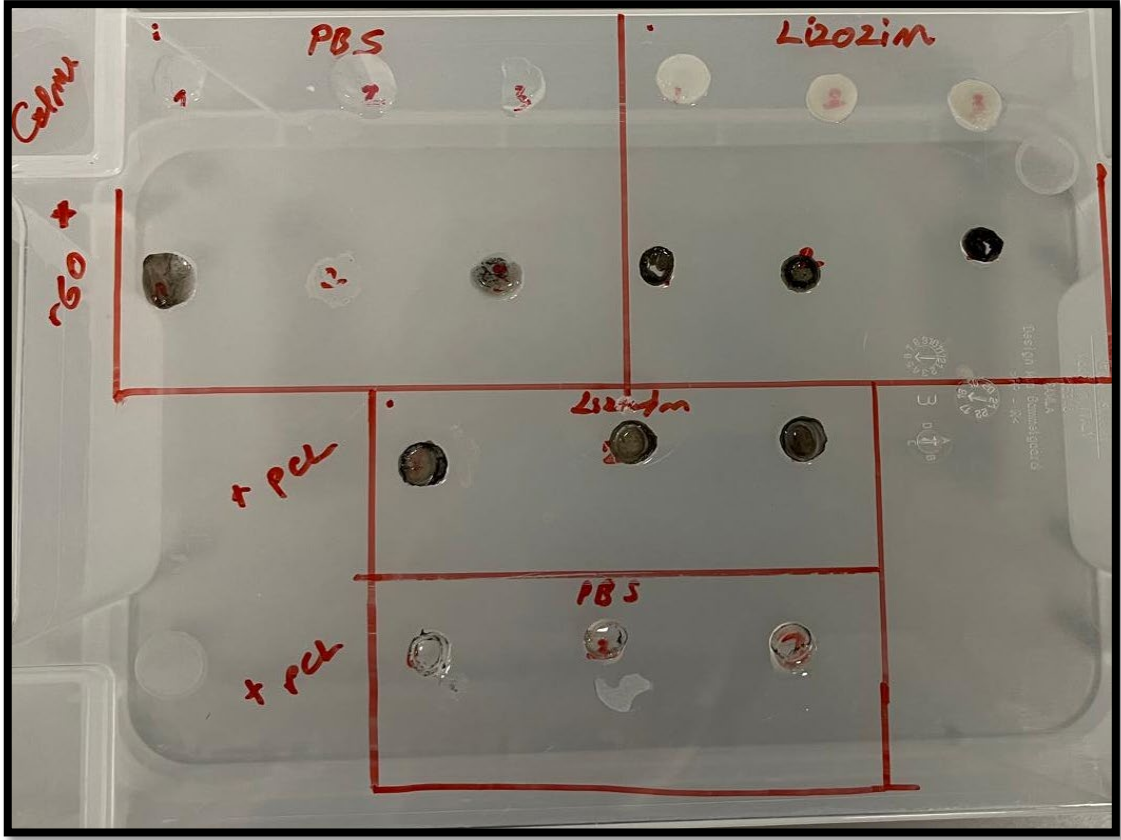
Şekil 3.9. Şişme testi için bölmeli petride distile su içerisine koyulan GelMA hidrojel örnekleri

### 3.6. Hidrojellerin Bozunma Testi

GelMA, GelMA/rGO ve GelMA/rGO/PCL'den oluşan hidrojellerin özelliklerinin karakterizasyonu açısından bozunma testi uygulanmıştır.

Bu test için gereken hidrojeller; 1. Grup olarak GelMA, 2. Grup olarak GelMA ve rGO kombinasyonu halinde ve 3. Grup olarak da GelMA, rGO ve PCL kombinasyonu halinde ve her gruptan da 6 tane örnek olacak şekilde hazırlanmış eşit miktarda çözeltilerin 365nm UV altında 10 dk tutulmasıyla yapılmıştır. 3 adet 6-kuyucuklu plaka (2x3) kullanılmıştır.

Örnekler 3'erli olarak 6-kuyucuklu plakaya yerleştirilmiştir. 9 örnek fosfat tamponu (PBS) ile 9 örnek de lizozim ile muameleye bırakılacak şekilde örnekler biyobozunma sürecini gözlemlemek amacıyla 37°C sıcaklıkta etüv içerisinde 85rpm çalkalayıcıya alınarak eş zamanlı bekleme alınmıştır. Sırasıyla 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20 ve 30. Günlerde örnekler alınarak oda koşullarında 1 saat kurumaya bırakılmıştır (Şekil 3.10). Kuru örneklerin ağırlıkları ölçülmüş ve kaydedilmiştir.



Şekil 3.10. Biyobozunma testleri sürecinde kuru ağırlık ölçümü almak için kurumaya bırakılan hidrojel örnekleri

### 3.7. Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi

Jelatinden elde edilen GelMA'nın özelliklerinin karakterizasyonu açısından nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi testi uygulanmıştır.

Bu test için 10mg jelatin ve GelMA örneği tartılarak NMR tüplerine aktarılmıştır. Daha sonra bu tüplere 1mL döteryum oksit eklenerek 50°C'de örnek çözündürülmüştür. Çözünme işleminden sonra çözelti soğuması için oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra 40°C'ye ayarlanan NMR cihazında 400MHz proton rezonans frekansında 30 dk spektrum toplama işlemi yapılmış ve veriler incelemek üzere kaydedilmiştir.

### 3.8. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi

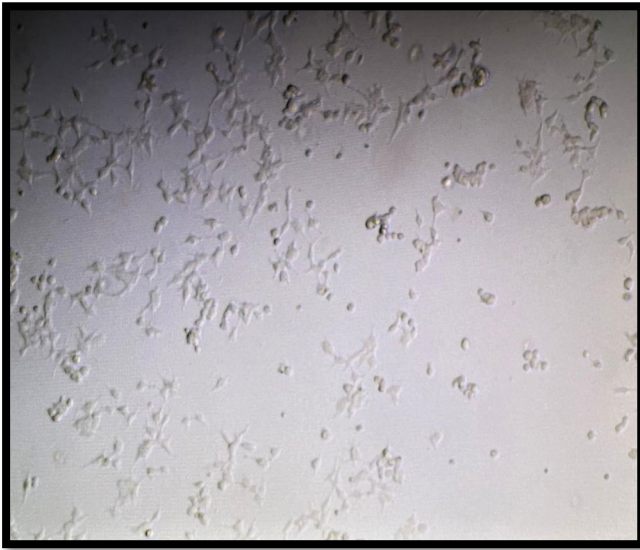
Bu tez çalışmasında kullanılan ve/veya işleme tabii tutulan örnekler (rGO, GO, PCL, GelMA, Jelatin), uygun bir şekilde hazırlandıktan sonra FTIR spektroskopik analizleri yapılmıştır. Elde edilen veriler ve spektrum incelenmek üzere kaydedilmiştir.

### 3.9. Hücre Kültürü Çalışmaları

SH-SY5Y hücreleri kullanılarak yapılan deneylerde, hücre kültürü için hazırlanan besiyerinin bileşimi şu şekildedir:

- %45 DMEM Düşük Glukoz (Düşük Glukozlu Dulbecco's Modified Eagle Medium)
- %45 Ham's F12 (Ham's F12 Besiyeri)
- %10 Fetal Sığır Serumu (FBS)
- %1 Penisilin/Streptomisin (Antibiyotikler)

Hücreler için optimal olan, 37°C sıcaklıkta ve %5 karbondioksit (CO<sub>2</sub>) içeren bir inkübatörde yetiştirilmiştir. Hücre kültürü düzenli olarak besiyerinin yenilenmesi ve hücre yoğunluğunun kontrol altında tutulması amacıyla takip edilmiştir (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinin ışık mikroskobu altında görüntüsü



### 3.9.1 Hücre Canlılık Testi

Bu çalışmada, hücre canlılığının kantitatif değerlendirilmesi amacıyla MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolyum bromid) tabanlı sitotoksik analiz yöntemi, ISO-10993-5 standardında belirtilen elüsyon yöntemi uyarlanarak *dolaylı yoldan* uygulanmıştır [110].

Test için gerekli olan hidrojeleller üç farklı grup olarak hazırlanmıştır: Birinci grup GelMA'dan, ikinci grup GelMA ve indirgenmiş grafen oksit (rGO) kombinasyonundan ve üçüncü grup ise GelMA, rGO ve polikaprolakton (PCL) kombinasyonundan oluşmaktadır. Her gruptan altı adet örnek, eşit hacimlerdeki çözeltiler 365 nm dalga boyundaki ultraviyole (UV) ışığına 10 dakika süreyle maruz kalarak oluşturulmuştur.

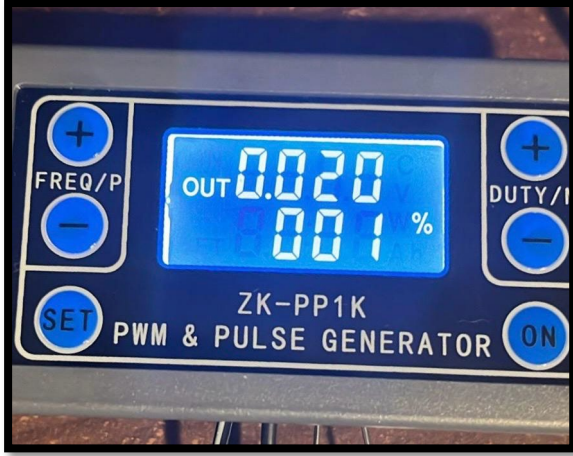
Oluşturulan hidrojeleller sterilizasyon amacıyla ilk olarak 30 dk UV'ye maruz bırakılmıştır. Sonrasında ise %80 etanol içerisinde 2,5 saat bekletilmiştir. Bu işlemler sonrasında hidrojelellerin steril olduğundan emin bir şekilde hücre kültürü aşamasına geçilmiştir.

Hücre kültürü aşamasında 96-kuyucuklu plaka kullanılmıştır ve her grup için 10000 hücre/kuyu derişim kullanılmıştır. Kontrol grubu olarak belirlenen iki kuyucuk, yalnızca hücre içermektedir. Bu test 2 gün süresince (24 ve 48 saat ölçümleri almak üzere) gerçekleştirilmiştir. Ölçümler alınmadan önce, kuyucuklardaki besiyerleri, hidrojeleller içeren besiyerleri ile değiştirilmiştir. Ardından MTT çözeltisi eklenip (15mg/mL), örnekler 4 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Son olarak, mikropilaka okuyucu cihazı kullanılarak, örneklerin 570 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri yapılmıştır. Çalışmada, herhangi bir etkiye maruz bırakılmayan SH-SY5Y hücreleri kontrol grubu olarak kullanılmış ve canlılık hesabı kontrol grubuna göre hesaplanmıştır.

### 3.9.2 Elektriksel Stimülasyon

Bu tez çalışmasında kullanılan elektriksel stimülasyon (ES) için, mikroişlemciye sahip ve ayarlanabilir ZK-PP1K marka kare dalga üretici tercih edilmiştir. Bu üretici, giriş ve çıkış voltajlarını eşit olarak sağlamaktadır. Bu nedenle, 2 adet 1.5V AA kalem pil seri şekilde

bağlanarak 3V elde edilmiş ve bu voltaj, kare dalga üreticinin güç kaynağı olarak kullanılmıştır. Üreteçten çıkacak 3V, %1 döngü oranı ve 20Hz frekans ayarı ile kare dalga üretmek üzere ayarlanmıştır (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. 20Hz ve %1 döngü ayarlarında ZK-PP1K kare dalga üretici ön yüzü

ES uygulamasında kapasitif yükleme yöntemi tercih edilmiştir. Bu yöntemle, ES uygulanacak örneklerin yerleştirildiği tekli petri kaplar, üst üste dizilmiştir. Kapların karşılıklı kenarlarına, uçları timsah elektrotlarının tutunabileceği şekilde uzun bırakılarak, boydan boya %100 iletken bakır bantlar yapıştırılmıştır.

Timsah elektrotlarının bakır bantlara doğru şekilde takıldığı ve bakır bantların yüzeye tamamen temas ettiği teyit edildikten sonra, ZK-PP1K cihazına başlama komutu verilerek örneklere 10 dakika boyunca ES uygulanmıştır (Şekil 3.13). Tüm ES işlemleri, inkübatörün dışında, laminar akışlı çalışma kabininde yapılmıştır. Ayrıca, ES uygulamaları sırasında üretilen kare dalga, bir osiloskop (DSO152) ile sürekli olarak izlenmiştir (Şekil 3.14).



Şekil 3.13. Elektriksel stimülasyon uygulama anında petri kaplara yapıştırılan bakır bantlar ve onlara tutturulan timsah elektrotların görüntüsü



Şekil 3.14. Elektriksel stimülasyon uygulama anında ZK-PP1K (üstte) ve osiloskop (altta) görüntüsü

### 3.9.3 Hücre Proliferasyon Testi

Bu çalışmada, hücre çoğalmasının kantitatif değerlendirilmesi amacıyla Alamar Mavi tabanlı analiz yöntemi uygulanmıştır.

Test için hazırlanan hidrojeller üç farklı grupta sınıflandırılmıştır: Birinci grup yalnızca GelMA'dan, ikinci grup GelMA ve indirgenmiş grafen oksit (rGO) kombinasyonundan ve üçüncü grup GelMA, rGO ve polikaprolakton (PCL) kombinasyonundan oluşmaktadır. Her gruptan, eşit hacimdeki çözeltiler 365 nm dalga boyundaki UV ışığına 10 dakika maruz bırakılarak toplam on iki adet örnek oluşturulmuştur. Her bir gruptaki on iki örneğin altısı elektriksel stimülasyon (ES) için ayrılmış, diğer altısı ise ES uygulanmadan bırakılmıştır.

Hücre kültürü aşamasında, ES uygulanmayan gruplar için 48-kuyucuklu plaka kullanılmıştır. ES uygulanan gruplarda ise, uygulama protokolü ve teknik gereklilikler doğrultusunda tekli petri kaplar tercih edilmiştir. Her iki gruptaki örneklerin üzerine 50.000 hücre ekilmiş ve hücrelerin hidrojellere tutunması için inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sürecinin ardından, kuyucukların ve petri kaplarının kenarlarına yakın bölgelere besiyeri dikkatlice eklenmiştir. Ölçümler için, 1., 3. ve 5. günlerde hücre kültürü ortamı aspirasyon ile alınmıştır. Sonrasında, Alamar Mavi reaktifi, DMEM-F12 ve DMEM Düşük Glukoz besiyeri ile 1:15 oranında seyreltilerek hücre kültürü ortamına eklenmiş ve 4 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası, 48-kuyucuklu plakalar ve tekli petri kaplar 96-kuyucuklu plakaya transfer edilmiş ve mikropilaka okuyucu cihazı kullanılarak örneklerin 570 nm dalga boyunda absorban ölçümleri yapılmıştır.

## 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

### 4.1. Hidrojellerin Karakterizasyonları

Bu tez çalışmasında üretilen hidrojellerin temel bileşeni olan jelatin metakrilat (GelMA), karışımın kütlece %5'ini oluşturmaktadır. GelMA konsantrasyonu arttıkça, hidrojelin sertliği ve mekanik direnci artar; ancak, doku mühendisliğinde GelMA'nın önemli özellikleri olan su tutma kapasitesi, hücre infiltrasyonu ve porozite gibi özellikler azalır. Bu nedenle, mevcut çalışmalar genellikle GelMA konsantrasyonunu düşük tutarak, mekanik direnç özelliklerini diğer malzemelerle kombin ederek sağlamayı tercih etmektedir [111]. Bu tez çalışmasında, GelMA oranı %5 gibi düşük bir seviyede tutularak hidrojelin özelliklerinden en iyi şekilde yararlanılması amaçlanmıştır. Ayrıca, olası bir konduit modelinde gerekli mekanik direnç ve destek, polikaprolakton (PCL) ile sağlanmaya çalışılmıştır. Biyobozunma çalışmalarında ise, %20 GelMA içeren hidrojellerin bozunma süresi 8 haftadan uzun iken, %5 GelMA içeren hidrojellerin bozunma süresinin 3 günden daha kısa olabileceği belirlenmiştir [112]. PCL'in %5 GelMA ile kullanıldığı ve sonuç alındığı çalışmalar da mevcuttur.

Bu *in-vitro* çalışmada, PCL içeren GelMA hidrojellerin UV ışığı ile çapraz bağlanmasının ardından, adheziv yapıları sayesinde PCL ile etkili bir şekilde yapışacağı ve GelMA'nın dayanıklılığının artacağı öngörülmüştür. Ayrıca, tez çalışmasında ele alınan konduit prototipleri için, elektriksel iletkenlik sağlamak amacıyla kütlece %0,25 oranında indirgenmiş grafen oksit (rGO) eklenmiştir. RSC96 hücre hattı üzerinde yapılan ve farklı metodolojileri kullanan, ancak sonuçları birbirine yakın ve güvenilir olan bir çalışma, %0,25 ve %0,5 rGO oranlarının hücre proliferasyonu üzerinde en olumlu etkileri sağladığını göstermiştir [113].

Bu tez çalışması, yukarıda belirtilen bilgiler doğrultusunda, elektriksel stimülasyona yüksek duyarlılık gösteren, iletken ve yeterli mekanik dirence sahip, konduit benzeri bir hidrojel doku iskelesinin temel bir yaklaşımla tasarımını kapsamaktadır. Bu kapsamda, üretilen hidrojellerin dokuya uyum sağlayıp sağlamadığı ve sinir iyileşmesi sürecinde gelecekteki bir konduit modelinde gerekli dayanıklılığı sergileyip sergilemeyeceği

üzerine çeşitli karakterizasyon analizleri gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir.

#### 4.1.1 Hidrojellerin Şişme Testlerinin Değerlendirilmesi

Şişme testleri, hidrojellerin su tutma kapasitesi hakkında önemli bilgiler sağlar. Yüksek su tutma kapasitesine sahip hidrojeller, hücreler için nemli bir ortam oluşturur; bu da hücrelerin canlılığını korumasına ve fonksiyonlarını sürdürebilmesine yardımcı olur [114]. Su aynı zamanda, besin maddelerinin ve metabolik atıkların difüzyonu için bir aracı görevi görür. Hidrojellerin yüksek su tutma kapasitesi, bu maddelerin hücrelere ulaşmasını ve atıkların uzaklaştırılmasını kolaylaştırıcı bir etkiye sahiptir [115].

Bu tez çalışmasında, su tutma kapasitesini değerlendirmek amacıyla, GelMA, GelMA/rGO ve GelMA/rGO/PCL'den oluşan deney gruplarına ait örnekler distile su kullanılarak şişme testine tabi tutulmuştur. 1., 3. ve 5. dakikalardaki ölçümler kaydedilmiş ve örneklerin ilk ağırlıklarına göre, ayrıca bir önceki ölçüm değerlerine göre yüzde artış miktarları hesaplanmıştır.

Çizelge 4.1. Hidrojellerin zamana bağlı şişme yüzdelerinin gösterimi

Deney Grubu	1. dk	3. dk	5. dk
GelMA	%19,02	%29,76	%47,86
GelMA/rGO	%13,12	%25,25	%36,38
GelMA/rGO/PCL	%29,26	%42,14	%53,28

Yüzde artış miktarlarına ilişkin veriler değerlendirildiğinde, tüm deney gruplarının hidrofilik yapıda olduğu ve su tutma kapasitesine sahip olduğu anlaşılmaktadır (Çizelge 4.1). Ancak, özellikle 1. ve 3. dakikalarda GelMA/rGO ve GelMA/rGO/PCL içeren grupların örneklerinin %2-3 oranında daha hızlı şiştiği gözlemlenmiştir. Bu durumun sebebi, rGO'nun hidrojel matrisine eklenmesiyle hidrojin su molekülleri ile etkileşiminin artması ve suyun daha etkin bir şekilde hapsedilmesidir. rGO, hidrojel içerisinde nanokanalların oluşumuna katkı sağlayarak suyun difüzyonunu ve tutulmasını

iyileştirmektedir. Örneğin; literatürde yapılan bir çalışmada, rGO içeren membranların, saf GO membranlarına kıyasla suyun daha hızlı geçişine izin verdiği ancak çözünmüş maddelerin daha yüksek oranda tutulduğu gösterilmiştir. Bunun, rGO'nun fonksiyonel grupları ile iyonlar veya su molekülleri arasındaki etkileşimin artmasından kaynaklandığı belirtilmiştir [116]. Ayrıca, rGO'nun yüksek yüzey alanı ve porozitesi de yine hidrojelin su tutma kapasitesini artıran faktörler arasındadır [117].

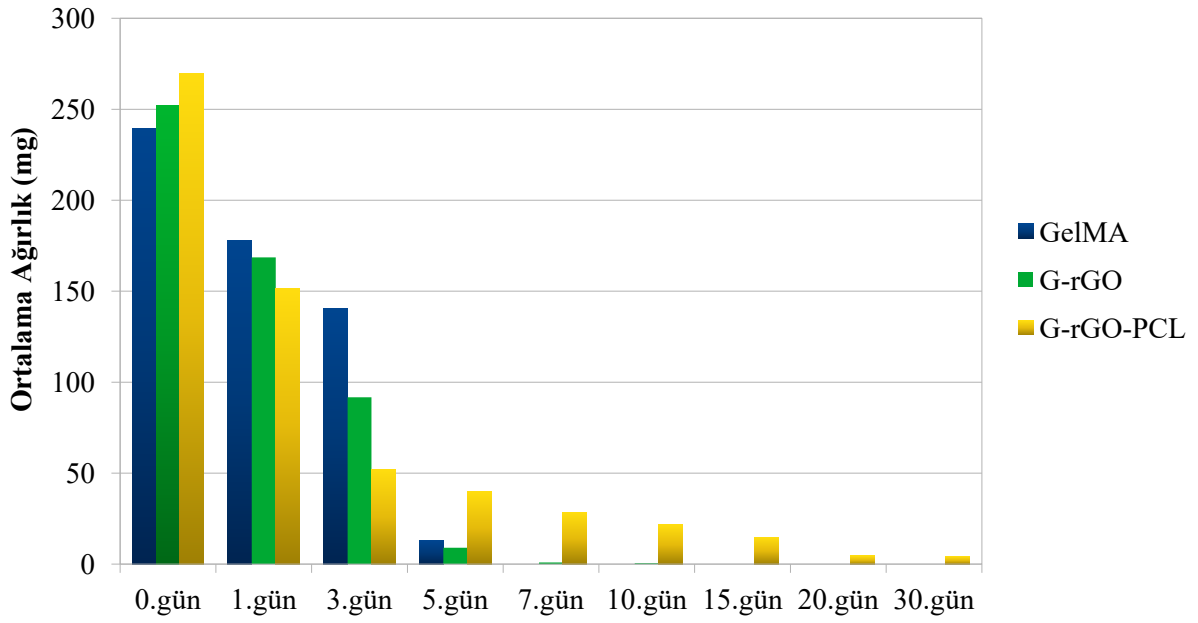
Verilerin incelenmesi sonucunda, 5. dakikada GelMA/rGO ve GelMA/rGO/PCL içeren grupların örneklerinin daha az oranda şiştiği gözlemlenmiştir. Bu durum, rGO içeren grupların daha hızlı şişerek doyum noktasına daha çabuk ulaştığı şeklinde yorumlanabilir. Deney sonuçları ve literatür bir arada değerlendirildiğinde, hidrojellerin şişme testlerinde başarılı bir performans sergilediği söylenebilir. Ayrıca, rGO'nun şişme performansına olumlu katkısı, literatürdeki bulgularla da uyumlu olarak tespit edilmiştir.

#### **4.1.2 Hidrojellerin Bozunma Süreçlerinin Değerlendirilmesi**

“Biyomateryallerin biyobozunurluk dereceleri ve hızları, doku mühendisliğinde hayati bir öneme sahiptir. Bu, ister tek başına isterse kompozit yapıda olsun, hidrojeller için de geçerlidir. Biyobozunur materyallerden oluşturulan doku iskeleleri, organizma tarafından emilebilir olduğundan, örneğin; ikinci bir cerrahi müdahaleye gerek kalmadan doku onarımı mümkün hale gelir [118]. Bir başka perspektife göre, biyobozunur hidrojeller, ilaçların kontrollü salınımını sağlayarak tedavi sürecinde etkin bir dozaj sunar [119]. Onarım sürecinde kullanılan biyobozunur materyallerin, işlevlerini tamamladıktan sonra bozunmaları tercih edilir; ancak bu bozunmanın erken gerçekleşmesi istenmez.

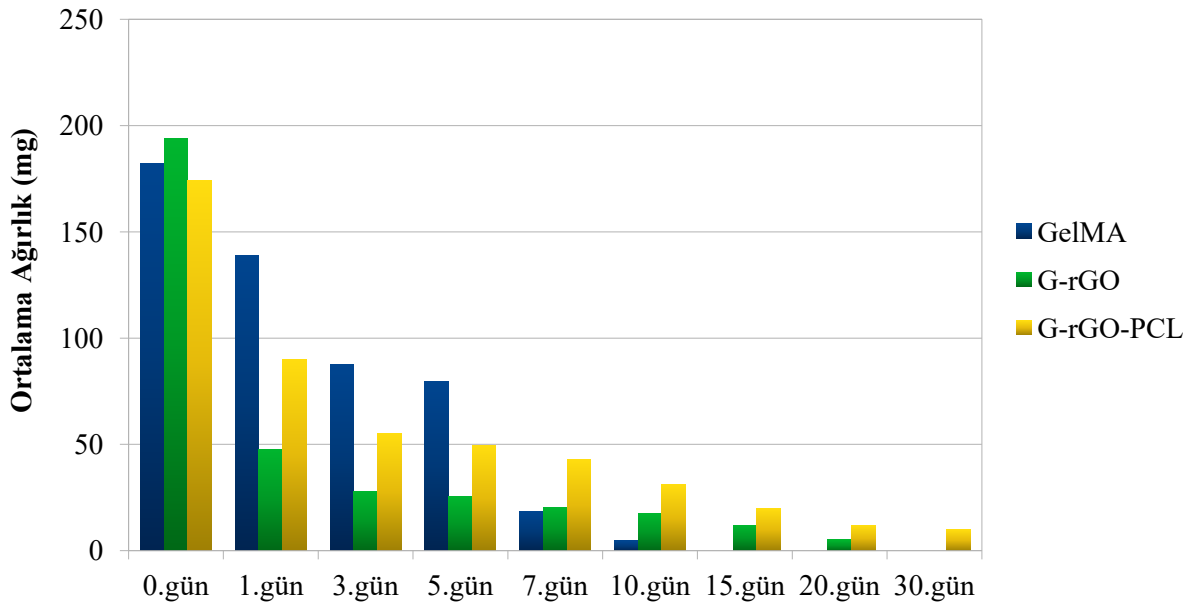
Bu tez çalışması kapsamında, üretilen hidrojellerin bozunma oranlarını belirlemek amacıyla, her üç deney grubu için de PBS ve lizozim kullanılarak biyobozunma deneyleri gerçekleştirilmiştir. Deney gruplarından 1., 3., 5., 7., 10., 15., 20. ve 30. günlerde alınan örnekler kurutulmuş ve kuru ağırlıkları ortalama değer olarak kaydedilmiştir (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2).

### PBS ile Biyobozunma Grafiği



Şekil 4.1. PBS ile biyobozunmada günlere göre ortalama ağırlık değişimi grafiği

### Lizozim ile Biyobozunma Grafiği



Şekil 4.2. Lizozim ile biyobozunmada günlere göre ortalama ağırlık değişimi grafiği



Ölçümlerden önce görsel olarak yapılan incelemelerde, PBS ile muamele edilen örneklerde 3. günden itibaren erken biyobozunma ve yapısal deformasyon belirtileri açıkça gözlenmiştir. Ağırlık ölçüm sonuçlarına bakıldığında, tüm örneklerin PBS ortamında daha hızlı bozunduğu, sayısal verilerle de desteklenmiştir. Bu gözlemler, lizozimin bir enzim olarak GelMA'nın polimer zincirlerini seçici bir şekilde parçaladığı gerçeğine dayandırılabilir. Lizozim, PBS'ye kıyasla, GelMA'nın amino asit bağlarını hedef alarak hidroliz yoluyla çözünmesini sağlar; bu süreç genellikle PBS'deki agresif iyonik çözünme sürecinden daha kontrollü ve yavaş ilerler [120].

Gruplar içinde yapılan değerlendirmelerde hem PBS hem de lizozim ortamlarında, GelMA/rGO grubunun özellikle 3. günden sonra daha hızlı bozulduğu gözlemlenmiştir. Ancak, 7. günden sonra GelMA/rGO gruplarının, GelMA'ya kıyasla daha yüksek biyobozunur dayanım gösterdiği belirlenmiştir. GelMA/rGO hidrojellerinin 3. günden itibaren hızlı bozunması ve 7. günden sonra GelMA'dan daha fazla dayanıklılık sergilemesi, GelMA/rGO kompozitlerinin yapısal ve fonksiyonel özelliklerine bağlı olabilir. Daha önce şişme testinde de belirtildiği gibi, rGO'nun yüksek yüzey alanı ve porozitesi, hidrojin su tutma kapasitesini artırarak bozunma hızını etkileyebilir [117].

Hidrojin suyu daha hızlı emmesi ve buna bağlı olarak daha çabuk şişmesi ve bozunması gözlemlenmiştir. 7. gün itibarıyla, GelMA/rGO'nun GelMA'ya kıyasla daha yüksek biyobozunur dayanıklılık göstermesi, rGO'nun hidrojel matrisine sağladığı ekstra yapısal bütünlüğe bağlanabilir. Bu ekstra yapısal bütünlük, rGO'nun hidrojel içinde çapraz bağlar oluşturarak matrisin mekanik dayanıklılığını artırması ve böylece hidrojin uzun vadede bozunmasını yavaşlatması şeklinde açıklanabilir. [111].

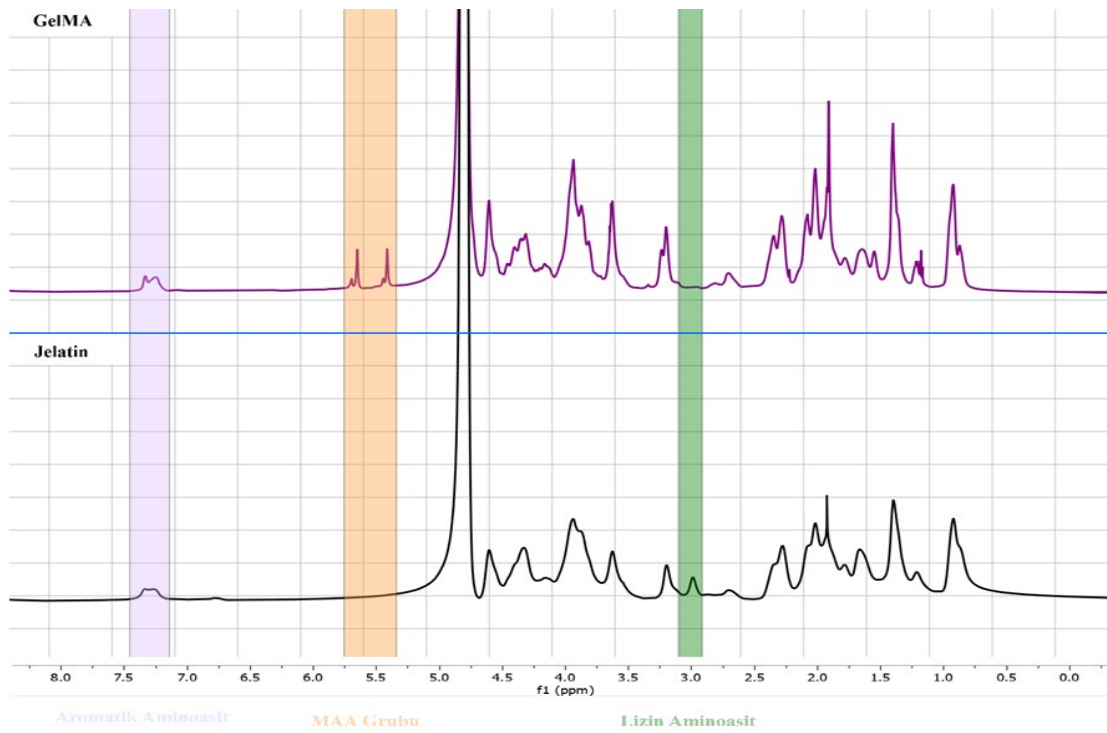
GelMA/rGO/PCL içeren gruptaki örnekler, biyobozunma testlerinde özellikle 7. ve 10. günlerde en yüksek dayanıklılığı sergilemiştir. Literatürdeki kapsamlı çalışmalar, PCL'nin hidrojel matrisinde suyun difüzyonunu yavaşlattığı ve yapısal bütünlüğü güçlendirdiği, böylece biyobozunma sürecini etkili bir şekilde modüle edebildiğini ortaya koymaktadır [121].

Bu sonuçlar, PCL'nin hidrojel biyobozunmaya karşı mekanik olarak desteklediği yönündeki hipotezi destekler niteliktedir.

#### 4.1.3 Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopilerinin Karşılaştırması

NMR spektroskopisi genellikle, malzemelerin kimyasal yapısını ve fonksiyonelleştirme düzeyini anlamak için kullanılır. Bu tez çalışmasında da, GelMA'nın jelatin üzerine bağlanan metakrilamid gruplarının oranını ve dağılımını belirlemek ve fonksiyonelliğini ölçmek amacıyla NMR spektroskopisi tercih edilmiştir. GelMA'nın kırılma derecesi ve fonksiyonelleştirme oranı, hidrojelin ışığa duyarlılık seviyesini ve dolayısıyla fotopolimerizasyon kapasitesini etkiler. Bu da, hidrojellerin mekanik özellikleri, biyouyumluluğu ve biyobozunurluğu gibi önemli parametreler üzerinde doğrudan bir etkiye sahiptir [122].

NMR spektroskopik analizi için eşit miktarda (10mg) jelatin ve GelMA, 1mL döteryum oksit içerisinde çözündürülmüş ve karşılaştırmalı spektrum elde edilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Jelatin ve GelMA'nın nükleer manyetik rezonans spektroskopilerinin karşılaştırması

Spektrum analizine göre, GelMA'daki metakrilamid gruplarının protonlarına ait pikler, 5–6 ppm aralığında belirgin olarak gözlemlenmektedir. Bu bulgular, metakrilat vinil gruplarının GelMA'ya başarılı bir şekilde eklendiğini göstermektedir [123]. Lizin aminoasit gruplarının yerine metakrilik anhidrit (MAA) bağlandığında, normalde lizin aminoasit gruplarının bulunduğu bölgelerde GelMA için sinyal azalması (düşük pik) gözlemlenir (2,75 – 3,25 ppm aralığında). Bu durum, MAA gruplarının jelatine bağlanmasını ve GelMA'nın fonksiyonelleştirilme derecesini gösterir. Aynı zamanda, aromatik amino asitlerin pikleri de yükselmiştir, bu da fonksiyonelleştirilmenin bir göstergesidir (7 – 7,5 ppm aralığında) [124].

Tüm bu bulgular göz önünde bulundurulduğunda ve literatür verileriyle kıyaslandığında, NMR analiz sonuçlarına dayanarak GelMA'nın başarılı bir şekilde sentezlendiği sonucuna varılabilir.

#### **4.1.4 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopilerinin Karşılaştırılması**

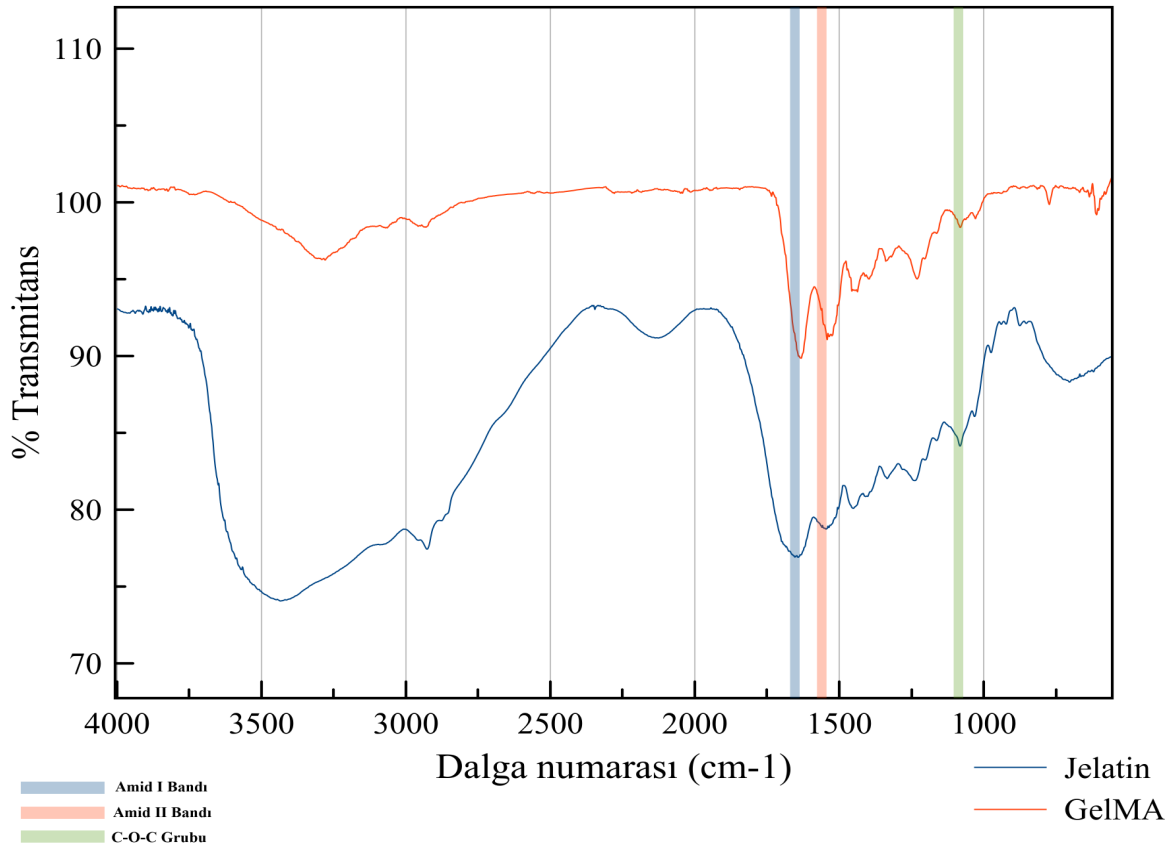
Fourier Dönüşüm Kızılötesi (FTIR) spektroskopisi, moleküler düzeyde malzeme karakterizasyonu ve kimyasal analiz için güçlü ve çok yönlü bir araçtır. Bu çalışmada, FTIR spektroskopisi kullanılarak tez kapsamında ele alınan jelatin, jelatin metakrilat (GelMA), polikaprolakton (PCL), indirgenmiş grafen oksit (rGO) ve grafen oksit (GO) numunelerinin yapısal ve kimyasal analizleri başarıyla gerçekleştirilmiştir.

Bu analizler kapsamında yapılan çalışmalar şunlardır:

- Jelatin ve GelMA spektrumları karşılaştırılarak GelMA'nın kimyasal modifikasyon başarısı değerlendirilmiştir.
- PCL spektrumu incelenerek, malzemenin doğruluğu ve kimyasal yapısı hakkında bilgi edinilmiştir.
- GO ve rGO spektrumları analiz edilmiş, indirgeme işlemi sonrasında ortaya çıkan yapısal farklar ve kimyasal gruplar karşılaştırılarak indirgeme işleminin başarısı değerlendirilmiştir.

Jelatin ve GelMA'nın FTIR spektrumları, amid I ve amid II bantları gibi karakteristik emilim piklerini tipik olarak içerir. Amid I bandı, jelatin ve GelMA'nın protein yapısından kaynaklanan C=O bağlarının emilim piklerini gösterir. Amid II bandı ise N-H bağlarının bükülme titreşimlerinden kaynaklanan emilim piklerini içerir [125]. Bu pikler, GelMA'nın sentezinin başarısını ve jelatinin yapısal bütünlüğünü doğrulamada kullanılır. Bu amaçla, FTIR ham verileri kullanılarak jelatin ve GelMA için spektrum grafiği oluşturulup analiz edilmiştir (Şekil 4.4).

Analiz sonuçlarına göre, amid I bandı kapsamında  $1650 \text{ cm}^{-1}$  dalga numarasında GelMA'nın protein yapısından kaynaklanan C=O bağlarının emilim piki tespit edilmiştir. Bu pik, proteinlerin karboksil gruplarının amid bağlarına dönüşümünü ve GelMA sentezinin başarısını gösterir. Ayrıca, amid II bandı kapsamında yaklaşık  $1550 \text{ cm}^{-1}$  dalga numarasında, N-H bağlarının bükülme titreşimlerinden kaynaklanan emilim piki gözlemlenmiştir, bu da GelMA'nın protein formasyonunun korunduğunu işaret eder. Son olarak, C-O-C grubuna denk gelen yaklaşık  $1090 \text{ cm}^{-1}$  dalga numarasında, metakrilat grubuna özgü ve epoksi halkalarından kaynaklanan emilim piki saptanmıştır [126]. FTIR analizleri yönünden jelatinin, metakrilat ile başarılı bir şekilde modifiye edildiği söylenebilir.



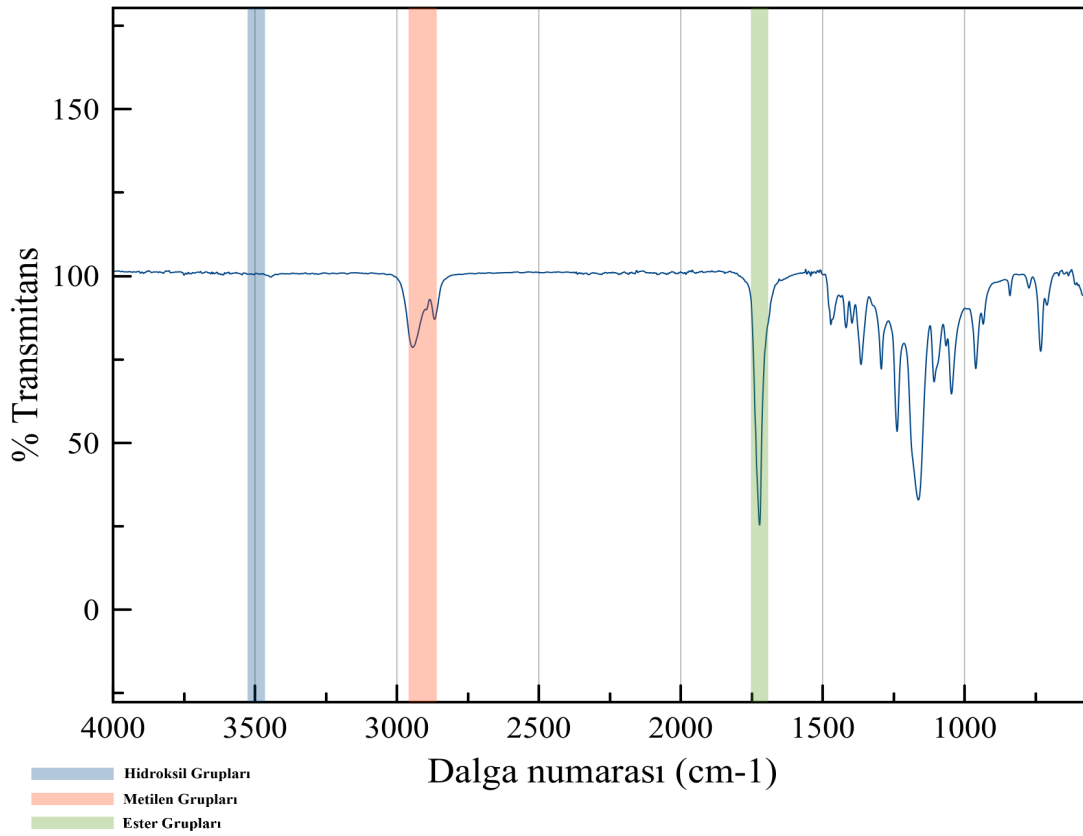
Şekil 4.4. Jelatin ve GelMA'nın fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopilerinin karşılaştırılması

PCL'nin FTIR spektrumları, ester gruplarının C=O bağlarının bükülme titreşimlerinden kaynaklanan oldukça keskin bir pik gösterir. Bu pik, PCL'nin FTIR spektrumunda en belirgin piklerden biri olarak dikkat çeker. Ayrıca, C-H bağlarının gerilme titreşimlerine karşılık gelen pikler de mevcuttur, bu pikler PCL'deki karakteristik metilen gruplarının varlığını işaret eder. O-H bağlarının gerilme titreşimlerine karşılık gelen geniş bir bant da gözlemlenir; bu bant PCL'deki hidroksil gruplarının varlığını gösterir. Bu veriler ışığında, PCL'nin yapısal bütünlüğü ve kimlik doğrulaması gerçekleştirilebilir [127]. Bu çalışmada, kullanılan PCL için FTIR ham verileri elde edilmiş ve bu verilerden spektrum grafiği oluşturularak detaylı bir analiz yapılmıştır (Şekil 4.5).

Analiz sonuçlarına göre, yaklaşık olarak  $1725\text{cm}^{-1}$  dalga numarası civarında, ester gruplarının C=O bağlarının gerilme titreşimlerine karşılık gelen oldukça keskin ve güçlü bir pik dikkat çekmektedir. Ayrıca, yaklaşık olarak  $2922\text{cm}^{-1}$  dalga numarası civarında

simetrik metilen gruplarının gerilme titreşimlerine karşılık gelen güçlü ve belirgin bir pik gözlemlenmiştir. Yanında, yaklaşık olarak  $2853\text{cm}^{-1}$  dalga numarası civarında asimetrik metilen gruplarının gerilme titreşimlerine karşılık gelen daha zayıf fakat PCL ile karakterize edilen bir pik bulunmaktadır.  $3500\text{--}3400\text{cm}^{-1}$  dalga numarası aralığında ise O-H bağlarının gerilme titreşimlerine karşılık gelen geniş bir bant gözlenmiştir. Bu bant, PCL'deki hidroksil gruplarının varlığını gösteren karakteristik bir özelliktir.

Tüm bu bulgular, tez çalışmasında kullanılan PCL'nin kimliğini ve işlevselliğini doğrulamaktadır.



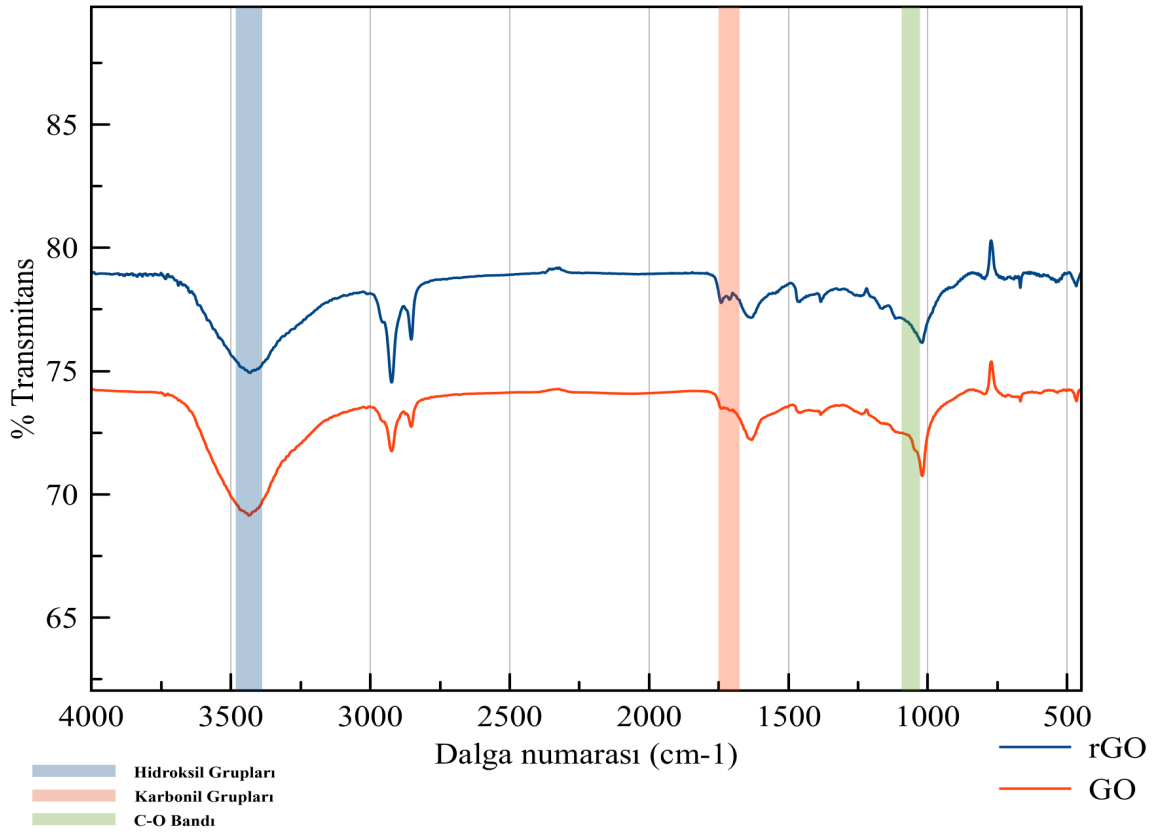
Şekil 4.5. PCL'nin fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi

Bu tez çalışmasında, daha önceki aşamalarda belirtildiği gibi, grafen oksitin biyoyumluluğunu ve elektriksel özelliklerini iyileştirmek amacıyla grafen oksit indirgeme işlemlerine tabi tutulmuştur.

İndirgenmiş grafen oksit'in başarılı bir şekilde sentezlenip sentezlenmediğini belirlemek için FTIR, etkili ve kolay yöntemlerden biridir. İndirgeme yöntemlerine (kimyasal, elektrokimyasal, termal, ışınlama) göre bazı farklar olmakla birlikte, tüm yöntemlerde grafen oksit (GO), indirgenmiş grafen oksite (rGO) dönüştürüldüğünde FTIR spektrumlarında bazı tipik değişiklikler gözlemlenir. Bu değişiklikler, indirgeme sonucu oksijen içeren grupların azalmasına bağlıdır. Dolayısıyla, grafen oksite özgü olan bazı kimyasal gruplarda, indirgeme işlemiyle birlikte piklerde azalma veya kaybolma gözlenmesi beklenir [128]. Piklerdeki azalma ve kaybolmalar; C-O gerilme kısımlarına uyan ve yaklaşık  $1060\text{ cm}^{-1}$  dalga numarasına denk gelen alanda, C-O-C bükülmeleri ile karakterize edilen ve yaklaşık  $1280\text{ cm}^{-1}$  dalga numarasına denk gelen alanda, karbonil grupları ile ilişkili olan C=O gerilmelerinde ve yaklaşık  $1720\text{ cm}^{-1}$  dalga numarasına denk gelen alanda, ve hidroksil grupları ile ilişkili olan ve yaklaşık  $3400\text{ cm}^{-1}$  dalga numarasına denk gelen alanda meydana gelmektedir [129].

Bu bağlamda, tez çalışması için üretilen GO ve rGO örneklerindeki, belirtilen indirgenmeye özgü farklılıkları belirlemek amacıyla ölçümler yapılmış ve elde edilen verilerle karşılaştırmalı spektrum grafiği oluşturularak analiz edilmiştir (Şekil 4.6).

Literatürdeki öngörülerin aksine, indirgenme sonucu azalması veya kaybolması beklenen bazı pikler ve titreşim değişiklikleri, bu çalışmada elde edilen rGO örneklerinde yeterli şeffaflık sağlanamadığı için belirgin olarak gözlemlenememiş ve bu durum teknik bir sınırlama olarak değerlendirilmiştir. Bununla birlikte, spektrumlar dikkatlice incelendiğinde,  $1040\text{--}1060\text{ cm}^{-1}$  dalga numarası aralığında C-O gerilmesine bağlı pikin indirgenmeyle birlikte azaldığı tespit edilmiştir. Yaklaşık  $1730\text{ cm}^{-1}$  dalga numarasında karbonil gruplarına ait bölgede, indirgenmeyle uyumlu bir şekilde pik azalması gözlenmiştir. Son olarak, yaklaşık  $3400\text{ cm}^{-1}$  dalga numarasında hidroksil gruplarına karşılık gelen bölgede, geniş pik aralığının daha da genişlediği ve pik yoğunluğunun azaldığı belirlenmiştir.



Şekil 4.6. Grafen oksit (GO) ve indirgenmiş grafen oksitin (rGO) fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopilerinin karşılaştırılması

İndirgenme işlemlerinde gözlenen ve indirgenmenin başarısını gösteren bulgular (Şekil 3.3, (C)) ve teknik limitasyon göz önüne alındığında, FTIR sonuçları GO'nun indirgenme başarısı aleyhine değerlendirilmemiştir.

#### 4.2. Malzeme ve Elektriksel Stimülasyonun Temel Hücre Etkileşimlerine Etkisinin İncelenmesi

Bu tez çalışmasında, karakterizasyon çalışmalarının ardından üretilen hidrojel doku iskelelerinin, bir konduit öncülü olarak kullanılabilirliği değerlendirilmiştir. GelMA/rGO/PCL kombinasyonunun yanı sıra, GelMA ve GelMA/rGO'nun tek başlarına canlılık ve proliferasyon üzerindeki temel hücre etkileşimleri incelenmiştir. Ayrıca, elektriksel stimülasyonun (ES) hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri, iletken ve iletken olmayan gruplar arasında karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır.



Hücre proliferasyon analizleri için kullanılan hidrojel doku iskeleleri, 6-kuyucuklu plakalarda kalıplanmış ve her bir kuyucuğun taban çapı 20mm olarak belirlenmiştir. ES uygulaması için kullanılan tekli petri kaplarının taban çapı ise 32mm'dir. Doku iskelelerinin petri kaplarına göre daha küçük olması, kap içinde aşırı mobilizasyona ve dolayısıyla hücrelerin malzemeye tutunma performansında olası kayıplara yol açabileceği düşünülerek, ES için kapasitif yöntem tercih edilmiştir. Kapasitif yöntemle, yükün her yere eşit olarak dağılması sağlanmıştır [104]. Bu yöntemle, petri kaplarında yer alan hidrojel ve hücrelerin konumundan bağımsız olarak, ES'nin uniform bir etki göstermesi amaçlanmıştır.

Doku mühendisliği alanında ES uygulamalarında akım parametreleri, hücre tipi, uygulanan teknik ve deney metodolojisinin farklılıklarına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Bu tezde ele alınan akım parametrelerini belirlerken, kullanılan teknikler ve literatür taraması sonucunda ulaşılan çalışmalar dikkate alınmıştır. Örneğin, 2013 yılında gerçekleştirilen bir hayvan çalışmasında, siyatik sinir kesimi sonrası sinirin proksimal uç bölgesine uygun bir elektrot yerleştirilmiş ve bu elektrot aracılığıyla 3V ve 20Hz frekansta, belirli aralıklarla toplam 20 dakika süresince akım uygulanmıştır. Çalışmanın sonucunda, ES uygulanan hayvan gruplarında yapılan histolojik ve moleküler analizler, akson rejenerasyonunun daha iyi olduğunu gösteren bulgular elde edilmiştir [130]. 2013 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada, PC12 hücreleri üzerine 100 mV/mm değerinde elektriksel stimülasyon (ES) uygulanmıştır. 24 ve 48 saat sonrasında yapılan değerlendirmelerde, ES uygulanan gruplarda nörit uzaması ile ilişkilendirilen hücre sayısında yüzdelik olarak anlamlı bir artış gözlemlenmiştir [131]. M. Ju ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, PC12 hücreleri üzerine kapasitif yöntemle 100 mV/mm değerinde ES uygulanmıştır [132]. ES uygulanan grupta, hücrelerin büyüme oranının 2,88 kat arttığı gözlemlenmiştir. Aynı çalışmada, 120 mV/mm'den daha yüksek akım uygulamasının hücrelere zarar verebileceği ifade edilmiştir.

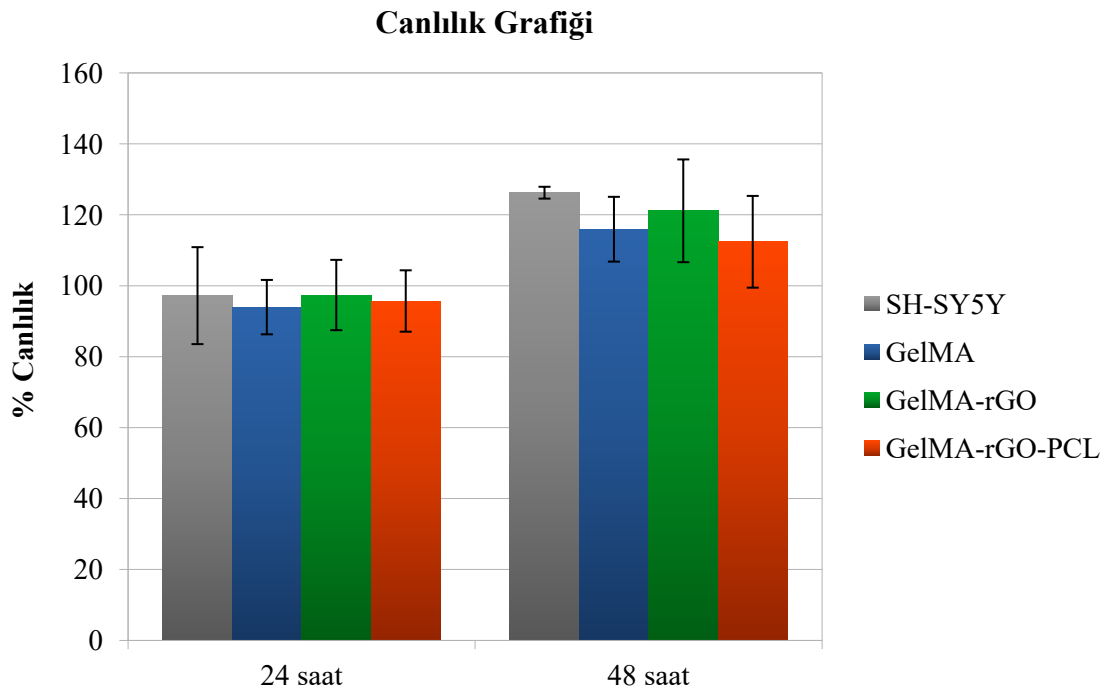
Literatür taraması sonuçlarına dayanarak, bu tez çalışmasında kapasitif yöntemle uygulanacak ES için 3V ve 20Hz frekansında akım kullanılmasının uygun olduğu öngörülmüştür. Ancak, inkübatör koşullarında planlanan 20 dakikalık ES uygulaması,

inkübatörün ES gereksinimlerini karşılayamamasından kaynaklanan teknik bir sınırlama nedeniyle, yalnızca 10 dakika süreyle laminar akış kabini içinde gerçekleştirilebilmiştir.

#### 4.2.1 Hücre Canlılıklarının Analizi

Bu tez çalışmasında, SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri kontrol grubu olarak kullanılmış ve bu hücreler, deney gruplarını oluşturan üç farklı malzemeye ekilerek analiz edilmiştir. Hücre canlılığı ve sitotoksitesi ölçümleri için MTT yöntemi tercih edilmiştir. Bu yöntem, hücre metabolik aktiviteyi kolorimetrik olarak değerlendirir ve hücre kültürü çalışmaları ile doku mühendisliği araştırmalarında yaygın olarak kullanılır.

MTT boyama tekniği ile deney gruplarını oluşturan hidrojel doku iskelelerinin biyouyumluluğu ve sitotoksitesi değerlendirilmiştir. Hücrelerin iskelelere adaptasyonu ve toksik etkiler, 24 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinin ardından, 570 nm dalga boyunda yapılan absorban ölçümleri ile incelenmiştir. Üç bağımsız ölçüm sonucunda elde edilen verilerin ortalaması alınmış, hücre canlılık yüzdeleri hesaplanmış ve sonuçlar grafiksel olarak sunulmuştur (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinin yüzde canlılık grafiği.

Grafiksel analiz sonuçlarına göre, 24 saatlik inkübasyon süresinde GelMA iskelesinin SH-SY5Y hücreleri üzerinde hafif sitotoksik bir etki gösterdiği anlaşılmaktadır; zira bu grup, kontrol grubuna kıyasla daha düşük canlılık yüzdesine sahiptir. Buna karşın, GelMA/rGO ve GelMA/rGO/PCL iskeleleri, kontrol grubuyla benzer veya daha yüksek canlılık yüzdeleri sergilemişlerdir ki bu durum, söz konusu iskelelerin SH-SY5Y hücreleri için sitotoksik olmadığına işaret etmektedir. 48 saatlik süreçte ise, tüm iskele gruplarının canlılık yüzdeleri kontrol grubunun altında kalmıştır; ancak bu oranlar 24 saatlik ölçümlere göre hala yüksektir.

İstatistiksel analizler tek faktörlü ANOVA ile yapılmıştır. 24 saat sonunda yapılan ölçümlerde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamışken (EK – 1.1), 48 saatlik ölçümlerde GelMA/rGO grubunda anlamlı bir yukarı sapma gözlemlenmiştir ( $p < 0,05$ ). F ve F crit değerleri, p değerine dayalı olarak belirlenen bu sapmayı desteklemektedir (EK – 1.2).

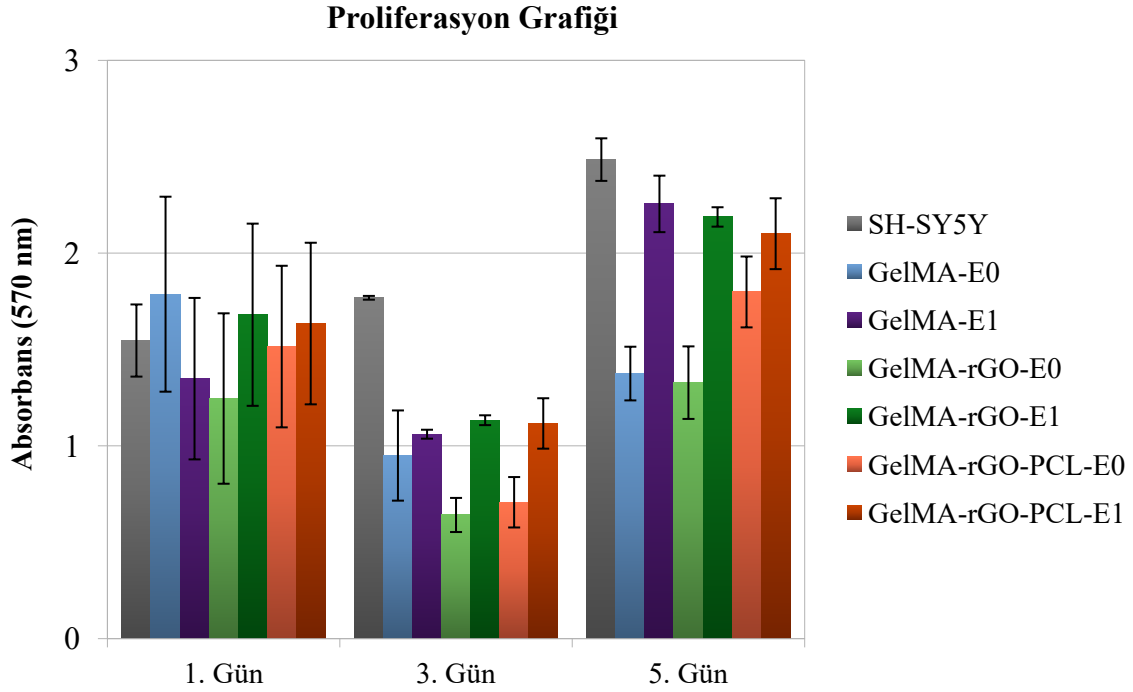
48 saatlik ölçümlerde bazı sapmalar gözlemlenmiş olmasına rağmen, 24 saatlik ölçümlere kıyasla her grupta canlılık oranlarının artmış olması, doku iskelelerinin genel olarak biyoyumlu olduğu yönünde bir değerlendirme yapılmasını desteklemektedir.

#### **4.2.2 Hücre Çoğalma Davranışının Analizi**

Bu tez çalışmasında, SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri kontrol grubu olarak kullanılmış ve bu hücreler, deney gruplarını oluşturan üç farklı malzemeye ekilmiştir. Hücre proliferasyonu ölçümleri için Alamar Mavi yöntemi tercih edilmiştir. Bu yöntem, MTT ile benzer şekilde, hücre metabolik aktiviteyi ölçerek hücre sağlığının bir göstergesi olarak kullanılır.

Deney kapsamında, üretilen hidrojel doku iskeleleri üzerindeki hücre çoğalma davranışı gözlemlenmiş ve elektriksel stimülasyon (ES) altında indirgenmiş grafen oksit içeren iletken hidrojel gruplarının çoğalma üzerindeki etkisi incelenmiştir. İnkübasyona bırakılan ve ES uygulanan/uygulanmayan tüm gruplar için 1., 3. ve 5. günlerde 570 nm dalga boyunda ölçümler yapılmıştır. Üç bağımsız deney sonucunda elde edilen verilerin

ortalaması alınarak proliferasyon değerleri hesaplanmış ve sonuçlar grafiksel olarak sunulmuştur (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinin proliferasyon grafiği \*

\* E0: elektrik stimülasyonu uygulanmayan, E1: elektrik stimülasyonu uygulanan

Sonuçlar incelendiğinde, 1. ve 3. günlerde, ES uygulanan ve indirgenmiş grafen oksit içeren gruplarda, çoğunlukla hücre proliferasyonunun arttığına dair absorbans ölçümleri elde edilmiştir. 5. gün ölçümlerinde ise, ES uygulanan grupların, ES uygulanmayan gruplara göre kontrol grubuna daha yakın oranlar sergilediği gözlemlenmiştir. Ancak, PCL'in olumlu bir etkisi tespit edilmemiştir. Ölçümler 5. günde sonlandırılmış olup, karakterizasyon aşamalarında PCL'in ilerleyen günlerdeki potansiyel katkısını göz önünde bulundurarak, erken dönemde PCL hakkında bir değerlendirme yapılmasının uygun olmadığı sonucuna varılmıştır.

Kesin sonuçlara ulaşabilmek adına, ES uygulanan (E1) ve uygulanmayan (E0) grupların değerlerinin ortalamaları karşılaştırılmış ve oranları hesaplanmıştır. Tek faktörlü ANOVA yapılarak, 5. gün sonunda, ES uygulanan tüm gruplarda, ES uygulanmayan

gruba kıyasla anlamlı bir artış olduğu gözlemlenmiştir ( $p < 0.05$ ) (EK – 1.5). 3. gün verilerinde, E1/E0 oranının tüm gruplarda yüksek olduğu belirlenmiştir. GelMA grubunda ise, p değeri anlamlılık sınırına yakın bir sapma göstermiştir ( $p = 0,053$ ) (EK – 1.4). Bu küçük sapma, GelMA-E1/E0 oranının diğer gruplarla tutarlı olduğunu ve proliferasyon açısından değerlendirilebileceğini göstermektedir. 1. gün verilerinde, GelMA/rGO/PCL grubunda bir fark saptanmış, ancak bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ( $p > 0.05$ ) (EK – 1.3).

Bu sonuçlar ve teknik limitasyonlar (10 dakikalık ES uygulaması ve inkübasyon koşullarının ES sırasında sağlanamaması) göz önünde bulundurulduğunda, genel olarak ES altında elde edilen sonuçların oldukça başarılı olduğu sonucuna varılabilir. Özellikle 5. gün itibarıyla, ES uygulanan ancak iletken olmayan GelMA grubunda da hücre proliferasyonunun arttığı gözlemlenmiş ve bu durum, kapasitif yöntemin etkin bir şekilde uygulandığını gösteren istatistiksel bulgularla desteklenmiştir. Aynı zamanda, 5. günde GelMA'nın rGO içeren gruplara kıyasla daha yüksek absorban değerleri sergilemesi, rGO'nun bu süreçteki etkinliğini sorgulamıştır. Bu durum, malzemenin 5. günden sonra çözünmeye başladığına ve rGO'nun hidrojellerden ayrılmaya başladığına işaret ediyor olabilir.

## 5. YORUM

Kayıplı periferik sinir yaralanmalarında, eğer kayıp segment belirli bir uzunluğun altındaysa, kesik sinir uçlarını birbirine bağlayarak tübülerizasyonu sağlayan ‘konduit’ adı verilen ürünler kullanılır. İdeal bir konduit, biyobozunur özellikte olmalı ve sinir rejenerasyonunu takiben dokudan tamamen yok olmalıdır. Yine ideal bir konduit, rejenera aksona klavuzluk yapmalı, akson filizlerinin 3 boyutlu düzlemde hedefe ulaşmasını sağlamalı, tercihen elektriksel iletkenlik özelliği olmalı, anjiyogenezis tamamlanıncaya kadar canlılığı sağlamak adına diffüzyon için poröz yapıda olmalı, şeklini koruyabilmeli, ihtiyaç duyulduğu kadar esnek olmalı, proksimal ve distal uçlardan suture edileceği için dikiş işlemlerine uygun olmalıdır. Günümüzde, teknolojik gelişmelere rağmen tanımlanmış ve oluşturulmuş, tüm bu özellikleri barındıran “ideal bir konduit” mevcut değildir. Dünyada, bu amaçla birçok merkez tarafından ideal sinir konduiti çalışmaları yapılmakta ve yeni bir ticari ürüne ulaşmak için çaba sarf edilmektedir. Bu tez çalışmasında kapsamında, literatürde daha önceden incelenmiş olan rGO, GelMA ve PCL malzemelerinin kombinasyonları kullanılarak, konduit benzeri iletken hidrojel doku iskeleleri, farklı bir metodoloji ile geliştirilmiştir.

- Doku iskelelerinin geliştirilmesi sırasında, GelMA’nın çapraz bağlanarak hidrojel formuna dönüştürülmesi için UV ışınlama yöntemi tercih edilmiştir. rGO yükleme miktarı, literatür ile paralel bir şekilde kütlece %0,25 olarak seçilmiştir.
- Genel uygulamalardan farklı olarak, PCL elektro eğirme yerine ıslak eğirme yöntemi ile sarmal bir yapıya dönüştürülmüş ve GelMA içerisine entegre edilmiştir. Ardından, bu bileşenlerin çapraz bağlanması işlemi gerçekleştirilmiştir.
- Şişme testi sonuçlarına göre, tüm grupların şişme oranları tatmin edici bulunmuştur. Özellikle rGO içeren gruplarda, ilk ve üçüncü dakikalar arasında şişme miktarının arttığı gözlemlenmiştir. Bu durum, rGO içeren grupların şişme hızının yüksek olduğunu göstermektedir ve rGO’nun şişme hızı ve miktarına olan olumlu etkisi literatürdeki bilgilerle desteklenmiştir.

- Bozunma testlerinde, iyonik özellikteki PBS ve enzimatik özellikteki lizozim olmak üzere iki farklı çözelti kullanılmıştır. İyonik çözücü olması nedeniyle PBS’de hidrojellerin daha hızlı bozulduğu gözlemlenmiştir.
- Hidrojeller için geliştirilen GelMA’nın başarılı sentezi, jelatin ile karşılaştırmalı olarak yapılan NMR ve FTIR spektroskopik analizleriyle doğrulanmıştır; her iki analizde de GelMA’ya özgü pik değerleri tespit edilmiştir. Ayrıca, hidrojellerde kullanılan PCL’nin FTIR spektroskopik analizi sonucunda, PCL’yi karakterize eden pikler belirlenerek malzemenin doğruluğu onaylanmıştır. rGO’nun indirgenmiş formunun doğrulanması için yapılan FTIR spektroskopik analizlerde, ışık geçirgenliği sorunu nedeniyle bulgular tam olarak seçilemese de, kısmen gösterilebilmiş ve literatürle karşılaştırılmıştır. Bu analizler, sentezlenen malzemelerin beklenen özelliklere sahip olduğunu göstermektedir.
- SH-SY5Y hücreleri ile yapılan MTT sonuçlarına göre 48 saat ölçümlerinde, 24 saate kıyasla tüm gruplarda canlılık seviyelerinde bir artış gözlemlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, tez kapsamında üretilen malzemelerin sitotoksik olmadığını göstermiştir.
- SH-SY5Y hücreleri ile yapılan Alamar mavisi testi sonuçlarına göre, 1. günden itibaren ES uygulanan ve rGO içeren gruplarda hücre proliferasyon seviyelerinde bir artış gözlemlenmiş, 5. gün itibarıyla ise ES uygulanan tüm gruplarda proliferasyon seviyeleri artmış ve kontrol grubuna yakın değerler sergilediği belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, özellikle rGO içeren gruplarda olmak üzere, ES’nin hücre proliferasyon seviyelerinde artışa yol açtığını göstermiştir.

Sonuç olarak bu tez çalışması, sinir doku mühendisliği kapsamında GelMA/rGO/PCL kombinasyonunun bir araya geldiği, SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinin kullanıldığı ve kapasitif yolla ES uygulanarak sonuçların değerlendirildiği özgün bir çalışmadır. Bu çalışma, gelecekte metodolojik olarak genişletilebilir. Örneğin; farklı ES yöntemleri, aynı malzemeler kullanılarak uygulanabilir, sonuçlar karşılaştırılabilir ve yöntemsel düzeyde daha kapsamlı bir analiz gerçekleştirilebilir. Hücre düzeyinde ise, hücre hizalanmasını gösteren detaylı mikroskobik analizler yapılarak, nörotrofik faktörler tayin edilerek ve

sito-iskeletsel proteinlerin analizi yapılarak ES'nin etkileri daha iyi ve kapsamlı bir şekilde gösterilebilir.

Son olarak, *in-vivo* basamağının eksikliği bu çalışmanın zayıf yönlerindedir. Önümüzdeki süreçte, GelMA/rGO/PCL kombinasyonu ile sinir konduiti oluşturulacak ve *in-vivo* çalışmada elektrofizyolojik parametreler de dahil edilerek test edilecektir. Yapılacak *in-vivo* çalışma sonuçları ile bu çalışmada elde edilen veriler karşılaştırılacaktır. Ayrıca, kullanılan ES uygulama teknikleri de *in-vivo* koşullar için optimize edilecektir. Böylelikle, ileride klinik uygulamalarda kullanılacak ve kayıplı periferik sinir tedavisinde yeni bir yöntem olarak değerlendirilebilecek bir tedavi stratejisi geliştirilebilir.



## 6. KAYNAKLAR

- [1] S. Yeoh, W.S. Warner, S.S. Merchant, E.W. Hsu, D. v. Agoston, M.A. Mahan, Incorporating Blood Flow in Nerve Injury and Regeneration Assessment, *Front. Surg.* 9 (2022) 1–10. <https://doi.org/10.3389/fsurg.2022.862478>.
- [2] C.J. Pateman, A.J. Harding, A. Glen, C.S. Taylor, C.R. Christmas, P.P. Robinson, S. Rimmer, F.M. Boissonade, F. Claeysens, J.W. Haycock, Nerve guides manufactured from photocurable polymers to aid peripheral nerve repair, *Biomaterials* 49 (2015) 77–89. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.01.055>.
- [3] P. Konofaos, J.P. Ver Halen, Nerve repair by means of tubulization: Past, present, future, *J. Reconstr. Microsurg.* 29 (2013) 149–163. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1333316>.
- [4] Z. Zhang, M. Ma, Strategies to enhance the ability of nerve guidance conduits to promote directional nerve growth, *Biomed. Eng. Online* (2024) 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12938-024-01233-z>.
- [5] H. Javidi, A. Ramazani Saadatabadi, S.K. Sadrnezhad, N. Najmoddin, Conductive nerve conduit with piezoelectric properties for enhanced PC12 differentiation, *Sci. Rep.* 13 (2023) 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-38456-4>.
- [6] J.S. Jara, S. Agger, E.R. Hollis, Functional Electrical Stimulation and the Modulation of the Axon Regeneration Program, *Front. Cell Dev. Biol.* 8 (2020) 1–12. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00736>.
- [7] Y. Qian, X. Wang, J. Song, W. Chen, S. Chen, Y. Jin, Y. Ouyang, W.E. Yuan, C. Fan, Preclinical assessment on neuronal regeneration in the injury-related microenvironment of graphene-based scaffolds, *Npj Regen. Med.* 6 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41536-021-00142-2>.
- [8] R.M. Enoka, I.G. Amiridis, J. Duchateau, Electrical stimulation of muscle: Electrophysiology and rehabilitation, *Physiology* 35 (2020) 40–56. <https://doi.org/10.1152/physiol.00015.2019>.
- [9] M.C. Costello, E.L. Errante, T. Smartz, W.Z. Ray, A.D. Levi, S.S. Burks, Clinical applications of electrical stimulation for peripheral nerve injury: a systematic review, *Front. Neurosci.* 17 (2023). <https://doi.org/10.3389/fnins.2023.1162851>.
- [10] J. Huang, Y. Zhang, L. Lu, X. Hu, Z. Luo, Electrical stimulation accelerates nerve regeneration and functional recovery in delayed peripheral nerve injury in rats, *Eur. J. Neurosci.* 38 (2013) 3691–3701. <https://doi.org/10.1111/ejn.12370>.
- [11] Q. Zhao, J. Wang, H. Cui, H. Chen, Y. Wang, X. Du, Programmed Shape-Morphing Scaffolds Enabling Facile 3D Endothelialization, *Adv. Funct. Mater.* 28 (2018) 1–11. <https://doi.org/10.1002/adfm.201801027>.
- [12] J.G. Merino, A. Martin, *Neuroanatomy Through Clinical Cases*, 2002. <https://doi.org/10.1176/jnp.14.3.351>.
- [13] N. Disorders, Y.S. Kim, J. Choi, B. Yoon, Neuron-Glia Interactions in, (2020).
- [14] L. Quan, A. Uyeda, R. Muramatsu, Central nervous system regeneration: the roles

- of glial cells in the potential molecular mechanism underlying remyelination, *Inflamm. Regen.* 42 (2022). <https://doi.org/10.1186/s41232-022-00193-y>.
- [15] G. Magni, B. Riboldi, S. Ceruti, Human Glial Cells as Innovative Targets for the Therapy of Central Nervous System Pathologies, (2024).
- [16] J. Chato-Astrain, Ó.D. García-García, F. Campos, D. Sánchez-Porras, V. Carriel, Basic Nerve Histology and Histological Analyses Following Peripheral Nerve Repair and Regeneration, in: J. Phillips, D. Hercher, T. Hausner (Eds.), *Peripher. Nerve Tissue Eng. Regen.*, Springer International Publishing, Cham, 2020: pp. 1–37. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-06217-0\\_14-1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-06217-0_14-1).
- [17] P. Ojha, An inspirational reflection on Nobel Prize-winning researches in nerve signaling from over a century: some lessons for inquisitive minds, *Brain Struct. Funct.* 226 (2021) 1641–1645. <https://doi.org/10.1007/s00429-021-02294-9>.
- [18] S. Standring, The History of Nerve Repair, in: J. Phillips, D. Hercher, T. Hausner (Eds.), *Peripher. Nerve Tissue Eng. Regen.*, Springer International Publishing, Cham, 2019: pp. 1–32. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-06217-0\\_1-2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-06217-0_1-2).
- [19] Y. Kaya, L. Sarikcioglu, Sir Herbert Seddon (1903–1977) and his classification scheme for peripheral nerve injury, *Child’s Nerv. Syst.* 31 (2015) 177–180. <https://doi.org/10.1007/s00381-014-2560-y>.
- [20] M.G. Siqueira, D.G. Kline, Sir Sydney Sunderland and the Sunderland Society, *J. Neurosurg.* JNS 129 (2018) 1325–1330. <https://doi.org/10.3171/2017.7.JNS171110>.
- [21] G.A. Davis, Reflections on the history of nerve repair - Sir sydney sunderland’s final presentation to the neurosurgical society of australasia, *Neurosurgery* 87 (2020) E373–E382. <https://doi.org/10.1093/neuros/nyaa059>.
- [22] W.K. Mydlarz, K.O. Boahene, Sunderland Classification of Nerve Injury, in: S.E. Kountakis (Ed.), *Encycl. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2013: pp. 2615–2616. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-23499-6\\_368](https://doi.org/10.1007/978-3-642-23499-6_368).
- [23] M.F. Meek, A.S.P. Varejão, S. Geuna, Use of skeletal muscle tissue in peripheral nerve repair: Review of the literature, *Tissue Eng.* 10 (2004) 1027–1036. <https://doi.org/10.1089/ten.2004.10.1027>.
- [24] P.A. Roberts, Cellular Composition of Nerve Tissue, in: *Neuroanatomy*, Springer US, New York, NY, 1987: pp. 1–4. [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-0286-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-0286-5_1).
- [25] A. Murtazina, I. Adameyko, The peripheral nervous system, *Dev.* 150 (2023) 1–9. <https://doi.org/10.1242/dev.201164>.
- [26] R. Birch, *Peripheral Nerve Injuries: A Clinical Guide*, 2013. <https://doi.org/10.1007/978-1-4471-4613-1>.
- [27] H. Ahn, Neuroscience and Psychiatry : Open Access Navigating the Complexity of the Peripheral Nervous System : Unravelling its Functions , Structure , and Disorders, 6 (2023) 139–140. [https://doi.org/10.47532/npoa.2023.6\(6\).139-140](https://doi.org/10.47532/npoa.2023.6(6).139-140).
- [28] B. Lavignolle, Spinal Nerves (Innervation of the Spine), in: J.M. Vital, D.T. Cawley (Eds.), *Spinal Anat. Mod. Concepts*, Springer International Publishing,

- Cham, 2020: pp. 391–401. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-20925-4\\_25](https://doi.org/10.1007/978-3-030-20925-4_25).
- [29] A. Draguhn, M. Both, Function follows form: how the structure of neurons determines cortical network activity: Comment on: Hodapp A, Kaiser ME, Thome C, Ding L, Rozov A, Klumpp M, Stevens N, Stingl M, Sackmann T, Lehmann N, Draguhn A, Burgalossi A, Engelhardt M, Both M (2022), *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 475 (2023) 285–287. <https://doi.org/10.1007/s00424-022-02776-7>.
- [30] A. Messé, D. Rudrauf, H. Benali, G. Marrelec, Relating Structure and Function in the Human Brain: Relative Contributions of Anatomy, Stationary Dynamics, and Non-stationarities, *PLoS Comput. Biol.* 10 (2014). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003530>.
- [31] M.E.I. SATAKE, S. ABE, Preparation and Characterization of Nerve Cell Perikaryon from Rat Cerebral Cortex, *J. Biochem.* 59 (1966) 72–75. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a128261>.
- [32] C. Deng, M. Moradi, S. Reinhard, C. Ji, S. Jablonka, L. Hennlein, P. Lüningschrör, S. Doose, M. Sauer, M. Sendtner, Dynamic remodeling of ribosomes and endoplasmic reticulum in axon terminals of motoneurons, *J. Cell Sci.* 134 (2021) jcs258785. <https://doi.org/10.1242/jcs.258785>.
- [33] G.H. DeVries, The Axonal Plasma Membrane, in: A. Lajtha (Ed.), *Struct. Elem. Nerv. Syst.*, Springer US, Boston, MA, 1984: pp. 341–360. [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-4586-2\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-4586-2_13).
- [34] S. Bodakuntla, H. Nedožralova, N. Basnet, N. Mizuno, Cytoskeleton and Membrane Organization at Axon Branches, *Front. Cell Dev. Biol.* 9 (2021). <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.707486>.
- [35] C. Prahm, J. Heinzl, J. Kolbenschlag, Blood Supply and Microcirculation of the Peripheral Nerve, in: J.B. Phillips, D. Hercher, T. Hausner (Eds.), *Peripher. Nerve Tissue Eng. Regen.*, Springer International Publishing, Cham, 2022: pp. 35–79. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-21052-6\\_21](https://doi.org/10.1007/978-3-030-21052-6_21).
- [36] E. Manole, A.E. Bastian, A.M. Oproiu, M.T. Neagu, C. Constantin, G. Isvoranu, Schwann Cell Plasticity in Peripheral Nerve Regeneration after Injury, in: S.J. Baloyannis, F.H. Rossi, W. Liu (Eds.), *Demyelination Disord.*, IntechOpen, Rijeka, 2020. <https://doi.org/10.5772/intechopen.91805>.
- [37] H. Aldskogius, Neuronal Changes in Axonal Degeneration and Regeneration, in: M.D. Binder, N. Hirokawa, U. Windhorst (Eds.), *Encycl. Neurosci.*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2009: pp. 2776–2779. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-29678-2\\_3911](https://doi.org/10.1007/978-3-540-29678-2_3911).
- [38] A.D. Gaudet, P.G. Popovich, M.S. Ramer, Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury, *J. Neuroinflammation* 8 (2011) 110. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-110>.
- [39] S.K. Lee, S.W. Wolfe, Peripheral nerve injury and repair., *J. Am. Acad. Orthop. Surg.* 8 (2000) 243–252. <https://doi.org/10.5435/00124635-200007000-00005>.
- [40] F. Bradke, J.W. Fawcett, M.E. Spira, Assembly of a new growth cone after axotomy: The precursor to axon regeneration, *Nat. Rev. Neurosci.* 13 (2012) 183–193. <https://doi.org/10.1038/nrn3176>.

- [41] C. Liu, J. Liu, C. Liu, Q. Zhou, Y. Zhou, B. Zhang, Saijilafu, The intrinsic axon regenerative properties of mature neurons after injury, *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. 53 (2020) 1–9. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmaa148>.
- [42] C.H.E. Ma, T. Omura, E.J. Cobos, A. Latrémolière, N. Ghasemlou, G.J. Brenner, E. Van Veen, L. Barrett, T. Sawada, F. Gao, G. Coppola, F. Gertler, M. Costigan, D. Geschwind, C.J. Woolf, Accelerating axonal growth promotes motor recovery after peripheral nerve injury in mice, *J. Clin. Invest.* 121 (2011) 4332–4347. <https://doi.org/10.1172/JCI58675>.
- [43] N. Sarvazyan, P. Exercises, *Tissue Engineering Principles, Protocols, and Practical Exercises*, 2020.
- [44] V. Matejčík, Peripheral nerve reconstruction by autograft, *Injury* 33 (2002) 627–631. [https://doi.org/10.1016/S0020-1383\(02\)00073-6](https://doi.org/10.1016/S0020-1383(02)00073-6).
- [45] T. Kornfeld, P.M. Vogt, C. Radtke, Nerve grafting for peripheral nerve injuries with extended defect sizes, *Wiener Medizinische Wochenschrift* (2018) 240–251. <https://doi.org/10.1007/s10354-018-0675-6>.
- [46] R. Gaudin, C. Knipfer, A. Henningsen, R. Smeets, M. Heiland, T. Hadlock, Approaches to peripheral nerve repair: Generations of biomaterial conduits yielding to replacing autologous nerve grafts in craniomaxillofacial surgery, *Biomed Res. Int.* 2016 (2016). <https://doi.org/10.1155/2016/3856262>.
- [47] T. Wan, Y.L. Wang, F.S. Zhang, X.M. Zhang, Y.C. Zhang, H.R. Jiang, M. Zhang, P.X. Zhang, The Porous Structure of Peripheral Nerve Guidance Conduits: Features, Fabrication, and Implications for Peripheral Nerve Regeneration, *Int. J. Mol. Sci.* 24 (2023). <https://doi.org/10.3390/ijms241814132>.
- [48] Y.T. Yang, Z.Q. Wang, Progress in the research and development of complement inhibitors, *Chinese J. New Drugs* 17 (2008) 2093–2097. <https://doi.org/10.18679/CN11-6030>.
- [49] E. Contreras, S. Bolívar, N. Nieto-Nicolau, O. Fariñas, P. López-Chicón, X. Navarro, E. Udina, A novel decellularized nerve graft for repairing peripheral nerve long gap injury in the rat, *Cell Tissue Res.* 390 (2022) 355–366. <https://doi.org/10.1007/s00441-022-03682-1>.
- [50] P.J. Evans, R. Midha, S.E. Mackinnon, The peripheral nerve allograft: a comprehensive review of regeneration and neuroimmunology., *Prog. Neurobiol.* 43 (1994) 187–233. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(94\)90001-9](https://doi.org/10.1016/0301-0082(94)90001-9).
- [51] S. Kehoe, X.F. Zhang, D. Boyd, FDA approved guidance conduits and wraps for peripheral nerve injury: a review of materials and efficacy., *Injury* 43 (2012) 553–572. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2010.12.030>.
- [52] M. Kasper, C. Deister, F. Beck, C.E. Schmidt, Bench-to-Bedside Lessons Learned: Commercialization of an Acellular Nerve Graft., *Adv. Healthc. Mater.* 9 (2020) e2000174. <https://doi.org/10.1002/adhm.202000174>.
- [53] J.I. Leckenby, C. Furrer, L. Haug, B. Juon Personeni, E. Vögelin, A Retrospective Case Series Reporting the Outcomes of Avance Nerve Allografts in the Treatment of Peripheral Nerve Injuries, *Plast. Reconstr. Surg.* 145 (2020). [https://journals.lww.com/plasreconsurg/fulltext/2020/02000/a\\_retrospective\\_case](https://journals.lww.com/plasreconsurg/fulltext/2020/02000/a_retrospective_case)

\_series\_reporting\_the\_outcomes.38.aspx.

- [54] B.J. Parker, D.I. Rhodes, C.M. O'Brien, A.E. Rodda, N.R. Cameron, Nerve guidance conduit development for primary treatment of peripheral nerve transection injuries: A commercial perspective., *Acta Biomater.* 135 (2021) 64–86. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.08.052>.
- [55] G. Buncke, Peripheral nerve allograft: how innovation has changed surgical practice, *Plast. Aesthetic Res.* 9 (2022). <https://doi.org/10.20517/2347-9264.2022.08>.
- [56] G.C.W. de Ruyter, M.J.A. Malessy, M.J. Yaszemski, A.J. Windebank, R.J. Spinner, Designing ideal conduits for peripheral nerve repair., *Neurosurg. Focus* 26 (2009) E5. <https://doi.org/10.3171/FOC.2009.26.2.E5>.
- [57] Y.-S. Chen, J.-Y. Chang, C.-Y. Cheng, F.-J. Tsai, C.-H. Yao, B.-S. Liu, An in vivo evaluation of a biodegradable genipin-cross-linked gelatin peripheral nerve guide conduit material, *Biomaterials* 26 (2005) 3911–3918. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.09.060>.
- [58] R.Y. Kannan, H.J. Salacinski, P.E.M. Butler, A.M. Seifalian, Artificial nerve conduits in peripheral-nerve repair., *Biotechnol. Appl. Biochem.* 41 (2005) 193–200. <https://doi.org/10.1042/BA20040137>.
- [59] Z.Z. Wang, S.E. Sakiyama-Elbert, Matrices, scaffolds & carriers for cell delivery in nerve regeneration., *Exp. Neurol.* 319 (2019) 112837. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2018.09.020>.
- [60] A.R. Nectow, K.G. Marra, D.L. Kaplan, Biomaterials for the development of peripheral nerve guidance conduits, *Tissue Eng. - Part B Rev.* 18 (2012) 40–50. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2011.0240>.
- [61] P. Meena, A. Kakkar, M. Kumar, N. Khatri, R.K. Nagar, A. Singh, P. Malhotra, M. Shukla, S.K. Saraswat, S. Srivastava, R. Datt, S. Pandey, Advances and clinical challenges for translating nerve conduit technology from bench to bed side for peripheral nerve repair, *Cell Tissue Res.* 383 (2021) 617–644. <https://doi.org/10.1007/s00441-020-03301-x>.
- [62] A. Mobasser, A. Faroni, B.M. Minogue, S. Downes, G. Terenghi, A.J. Reid, Polymer scaffolds with preferential parallel grooves enhance nerve regeneration., *Tissue Eng. Part A* 21 (2015) 1152–1162. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2014.0266>.
- [63] S. Vijayavenkataraman, Nerve guide conduits for peripheral nerve injury repair: A review on design, materials and fabrication methods, *Acta Biomater.* 106 (2020) 54–69. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.02.003>.
- [64] Y.C. Huang, Y.Y. Huang, Biomaterials and strategies for nerve regeneration, *Artif. Organs* 30 (2006) 514–522. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1594.2006.00253.x>.
- [65] M. Ezra, J. Bushman, D. Shreiber, M. Schachner, J. Kohn, Porous and Nonporous Nerve Conduits: The Effects of a Hydrogel Luminal Filler With and Without a Neurite-Promoting Moiety, *Tissue Eng. Part A* 22 (2016) 818–826. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2015.0354>.
- [66] X. Jiang, S.H. Lim, H.-Q. Mao, S.Y. Chew, Current applications and future

- perspectives of artificial nerve conduits, *Exp. Neurol.* 223 (2010) 86–101. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.09.009>.
- [67] M. Sun, M. McGowan, P.J. Kingham, G. Terenghi, S. Downes, Novel thin-walled nerve conduit with microgrooved surface patterns for enhanced peripheral nerve repair., *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 21 (2010) 2765–2774. <https://doi.org/10.1007/s10856-010-4120-7>.
- [68] Y. Ma, H. Gao, H. Wang, X. Cao, Engineering topography: effects on nerve cell behaviors and applications in peripheral nerve repair, *J. Mater. Chem. B* 9 (2021) 6310–6325. <https://doi.org/10.1039/D1TB00782C>.
- [69] L. Yao, G.C.W. de Ruitter, H. Wang, A.M. Knight, R.J. Spinner, M.J. Yaszemski, A.J. Windebank, A. Pandit, Controlling dispersion of axonal regeneration using a multichannel collagen nerve conduit., *Biomaterials* 31 (2010) 5789–5797. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.03.081>.
- [70] Z. Jiang, Y. Zhang, Y. Wang, S. Wang, J. Chang, W. Liu, B. Han, Multichannel nerve conduit based on chitosan derivates for peripheral nerve regeneration and Schwann cell survival, *Carbohydr. Polym.* 301 (2023) 120327. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.120327>.
- [71] V. Chiono, C. Tonda-Turo, Trends in the design of nerve guidance channels in peripheral nerve tissue engineering, *Prog. Neurobiol.* 131 (2015) 87–104. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.06.001>.
- [72] M. Sarker, S. Naghieh, A.D. McInnes, D.J. Schreyer, X. Chen, Strategic Design and Fabrication of Nerve Guidance Conduits for Peripheral Nerve Regeneration., *Biotechnol. J.* 13 (2018) e1700635. <https://doi.org/10.1002/biot.201700635>.
- [73] M.B. Chen, F. Zhang, W.C. Lineaweaver, Luminal Fillers in Nerve Conduits for Peripheral Nerve Repair, *Ann. Plast. Surg.* 57 (2006). [https://journals.lww.com/annalsplasticsurgery/fulltext/2006/10000/luminal\\_fillers\\_in\\_nerve\\_conduits\\_for\\_peripheral.21.aspx](https://journals.lww.com/annalsplasticsurgery/fulltext/2006/10000/luminal_fillers_in_nerve_conduits_for_peripheral.21.aspx).
- [74] S. Wang, L. Cai, Polymers for Fabricating Nerve Conduits, *Int. J. Polym. Sci.* 2010 (2010) 138686. <https://doi.org/10.1155/2010/138686>.
- [75] H. Jiang, Y. Qian, C. Fan, Y. Ouyang, Polymeric Guide Conduits for Peripheral Nerve Tissue Engineering, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8 (2020) 1–8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.582646>.
- [76] J. Park, J. Jeon, B. Kim, M.S. Lee, S. Park, J. Lim, J. Yi, H. Lee, H.S. Yang, J.Y. Lee, Electrically Conductive Hydrogel Nerve Guidance Conduits for Peripheral Nerve Regeneration, *Adv. Funct. Mater.* 30 (2020) 1–14. <https://doi.org/10.1002/adfm.202003759>.
- [77] L. Huang, X. Yang, L. Deng, D. Ying, A. Lu, L. Zhang, A. Yu, B. Duan, Biocompatible Chitin Hydrogel Incorporated with PEDOT Nanoparticles for Peripheral Nerve Repair, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 13 (2021) 16106–16117. <https://doi.org/10.1021/acsami.1c01904>.
- [78] S. Paramshetti, M. Angolkar, A. Al Fatease, S.M. Alshahrani, U. Hani, A. Garg, G. Ravi, R.A.M. Osmani, Revolutionizing Drug Delivery and Therapeutics: The Biomedical Applications of Conductive Polymers and Composites-Based

- [79] H. Xu, J.M. Holzwarth, Y. Yan, P. Xu, H. Zheng, Y. Yin, S. Li, P.X. Ma, Conductive PPY/PDLLA conduit for peripheral nerve regeneration., *Biomaterials* 35 (2014) 225–235. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.10.002>.
- [80] X. Zhang, W. Qu, D. Li, K. Shi, R. Li, Y. Han, E. Jin, J. Ding, X. Chen, Biomaterials: Functional Polymer-Based Nerve Guide Conduits to Promote Peripheral Nerve Regeneration (Adv. Mater. Interfaces 14/2020), *Adv. Mater. Interfaces* 7 (2020) 2020. <https://doi.org/10.1002/admi.202070081>.
- [81] D.C. Pina, E. Falletta, Advances in Polyaniline for Biomedical Applications, *Curr. Med. Chem.* 29 (2022) 329–357. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2174/0929867328666210419135519>.
- [82] H.P. Bei, Y. Yang, Q. Zhang, Y. Tian, X. Luo, M. Yang, X. Zhao, Graphene-Based Nanocomposites for Neural Tissue Engineering., *Molecules* 24 (2019). <https://doi.org/10.3390/molecules24040658>.
- [83] G. Kandhola, S. Park, J.-W. Lim, C. Chivers, Y.H. Song, J.H. Chung, J. Kim, J.-W. Kim, Nanomaterial-Based Scaffolds for Tissue Engineering Applications: A Review on Graphene, Carbon Nanotubes and Nanocellulose, *Tissue Eng. Regen. Med.* 20 (2023) 411–433. <https://doi.org/10.1007/s13770-023-00530-3>.
- [84] Z. Zhou, X. Liu, W. Wu, S. Park, A.L. Miller II, A. Terzic, L. Lu, Effective nerve cell modulation by electrical stimulation of carbon nanotube embedded conductive polymeric scaffolds, *Biomater. Sci.* 6 (2018) 2375–2385. <https://doi.org/10.1039/C8BM00553B>.
- [85] R. Balint, N.J. Cassidy, S.H. Cartmell, Electrical stimulation: a novel tool for tissue engineering., *Tissue Eng. Part B. Rev.* 19 (2013) 48–57. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2012.0183>.
- [86] L. Ghasemi-Mobarakeh, M.P. Prabhakaran, M. Morshed, M.H. Nasr-Esfahani, H. Baharvand, S. Kiani, S.S. Al-Deyab, S. Ramakrishna, Application of conductive polymers, scaffolds and electrical stimulation for nerve tissue engineering., *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 5 (2011) e17-35. <https://doi.org/10.1002/term.383>.
- [87] M.P. Willand, M.-A. Nguyen, G.H. Borschel, T. Gordon, Electrical Stimulation to Promote Peripheral Nerve Regeneration, *Neurorehabil. Neural Repair* 30 (2016) 490–496. <https://doi.org/10.1177/1545968315604399>.
- [88] K. Xu, X. Liu, X. Li, J. Yin, P. Wei, J. Qian, J. Sun, Effect of Electrical and Electromechanical Stimulation on PC12 Cell Proliferation and Axon Outgrowth., *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9 (2021) 757906. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.757906>.
- [89] F. Gisbert Roca, S. Serrano Requena, M. Monleón Pradas, C. Martínez-Ramos, Electrical Stimulation Increases Axonal Growth from Dorsal Root Ganglia Co-Cultured with Schwann Cells in Highly Aligned PLA-PPy-Au Microfiber Substrates, *Int. J. Mol. Sci.* 23 (2022). <https://doi.org/10.3390/ijms23126362>.
- [90] H. Xing, M. Zhou, P. Assinck, N. Liu, Electrical stimulation influences satellite cell differentiation after sciatic nerve crush injury in rats., *Muscle Nerve* 51 (2015)

400–411. <https://doi.org/10.1002/mus.24322>.

- [91] J. Segers, I. Vanhorebeek, D. Langer, N. Charusisin, W. Wei, B. Frickx, I. Demeyere, B. Clerckx, M. Casaer, I. Derese, S. Derde, L. Pauwels, G. Van den Berghe, G. Hermans, R. Gosselink, Early neuromuscular electrical stimulation reduces the loss of muscle mass in critically ill patients - A within subject randomized controlled trial., *J. Crit. Care* 62 (2021) 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2020.11.018>.
- [92] A.A. Al-Majed, T.M. Brushart, T. Gordon, Electrical stimulation accelerates and increases expression of BDNF and trkB mRNA in regenerating rat femoral motoneurons., *Eur. J. Neurosci.* 12 (2000) 4381–4390.
- [93] S. Cobianchi, L. Casals-Diaz, J. Jaramillo, X. Navarro, Differential effects of activity dependent treatments on axonal regeneration and neuropathic pain after peripheral nerve injury., *Exp. Neurol.* 240 (2013) 157–167. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.11.023>.
- [94] K.A. Eberhardt, A. Irintchev, A.A. Al-Majed, O. Simova, T.M. Brushart, T. Gordon, M. Schachner, BDNF/TrkB signaling regulates HNK-1 carbohydrate expression in regenerating motor nerves and promotes functional recovery after peripheral nerve repair., *Exp. Neurol.* 198 (2006) 500–510. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2005.12.018>.
- [95] N.J. Batty, A. Torres-Espín, R. Vavrek, P. Raposo, K. Fouad, Single-session cortical electrical stimulation enhances the efficacy of rehabilitative motor training after spinal cord injury in rats., *Exp. Neurol.* 324 (2020) 113136. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2019.113136>.
- [96] W. Wenjin, L. Wenchao, Z. Hao, L. Feng, W. Yan, S. Wodong, F. Xianqun, D. Wenlong, Electrical stimulation promotes BDNF expression in spinal cord neurons through Ca(2+)- and Erk-dependent signaling pathways., *Cell. Mol. Neurobiol.* 31 (2011) 459–467. <https://doi.org/10.1007/s10571-010-9639-0>.
- [97] E. Udina, M. Furey, S. Busch, J. Silver, T. Gordon, K. Fouad, Electrical stimulation of intact peripheral sensory axons in rats promotes outgrowth of their central projections, *Exp. Neurol.* 210 (2008) 238–247. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.11.007>.
- [98] N.M. Geremia, T. Gordon, T.M. Brushart, A.A. Al-Majed, V.M.K. Verge, Electrical stimulation promotes sensory neuron regeneration and growth-associated gene expression., *Exp. Neurol.* 205 (2007) 347–359. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.01.040>.
- [99] P.J. Han, S. Shukla, P.S. Subramanian, P.N. Hoffman, Cyclic AMP elevates tubulin expression without increasing intrinsic axon growth capacity, *Exp. Neurol.* 189 (2004) 293–302. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2004.03.010>.
- [100] S. Acaröz Candan, A.S. Akoğlu, S. Büyüşan, F. Yüksel, Effects of neuromuscular electrical stimulation of quadriceps on the quadriceps strength and functional performance in nursing home residents: A comparison of short and long stimulation periods., *Geriatr. Gerontol. Int.* 19 (2019) 409–413. <https://doi.org/10.1111/ggi.13633>.



- [101] C. Osorio-Fuentealba, A.E. Contreras-Ferrat, F. Altamirano, A. Espinosa, Q. Li, W. Niu, S. Lavandero, A. Klip, E. Jaimovich, Electrical stimuli release ATP to increase GLUT4 translocation and glucose uptake via PI3K $\gamma$ -Akt-AS160 in skeletal muscle cells., *Diabetes* 62 (2013) 1519–1526. <https://doi.org/10.2337/db12-1066>.
- [102] D.R. Merrill, M. Bikson, J.G.R. Jefferys, Electrical stimulation of excitable tissue: design of efficacious and safe protocols., *J. Neurosci. Methods* 141 (2005) 171–198. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2004.10.020>.
- [103] J.A. Spadaro, R.O. Becker, Function of implanted cathodes in electrode-induced bone growth., *Med. Biol. Eng. Comput.* 17 (1979) 769–775. <https://doi.org/10.1007/BF02441560>.
- [104] J.J. Vaca-González, J.M. Guevara, J.F. Vega, D.A. Garzón-Alvarado, An In Vitro Chondrocyte Electrical Stimulation Framework: A Methodology to Calculate Electric Fields and Modulate Proliferation, Cell Death and Glycosaminoglycan Synthesis, *Cell. Mol. Bioeng.* 9 (2016) 116–126. <https://doi.org/10.1007/s12195-015-0419-2>.
- [105] Y.-C. Fu, C.-C. Lin, J.-K. Chang, C.-H. Chen, I.-C. Tai, G.-J. Wang, M.-L. Ho, A novel single pulsed electromagnetic field stimulates osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells and bone repair., *PLoS One* 9 (2014) e91581. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091581>.
- [106] Y. Chen, B.J. Braun, M.M. Menger, M. Ronniger, K. Falldorf, T. Histing, A.K. Nussler, S. Ehnert, Intermittent Exposure to a 16 Hz Extremely Low Frequency Pulsed Electromagnetic Field Promotes Osteogenesis In Vitro through Activating Piezo 1-Induced Ca<sup>2+</sup> Influx in Osteoprogenitor Cells, *J. Funct. Biomater.* 14 (2023). <https://doi.org/10.3390/jfb14030165>.
- [107] T. Bodamyali, B. Bhatt, F.J. Hughes, V.R. Winrow, J.M. Kanczler, B. Simon, J. Abbott, D.R. Blake, C.R. Stevens, Pulsed electromagnetic fields simultaneously induce osteogenesis and upregulate transcription of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in rat osteoblasts in vitro., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 250 (1998) 458–461. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9243>.
- [108] C. Chen, X. Bai, Y. Ding, I.S. Lee, Electrical stimulation as a novel tool for regulating cell behavior in tissue engineering, *Biomater. Res.* 23 (2019) 1–12. <https://doi.org/10.1186/s40824-019-0176-8>.
- [109] Cellink, Casting Protocol, (2018) 5. [https://www.cellink.com/wp-content/uploads/2019/03/Casting-protocol-ColMA\\_30-Nov-2018.pdf](https://www.cellink.com/wp-content/uploads/2019/03/Casting-protocol-ColMA_30-Nov-2018.pdf).
- [110] X. Liu, D.P. Rodeheaver, J.C. White, A.M. Wright, L.M. Walker, F. Zhang, S. Shannon, A comparison of in vitro cytotoxicity assays in medical device regulatory studies, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 97 (2018) 24–32. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2018.06.003>.
- [111] S. Xiao, T. Zhao, J. Wang, C. Wang, J. Du, L. Ying, J. Lin, C. Zhang, W. Hu, L. Wang, K. Xu, Gelatin Methacrylate (GelMA)-Based Hydrogels for Cell Transplantation: an Effective Strategy for Tissue Engineering, *Stem Cell Rev. Reports* 15 (2019) 664–679. <https://doi.org/10.1007/s12015-019-09893-4>.
- [112] X. Zhao, Q. Lang, L. Yildirimer, Z.Y. Lin, W. Cui, N. Annabi, K.W. Ng, M.R.

- Dokmeci, A.M. Ghaemmaghami, A. Khademhosseini, Photocrosslinkable Gelatin Hydrogel for Epidermal Tissue Engineering., *Adv. Healthc. Mater.* 5 (2016) 108–118. <https://doi.org/10.1002/adhm.201500005>.
- [113] X. Fang, H. Guo, W. Zhang, H. Fang, Q. Li, S. Bai, P. Zhang, Reduced graphene oxide-GelMA-PCL hybrid nanofibers for peripheral nerve regeneration, *J. Mater. Chem. B* 8 (2020) 10593–10601. <https://doi.org/10.1039/d0tb00779j>.
- [114] B.S. MohanKumar, G. Priyanka, S. Rajalakshmi, R. Sankar, T. Sabreen, J. Ravindran, *Hydrogels: potential aid in tissue engineering—a review*, Springer Berlin Heidelberg, 2022. <https://doi.org/10.1007/s00289-021-03864-x>.
- [115] C. Chen, Y. Xi, Y. Weng, *Recent Advances in Cellulose-Based Hydrogels for Tissue Engineering Applications*, *Polymers (Basel)*. 14 (2022). <https://doi.org/10.3390/polym14163335>.
- [116] J. Pei, X. Zhang, L. Huang, H. Jiang, X. Hu, Fabrication of reduced graphene oxide membranes for highly efficient water desalination, *RSC Adv.* 6 (2016) 101948–101952. <https://doi.org/10.1039/C6RA22711B>.
- [117] E.T. Mombeshora, E. Muchuweni, Dynamics of reduced graphene oxide: synthesis and structural models, *RSC Adv.* 13 (2023) 17633–17655. <https://doi.org/10.1039/d3ra02098c>.
- [118] M. Gomez-Florit, A. Pardo, R.M.A. Domingues, A.L. Graça, P.S. Babo, R.L. Reis, M.E. Gomes, *Natural-Based Hydrogels for Tissue Engineering Applications*, *Molecules* 25 (2020). <https://doi.org/10.3390/molecules25245858>.
- [119] C. Su, D. Lin, X. Huang, J. Feng, A. Jin, F. Wang, Q. Lv, L. Lei, W. Pan, Developing hydrogels for gene therapy and tissue engineering, *J. Nanobiotechnology* 22 (2024) 182. <https://doi.org/10.1186/s12951-024-02462-z>.
- [120] X. Zhu, C. Wei, N. Li, Z. Wang, The Modification of Dissolution Kinetics and Solubility of Lysozyme Crystals by Ionic Liquids, *J. Solution Chem.* (2024). <https://doi.org/10.1007/s10953-023-01344-6>.
- [121] N. Das, *Biodegradable Hydrogels for Controlled Drug Delivery*, in: M.I.H. Mondal (Ed.), *Cellul. Superabsorbent Hydrogels*, Springer International Publishing, Cham, 2018: pp. 1–41. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-76573-0\\_47-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-76573-0_47-1).
- [122] J.M. Zatorski, A.N. Montalbino, J.E. Ortiz-Cárdenas, R.R. Pompano, Quantification of fractional and absolute functionalization of gelatin hydrogels by optimized ninhydrin assay and <sup>1</sup>H NMR, *Anal. Bioanal. Chem.* 412 (2020) 6211–6220. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02792-5>.
- [123] N. Vargas-Alfredo, M. Munar-Bestard, J.M. Ramis, M. Monjo, Synthesis and Modification of Gelatin Methacryloyl (GelMA) with Antibacterial Quaternary Groups and Its Potential for Periodontal Applications, *Gels* 8 (2022). <https://doi.org/10.3390/gels8100630>.
- [124] X. Li, S. Chen, J. Li, X. Wang, J. Zhang, N. Kawazoe, G. Chen, 3D culture of chondrocytes in gelatin hydrogels with different stiffness, *Polymers (Basel)*. 8 (2016). <https://doi.org/10.3390/polym8080269>.
- [125] S. Ramesh, M. Ramalingam, Aqueous-mediated synthesis and characterization of gelatin methacryloyl for biomedical applications, *Biointerface Res. Appl. Chem.*

- 12 (2022) 6269–6279. <https://doi.org/10.33263/BRIAC125.62696279>.
- [126] J. De Meutter, E. Goormaghtigh, Amino acid side chain contribution to protein FTIR spectra: impact on secondary structure evaluation, *Eur. Biophys. J.* 50 (2021) 641–651. <https://doi.org/10.1007/s00249-021-01507-7>.
- [127] A. Benkaddour, K. Jradi, S. Robert, C. Daneault, Grafting of polycaprolactone on oxidized nanocelluloses by click chemistry, *Nanomaterials* 3 (2013) 141–157. <https://doi.org/10.3390/nano3010141>.
- [128] A. Khan, S.N. Sapakal, A. Kadam, Comparative analysis of graphene oxide (GO) reduction methods: impact on crystallographic, morphological, and optical properties, *Graphene 2D Mater.* 9 (2024) 101–109. <https://doi.org/10.1007/s41127-024-00072-y>.
- [129] E. Andrijanto, S. Shoelarta, G. Subiyanto, S. Rifki, Facile synthesis of graphene from graphite using ascorbic acid as reducing agent, *AIP Conf. Proc.* 1725 (2016). <https://doi.org/10.1063/1.4945457>.
- [130] J. Huang, Y. Zhang, L. Lu, X. Hu, Z. Luo, Electrical stimulation accelerates nerve regeneration and functional recovery in delayed peripheral nerve injury in rats, *Eur. J. Neurosci.* 38 (2013) 3691–3701. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/ejn.12370>.
- [131] Y.J. Chang, C.M. Hsu, C.H. Lin, M.S.C. Lu, L. Chen, Electrical stimulation promotes nerve growth factor-induced neurite outgrowth and signaling, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1830 (2013) 4130–4136. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.04.007>.
- [132] M.S. Ju, H.M. Lan, C.C.K. Lin, Application of atomic force microscopy to investigate axonal growth of PC-12 Neuron-like cells, *IFMBE Proc.* 23 (2009) 1833–1837. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-92841-6\\_455](https://doi.org/10.1007/978-3-540-92841-6_455).

## EKLER

### EK 1 – Tek Faktörlü ANOVA Sonuçları

#### EK 1.1 – MTT 24 Saat Canlılık İçin Tek Faktörlü ANOVA Sonuçları

Deney Grupları (24 Saat)	F	P	F Crit
GelMA	0,538581088	0,470770881	4,300949502
GelMA/rGO	0,001120597	0,973597415	4,300949502
GelMA/rGO/PCL	0,102950944	0,751344769	4,300949502

#### EK 1.2 – MTT 48 Saat Canlılık İçin Tek Faktörlü ANOVA Sonuçları

Deney Grupları (48 Saat)	F	P	F Crit
GelMA	7,330203356	0,012862108	4,300949502
GelMA/rGO	0,720772247	0,405034455	4,300949502
GelMA/rGO/PCL	6,637654519	0,017222652	4,300949502

#### EK 1.3 – 1. Gün İçin ES Uygulanan ve Uygulanmayan Örneklerin Proliferasyon Değerlerinin Oranının (E1/E0) Tek Faktörlü ANOVA Sonuçları

Deney Grupları (1. gün)	F	P	F Crit
GelMA	8,01418472	0,007739336	4,130017746
GelMA/rGO	8,12176783	0,007378044	4,130017746
GelMA/rGO/PCL	1,254096346	0,270620294	4,130017746

**EK 1.4 – 3. Gün İçin ES Uygulanan ve Uygulanmayan Örneklerin Proliferasyon Değerlerinin Oranının (E1/E0) Tek Faktörlü ANOVA Sonuçları**

Deney Grupları (3. gün)	F	P	F Crit
GelMA	3,989984352	0,053823829	4,130017746
GelMA/rGO	512,8922862	4,33471E-22	4,130017746
GelMA/rGO/PCL	172,1770506	7,29196E-15	4,130017746

**EK 1.5 – 5. Gün İçin ES Uygulanan ve Uygulanmayan Örneklerin Proliferasyon Değerlerinin Oranının (E1/E0) Tek Faktörlü ANOVA Sonuçları**

Deney Grupları (5. gün)	F	P	F Crit
GelMA	341,2860738	2,65104E-19	4,130017746
GelMA/rGO	350,6386724	1,74254E-19	4,130017746
GelMA/rGO/PCL	34,3135428	1,31762E-06	4,130017746