KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

ÜÇ BOYUTLU BİYO YAZICI İLE KOMPLEKS GEOMETRİDE BÜYÜK ÖLÇEKLİ İNSAN DAMAR DOKU ELDESİ

LEVENT AYDIN

KOCAELİ 2020

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

ÜÇ BOYUTLU BİYO YAZICI İLE KOMPLEKS GEOMETRİDE BÜYÜK ÖLÇEKLİ İNSAN DAMAR DOKU ELDESİ

LEVENT AYDIN

Prof.Dr. Serdar KÜÇÜK		
Danışman,	**Kocaeli Üniv.**	**.....**
Prof.Dr. Nihat Zafer UTKAN		
Jüri Üyesi,	**Kocaeli Üniv.**	**.....**
Dr.Öğr.Üyesi İbrahim MUTLU		
Jüri Üyesi,	**Kocaeli Üniv.**	**.....**
Doç.Dr. Halime KENAR		
Jüri Üyesi,	**Acıbadem Üniv.**	**.....**
Doç.Dr. Erkan Türker BORAN		
Jüri Üyesi,	**Sağlık Bilimleri Üniv.**	**.....**

Tezin Savunulduğu Tarih: 07.07.2020

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Lisans eğitimimden bugüne daima yanımda olan, beni her çalışmada doğru hedefe yönlendiren, zor günlerimde destekleyen, akıl danışmanım, değerli Danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Serdar KÜÇÜK'e,

Tez çalışmamda bana yol gösteren, destekleyen, doku mühendisliğini öğreten ve laboratuvarını açan Doç. Dr. Halime KENAR'a, çalışmalarımda bana yürekten inanan, biyomalzemeler konusunda yardımcı olan ve daima destekleyen Prof. Dr. Özcan GÜNDOĞDU'ya, hücre izolasyonları ile birlikte deneylerimde ve doktora sürecinin her aşamasında bana yardımcı olan Dr. Candan Yılmaz ÖZDOĞAN'a, hücre kaynağı ile ilgili dokuların temininde yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Emek DOĞER'e, deneylerim esnasında her ihtiyacım olduğunda bana laboratuvarlarını açan ve beni gönülden destekleyen Prof. Dr. Murat KASAP ve Doç. Dr. Gürler AKPINAR'a, histolojik kesit alımı ve boyama konularında bana yardımcı olan Doç. Dr. Ayşe KARSON'a, polimer analizleri ve karakterizasyonları konusunda bana daima destek veren ve laboratuvarını açan Prof. Dr. Güralp ÖZKOÇ'a,

Bu uzun ve zorlu süreçte daima yanımda olan ve beni destekleyen en yakın arkadaşlarım Mehmet Onur ARICAN, Mehmet SARIHAN, Sertan ARKAN, Vildan KÜÇÜKOĞLU, Sabriye KARADENİZLİ, Gamze KARA MAĞDEN ve Tuğçe EROL'a,

Beni bugünlere getiren, her türlü maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen babam Bülent AYDIN'a, annem Fatma AYDIN'a ve her zaman yanımda olan kardeşim Aslı ÇOBANOĞLUNA'na, manevi ailem Ziya BADIN, Leman BADIN ve Eren BADIN'a,

Tezim süresince 2016/006 no'lu proje kapsamında sağladıkları destekten dolayı Kocaeli Üniversitesi BAP birimine,

Teşekkür ederim.

Temmuz – 2020 Levent AYDIN

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR....i
İÇİNDEKİLER....ii
ŞEKİLLER DİZİNİ....iv
TABLOLAR DİZİNİ....vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ....vii
ÖZET....viii
ABSTRACT....ix
GİRİŞ....1
1. GENEL BİLGİLER....3
1.1. Katmanlı İmalat Teknolojileri....3
1.2. Biyobasım....6
1.2.1. Biyobasım teknolojileri....8
1.2.2. Biyo yazıcılar....9
1.2.3. Biyo mürekkep....14
1.3. Damar Doku Anatomisi....22
1.4. Dünya'da ve Türkiye'de Biyobasım....24
1.4.1. Dünya'da biyobasım....25
1.4.2. Türkiye'de biyobasım....28
2. MALZEME VE YÖNTEM....30
2.1. Doku ve Organ Biyobasımı Amaçlı 3B Biyo Yazıcı ve Biyo Mürekkep Geliştirilmesi....30
2.1.1. Biyo yazıcı tasarımı kriterleri ve üretimi....30
2.1.2. Damar doku eldesi için biyo mürekkep geliştirilmesi....33
2.1.2.1. GelMA sentezi ve kollajen izolasyonu....34
2.1.2.2. Destek hidrojel optimizasyonu....36
2.1.2.3. Ana hidrojel optimizasyonu....38
2.1.2.4. Destek hidrojelinin hazırlanması....38
2.1.2.5. Ana hidrojelin hazırlanması....40
2.1.3. Biyobasılabilirlik optimizasyonları....44
2.1.4. Biyobozunurluk ve şekil korunumu....44
2.1.5. Viskozite....45
2.1.6. *In vitro* Biyouyumluluk....46
3. BULGULAR VE TARTIŞMA....47
3.1. Biyo Mürekkeplerin Değerlendirilmesi....47
3.1.1. BioLogic – multimikroekstrüzyon başlıklı biyobasım sistemi….....47
3.1.2. Hidrojel optimizasyonları ve biyobasılabilirlik skoru....48
3.1.3. Reolojik özellikler....52
3.1.4. Şekil korunumu....53
3.1.5. *In vitro* biyouyumluluk....55
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER....58
KAYNAKLAR....60
EKLER....70
KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER....82

ÖZGEÇMİŞ.....83

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. FDM metodu ile 3B baskı işlemi akış diyagramı..... 6
Şekil 1.2. 3B biyobasım işlem adımları ve akış diyagramı..... 7
Şekil 1.3. 3B biyo yazdırma teknolojileri çalışma prensipleri..... 9
Şekil 1.4. Doğal ve sentetik polimerlerin kullanım sıklığı..... 17
Şekil 1.5. Biyo mürekkep tasarım kriterleri..... 19
Şekil 1.6. Kan damarının genel olarak yapısı..... 24
Şekil 2.1. BiyoLojik: Çoklu mikroekstrüzyon başlığı bulunan H-bot biyo yazıcı..... 31
Şekil 2.2. BiyoLojik: yazdırma başlıkları..... 32
Şekil 2.3. GelMA deney düzeneği..... 34
Şekil 2.4. GelMA liyofilizasyonu..... 35
Şekil 2.5. İlk hidrojel optimizasyonundaki biyomürekkep konsantrasyonları..... 36
Şekil 2.6. Destek hidrojeli hazırlama aşamaları..... 39
Şekil 2.7. İdeal pH değerinin ayarlanması..... 40
Şekil 2.8. Toz polimerlerin laminar kabin içerisinde sterilize edilmesi..... 40
Şekil 2.9. Biyolojik güvenlik kabini içerisinde UV çapraz bağlama..... 43
Şekil 2.10. Hücresiz ana hidrojel örnekleri..... 44
Şekil 2.11. Şekil korunumu için belirlenen modeller..... 44
Şekil 3.1. BiyoLojik ve bileşenleri..... 47
Şekil 3.2. İlk hidrojel optimizasyonundaki biyomürekkep konsantrasyonları..... 48
Şekil 3.3. İkinci hidrojel optimizasyonu ve ilk deneme sonuçları..... 48
Şekil 3.4. Üçüncü hidrojel optimizasyonu ve ilk deneme sonuçları..... 49
Şekil 3.5. Biyo yazdırılan kalibrasyon modeli..... 50
Şekil 3.6. Hidrojel örnekleri..... 50
Şekil 3.7. Hidrojel kalınlıkları..... 51
Şekil 3.8. 25 °C de her bir konsantrasyonun frekansa bağlı depolama ve kayıp modülleri..... 52
Şekil 3.9. Destek hidrojelinin erozyonuna ait görünüm..... 53
Şekil 3.10. Biyobasılan yapılarda şekil korunumu..... 54
Şekil 3.11. Biyobasılan büyük ölçekli ve kompleks geometride insan damar doku özdeşi..... 55
Şekil 3.12. 24. ve 48. saatlerde destek hidrojelinin dağılması..... 55
Şekil 3.13. 24. ve 48. saatlerde biyobasılan yapıda (kalibrasyon modeli B) canlı/ölü boyama (4x)..... 55
Şekil 3.14. 24. ve 48. saatlerde biyobasılan yapıda (kalibrasyon modeli B) canlı/ölü boyama (4x)..... 56
Şekil 3.15. 3 günlük inkübasyon sonunda alınan kesite ait floresan mikroskop görüntüsü (kalibrasyon modeli B), canlı/ölü boyaması..... 56
Şekil 3.16. 24 saatlik inkübasyon sonrası biyobasılan filamentten ayrılan polisakkaritlerin filament etrafında oluşturduğu birikintinin ışık mikroskobu görüntüsü (4x)..... 57

Şekil 3.17. 24 saat sonra hücre yüklü hidrojelden ayrılan polisakkaritlerin
PAS boyama sonrası ışık mikroskobu görüntüleri
(Kalibrasyon Modeli B).....57

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1.1. Katmanlı imalat teknolojileri ve kullanılan malzemeler 3
Tablo 1.2. 3B biyo yazıcılar, üretim kabiliyetleri, fiyatları ve özellikleri.....10
Tablo 1.3. Dünyada biyobasım teknolojileri ve uygulama alanları.....25
Tablo 1.4. Türkiyede biyobasım teknolojileri ve uygulama alanları.....28

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

G' : Depolama modülü, (MPa)
G'' : Kayıp modülü, (MPa)
ω : Frekans, (rad/sn^{-1})

Kısaltmalar

2D : Two dimensional (İki Boyutlu)
3D : Three dimensional (Üç Boyutlu)
ABS : Acrylonitrile Butadiene Styrene (Akrilonitril Bütadien Stiren)
ASTM : American Society For Testing And Materials (Amerikan Test Ve Malzeme Kurumu)
AT MSCs : Adipose Tissue derived Mesecimal Stem Cell (Yağ Dokusu Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre)
$CaCl_2$: Calcium Chloride (Kalsiyum Klorür)
CLIP : Continuous Liquid Interface Production (Sürekli Sıvı Arayüz Üretimi)
DLMS : Direct Metal Laser Sintering (Doğrudan Lazer Metal Sinterleme)
ECM : Extra Cellular Matrix (Hücre Dışı Ortam)
FDM : Fused Deposition Modeling (Erimiş Birikimi Modelleme)
GelMA : Gelatin Methacryloyl (Jelatin Metakrilat)
HA : Hydroxyapatite (Hidroksiapatit)
ISO : International Organization for Standardization (Uluslararası Standardizasyon Örgütü)
LOM : Laminated Object Manufacturing (Laminalı Nesne İmalatı)
MIP-SLA : Mask Image Projection Based Stereolithography (Maske Görüntü Projeksiyon Tabanlı Stereolitografi)
PC : Polycarbonate (Polikarbonat)
PCL : Polycaprolactone (Polikaprolakton)
PEG : Polyethylene Glycol (Polietilen Glikol)
PETG : Polyethylene Terephthalate Glycol (Polietilen Terefitalat Glikol)
PGA : Polyglycolic Acid (Poliglikolik Asit)
PLA : Polylactic Acid (Polilaktik Asit)
PLGA : Poly Lactic-Co-Glycolic Acid (Polilaktik-Ko-Glikolik Asit)
RGD : Asparagine-Glycine-Aspartic Acid (Asparagin-Glisin-Aspartik Asit)
SLM : Selective Laser Melting (Seçici Lazer Ergitme)
SLS : Selective Laser Sintering (Seçici Lazer Sinterleme)
STL : Standard Tessellation Language (Standart Mozaik Dili)
UCV SMCs : Umbilical Cord Vein Smooth Muscle Cell (Göbek Kordon Veni Düz Kas Hücresi)

ÜÇ BOYUTLU BİYO YAZICI İLE KOMPLEKS GEOMETRİDE BÜYÜK ÖLÇEKLİ İNSAN DAMAR DOKU ELDESİ

ÖZET

4. Sanayi Devrimi ile birlikte geleneksel üretimin bilgisayarlaşma yönünde teşvik edilmesi ve yüksek teknolojiyle donatılması sonucu hemen hemen her alanda akıllı çözümler üretilmiştir. Bilim insanları da bu gelişmelerden etkilenerek, çalışmalarda önemli ivme kazanılmış ve yeni araştırma alanlarının kapıları aralanmıştır. 3B yazıcı ve tarayıcı teknolojilerinin hızlı prototiplemedeki yeteneği ile birlikte biyo yazıcılar ve tıbbi görüntüleme teknolojileri de özellikle sağlık alanında hastaya özel; ortez veya protez üretilmesi, hasta anatomisinin daha iyi anlaşılmasıyla doğru teşhis ve ameliyatların planlanması, plastik ve rekonstrüktif cerrahide implant üretilmesi, ilaç geliştirilmesi ve hatta insan dokularının ya da organların bir bölümünün laboratuvar ortamında veya doğrudan canlı üzerinde yeniden oluşturulmasını mümkün kılmıştır.

Bu çalışmada, 3B biyo yazıcıyla kompleks geometride büyük ölçekli bir insan damar dokusunun katmanlı imalat teknolojileri temelli üretilmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda öncelikle çok başlıklı, mikroekstrüzyon teknolojisi temelli, H-Bot kinematiği ile çalışan bir 3B biyo yazıcı tasarımı ve üretimi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra bu sistem bünyesinde hedef doku özdeşi eldesinde bir hücre yüklenebilen bir de destek amaçlı kullanılabilen doğal polimer temelli 2 farklı hidrojel biyomürekkep geliştirilmiştir. Çalışmadan elde edilen doku örnekleri üzerinde kullanılan hidrojel kaynaklı herhangi bir toksik yan etki gözlemlenmeyerek aksine besin ve oksijen taşınımı için uygun mikroçevre oluşturulmuştur. 14 güne varan inkübasyon sonucunda dâhi %89±1 lerin üzerinde hücre canlılıkları gözlemlenmiş ve işlevsel doku oluşumu sinyalleri alınmıştır. Sonuç olarak, doğal ve canlı damar doku eldesinin otolog hücre ve doğal polimer temelli, oldukça hızlı bir şekilde (2 cm. lik tübüler yapı için 1 dk. 52 sn.) laboratuvar koşullarında üretilmesi ile ilaç denemelerinde de kullanılabilecek 3B damar doku modeli elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: 3B Damar Doku Modeli, Biyobasım, Biyo Basılabilirlik, Biyo Mürekkep, Biyo Yazıcı.

3D BIOPRINTING OF COMPLEX AND LARGE-SCALE HUMAN VESSEL TISSUE SUBSTITUE

ABSTRACT

Smart solutions have been produced in almost every field as a result of encouraging the traditional production towards computerization and high technology with the 4th Industrial Revolution. Thus, important acceleration was achieved in studies and new research fields were discovered. Along with the ability of 3D printer and scanner technologies in rapid prototyping, bio printers and medical imaging technologies are also utilized in the fields of medicine and patient-specific medical equipment manufacturing, surgical planning to better understand patient's anatomy or to increase success rate of the operations, implant manufacturing in plastic and reconstructive surgery, medicine developments and even *in vitro*, *in vivo* or *in situ* reconstruction of a part of human tissues.

In this study, it is aimed to produce a 3D large-scale complex human blood vessel tissue model by means of a 3D bio printer. First of all, a 3D bio printer was designed and manufactured with a multi micro-extrusion print head. Subsequently, 2 different hydrogel bioinks were developed to be used in this system. No toxic side effects were observed and an ideal micro-environment, for the transport of food and oxygen, was created. After the incubation process, up to 14 days, cell viability was observed as 89±1% with the functional tissue formation. As a result of this study, a 3D vascular model, which can also be used in drug experiments, was obtained *in vitro* as fast as possible (1 min. 52 s. for 2 cm. tubular model) by using an autologous cell source and natural polymer based bioinks.

Keywords: 3D Blood Vessel Model, Bioprinting, Bioprintability, Bioink, Bioprinter.

GİRİŞ

Endüstri 4.0 ile katmanlı imalat (Additive Manufacturing) teknolojileri günümüzde oldukça yaygın kullanılmaya başlanılmış ve endüstriyel uygulamalardan sağlık sektörüne pek çok farklı alanda var olan problemlere çözüm üretilmiştir. 1980'lerde temeli atılan hızlı prototipleme sistemleri ve yöntemleri (3D Systems, SLA – Stereolitografi) ile geleneksel imalat yöntemlerinden farklı olarak üç boyutlu (3B) ve özellikle de kompleks geometrilerde nesnelerin kolaylıkla üretilebilmesi mümkün olmuştur. Katmanlı imalat yöntemleri bünyesinde bulunan 3B baskı, herhangi bir platformdan hazır olarak edinilebilen ya da kişisel olarak oluşturulabilen bir 3B modelin belirli baskı teknolojileri ve malzemeler vasıtasıyla madde olarak elde edilmesi işlemidir (Aydın ve Küçük, 2017). 3B baskı ile maddesel çıktı alınması işlemi, çoğunlukla bir 3B modelin, düzlemsel, belirli kalınlıklarda ve ardışık, iki boyutlu (2B) katmanlara ayrılması ve bahsedilen 2B katmanların üst üste konumlandırılmasıyla gerçekleştirilebildiği gibi (Aydın, 2014), yeni nesil düzlemsel olmayan dilimleme algoritmaları ile farklı şekillerde de meydana getirilebilmektedir (Shembekar ve diğ., 2018). 3B baskı işlemi, çalışma prensibi bakımından, imalat teknolojisinde geleneksel olarak kullanılmakta olan kesme ve delme yöntemleri gibi malzeme çıkarılmasına/eksiltilmesine dayalı işleme tekniklerinden farklı kabul edilmekte ve üretim süresince yalnızca hedef nesneyi oluşturacak kadar sarf malzemeyi gerektirmektedir. 3B yazıcılar, bilgisayarlı ya da bilgisayardan bağımsız çalışabilen, temel makine kodlarını yorumlayabilen, mikroişlemci kontrollü ve 3 eksende hareket kabiliyetine sahip bir robot olarak nitelendirilmektedir. 3B baskı teknolojisi günümüzde endüstriyel parça ya da bileşen üretiminde (araba parçaları), mühendislik uygulamalarında, mimarlık uygulamalarında (ev), askeri uygulamalarda, sağlık sektöründe (ortez, protez), biyoteknoloji sektöründe (insan dokusunun yenilenmesi), moda sektöründe (ayakkabı, elbise), gıda sektöründe (pasta, et) ve diğer birçok alanda kullanılmaktadır (Aydın, 2014). Katmanlı imalat teknolojileri, pahalı ve yavaş olan geleneksel üretim yöntemlerine göre özellikle yeni bir parça ya da prototip geliştirilmesinde zaman ve maliyet açısından önemli bir kazanç sağlamaktadır (Peker ve diğ., 2020).

Bu çalışmada, 3B biyo yazıcı ile kompleks geometride büyük ölçekli bir insan damar dokusunun *in-vitro* koşullarda katmanlı imalat teknolojileri temelli üretilmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda öncelikle çok başlıklı, mikroekstrüzyon teknolojisi temelli ve H-Bot kinematiği ile çalışan bir 3B biyo yazıcı tasarımı ve üretimi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra bu sistem bünyesinde hedef doku özdeşi eldesinde bir hücre yüklenebilen ve bir de destek amaçlı kullanılabilen doğal polimer temelli 2 farklı hidrojel biyomürekkep geliştirilmiştir. Optimize edilen biyo mürekkeplerin 3B biyo yazıcıya yüklenmesi ve belirlenen baskı protokolleri ile oda koşullarında biyobasım işlemi gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak, doğal ve canlı damar doku eldesinin otolog hücre ve doğal polimer temelli, hastaya özgü ve oldukça hızlı bir şekilde (2 cm. lik tübüler bir yapı için yalnızca 1 dk. 52 sn.) laboratuvar koşullarında üretilmesi ile ilaç denemelerinde de kullanılabilecek 3B damar doku modeli elde edilerek histolojik incelemeler ile biyolojik açıdan uygunluğu tespit edilmiştir.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Katmanlı İmalat Teknolojileri

Endüstri 4.0'ın bir sonucu olarak 3B nesnelerin oluşturulmasında katmanlı imalatın kullanımı giderek yaygınlaşmıştır (URL-1; URL-2; URL-3). Katmanlı imalat ile üretim, Erimiş Birikimi Modelleme (FDM – Fused Deposition Modeling), Inkjet Malzeme Biriktirme, Sinterleme (Seçici Lazer Sinterleme, SLS – Selective Laser Sintering, Doğrudan Lazer Metal Sinterleme, DLMS – Direct Laser Metal Sintering), Seçici Lazer Ergitme (SLM – Selective Laser Melting), Laminalı Nesne İmalatı (LOM – Laminated Object Manufacturing) gibi teknikler kullanılarak gerçekleştirilmektedir (Tablo 1.1). Bu üretim yöntemleri bünyesinde çoğunlukla termoplastik polimerler, metal/seramik tozlar ya da sıvı reçine kullanılarak 3B bir nesnenin oluşturulması sağlanmaktadır. Bir nesnenin imalatı temel olarak; i) 3B bir modelin elde edilmesi ya da oluşturulması, ii) 3B modelin geleneksel ya da yeni nesil bir dosya formatına dönüştürülmesi (Edgar ve Tint, 2015), iii) Dönüştürülen dosyanın bir katmanlı imalat sistemine yüklenmesi ve iv) Hedef nesnenin katman katman işlenerek üretilmesi (Huang ve diğ., 2013) aşamalarından oluşmaktadır.

Tablo 1.1. Katmanlı imalat teknolojileri ve kullanılan malzemeler

Tip	Teknoloji	Malzeme
Ekstrüzyon	Erimiş Birikimi Modelleme	Polilaktikasit, Akrilonitril bütadien stiren
Granüler	Doğrudan Metal Lazer Sinterleme	Neredeyse bütün metal alaşımlar
	Seçici Lazer Sinterleme	Termoplastik, metal tozları, seramik tozları
	Seçici Lazer Eritme	Titanyum alaşımları, paslanmaz çelik, alüminyum
Katmanlı	Laminali Nesne İmalatı	Tabaka, metal folyo, plastik folyo
Işık polimerize	Stereolitografi	Fotopolimer

SLA, sıvı malzeme temelli çalışan ve çoğunlukla reçine, seramik ya da ışığa duyarlı polimerleri belirli dalga boylarında ultraviyole (UV) lazer ile işleyen bir teknolojidir. 3B nesneler, bir sıvı reçine tankı üzerinde 3 eksende hareket kabiliyetine sahip, 2B eksende konumu kontrol edilen bir UV lazer yardımı ile oluşturulmaktadır. Bu süreçte ilk olarak UV lazer sıvı reçine tankı yüzeyinde önceden belirli katman kalınlığında ilk

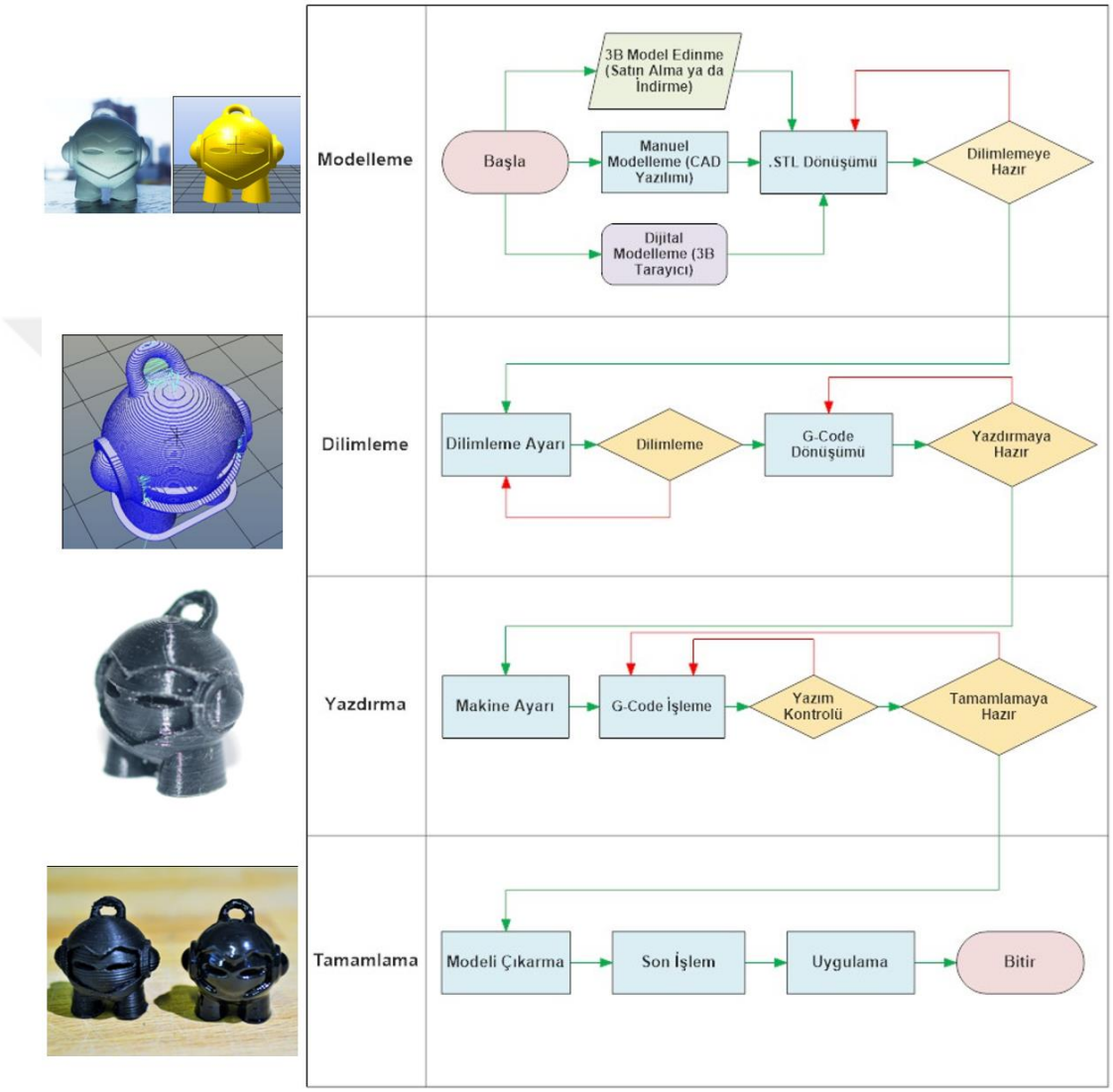
tabakayı oluşturmaktadır (Bártolo, 2011). Daha sonra yazdırma tablası sıvı reçine tankı içerisine doğru ilerleyerek, kürlenmemiş reçinenin tabla yüzeyini kaplaması ve 2. katmanın basımı için gerekli hazırlıkların tamamlanması sağlanmaktadır (Hull, 1994). 2. katman kürlendikten sonra her bir katman için aynı durum geçerli olacak şekilde 3B nesnenin üretimi tamamlanmaktadır (Xie ve diğ., 2011). Oldukça küçük lazer çaplarının var olması nedeniyle nano düzeyde baskı imkânı sağlayan bu metot ayrıca kompleks geometriye sahip yapılar için harici desteklere ya da bileşenlere gerek duymamaktadır (Park ve diğ., 2009; Lu ve Chen, 2004). SLA metodu ve Standard Tessellation Language (STL) dosya uzantısı 3D Systems firması tarafından oluşturulmuş olup günümüzde de yaygın olarak kullanılmaktadır (Iancu ve diğ., 2010). Pek çok SLA metodunda polimerizasyon işlemi 3B uzayda hareket kabiliyetine sahip noktasal bir lazer ışınıyla sağlanırken, 2B her bir dilimlenen katmanın bir ışık olarak sıvı reçine tankı yüzeyine yansıtılması ve anlık katılaştırılması da mümkündür. Maske Görüntü Projeksiyon Tabanlı Stereolitografi (MIP SLA – Mask-Image-Projection-based Stereolithography), çoğunlukla bir projeksiyon vasıtasıyla gerek her bir 2B katmanı hızlı bir şekilde katılaştırarak baskı süresini önemli bir ölçüde azaltmakta gerekse oldukça yüksek çözünürlüklerde baskı imkânı sağlamaktadır (Zhou ve diğ., 2011). Bunun yanı sıra, araştırmacılar son yıllarda yalnızca dakikalar içerisinde büyük hacimlerde çıktı alınması imkânını sunan Sürekli Sıvı Arayüz Üretim (CLIP – Continuous Liquid Interface Production) teknolojisine odaklanmıştır (Tumbleston ve diğ., 2015).

Günümüzde popüler olarak kullanılan FDM metodu, Akrilonitril Bütadien Stiren (ABS), Polilaktik Asit (PLA), Polikarbonat (PC), Polifenil Sülfon (PPSF veya PPSU), Polietilen Terefitalat Glikol (PETG), Ultem 9085 (ateşe dayanıklı), karbon karışımları ve seramik kompozitleri gibi termoplastik polimerlerin belirli sıcaklıklarda eritilmesi temeline dayalı çalışmaktadır (Ilardo ve Williams, 2010; Shofner ve diğ., 2003; Kalita ve diğ., 2003). Bu metotla basım işleminde ilk olarak yazdırma tablası ve yazdırma başlığı kullanılacak termoplastik polimere özgü belirli sıcaklıklarda ısıtılmaktadır. Daha sonra yazdırma başlığı 3B çalışma uzayı içerisinde hedef nesneyi oluşturmak adına ilgili her bir 2B konuma gereken miktarlarda erimiş polimer biriktirmektedir (Şekil 1.1). Erimiş polimerin katılaşması bir fan yardımıyla oluşan hava akımı ile sağlanırken, bu metot kompleks geometrilerdeki yapılar için destek yapıları

gerektirmektedir (Kochesfahani, 2016). FDM metodu, diğer katmanlı imalat metotlarıyla karşılaştırıldığında daha uygun maliyetlidir ve kolay uygulanabilirliğe sahiptir (Rengier, 2010). Bu avantaja rağmen, yazdırma başlığında termoplastik polimerin çıkış birimi olarak bilinen nozul bileşeninde yanmış ya da kurumuş polimerlerden dolayı tıkanma meydana gelebilmekte ve nesnenin yüzeyinde meydana gelen baskı izlerini yok etmeye yönelik aseton banyosu gibi son işlemleri gerektirebilmektedir (Heller ve diğ., 2015). Bunun yanı sıra, sızıntı olarak nitelendirilen istenmeyen erimiş polimer birikintilerinin de baskı alınmayan ve yalnızca konum değişikliği amaçlı gerçekleştirilen hareket durumlarında iyi optimize edilmeyen geri çekim parametresinden kaynaklı oluşabilmesi muhtemeldir. Bu nedenle, belirli kalibrasyon modelleri kullanılarak baskı parametrelerinin mevcut mekanik ve elektriksel bileşenlere göre iyi optimize edilmesi ve ideal değerlere sahip olması metrik çıktı alınabilmesi açısından büyük önem arz etmektedir.

Toz malzeme temelli çalışan SLS metodunda bir bağlayıcı ajan ya da mekanizma kullanılmakta ve toz granülleri odaklı bir lazer ışını yardımıyla birleştirilerek katı nesneler oluşturumaktadır. Bu metotta genellikle metal ya da alaşım, alüminyum, seramik kompozit ve polimer kompozit tozları kullanılmaktadır (Chunze, 2009). Üretim esnasında ilk olarak, mevcut yazdırma tablası yüzeyine bir toz tankı bünyesinden yine bir merdane sistemi vasıtasıyla belirli kalınlıkta toz katman biriktirilmektedir (Subramanian vd., 1995). Belirli bir dalga boyunda, 3B çalışma uzayında bulunan 2B eksende hareketlendirilen bir lazer ışını kullanılarak bahsedilen toz tabaka yüzeyinde bulunan granüller belirlenen desenlerde bağlanarak birleştirilir ve böylece ilk katmanın üretimi tamamlanır (Deckard ve diğ., 1992). Yazdırma tablası belirlenen katman kalınlığında aşağı doğru hareket ederken, boş kalan yüzeyi yine merdane sistemi vasıtasıyla toz tankı bünyesinden taşınan toz granülleri ile kaplanır ve aynı şekilde 2. katmanın üretimi gerçekleşir. Bu süreç hedef nesnenin üretimi tamamlanıncaya kadar devam etmektedir. SLA metodunda olduğu gibi SLS metodu da destek yapıları gerektirmemektedir. Bu metotta lazer olarak çoğunlukla karbondioksit (CO_2) ya da neodymium-doped yttrium aluminium garnet (Nd:YAG) kullanılmaktadır ve bir üretimde kullanılmayan toz granüller geri dönüşümlü olarak yeniden üretimde kullanılabilmektedir (Kruth ve diğ., 2003). Bir diğer toz malzeme temelli çalışan metot olan SLM metodunda toz granüller eritilerek birleştirilmektedir

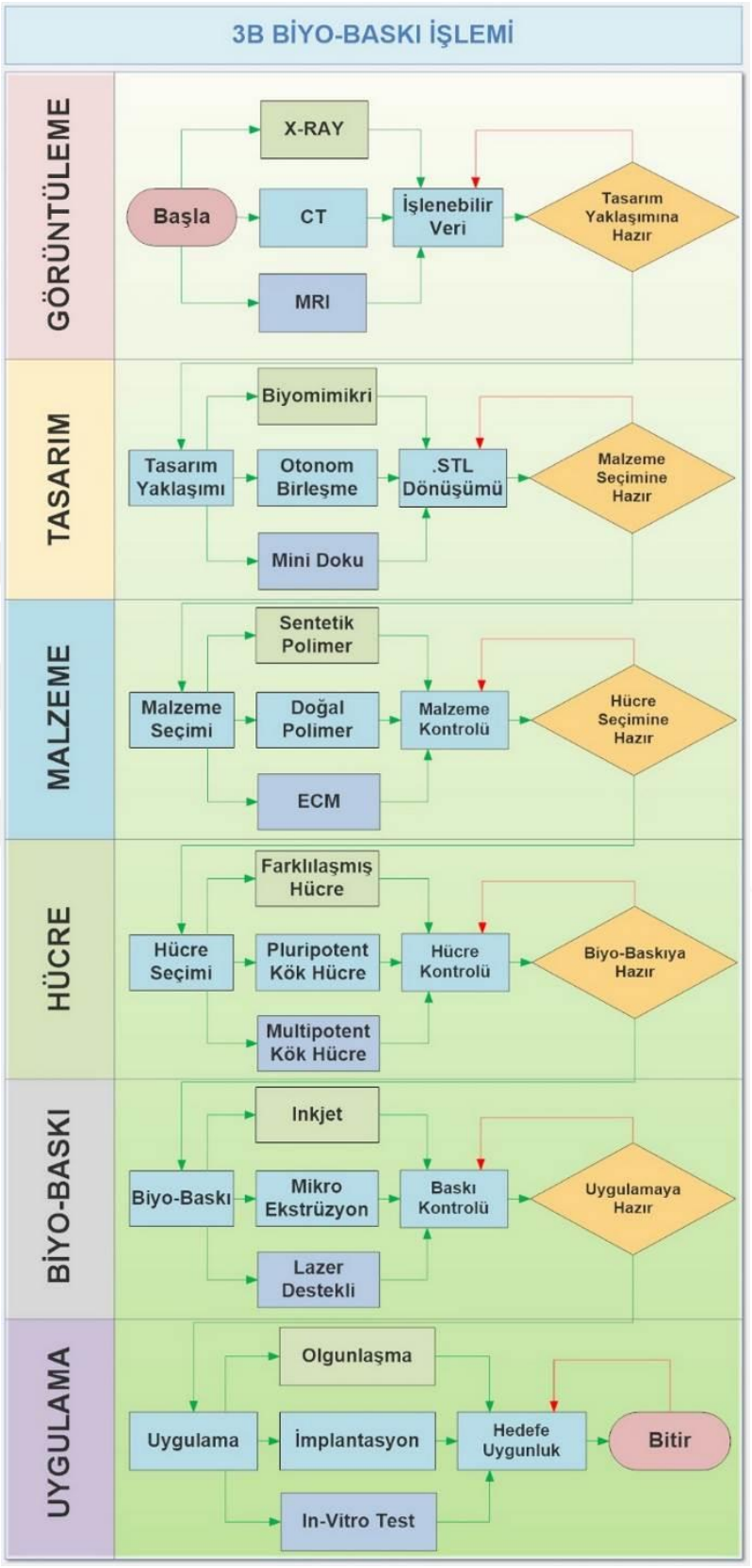
(Chantarapanich vd., 2014). Toz malzemeler çoğunlukla metal ya da alaşım, alüminyum ve seramik kompozitlerden oluşmaktadır (Wilkes ve diğ., 2013). Üretim işlemi SLS metodu ile aynı olmakla birlikte SLS metoduna göre üretilen nesnelerin dayanımı daha yüksektir (Khan ve Dickens, 2014).



Şekil 1.1. FDM metodu ile 3B baskı işlemi akış diyagramı (Aydın ve Kucuk, 2018)

1.2. Biyobasım

Biyobasım, 3B baskı işlemine, basım esnasında ya da sonrasında, hücrelerin de dahil edilmesiyle kompleks biyolojik yapıların katman katman oluşturulmasıdır (Aydın ve diğ., 2015). 3B biyo yazdırma işlemi görüntüleme, tasarım, malzeme, hücre, biyobaskı ve uygulama olmak üzere altı ana başlıktan oluşmaktadır (Şekil 1.2).

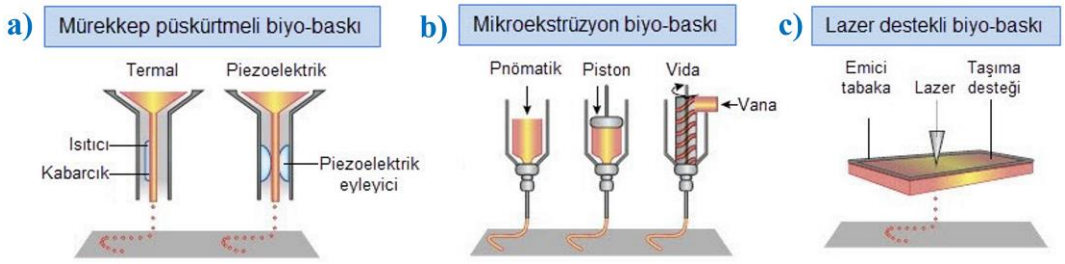


Şekil 1.2. 3B biyobasım işlem adımları ve akış diyagramı (Aydın ve diğ., 2015)

Görüntüleme adımında, tıbbi görüntüleme cihazları kullanılarak biyolojik yapıların, bilgisayar destekli tasarımı ve matematiksel modellenmesinde kullanılacak kompleks mimari bilgileri elde edilir. Görüntüleme cihazları ile elde edilen ham veriler, bilgisayar destekli yazılım paketi kullanılarak 3B dijital (CAD/CAM) çizimlere dönüştürülür. Tasarım adımında, üretilmesi planlanan hedef dokuya uygun tasarım yaklaşımı ya da bu yaklaşımların kombinasyonları belirlenir. Tasarım yaklaşımlarına göre işlenen 3B dijital çizimler biyobaskı işlemi için hazırlanarak belirli kalınlıklarda 2B ardışık katmanlara dilimlenir. Malzeme ve Hücre adımlarında, hedef doku şekli ve işlevi için uygun malzeme ve hücre kaynağı seçilir. Malzeme adımında yaygın olarak sentetik ve doğal polimerler ile hücre dışı ortam (ECM, Extracellular Matrix) kullanılır. Hücre adımında kullanılan hücre kaynağı allojenik ya da otolog olabilir. Bu bileşenler, mürekkep püskürtmeli, mikroekstrüzyon ya da lazer destekli biyo yazıcılara entegre edilir. Biyobaskı adımında, seçilen malzeme ve hücre kaynakları, hedef dokuya özgü geliştirilen inkjet, mikroekstrüzyon ve lazer destekli yazdırma teknolojileri ile birlikte kullanılarak canlı yapıların oluşması sağlanır. Uygulama adımında, bazı dokular için transplantasyon öncesi biyoreaktörde olgunlaşma periyodu gerekebilir. Bu dokular, alternatif olarak *in-vitro* uygulamalarda kullanılabilir. Olgunlaşma periyodunu tamamlayan dokular analiz edilerek hedef dokuya uygunluk belirlenir.

1.2.1. Biyobasım teknolojileri

Temel olarak kullanılan biyo yazdırma teknolojileri; mürekkep püskürtmeli, mikroekstrüzyon ve lazer destekli yazdırma sistemleridir (Şekil 1.3). Mürekkep püskürtmeli yazıcılarda, elektrik ile yazdırma başlığı ısıtılır ve başlıkta damlamayı sağlayan hava basıncı darbeleri üretilir. Aynı şekilde piezoelektrik ya da ultrason basıncından oluşan darbeler de kullanılabilir. Mikroekstrüzyon yazıcılarda, ekstrüzyon için pnömatik ya da mekanik sistemler kullanılır. Lazer destekli yazıcılarda, emici yüzey üzerine odaklı lazer kullanılarak puls oluşturulur. Bu basınçla hücreler alt tarafta bulunan bir toplayıcı yüzeye doğru itilir.



Şekil 1.3. 3B biyo yazdırma teknolojileri çalışma prensipleri: a) Mürekkep püskürtmeli (termal ve piezoelektrik temelli), b) Mikroekstrüzyon (pnömatik, piston ve vida temelli), c) Lazer destekli biyobasım (Murphy ve Atala, 2014).

Mikroekstrüzyon baskı teknolojisi, en sık kullanılan ve en uygun maliyetli olan yazdırma teknolojisidir. Bu yazdırma teknolojisi genellikle X, Y ve Z eksenleri boyunca 3 boyutta kontrollü hareket edebilen, sıcaklık kontrollü malzeme iletimi ve ekstrüzyonu ile gerçekleşir. Bazı biyo yazıcılar farklı hücre tipini yazdırmayı sağlayan birden fazla yazdırma başlığına sahiptir. Mikroekstrüzyon teknolojisinde ekstrüzyon; gaz basıncı ile sürülen bir pnömatik ya da piston/vidalı mil ile sürülen bir mekanik sistem ile gerçekleştirilir. Mekanik sistemler, gaz basıncının oluşturduğu kararsız sıkışma potansiyelini ve dolayısı ile ekstrüzyon kontrolünü pnömatik sistemlere göre daha sağlıklı bir şekilde gerçekleştirirken, vidalı bir mil aracılığı ile tahrik edilen pistonun sürülmesini sağlayan bileşenler yazdırma başlığında ağırlaşmaya neden olmaktadır. Bu durum özellikle çok başlıklı sistemlerde (multi-nozzle) 3B çalışma uzayının hacminde önemli kayba neden olmaktadır. Ayrıca, her bir teknoloji için birden fazla başlığın ihtiyaç duyulduğu kompleks biyobasım işlemlerinde, başlıklararası ofset kaçıklıkları meydana gelebilmekte ve pasif başlıklar biyo yazdırılan model üzerindeki hareketlilikten dolayı geometrik bozulmalara neden olabilmektedir. Bu durum göz önünde bulundurulduğunda baskı süresinin ve dolayısı ile *in vitro* koşullarda hücre yaşayabilirliğini arttırmaya yönelik hafif, küçük boyutlu ve aynı zamanda kompleks doku yapılarının oluşturulmasına imkân tanıyan çok başlıklı teknolojilerin ya da biyobasım yöntemlerinin geliştirilmesi gerekmektedir.

1.2.2. Biyo yazıcılar

Hedef doku özdeşinin elde edilmesinde biyo mürekkepler kadar kullanılan biyo yazıcıların özellikleri de önemlidir. Bazı biyo yazıcılar tek tip malzeme kullanarak isteğe bağlı sentetik ya da doğal polimer temelli hücre iskelesi oluşturabilme yeteneğine sahip iken bazıları da sarkıt yapıları oluşturamamaktadır. Birden fazla

hücre ya da malzeme tipini, kompleks ve sarkıt geometrileri içeren bir yapıya göre belirlenen desen ya da doluluk oranlarında konumlandırabilmek zordur. Bütün bunların dışında belirlenen hedef doku geometrisinin üretiminde kullanılabilecek basılabilirlik parametrelerinin yine amaca yönelik kontrol edilebilir olması bu alanda bilgi ve deneyim gerektirirken mevcut cihazlarda uygulanabilecek konfigürasyon sınırlıdır. Bu durumlarda mevcut cihazların üretim yetenekleri sınırlı olup, hedefe uygun cihaz geliştirilmesi gerekmektedir. Literatürde de farklı doku özdeşlerinin eldesinde amaca yönelik biyo yazıcıların geliştirildiği çalışmalar mevcuttur (Tablo 1.2).

Tablo 1.2. 3B biyo yazıcılar, üretim kabiliyetleri, fiyatları ve özellikleri

Üretici / Model	Malzeme	Fiyat	Özellikler	Ref.
Revotek / 3D Blood Vessel Bio-Printer	Organik biyo mürekkep	$50.000 - $100.000	Kapalı kabin, Windows uyumlu	(Radenkovic ve diğ., 2016)
Envision TEC / 3D-Bioplotter Developer Series	PLA, sıvı reçine, metal, seramik ve organik biyo mürekkep	$100.000 - $125.000	XY eksen çözünürlüğü: 0.001 mm Min. katman kalınlığı: 0.1 mm Mak. baskı hızı: 150 mm/sn Mak. baskı hacmi: 150x150x140 mm Boyut: 975.3x622.3x772.1 mm Ağırlık: 80 kg Windows uyumlu Ethernet	(Johnson ve diğ., 2016)
Envision TEC / 3D-Bioplotter Manufacturer Series	PLA, sıvı reçine, metal, seramik ve organik biyo mürekkep	$100.000 - $250.000	XY eksen çözünürlüğü: 0.001 mm Min. katman kalınlığı: 0.1 mm Çift yazdırma başlığı Mak. Baskı hızı: 150 mm/sn Mak. baskı hacmi: 150x150x140 mm Boyut: 975.3x622.3x772.1 mm Ağırlık: 80 kg Windows uyumlu Ethernet	(Van Noort, 2012; Ozbolat ve Yu, 2013; Rutz ve diğ., 2015)
RegenHU / 3DDiscovery	Hidrojel, biyopolimer, PCL, kalsiyum fosfat, kollajen, hyaluronik asit ve jelatin	$100.000 - $250.000	XY eksen çözünürlüğü: 0.01 mm Mak. baskı hacmi: 130x90x60 mm Boyut: 580x540x570 mm Windows uyumlu	(Khaled ve diğ., 2015; Khaled ve diğ., 2015; Rimann ve diğ., 2015; Markstedt ve diğ., 2015; Daly ve diğ., 2016)
Rokit / 3Dison Invivo	Hidrojel, HA, PCL, PLGA, kollajen, hyaluronik asit ve jelatin	$10.000 - $50.000	Mak. baskı hacmi: 100x100x80 mm Nozul çapı: 0.1 mm, 0.08 mm Windows, Mac, Linux uyumlu Kapalı kabin LCD, USB UV lamba ve LED	(Lee ve diğ., 2016; Kim ve diğ., 2015; Kang ve diğ., 2015)

Tablo 1.2. (Devam) 3B biyo yazıcılar, üretim kabiliyetleri, fiyatları ve özellikleri

Üretici / Model	Malzeme	Fiyat	Özellikler	Ref.
3Dynamic Systems / Omega Tissue Engineering Workstation	PLA, PGA, PEG, fibrin, elastin, kollajen, aljinat ve agaroz	$28.849	XY eksen çözünürlüğü: 0.5 mm Çift yazdırma başlığı Mak. baskı hacmi: 210x100x60 mm Boyut: 500x700x500 mm Windows uyumlu	(URL-4)
Advanced Solutions / BioAssembly Bot	İmplant, organ modelleri, hidrojel ve organik biyo mürekkep	$159.990	XY eksen çözünürlüğü: 0.15 mm Mak. baskı hacmi: 250x300x250 mm Nozul çapı: 0.1 mm Boyut: 935x744.5x1343 mm Ağırlık: 165 kg Windows uyumlu Kapalı kabin Ethernet	(Hornick, 2016; Whitford, 2016)
BioBots / BioBots	PCL, kollajen, hyaluronik asit, jelatin, aljinat ve organik biyo mürekkep	$10.000 - $50.000	XY eksen çözünürlüğü: 0.05 mm Min. katman kalınlığı: 0.1 mm Mak. baskı hacmi: 90x90x90 mm Nozul çapı: 0.1 mm Windows, Mac, Linux uyumlu Kapalı kabin, USB	(Ersumo ve Spiller, 2015; Dubbin ve diğ., 2016)
RegenHU / BioFactory	Hidrojel, biyopolimer, PCL, kalsiyum fosfat, kollajen, hyaluronik asit ve jelatin	$100.000 - $250.000	Mak. baskı hacmi: 60x60x60 mm Boyut: 1370x1030x2400 mm Windows uyumlu	(Ho ve diğ., 2015; Passamai ve diğ., 2016)
GeSim / BioScaffolder 2.1	PCL, organik biyo mürekkep	$100.000 - $250.000	XY eksen çözünürlüğü: 0.002 mm Min. katman kalınlığı: 0.01 mm Mak. baskı hacmi: 124.46x345.44x40.64 mm Boyut: 975.36x622.3x772.16 mm Windows uyumlu	(Detsch ve diğ., 2016; Detsch ve diğ., 2015)
Organovo / NovoGen MMX Bioprinter	NovoGel ve organik biyo mürekkep	$250.000	UV LED Windows uyumlu	(Robbins ve diğ., 2013; Bertassoni ve diğ., 2014; Hafezi ve diğ., 2015)
Xi'an particle cloud / PCPrinter BC100C	PCB, Organik biyo mürekkep	$100.000 - $250.000	Min. katman kalınlığı: 0.1 mm Mak. baskı hacmi: 100x100x60 mm Boyut: 800x470x455 mm Windows uyumlu USB Wifi Ethernet	(Lin ve diğ., 2016)
Regenova / Cyfuse	Organik biyo mürekkep	$250.000	“Kenzan” metodu (iğne uçlarına kürecik konumlama) Kürecik çapı: 400-600 μm Boyut: 1340x825x1740 mm Ağırlık: 385 kg Windows uyumlu Kapalı kabin	(Hölzl ve diğ., 2016)

Tablo 1.2. (Devam) 3B biyo yazıcılar, üretim kabiliyetleri, fiyatları ve özellikleri

Üretici / Model	Malzeme	Fiyat	Özellikler	Ref.
Kocaeli Üniv. (Türkiye) / BioLogic v1.0	Hidrojel, Biyoseramik kompozitler ve tüm organik biyo mürekkepler	Protoip üretim maliyeti $5000	Doğrudan üç farklı hücre/malzeme tipini hassas konumlandırabiliyor Kompleks geometrileri oluşturabiliyor Sarkıt yapıları destekliyor Nanodüzeyde baskı imkânı 375x250x275 mm maksimum baskı alanı 350° maksimum başlık sıcaklığı 50x60x70 cm cihaz ölçüleri ≈ 80 kg ağırlık Tüm işletim sistemleri ile çalışabiliyor Grafik LCD ya da 7 " lik dokunmatik panel ile SD karttan bilgisayarsız çıktı alabiliyor Atmosferik ortam ölçümleri (CO_2, nem ve sıcaklık) Çevre birimlerden tamamen yalıtılmış kapalı kabin UV sterilizasyon sistemi Eldiven portu girişleri	(Aydın ve diğ., 2015)

Biyo yazıcılar çoğunlukla pahalı ve karmaşık sistemlerdir. Bu nedenle her araştırmacının bahsedilen sistemlerden yararlanabilmesi her durumda mümkün olmamaktadır. Bununla birlikte mevcut sistemlerin büyük çoğunluğu pnömatik başlıkları kullanmakta ve bu da biyobasım işlemini olumsuz etkilemektedir. Çok başlıklı sistemlerde çalışma alanlarının küçük boyutlarda olmasının yanında hareketli bileşenlere çok fazla ağırlık yüklenmesi, bahsedilen bileşenleri taşıyan malzemelerde yorulmalara neden olmaktadır. Öte yandan tek başlıklı sistemlerde kompleks mikromimarilerin elde edilmesi mümkün olmamaktadır. Bu nedenle 3B baskı teknolojileri pazarında önemli bir rolü ve payı bulunmayan ülkemizde mevcut teknolojilerden daha farklı boyutlarda endüstriyel ürünlerin geliştirilmesi ve klinik uygulamalara geçişin hızlandırılması gerekmektedir.

Mevcut sistemler incelendiğinde tek bir yazdırma başlığı ile kompleks, işlevsel ve birden fazla hücre tipini ihtiva eden bir doku çıktısı alabilmek mümkün değildir (Murphy and Atala, 2014). Biyo mürekkep içerisinde bulunan her bir farklı hücre tipi için ayrı yazdırma başlığı kullanılmalı ve her bir biyomalzeme için biyobasım esnasında ideal basılabilirlik parametreleri tanımlanmalıdır. Mevcut cihazlarda kullanıcı, üreticinin öngördüğü sınırlar çerçevesinde basılabilirlik parametrelerini optimize edebilmektedir. Bu durum, kullanılan biyomalzemeler üzerindeki kontrolü

sınırlandırarak işlevsel doku çıktılarının elde edilmesini olumsuz etkileyebilmektedir. Araştırmacılar geliştirdikleri biyo mürekkebe özgü biyobasılabilirlik parametrelerini optimize edebilmeli, basım esnası ve sonrasında şekil korunumu sağlamalıdır. Şekil korunumu mevcut sistemde sadece baskı parametreleriyle (hız, katman yüksekliği) sınırlı olmayıp donanımsal bileşenlerin sisteme entegre edilebilmesini de gerektirebilmektedir (lazer modülü, ısıtma/soğutma modülü). Kullanıcının biyo yazıcı üzerinde erişebildiği kontrolün sınırı doğrudan hedef doku yapısının işlevselliğini, geometrik benzerliğini ve hücre canlığını etkilemektedir.

Hücrelerin vücut dışı ortamlarda canlılığını koruyabilmeleri oldukça zordur. Uygun atmosferik koşulların ve özellikle sterilizasyon şartlarının sağlanması çoğu mevcut cihaz için mümkün olmamaktadır. Bu nedenle biyo yazıcılar güvenlik kabinleri içerisine alınarak çalıştırılabilmektedir. Biyo yazıcıları kontrol eden arayüzlerin görüntülenmesini sağlayan monitörlerin de ayrıca güvenlik kabini içerisinde yer alması sterilitenin muhafaza edilmesini tehlikeye sokmaktadır. Güvenlik kabini içerisine alınan biyo yazıcılarda kullanılan biyo mürekkep üzerinde, kabin içi hava akımından kaynaklanan buharlaşmalar gerçekleşmektedir. Dolayısı ile biyo mürekkebin mekanik yapısı değişmekte ve özellikle hidrojellerde hücre canlılığını tehlikeye sokacak kuruma gözlemlenmektedir. Bu nedenle biyobasımın hava akışsız, UV ile tüm yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilen kapalı bir kabin içerisinde gerçekleştirilmesi bu problemi ortadan kaldırmaktadır. Cihaz otomasyonunu gerçekleştiren bileşenlerin yaydığı elektromanyetik dalgalar ayrıca hücre canlılığını etkileyebilmektedir. Bu nedenle gerek güç kaynağı gerekse diğer elektronik bileşenlerin baskı platformundan mümkün olduğunca yalıtılması gerekmektedir. Bunun yanı sıra, küçük baskı hacmine sahip biyo yazıcılar ile büyük ölçekli doku özdeşlerinin üretilmesi mümkün olmamaktadır. Baskı hacmi kullanıcının üretim potansiyelini ve araştırma imkânlarını doğrudan sınırlandırmaktadır. Biyo yazıcıların mekanik bileşenleri ve hareket sistemleri incelendiğinde neredeyse tamamının kartezyen robot olduğu gözlemlenmektedir. Lineer eksenlerin birbiri üzerine binmesi, cihazın hareket kabiliyetini olumsuz etkilemekte ve kartezyen sistemlerde yazdırma tablasının hareketliliğinden kaynaklı biyo yazdırılan modelde geometrik bozulmalar meydana gelmektedir. Biyo yazıcılar üzerinde yukarıda bahsedilen optimizasyonların tamamını gerçekleştirmek mümkün değil iken biyobasım esnasında çoğunlukla üretici

firmanın sağladığı biyo mürekkeplerin kullanılması önerilmektedir. Bu durum çalışmaları önemli derecede sınırlandırmaktadır. Kullanıcı geliştirdiği biyo mürekkebi mevcut sistemde kullanırken; baskı hızı, katman yüksekliği, iç doluluk oranı ve hatta iğne ucunun malzeme konumlandırma esnasında uygulayacağı desen ya da doldurma açısı gibi parametreleri içeren biyo mürekkebe özgü biyobasılabilirlik optimizasyonunu her durumda gerçekleştirememektedir. Bu optimizasyonlar referans doku yapısının geometrisinin birebir elde edilmesinde kritik bir rol oynarken, işlevsel doku çıktısı alınmasında büyük önem arz etmektedir

Biyobasım esnasında hücre canlılığını arttırmaya yönelik baskı süresinin azaltılması, biyo mürekkepte katmanlar arasında yapışmanın sağlanabilmesi ve hedef doku yapısına özgü geometrinin detayları baskı hızıyla ilgilidir. Özellikle hücre yüklü biyo mürekkeplerin biyobasım esnasında uzun süre laboratuvar ortamına maruz bırakılması, hücre ölümlerini ve kontaminasyon riskini beraberinde getirmektedir. Bu sürenin minimize edilmesi ve katmanlar arasında yapışmanın sağlanabilmesi için gerekli olan baskı hızı değerlerinin hedef doku yapısını elde etmeye elverişli olarak ayarlanabilmesi gerekmektedir. Bunun yanında, iğne ucunun farklı çapta kullanılmasına bağlı olarak cihazdan alınacak çıktının geometrisi değişiklik göstereceğinden iğne ucuna özgü parametre ayarlarının gerçekleştirilebilmesi her durumda mümkün olmamaktadır. Hedef doku yapısı, birden fazla yazdırma başlığını ve her bir başlıkta farklı çapta iğne uçlarının kullanılmasını gerektirebilmektedir. Aynı şekilde kullanılan iğne uçlarında oluşan kayma geriliminin özellikle hücre yüklü biyo mürekkeplerde olumsuz etkilerini minimize etmek için farklı tipte iğne uçları kullanılması da gerekebilir. Üretici firmaların sağladığı standart küt uçlu iğneler bu kayma gerilimi değerini daha fazla arttıracak geometriye sahiptir. İşlevsel doku çıktısı alınabilmesi ve bu kayma geriliminden doğan hücre ölümlerinin minimize edilebilmesi için konik tipte iğne uçlarının kullanılması gerekmektedir ki bunlar da her cihazda kullanılamamaktadır.

1.2.3. Biyo mürekkep

Biyo mürekkep, biyobasım işleminde kullanılan ve hedef doku yapısı ya da kullanılan biyobasım teknolojisine özgü polimer, hidrojel, seramik ya da kompozitler ile hibrit karışımlarından da oluşabilen biyomalzemelerdir (Aydın ve diğ., 2016). Günümüze

kadar çok çeşitli biyomalzemeler, iskele temelli biyo mürekkep geliştirilmesinde kullanılmıştır. İskele temelli biyo mürekkepler her ne kadar hücre yüklenebilen hidrojelleri çağrıştırsa da biyobasım sonrasında ekilmek kaydıyla hücre yüklenebilen, hücresiz biyo mürekkepler de bu gruba dahildir (Hölzl ve diğ., 2016). Malzeme ve hücre kaynağı seçimi hücre-biyomalzeme etkileşimi açısından hedef biyo mürekkebin geliştirilmesinde büyük önem arz etmektedir (Murphy ve diğ., 2013). Biyo mürekkeplerde kimyasal yapılar, fonksiyonel grupların mevcudiyeti, polimer hidrofilitesi, iskele gözenek çapı ve gözenekliliği hücre yaşayabilirliği, hücre yapışması ve göç gibi temel faaliyetlerin gerçekleşmesi açısından kritik olmakla birlikte doğrudan hedef doku özdeşinin işlevselliğini etkilemektedir (Rutz ve diğ., 2015). Öte yandan, biyo mürekkeplerin uygun biyobozunma kinetiği ve biyomekanik özellikleri de hedef doku özdeşi için arzu edilen şekil korunumu ve mekanik dayanımın elde edilmesi açısından önemlidir (Liberski, 2016). Sonuç olarak biyo mürekkeplerin biyolojik, yapısal ve mekanik özelliklerinin amaca yönelik ihtiyaçlar dahilinde şekillendirilmesi ve elde edilmesi gerekmektedir.

Biyo mürekkepler doğal ya da sentetik polimerlerden oluşmaktadır. Doğal polimerlerin aksine, sentetik polimerlerin düşük biyouyumluluk ve toksik yan ürünlerin oluşması gibi dezavantajları bulunabilmektedir (Lee ve Yeong, 2016; Lee ve diğ., 2013). İşlevsellik açısından hücre yapışması ve çoğalması, kullanılan biyo mürekkep tarafından desteklenmelidir. Genellikle, sentetik polimer ya da seramik temelli biyo mürekkepler, biyobasım esnasında hücreler ile birlikte işlenmeleri mümkün olmadığından, sonradan üzerlerine hücre ekilmek üzere, hücresiz biyobozunur iskele yapılarının oluşturulmasında kullanılmaktadır (Hutmacher, 2000). Oluşturulan 3B mikroçevre içerisinde yeterli miktarda oksijen ve besin taşınımını sağlayabilen hidrojel temelli biyo mürekkepler hücresel faaliyetlere elverişli bir ortam sağladığından biyobasım işlemlerinde çoğunlukla tercih edilmektedir (Shi ve diğ., 2015). Fakat, hücre yüklü bir hidrojel biyo mürekkepte şekil korunumu sağlamak zordur. Biyo yazdırılan bir yapıda hem arzu edilen şekil korunumunu hem de ideal hücre yaşabilirliğini oluşturmak oldukça fazla hidrojel optimizasyonu gerektirmektedir. Bu nedenle fiziksel/kimyasal çapraz bağlama, biyobasım esnasında ikinci bir biyobozunur biyomürekkep kullanılması, viskozitesi daha yüksek ikinci bir destek hidrojeli kullanılması ya da hibrit biyobasım (biyobozunur sentetik polimerden

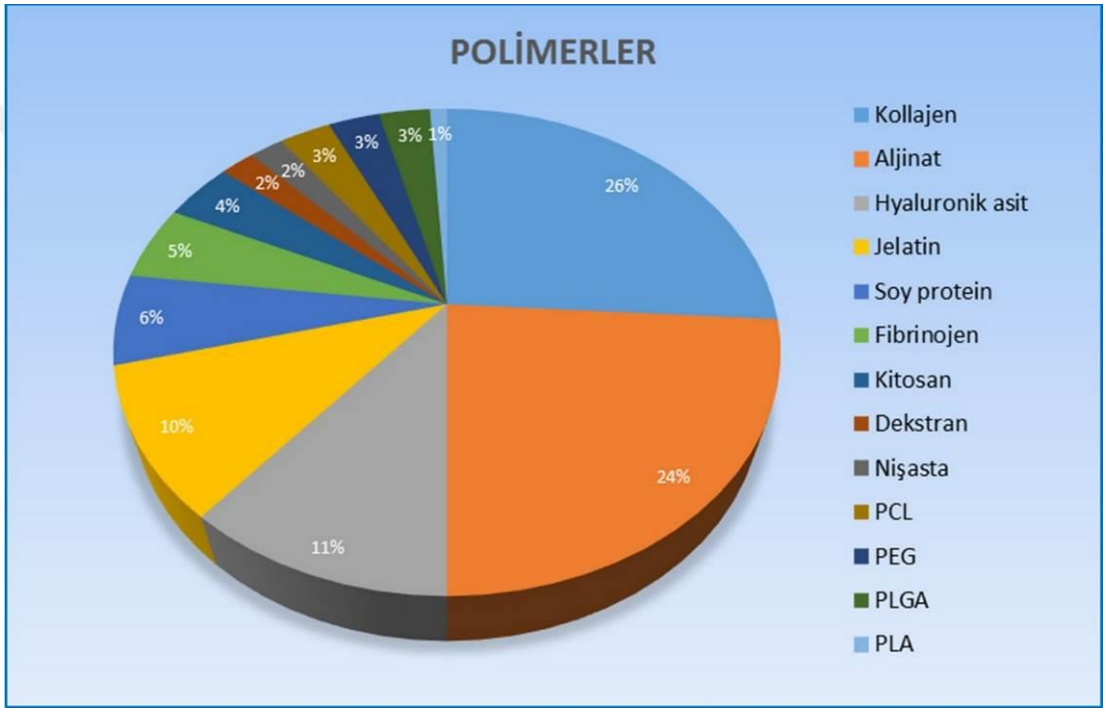
oluşturulabilen bir kabuk) teknikleri arzu edilen şekil korunumunu sağlamak için kullanılmaktadır (Murphy ve diğ., 2013). Son yıllarda biyobozunur destek hidrojel destekli biyobasım işlemleri oldukça yaygın olarak tercih edilmektedir. Böylece, biyobasım esnasında viskozitesi düşük olan hücre yüklü biyo mürekkepler, viskozitesi yüksek biyobozunur destek hidrojelleriyle baskı esnasında desteklenerek daha iyi bir şekil korunumu sağlanabilmektedir (Compaan ve diğ., 2017).

Doğal polimer biyo mürekkep temelli biyobasımın, sabit işlenebilirliği bulunan sentetik polimerlerin kullanılmasına göre pek çok zorluğu bulunmaktadır. Doğal polimerler de ayrıca dinamik nem mevcudiyeti, istenmeyen degradasyon ve özellikle de biyo yazdırılan striplerde şişme ya da büzüşme oluşumu gözlemenebilmektedir. Her ne kadar kompleks bir geometrideki yapının doğal polimerler ile yeniden oluşturulabilirliği ya da bu oluşturulma yeteneğinin sürekliliği düşük olsa da zengin biyoaktivite ve hedef ECM yapısını taklit yeteneğinin oldukça iyi olmasından hücre dostu olarak nitelendirilmektedir (Sell ve diğ., 2010). Çoğunlukla doğal polimer temelli biyo mürekkep geliştirilmesinde kollajen, jelatin, aljinat, hyaluronik asit, dekstran ve fibrin (Şekil 1.4) tercih edilmektedir (Carrow ve diğ., 2015). Bu polimerler yalnız kullanıldıklarında zayıf reolojik karakteristiklere sahiptir. Bu nedenle hedef doku özdeşi yapısına uygun ideal bir kombinasyonun geliştirilmesi biyo yazdırılan çıktının bütünlüğünü sağlamak adına önemlidir.

Kollajen, insan vücudundan bulunan ve kemik, kıkırdak, kas ve sinir gibi birçok dokunun ECM'ini oluşturan proteindir. Bununla birlikte 28 farklı morfolojide türü bulunmakta ve oluşturduğu ECM'lerde fizyolojik fonksiyonları düzenlemektedir (Martins-Green, 1997). Kollajenin birincil türleri kemik, kıkırdak, tendon ve kasın ana yapısını oluşturan tip 1, 2, 3 ve 5 tir. Her ne kadar kollajenin yetersiz mekanik özellikleri biyofabrikasyon potansiyelini kısıtlasa da medikal sektöründe ve 3B biyobasım işleminde hücresel faaliyetlere elverişli olmakla birlikte yüksek *in-vitro/vivo* biyouyumluluğu bulunması nedeniyle (RGD, asparagin – glisin – aspartik asit kalıntılarının göç, proliferasyon ve farklılaşmayı teşvik edici olması) yaygın olarak kullanılmaktadır (Lee ve diğ., 2010).

Jelatin tipik olarak sığır ya da domuz derisinden elde edilmektedir ve kollajen gibi benzer hücre dostu özelliklerinden dolayı biyobasım işlemlerinde sıklıkla tercih

edilmektedir (Hoch ve diğ., 2013). Fakat, doğal jelatinin zayıf mekanik özellikleri, kolayca sıvı forma dönüşerek dağılabilmesi (37 ºC ya da daha yüksek sıcaklıklarda jel ağırlığının en az %50 sinin 10 saatlik bir inkübasyonda yitirilmesi) dezavantajları bulunmaktadır (Hospodiuk ve diğ., 2017). Bu nedenle gluteraldehit ya da hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi bazı çapraz bağlayıcı mekanizmaların sitotoksik olsa dahi kullanılması ve jelatinin çapraz bağlı formlarının oluşturulması ya da jelatin metakrilat (GelMA) gibi modifiye edilmiş halinin kullanımı şekil korunumunun iyileştirilmesini sağlayabilmektedir (Liang ve diğ., 2017).

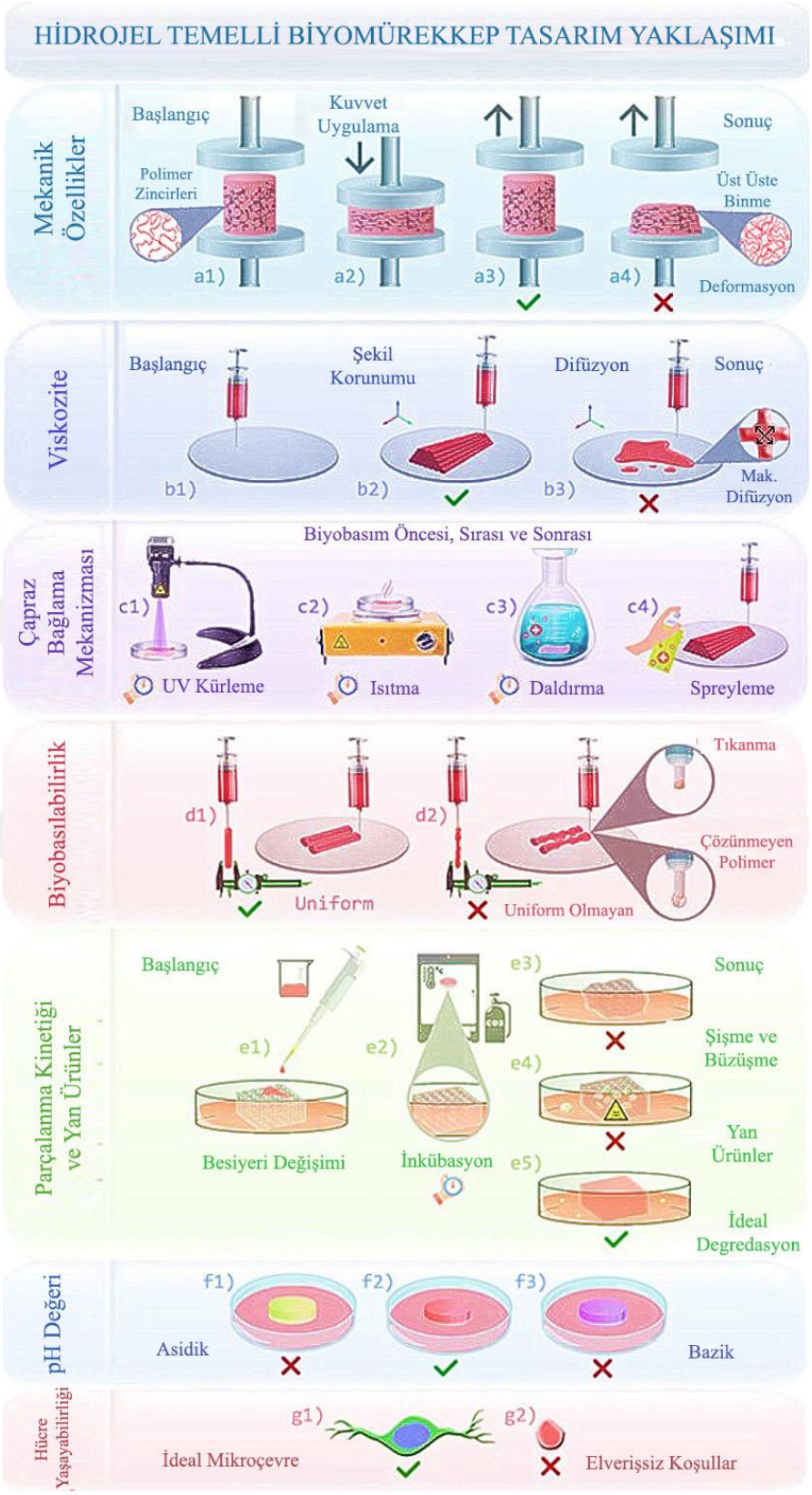


Şekil 1.4. Doğal ve sentetik polimerlerin kullanım sıklığı

Aljinat kahverengi deniz yosunundan elde edilen ve doğal ECM'e benzer özellikleri bulunan bir polisakkarittir. Aljinat yeterli seviyede biyouyumluluğa ve kontrol edilebilen viskoziteye sahip olmakla birlikte genellikle oda sıcaklığında kalsiyum klorür ($CaCl_2$) ile çapraz bağlanmaktadır (Ahn ve diğ., 2012; Leroux ve diğ., 1999). Yine de yapışma ve proliferasyon için gereken ligandların eksikliği nedeniyle apoptoz tetiklenebilmektedir (Jia ve diğ., 2014). Bu nedenle hücre yapışması için gerekli moleküllerin aljinat ile karıştırılarak aljinat temelli geliştirilen biyo mürekkeplerin daha fonksiyonel hale getirilmesi mümkündür.

Agaroz, bir diğer yaygın kullanılan ve deniz yosunundan elde edilen polisakkarit temelli doğal bir polimer olup 20 ºC ve 70 ºC aralığında hızlı ve kademeli jelleşme kinetiği bulunmaktadır (Fan ve diğ., 2016). Agaroz özellikle kalıp temelli biyofabrikasyon işlemlerinde tercih edilmektedir fakat yalnız kullanımı hücreler için uygun değildir (Livoti ve Morgan, 2010). Bu yüzden biyo mürekkep olarak kullanımda genellikle diğer fonksiyonel polimerler ile karıştırılmaktadır (Kreimendahl ve diğ., 2017).

Günümüzde iskele temelli biyo mürekkep geliştirilmesinde başlıca mekanik özellikler, viskozite, çapraz bağlama mekanizmaları, biyobasılabilirlik, biyobozunma kinetiği, pH ve hücre yaşayabilirliği parametrelerinin hedef doku yapısına özgü ayrı ayrı optimize edilmesi ve fonksiyonellik açısından her birinin ideal değerlerde olması gerekmektedir (Şekil 1.5). Tasarım yaklaşımının uygulanması biyobasım öncesi, sırası ve sonrasında arzu edilen işlevselliklerde çıktı alınabilmesi adına biyo mürekkep özelliklerinin optimize edilmesine ve nihâi ideal halini almasına yardımcı olmaktadır. Mekanik özellikler hedef doku yapısının biyomekanik karakteristiklerinin taklit edilebilmesi için önemlidir (Kuo ve Ma, 2008). İlgili standartlar çerçevesinde bir baskı ya da çekme testi uygulanması ile geliştirilen iskeleye ait mekanik özellikler elde edilebilmektedir. Bu testler sonucunda uygulanan kuvvetler sonucunda bazı örneklerin polimer zincirlerinde kalıcı bir deformasyon gözlemlenebilirken, bazıları ise malzemeye özgü elastik davranış yeteneğinden dolayı eski şeklini geri kazanabilmektedir. Viskozite ihtiyaç duyulan mikroçevrenin yine istenilen geometride elde edilebilmesi adına önemlidir ve reolojik analizlerle geliştirilen biyo mürekkebe ait viskozite değerleri ölçülebilmektedir. Biyo yazdırılacak hedef 3B model ile biyo yazdırılan yapı arasındaki geometrik benzerlik viskozite ile doğrudan ilişkilidir. Biyobasılan bir kalibrasyon modeli vasıtasıyla mevcut viskozitenin biyobasım esnasında ya da sonrasında yeterli şekil korunumu sağlanması hususnda ne kadar etkili olabileceği ölçülebilmektedir. Biyo yazdırılacak 3B model ile birebir aynı geometriye sahip bir yapının oluşturulması, hücresel aktivitelere imkân sağlayan bir mikroçevre oluşturulması kadar büyük önem arz etmektedir ve bu iki parametrenin ortak bir noktada buluşması gerekmektedir (Kesti ve diğ., 2015). Yüksek viskozite daha iyi bir şekil korunumu sağlarken oksijen ve besin iletimini sınırlandırabilmektedir.



Şekil 1.5. Biyo mürekkep tasarım kriterleri, a) Mekanik özellikler, b) Viskozite, c) Biyobozunma kinetiği, d) Biyobasılabilirlik, e) Çapraz bağlama, f) pH ve g) Hücre yaşayabilirliği (Aydın ve diğ., 2020).

Bu durumun aksine düşük viskozite hücresel aktiviteler için uygun bir mikroçevre oluşturabilirken şekil korunumu için yetersiz olabilmektedir. Düşük viskoziteye sahip bir biyo yazdırılan yapıda basılan stripler arasında istenmeyen difüzyonlar gerçekleşebilmektedir. Bununla birlikte viskozitenin oldukça düşük olması, biyo mürekkep içerisine yüklenen hücrelerin homojen dağılımını ve dolayısı ile biyo yazdırılan dokunun işlevselliğini de olumsuz etkileyebilmektedir. Çapraz bağlama mekanizmaları yine şekil korunumunu arttırmaya yönelik uygulanmakta, mekanik özellikleri arzu edilen şekillerde iyileştirmekte ve biyo yazdırılan yapının bütünlüğü açısından büyük önem arz etmektedir. Bahsedilen çapraz bağlama mekanizmaları bir UV ışık kaynağı vasıtasıyla fotopolimerizasyon işlemi, iyonik bir solüsyon yardımıyla biyobasım öncesi, sırası ya da sonrasında yapının bütün olarak daldırılması ya da katmanlar arası spreyleme şekillerinde uygulanabilmektedir (Kesti ve diğ., 2015). Çağraz bağlanma başlıca fiziksel ve kimyasal olarak gerçekleşmektedir. İyonik ya da Hidrojen bağı gibi fiziksel çapraz bağlanma tersine çevrilebilirken kimyasal çapraz bağlanma kalıcı olarak gerçekleşmektedir. Her bir çapraz bağlama mekanizmasının hücre yaşayabilirliği üzerinde maruz çapraz bağlama işleminde maruz kalınan süreye bağlı olumsuz etkisi bulunabilmektedir. Biyobasılabilirlik, biyo basım esnasında iğne ucundan birim zamanda homojen biyo mürekkep çıkışını ve aynı zamanda yazdırma platformu üzerine teorik olarak belirlenen baskı süresi çerçevesinde, planlanana uygun bir şekilde homojen olarak (teorik olarak belirlenen parametrelere uygun hacimlerde) biyo mürekkep konumlandırılmasını ifade etmektedir. Bir kalibrasyon modelinin biyo yazdırılması ile kullanılan biyo mürekkebin biyobasılabilirliği ölçülebilmektedir. Belirli desenlerde ya da yalnızca doğrusal olarak konumlandırılan striplerin ya da stripler arası boşlukların (gözenek boyutunun) ölçülmesi ve teorik olarak belirlenen ölçülerle karşılaştırılması sonucunda biyobasılabilirlik parametresi sayısal olarak elde edilebilmektedir. Biyobasılabilirlik viskozite ve baskı hızına bağlı değişebilmektedir. Biyobasım işleminin tekdüze (uniform) strip konumlandırılmasıyla gerçekleştirimesi yine daha işlevsel bir doku özdeşi oluşturulması açısından önemlidir (Ouyang ve diğ., 2016). Homojen olmayan (non-uniform) strip çıkışı çoğunlukla iğne ucunun tıkanması ya da geliştirilen biyo mürekkep karışımı bünyesinde bulunan ve tam olarak çözünmemiş bir polimer kaynaklı oluşabilmektedir. Bu sebeple biyobasım işleminde kullanılacak biyo mürekkep içerisinde baloncuk bulunmaksızın her bir polimerin çok iyi çözünmesi ve varsa hücrelerin homojen bir şekilde dağılımı 3B uniform bir yapı

oluşturulmasını sağlamaktadır (Blaeser ve diğ., 2016). İskelelerin biyobozunurluklarının, hücrelerin ECM oluşturma kabiliyetine uygun ve herhangi bir yan oluşturmayacak şekilde gerçekleşmesi hedef geometriye uygunluk açısından önemlidir (Mironov ve diğ., 2007). Polimer bozunmaları foto, termal, mekanik ya da kimyasal olarak gerçekleşebilmektedir. Bazıları hidroliz gibi pasif olarak meydana gelebilirken bazıları da enzimatik bir reaksiyon gibi aktif olarak oluşturulabilmektedir (Zhang, 2016). Bir iskeleye ait biyobozunurluk kültür ortamında belirli bir süre tutulan yapıdaki, inkübasyon sonrası, besiyeri ya da medyum değişimiyle belirlenebilmektedir. Kültür esnasında besiyeri değişimiyle çekilen medyumun liyofilize edilmesi ile tartılması bozunma hızı ile ilgili bilgi verebilirken, malzemeye özgü boyanması ise yan ürünlerin biyo yazdırılan yapıdan ayrılıp ayrılmadığını gösterebilmektedir. Bunun yanı sıra, bazı yan ürünler bounma esnasında toksik yan etkiler oluşturabilmekte ve bazı durumlarda ise biyo yazdırılan yapıda şişme ya da büzülme gibi biyo yazdırılan yapının bütünlüğünü ve işlevselliği etkileyebilen dinamik değişimler meydana gelebilmektedir (Lee ve Yeong, 2016). Geliştirilen biyo mürekkebin ideal pH da olması hücre yaşayabilirliği ve gelişimi için ideal mikroçevrenin oluşturulabilmesi adına önemlidir (Gopinathan ve Noah, 2018). Her bir asidik ya da bazik çevre hücre yaşayabilirliğini olumsuz etkilerken pH seviyeleri aynı zamanda biyo mürekkebin mekanik özelliklerini, jelleşme kinetiğini ya da biyobasılabilirliğini etkileyebilmektedir (Diamantides, 2017). Hücre yaşayabilirliği çoğunlukla geliştirilen biyo mürekkeple ilişkili olmak üzere biyo yazıcı bünyesinde kullanılan iğne ucuna, çapraz bağlanma işleminde maruz kalınan UV ışık miktarına ve süresine ya da inkübasyon koşullarına bağlı olarak etkilenebilmektedir (Billiet ve diğ., 2014; Li ve diğ., 2011). Genellikle bir Canlı/Ölü hücre deneyi (Live/Dead assay) ile boyanan canlı ve ölü hücrelerin sayısı canlılık ya da biyo mürekkep biyouyumluluğu hakkında bilgi verebilmektedir. İdeal mikroçevrede bulunan hücreler genellikle uzama yönünde eğilim gösterirken, yetersiz koşullarda hücre ölümleri meydana gelmektedir. Bir biyo yazdırılan yapı bünyesinde gerçekleşebilecek hücresel faaliyetlerin ve bahsedilen uzama eğilimlerinin hedef dokuya özgü histolojik özelliklere uygun olarak oluşabilmesi önemlidir (Shim ve diğ., 2012). Sonuç olarak, bütün bu tasarım kriterleri göz önünde bulundurulduğunda bir biyo mürekkebin hem biyolojik hemde mekanik olarak hedef doku yapısını iyi taklit edebilmesi ve yine hedef doku yapısına özgü mikroçevre şartlarını sağlayabilmesi gerekmektedir.

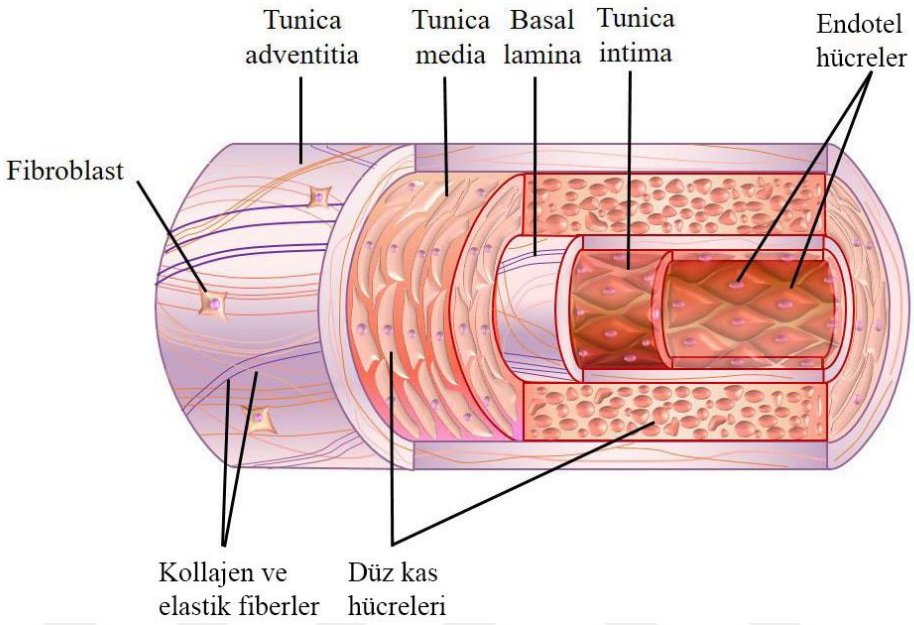
1.3. Damar Doku Anatomisi

Kan damarlarının duvarları genellikle 3 katmandan oluşmaktadır. En iç katman *tunica intima* olarak adlandırılmakta olup, Latince de *tunica* örtü ve *intimus* da en iç katman anlamına gelmektedir. Bu katmanın üzerinde orta katman olarak bilinen *tunica media* ve en dış katmanda da *tunica adventitia* ya da bazı kaynaklara göre *tunica externa* olarak ifade edilen katman yer almaktadır (Şekil 1.6). *Tunica intima* içerisinde 3 ana bileşen bulunmaktadır. Bunlar basit bir skuamoz epitel tabakadan oluşan endotel, esas olarak tip IV kollajen ve lamininden oluşan bir bazal lamina ve son olarak gevşek bağ dokusundan oluşan subendotel tabakadır. Her ne kadar endotel tabaka, bahsedilen tabakalar içerisinde en ince katman olarak (sıkı bir trombojenik bariyer) yer alsa da çevre doku kaynaklı enfksiyonları ve iltihaplanmaları önleme gibi önemli rolleri bulunmaktadır. Bunun yanı sıra, bazı durumlarda gevşek bağ dokusunda düze kas hücreleri de bulunabilmektedir (Zhang ve diğ., 2007). İç elastik membran olarak adlandırılan, fenestre edilmiş bir aselüler elastik lamel, arterlerde ve arteriollerde *tunika intima'*nın subendotel tabakasında bulunmakta ve maddelerin bahsedilen tabakalar arasında difüzyonunu kolaylaştırmada rol oynamaktadır. Ayrıca, *tunika intima*'nın düz kas hücrelerine veya fibroblastlara sinyal faktörleri salgılayarak kan damarlarının genel yapısal bütünlüğünün korunmasında rol oynadığı düşünülmektedir. *Tunika intima*'nın çevresinde, ağırlıklı olarak tip I ve III kollajen ile damar çevresinde, çevresel olarak düzenlenmiş düz kas hücrelerinin katmanlarından oluşan ve kaslı bir tabaka olan *tunika media* bulunur (Berillis, 2013). Bu tabaka arterlerde, damarlara göre nispeten daha kalındır ve iç - dış elastik membran arasındaki tüm boşluğu kapsar. Dış elastik membran, *tunika media*'yı *tunica adventitia*'dan ayıran elastik bir tabakadır.

*Tunika media'*nın diğer bileşenleri arasında retiküler lifler, elastin ve düz kas hücrelerinin katmanları arasına bulunan proteoglikanlar yer almaktadır. Değişken miktarlarda fenestrasyonlarla dairesel olarak düzenlenmiş elastik lameller yine bu katmanda da bulunur. *Tunica adventitia*'nın aksine *tunika intima* ve *media*'nın tüm hücre dışı bileşenleri (elastin ve kollajen gibi maddeler) düz kas hücreleri tarafından sentezlenir (Hoch ve diğ., 2014). Kan damarlarının en dış tabakası, esas olarak uzunlamasına kollajen doku ve bazı elastik liflerden oluşan gömülü fibroblastlara sahip gevşek bir bağ dokusu tabakası olan *tunica adventitia*'dır. Bu katman, kan damarını, çevreleyen dokuya sabitlemede ve ek mekanik destek sağlanmasında rol

oynamaktadır (Stegemann ve diğ., 2007). Bununla birlikte bahsedilen katman arterlerde ver arteriollerde nispeten daha ince iken, damar duvarlarının ana bileşeni de olduğundan, venül ve venlerde çok daha kalın bir yapıdadır. Büyük arter ve venlerin *tunica adventitia* yapılarında *vasa vasorum* adı verilen bir vasküler ağ ve *nervi vasorum* (vascularis) adı verilen otonom bir sinir ağı bulunmaktadır. Bu ağların, kan damarları duvarlarına besin - oksijen sağlamak, vazokonstriksiyonu düzenlemek ve düz kaslara sinir sistemi kaynaklı sinyaller göndererek vazodilatasyonu düzenlemek gibi işlevleri bulunmaktadır. Arterlerin ve venlerin anatomileri oldukça benzerdir, ancak *tunica* yapılarının kalınlığı ve tabakalarda bulunan protein bileşimleri değişiklik göstermektedir. Arterler genellikle daha kalın bir *tunika media*'ya ve daha ince bir *tunica adventitia* yapısına sahiptir. Genellikle *tunika media'*nın boyutu ve özelliklerine göre, büyük (veya elastik arterler), orta (veya kaslı arterler) ve son olarak küçük arter ya da arterioller olmak üzere 3 ana gruba ayrılırlar. Büyük arterlerin bazı örnekleri aort, pulmoner arterler ve brakiyosefalik gövdeyi içermektedir. Bu tip arterlerin vasküler duvarlarında büyük miktarda elastik lamellerden bulunmaktadır. Bu elastik lameller, vasküler yol boyunca sürekli ve düzgün kan akışı ile arteriyel kan basıncını koruyabilen elastik geri tepme özelliklerine sahiptir. Büyük arterlerde bulunan *tunika media*'nın aksine, orta arterler neredeyse tamamen düz kaslardan oluşmaktadır. Ancak az miktarda da olsa elastin ve belirgin bir iç elastik zar içermektedirler. Kas arterlerinin bazı örnekleri femoral, radyal ve popliteal arterdir. Küçük arterler ve arterioller, *tunika media* yapılarında bulunan düz kas tabakalarının kalınlığı ile birbirinden ayırt edilebilmektedir. Arteriollerdeki düz kas tabakaları sadece 1 veya 2 hücre kalınlığındayken, küçük arterlerde olanlar 8 ile 10 hücre kalınlığında olabilmektedir. Kılcal damarlar, bahsedilen tüm kan damarları arasında en küçük çapa sahiptirler ve her biri yalnızca tek bir endotel tabakası ve bunların bazal laminasından oluşmaktadır. Lümenlerinin çapı, bir seferde yalnızca bir eritrositin geçmesine izin verecek kadar büyüktür. Diğer damarlardan farklı olarak, kılcal damarlarda *tunika media* ve *tunica adventitia* bulunmamaktadır. Venler, arterlere kıyasla daha kalın bir *tunica adventitia* yapısına sahiptir. Genellikle venler büyüklüklerine göre venüller (postkapiller), küçük, orta ve büyük venler olarak 4 gruba ayrılmaktadır. Venüller ayrıca, duvar yapılarında *tunika media* içermediği için bu duruma bağlı postkapiller ve müsküler venül olarak alt bölümlere ayrılabilmektedir. Venüller doğrudan kılcal damarlardan kan almakta ve perisitlerin varlığı ile karakterize edilmektedir. Küçük venler venüller ile bağlantılı

olup orta venler ise vücudumuzda belirli isimlendirilmiş damarları temsil etmekte ve sıklıkla arterlerle birlikte görülmektedir. Orta ven olarak radyal, tibial ve popliteal ven örnek gösterilebilmektedir. Büyük venler, çapı 10 mm'den büyük olan damarlar olup üst ve alt *vena cava* 'yı kapsamaktadır.



Şekil 1.6. Kan damarının genel olarak yapısı (Ng ve diğ., 2018)

1.4. Dünya'da ve Türkiye'de Biyobasım

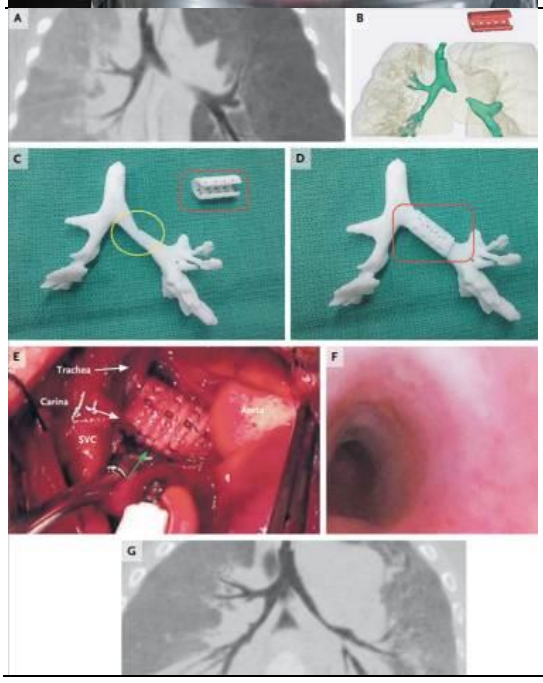
Global 3B biyobasım pazarının, 2026'ya kadar %19,5'luk bir CAGR (yıllık bileşik büyüme oranı) kaydederek 4,1 milyar dolarlık seviyeye genişlemesi beklenmektedir. Özellikle kozmetik sektöründe de 3B baskının artan kullanımının ve 3B biyobasımdaki yeni gelişmelerin mevcut büyümeyi destekleyeceği düşünülmektedir. Biyobasım teknolojileri 2000'li yıllardan günümüze implant ya da protez geliştirilmesi ile üretiminde kullanılmıştır. Günümüzde de ilaç geliştirme maliyetlerini azaltması nedeniyle ilaç üretmi ve farklı tıbbi uygulamalarda da kullanım alanına sahip olmuştur. Geçtiğimiz yıllarda Amerika'da bir şirket, FDA onayı alarak biyobasım teknolojileri temelli ilaç üretimini gerçekleştirmiştir (URL-5). Bunun sonucunda, artan kronik hastalıklar ve sınırlı sayıda donörün bulunması ile birlikte ilaç keşif çalışmalarının geliştirilmesinde de 3B biyobasım teknolojilerinin yaygın olarak kullanılması ve mevcut pazarın daha da büyümesi beklenmektedir. Bu bölümde güncel olarak ülkemizde ve dünyada biyobasım alanında gerçekleştirilen önemli çalışmalar,

biyobasım pazarındaki gelişmeler ve biyobasımın geleceğine ilişkin tespitler yer almaktadır.

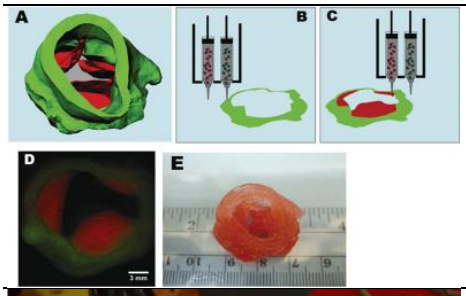
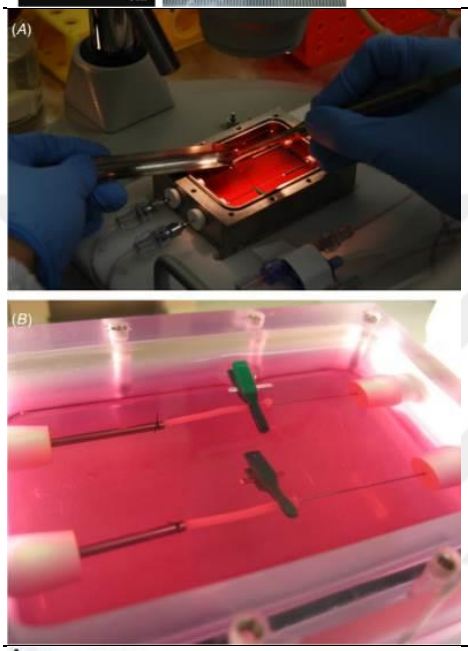
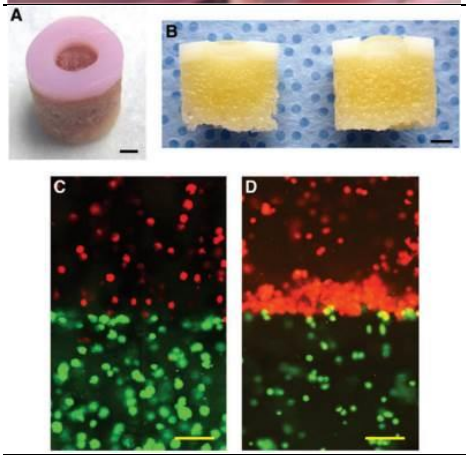
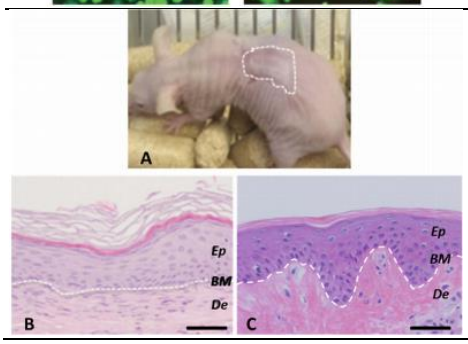
1.4.1. Dünya'da biyobasım

Başlangıçta yalnızca kompleks vakalarda kullanılan biyobasım teknolojileri, günümüzde pek çok klinik uygulamada da yer alarak özellikle ortopedi ile dental ve maksilofasiyal cerrahisinde kulanılmıştır. Bu alanlarla birlikte implant geliştirilmesi (biyobozunur ya da tamamen kalıcı), nörocerrahi, vasküler cerrahi, plastik ve rekonstrüktif cerrahi, hepatobiliyer cerrahi, üroloji, kardiyak cerrahi, anesteziyoloji, ilaç çalışmaları ya da eğitim amaçlı 3B anatomik modellerin geliştirilmesi konularında kullanılmaktadır (Tablo 1.3).

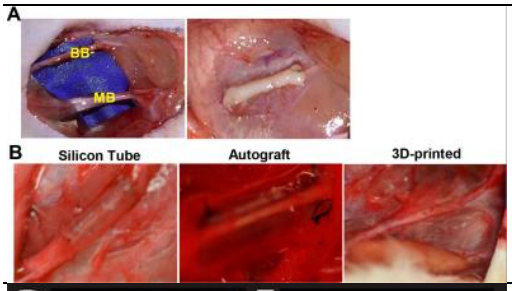
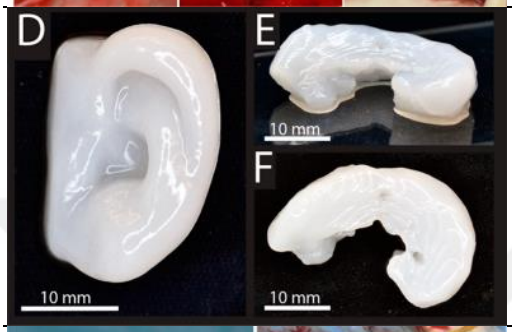
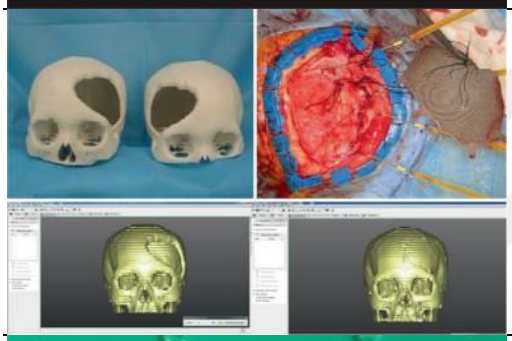
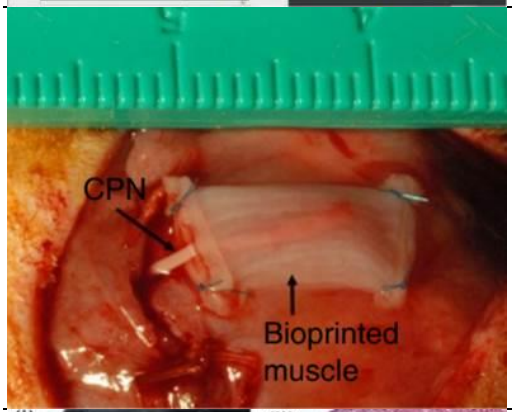
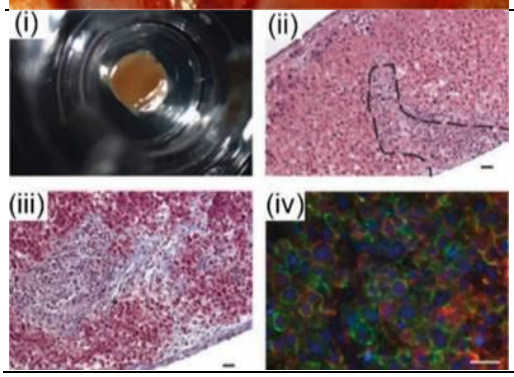
Tablo 1.3. Dünyada biyobasım teknolojileri ve uygulama alanları

Önizleme	Uygulama	Ref.
	Mikroekstrüzyon teknolojisi ile üretilen böbrek prototipi	(Murphy ve Atala, 2014)
	3B biyolojik rezorbe edilebilir havayolu ateli	(Bracci ve diğ., 2013)

Tablo 1.3. (Devam) Dünyada biyobasım teknolojileri ve uygulama alanları

Önizleme	Uygulama	Ref.
	Aljinat / jelatin hidrojelleri ile heterojen aort kapağı biyobasımı	(Duan ve diğ., 2012)
	Mikroekstrüzyon teknolojisi temelli kaynaşmış vasküler yapılar ve olgunlaşma periyodu sürecinde uygulanan perfüzyon işlemi	(Marga ve diğ., 2012)
	Mürekkep püskürtmeli biyobasım teknolojsi temelli geliştirilen kıkırdak doku özdeşleri	(Cui ve diğ., 2012)
	Mikroekstrüzyon teknolojisi temelli geliştirilen fonksiyonel insan derisi ve *in vivo* analizi	(Cubo ve diğ., 2016)

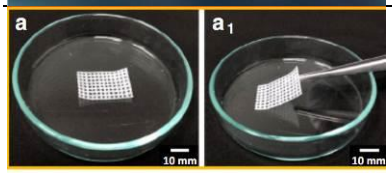
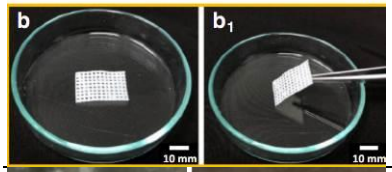
Tablo 1.3. (Devam) Dünyada biyobasım teknolojileri ve uygulama alanları

Önizleme	Uygulama	Ref.
	Kenzan metodu temelli biyo basılan sinir doku yapıları ve doku rejenerasyonu	(Zhang ve diğ., 2018)
	Mikroekstrüzyon teknolojisi ve aljinat-nanoselüloz biyo mürekkep temelli kıkırdak doku mühendisliği uygulamaları (kulak ve menisküs yapıları)	(Markstedt ve diğ., 2015)
	Kraniyofasiyal plastik cerrahide 3B biyobasımın klinik uygulaması	(Choi ve Kim., 2015)
	*In vivo* kas doku mühendisliği ve biyo yazdırılan kas doku implantasyonu	(Kang ve diğ., 2016)
	Biyobasılan mini insan karaciğer doku yapısı	(Kryou ve diğ., 2019)

1.4.2. Türkiye'de biyobasım

Ülkemizde biyobasım alanında çoğunlukla kemik doku iskeleleri, damar doku özdeşleri ve deri özdeşleri üzerine çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Tablo 1.4).

Tablo 1.4. Türkiyede biyobasım teknolojileri ve uygulama alanları

Önizleme	Uygulama	Ref.
	Mikroekstrüzyon teknolojisi ile üretilen kemik doku iskelesi	-
	Mikroekstrüzyon teknolojisi ve hidrojel biyo mürekkep temelli geliştirilen büyük ölçekli insan damar doku özdeşi	(Aydın ve diğ., 2020)
	Mikroekstrüzyon ve hidrojel biyo mürekkep temelli biyo yazdırılan damar doku yapısı	(Küçükgül ve diğ., 2013)
 	Polikaprolakton / beta-trikalsiyum fosfat / kollajen biyomürekkep temelli kemik doku iskelesi	(Aydoğdu ve diğ., 2019)
	Triküspit kalp kapakçığı özdeşi	(Akpek, 2017)

Tablo 1.4. (Devam) Türkiyede biyobasım teknolojileri ve uygulama alanları

Önizleme	Uygulama	Ref.
	Mikroekstrüzyon teknolojisi ve hidrojel biyo mürekkep temelli kıkırdak doku özdeşi	(İlhan, 2019)

2. MALZEME VE YÖNTEM

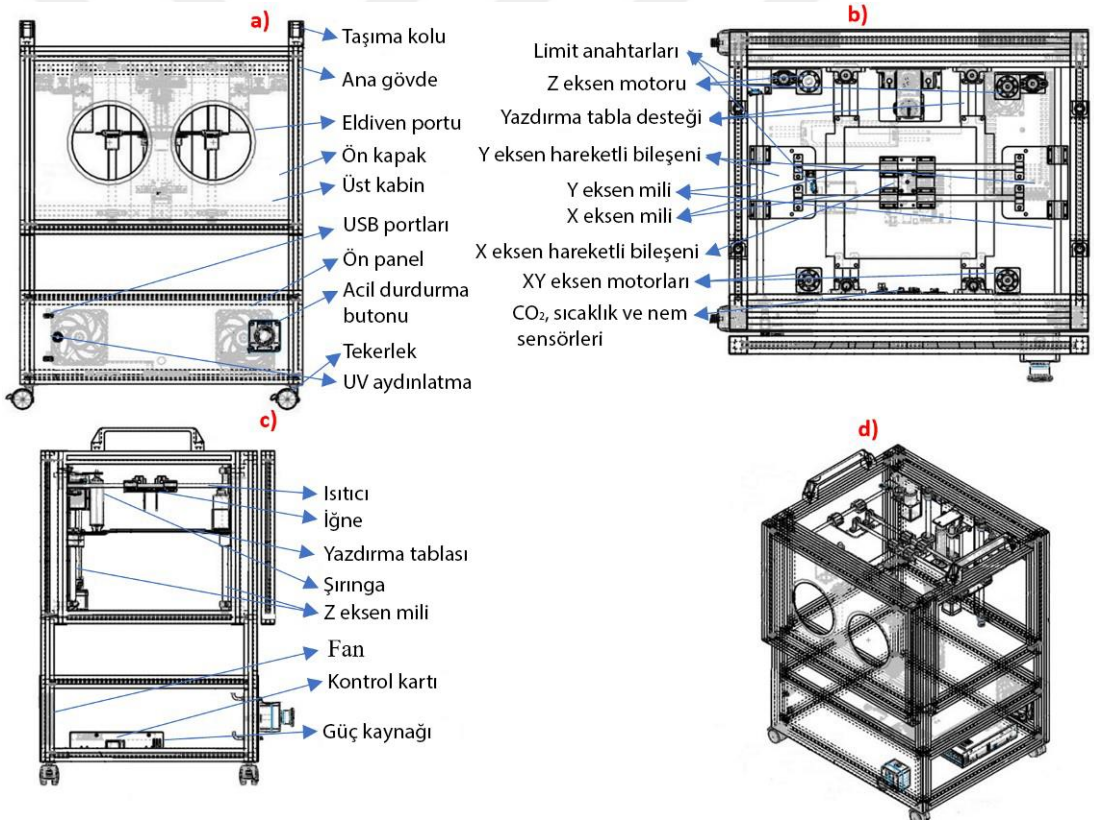
2.1. Doku ve Organ Biyobasımı Amaçlı 3B Biyo Yazıcı ve Biyo Mürekkep Geliştirilmesi

2.1.1.Biyo yazıcı tasarım kriterleri ve üretimi

Başlangıçta, kinematik, büyük modüller, elektronik ve mikroekstrüzyon yazdırma başlığı mevcut biyo yazıcı sistemlerinin fiyat ve işlevsellikleri de göz önünde bulundurularak belirlendi. Kartezyen sistemlerde eksenlerin birbiri üzerine binmesi ya da delta sistemlerinde mikro işlemciye ağır bir işlem yükü binmesi durumlarının yaşanmaması adına H-bot mekaniği temelli bir sistem tasarımına karar verildi (Weikert ve diğ., 2011; Vuola ve diğ., 2010). Bütün sistemin *in vitro* çalışmaya uygun olarak çevreden yalıtılması ve hatta bünyesinde bir UV sterilizasyon modülü ile birlikte eldiven portuna sahip olması planlandı. Bunun yanı sıra, kapalı kabin içi CO_2 ve nem parametrelerinin anlık olarak ölçülmesi de yine tasarım kriterleri içerisinde yer aldı. Kompleks doku özdeşi eldesi için çoklu ve mikroekstrüzyon baskı teknolojisine sahip bir yazdırma başlığının, büyük ölçekli doku özdeşi eldesi için de büyük ve ısıtılabilir bir yazdırma tablasının bulunması dikkate alındı.

Tasarım ve montaj ilk olarak SolidWorks (2016, Dassault Systemes) tasarım ortamında gerçekleştirildi. 2B çizimler 3B montaj parça modellerine dönüştürülerek montaj adımı tamamlandı (Şekil 2.1). Elektronik bileşenlerin çoğu mümkün olduğunca baskı platformunda ayrı tutuldu ve harici bir soğutma birimi ile soğutuldu. Baskı platformu akrilik ve bakır plakalar vasıtasıyla çevreden yalıtıldı. Uygulama esnasında açılıp kapanabilen bir ön kapak ve bu kapak üzerine gerektiğinde açmadan baskı platformuna müdahale edilebilmesi amaçlı eldiven portu uygulandı. Bununla birlikte çeşitli aydınlatma ve bağlantı amaçlı USB birimleri yine kullanım kolaylığı sağlaması açısından tasarlanan bir ön panel üzerine uygulandı. Bütün metal bileşenler 3 mm kalınlığında ve kolay işlenebilmesi açısından alüminyum lazer kesimle imal edildi. Böylece bahsedilen imalat süreci gerek maliyet açısından uygunluk gerekse ihtiyaç duyulan rijitlik ve rahat uygulanabilirliği de beraberinde

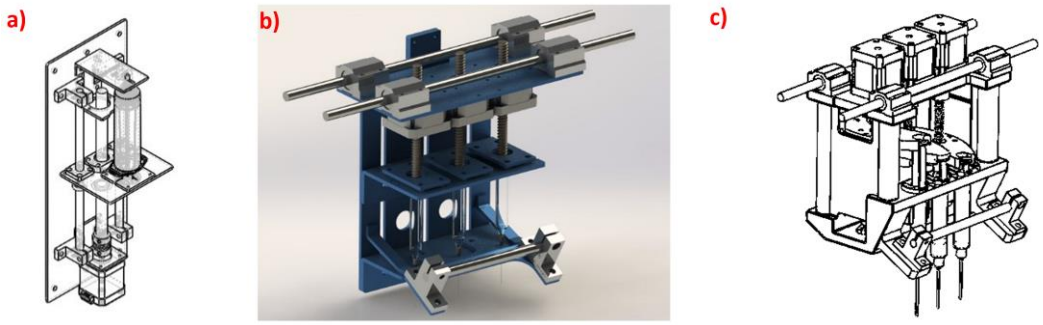
sağlamış oldu. LM, SCE, KP, KFL serisi rulmanlar montaj adımında 2B lazer kesilen bileşenlere monte edilerek, bahsedilen alümünyum parrçaları arzu edilen görevleri yerine getirebilecek şekilde işlevsel hale getirdi. Çevresel ölçüm sensörleri (K tipi termokupl, DHT11 ve MG-811) ile aydınlatma (led aydınlatma modülü) ve sterilizasyon modülleri (UV ışık modülü) için kapalı kabin içerisinde uygun konumlar belirlendi ve 3B çalışma ortamında montajları gerçekleştirildi. Bir LCD kontrol paneli cihazın ön tarafında ve görünür bir konuma monte edilerek bilgisyarsız çalışma ve manuel kontrol imkânı sağlandı. Başlangıçta uzatmalı (distal) türde bir yazdırma başlığı planlansa da uygulamada yaşanan olumsuzluklardan dolayı 2 farklı yazdırma başlığı daha üretilerek hedef doku özdeşinin eldesinde karşılaşılan problemere çözüm üretildi.



Şekil 2.1. BiyoLojik: Çoklu mikroekstrüzyon başlığı bulunan H-bot biyo yazıcı, a) Önden görünüm, b) Üstten görünümü c) Yandan görünüm ve d) Perspektif görünüm

Toplamda 3 farklı yazdırma başlığı üretilmesi planlanan doku özdeşi için belirlenen ihtiyaçlar doğrultusunda tasarlandı (Universal MicroExtrusion Module - UMM, Multi MicroExtrusion Module - MMM ve Ergonomic MultiExtrusion Module - EMM). Üniversal ekstrüzyon modülü yalnızca tek bir yazdırma başlığından ibaret olarak

başlangıçta çeşitli biyobasım testlerinin gerçekleştirilmesinde kullanıldı. Ancak hedef doku özdeşinini elde edilebilmesi için birden fazla başlığın kullanılması gerekmekteydi. Bu nedenle UMM modülü için tek başlıkta gerçekleştirilen optimizasyonlar ileride ilave edilmesi planlanan diğer başlıklar için temel oluşturması ve faydalanılması adına kullanıldı. UMM modülü herhangi bir boyutta ve özellikteki şırıngayı rahatlıkla kullanabilirken, ergonomik açıdan şırınganın montajının uygun olmaması ve distal olarak akışkan iletiminin gerçekleştirilmesi nedeniyle farklı bir başlık tasarımına karar verildi. Bu nedenle MMM mikroekstrüzyon modülü tasarlandı ve ekstrüzyon işleminin doğrudan hareketli yazdırma başlığı üzerinden gerçekleştirilmesi sağlandı. Bununla birlikte aktif olarak çalışabilecek başlık sayısı 3 adete çıkarıldı. Sistemin hızlı çalışabilmesi, sistemin yorulmaması ve mekanik olarak herhangi bir ısıtma işleminden etkilenmemesi adına lazer kesim alüminyum bileşenler vasıtasıyla üretilmesine karar verildi. Ancak uygulamada vakit kaybı yaşamamak ve şırınganın daha rahat yazdırma başlığına sabitlenebilmesi için daha farklı bir tasarımı bulunan bir başlık geliştirildi. Geliştirilen başlıkta maksimum 5 mL lik tipik şırıngaların kullanılabilmesi, gerektiğinde lazer modülünün aktif bir şekilde iğne ucuna odaklanarak kullanılabilmesi ve şırıngaların birkaç saniye içerisinde değiştirilebilmesi sağlandı. Her bir yazdırma başlığına ısıtıcı bileşen ve sıcaklı ölçüm sensörleri yerleştirilerek gerektiğinde kullanılabilmesi sağlandı (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. BiyoLojik: yazdırma başlıkları, a) Üniversal ekstrüzyon modülü, b) Çoklu mikroekstrüzyon modülü ve c) Ergonomik mikroekstrüzyon modülü

Mekanik montajın tamamlanması ile sistemin çalışması için gerekli olan elektronik bileşenler ve kablolama işlemleri gerçekleştirildi. Kontrol kartı, motorlar, sensörler, anahtarlar ve ısıtıcılar sırasıyla ilgili konumlara monte edildi. Kontrol kartı çok başlıklı baskı imkânı sunan Megatronics v3 (RepRapWorld) tercih edildi. Bununla birlikte 3 eksende hassas hareket kabiliyeti elde emek amacıyla planet redüktörlü step motor

kullanıldı (NEMA 17, 0,9°, 14:1). Tüm motorlar yine hassas hareket ve ekstrüzyon kabiliyeti elde etmek için DRV8825 motor sürücüleriyle birlikte kullanıldı (1/32 adım). Kabin içi sıcaklık ve nem ölçümünde DHT11 sensörü ile birlikte CO_2 ölçümü için MG-911 sensörü kullanıldı. Tüm elektronik bileşenler kontrol kartı üzerine kablolanarak sistem çalıştırıldı.

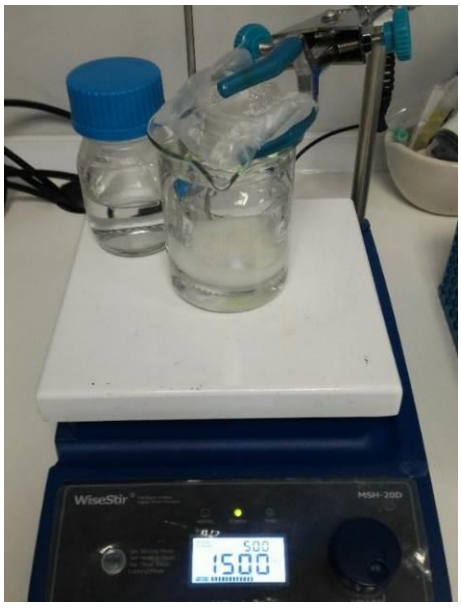
Bütün montajın tamamlanmasıyla birlikte kalibrasyon adımına geçildi. Kalibrasyonlar hem manuel hemde otomatik olarak gerçekleştirildi. Bu işlemlere hareket kabiliyet, ekstrüzyon mikarı, ısıtıcılar ve sıcaklıl ölçümleri ile nem ve CO_2 miktarının ölçümleri dahil oldu. Bunlarla birlikte, ön paneldeki kontrol elemanlarının testleri, UV aydınlatma, kayıt ve USB bağlantı testleri uygulandı. Yine cihazın ön kısmında bulunan LCD ekran üzerinden manuel çalıştırma ve bilgisayarsız baskı testleri gerçekleştirildi. Isıtıcıların kalibrasyonu esnasında Marlin yazılımının otomatik PID konfigürasyonu kullanıldı. Böylece arzu edilen seviyelerde minimum aşım miktarı olacak şekilde elektronik ısıtma elemanlarının kalibrasoynu sağlandı. Tüm sistemi test etmek için Repetier Host yazılımı bünyesinde bulunan Dry Run fonksiyonu ile birlikte ekstrüzyon gerçekleştirilmeden baskı uygulandı. Bu test aşaması ile birlikte son olarak laboratuvar koşullarında üretilen belirli viskozitelerde akışkan biyo mürekkep özdeşleri ile hedef doku özdeşi oluşturulmadan önce basılabilirlik gözlemlendi.

2.1.2. Damar doku eldesi için biyo mürekkep geliştirilmesi

Bu bölümde GelMA temelli hücre ihtiva eden bir ana hidrojel (main) ve buna desteklik sağlayan bir diğer hidrojel (sacrificial) biyomürekkep geliştirilerek biyobasılabilirlik optimizasyonları gerçekleştirildi ve protokolleri belirlendi. Hidrojel optimizasyonlarında; ideal biyobasılabilirlik, hücresel aktivitelere uygunluk ile besin ve oksijen taşınımı için uygun polimerler ve oranlar araştırıldı. Geliştirilmesi planlanan ana hidrojelde, ideal mikroçevrenin oluşumu ve arzu edilen hücre yöneliminin sağlanması hedeflenirken, destek hidrojelinde ise kontrollü erozyon kinetiğinin oluşturulması amacıyla optimizasyon çalışmaları yapıldı. Bahsedilen hidrojel biyo mürekkeplerin doğal polimer temelli geliştirilmesi ile toksik yan etkilerin minimize edilmesine dikkat edildi. İlk olarak biyo mürekkep geliştirilmesinde kullanılacak sarf polimerler kullanıma hazırlandı. Bu kapsamda GelMA sentezi, kollajen izolasyonu ve diğer stok çözeltilerin hazırlanması sağlandı.

2.1.2.1. GelMA sentezi ve kollajen izolasyonu

1x GelMA sentezi için: 1,5 gr. Jelatin (Sigma, Lot: SLBK2325V, Bloom 300, Type A) ile 15 mL 1x PBS su banyosunda 37 °C çözünmeye bırakıldı. Senteze başlamak için deney düzeneği hazırlandı (Şekil 2.3) ve sentez sonunda ilave edilmek üzere 60 mL 1x PBS 50 °C su banyosunda bekletildi. Altta 300 mL lik beher ve üste de 100 mL lik cam şişe olacak şekilde beherin ve şişenin içerisine ayrı ayrı balık (2 cm. lik) atılarak beherin içi dH_2O ile dolduruldu. Su banyosunda çözünen jelatin şişe içerisine alınarak karıştırıldı. Isıtıcı karıştırıcı 50 °C ve 1500 rpm de sabit kalacak şekilde ayarlandı. Senteze başlarken 2 mL lik ependorf (Axygen) içerisine 1 mL MAA (Aldrich, Methacrylic Anhydride, Lot: STBF3733V) alınarak ilk 10 dk. boyunca her bir dk. da 100 µL olacak şekilde mikropipet ile eşit miktarlarda jelatin-PBS (1x) karışımına damlatıldı. Damlatma işlemi sona erdikten sonra ısıtıcı karıştırıcıda mümkün olduğunca hızlı (1500 rpm) bir şekilde 2 saat 50 dk. boyunca karıştırıldı. Sentez tamamlandıktan sonra steril göbek bağı klempleri ile diyaliz torbasına (Thermo Scientific, SnakeSkin Dialysis Tubing, Lot: QA207680, 10kDa MWCO) sıkıştırıldı. 500 mL lik bir şişe içerisine alınan diyaliz torbası üzerine su banyosundan alınan (50 °C) 500 mL dH_2O eklendi. Şişe içerisinde bakteri oluşumunu engellemek için %1 oranında 500 µL Pen/Strep Anf/B ilave edildi. Şişe üzeri alüminyum folyo ile kaplanarak iğne ucu ile bir iki adet delik açıldı ve çalkalamalı su banyosunda 50 °C de 10 günlük diyaliz işlemi başladı.



Şekil 2.3. GelMA deney düzeneği

Diyaliz esnasında şişe içerisindeki dH_2O her gün değiştirilerek içerisine Pen/Strep Anf/B (%0,1) ilave edildi (2 günde 1 de olabilir). Diyaliz süresince metakrilatın ortamdan uzaklaştırılması, şişe ağzına kapatılan alüminyum folyoda uçurulma miktarı ile anlaşıldı. 10 günün sonunda folyoda değişklik gözlemlenmedi. Diyaliz işlemi tamamlandıktan sonra, GelMA geniş bir cam petride (7 cm.) 2 gün boyunca (tamamen kuruyana kadar) liyofilize edildi (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. GelMA liyofilizasyonu

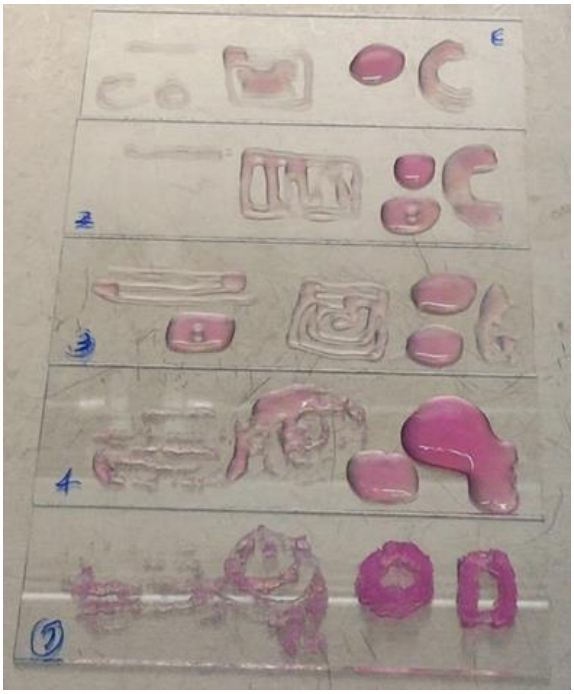
Kollajen izolasyonu için: Kasaptan ve mezbahadan sığır aşil tendonları temin edildi. Temin edilen sığır aşil tendonları, bistüri yardımı ile fasia dokusundan mekanik olarak temizlendi. Doku parçaları demineralize suda yıkandı. Blendır vasıtasıyla bahsedilen doku parçaları daha küçük parçalara ayrıldı (denaturasyonu önlemek için doku parçaları dondurularak buz parçaları ile birlikte blendırda daha küçük parçalara ayrılabilir). Doku parçacıklarına 1 mg/mL pepsin ihtiva eden 0,2 M asetik asit (dH_2O içerisinde) eklendi. 4 °C'de ve 90 rpm de sürekli çalkalanarak 3 gün boyunca bekletildi. Süre sonunda tendonlar süzgeçten geçirilerek süpernatant kısmı alınıp 1,8 M NaCI içerisinde çöktürüldü. Elde edilen fibriler kollajen santrifüj sonrası toplandı ve diyaliz için alındı. Fibriler kollajen kısmı 0,5 M asetik asitte çözünüp diyaliz tüplerine transfer edildi. Kollajen içeren diyaliz tüpleri 0,1 M asetik asit çözelti içerisine alınarak 3 gün 4°C sıcaklıkta bekletildi. Süre sonunda 0,1 M asetik asit çözeltisi yerine distile su koyulup 4°C'de bir gece (O/N) tutuldu. Gece sonunda distile su tazelenerek 8 saat manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Diyaliz sonunda elde edilen kollajen petri kaplarında toplandı ve -80 °C'de dondurulduktan sonra liyofilize edildi

(izole edilen kollajenin saflığı SDS-PAGE ile belirlenebilmektedir. Sığır tendon kollajeni %90 kollajen tip 1 ve %10 kollajen tip 3'ten oluşmaktadır).

2.1.2.2. Destek hidrojel optimizasyonu

Destek hidrojeli için optimizasyonlar iki aşamalı olarak gerçekleştirildi. İlk aşamada belirlenen kalibrasyon modelleri manuel olarak lam yüzeyinde oluşturularak geometrik bozukluklar gözlemlendi. İkinci aşamada belirlenen konsantrasyon aralıkları biyo yazıcı üzerinde denenerek biyobasılabilirlik optimizasyonları gerçekleştirildi. İç doluluk oranı bulunmayan ve tek kalınlıkta bir kabuktan oluşan 1x1x0,5 cm^3 lük (en, boy, yükseklik) bir kalibrasyon modeli biyo yazdırılarak oda koşullarında geometrik bozuklukları gözlemlendi.

İlk hidrojel optimizasyonundan elde edilen sonuçlara göre (Şekil 2.5); sabit bir çözücü içerisinde artan agaroz miktarı yüksek viskozite ile daha katı yapıların oluşmasını sağlarken hidrojelde meydana gelen parçalanmalar homojen ve ideal biyobasılabilirlik kinetiği için uygun bulunmadı. Bu nedenle sabit bir çözücü içerisindeki mevcut kontrol hidrojelini oluşturan konsantrasyon arttırılarak ikinci bir optimizasyon gerçekleştirildi. Aynı kalibrasyon modelleri temel alınarak 3 farklı örnek hazırlandı ve geometrik bozukluklar incelendi.



Şekil 2.5. İlk hidrojel optimizasyonu

İkinci optimizasyonda kullanılan konsantrasyonlar aşırıdoymuş olmakla birlikte hazırlama esnasında mikrodalgadan faydalanıldı. Bahsedilen konsantrasyonların hazırlanması esnasında agaroz (toz, SERVA for PCR low melting: SERVA, 11384.01-25G, Lot 150670) ve aljinatın (toz, Alginic acid sodium salt from brown algae: Sigma A2033-100G, medium viscosity, Lot SLBN0889V) falkon tüp içerisinde ısıtma öncesinde vortex ile iyice karıştırılması özellikle aljinatın mikrodalgada çözünme esnasında yanmasını engelledi. Bahsedilen toz polimerlerin homojen olarak karışmasına dikkat edildi. Bu nedenle boş falkon tüp içerisinde homojen karıştırılan toz polimerlere besiyeri ilave edilerek, karışım mikrodalgada kısa süre çözündükten sonra spatül yardımı ile mekanik olarak karıştırıldı. Mekanik olarak karıştırılan hidrojel tekrar mikrodalga vasıtasıyla kısa süreli çözündükten sonra aynı işlem ışık altında hedef hidrojel üzerinde homojen görüntü gözlemleninceye kadar tekrar edildi. İkinci hidrojel optimizasyonu ile Cx1,5 konsantrasyonunun, destek hidrojeli olarak kullanılabilirliği ve ideal biyobasılabilirliği gözlemlendi. Daha kesin sonuçlar elde etmek amacıyla Cx1,5 konsantrasyonu temelli ve geniş örnek aralıklı (C-Cx2) yeni hidrojeller hazırlanarak optimizasyon yeniden gerçekleştirildi (Cx3 hidrojel örneği, bahsedilen polimerlerin 10 ml lik besiyeri, DMEMF12, içerisinde çözünmesiyle elde edilebilecek maksimum konsantrasyonu ifade etmektedir. Cx3 konsantrasyonu üzerine çıkılması halinde aljinatın mikrodalgada çözünme esnasında yanma ihtimali çok yüksektir).

Üçüncü hidrojel optimizasyonu ile Cx1,4 örneğinde ideal biyobasılabilirlik özellikleri gözlemlendi. Manuel hidrojel optimizasyonlarının ardından destek hidrojel optimizasyonunun ikinci aşaması olan; iç doluluk oranı bulunmayan ve tek kalınlıkta bir kabuktan oluşan 1x1x0,5 cm^3 lik (en, boy, yükseklik) kalibrasyon modeli, Cx1,4 konsantrasyonunda hazırlanan biyomürekkep kullanılarak biyo yazdırıldı ve oda koşullarında geometrik bozuklukları gözlemlendi.

Destek hidrojeli üzerinde gerçekleştirilen biyobasılabilirlik optimizasyonları sonrasında mevcut konsantrasyon ile birlikte diğer örnekler kullanılarak doğrudan 24 kuyucuklu bir plaka içerisinde bir çember modeli (1 cm.) manuel olarak oluşturuldu. Her bir kuyucuğa laminar kabin içerisinde 3mL besiyeri (DMEMF12) ilave edilerek 72 saat inkübe edildi ve destek hidrojel konsantrasyonlarının erozyonuna etkisi gözlemlendi.

2.1.2.3. Ana hidrojel optimizasyonu

Benzer bir optimizasyon hücre yüklenecek olan ana hidrojel için de uygulandı. Bu hidrojel üzerinde ideal mikroçevre oluşturmaya teşvik edici optimizasyonlar gerçekleştirildi. Mevcut konsantrasyonlar içerisinde ideal mikroçevre (hücresel aktivitelere uygun) oluşumu sağlayan örnek temel alınarak, hücre canlılıkları incelendi.

2.1.2.4. Destek hidrojelinin hazırlanması

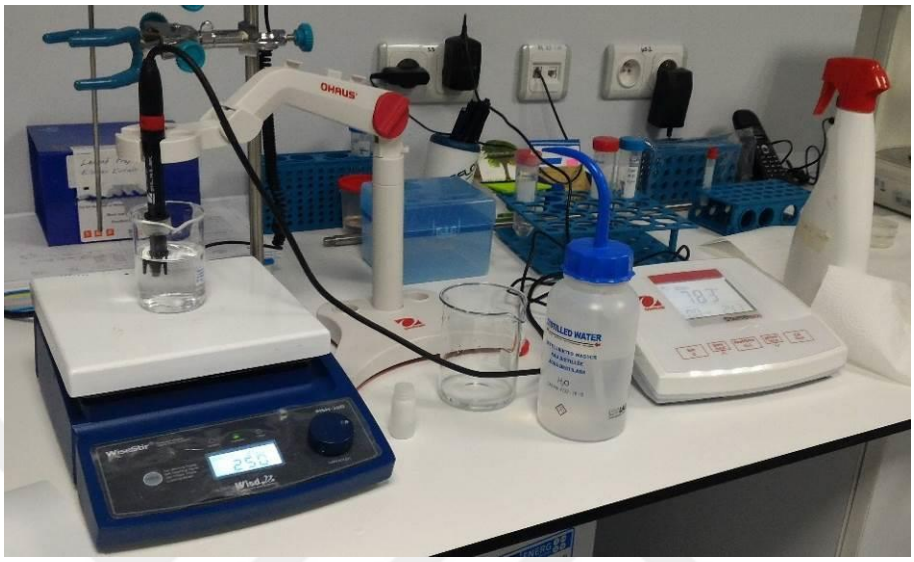
Destek hidrojel (sacrificial hydrogel) hazırlanırken ilk olarak 0,28 gr. (%2,8 w/v) agaroz (+20 °C) ve 0,84 gr. (%8,4 w/v) alginic acid (+4 °C) tartıldı. 10 mL DMEM/F12 (+4 °C) besiyeri içerisinde çözünmeden önce vortex yardımı ile polimerler 3 dk. boyunca karıştırıldı (mak. rpm). Tozlarda homojen dağılım gözlemlendikten sonra 50 mL lik falkon tüpünün kapağı yarım kapatılarak mikrodalga içerisine alındı. 30 sn boyunca bekletildikten sonra laminar içerisine alınan hidrojel spatül yardımı ile mekanik karıştırıldı. Homojen dağılımın gözlemlenebilmesi amacıyla hidrojel içerisinde oluşan baloncuklar santrifüj edilerek yok edildi (+20 °C, 9-9, 1750 rpm, 10 dk.). Homojen dağılım gözlemlenerek laminar kabin içerisinde hidrojel spatül yardımı ile 5 mL lik şırınga tüpüne doldurulduldu (homojen dağılımın gözlemlenmemesi durumunda kısa süreli mikrodalga içerisinde bekletilen hidrojel tekrar santrifüj edildi, +20 °C, 9-9, 2500 rpm, 10 dk.) (Şekil 2.6). Şırınga ayağı çıkarılan şırınganın açıkta kalan kısımları parafilm ile sarılarak kapatıldı (santrifüj esnasında parafilmi yırtmaması için alt kısmı 3 kat sarıldı). Şırınga ucu 50 mL lik falkon tüpünün kapak kısmına bakacak şekilde, şırınga haznesi falkon tüpünün içerisine yerleştirildi. Falkon tüpünün kapağı kapatılarak (herhangi bir taşma olması durumunda koruyucu önlem olarak) santrifüj edildi (+20 °C, 9-9, 1500 rpm, 5 dk.). Santrifüj işlemi ile hidrojel şırınga tüpünün alt kısmına doğru çöktürüldü. Laminar içerisinde şırınga ayağı ve biyobasımda kullanılan konik küt iğne ucu takıldı.



Şekil 2.6. Destek hidrojeli hazırlama aşamaları, a) Polimer sterilizasyonu, b) Besiyer ilavesi, c) Mikrodalgada çözme, d) Santrifüj uygulama, e) Şırınga tüpüne dolum, f) Parafilm sarımı, g) Falkon tüpe yerleşim, h) Santrifüj uygulama ve i) Biyobasıma hazır hidrojel

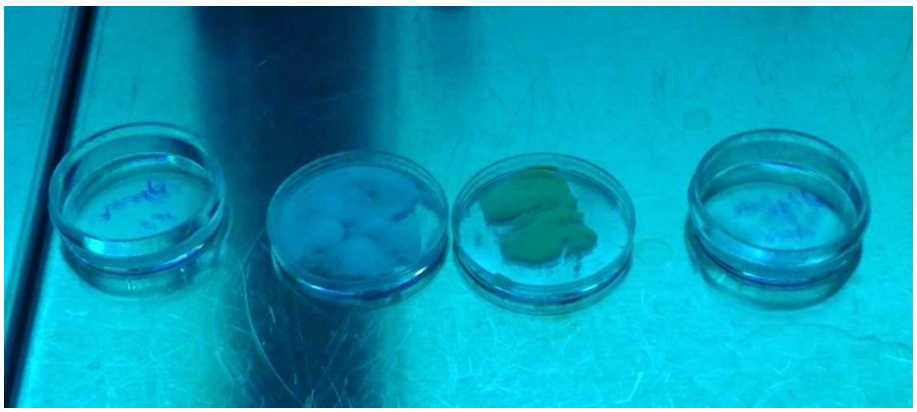
2.1.2.5. Ana hidrojelin hazırlanması

Ana hidrojel (main hydrogel) hazırlanırken ilk olarak kullanılacak olan dH_2O nun pH ölçümü yapıldı ve bu değerin 7,2 ile 7,4 arasında olması sağlandı (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. İdeal pH değerinin ayarlanması

Kullanılacak olan GelMA (sünger), aljinat (toz) ve agaroz (toz) laminar kabin içerisinde bulunan UV lamba ile 15 dk. boyunca sterilize edildi. VA086 (2,2'-Azobis[2-methyl-N-(2-hydroxyethyl)propionamide] azo initiator: WAKO 013-19342-25G, Lot DCF0653) ise dH_2O içerisinde çözündükten sonra 22 µm. lik şırınga ucu filtresinden geçirilerek sterilize edildi. Böylece tüm bileşenler sterilize edildi (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Toz polimerlerin laminar kabin içerisinde sterilize edilmesi

Bir sonraki adımda ana hidrojel için gerekli olan stok çözeltileri (GelMA, aljinat, agaroz, kollajen ve VA086) hazırlandı.

GelMA stok çözeltisi (%16): 1x GelMA (%15 lik, sünger): 1,6 gr. tartıldı. 10 mL DMEM/F12 (+4 °C) besiyeri içerisinde +37 °C de çözündü.

Aljinat stok çözeltisi (%1,5): 0,15 gr. alginic acid (+4 °C) tartıldı. 10 mL DMEM/F12 (+4 °C) besiyeri içerisinde mikrodalga vasıtasıyla çözündü.

Agaroz stok çözeltisi (%2): 0,2 gr. low melting agarose tartıldı. 10 mL DMEM/F12 (+4 °C) besiyeri içerisinde mikrodalga vasıtasıyla çözündü.

Kollajen stok çözeltisi (%1): %0,05 acedic acid içeren suda hazırlanmış, 0,1 gr. liyofilize edilen kollajen tartıldı. 10 mL dH_2O içerisinde +37 °C de çözündü (pH 7.0). 0,45 µm. lik şırınga ucu filtresinden geçirilerek sterilize edildi.

VA086 stok çözeltisi (%4): 0,4 gr. VA086 (+4 °C) tartıldı. 10 mL dH_2O içerisinde +37 °C de çözündü.

Besiyeri için 50 mL lik falkon tüp içerisine: 5 ml FBS (-20 °C), 500 µL P/S Anf/B (-20 °C), 50 ml e tamamlanacak şekilde besiyeri (DMEM/F12, +4 °C) ile 2 µL bFGF ilave edildi (-80 °C). Besiyeri hazırlandıktan sonra +4 °C de saklandı. Kullanılmadan önce de su banyosunda bekletildi (37 °C).

15 mL lik amberli falkon tüp içerisinde son konsantrasyonları %8 GelMA, %0,45 aljinat, %0,2 agaroz, %0,1 kollajen olacak şekilde ana hidrojel hazırlandı ve son olarak %0,4 VA086 eklendi. Mikropipet kullanılarak çek-bırak yöntemiyle her bileşen eklenildiğinde karıştırıldı. Biyobasımda kullanılacak 5 mL lik şırıngalar için 3 mL ana hidrojel hazırlandı.

İnsan göbek bağı veni kaynaklı düz kas hücrelerini çözmek için: Sıvı azottan alınan vialler su banyosu içerisine sallanarak çözünene kadar bekletildi. Çözündükten sonra biyolojik güvenlik kabini içerisinde üzerine yavaş yavaş 1mL besiyeri eklendi. Sonra yavaşça 15 mL lik tüp içerisine alınarak üzerine 5 mL besiyeri eklendi (1 vial normalde 5 mL besiyeri içerisinde çözünmelidir, hücre sayısı az olduğu durumlarda birkaç vial 5 mL lik besiyeri içerisinde çözünebilmektedir).

Hücre pasajlama adımında hücrelerin %100 doluluk oranına ulaşmadan pasajlanması ya da kullanılması gerekmektedir. Tripsinizasyon işleminde amaç, Tripsin vasıtasıyla hücrelerin mevcut bulunduğu flasklarda tutunduğu proteinlerin koparılması (1 adet T75 flasktan ayrılarak 3 eşit parçaya bölünmesi ve 3 farklı T75 flaska aktarılması idealdir) ve FBS li besiyer ile (SMC besiyeri) yeni flasklara tutunmasını sağlamaktır. Hücrelerin %100 doluluk oranına ulaşması istenmeyen bir durum olmakla birlikte hücre ölümleri meydana gelmektedir. Bu nedenle pasajlama süresince hücrelerin mikroskop ile günlük görüntülenmesi ve flask yüzeyininde kaplanılan alana göre pasajlama işleminin gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

Pasajlama için: T75 flask (2 adet, geçirgen kapaklı) içerisinde bulunan hücreler inkübatörden çıkarılarak laminar içerisine alındı. Besiyerleri atıldı (Besiyerinde bulunan FBS Tripsinin aktivitesine engeldir). Ortamdan FBS yi uzaklaştırmak için 6 mL PBS ile yıklama yapıldı (Ca ve Mg hücrenin tutunması için önemlidir. Bu şekilde hem Ca ve Mg hem de FBS ortamdan uzaklaştırılıyor. Enzim ile birlikte hücreler kalkıyor. Yıkama esnasında dikkat edilmesi gereken, PBS nin flask yüzeyini kaplamasının sağlanmasıdır). %0,05 Tripsin 3 mL ilave edildi (1 adet T75 flask için). T75 flask 5 dk. +37 °C de bekletildi ve inkübatörden alındı. Üzerine tripsini inaktive etmek için 2 katı kadar FBS li besiyeri (DMEM F12, FBS, PenStrep, bFGF) ilave edildi (Tripsin, hücrenin yüzeye tutunduğu proteinlerini (proteaz) kırıyor, hücreler fazla maruz bırakılmamalı). Besiyeri ilave edilirken pipetör ile çekilip flask yüzeyini yıkayacak şekilde bırakıldı. Son olarak hepsi 15 mL lik tüp içerisine alındı. Mevcut pasaj kaldırılıp tekrar ekildi. Ekilince pasaj sayısı 1 arttırıldı. Santrifüj işlemi için hazır hale gelen 15 mL lik falkon tüp 5 dk. 1500 rpm 20 °C de santrifüj edildikten sonra hareket ettirilmeden laminar içerisine alındı (Santrifüj esnasında HeatShock u önlemek için sıcaklığın 20 °C de olması idealdir. Sıcaklığın düşürülme gerekçesi olarak tüplerde yüksek hızda dönmeden kaynaklı oluşan ısının hücre ölümlerine neden olmasını engellemek için uygulanabilir). Santrifüj sonrasında çöken hücrelerin sıvı kısımları atıldı. Tripsin bu şekilde uzaklaştırıldı. Yeniden besiyeri eklenilerek yeni T75 flasklara eşit miktarda dağıtıldı (Normalde 1 flasktan çıkan hücreler 3 flaska dağıtılır. Gerekli ise cm^2 başına düşen hücreler sayılır). Yeni flasklara alınan hücrelere toplamda 10 mL besiyeri ilave edildi. Besiyeri flask yüzeyine dağıtılarak flasklar yeniden inkübatör içerisine alındı.

Hücre sayımı için: 2 mL lik 1 adet ependorf alındı (non-steril). 10 µL hücre ve 10 µL de Trypan Blue boya ependorf içerisine eklendi ve mikropipet ile karıştırıldı. 1 adet Thoma lamı alınarak üzerine lameli konuldu ve lam ile lamel arasından Thoma lamının 2 tarafından da 10 µL karışım ilave edildi (Bu esnada dikkat edilmesi gereken karışımın 2 cam yüzeyi arasında her tarafı boşluksuz kapladığından emin olunmasıdır). Mikroskopta canlı hücreler parlak renksiz ve ölü hücreler de mat mavi olarak gözlemlendi. Bu esnada sayım en dış kare çizgisi üzerinde, en sol ve üst çizgiler üzerinde bulunan hücreler hariç tutularak gerçekleştirildi. Öndecen sıvı azottan çıkarılarak çözünmüş olan SMC (göbek kordon veni düz kas hücresi) hücreleri santrifüj ile çöktürülerek mikropipet yardımı ile sıvıdan arındırıldı (+20 °C, 9-9, 1500 rpm, 5 dk.). 3 mL lik çözelti içerisine $9x10^6$ hücre ilave edildi (mL başına $3x10^6$ hücre, thoma lamı hücre sayımında kullanıldı). Mikropipet kullanılarak çek-bırak yöntemiyle homojenize hale gelen çözeltiye 3 mL için 34,99 µL Aprotinin (proteinaz inhibitörü) ilave edilerek hücrelerin hidrojeli parçalaması engellendi. Floresan tip UV lamba ile (OSRAM PURITEC UV-C Germicidal Low Pressure Lamp HNS 15W G13) 3 dk. boyunca laminar kabin içerisinde 3,5 cm. lik bir petri içerisinde kapağı açık olacak ve hava almayacak şekilde lamba üzeri tamamen alüminyum folyo ile kaplanarak kısmi şekilde çapraz bağlandı. UV lambanın petriye olan uzaklığı 3 cm. olarak belirlendi ve laminar kabindeki hava akışı çapraz bağlama esnasında kapatıldı (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. Biyolojik güvenlik kabini içerisinde UV çapraz bağlama

Çapraz bağlama işlemi esnasında 1,5 dakikadan itibaren jel yüzeyinde ufak baloncuklar gözlemlendi. Bu baloncukların ayrıca çapraz bağlama süresi ile orantılı olarak arttığı tespit edildi (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Hücresiz ana hidrojel örnekleri, a) Ana hidrojel örneği ilk çapraz bağlama denemesi, b) Uzun ve kısa sürelerde UV ışığa maruz bırakılan ana örneklerinin çapraz bağlama süre optimizasyonu ve c) Biyobasım için çapraz bağlama süresi belirlenen ana hidrojel örneği

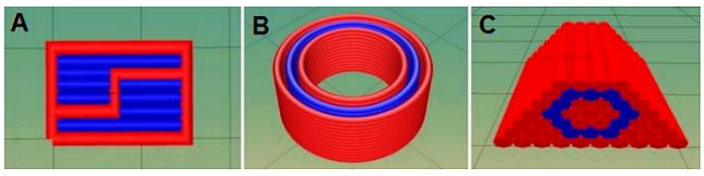
Çapraz bağlama işlemi sonrasında 5 mL lik şırınga içerisine çekilerek doldurulan ana hidrojel cihazda kullanıma hazır hale getirildi. Ana hidrojel biyobasım sonrasında UV lamba ile ayrıca 8 dk. çapraz bağlandı.

2.1.3. Biyobasılabilirlik optimizasyonları

Biyobasılabilirlik değerini tüm örnekler için sayısal olarak elde edebilme adına oda sıcaklığında her bir örnek aynı koşullar altında ve yine aynı parametrelerde biyo yazdırılarak ölçümler yapıldı. Bu kapsamda yalnızca doğrusal bir model lam yüzeyine yazdırılarak mikroskopta (Olympos IX53 Inverted Microscope) strip kalınlığı ölçüldü. Her bir örnek için kullanılan bilinen iğne çapı büyüklüğü ile oda sıcaklığında ölçülen hidrojel strip kalınlıkları karşılaştırıldı (Aydın ve diğ., 2020). Ölçüm esnasında ayrıca hidrojel striplerin uniform bir geometrisi bulunup bulunmadığına ayrıca dikkat edildi.

2.1.4. Biyobozunurluk ve şekil korunumu

Bu kapsamda küçük ölçekli bir kalibrasyon modeli vasıtasıyla bir erozyon testi uygulandı. Tek bir katmandan oluşan ve hem hücre ihtiva eden hidrojel biyo mürekkepten hemde zamanla erozyona uğrayan destek hidrojelinden oluşan hibrit bir model yapısı planlandı (%3,5 agaroz: %10,5 aljinat karışımı ve hücre yüklü hidrojel, AT MSCs, Adipose Tissue derived Mesecimal Stem Cell, yağ dokusundan alınan mezenkimal kök hücre) (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. Şekil korunumu için belirlenen modeller

Keskin köşeli bir desen yapısı oda sıcaklığında (25 °C), konik tipte bir iğne ile (400 µm. çap) ve belirlenen hızlarda (25 mm./sn. destek hidrojeli için, 15 mm./sn. hücre yüklü hidrojel için) gerçekleştirildi. Biyobasılan kalibrasyon modeli (Model A) daha sonra 48 saat boyunca inkübasyonda bekletildi (nemli ve 37 °C). İnkübasyon sonucunda destek hidrojelinin yapıdan tamamen ayrılmasıyla oluşan geometriler ölçülerek teorik planlanan değerlerle karşılaştırıldı. Mikroskop ölçümlerde boşlukların kontrastını arttırmaya yönelik AT MSCs FITC-falloidin ile boyandı.

Tübüler modelde (Model C) şekil korunumunu ve hücre dağılımını gözlemlemek adına kriyokesit alınması planlandı. Biyobasılan model öncelikle 2 kere HBSS solüsyonunda yıkandı ve 5 dk. bu solüsyonda bekletildi. Ardından %4 paraformaldehit (PFA) solüsyonunda 30 dk. boyunca bekletilerek sabitlendi. Sırasıyla %15 ve %30 luk sukroz çözeltilerinde batana kadar bekletildi. Son olarak bir OCT sıvıya (OCT, Tissue Tek, Sakura Finetek) batırılarak -80 °C de bir gece dondurulduu. Bir kriyostat cihazı (Leica Microsystems, Nussloch, GmbH) bünyesinde 20 µm kalınlıklarında kesitler aldınarak saklandı. Bu kesitler FITC-falloidin ile boyanarak SMC hücrelerinin belirlenmesi sağlandı. Falloidin boyama için örnekler öncelikle %4 PFA ile sabitlendi. Hücre ihtiva eden hidrojeller daha sonra DPBS ile yıkanarak %0,1 triton X-100 ile permeabilize edildi. Yüzey serum ile oda sıcaklığında 30 dakika boyunca bloke edildi ve %0,1 sığır serum albumini (BSA) içerisinde hazırlanan FITC işaretli falloidin ile birlikte muamele edilerek 37 °C de 1 saat bekletildi. Son olarak %0,1 BSA ile hücreler yıkanarak çekirdek boyanması için DAPI (1:1000 DPBS'te) içerisinde 10 dakika boyunca oda sıcaklığında muamele edildi ve floresan mikroskopta incelendi (Olympus IX53).

2.1.5. Viskozite

Destek hidrojeli için viskozite ölçümü gerçekleştirildi. Bu kapsamda silindirik örnekler belirlenen standartlara uygun ve baloncuksuz olarak geliştirlen özel bir aparat vasıtasıyla hazırlandı. Bir reometre cihazı (Anton Paar, MCR 102) yardımıyla destek hidrojeli grubunda yer alan tüm örneklerin ölçümleri gerçekleştirildi (ölçüm ofset değeri: 4 mm.). Viskozite ölçümleri oda sıcaklığında (25 °C) ve örneklerin kenarları kesilmeden yapıldı.

2.1.6. *In vitro* biyouyumluluk testi

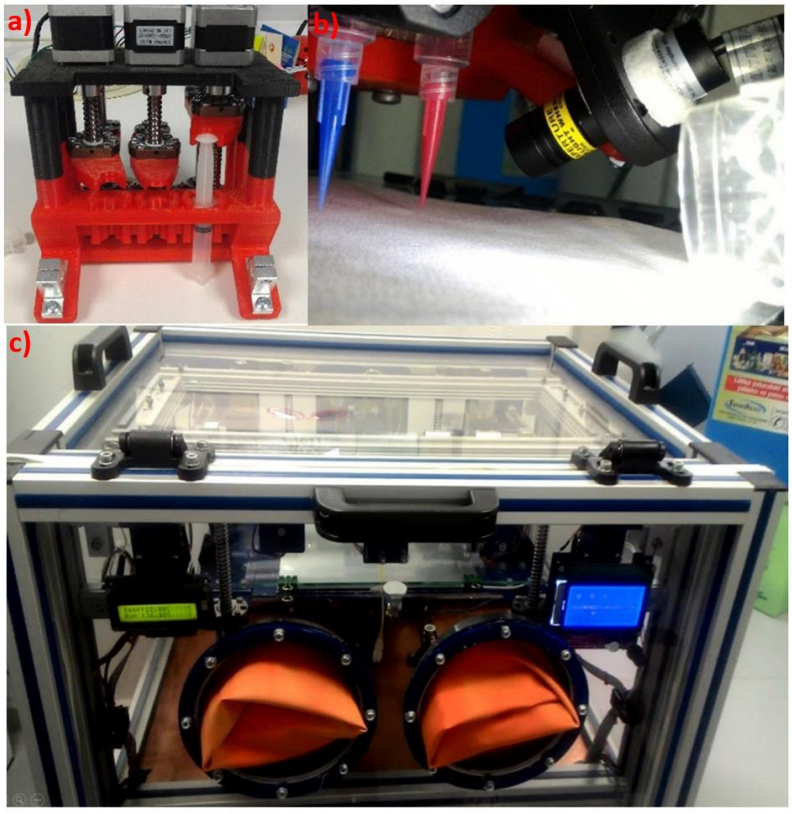
Biyouyumluluk testleri için Canlı/Ölü boyama yapıldı (ThermoFisher, Live/Dead Viability/Cytotoxicity Kit, for mammalian cells). 3 günlük bir inkübasyon sonucunda 3B doku özdeşi FBS kalıntılarının atılması için 30 dk. HBSS ile yıkandı. Daha sonra oda sıcaklığında kalsein AM (2µM) ve etidyum homodimer-1 (4µM) de 45 dakika bekletildi. Son olarak örnek yeniden HBSS ile yıkandı ve floresan mikroskopta incelendi (Olympus IX53 Inverted Microscope). Hücre canlılıklarının yüzdece tespiti ImageJ (Fiji) programında 1. ve 3. günlerin sonunda hücrelerin sayılmasıyla elde edildi. Biyobasılan doku özdeşi içerisinde çapraz bağlanmadığı için kültür süresince hidrojel yapısından ayrılan agaroz ve aljinat gibi polisakkaritlerin görüntülenmesi için oda sıcaklığında PAS (Periodic Acid-Schiff Kit, Sigma-Aldrich) boyama uygulandı. Bu kapsamda kesitleri alınan örnekler öncelikle distile su ile yıkanarak 5 dk. Periodic Acid solüsyonunda bekletildi. Örnekler daha sonra yeniden distile su ile yıkanarak 15 dk. Schiff's Reagent solüsyonunda bekletildi. 5 dk. distile suda yıkanama işleminin ardından mikroskop (Olympus CKX41) ile görüntü alındı.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Biyo Mürekkeplerin Değerlendirilmesi

3.1.1 BioLogic – multimikroekstrüzyon başlıklı biyobasım sistemi

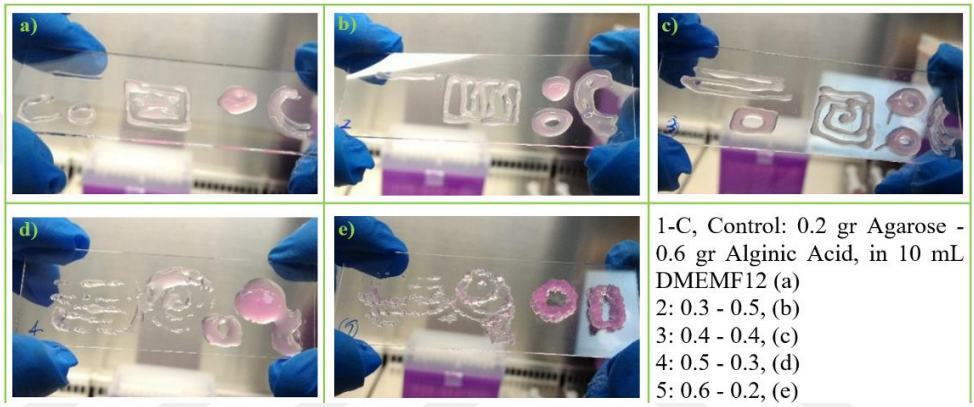
Cihazla ilgili montaj ve kalibrasyon adımları başarılı bir şekilde tamamlandı ve sistem çalışır hale getirildi (Şekil 3.1). Sonuçta 4 yazdırma başlığına kadar destekli, kompleks doku yapılarını oluşturabilen, 375x250x275 mm. çalışma uzayına sahip, yazdırma başlıkları 300 °C sıcaklığa erişebilen, 50x60x70 cm. ebatlarında, 80 kg. ağırlığında, gerçek zamanlı atmosferik ortam ölçümlerini bir arayüzde kullanıcıya bildiren, kapalı kabin, eldiven portu dahili UV sterilizasyon sistemine sahip tüm işletim sistemleri ile birlikte çalışabilen bir sistem ortaya konuldu.



Şekil 3.1. BiyoLojik ve bileşenleri, a) EMM modülü, b) EMM bileşenleri, kamera ve odaklı lazer ve c) Cihazın önden görünümü

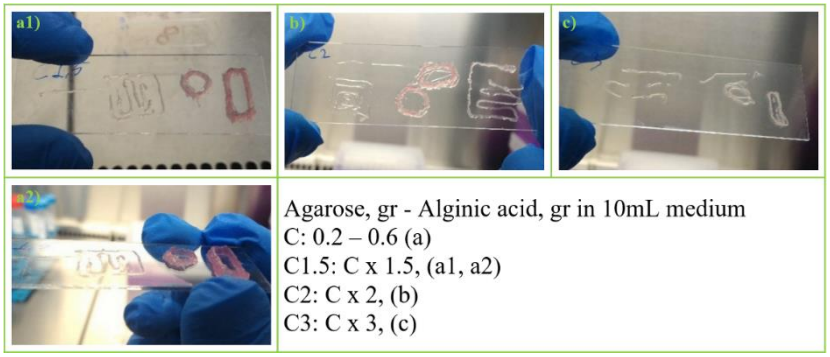
3.1.2. Hidrojel optimizasyonları ve biyobasılabilirlik skoru

Destek hidrojeli için, ilk denemelerden elde edilen sonuçlara göre sabit bir hacimdeki çözücü içerisinde artan agaroz konsantrasyonu yüksek viskozite ile birlikte daha dayanıklı yapıların oluşmasına imkân tanıdı (Şekil 3.2). Ancak yüksek viskozite hücresel faaliyetlere elverişli olmadığından ve hidrojellerde parçalanma gözlemlendiğinden biyobasım için uygun bulunmadı. Düşük konsantrasyonlardaki agaroz içeren örnekler ise oldukça düşük viskoziteye sahip oldukları için destek hidrojeli olarak kullanılması uygun bulunmadı.



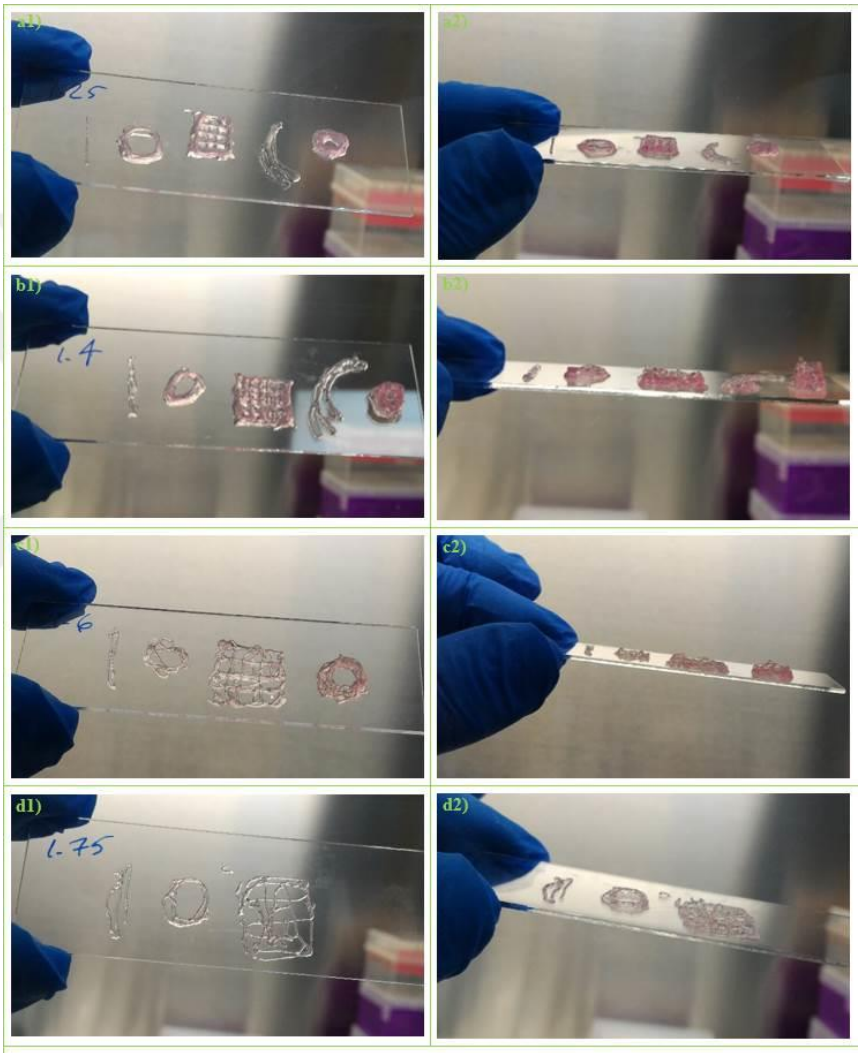
Şekil 3.2. İlk hidrojel optimizasyonundaki biyomürekkep konsantrasyonları

İlk denemelerin sonuçlarına göre uygulanan ikinci denemelerden elde edilen verilerde biyobasım esnasında hidrojel striplerarası difüzyon oluşumunu önleyebilecek uygun oranlar belirlendi (Şekil 3.3). Buna göre aynı çözücü miktarı içerisinde kontrol (C) örneğinin konsantrasyonun orantılı bir şekilde arttırılmasıyla oldukça yüksek (C3) viskozitede biyobasılabilen hidrojel biyo mürekkepler oluşturuldu. İkince denemenin sonunda C1,5 örneğinin biyobasılabilirlik açısıdan uygun olduğu görüldü.



Şekil 3.3. İkinci hidrojel optimizasyonu ve ilk deneme sonuçları

İkinci denemelerin sonuçlarına göre uygulanan C1,5 örneği temelli ve daha geniş aralıklı üçüncü denemelerden elde edilen verilerde biyobasım için ideal konsantrasyon belirlendi (C1,4). Bu seçimde, her bir örnek için, aynı çözücü içerisinde minimum çözünen polimer miktarı ile oluşturulabilecek maksimum şekil korunumu kabileyeti etkili oldu. Üçüncü denemenin sonunda C1,4 örneğinin biyobasılabilirlik açısıdan ideal olduğu görüldü (Şekil 3.4).

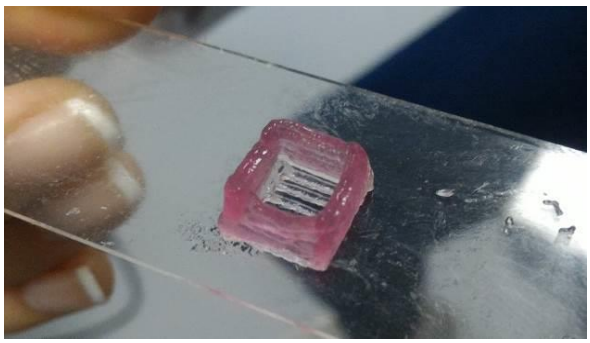


C: Control: 0.2 gr Ag - 0.6 gr Al in 10 mL DMEMF12 (a)
C1.25: C x 1.25, (a1, a2)
C1.4: C x 1.4, (b1, b2)
C1.6: C x 1.6, (c1, c2)
C1.75: C x 1.75, (d1, d2)

Şekil 3.4. Üçüncü hidrojel optimizasyonu ve ilk deneme sonuçları

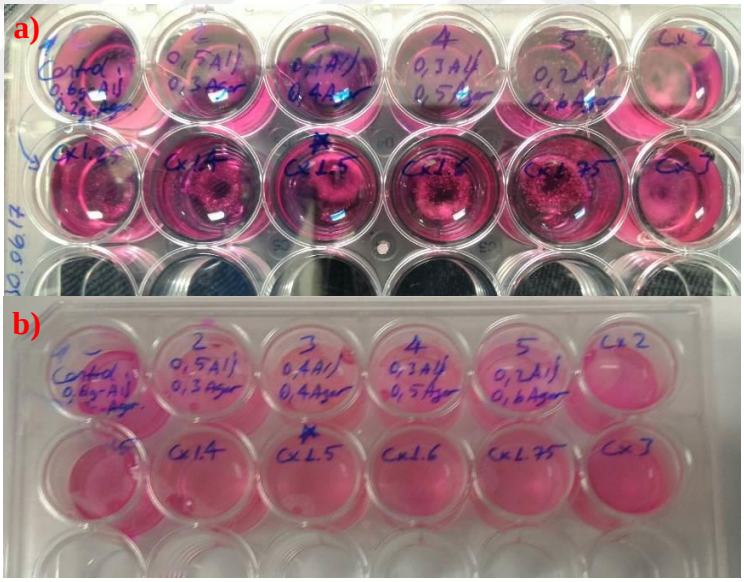
C1,4 örneği için iç doluluk oranı bulunmayan ve tek kalınlıkta bir kabuktan oluşan 1x1x0,5 cm^3 lük (en, boy, yükseklik) kalibrasyon modelinin oda sıcaklığında

biyobasımı sonucunda hidrojelin biyobasım süresince şeklini koruyabildiği gözlemlendi (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Biyo yazdırılan kalibrasyon modeli

Hidrojel örneklerleri için mevcut konsantrasyonun erozyona etkisinin incelendiği çalışma sonucunda 3 mL besiyeri içerisinde C1,4 örneğinin 72 saat sonunda ve C3 örneğinin ise 10 gün sonunda tamamen dağıldığı gözlemlendi (Şekil 3.6).

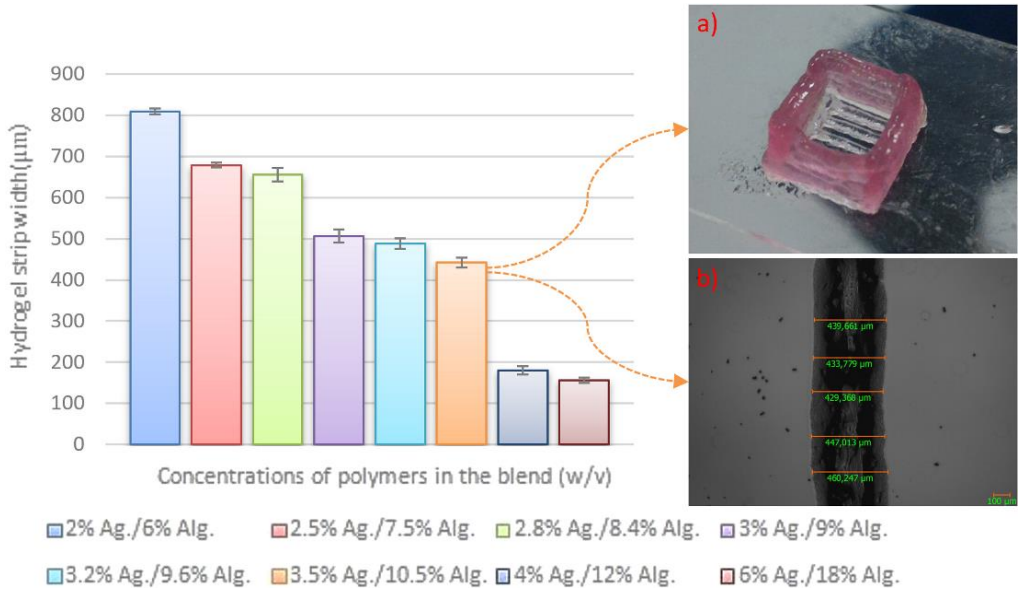


Şekil 3.6. Hidrojel örnekleri, a) 0. saat, b) 72. saat sonrası

Destek hidrojeli için gerçekleştirilen optimizasyonların sonucunda artan saturasyonun arzu edilen viskozitede ve mekanik özelliklerde hidrojel oluşmasını sağladığı belirlendi. Özellikle biyobasılabilirlik testi sonucunda %3,5 agaroz ve %10,5 aljinatın biyobasım için mevcut örnekler içerisnde uygun olduğu belirlendi (Şekil 3.7). Sonuç olarak, iğne ucu çapına en yakın hidrojel strip kalınlığı elde edilirken (442,01 µm. - 400 µm.) her bir çalışılan örneğe bir sokr belirlendi. Buna göre, 3. optimizasyonda çalışılan örneklere ait biyobasılablirlik skorları sırasıyla ve yüzdece; i) çok yüksek

difüzyondan dolayı kabul edilemez, (hirojel strip kalınlığı > 2 x iğne ucu çapı), ii) 30,24, iii) 36,05, iv) 73,4, v) 77,96, vi) 89,5 (%3,5 agaroz ve %10,5 aljinat), vii) 45,08 and viii) 39,05 olarak elde edildi.

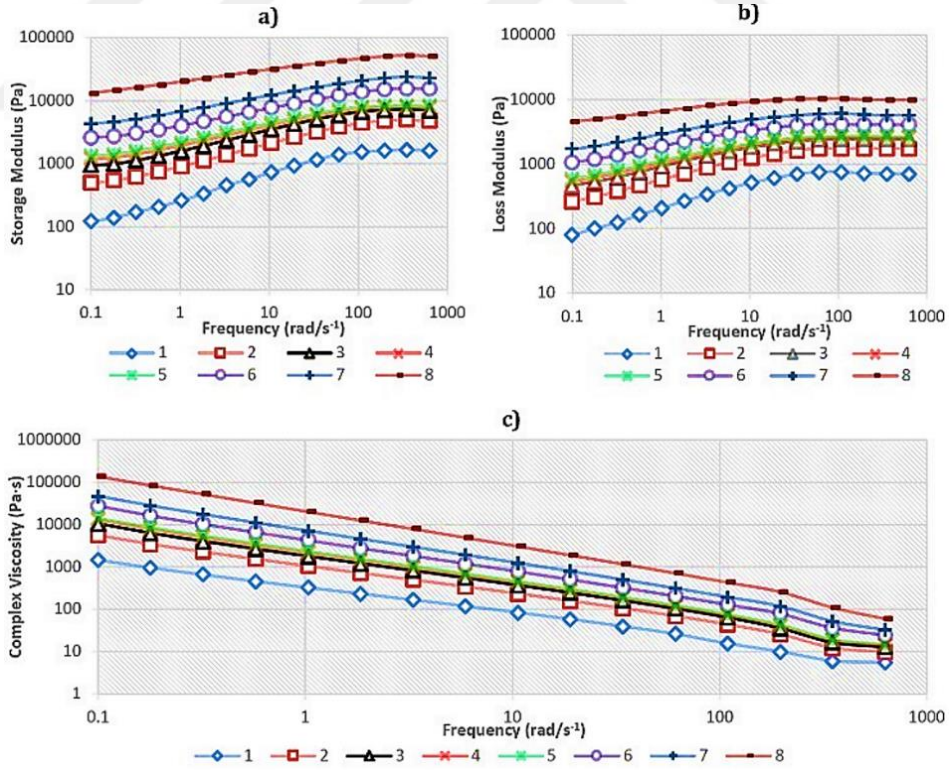
Biyobasılabilirlik skoru hidrojel temelli geliştirilen biyo mürekkeplerin mekanik işlevselliklerinin belirlenmesine katkı sağlamıştır. Genellikle tek, iki ya da üç boyutlu kalibrasyon modellerinin basılması ve ölçülmesi ile elde edilebilen skor değeri bu çalışmada daha basit bir şekilde elde edilmiş ve anlamlı bir şekilde yorumlanmıştır. Unutulmamalıdır ki basılabilirlik biyo mürekkebe bağlı olduğu kadar baskı parametrelerine de bağlıdır. Bu nedenle hedef geometrinin arzu edilen şekilde oluşturulabilmesi adına gerek kullanılan biyo yazıcı gerekse kullanılan biyo mürekkepler birlikte optimize edilmelidir. Yüksek biyobasılabilirlik skoru çalışılan hidrojel biyo mürekkep grubunda hangi örneğin daha uygun olduğunun sayısal olarak belirlenmesini kolaylaştırmıştır. Bu çalışmada elde edilen skor değerlerinde belirli bir eğilimde artış yaşanırken (30,24 – 89,5) tepe noktasından sonra ani bir düşüş meydana gelmiştir (89,5 – 39,05). Bu da mevcut kullanılan ve sabit tutulan biyobasım hızının biyo mürekkepteki konsantrasyona bağlı artışa etki etmesi ve yüksek konsantrasyonlarda hidrojel strip kalınlığının iğne ucundan çok daha ince olmasına neden olmuştur. Biyobasılabilirlik skor tayini tüm hidrojel temelli biyo mürekkeplere uygulanabilmektedir.



Şekil 3.7. Hidrojel kalınlıkları (400 µm. iğne çapı, 400 µm. katman yüksekliği, 25 mm./sn. baskı hızı). a) Biyobasılan kalibrasyon modeli (1x1x0,5 cm^3) (En, Boy, Yükseklik) ve b) Biyobasılan hidrojel strip ölçümü (4X).

3.1.3. Reolojik özellikler

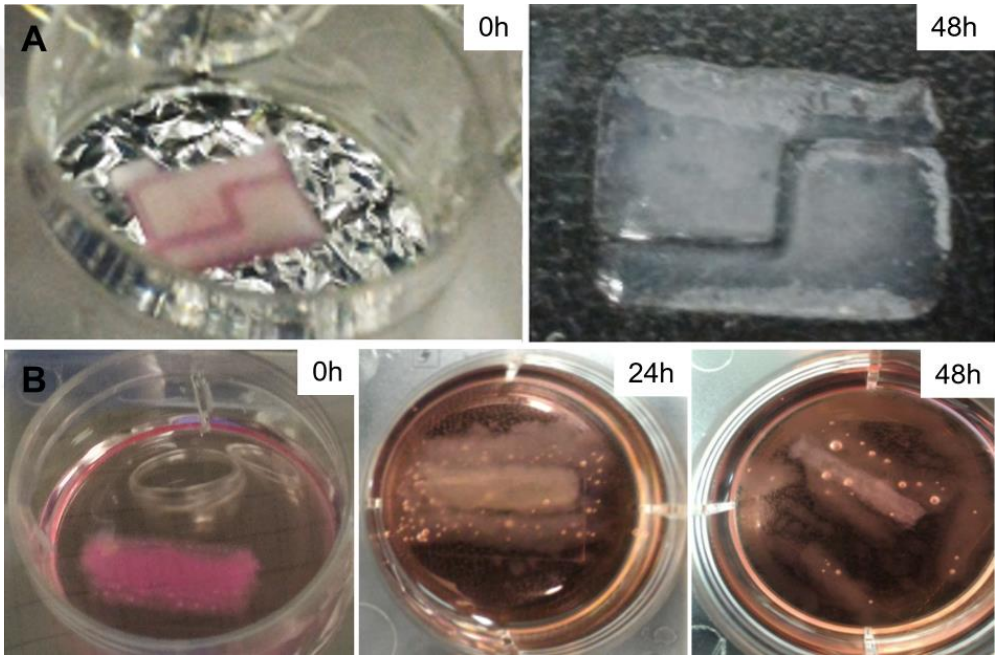
Depolama modülü (G') elastik davranış karakteristiğini ya da bir malzemenin katılık özelliğini (sol-jel geçişi) ifâde ederken kayıp modülü (G") de viskoz ya da sıvılık özelliğini temsil etmektedir. 3. optimizasyonda çalışılan destek hidrojel örnekleri için frekanstaki (ω) artışa (1-100 Hz) bağlı olarak bu iki parametrede de belirli düzeylerde artış gözlemlendi. Buna göre, G' değeri her bir örnek için: i) 0,12 – 1,61, ii) 0,49 – 4,75, iii) 0,94 – 7,05, iv) 1,2 – 7,75, v) 1,34 – 8,25, vi) 2,61 – 15,4, vii) 4,33 – 22,8 ve viii) 13,12 – 50 MPa (Şekil 3.8) olarak elde edildi. G' hidrojellerin dayanıklılığını ifade ettiğinden ölçüm sonrasında mekanik strese bağlı deformasyon rezistansında bir artış beklenmekteydi. Aynı şekilde G" değeri her bir örnek için sırasıyla: i) 0,08 – 0,2, ii) 0,26 – 1,71, iii) 0,46 – 2,45, iv) 0,53 – 2,56, v) 0,59 – 2,65, vi) 1,05 – 4,04, vii) 1,7 – 5,69 ve viii) 4,45 – 9,72 MPa (Şekil 3.2) değerlerini ω daki artışa bağlı olarak aldı. ω ya bağlı kompleks viskozitede (η*) elde edilen sonuçlara göre Power Law reolojik modeliyle ilişkili olarak kesmeyle incelen akışkan karakteristiği gözlemlendi.



Şekil 3.8. 25 °C de her bir konsantrasyonun frekansa bağlı depolama ve kayıp modülleri. a) G' değeri (G'), b) G" değeri (G"), c) Kompleks viskozite değeri (agaroz/aljinat (w/v): 1) %2 / %6, 2) %2,5 / %7,5, 3) %2,8 / %8,4, 4) %3 / %9, 5) %3,2 / %9,6, 6) %3,5 / %10,5, 7) %4 / %12 ve 8) %6 / %18).

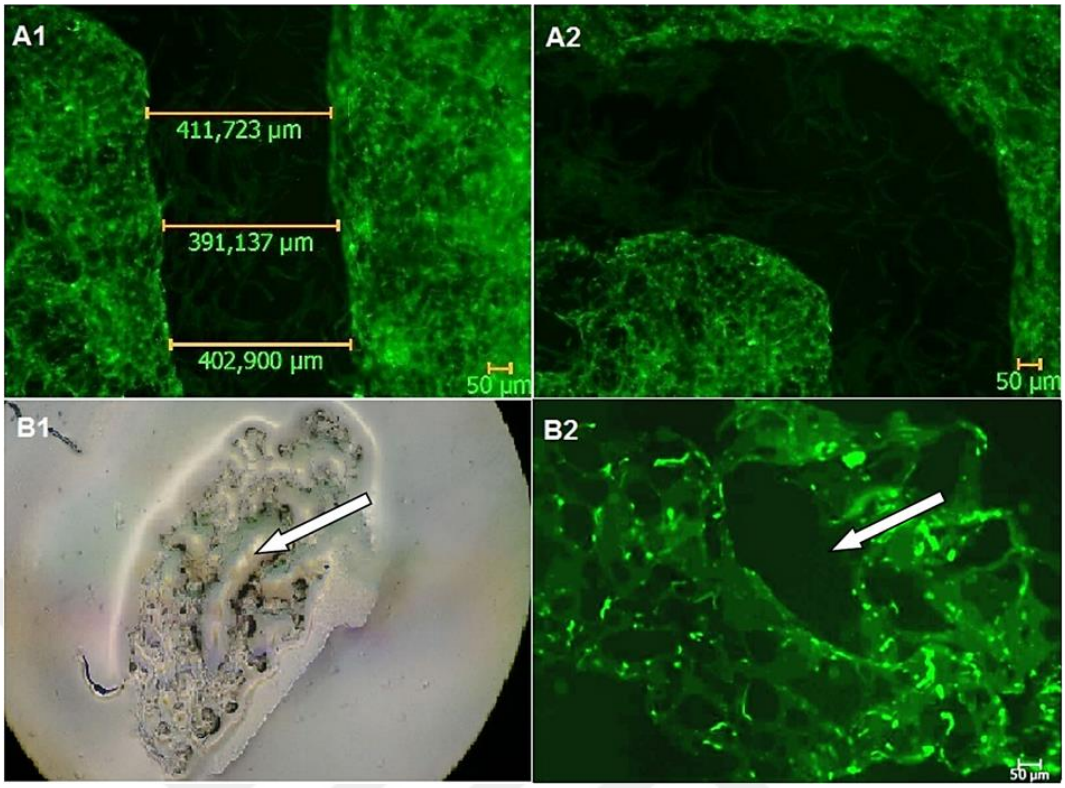
3.1.4. Şekil korunumu

Tek strip destek hidrojeli ile basılan kalibrasyon modelinde planlanan oyuk yapısı başarılı bir şekilde oluştu (Şekil 3.9). Destek hidrojeli 48 saatlik bir inkübasyon sonucunda hücre ihtiva eden hidrojelin geometrisinde bir bozulma meydana gelmeksizin dağılarak kayboldu. Hücre ihtiva eden hidrojeldeki hücrelerin dağılımları ve morfolojik yapıları da bu korunan geometriye uygun bir şekilde gelişti. Bunun yanı sıra yapılan ölçümlerde destek hidrojelinin inkübasyon ile kaybolması sonucunda oluşan boşlukların teorik olarak planlanan ölçülere çok yakın olması dikkat çekti (Şekil 3.10).



Şekil 3.9. Destek hidrojelinin erozyonuna ait görünüm, a) Biyobasılan kalibrasyon modeli (Model A) 0 ve 48 saatlik kültürde, b) Biyobasılan kalibrasyon modeli (Model C) 0, 24 ve 48 saatlik kültürde.

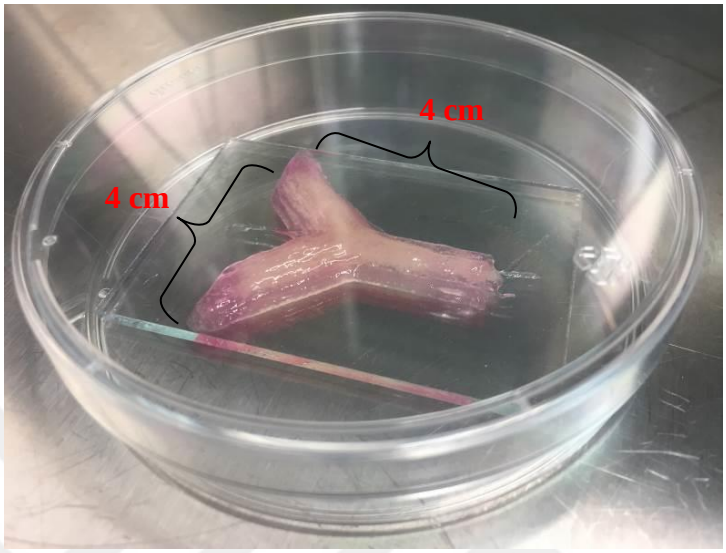
Yatay tübüler yapıdan kesit alınarak uygulanan boyama sonucunda düzgün bir lümen yapısı görüntülendi. Teorik olarak 3 mm. olarak planlanan lümen yapısının ölçümler sonucunda 2,2 mm. olduğu tespit edildi (Şekil 3.10). 14 güne varan inkübasyon sonucunda dâhi %89±1 lerin üzerinde hücre canlılıkları gözlemlendi. 2 cm. lik 3B damar doku özdeşinin biyobasımı laboratuvar koşullarında yalnızca 1 dk. 52 sn. sürdü (Kalibrasyon Modeli C). Bu süre bu ölçekteki üretim için nispeten hızlı olmakla birlikte *in vitro* koşullarda hücre yaşayabilirliğine olumlu katkı sağladı.



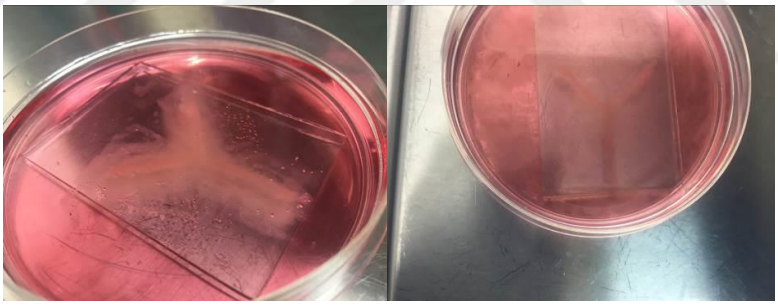
Şekil 3.10. Biyobasılan yapılarda şekil korunumu, a) FITC-falloidin ile boyanan düz ve 90° lik köşeli bir yapı (400 µm. iğne ucu, Kalibrasyon Modeli A), b) FITC-falloidin ile boyanan yapıda lümen görünümü (Kalibrasyon Modeli C)

Şekil korunumu özellikle hidrojel biyo mürekkep temelli biyobasımlarda büyük bir problemdir. Farklı biyobasım teknolojileri ya da farklı çapraz bağlama mekanizmaları şekil korunumunu daha iyi sağlayabilmek adına kullanılabilmesine rağmen hücre yaşayabilirliği bu durumdan doğrudan etkilenmektedir. Kullanılan iğne ucu türü, biyobasım koşulları, biyo mürekkebin pH değeri ya da mevcut ortamdan atılamayan toksik ürünler canlılığı etkilemektedir. Bu çalışmada optimize edilen biyo mürekkeplerde oldukça yüksek hücre canlılıkları gözlemlenmiş ve nispeten iyi bir şekilde geometri korunumu sağlanmıştır. Destek hidrojelinin, inkübasyonda belirlenen sürelerde konsantrasyona bağlı olarak dağılması ve bu dağılma esnasında hücrelerin bu hidrojele tutunamaması arzu edilen şekil korunumunun eldesinde büyük rol oynamıştır. Biyobasım esnasında destek hidrojelinde hiçbir çapraz bağlama mekanizmasının kullanılmaması yine hücre canlılığını önemli ölçüde arttırmıştır. Destek hidrojelinin inkübasyon süresince besiyerinde dağılması ile hücre ihtiva eden ana hidrojelde hiçbir kalıntı ya da yan ürün bırakmamıştır.

Sonuç olarak 4 cm. lik büyük ölçekli ve dallanmış yapıda bir insan damar doku özdeşi (Şekil 3.11) 5 dk. 23 sn. de *in vitro* koşullarda başarılı bir şekilde üretilerek %95 lik bir hücre canlılığı elde edilmiştir (Şekil 3.12).



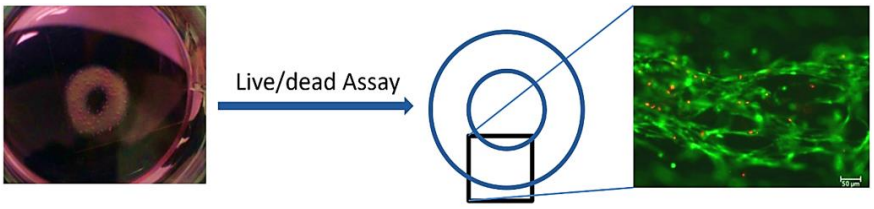
Şekil 3.11. Biyobasılan büyük ölçekli ve kompleks geometride insan damar doku özdeşi



Şekil 3.12. 24. ve 48. Saatlerde destek hidrojelinin dağılması

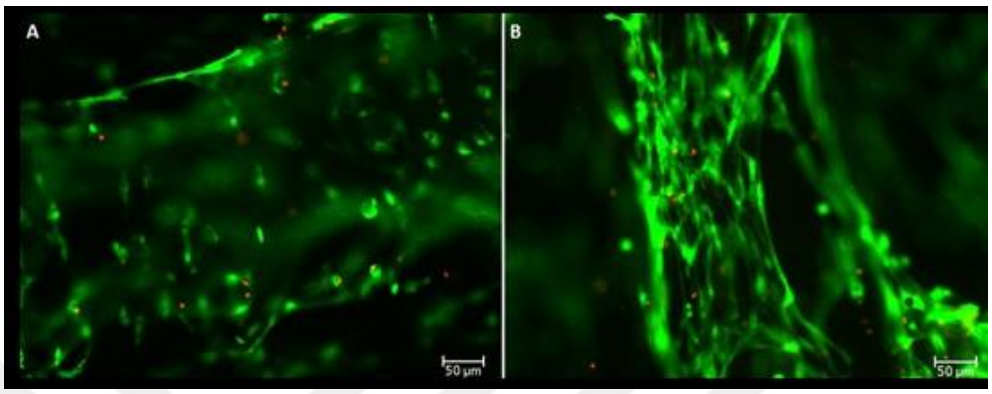
3.1.5. *In vitro* biyouyumluluk

Biyobasılan modellerden 3 günlük inkübasyon sonrasında alınan parçalar üzerinde boyama sonucu %89±1 lerin üzerinde bir canlılık gözlemlendi (Şekil 3.13) (4X, canlı: yeşil, ölü: kırmızı).

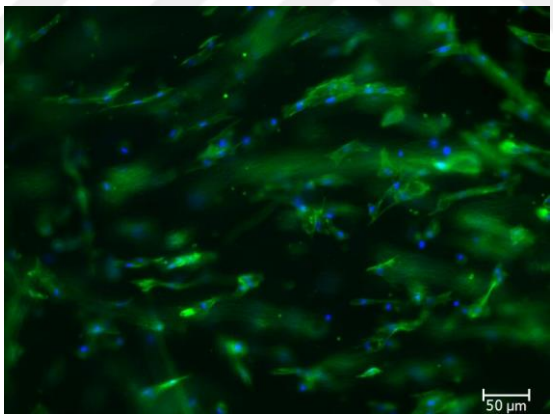


Şekil 3.13. Kalibrasyon Modeli B Canlı/Ölü boyama (4X)

Biyobasılan kalibrasyon modelinin 3 günlük inkübasyon sonunda hidrojel filamentin orta kısmındaki hücrelerin filamentin basım yönüne dik şekilde yerleştiği, filamentin yüzeyinde ise basım yönüne paralel uzandığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.14 ve Şekil 3.15).

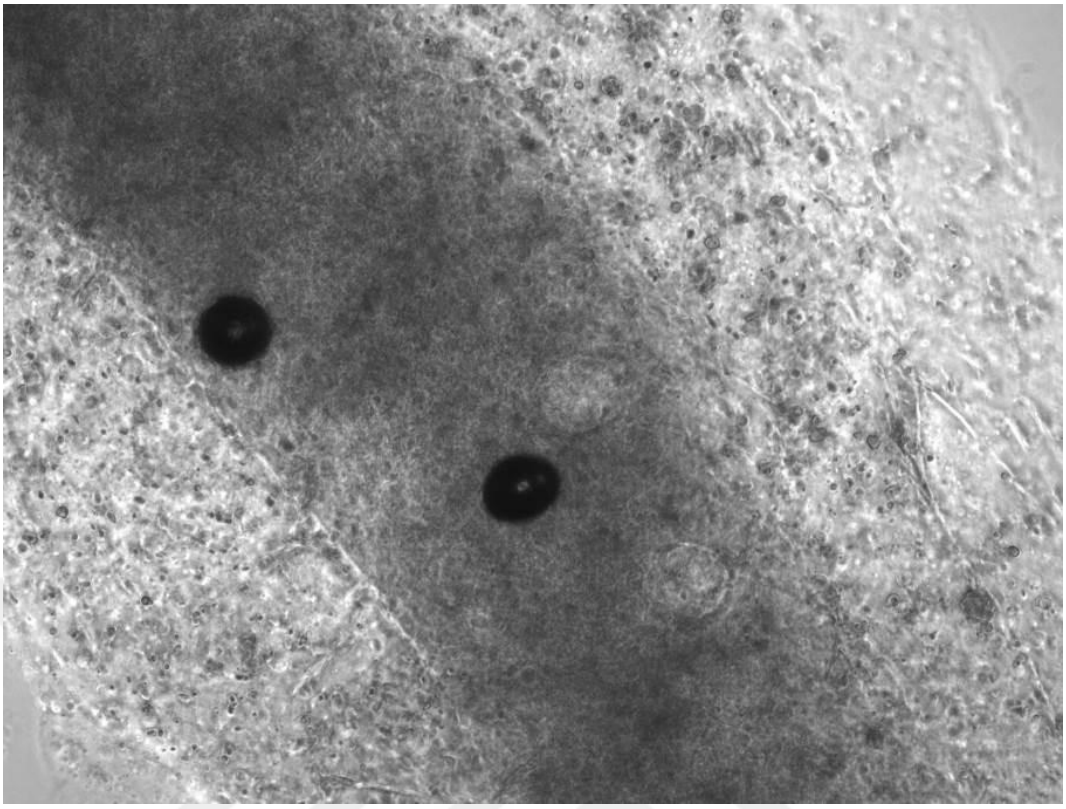


Şekil 3.14. 3 günlük inkübasyon sonunda alınan kesite ait floresan mikroskop görüntüsü (Kalibrasyon Modeli B). Canlı/Ölü boyaması, a) Hidrojel filamentin orta kısmında hücre yerleşimi, b) Hidrojel filamentin yüzeyinde hücre yerleşimi, yönelimi Yeşil – canlı, Kırmızı – ölü.

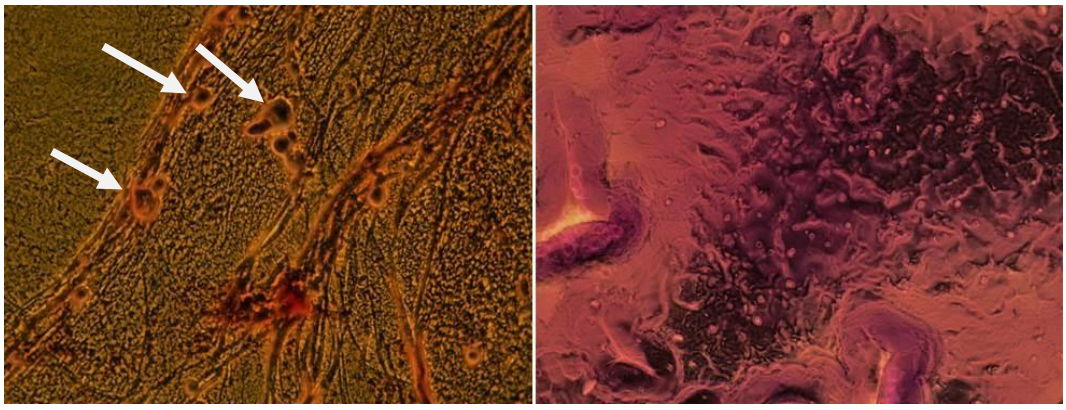


Şekil 3.15. Hidrojel filamentin orta kısmında hücre yerleşimi, yönelimi. Yeşil – aktin filamentler, Mavi – hücre çekirdeği (3 günlük inkübasyon sonunda alınan parçaya ait floresan mikroskop görüntüsü, Kalibrasyon Modeli B).

Hücre kültürünün 24. saatinden başlayarak ana hidrojelin yapısında bulunan aljinat ve agarozun çapraz bağlanmadıkları için yapıdan ayrıldığı gözlemlendi (Şekil 3.16). PAS boyama ile polisakkaritlerin yapıdan ayrıldığı kanıtlandı (Şekil 3.17).



Şekil 3.16. 24 saatlik inkübasyon sonrası biyobasılan filamentten ayrılan polisakkaritlerin filament etrafında oluşturduğu birikintinin ışık mikroskobu görüntüsü (4x).



Şekil 3.17. 24 saat sonra hücre yüklü hidrojelden ayrılan polisakkaritlerin PAS boyama sonrası ışık mikroskobu görüntüleri (Kalibrasyon Modeli B).

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Laboratuvar ortamında gerçekleştirilen biyobasım testleri sonucunda ilk olarak hücre canlılığı yüksek oranlarda korunmuştur. Biyobasım esnasında baskı hızının hedef doku geometrisi bozulmayacak şekilde arttırılması yine hücre canlılığını olumlu etkilemiştir. Bu kapsamda üretilen örneklerde biyobasım süreleri 2 cm. lik tübüler yapı için 1 dk. 52 sn. ve 4 cm. lik dallanmış tübüler yapı için ise 5 dk. 23 sn. olarak belirlenerek oldukça yüksek hızlarda biyobasım işleminin tamamlanması sağlanmıştır. Bu durum hücrelerin laboratuvar koşullarında hücre canlılığının korunmasına olumlu katkı sağlamıştır. Özellikle tipik silindirik küt iğne ucu yerine konik tipte iğne ucunun kullanılması, iğne ucundan kaynaklı kayma geriliminin azalmasını ve dolayısı ile hücre yaşayabilirliğinin önemli ölçüde arttırılmasını sağlamıştır. Biyomürekkep olarak hidrojellerin kullanılması, biyobasım öncesi/sonrası ile inkübasyon sonucunda besin ve oksijen taşınımı için ideal mikroçevre oluşmasını sağlamıştır. Doğal polimer temelli hidrojellerin kullanılması ile toksik yan etkilerin oluşması minimize edilmiştir. Biyobasım sonrasında GelMA yapısı hücreler tarafından parçalanarak bozunurken biyobozunur olmayan polisakkaritlerin ana hidrojel yapısından ayrılması yan ürün oluşumunu engellemiştir. Biyobasım sonrası tübüler yapı çeperindeki ve içindeki hücre yöneliminin birbirine dik olarak oluşması biyomimetik açıdan uygunluk sağlamıştır. Destek hidrojelinin şırınga ile birlikte falkon tüpüne konularak doğrudan belirli değerlerde santrifüj edilmesi hedef doku geometrisinin oluşturulmasında biyomürekkebin her katmanda homojen konumlandırılmasını sağlamıştır. Doğrudan GCode yazımı ile biyobasım yol planlaması, biyomürekkep kaynaklı gereksiz malzeme birikimini önleyerek çalışma alanı içerisinde istenilen yolun (isteğe bağlı en kısa yol) izlenilmesini ayrıca belirlenen açısal yaklaşımlarla biyomürekkep birikiminin gerçekleşmesini ve dolayısı ile hücre yöneliminin kontrolünü sağlamıştır.

Biyobasım teknolojileri her geçen gün gelişmektedir. Gelişen teknoloji ile daha fazla miktarda ve daha hassas biyo mürekkep konumlandırılabilmesi mümkün olurken biyo yazdırılan yapıda taklit edilen mikromimarinin detayları da artmakta ve daha işlevsel doku özdeşlerinin geliştirilmesi mümkün olmaktadır. Bu nedenle biyobasım alanında

üretilmesi planlanan hedef dokulara özgü kullanılabilen evrensel biyo mürekkeplerin geliştirilmesi ve üretim aşamalarının standardizasyonu sonrası geç kalınan klinik uygulamara geçişin özellikle ülkemizde hızlandırılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

Ahn S., Lee H., Bonassar L. J., Kim G., Cells (MC3T3-E1)-Laden Alginate Scaffolds Fabricated by a Modified Solid-Freeform Fabrication Process Supplemented with an Aerosol Spraying, *Biomacromolecules*, 2012, **13**(9), 2997-3003.

Akpek A., Triküspit Kalp Kapakçıklarının Üç Boyutlu (3B) Biyobaskı Metotları ile Fabrikasyonu, *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2018, **22**(2), 740-745.

Aydin L., Kucuk S., A Method for More Accurate FEA Results on a Medical Device Developed by 3D Technologies, *Polymers for Advanced Technologies*, 2018, **29**(8), 2281-2286.

Aydin L., Kucuk S., Kenar H., A Universal Self-Eroding Sacrificial BioInk That Enables Bioprinting At Room Temperature, *Polymers for Advanced Technologies*, 2020, DOI:10.1002/pat.4892.

Aydin L., Kucuk S., Kenar H., Design and Construction of a 3D Bioprinter for Bioprinting of Tissues and Organs, *Proceedings on the Tıp Tekno (TIPTEKNO15)*, Mugla, Turkey, 15-18 October, 2015.

Aydın L., Küçük S., Kenar H., Design and Construction of a Compact Micro-Extrusion System for Bio-Printing Applications, *BioEng'16 IV. International Bioengineering Conference*, Istanbul, Turkey, 13-14 October, 2016.

Aydın L., Küçük S., Üç Boyutlu Yazıcı ve Tarayıcı ile Hastaya Özel Medikal Ortez Tasarımı ve Geliştirilmesi, *Politeknik Dergisi*, 2017, **20**(1), 1-8.

Aydın L., Üç Boyutlu Yazıcıyla Ayak Bileği Ortezinin Tasarımı ve Geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, 2014, 372714.

Aydogdu M. O., Mutlu B., Kurt M., Inan A. T., Kuruca S. E., Erdemir G., Sahin Y. M., Ekren N., Oktar F. N., Gunduz O., Developments of 3D Polycaprolactone/Beta-Tricalcium Phosphate/Collagen Scaffolds for Hard Tissue Engineering, *Journal of the Australian Ceramic Society*, 2019, **55**(3), 849–855.

Bártolo P. J., Materials, Processes and Applications. Jorge P., *Stereolithography*, 1st ed., Springer Science & Business Media, New York, USA, 1-36.

Berillis P., The Role of Collagen in the Aorta's Structure, *Open Circulation and Vascular Journal*, 2013, **6**, 1-8.

Bertassoni L. E., Cardoso J. C., Manoharan V., Cristino A. L., Bhise N. S., Araujo W. A., Zorlutuna P., Vrana N. E., Ghaemmaghami A. M., Dokmeci M. R., Khademhosseini, A. Direct-Write Bioprinting of Cell-Laden Methacrylated Gelatin Hydrogels, *Biofabrication*, **6**(2), 024105.

Billiet T., Gevaert E., Schryver T. D., Cornelissen M., Dubruel P., The 3D Printing of Gelatin Methacrylamide Cell-Laden Tissue-Engineered Constructs with High Cell Viability, *Biomaterials*, 2014, **35**(1), 49-62.

Blaeser A., Campos D. F. D., Puster U., Richtering W., Stevens M. M., Fischer H., Controlling Shear Stress in 3D Bioprinting is a Key Factor to Balance Printing Resolution and Stem Cell Integrity, *Advanced Healthcare Materials*, 2016, **5**(3), 326-333.

Bracci R., Maccaroni E., Cascinu S., Bioresorbable Airway Splint Created with a Three-Dimensional Printer, *New England Journal of Medicine*, 2013, **368**(21), 2043-2045.

Carrow J. K., Kerativitayanan P., Jaiswal M. K., Lokhande G., Gaharwar A. K., Essentials of 3D Biofabrication and Translation, Atala A., Yoo J. J., *Polymers for Bioprinting. Essentials of 3D Biofabrication and Translation*, 1st ed., Academic Press, Wyman Street, Waltham, MA, USA, 229-248, 2015.

Chantarapanich N., Laohaprapanon A., Wisutmethangoon S., Jiamwatthanachai P., Chalermkarnnon P., Sucharitpwatskul S., Chalermkarnnon P., Sucharitpwatskul S., Puttawibul P., Sitthiseripratip K., Fabrication of Three-Dimensional Honeycomb Structure for Aeronautical Applications Using Selective Laser Melting: a Preliminary Investigation, *Rapid Prototyping Journal*, 2014, **20**(6), 551-558.

Choi J. W., Kim N., Clinical Application of Three-Dimensional Printing Technology in Craniofacial Plastic Surgery, *Archives of Plastic Surgery-APS*, 2015, **42**(3), 267-277.

Chunze Y., Yusheng S., Jinsong Y., Jinhui L., A Nanosilica/Nylon-12 Composite Powder for Selective Laser Sintering, *Journal of Reinforced Plastics and Composites*, 2009, **28**(23), 2889-2902.

Compaan A. M., Christensen K., Huang Y., Inkjet Bioprinting of 3D Silk Fibroin Cellular Constructs Using Sacrificial Alginate, *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2017, **3**(8), 1519-1526.

Cubo N., Garcia M., del Cañizo J. F., Velasco D., Jorcano J. L., 3D Bioprinting of Functional Human Skin: Production and In Vivo Analysis, *Biofabrication*, 2016, **9**(1), 015006.

Cui X., Breitenkamp K., Finn M. G., Lotz M., D'Lima D. D., Direct Human Cartilage Repair Using Three-Dimensional Bioprinting Technology, *Tissue Engineering Part A*, 2012, **18**(11-12), 1304-1312.

Daly A. C., Cunniffe G. M., Sathy B. N., Jeon O., Alsberg E., Kelly D. J., 3D Bioprinting of Developmentally Inspired Templates for Whole Bone Organ Engineering, *Advanced Healthcare Materials*, 2016, **5**(18) 2353-2362.

Deckard C. R., Beaman J. J., Darrah J. F., Method for selective laser sintering with layerwise cross-scanning, 1992, U.S. Patent, No: 5,155,324. *Washington*, DC: *U.S. Patent and Trademark Office*.

Detsch R., Blob S., Zehnder T., Boccaccini, A. R., Evaluation of Cell Inkjet Printing Technique for Biofabrication, *BioNanoMaterials*, 2016, **17**(3-4), 185-191.

Detsch R., Sarker B., Zehnder T., Frank G., Boccaccini A. R., Advanced Alginate-Based Hydrogels, *Materials Today*, 2015, **18**(10), 590-591.

Duan B., Hockaday L. A., Kang K. H., Butcher J. T., 3D Bioprinting of Heterogeneous Aortic Valve Conduits with Alginate/Gelatin Hydrogels, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2013, **101**(5),1255-1264.

Dubbin K., Hori Y., Lewis K. K., Heilshorn S. C., Dual-Stage Crosslinking of a Gel-Phase Bioink Improves Cell Viability and Homogeneity for 3D Bioprinting, *Advanced Healthcare Materials*, 2016, **5**(19), 2488-2492.

Edgar J., Tint S., Additive Manufacturing Technologies: 3D Printing, Rapid Prototyping, and Direct Digital Manufacturing, *Johnson Matthey Technology Review*, 2015, **59**(3), 193-198.

Ersumo N. T., Spiller K. L., Effects of Hydrogel Properties and Extrusion Parameters on 3D Bioprinting, *41st Annual Northeast Biomedical Engineering Conference (NEBEC)*, Troy, NY, USA, 17-19 April, 2015.

Fan R., Piou M., Darling E., Cormier D., Sun J., Wan J., Bio-Printing Cell-Laden Matrigel–Agarose Constructs, *Journal of Biomaterials Applications*, 2016, **31**(5), 684-692.

flow. *30th Technical Conference of the American-Society-for-Composites*, East Lansing, MI, USA, 28-30 September, 2015.

Gopinathan J., Noh I., Recent Trends in Bioinks for 3D Printing, *Biomaterials Research*, 2018, **22**, 11.

Hafezi F., Kucukgul C., Ozler S. B., Koc B., Bioprinting: Application of Additive Manufacturing in Medicine, Bandyopadhyay Amit., Bose S., *Additive Manufacturing*, 1st ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 197-214, 2015.Heller B., Smith D., Jack D., The effects of extrudate swell, nozzle shape, and the nozzle convergence zone on fiber orientation in fused deposition modeling nozzle Ho C. M. B., Ng S. H., Yoon, Y.-J., A Review on 3D Printed Bioimplants, *International Journal of Precision Engineering and Manufacturing*, 2015, **16**(5), 1035-1046.

Hoch E., Hirth T., Tovar G. E. M., Borchers K., Chemical Tailoring of Gelatin to Adjust Its Chemical and Physical Properties for Functional Bioprinting, *Journal of Materials Chemistry B*, 2013, **1**(41), 5675-5685.

Hoch E., Tovar G. E. M., Borchers K., Bioprinting of Artificial Blood Vessels: Current Approaches Towards a Demanding Goal, *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 2014, **46**(5), 767-778.

Hölzl K., Lin S., Tytgat L., Vlierberghe S. V., Gu L., Ovsianikov A., Bioink Properties Before, During and After 3D Bioprinting, *Biofabrication*, 2016, **8**(3), 032002.

Hornick J., 3D Printing in Healthcare, *Journal of 3D Printing in Medicine*, 2016, **1**(1), 13-17.

Hospodiuk M., Dey M., Sosnoski D., Ozbolat I. T., The Bioink: A Comprehensive Review on Bioprintable Materials, *Biotechnology Advances*, 2017, **35**(2), 217-239.

Huang S. H., Liu P., Mokasdar A., Hou L., Additive Manufacturing and its Societal Impact: A Literature Review, *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, 2013, **67**(5-8), 1191-1203.

Hull C. W., Spence S. T., Albert D. J., Smalley D. R., Harlow R. A., Stinebaugh P., Tarnoff H. L., Nguyen H. D., Lewis C.W., Vorgitch T. J., Remba D. Z., Method and Apparatus for Production of High Resolution Three-Dimensional Objects by Stereolithography, 1994, U.S. Patent, No: 5,345,391, *Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office*.

Hutmacher W., Scaffolds in Tissue Engineering Bone and Cartilage, *Biomaterials*, 2000, **21**(24), 2529-2543.

Iancu C., Iancu D., Stăncioiu A., From Cad Model To 3d Print Via "STL" File Format. *Fiability & Durability*, 2010, **1**(1), 73-80.

Ilardo R., Williams C., Design and Manufacture of a Formula SAE Intake System Using Fused Deposition Modeling and Fiber-Reinforced Composite Materials, *Rapid Prototyping Journal*, 2010, **16**(3), 174-179.

İlhan G. T., Mikrodalga Desteği İle Metakrilatlanmış Kappa Carrageenan Hidrojellerin 3B Baskılanması Ve Kıkırdak Doku Mühendisliğinde Kullanımının Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2019, 590330.

Jia J., Richards D. J., Pollard S., Tan Y., Rodriguez J., Visconti R. P., Trusk T. C., Yost M. J., Yao H., Markwald R. R., Mei Y., Engineering Alginate as Bioink for Bioprinting, *Acta Biomaterialia*, 2014, **10**(10), 4323-4331.

Johnson C., Sheshadri P., Ketchum J. M., Narayanan L. K., Weinberger P. M., Shirwaiker R. A., In Vitro Characterization of Design and Compressive Properties of

3D-Biofabricated/Decellularized Hybrid Grafts for Tracheal Tissue Engineering, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2016, **59**, 572-585.

Kalita S., Bose S., Hosick H., Bandyopadhyay A., Development of Controlled Porosity Polymer-Ceramic Composite Scaffolds via Fused Deposition Modeling, *Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems*, 2003, **23**(5), 611-620.

Kang H.-W., Lee S. J., Ko I. K., Kengla C., Yoo J. J., Atala A., A 3D Bioprinting System to Produce Human-Scale Tissue Constructs with Structural Integrity, *Nature Biotechnology*, 2016 **34**(3), 312-319.

Kang S., Kim K.-H., Kim, Y.-C., A Novel Electroporation System for Efficient Molecular Delivery into Chlamydomonas Reinhardtii with a 3-Dimensional Microelectrode, *Scientific Reports*, 2015, **5**, 15835.

Kesti M., Müller M., Becher J., Schnabelrauch M., D'Este M., Eglin D., Zenobi-Wong M., A Versatile Bioink for Three-Dimensional Printing of Cellular Scaffolds Based on Thermally and Photo-Triggered Tandem Gelation, *Acta Biomaterialia*, 2015, **11**, 162-172.

Khaled S. A., Burley J. C., Alexander M. R., Yang J., Roberts C. J., 3D Printing of Five-In-One Dose Combination Polypill with Defined Immediate and Sustained Release Profiles, *Journal of Controlled Release*, 2015, **217**, 308-314.

Khaled S. A., Burley J. C., Alexander M. R., Yang J., Roberts C. J., 3D Printing of Tablets Containing Multiple Drugs with Defined Release Profiles", *International Journal of Pharmaceutics*, 2015, **494**(2), 643-650.

Khan M., Dickens P., Selective Laser Melting (SLM) of Pure Gold for Manufacturing Dental Crowns, *Rapid Prototyping Journal*, 2014, **20**(6), 471-479.

Kim Y., Yoon C., Ham S., Park J., Kim S., Kwon O., Tsai, P. J., Emissions of Nanoparticles and Gaseous Material from 3D Printer Operation, *Environmental Science & Technology*, 2015, **49**(20), 12044-12053.

Kochesfahani S. H., Improving PLA-based Material for FDM 3D-Printers Using Minerals *SPE ANTEC*, Indianapolis, USA, 23-25 May, 2016.

Kreimendahl F., Köpf M., Thiebes A. L., Campos D. F. D., Blaeser A., Schmitz-Rode T., Apel C., Jockenhoevel S., Fischer H., Three-Dimensional Printing and Angiogenesis: Tailored Agarose-Type I Collagen Blends Comprise Three-Dimensional Printability and Angiogenesis Potential for Tissue-Engineered Substitutes, *Tissue Engineering Part C-Methods*, 2017, **23**(10), 604-615.

Kruth J. P., Wang X., Laoui T., Froyen L., Lasers and Materials in Selective Laser Sintering, *Assembly Automation*, 2003, **23**(4), 357-371.

Kryou C., Leva V., Chatzipetrou M., Zergioti I., Bioprinting for Liver Transplantation. *Bioengineering*, 2019, **6**(4), 95.

Kucukgul C., Ozler B., Karakas HE., Gozuacik D., Koc B., 3D Hybrid Bioprinting of Macrovascular Structures. *3rd ECCOMAS Thematic Conference on Tissue Engineering (ICTE)*, Leiria, Portugal, 6-8 June, 2013.

Kuo C., Ma P. X., Maintaining Dimensions and Mechanical Properties of Ionically Crosslinked Alginate Hydrogel Scaffolds In Vitro, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2008, **84A**(4), 899-907.

Lee J. M., Yeong W. Y., Design and Printing Strategies in 3D Bioprinting of Cell-Hydrogels: A Review, *Advanced Healthcare Materials*, 2016, **5**(22), 2856-2865.

Lee J. M., Yeong W. Y., Design and Printing Strategies in 3D Bioprinting of Cell-Hydrogels: A Review, *Advanced Healthcare Materials*, 2016, **5**(22), 2856-2865.

Lee J.-B., Ahn M.-K., Koh Y.-H., Lee H., Kim H.-E., Ti Scaffolds with Tailored Porosities and Mechanical Properties Using Porous Polymer Templates", *Materials & Design*, 2016, **101**, 323-331.

Lee V., Singh G., Trasatti J. P., Bjornsson C., Xu X., Tran T. N., Yoo S.-S., Dai G., Karande P., Design and Fabrication of Human Skin by Three-Dimensional Bioprinting, *Tissue Engineering Part C-Methods*, 2013, **20**(6), 473-484.

Leroux M. A., Guilak F., Setton L. A., Compressive and Shear Properties of Alginate Gel: Effects of Sodium Ions and Alginate Concentration, *Journal of Biomedical Materials Research*, 1999, **47**(1), 46-53.

Li M., Tian X., Schreyer D. J., Chen X., Effect of Needle Geometry on Flow Rate and Cell Damage in the Dispensing-based Biofabrication Process, *Biotechnology Progress*, 2011, **27**(6), 1777-1784.

Liang, H.-C., Chang W.-H., Liang H.-F., Lee M.-H., Sung H.-W., Crosslinking Structures of Gelatin Hydrogels Srosslinked with Genipin or a Water-Soluble Carbodiimide, *Journal of Applied Polymer Science*, 2004, **91**(6), 4017-4026.

Liberski A. R., Three-Dimensional Printing of Alginate: From Seaweeds to Heart Valve Scaffolds, *QScience Connect*, 2016, **3**(2), 1-25.

Lin K.-F., He S., Song Y., Wang C.-M., Gao Y., Li J.-Q., Tang P., Wang Z., Bi L., Pei G.-X., Low-Temperature Additive Manufacturing of Biomimic Three-Dimensional Hydroxyapatite/Collagen Scaffolds for Bone Regeneration, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2016, **8**(11), 6905-6916.

Livoti C. M., Morgan J. R., Self-Assembly and Tissue Fusion of Toroid-Shaped Minimal Building Units, *Tissue Engineering Part A*, 2010, **16**(6), 2051-2061.

Lu Y., Chen S. C. Micro and Nano-Fabrication of Biodegradable Polymers for Drug Delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2004, **56**(11), 1621-1633.

Marga F., Jakab K., Khatiwala C., Shepherd B., Dorfman S., Hubbard B., Colbert S., Forgacs G., Toward Engineering Functional Organ Modules by Additive Manufacturing, *Biofabrication*, 2012, **4**(2), 022001.

Markstedt K., Mantas A., Tournier I., Ávila H. M., Hägg D., Gatenholm, P., 3D Bioprinting Human Chondrocytes with Nanocellulose–Alginate Bioink for Cartilage Tissue Engineering Applications, *Biomacromolecules*, 2015, **16**(5), 1489-1496.

Markstedt K., Mantas A., Tournier I., Ávila H. M., Hagg D., Gatenholm P., 3D Bioprinting Human Chondrocytes with Nanocellulose–Alginate Bioink for Cartilage Tissue Engineering Applications, *Biomacromolecules*, 2015, **16**(5), 1489-1496.

Mironov V., Prestwich G., Forgacs G., Bioprinting Living Structures, *Journal of Materials Chemistry*, 2007, **17**(20), 2054-2060.

Murphy S. V., Atala A., 3D Bioprinting of Tissues and Organs, *Nature Biotechnology*, 2014, **32**(8), 773-785.

Murphy S. V., Skardal A., Atala A., Evaluation of Hydrogels for Bio-Printing Applications, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2013, **101**(1), 272-284.

Ng H. Y., Lee K.-X. A., Kuo C.-N., Shen Y.-F., Bioprinting of Artificial Blood Vessels, *International Journal of Bioprinting*, 2018, **4**(2), UNSP 140.

Ouyang L., Highley C. B., Rodell C. B., Sun W., Burdick J. A., 3D Printing of Shear-Thinning Hyaluronic Acid Hydrogels with Secondary Cross-Linking, *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2016, **2**(10), 1743-1751.

Ozbolat I. T., Yu Y., Bioprinting Toward Organ Fabrication: Challenges and Future Trends, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 2013, **60**(3), 691-699.

Park S. H., Yang D. Y., Lee K. S., Two-Photon Stereolithography for Realizing Ultraprecise Three-Dimensional Nano/Microdevices, *Laser & Photonics Reviews*, 2009, **3**(1-2), 1-11.

Passamai V. E., Dernowsek J. A., Nogueira J., Lara V., Vilalba F., Mironov V. A., Rezende R. A., da Silva, J. V., From 3D Bioprinters to a Fully Integrated Organ Biofabrication Line, *20th Argentinean-Bioengineering-Society Congress (SABI)*, San Nicolas de los Arroyos, Argentina, 28-30 October, 2015.

Peker A., Aydin L., Kucuk S., Ozkoc G., Cetinarslan B., Canturk Z., Selek A., Additive Manufacturing and Biomechanical Validation of a Patient-Specific Diabetic Insole, *Polymers for Advanced Technologies*, 2020, DOI: 10.1002/pat.4832.

Petreaca M., Martins-Green M., The Dynamics of Cell-ECM Interactions with Implications for Tissue Engineering. Lanza R., Langer R., Vacanti J., *Principles of Tissue Engineering*, 4th ed., Landes Company, Austin, TX, USA, 23-46, 1997.

Radenkovic D., Solouk A., Seifalian A., Personalized Development of Human Organs Using 3D Printing Technology, *Medical Hypotheses*, 2016, **87**, 30-33.

Rengier F., Mehndiratta A., Von Tengg-Kobligk H., Zechmann C. M., Unterhinninghofen R., Kauczor H. U., Giesel F. L., 3D Printing Based on Imaging Data: Review of Medical Applications, *International Journal of Computer Assisted Radiology and Surgery*, 2010, **5**(4), 335-341.

Rimann M., Laternser S., Keller H., Leupin O., Graf-Hausner, U., 3D Bioprinted Muscle and Tendon Tissues for Drug Development, *Chimia*, 2015, **69**(1/2), 65-67.

Robbins J. B., Gorgen V., Min P., Shepherd B. R., Presnell S. C., A Novel In Vitro Three-Dimensional Bioprinted Liver Tissue System for Drug Development, *Joint Annual Meeting of the ASPET/BPS at Experimental Biology (EB)*, Boston, MA, USA, 20-24 April, 2013.

Rutz A. L., Hyland K. E., Jakus A. E., Burghardt W. R., Shah R. N., A Multimaterial Bioink Method for 3D Printing Tunable, Cell-Compatible Hydrogels, *Advanced Materials*, 2015, **27**(1), 1607-1614.

Rutz A. L., Hyland K. E., Jakus A. E., Burghardt W. R., Shah, R. N., A Multimaterial Bioink Method for 3D Printing Tunable, Cell-Compatible Hydrogels, *Advanced Materials*, 2015, **27**(9), 1607-1614.

Sell S. A., Wolfe P. S., Garg K., McCool J. M., Rodriguez I. A., Bowlin G. L., The Use of Natural Polymers in Tissue Engineering: A Focus on Electrospun Extracellular Matrix Analogues, *Polymers*, 2010, **2**(4), 522-553.

Shembekar A. V., Yoon Y. J., Kanyuck A., Gupta S. K., Trajectory Planning For Conformal 3d Printing Using Non-Planar Layers, *ASME International Design Engineering Technical Conferences (IDETC)*, Quebec City, Canada, 26-29 August, 2018.

Shi W., He R., Liu Y., 3D Printing Scaffolds with Hydrogel Materials for Biomedical Applications, *European Journal of Medical Research*, 2015, **1**(3), 3-8.

Shim J.-H., Lee J.-S., Kim J. Y., Cho D.-W., Bioprinting of a Mechanically Enhanced Three-Dimensional Dual Cell-Laden Construct for Osteochondral Tissue Engineering Using a Multi-Head Tissue/Organ Building System, *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 2012, **22**(8), 085014.

Shofner M. L., Lozano K., Rodríguez-Macías F. J., Barrera E. V., Nanofiber-Reinforced Polymers Prepared by Fused Deposition Modelling, *Journal of Applied Polymer Science*, 2003, **89**(11), 3081-3090.

Stegemann J. P., Kaszuba S. N., Rowe S. L., Review: Advances in Vascular Tissue Engineering Using Protein-based Biomaterials, *Tissue Engineering*, 2007, **13**(11), 2601-2613.

Subramanian K., Vail N., Barlow J., Marcus H., Selective Laser Sintering of Alumina with Polymer Binders, *Rapid Prototyping Journal*, 1995, **1**(2), 24-35.

Tumbleston J. R., Shirvanyants D., Ermoshkin N., Janusziewicz R., Johnson A. R., Kelly D., Chen K., Pinschmidt R., Rolland J. P., Ermoshkin A., Samulski E. T., DeSimone J. M., Continuous Liquid Interface Production of 3D Objects, *Science*, 2015, **347**(6228), 1349-1352.

URL-1: www.iso.org/standard/69669.html (Ziyaret tarihi: 3 Eylül 2019).

URL-2: www.patents.google.com/patent/US4575330A/en (Ziyaret tarihi: 3 Eylül 2019).

URL-3: www.grandviewresearch.com/press-release/global-3d-bioprinting-market (Ziyaret tarihi: 3 Eylül 2019).

URL-4: www.fb06.fh-muenchen.de/fb/images/img_upld/arbeiten/02976.pdf (Ziyaret tarihi: 3 Eylül 2019).

URL-5: www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542711/ (Ziyaret tarihi: 3 Eylül 2019).

Van Noort R., The Future of Dental Devices is Digital, *Dental Materials*, 2012, **28**(1), 3-12.

Vuola A., Heikkila R., Prusi T., Remes M., Rokka P., Siltala N., Tuokko R., Miniaturization of flexible screwing cell. *5th International Precision Assembly Seminar (IPAS 2010)*. Chamonix, France, 14-17 February, 2010.

Weikert S., Ratnaweera R., Zirn O., Wegener K., Modeling and Measurement of H-Bot Kinematic Systems, *26th Annual Meeting of the American Society for Precision Engineering (ASPE 2011)*, Denver, USA, 13-18 November, 2011.

Whitford W. G., Hoying J. B., A Bioink by Any Other Name: Terms, Concepts and Constructions Related to 3D Bioprinting, *Future Science OA*, 2016, **2**(3), UNSP FSO133.

Wilkes J., Hagedorn Y. C., Meiners W., Wissenbach K., Additive Manufacturing of ZrO_2-Al_2O_3 Ceramic Components by Selective Laser Melting, *Rapid Prototyping Journal*, 2013, **19**(1), 51-57.

Xie R., Li D., Chao S., An Inexpensive Stereolithography Technology with High Power UV-LED Light, *Rapid Prototyping Journal*, 2011, **17**(6), 441-450.

Zhang Q., Nguyen P. D., Shi S., Burrell J. C., Cullen D. K., Le A.D., 3D Bio-Printed Scaffold-Free Nerve Constructs with Human Gingiva-Derived Mesenchymal Stem Cells Promote Rat Facial Nerve Regeneration, *Scientific Reports*, 2018, **8**, 6634.

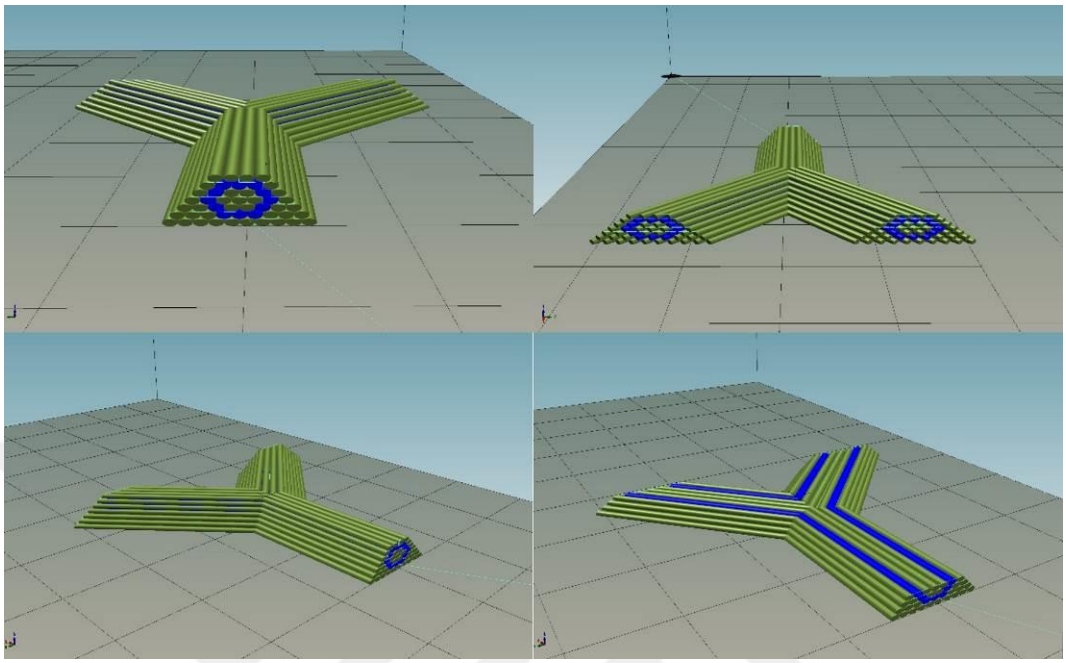
Zhang W. J., Liu W., Cui L., Tissue Engineering of Blood Vessel, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2007, **11**(5) 945-957.

Zhang X. C., *Science and Principles of Biodegradable and Bioresorbable Medical Polymers: Materials and Properties*, 1st ed., Woodhead Publishing, Cambridge, England.

EKLER

EK-A

Hedef doku yapısına ait yörünge planlaması:



```
G21 ; set units to millimeters
G90 ; use absolute coordinates
M82 ; use absolute distances for extrusion
;LAYER 1
G92 E0
T2;
G92 E0
G1 Z0.5 F1600
G92 E0
G1 X60 Y30 F1600
G1 X80 Y30 E0.8 F600
G1 X80 Y30 F1600
G1 X95 Y15 E1.6 F600
G1 X95 Y16.4 F1600
G1 X81 Y30.5 E2.4 F600
G1 X81 Y30.5 F1600
G1 X95 Y43.6 E3.2 F600
G1 X95 Y45 F1600
G1 X80 Y31 E4.0 F600
G1 X80 Y31 F1600
G1 X60 Y31 E4.8 F600
G1 X60 Y32 F1600
G1 X79.5 Y32 E5.6 F600
G1 X79.5 Y32 F1600
G1 X95 Y46.4 E6.4 F600
```

```
G1 X95 Y42.2 F1600
G1 X82.5 Y30.5 E7.2 F600
G1 X82.5 Y30.5 F1600
G1 X95 Y17.8 E8.0 F600
G1 X95 Y13.6 F1600
G1 X79.5 Y29 E8.8 F600
G1 X79.5 Y29 F1600
G1 X60 Y29 E9.6 F600

G1 X60 Y28 F1600
G1 X79 Y28 E10.4 F600
G1 X79 Y28 F1600
G1 X95 Y12.2 E11.2 F600
G1 X95 Y19.2 F1600
G1 X84 Y30.5 E12 F600
G1 X84 Y30.5 F1600
G1 X95 Y40.8 E12.8 F600
G1 X95 Y47.8 F1600
G1 X79 Y33 E13.6 F600
G1 X79 Y33 F1600
G1 X60 Y33 E14.4 F600
G92 E0

G1 X60 Y34 F1600
G1 X78.5 Y34 E15.2 F600
G1 X78.5 Y34 F1600
G1 X95 Y49.2 E16 F600
G1 X95 Y39.4 F1600
G1 X85.5 Y30.5 E16.8 F600
G1 X85.5 Y30.5 F1600
G1 X95 Y20.6 E17.6 F600
G1 X95 Y10.8 F1600
G1 X78.5 Y27 E18.4 F600
G1 X78.5 Y27 F1600
G1 X60 Y27 E19.2 F600
G92 E0

G1 X60 Y26 F1600
G1 X78 Y26 E20.0 F600
G1 X78 Y26 F1600
G1 X95 Y9.4 E20.8 F600
G1 X95 Y22 F1600
G1 X87 Y30.5 E21.6 F600
G1 X87 Y30.5 F1600
G1 X95 Y38 E22.4 F600
G1 X95 Y50.6 F1600
G1 X78 Y35 E23.2 F600
G1 X78 Y35 F1600
```

```
G1 X60 Y35 E24.0 F600
G92 E0

;LAYER 2
G92 E0
T2
G92 E0
G1 Z1.0 F1600
G92 E0
G1 X60 Y34.5 F1600
G1 X78.25 Y34.5 E0.8 F600
G1 X78.25 Y34.5 F1600
G1 X95 Y49.9 E1.6 F600
G1 X95 Y38.7 F1600
G1 X86.25 Y30.5 E2.4 F600
G1 X86.25 Y30.5 F1600
G1 X95 Y21.3 E3.2 F600
G1 X95 Y10.1 F1600
G1 X78.25 Y26.5 E4.0 F600
G1 X78.25 Y26.5 F1600
G1 X60 Y26.5 E4.8 F600
G92 E0

G1 X60 Y27.5 F1600
G1 X78.75 Y27.5 E5.6 F600
G1 X78.75 Y27.5 F1600
G1 X95 Y11.5 E6.4 F600
G1 X95 Y19.9 F1600
G1 X84.75 Y30.5 E7.2 F600
G1 X84.75 Y30.5 F1600
G1 X95 Y40.1 E8.0 F600
G1 X95 Y48.5 F1600
G1 X78.75 Y33.5 E8.8 F600
G1 X78.75 Y33.5 F1600
G1 X60 Y33.5 E9.6 F600
G92 E0

G1 X60 Y32.5 F1600
G1 X79.25 Y32.5 E10.4 F600
G1 X79.25 Y32.5 F1600
G1 X95 Y47.1 E11.2 F600
G1 X95 Y41.5 F1600
G1 X83.25 Y30.5 E12.0 F600
G1 X83.25 Y30.5 F1600
G1 X95 Y18.5 E12.8 F600
G1 X95 Y12.9 F1600
G1 X79.25 Y28.5 E13.6 F600
G1 X79.25 Y28.5 F1600
```

```
G1 X60 Y28.5 E14.4 F600
G92 E0

G92 E0
T1
G92 E0
G1 X60 Y29.5 F1600
G1 X79.5 Y29.5 E0.8
G1 X79.5 Y29.5 F1600
G1 X95 Y14.3 E1.6 F600
G1 X95 Y17.1 F1600
G1 X81.75 Y30.5 E2.4 F600
G1 X81.75 Y30.5 F1600
G1 X95 Y42.9 E3.2 F600
G1 X95 Y45.7 F1600
G1 X79.75 Y31.5 E4.0 F600
G1 X79.75 Y31.5 F1600
G1 X60 Y31.5 E4.8 F600
G92 E0

G1 X60 Y30.5 F1600
G1 X80.25 Y30.5 E5.6 F600
G1 X80.25 Y30.5 F1600
G1 X95 Y15.7 E6.4 F600
G1 X80.25 Y30.5 F1600
G1 X95 Y44.3 E7.2 F600
G1 X80.25 Y30.5 F1600
G1 X60 Y30.5 F1600
G92 E0

;LAYER 3
G92 E0
T2
G92 E0
G1 Z1.5 F1600
G92 E0
G1 X60 Y30 F1600
G1 X80 Y30 E0.8 F600
G1 X80 Y30 F1600
G1 X95 Y15 E1.6 F600
G1 X95 Y16.4 F1600
G1 X81 Y30.5 E2.4 F600
G1 X81 Y30.5 F1600
G1 X95 Y43.6 E3.2 F600
G1 X95 Y45 F1600
G1 X80 Y31 E4.0 F600
G1 X80 Y31 F1600
G1 X60 Y31 E4.8 F600
```

```
G92 E0

G1 X60 Y33 F1600
G1 X79 Y33 E5.6 F600
G1 X79 Y33 F1600
G1 X95 Y47.8 E6.4 F600
G1 X95 Y40.8 F1600
G1 X84 Y30.5 E7.2 F600
G1 X84 Y30.5 F1600
G1 X95 Y19.2 E8.0 F600
G1 X95 Y12.2 F1600
G1 X79 Y28 E8.8 F600
G1 X79 Y28 F1600
G1 X60 Y28 E9.6 F600
G92 E0

G1 X60 Y27 F1600
G1 X78.5 Y27 E10.4 F600
G1 X78.5 Y27 F1600
G1 X95 Y10.8 E11.2 F600
G1 X95 Y20.6 F1600
G1 X85.5 Y30.5 E12.0 F600
G1 X85.5 Y30.5 F1600
G1 X95 Y39.4 E12.8 F600
G1 X95 Y49.2 F1600
G1 X78.5 Y34 E13.6 F600
G1 X78.5 Y34 F1600
G1 X60 Y34 E14.2 F600
G92 E0

G92 E0
T1
G92 E0
G1 X60 Y32 F1600
G1 X79.5 Y32 E0.8 F600
G1 X79.5 Y32 F1600
G1 X95 Y46.4 E1.6 F600
G1 X95 Y42.2 F1600
G1 X82.5 Y30.5 E2.4 F600
G1 X82.5 Y30.5 F1600
G1 X95 Y17.8 E3.2 F600
G1 X95 Y13.6 F1600
G1 X79.5 Y29 E4.0 F600
G1 X79.5 Y29 F1600
G1 X60 Y29 E4.8 F600
G92 E0

;LAYER 4
```

```
G92 E0
T2
G92 E0
G1 Z2.0 F1600
G92 E0
G1 X60 Y30.5 F1600
G1 X80.25 Y30.5 E0.8 F600
G1 X80.25 Y30.5 F1600
G1 X95 Y15.7 E1.6 F600
G1 X80.25 Y30.5 F1600
G1 X95 Y44.3 E2.4 F600
G1 X80.25 Y30.5 F1600
G1 X60 Y30.5 F1600
G92 E0

G1 X60 Y29.5 F1600
G1 X79.5 Y29.5 E3.2
G1 X79.5 Y29.5 F1600
G1 X95 Y14.3 E4.0 F600
G1 X95 Y17.1 F1600
G1 X81.75 Y30.5 E4.8 F600
G1 X81.75 Y30.5 F1600
G1 X95 Y42.9 E5.6 F600
G1 X95 Y45.7 F1600
G1 X79.75 Y31.5 E6.4 F600
G1 X79.75 Y31.5 F1600
G1 X60 Y31.5 E7.2 F600
G92 E0


G1 X60 Y33.5 F1600
G1 X78.75 Y33.5 E8.0 F600
G1 X78.75 Y33.5 F1600
G1 X95 Y48.5 E8.8 F600
G1 X95 Y40.1 F1600
G1 X84.75 Y30.5 E9.6 F600
G1 X84.75 Y30.5 F1600
G1 X95 Y19.9 E10.4 F600
G1 X95 Y11.5 F1600
G1 X78.75 Y27.5 E11.2 F600
G1 X78.75 Y27.5 F1600
G1 X60 Y27.5 E12.0 F600
G92 E0

G92 E0
T1
G92 E0
G1 X60 Y28.5 F1600
```

```
G1 X79.25 Y28.5 E0.8 F600
G1 X79.25 Y28.5 F1600
G1 X95 Y12.9 E1.6 F600
G1 X95 Y18.5 F1600
G1 X83.25 Y30.5 E2.4 F600
G1 X83.25 Y30.5 F1600
G1 X95 Y41.5 E3.2 F600
G1 X95 Y47.1 F1600
G1 X79.25 Y32.5 E4.0 F600
G1 X79.25 Y32.5 F1600
G1 X60 Y32.5 E4.8 F600
G92 E0

;LAYER 5
G92 E0
T2
G92 E0
G1 Z2.5 F1600
G92 E0
G1 X60 Y33 F1600
G1 X79 Y33 E0.8 F600
G1 X79 Y33 F1600
G1 X95 Y47.8 E1.6 F600
G1 X95 Y40.8 F1600
G1 X84 Y30.5 E2.4 F600
G1 X84 Y30.5 F1600
G1 X95 Y19.2 E3.2 F600
G1 X95 Y12.2 F1600
G1 X79 Y28 E4.0 F600
G1 X79 Y28 F1600
G1 X60 Y28 E4.8 F600
G92 E0

G1 X60 Y30 F1600
G1 X80 Y30 E5.6 F600
G1 X80 Y30 F1600
G1 X95 Y15 E6.4 F600
G1 X95 Y16.4 F1600
G1 X81 Y30.5 E7.2 F600
G1 X81 Y30.5 F1600
G1 X95 Y43.6 E8.0 F600
G1 X95 Y45 F1600
G1 X80 Y31 E8.8 F600
G1 X80 Y31 F1600
G1 X60 Y31 E9.6 F600
G92 E0

G92 E0
```

```
T1
G92 E0
G1 X60 Y32 F1600
G1 X79.5 Y32 E0.8 F600
G1 X79.5 Y32 F1600
G1 X95 Y46.4 E1.6 F600
G1 X95 Y42.2 F1600
G1 X82.5 Y30.5 E2.4 F600
G1 X82.5 Y30.5 F1600
G1 X95 Y17.8 E3.2 F600
G1 X95 Y13.6 F1600
G1 X79.5 Y29 E4.0 F600
G1 X79.5 Y29 F1600
G1 X60 Y29 E4.8 F600
G92 E0

;LAYER 6
G92 E0
T2
G92 E0
G1 Z3.0 F1600
G92 E0
G1 X60 Y28.5 F1600
G1 X79.25 Y28.5 E0.8 F600
G1 X79.25 Y28.5 F1600
G1 X95 Y12.9 E1.6 F600
G1 X95 Y18.5 F1600
G1 X83.25 Y30.5 E2.4 F600
G1 X83.25 Y30.5 F1600
G1 X95 Y41.5 E3.2 F600
G1 X95 Y47.1 F1600
G1 X79.25 Y32.5 E4.0 F600
G1 X79.25 Y32.5 F1600
G1 X60 Y32.5 E4.8 F600
G92 E0

G92 E0
T1
G92 E0
G1 X60 Y31.5 F1600
G1 X79.5 Y31.5 E0.8
G1 X79.5 Y31.5 F1600
G1 X95 Y45.7 E1.6 F600
G1 X95 Y42.9 F1600
G1 X81.75 Y30.5 E2.4 F600
G1 X81.75 Y30.5 F1600
G1 X95 Y17.1 E3.2 F600
G1 X95 Y14.3 F1600
```

```
G1 X79.75 Y29.5 E4.0 F600
G1 X79.75 Y29.5 F1600
G1 X60 Y29.5 E4.8 F600
G92 E0

G1 X60 Y30.5 F1600
G1 X80.25 Y30.5 E5.6 F600
G1 X80.25 Y30.5 F1600
G1 X95 Y15.7 E6.4 F600
G1 X80.25 Y30.5 F1600
G1 X95 Y44.3 E7.2 F600
G1 X80.25 Y30.5 F1600
G1 X60 Y30.5 F1600
G92 E0

;LAYER 7
G92 E0
T2
G92 E0
G1 Z3.5 F1600
G92 E0
G1 X60 Y30 F1600
G1 X80 Y30 E0.8 F600
G1 X80 Y30 F1600
G1 X95 Y15 E1.6 F600
G1 X95 Y16.4 F1600
G1 X81 Y30.5 E2.4 F600
G1 X81 Y30.5 F1600
G1 X95 Y43.6 E3.2 F600
G1 X95 Y45 F1600
G1 X80 Y31 E4.0 F600
G1 X80 Y31 F1600
G1 X60 Y31 E4.8 F600

G1 X60 Y32 F1600
G1 X79.5 Y32 E5.6 F600
G1 X79.5 Y32 F1600
G1 X95 Y46.4 E6.4 F600
G1 X95 Y42.2 F1600
G1 X82.5 Y30.5 E7.2 F600
G1 X82.5 Y30.5 F1600
G1 X95 Y17.8 E8.0 F600
G1 X95 Y13.6 F1600
G1 X79.5 Y29 E8.8 F600
G1 X79.5 Y29 F1600
G1 X60 Y29 E9.6 F600
G92 E0
```

EK-B

Firmware EEPROM parametreleri ve mevcut atanmış değerleri

Parametre	Değer
Baudrate	115200
Filament printed	0
Printer active	0
X-axis steps per mm	2799
Y-axis steps per mm	2799
Z-axis steps per mm	22400
X-axis max. feedrate	10
Y-axis max. feedrate	10
Z-axis max. feedrate	1
X-axis homing feedrate	10
Y-axis homing feedrate	10
Z-axis homing feedrate	1
Max. jerk	20
Max. Z-jerk	0.3
X home pos	0
Y home pos	0
Z home pos	0
X max length	375
Y max length	275
Z max length	300
X-axis acceleration	50
Y-axis acceleration	50
Z-axis acceleration	4000
X-axis travel acceleration	250
Y-axis travel acceleration	250
Z-axis travel acceleration	20
Bed Heat Manager	1
Bed PID drive max	255
Bed PID drive min	80
Bed PID P-gain	196
Bed PID I-gain	33.02
Bed PID D-gain	290
Bed PID max value	255
Extr.1 steps per mm	1600
Extr.1 max. feedrate	30
Extr.1 start feedrate	10
Extr.1 acceleration	4000
Extr.1 heat manager	1
Extr.1 PID drive max	140
Extr.1 PID drive min	60
Extr.1 PID P-gain/dead-time	24

Extr.1 PID max value	255
Extr.1 X-offset	0
Extr.1 Y-offset	0
Extr.1 temp. stabilize time	1
Extr.1 temp. for retraction when heating	37
Extr.1 distance to retract when heating	0
Extr.1 extruder cooler speed	255
Extr.1 advance K	0
Extr.1 advance L	0
Extr.2 steps per mm	1600
Extr.2 max. feedrate	30
Extr.2 start feedrate	10
Extr.2 acceleration	4000
Extr.2 heat manager	1
Extr.2 PID drive max	140
Extr.2 PID drive min	60
Extr.2 PID P-gain/dead-time	24
Extr.2 PID max value	255
Extr.2 X-offset	0
Extr.2 Y-offset	0
Extr.2 temp. stabilize time	1
Extr.2 temp. for retraction when heating	37
Extr.2 distance to retract when heating	0
Extr.2 extruder cooler speed	255
Extr.2 advance K	0
Extr.2 advance L	0

KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER

Aydin L., Kucuk S., A Method For More Accurate FEA Results On A Medical Device Developed By 3D Technologies. *Polymers for Advanced Technologies,* 2018, 29(8), 2281-2286.

Peker A., Aydin L., Kucuk S., Ozkoc G., Cetinarslan B., Canturk Z., Selek A., Additive manufacturing and biomechanical validation of a patient-specific diabetic insole, *Polymers for Advanced Technologies,* 2020, DOI: 10.1002/pat.4832.

Aydin L., Kucuk S., Kenar H., A Universal Self-Eroding Sacrificial BioInk That Enables Bioprinting At Room Temperature. *Polymers for Advanced Technologies,* 2020, DOI:10.1002/pat.4892.

Aydin L., Kucuk S., Design and construction of ankle foot orthosis by means of three dimensional printers. *Journal of Polytechnic,* 2017, DOI: 10.2339/2017.20.1.

Aydin L., Kucuk S., Kenar H., Design and construction of a 3d bioprinter for bioprinting of tissues and organs. *Proceedings on the Tıp Tekno 15,* Mugla, Turkey, 15-18 October 2015.

Aydın L., Üç boyutlu yazıcıyla ayak bileği ortezinin tasarımı ve geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, 2014, 372714.

Aydın L., Cakir O., Dilek R., Ege M., Surgical Planning and Additive Manufacturing of an Anatomical Model: A Case Study of a Spine Surgery, Editors: Kucuk S., Canda A., *Medical Robotics - New Achievements,* IntechOpen, London, 1-12, 2019.

Aydin L., Kucuk S., Kenar H., Design and Construction of a Novel Micro-Extrusion System for Bio-printing Applications. *International Journal of Applied Mathematics Electronics and Computers,* 2016, Special Issue(1), 52-56.

Aydin L., Kucuk S., Cakir O., Patient Specific Cardiovascular Disease Modelling Based on the Computational Fluid Dynamics Simulations: Segmentation and Hemodynamic Model of a Thoracic Artery. *Journal of Polytechnic,* 2020, DOI: 10.2339/politeknik.616293.

ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında Mersin‘de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Mersin‘de tamamladı. 2008 yılında girdiği Kocaeli Üniversitesi Teknik Eğitim Fakültesi Bilgisayar Öğretmenliği Bölümü‘nden 2012 yılında Bilgisayar Öğretmeni olarak mezun oldu. 2012 yılında, Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı‘nda yüksek lisansa başladı. 2014 yılında bu bölümden mezun olarak yine 2014 yılında aynı bu bölümde doktoraya başladı.