DERLEME REVIEW

DOI: 10.5336/healthsci.2019-72026

Üç Boyutlu Biyobasıma Bir Bakış ve Organ Basımı

An Overview of Three Dimensional Bioprinting and Organ Printing

Ali İhsan BÜLBÜL[a], Serdar KÜÇÜK[b]

[a]Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomedikal Mühendisliği, Kocaeli, TÜRKİYE
[b]Kocaeli Üniversitesi Teknoloji Fakültesi, Biyomedikal Mühendisliği, Kocaeli, TÜRKİYE

ÖZET Bu çalışma, rejeneratif tıp dünyasında araştırmacılar tarafından 3 boyutlu (3B) biyobasım alanında yapılan çalışmalara ait bir analizdir. Konunun spesifikliği ve buna rağmen çok geniş yayın yelpazesine dağılması, çoklu disiplinli bilimsel yapıda olması nedenleriyle analiz etmek ve bir makale kapsamına sığdırmak zordur. Biyobasım, büyük oranda transplantasyon ve bir ölçüde ilaç keşfi ve toksikoloji araştırmalarında kullanılacak uygun doku ve organlara olan ihtiyacı gidermek amacıyla doku mühendisliğinde biyomalzemeler veya hücrelerle biyolojik yapıları in vivo veya in vitro üretmek için, laboratuvar çalışması ve/veya bilgisayar destekli biyoyazdırma işlemleridir. Bu işlemlerde özellikle yumuşak dokuları simüle edebilmesi, hidrofilik yapısı ve yüksek biyouyumluluğu sayesinde hidrojeller yoğun kullanılır. İskele yapıları hidrojellerle beraber dokulara temel oluşturur. İskelelerin ve dokuların üretiminde 3B biyoyazıcılar da kullanılmaktadır. Bu çalışmada, 3B biyobasım hakkında literatürdeki önemli bilgiler ve güncel uygulama örnekleri derlenmiştir. Ayrıca organ ve özellikle böbrek basımı üzerine yapılan çalışmalar irdelenmiştir. 3B biyobasımın nispeten yeni olmasından dolayı gelişim süreci ile yapılan çalışmalar, bu teknolojiyi yapılandırmakta ve bu anlamda tanımını ve içeriğini oluşturmaktadır. Bundan dolayı ve artan ilginin de gösterdiği önemi nedeniyle bu makalede, 3B biyobasımın okunabilirliğinin artırılması da amaçlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Doku mühendisliği; biyobaskı; hidrojel; iskele; böbrek

ABSTRACT This review is an analysis of the studies carried out in the field of three-dimensional bioprinting by people working in the regenerative medicine world. Due to the specificity of the subject and its distribution to a wide range of publications and its multidisciplinary scientific structure, it is difficult to analyze and fit within the scope of an article. Bioprinting is a laboratory study and/or a computer-aided process to produce biomaterials or cells in tissue engineering in vivo or in vitro for the purpose of relieving the need for appropriate tissues and organs to be used in a large extent in transplantation and to some extent in drug discovery and toxicology research. In these processes, hydrogels are used intensively due to their ability to simulate soft tissues, hydrophilic structure and high biocompatibility. Scaffold structures are the basis for the tissues together with hydrogels. Three-dimensional bioprinters are also used in the production of scaffold and tissue. In this study, important information and actual application examples about the three dimensional bioprint literature have been compiled. In addition, studies on organ and especially kidney compression are examined. Due to the fact that the three-dimensional bioprint is relatively new, the studies carried out with the development process define this technology and in this sense constitute the definition and the content. Therefore and due to the importance of increasing interest, it is aimed to increase the readability of the three-dimensional bioprint.

Keywords: Tissue engineering; bioprinting; hydrogel; scaffold; kidney

İnsanlar için yaralanma, hastalık ve doğuştan sakatlık daima mevcut olmuştur. Böylece ihtiyaç duyulan doku ve organların yeniden yapılandırılması üzerine tarih boyunca çalışmalar gerçekleştirilmiş. İlerleyen dönemlerde gelişen teknolojiyle birlikte, bir kişiden diğerine nakil, çok başarılı olmasına rağmen ciddi kısıtlamaları vardır. Asıl sorun, ihtiyacı olan tüm hastalar için yeterli doku ve organlara erişmektir.[1] 26.051 kişi Türkiye'de organ nakil bekleme listelerinde iken 2018 yılında 5.600 nakil gerçekleştirilmiş.[2] Ayrıca bağışıklık sistemi ile ilgili sorunlar zaman içinde kronik reddedilme ve yıkıma neden olmakta. Kısıtlamalar sonucu gerekli dokuyu sağlamak için yeni çözümlere ihtiyaç duyuluyor. Bu noktada doku mühendisliği ortaya çıkmıştır. Bu nispeten yeni mühendislik alanının temelinde, yeni ve fonksiyonel

Correspondence: Ali İhsan BÜLBÜL
Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomedikal Mühendisliği, Kocaeli, TÜRKİYE/TURKEY
E-mail: aliihsanbulbul@yahoo.com

Peer review under responsibility of Turkiye Klinikleri Journal of Health Sciences.

Received: 23 Nov 2019 ***Received in revised form:*** 14 Jan 2020 ***Accepted:*** 21 Jan 2020 ***Available online:*** 17 Dec 2020

2536-4391 / Copyright © 2020 by Türkiye Klinikleri. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

canlı dokusu geliştirmek için genellikle bir iskele ile ilişkilendirilen canlı hücreler kullanılarak üretim yatmaktadır.[1]

Biyobasım, 3 boyutlu (3B) canlı yapıları oluşturmak için biyomalzemeli veya hücrelerin katman katman olarak basıldığı nispeten yeni bir teknolojidir. Günümüzde, önde gelen 3 farklı biyobasım yöntemi öne çıkmaktadır: mürekkep püskürtmeli, direkt lazer ve ekstrüzyon biyobasım.[3] Aslında hedef doku veya organa özel farklı biyoyazıcı yöntemleri de geliştirilmektedir.

Doku mühendisliğinin 3B biyobasıma geçiş sürecinde hidrojel, iskele ve 3B yazıcı teknolojileri için biyomürekkep, yazıcı teknolojilerinin biyouyumlulukları ile nihai reel hedef organ basımı önemli yer tutmaktadır.

Biyobasım uygulamalarında hâlihazırda damar dokusu, kıkırdak, kemik, kardiyak dokular, karaciğer dokusu üretilmektedir.[4] Özellikle böbrek, organ basımı konusunda büyük ilgi çekmektedir. Çünkü organ nakli için bekleyenlerin yaklaşık %85'i böbrek hastasıdır.[2] Fakat doku mühendisliğindeki sınırlamalar, böbreğin karmaşık yapısı, vaskülarizasyon sorunları gibi nedenlerle henüz böbrek üretilememiştir.

HİDROJEL

Araştırmacılar, yıllar içinde hidrojelleri birçok farklı şekilde tanımlamışlardır. Bunlardan en yaygın olanı, hidrojenin, 1 veya daha fazla monomerin basit reaksiyonu ile üretilen, suyla şişmiş ve çapraz bağlı bir polimerik ağ olmasıdır. Bir başka tanım ise, yapısında suyun önemli bir kısmını tutabilen (hidrofilik), ancak suda çözünmeyecek bir polimerik malzeme olmasıdır. Hidrojeller, son 50 yılda, geniş uygulama alanlarındaki olağanüstü vaatlerinden dolayı büyük ilgi görmektedir.[5,6] Ayrıca genellikle hidrofilik yapısı nedeniyle doğal dokuya çok benzer bir esnekliğe sahiptirler.[7]

Hidrojellerin suyu emebilme yeteneği, polimerik omurgaya bağlı hidrofilik fonksiyonel gruplardan kaynaklanırken, çözünmeye karşı dirençleri ağ zincirleri arasındaki çapraz bağlantılardan kaynaklanır. Doğal olarak oluşan ve sentetik olan birçok malzeme, hidrojel tanımına uygundur.[7]

Hidrojeller, polimerik yapıdan kaynaklanan çeşitliliğiyle, fiziksel ve kimyasal özellikleri ve kullanımlarının teknik olarak uygulanabilirliği şeklinde birçok farklı sınıflandırmalara sahiptir.[7] Basitçe hidrojeller, kökenlerine göre doğal veya sentetik olarak 2 gruba ayrılabilir.[8] Genellikle hidrojel olarak adlandırılan polimer zincir yapıdaki hidrofilik jeller olsa da bazen suda dağılabilen kolloidal jeller de kastedilir.[9]

Son 20 yıl boyunca, doğal hidrojeller yavaş yavaş uzun kullanım ömrüne, yüksek su emme kapasitesine ve yüksek jel mukavemetine sahip sentetik hidrojellerle değiştirildi. Sentetik polimerler genellikle, özel olarak ayrışabilen ve işlevsellik kazandıracak şekilde modifiye edilebilen iyi tanımlanmış yapılara sahiptir. Hidrojeller tamamen sentetik bileşenlerden sentezlenebilir. Ayrıca bu tip hidrojeller, keskin ve güçlü sıcaklık dalgalanmalarında da stabildir.[10]

Hidrojeller, bazı "klasik" kimyasal yollarla sentezlenebilir. Bunlar arasında çok fonksiyonlu monomerlerin polimerizasyonu ve paralel çapraz bağlanması gibi tek adımlı prosedürler ve reaktif gruplara sahip polimerik moleküllerin sentezini içeren çoklu adım prosedürleri ve bunların ayrıca çapraz bağlanma ajanları ile muhtemelen polimerlerin reaksiyona sokulması da bulunmaktadır. Polimer mühendisi, çapraz bağlanma yoğunluğu gibi yapısal olarak moleküler ölçekte kontrol ve polimerlerin biyolojik bozunma, mekanik dayanım ve uyaranlara kimyasal ve biyolojik tepki gibi özel özellikleri ile polimer yapıları tasarlayabilir ve sentezleyebilir.[11]

Doğal hidrojel kaynakları 2 ana gruba ayrılabilir; polisakkaridler ve polipeptidler (proteinler). Doğal bazlı hidrojeller genellikle doğal substratlar üzerinde bazı sentetik parçaların eklenmesiyle, örneğin polisakkaridler üzerinde vinil monomerlerin aşı kopolimerizasyonu yoluyla hazırlanır.[12] Doğal polimerler bazında hidrojeller ayrıca hayvan kollajeninden, bitkilerden ve deniz yosunundan elde edilen makromoleküller de olabilir. Bu doğal makromoleküller tipik olarak sırasıyla glikosidik ve amino asit tekrarlama birimlerinden oluşan polisakkaridler ve proteinlerdir. Doğal polimerlerin hidrojelleri, özellikle polisakkaridler genel olarak toksik değildir ve

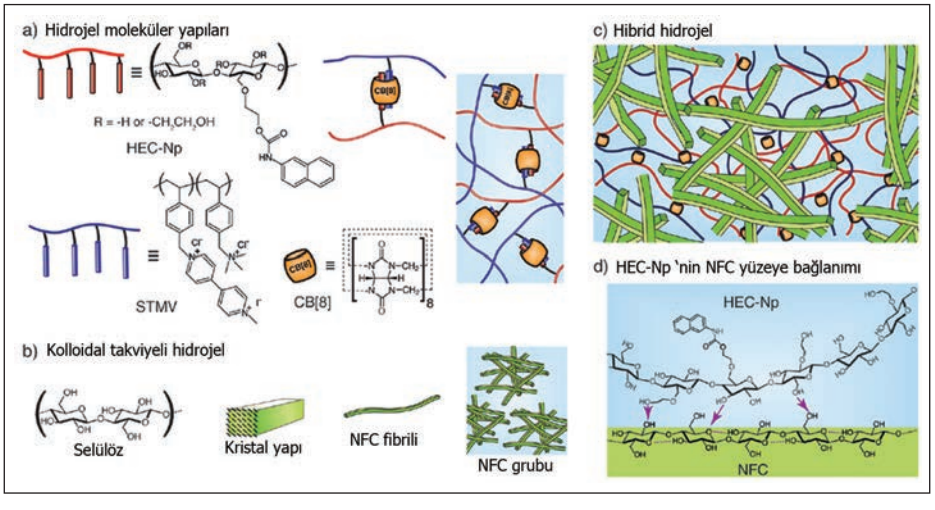
biyobozunurdurlar. Nişastanın veya modifiye nişastanın vinil aşı kopolimerizasyonu yoluyla kimyasal modifikasyonu, nişasta özelliklerinin geliştirilmesi ve kullanım aralığının genişletilmesi için en önemli alanları oluşturmaktadır.[13]

Hibrid nanokompozitler, iç içe geçmiş supramoleküler hidrojeller içeren kolloidal nanofibril hidrojelleri temel alarak inşa edilir. Doğal malzemeler, sentetik malzemeler ile nadiren elde edilen mukavemet, sertlik ve dayanıklılık birleşimi bir özellik göstermektedir. Örneğin Şekil 1'de Janecek ve ark.nın hidrojel çalışmasında, moleküler ve kolloidal hibrid hidrojellerin uzunluk ölçeğini köprüleme yöntemi görülmektedir. Doğada ipek, hayvan kemiği ve bitki liflerinin tamamı bu şekilde hiyerarşik yapılardan oluşur. Nanofibril selüloz (NFC), yüksek mukavemetli nanomalzemeler ve biyomedikal yapı iskeleleri gibi geniş bir yelpazede ortaya çıkan uygulamalar için kullanılır.[14-16] NFC ile supramoleküler hidrojel, hidrojen bağları ile bağlanarak farklı şekillerde kombine edilmiştir. Bu yöntem hidrojellerde genellikle zayıf olan mekanik yapıda pozitif sinerjiyle sonuçlanmaktadır.[17]

Hidrojeller, biyomedikal mühendisliğinde, hidratlanmış ortamları ve doğal ekstrasellüler matriksi (ECM)ne benzer ayarlanabilen özellikleri (örneğin mekanik, kimyasal, biyouyumlu) nedeniyle yaygın kullanım alanları bulurlar. Bununla birlikte, kontrol edilebilirlik, harekete geçirme ve hızlı cevaplama özelliklerinin eksikliği nedeniyle, mühendislik 3B doku yapıları ve ilaç dağıtımında aktif hedefleme gibi uygulamalarda hidrojellerin kullanımı ile ilgili zorluklar devam etmektedir. Son zamanlarda, manyetik hidrojeller aktif tepki özellikleri ve genişletilmiş uygulama alanları ile yeni bir biyokompozit biyomalzeme olarak ortaya çıkmıştır.[6]

İdeal bir hidrojel malzemenin fonksiyonel özellikleri aşağıdaki gibi listelenebilir:[12]

- Yüksek emme (absorbsiyon) kapasitesi (maksimum denge şişmesi),
- Uygulama gereksinimine bağlı olarak istenen emilim oranı (tercih edilen parçacık büyüklüğü ve gözeneklilik),
- Yük altındaki yüksek emicilik,
- Düşük çözünür içerik ve atık monomer,
- Düşük fiyat,
- Şişme ortamında ve depolama sırasında yüksek dayanıklılık ve stabilite,
- Toksik türler oluşmadan yüksek biyobozunurluk,



ŞEKİL 1: a) Supramoleküler hidrojel, naftil ile violojeni oldukça dinamik bir şekilde bağlayabilen HEC-Np (naphthyl-functionalized hydroxyethyl cellulose, naftil işlevli hidroksietil selüloz), STMV (viologen functional styrene derivative, viologen fonksiyonel stiren türevi) ve CB[8] (cucurbit[8]uril)'den oluşur. b) Kolloidal takviye nanofibrilatlı selüloz, ayrıca daha yoğun ve daha az yoğun ağ rejimleri de gösterilmiştir. c) Moleküler seviye supramoleküler ve kolloidal seviye NFC (nanofibrillated cellulose, nanofibrilatlanmış selüloz) hidrojelden oluşan interpenetran hibrid hidrojel. Sert nano lifleri ve kısa en boy oranı nedeniyle, ağ kümeleri oluşur. d) HEC-Np'nin NFC yüzeyine yüzey emilimi. Olası hidrojen bağı şematik olarak gösterilmiştir.

- Suda şişme sonrası pH nötrlüğü,
- Renksizlik, kokusuzluk ve toksik olmama,
- Fotostabilite,
- Yeniden ıslatma kabiliyeti (gerekirse), hidrojel, emdirilmiş çözeltiyi geri verebilmeli veya bunu muhafaza edebilmelidir.

Açıktır ki bir hidrojel numunesinin yukarıda belirtilen gerekli tüm özellikleri eş zamanlı olarak yerine getirmesi imkânsızdır. Aslında, bu özelliklerin bazılarının maksimum seviyesini elde etmek için kullanılan sentetik bileşenler, kalanın verimsiz olmasına yol açacaktır. Bu nedenle, pratikte, üretim işlem değişkenleri, özellikler arasında uygun bir denge sağlanacak şekilde optimize edilmelidir. Örneğin hidrojellerin hijyenik ürünleri yüksek emme oranı, düşük yeniden ısıtma ve düşük rezidüel monomere sahip olmalı ve ilaç uygulamasında kullanılan hidrojellerin gözenekli olması ve pH veya sıcaklığa tepki vermesi gerekir.[7]

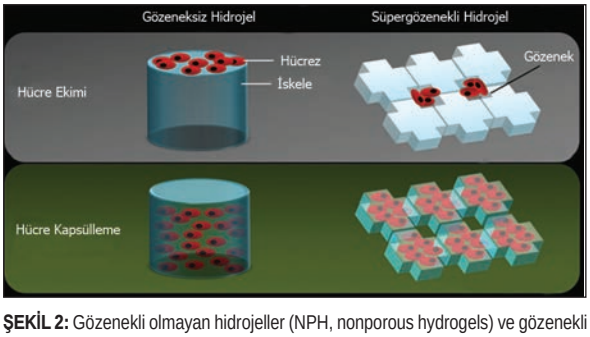
İSKELE YAPILARI

Doku mühendisliği kavramı, Cohen, Langer ve Vacanti'nin bilimde bir tarihsel dönüm noktası olan makaleleri yayınladığı 1993 yılında resmîleştirildi; biyobozunabilir 3B iskelelerin özellikleri ve uygulamaları ilk kez detaylandırıldı.[18] 3B iskeleler birbirine iyi bağlı gözenek ağları ile oldukça gözenekli olmalı ve hücre göçü ve büyüme faktörlerinin dâhil edilmesine uygun bir mikro ortam sağlamak için tutarlı ve yeterli gözenek büyüklüğüne de sahip olmalıdır. Bu iskeleler, hücrelerin onları çevreleyen 3B çevreden elde edilen mekanik işaretlere göre etkileştiği ve hareket ettiği gerçek in vivo mikro çevreyi taklit etmeye hizmet eder. Bu nedenle, iskelelerin malzeme özellikleri, hücresel tepkiyi ve sonucu belirlemede hayati öneme sahiptir.[19]

Genel olarak, besinlerin taşınmasını, atıkların uzaklaştırılmasını sağlayan ve hücrelerin çoğalmasını ve göçünü kolaylaştıran birbirine bağlı gözenekli iskele ağları esastır. Gözeneklilik ve gözenek büyüklüğü hücre davranışını etkiler ve iskelenin nihai mekanik özelliğini belirler. 3B iskelelerin gözeneklilik şekli ve gözenek büyüklüklerinin biyomedikal uygulamalar sırasındaki işlevselliği üzerinde doğrudan etkileri vardır. Gözenekli ve birbirine bağlı ağlar, hücre beslenmesi, çoğalması ve doku vaskülarizasyonu, göç ve yeni dokuların oluşumu için gereklidir.[20-22] Gözenekli bir yüzey aynı zamanda iskeleler ile çevre doku arasında mekanik kenetlenmeyi kolaylaştırmaya yarar. İmplantın mekanik stabilitesini iyileştirir.[23] Ayrıca gözeneklerin ağ yapısı, yeni doku oluşumunu yönlendirmeye ve teşvik etmeye yardımcı olur.[24,25] Yüksek gözenekli materyaller, proteinler, genler veya hücreler gibi biyofaktörlerin etkili salınımını ve iyi besin değişimi sağlar. Bununla birlikte, biyomateryalin yapısal stabilitesini sağlamada önemli olan mekanik özellik, artan gözeneklilik sonucu genellikle tehlikeye girer. Bu nedenle, en uygun iskele sistemi için iskelelerin mekanik ve kütle aktarım fonksiyonu arasında bir denge bulunmalıdır.[19]

Loh ve Choong'un çalışması, farklı gözenek boyutlarına ve gözenekliliğe sahip 3B iskeleleri imal etmek için kullanılan çeşitli imalat teknikleri (örneğin geleneksel ve hızlı prototipleme yöntemleri) üzerinde odaklanmaktadır. Farklı gözenek boyutunun farklı sonuçları olmaktadır. Kademeli gözenekliliğe sahip olan iskeleler, hücrelerin farklı özelliklere sahip farklı doku katmanlarının maruz kaldıkları gerçek in vivo durumları daha iyi temsil etme yeteneğine sahiptir.[19]

Hücre kapsüllemesi, iskelenin içindeki hücreleri sürüklerken, gözeneksiz hidrojellere hücre eklenmesi, hücrelerin yüzeyde çoğalmasına neden olur.[19] Günümüzde, hücre kapsüllemesinin ana sınırlaması, oksijen ve besi maddelerinin hücrelere taşınması için uygun difüzyon katsayısı ile immün sistem koruması arasındaki dengedir.[26] Şekil 2'de görüldüğü üzere, gö-



ŞEKİL 2: Gözenekli olmayan hidrojeller (NPH, nonporous hydrogels) ve gözenekli hidrojeller (SPH, superporous hydrogels) için hücre kültürünün şematik gösterimi. Gözenekli olmayan hidrojellere ekim yapılan hücre, yüzeyde çoğalan hücrelere neden olurken hücre kapsüllemesi, iskele içindeki hücreleri hapseder. Gözenekli hidrojeller için, hücreler iskele üzerine ekildiğinde gözenekler arasında çoğalacak veya kapsülleme işlemi sırasında iç kısımda sıkışacaktır.[19]

zenekli olmayan hidrojeller (NPH) yerine süper gözenekli hidrojeller (SPH), daha elverişli difüzyon ve tutunma özelliklerine sahiptir.[27] Süper gözenekli hidrojeller için hücreler, iskeleler üzerine ekildiklerinde veya kapsülleme işlemi sırasında içte tutulduklarında gözenekler arasında çoğalırlar. Hücre kapsüllemesinin ana avantajları, hücreler için immün sisteme karşı koruma sağlama kabiliyeti ve enjekte edilebilir formları üretme olasılığıdır.[19]

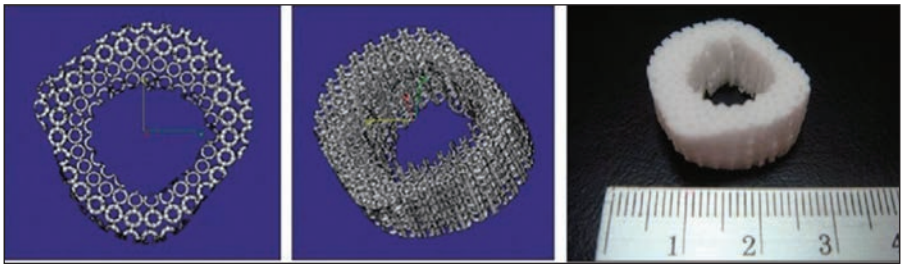
İskele yapılarda hidrojellerin, biyouyumlulukları ve moleküllerin hızlı yayılma kabiliyetleri, ilaç verme, hücre kültürü, yara iyileşmesi ve algılama uygulamaları için yararlı kılmaktadır. Jellerin kimyasal işlevselliği, hücre çoğalması için sinyal ve büyüme faktörleri sağlamak üzere kolaylıkla modifiye edilebilir. Büyük hücrelerin girmesine izin vermek için, substratın gözenekliliği kontrol edilebilir veya jel biyolojik olarak parçalanabilir hale getirilebilir. Nihai amaçlardan biri, nakil için laboratuvardaki tüm organların büyümesidir. Jeller, ilaç taşıyıcı araçlar olarak implante edilebilir veya kan bazlı dağıtım sistemlerinde mikrojeller olarak kullanılabilir. 3B iskeleler yaygın olarak ilaç dağılımı, hücre davranışı ve doku mühendisliği alanında malzeme araştırmaları için kullanılmaktadır.[28-32]

Doku mühendisliğinin tanımlanmasından sonraki 10 yıl içinde (1993-2002), fiber yapıştırma, faz ayırma, çözücü dökümü, parçacıklı süzme, membran laminasyon, kalıplama ve köpüklenme gibi gözenekli 3B iskelelerin imal edilmesine yönelik bir dizi geleneksel imalat tekniği uygulanmıştır.[33] Bununla birlikte, tüm bu yöntemler büyük bir dezavantajı paylaşmaktadır; iskele mimarisinin, gözenek ağının ve gözenek büyüklüğünün yeterince kontrol edilmesine izin vermezler, bu da tutarsız ve daha az 3B örülü iskelelere yol açar. Bu sorunun üstesinden gelmek için araştırmacılar, kontrollü gözenek boyutu ve gözenek yapısı ile özelleştirilmiş iskeleleri imal etmek için 3B baskı yöntemlerinin (hızlı prototipleme, katı serbest form imalat veya katkı maddesi üretimi olarak da bilinir) kullanımını önermişlerdir.[34-36]

İskele mimarisi tasarımı hem mekanik özelliği hem de hücre davranışlarını önemli ölçüde etkileyebilir. Chua ve ark.nın çalışmasında, 3B iskele inşa ederken aşağıdan yukarıya bir yaklaşım benimsenmiştir. Böylece, önce birim hücreleri yapılmış ve daha sonra bunlar bir 3B iskele haline getirilmiştir. Bu yaklaşımı kullanarak, gözenekli yapı tasarımına dayanan mekanik özelliğe ince ayar yapılabilir. Kontrollü bir mimariye sahip, yüksek oranda gözenekli bir 3B iskele modeli oluşturabilen ve kemik gibi doğal anatomik yapının dış yüzey profilini tam olarak karşılayabilen doku iskeleleri için bir sistem geliştirilmiştir.[37-40] Bu sistemde, bir birim hücrenin temel geometrisini oluşturmak için yaklaşık 20 çok yüzlü şekil seçilmiştir. İskele kütüphanesi ve her bir birim hücresinin gözenek boyutu ve dikme boyutu gibi parametreleri ayarlanabilir ve her bir poligonal ünite, bir mekânsal düzenlemede otomatik olarak tekrarlanabilir ve amaçlanan iskele uygulamasına uyan bir blok oluşturmak üzere boyutlandırılabilir. Bundan sonra anatomik olarak şekillendirilmiş bir gözenekli iskele, iskele bloğu ile hedeflenen dokunun gerçek yüzey modeli Boolean operasyonu ile oluşturulabilir.[41]

Kemik gibi doğal dokular genellikle gradyan gözenekli bir yapıya sahiptir, bu nedenle gözenekli iskele tasarımı ile hedef doku yapısı arasındaki mekanik mukavemet ve sertliğin eşleşmesi önemlidir.[42] Kemiklerde 2 tip sertlik gradyanı vardır: uzun kemiklerdeki radyal gradyanlar ve kısa ve düzensiz kemiklerdeki lineer gradyanlar. Silindirik birim hücreleri düzenlenerek radyal gradyan tasarımına ulaşılmıştır. Böylece gözeneklilik doğrusal olarak merkezden çevreye doğru azalır. Bu yapı ile iskeleler için sertlik varyasyonu uyarlanabilir.[43]

Her 2'si de fonksiyonel gradyanları olan bir insan mandibular süngerimsi kemik iskelesi ve femur kemiği segmenti başarıyla üretilmiş biyobasım örneklerindendir.[44,45] Fonksiyonel olarak derecelendirilmiş femur kemiği segmentinin bir örneği Şekil 3'te gösterilmektedir.[46] Bu yöntemde, kesik bir kemik, çeşitli düzensiz gözenekli elemanlara dönüştürülen, çeşitli düzensiz altıgen elemanlar kullanılarak bölünür ve temsil edilir. Tüm gözenek modeli, düzensiz gözenekler arasında bir birleşim işleminden sonra elde edilir ve daha sonra ortaya çıkan kemik iskelesi, kontur modeli ve gözenek modeli arasında bir fark operasyonu gerçekleştirilerek elde edilir. Bu yöntemi kullanarak, kemik iskele tasarımı için iyi tanımlanmış gözenek boyutu dağılımı elde edilebilir. Fonksiyonel olarak derecelendirilmiş yapılar oluşturmak



ŞEKİL 3: Bir femur kemik segmentinin fonksiyonel olarak derecelendirilmiş gözenekli iskelesinin sanal ve fiziksel prototipleri.[48]

için farklı fonksiyonlara dayanan yeni bir metot geliştirilmiştir ve ortaya çıkan modeller STL dosyaları olarak tasarlanabilir ve 3B basılabilir.[47]

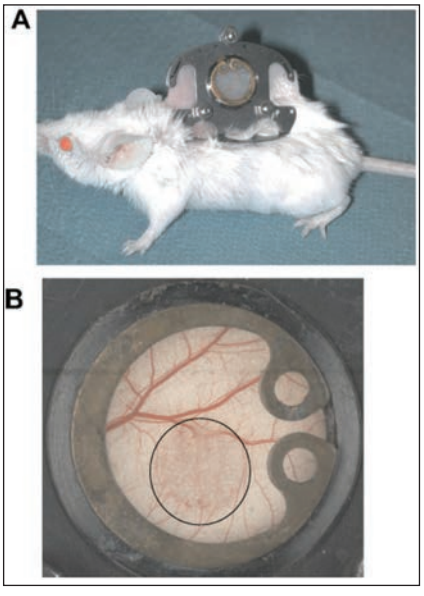
Mekanik performansın yanında vaskülarizasyon, doku mühendisliğinde, özellikle kalın veya dökme dokularda mühendislik yaparken belki de en önemli sınırlamadır. Araştırmacılar, iskele tasarımının çok önemli bir rol oynadığı vaskülarizasyonu hızlandırmak için çeşitli stratejiler önermişlerdir.[49]

Fare denek üzerinde yapılmış bir vaskülarizasyon çalışması, Şekil 4'te götülmektedir. Şekilde, bir fare (A) içindeki deri katlama haznesi modeli görülüyor.[50-52] Büyütülen resimde (B), bölmede (siyah daire ile işaretlenmiş) çizgili kas üzerine implante edilen poli (eter ester) blok-kopolimer iskelenin transilluminasyon ile incelenmesi yapılmıştır. İskele yapıda yumuşak blok polietilen glikol tereftalat (PEGT) ve sert blok polibütilen tereftalat (PBT) bloklarından oluşan bir blok kopolimer komposit kullanılmıştır.[53]

8 ve 12 gün sonra, iskele kenarlarında, iskelede daha büyük gözeneklere sahip daha büyük çaplı kan damarlarına doğru bir eğilim gözlenmiştir. Sonuçlar, tasarlanan 250 mikron veya üzeri bir gözenek boyutunun, daha küçük gözenek boyutlarından daha fazla kan damarlarının büyümesini desteklediğini göstermektedir.[53] Yüksek gözenekliliğin, daha fazla vaskülarizasyona yol açması gerekmez, çünkü gözenekler arasında çok az bağlantı varsa hücre göçü ve vaskülarizasyonu inhibe edilebilir.[54]

Üç BOYuTLu BiYOYazICI VE BiYOMÜREKKEP

3B baskı olarak bilinen üretim teknolojisi, karmaşık geometrileri hızlı prototipleme özelliği ile mühendislik, imalat, sanat, eğitim ve tıp gibi birçok alanda devrimsel yenilikler doğurmaktadır. Son gelişmeler rejeneratif tıpta uygun dokulara olan ihtiyacı gidermek için biyouyumlu malzemelerin, hücrelerin ve destekleyici bileşenlerin karmaşık fonksiyonel canlı dokular halinde 3B yazdırılmasını sağlamıştır. Biyolojik olmayan baskı ile karşılaştırıldığında 3B biyobaskı, malzeme seçimi, hücre tipleri, büyüme ve farklılaşma faktörleri ve canlı hücrelerin duyarlılıkları ve dokuların yapımı ile ilgili teknik zorluklar gibi ek karmaşıklıklar içerir. Temel zorluk karmaşık mikro mimariyi yeniden üretmektir. 3B biyobaskı, çok katmanlı cilt, kemik, vasküler greftler, trakea splintleri, kalp dokusu ve kıkırdak yapılar dâhil olmak üzere çeşitli dokuların üretilmesi ve nakli için zaten kullanıl-

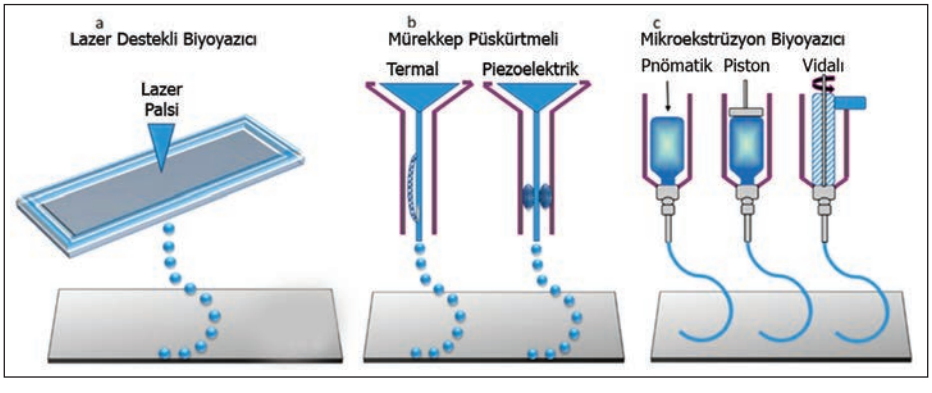


ŞEKİL 4: Deri bölme modelinin bir farede (a) gösterimi.[53] Büyütülmüş gösterimde (B), bölmedeki (siyah daireyle işaretlenmiş) çizgili kas üzerine implante edilen poli (eter ester) blok kopolimer iskelesi, transillüminasyon ile belirlenebilir. iskele ve bölmenin mikro sirkülasyonu kapak camından gözlenebilir.

maktadır. Ayrıca araştırma, ilaç keşfi ve toksikoloji için yüksek verimli 3B biyoyazıcı doku model geliştirme uygulamaları mevcuttur. 3B biyobaskı için mürekkep püskürtmeli baskı, mikro ekstrüzyon ve lazer destekli baskı yaklaşımları ve metodolojileri ana teknolojilerdir (Şekil 5).[55]

Lazer destekli baskı, hızlı ve hassas bir şekilde canlı hücre kalıpları petri kabı üzerinde oluşturma yeteneğine sahiptir. Çözelti içinde süspansiyon haline getirilmiş hücreler, lazer enerjisi kullanılarak altın veya titanyum gibi lazer enerjisini absorbe eden tabakada oluşturulan enerji ile toplayıcı yüzeye aktarılır. Odaklanmış bir lazer darbesi bir kabarcık meydana getirir ve kabarcık oluşumuyla şok dalgaları üretilir, bu da hücreleri toplayıcı substratlara doğru iter. Biyolojik malzemenin (biyomürekkep) viskozitesi, lazer baskı hızı, lazer enerjisi ve sinyal frekansı optimize edilerek mikro ölçekli hücre düzenlemesi gerçekleştirilebilir.[55,56] Lazer yazdırma teknolojisi ile farklı tip hücreleri başarılı şekilde yazdırmak mümkündür. Hidrojel fotopolimerizasyonu ile iskele üretiminde de kullanılmaktadır. Substrat üzerinde yüksek çözünürlükte konumlandırılan hücreler katmanlar halinde serilerek 3B yapılar elde edilir.[3]

Mürekkep püskürtme tabanlı biyoyazdırmada, canlı hücreler, iskeleler üzerine ekilmek yerine, kartuşlar aracılığıyla kontrollü damlacıklar halinde ön tanımlı konumlara basılmaktadır. Doku veya organlar ile ilgili dijital verileri bilgisayardan alan ve hücreler ile biyomalzemelerden yapılmış "biyomürekkep" kullanarak bir substrat üzerinde çoğaltan temassız bir teknik kullanır.[57] Mürekkep püskürtme tabanlı sistem, hücre konsantrasyonu, damla hacmi, çözünürlük, nozül çapı ve basılı hücrelerin ortalama çapı gibi işlem parametrelerini kontrol ederek tek hücrelerin veya hücre agregatlarının yazdırılmasını sağlar.[58,59] Mürekkep püskürtmeli yazıcılar, nihai yapının bir kısmını destekleyebilen veya oluşturabilen bir substrata sıvı damlalarını çıkarmak için termal veya akustik kuvvetler kullanır.[58,60,61] Termal mürekkep püskürtmeli yazıcılar, nozülden damlacıkları zorlayan basınç darbeleri üretmek için baskı kafasını elektriksel olarak ısıtarak çalışır. Bazı çalışmalar, 200-300 °C arasında değişebilen bu sınırlandırılmış ısıtmanın, DNA gibi biyolojik moleküllerin kararlılığı üzerinde veya hücrelerin yaşayabilirliği ile baskı sonrası işlevi üzerinde önemli bir etkiye sahip olmadığını göstermiştir.[61,62] Termal mürekkep püskürtmeli yazıcıların, hücrelerin ve malzemelerin ısıl ve mekanik strese maruz kalma riski, düşük damlacık yönlülüğü, düzgün olmayan damlacık büyüklüğü, nozülün sık sık tıkanması ve güvenilir olmayan hücre kapsüllemesi, bu yazıcıların 3D biyobaskıda kullanımı için önemli dezavantajlar içermektedir.[55] Birçok mürekkep püskürtmeli yazıcı, sıvının damlacıklara düzenli aralıklarla ayrılması için baskı kafasının içinde akustik bir dalga oluşturan piezoelektrik kristal içerir. Piezoelektrik malzemeye voltaj uygulanması, malzemenin titreşimini ve bu da nozüllerden damlacıkları çıkarmak için gereken basıncı oluşturur.[63] Piezoelektrik mürekkep püskürtmeli yazıcıların avantajları arasında, düzgün damlacık boyutu, hücrelerin ısı ve basınç streslerine maruz kalmalarını önleme kabiliyeti sayılabilir.[64,65] Piezoelektrik mürekkep püskürtmeli



ŞEKİL 5: Biyoyazıcı teknikleri a. Lazer destekli biyoyazıcı b. Mürekkep püskürtmeli biyoyazıcı (Termal, Piezoelektrik) c. Mikroekstrüzyon biyoyazıcı (Pnömatik, Piston, Vidalı).

yazıcılar tarafından kullanılan 15-25 KHz frekansları hücre zarı ve lizis hasarına neden olma potansiyelleri hakkında endişeler mevcuttur.[60] Buna rağmen mürekkep püskürtmeli tabanlı biyoyazıcılar düşük maliyet, yüksek çözünürlük, yüksek hız ve birçok biyolojik malzeme ile uyumluluk gibi avantajlar da sunuyor.[55]

Başka bir biyoyazdırma tekniği biyomateryallerin ekstrüzyonuna dayanmaktadır. Ekstrüzyon için bir akışkanlaştırıcı sistemin ve baskı için otomatik 3 eksenli robotik sistemin birleşimidir. Baskı sırasında, biyomateryal, "robotların" kontrolü altında basınç destekli bir sistem tarafından dağıtılır ve hücreler, silindirik filamentler şeklinde hedeflenen 3B yapılar içinde kapsüllenir.[3] Mikro ekstrüzyon, sıvı damlacıklarından ziyade sürekli malzeme boncukları verir. Küçük malzeme boncukları, yazılım tarafından yönlendirilerek 2 boyutta biriktirilir.[55] Şekil 5'de görüldüğü gibi 3B biyolojik baskı uygulamalarında biyolojik malzemeleri ekstrüde etmek için en yaygın kullanılan yöntemler pnömatik veya mekanik (pistonlu veya vidalı) sistemlerdir.[66-70] Mikro ekstrüzyon biyobaskı teknolojisinin temel avantajı, çok yüksek hücre yoğunluğu yerleştirme yeteneğidir. Doku mühendisliğinde fizyolojik hücre yoğunluklarının elde edilmesi, biyobaskıda ana amaçtır.[55] Bazı gruplar, mikro ekstrüzyon baskısı ile 3B doku yapıları oluşturmak için sadece hücrelerden oluşan solüsyonlar kullanmışlardır.[71] Çok hücreli hücre sferoidleri biriktirilir ve istenen 3B yapıda kendiliğinden birleşmeye bırakılır.[72,73] Doku sferoidlerinin, ECM'nin mekanik ve fonksiyonel özelliklerini kopyalayabilen malzeme özelliklerine sahip olduğu düşünülmektedir. İskele içermeyen doku küresi biyobaskısı için kullanılan en yaygın teknoloji mekanik mikro ekstrüzyondur.[55]

Biyoyazdırma, canlı hücrelerin belirli bir düzende basıldığı tasarlanmış dokuların "biyofabrikasyon" üretimi için büyük bir potansiyeli vaat ediyor. Fakat kullanılmakta olan her tekniğin kendi sınırlamaları vardır.[3] Tanımlanmış bir konumda tek bir işlemde birden çok hücre türünü konumlandırmak ve kültürlemek bu yaklaşımlarda büyük bir sorundur. Araştırmacılar, heterojen dokuların basımında başarı elde etmiş olsalar da, bunlar ayrı bölümlere basılmış ve doğal dokunun mikro yapısını kopyalamamıştır.[74,75]

3B baskı, 3D modellerin oluşturulması için art arda malzeme katmanlarının serilmesini içerir, böylece diğer imalat yöntemleriyle karşılaştırıldığında gözenek boyutlarının, gözenek morfolojisinin ve matrisin gözenekliliğinin daha iyi kontrol edilmesini sağlar.[76,77] Bu işlemle üretilen 2 tip gözenek vardır; ya tasarım gözeneklidir ya da işlem sürecinde gözenek oluşturur. Bununla birlikte, bu yöntemde yer alan yüksek sıcaklıklar göz önüne alındığında, bu yöntem kullanılarak sadece sınırlı sayıda polimer üretilebilir. Ek olarak, bu yöntemle elde edilen seramik iskeleler daha iyi mekanik mukavemete sahiptir, ancak kırılgan sertliği iyileştirmek için yüksek sıcaklıklarda 2. bir sinterleme işlemine ihtiyaç duyar. Dahası, genellikle toz halinde olmadıkları için bazik biyomalzemelerin ön işlemesi gereklidir.[78,79]

Bir malzeme, belirli bir formda hazırlanabilse bile bu malzemenin 3B yazdırılabilir olduğunu garanti etmez. Çünkü dikey boyuttaki başarılı baskı, katmanlar arasındaki yapıştırma mukavemetine de bağlıdır. Bu nedenle, 3B iskele uygulamaları için bir malzeme araştırılırken, malzemenin mevcut formlarının ilk aşamada dikkate alınması önemlidir. Ayrıca 3B yazdırılabilir biyomateryallerin çeşitliliğini artırmak için gelecekteki çalışmalar mevcut biyomateryalleri 3B baskı için uygun formlara dönüştürmekte yeni yöntemlerin icat edilmesini içermelidir. Örneğin jelatin jel, sıcaklıktaki düşüş ile katılaşabilir, ancak bu düşük sıcaklıklı ortam, hücre sağ kalımı için elverişli değildir. Bu nedenle gelecekteki araştırmalar, enzimatik çapraz bağlanma ile katılaşma gibi jelatin için yeni bir katılaşma mekanizması veya hidrojel ve hücrelerin düşük sıcaklıkta birikmesi için yeni bir hibrid mekanizmasının geliştirilmesini içerebilir.[80,81]

Doğal polimerler genellikle çok iyi biyouyumluluğa sahiptir ve sentetik polimerler ile karşılaştırıldığında hücreler için uygun bir mikro çevre sağlayabilir. Bununla birlikte, doğal polimerlerin 3B basılabilirliği genellikle zayıftır. Dolaylı 3B baskı, kollajen veya jelatin gibi doğal polimerler kullanılarak bir 3B gözenekli iskele üretilmesi için geliştirilmiştir. Direkt 3B baskıdan farklı olarak, dolaylı 3B baskı, genellikle bir destek malzemesinden negatif bir kalıp oluşturur ve daha sonra istenen polimer yapı iskeletini bir kurutma yöntemi ile kalıptan çıkarır.[82,83] Bu yaklaşım kullanılarak 3B dâhili kanallara sahip kollajen iskeleler üretilebilir. Ayrıca kritik nokta ku-

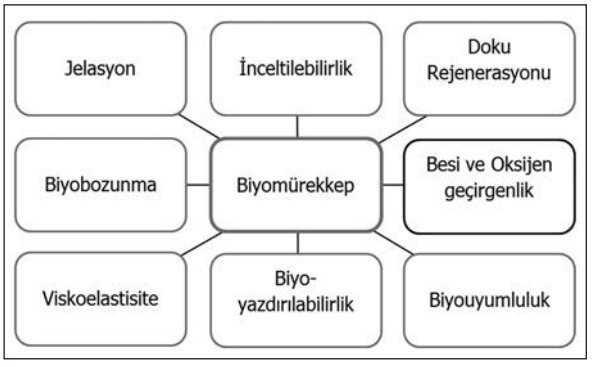
rutmadan daha az büzülmeye neden olduğu ve kanalların tasarım morfolojisini doğru şekilde yeniden ürettiği için dondurarak kurutma, dolaylı 3B baskıda en uygun kurutma yöntemi olarak bulunmuştur.[84] Kollajen ve jelatine ek olarak, hem makro hem de mikro-morfolojik özelliklere sahip ipek fibroin proteininden gözenekli iskeleler de üretilmiştir.[85,86]

3B biyobaskıda, hücre agregatları ve hidrojeller biyomürekkep olarak adlandırılır ve gelişmiş hesaplama algoritmalarına göre biyoyazıcının hassas mimariye yerleştirdiği yapı blokları olarak kullanılır.[87]

3B biyobaskının ana bileşeni, fonksiyonel organların veya doku yapılarının gelişimi için çok önemli olan biyomürekkeptir. 3B baskı teknolojisinde kullanılan biyomürekkepler, hayati önem taşıyan ve seçim sırasında dikkate alınması gereken pek çok özellik gerektirir. Organların veya doku yapılarının 3B baskısı zor bir hedeftir. Bu amaçla daha başarılı biyomürekkepler geliştirmek için farklı yöntem ve özellik kombinasyonları kullanılabilir.[88]

Şekil 6'da biyobaskı için biyomürekkep seçim kriterleri gösterilmektedir. Biyomürekkep için önemli beklentiler arasında, baskı sırasında yüksek çözünürlük, yerinde jelleşme, visko-elastikiyet, düşük maliyet, kolay temin edilebilme, endüstriyel ölçeklenebilirlik, doku iç yapılarının biyomimasyonu, mekanik bütünlük, olgunlaşma için baskı sonrası kısa süre ve immünolojik uyumluluk yer alır.[89] Tablo 1'de görüldüğü gibi, 3B biyobaskı uygulamalarında birçok farklı doğal ve sentetik polimer biyomürekkep olarak kullanılmaktadır.

Tabloda da görüldüğü gibi hücre-biyomateryal bazlı biyomürekkeplerden hücre kümeleri şeklinde biyomürekkeplere ve doku mühendisliği uygulamaları için doku sferoidlerine varıncaya kadar çok çeşitli biyomürekkep formülasyonları bildirilmiştir. İlginç bir şekilde biyouyumlu olan, basılabilir ve baskı sonrası mekanik olarak daha kararlı olan biyomürekkepler; fonksiyonel polimerik biyomateryaller, bunların modifikasyonları ve hücrelerin ve hidrojellerin harmanlanması sayesinde ortaya çıkmaktadır. Bu yaklaşımlar, biyomürekkeplerin, gelecekte 3B biyobaskı kullanılarak daha karmaşık doku/organ yapıları üretme konusundaki muazzam potansiyelini göstermektedir.[88]



ŞEKİL 6: Biyomürekkep seçim kriterleri.[89]

ORGaN BaSIMI

İnsan doku ve organlarının 3B baskısı, son 30 yılda heyecan verici bir araştırma konusu olmuştur. Bununla birlikte, mevcut teknolojik ve biyolojik zorluklar hâlâ önemli miktarda araştırma gerektirmektedir. Organ baskı, önemli potansiyele sahiptir. Mevcut organ baskısı uygulamaları hâlen in vitro ilaç testiyle sınırlıdır.[114]

Her yıl ve sadece Avrupa'da, organ nakli için bekleme listelerine 63.000 hasta eklenmekte, bunlardan her gün 12 hasta ölmekte ve bunların çoğu (%81) böbrek nakillerine ihtiyaç duymaktalar.[115] Böbrek hastalığı, akut veya kronik olabilir. Amerika'da ve benzer şekilde tüm dünyada nüfusun yaklaşık %10'dan fazla bir bölümü kronik böbrek hastalığına sahip. Böbrek hastalıkları zamanla böbreklerin fonksiyonel olmadığı bir aşama olan son dönem böbrek hastalığı haline gelerek giderek kötüleşebilir. Günümüzde, son dönem böbrek hastalığı için 2 tedavi seçeneği olan böbrek nakli ve diyaliz, morbidite, mortalite ve ekonomik maliyetler açısından ciddi dezavantajları içermektedir.[116]

Aslında böbrek dramatik şekilde karmaşık bir organdır. 20'den fazla hücre çeşitliliğine ve santral sinir sisteminden sonra en karmaşık mimariye sahiptir. Yapısal uzuvları ve bölümleri, nefronları karmaşıktır ki bir böbrekte kişiden kişiye değişen nefron sayısı 200.000-2.500.000 arasında olabilir. Kardiyak çıkışın %10'dan fazlasını alan oldukça vasküler bir organdır. Organa özelleşmiş kan filtrasyonu ve elektrolit kontrolü için kritik kılcal damarlara sahiptir.[117-120] Buna rağmen açıklanan büyük ihtiyaca cevaben,

TABLO 1: 3B biyobaskıda kullanılan biyomürekkep çeşidi örnekleri.

Biyomürekkep	Test edilen hücre tipleri	uygulamaları	avantaj ve dezavantajları
agaroz ve karışımları	Kemik iliği hücreleri	Kemik[87,90]	a: iyi mekanik mukavemet, düşük fiyat
	Düz kas hücreleri, insan endotel hücreleri	Damar[90-92]	D: Hücre adezyonu
	Stromal, mezenkimal kök hücre	adipoz ve kemik [93]	a: Hızlı jelasyon, düşük fiyat, yüksek şekil bütünlüğü
aljinat	NIH 3T3 fare fibroblastları	Damar [94]	D: Hücre adezyonu, tıkanma
Fibrin	NT2 nöronları	Sinir sistemi [62]	a: anjiyogenezi artırır, yapısal bütünlük
			D: Tıkanma, düşük mekanik özellik
Furfuril (F) jelatin	Fare C2C12 hücreleri, STO fibroblastları	Doku mühendisliği,	a: iyi hücre tutunması, hızlı jelasyon
		Kardiyak [95]	D: Vaskülarizasyon vb. belirsizlikler için
			araştırma ihtiyacı
Hücresizleştirilmiş adipoz	adipoz türevi kök hücreler (haSC)	in vitro ilaç tarama ve	a: ECM benzerliği, yüksek hücre tutunma oranı
(adECM), kıkırdak (cdECM) ve	ve mezenkimal stromal hücreleri (hTMSC)	doku/kanser modeli[96]	
kalp (hdECM)			
Hücresizleştirilmiş ekstrasellüler	Kalp progenitör hücreleri (hCPC),	Kardiyak[97]	D: Doku kullanılabilirliği, uzun prosedür
matriks (dECM)	mezenkimal kök hücre		
ipek/polietilen glikol (PEG)	Kemik iliği mezenkimal kök hücre ve	Doku mühendisliği[98]	a: Düşük maliyetli, iyi hücre tutunması
	fibroblastlar		D: Modifikasyon ihtiyacı, uzun süreç
jelatin	Fibroblastlar	Kök hücre, kanser araştırmalar [99]	a: Hücre tutunmasını artırır, geri dönüşümlü, düşük
	HepG2	Karaciğer, tümör modelleme[100]	maliyetli
	interstisyel hücreler, düz kas hücreleri	aort kapağı[101]	D: Düşük stabilite, hassas
jelatinle birlikte hiyalüronik asit	adipoz kök hücreleri	Doku mühendisliği[102,103]	a: Hücre büyümesini artırır, anjiyogenez, hızlı jelasyon,
Metil selülozla birlikte hiyalüronik	Mezenkimal kök hücre		yüksek şekil bütünlüğü
asit			D: Hızlı bozunma, düşük mekanik özellik
jelatin metakrilat (GelMa)	HepG2	Karaciğer[104]	a: Kolay dejenerasyon, mekanik olarak güçlü, karışım
mümkün, basılabilirliği yüksek	Eklem kıkırdak kondrogenitör	Kıkırdak[105]	D: Fotopolimerizasyon hücreyi etkileyebilir, geç jelasyon
GelMa ve Gellan sakızı	at kondrositleri	Kondrosit[106]	
GelMa, GelSH ve heparin	Kondrosit	Kıkırdak[107]	
GelMa ve böbrek ekstrasellüler	Renal	Böbrek[108]	a: Hücre büyümesinde ve canlılığında artış
matriks (ECM)			D: Organelden organa geçiş henüz mümkün değil
Kollajen	Dermal fibroblastlar	Perfüze edilebilir yapay doku[68]	a: RGD gibi hücre tutunma faktörlerini artırmak
Kollajen-aljinat	Kondrosit	Kondrosit[109]	D: Düşük mekanik stabilite, yüksek maliyet, yavaş
			jelleşme, tıkanma
Okside ve metakrilat aljinat (OMa)	Mezenkimal kök hücre	Doku mühendisliği[110]	a: iyi mekanik mukavemet, iyi hücre tutunması ve göçü
			D: uzun prosedür
PEG ve peptidler	Mezenkimal kök hücre	Kemik ve kıkırdak[111]	a: Harmanlandığı zaman iyi uyumluluk
			D: uV kürleme, düşük hücre tutunması ve mekanik
			özellikler
Pluronic F127	Sığır kondrositleri	Kıkırdak[112]	a: Geri dönüşümlü, sentetik
Pluronic PF127/aljinat	Fare C2C12 hücreleri	Kas[113]	Da: Düşük mekanik özellikler, hızlı bozulma

3B: 3 boyutlu; ECM: Ekstrasellüler matriks.

dünyada böbrek üretimi için yoğun çalışmalar mevcuttur. Organ büyüklüğünü oluşturan çeşitli tip hücrelerin 3B baskısı çok zordur. Çözüm ayrılmış ve yeniden bir araya getirilmiş embriyonik böbrekler olabilir. Organoitler, böbrek gelişiminin gelişim sürecini takip eder. Bu metotta hücre üretimi için geliştirilmiş protokoller mevcuttur.

Mevcut teknoloji ile karmaşık ve büyük ölçekli 3B böbreğin üretimi henüz mümkün değildir. İlaç taramaları, hastalık modellemesi ve nihai amaç organ olarak böbrek üretim çalışmaları için doku modellerinin 3B biyobaskısı üzerine çalışmalar mevcuttur. Harvard'ın Jennifer Lewis Laboratuvarında araştırmacılar, insan böbrek proksimal tübül segmentini ye-

niden oluşturarak küçük çaplı fonksiyonel renal doku yapısını elde etmiştir.[121]

Doku mühendisliğinde biyoyazıcılar önemli bir adımdır. Biyoyazıcılar ile organ basımı ve biyofabrikasyon çalışmaları ivme kazanmıştır. Mironov ve ark., 3B biyobaskı konseptini organ baskısı olarak önermişler ve bunu canlı insan organlarının bilgisayar destekli, jet tabanlı 3B doku mühendisliği olarak tanımlamışlardır.[122] Bu organ yazdırma işlemi, 3B baskının rutin işlem zincirini takip eder; yani bilgisayar destekli tasarım (CAD) modelinden başlayarak, bir STL dosyasına dönüştürme, dilimleme ve sonra yazdırma. Geleneksel iskele tabanlı doku mühendisliği yaklaşımıyla karşılaştırıldığında organ baskının başlıca avantajları, ölçeklenebilir üretim imkânı sağlayan otomasyon ve vaskülarizasyon problemini çözen yüksek hücre yoğunluğudur.[123]

Turunen ve ark.nın araştırmasında, böbrek için 3B organ baskısı irdelenmiştir. 3B basılmış renal yani böbrek dokuları daha iyi ilaçlar geliştirmeye yardımcı olabilir. Bununla birlikte, böbreğin karmaşık yapısı, vaskülarizasyon ve basılı organın boyutu gibi engeller hâlâ mevcuttur. Yine de bulmacanın birçok parçası zaten mevcut ve onları bir araya getirecek böbrekler için 3B biyoyazıcı sadece bir zaman meselesi.[124]

Kaliforniya merkezli doku mühendisliği şirketi Organovo, biyobaskılı böbrek araştırması için Murdoch Çocuk Araştırma Enstitüsü ile ortaklık kurmuştur. Kendilerine ait 3B biyoyazıcı platformunu kullanarak ilaç tarama ve hastalık modellemesi için insan böbrek dokusu yapıları ürettiler. Yapılan testlerde insan böbrek doku tepkilerini karşıladıkları görülmektedir.[125] Organovo destekli başka bir araştırmada, pluripotent kök hücreler kullanılarak organoit üretimi gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, biyobaskılı böbrek organoitlerinin, fonksiyonel olduğunu ve böylece, toksisite taraması ile kompleks hastalık fenotiplerinin sorgulanması için gerekli yaklaşımların ve klinik çalışmaların geliştirilmesinde faydalı olabileceğini göstermektedir.[126]

Murphy ve Atala, organ nakline uygun böbreklerin biyobaskısı için uzun süredir çalışmakta. Aslında Entegre Doku-Organ Yazıcısı (Integrated Tissue-Organ Printer, ITOP) olarak adlandırılan bir mikro ektstrüzyon biyoyazıcı kullanarak böbrek prototipini bastılar.[55] Nihai amaç fonksiyonel organ olarak böbrek üretimi için, insandan türetilmiş amniyotik sıvı kök hücreleri ile böbrek tedavisi ve fotopolimer böbrek ECM türevli biyomürekkep çalışmaları da yapılmaktadır.[108,127]

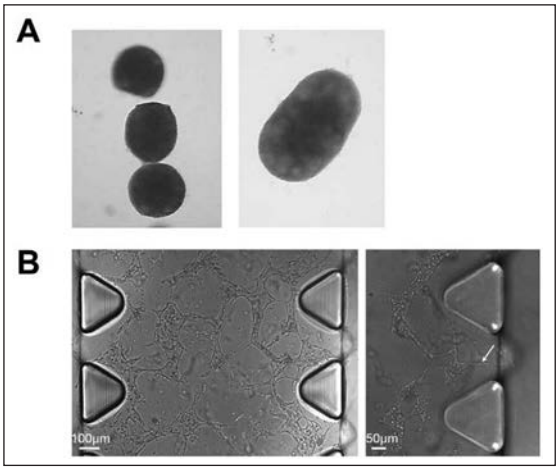
Rusya'da 3B Bioprinting Solutions tarafından 3B biyoyazıcılar geliştirilmektedir. Amaçları yakın gelecekte işlevsel ve nakil edilebilir bir insan organı basmaktır. Bir kavram kanıtı olarak, şirket zaten fonksiyonel tiroit bezlerini fare denekte in vitro basmıştır.[128]

Biyobaskı fonksiyonel böbrek yapılarını takip eden bir başka şirket ise Nano Dimension. İsrailli şirket canlı hücrelerin 3B mürekkep püskürtmeli baskı ile nefron benzeri işleyen yapıların üretiminde destekleyici yapılar için ABD'de patent başvurusunda bulunmuştur.[129]

Böbrek üretiminde, organa özel ve genel hidrojel yapılar ihtiyaç olacaktır. Polietilen glikol (PEG) gibi sentetik polimerler, karmaşık 3B yapıların biyobaskısı için (biyomürekkep veya destek malzemesi olarak) yaygın olarak kullanılan suda çözünür polimerlerdir. PEG ile akut böbrek hasarının iyileştirilmesi ve hücre etkileşimleri üzerine çalışmalar mevcuttur.[130] Doğal hidrojellerden yaygın kullanılan doğal polimer jelatin, fibrinojen, ECM protein karışımı olan Matrijel, Tip 1 kollajen ve hyalüronik asitte organ basımın hidrojelleridir.[131]

Doku mühendisliğinin en önemli sorunlarından vaskülarizasyon için böbrek üzerine çalışmalar uzun süredir yapılmaktadır.[72,123,132] 3B biyobaskı vasküler segmentlerin ve vasküler ağın oluşturulması, in vitro olarak mikrovasküler ağa kaynaşması konularında ilerleme kaydedilmiştir.[133-136] Şekil 7a'da görüldüğü üzere fare deneklerde 3B biyobaskı ile hücrelerin birbirine kaynaşması gerçekleştirilmiştir. Sonraki adım organoit oluşumu ve işlevselliğin sağlanması için Şekil 7b'de görüldüğü gibi vaskülarizasyonun gerçekleştirilmesidir.[124]

Ana amaç, transplantasyon için reddedilmeyen organların üretmek olsa da, 3B biyobaskı ile elde edilen fonksiyonel böbreklerin daha küçük birimleri, biyomedikal veya farmakolojinin diğer alanlarında yararlı olabilir. Örneğin 3B modellenen böbrek ile kişiselleştirilmiş ilaç üretimi de söz konusudur.



ŞEKİL 7: 3B biyobaskı teknolojisi ile fonksiyonel böbrek dokusu üretimi. (a) Fare metanefrik mezenkimal hücrelerinden üretilen renal organoitler, 1 günlük kültürden sonra bir araya getirilir. (b) uygulanan akış oluşturma bağlantılarının etkisi altında (kırmızı interkalasyonlu hat) akış çıkışı beyaz bir ok ile işaretlenmiştir.

Sonuçta, kök hücre uzmanlığı, 3B biyobaskı ve mikroakışkan teknolojilerle, tüm gerekli yapboz parçalarını doğru bir şekilde bir araya getirerek, fonksiyonel böbreğin 3B biyobasımı bir zaman meselesidir.[124]

YENİ TEKNOLOJİLER VE GELECEK BEKLENTİLERİ

3B biyoyazdırma teknolojisi için, gelecekteki çalışmalarda, materyaller doğrudan hastanın dokusuna entegre olabilir. Bu anlamda, deri ve kıkırdak doku üzerine deneklerle yapılmış olup, daha kapsamlı örneğin iskele yapılar klinik uygulamalarda in vivo üretilebilir.[137,138] Ek olarak, hastanın kendi hücrelerinin kullanılması, bu tip yapıların dokunun hem yapısal hem de fonksiyonel bileşenlerine katkıda bulunma kabiliyetini kolaylaştırabilir.[55,139]

3B biyobaskının bir başka ilginç türevi, 4 boyutlu (4B) biyobaskı konseptidir. 4B yazdırma, programlanabilir malzemelerin 3B baskısını ifade eder. Yazdırılan kısım kademeli olarak baskı sonrası dönem boyunca şekil değiştirdiği için, 4. boyuta karşılık gelir.[140] 4B baskının endüstriyel bir uygulaması, güneş ışığının miktarına cevaben otomatik olarak açılıp kapanabilen ışıklandırma pencereleridir.[141,142] 4B biyobaskı açısından, zamana bağlı şekil değişikliğinin gerçekleştirilmesinde programlanabilir biyomateryallerin geliştirilmesi çok önemli gibi görünmektedir.[48]

4B biyobasım konsepti için bir yaklaşım, 3B biyobasım ile 4.boyut olarak zamanın bütünleştirilmesidir. 3B biyobasımdan sonra programlanmış doku veya yapıların, su, sıcaklık ve manyetik uyaranlarla zaman içinde gelişmeye devam etmesi gerçeğine dayalıdır.[143,144] 4B biyobaskı için nem, sıcaklık, elektrik ve manyetik alan ve ışık gibi farklı uyaranlar ile şekil değiştirebilen ortopedik implantlar, akıllı alaşımlar veya 3B dinamik şekil değiştirebilen iskeleler, hidrojellerle tasarlanan 4B iskeleler, kollajen bazlı hidrojel kontrolü ile kavisli kornea üretimi gibi güncel çalışmalar mevcuttur.[145-148]

Doku mühendisliğinin doğumundan sonraki 2. 10 yılda 3B baskı, kontrol edilebilirliği ve üretim kapasitesi nedeniyle yavaş yavaş bu alanın belirli bir parçası haline geldi. Geleceğe baktığımızda, yukarıda açıklanan teknik zorlukların üstesinden gelindiğinde bile akademik bilgiyi topluma fayda sağlayan klinik ürünlere dönüştürmenin uzun bir yolu olacaktır. Araştırmacıların bu alandaki mevcut görevleri 3B baskılı tıbbi cihazların standardizasyonunu ve sertifikasyonunu hızlandırmaktır. Bu standardizasyonda uzun bir gecikme, düzenleyici çalışmayı daha da karmaşık hale getirecek, özellikle de şu anda trend olan ve dönüşen 3B biyobaskı teknolojileriyle, "tıbbi cihaz" tanımı yakında yeniden tanımlanabilecektir. Bir başka gelecek trendi de yasal manzarada olabilir, 3B baskıya ilişkin fikri mülkiyet haklarının ihlali ve korunması daha yoğun bir şekilde birbirini izlemektedir.[149] Bu nedenle, çeşitli yasal yaklaşımların erken ve bilinçli bir şekilde araştırılması, yarının değişiklikleri ile başa çıkmak için en iyi hazırlık olabilir.[48]

SONUÇ VE TARTIŞMA

Biyobasım kısa tarihine rağmen etkileyici vaatleri ile giderek artarak ilgi çekmektedir. Araştırmalardan da anlaşılıyor ki küresel anlamda ve konunun kendine özel yapısından kaynaklı dağınık bir yapı mevcuttur. Gelişen doku mühendisliği, elektronik, robotik, biyolojik teknikleri ile hızlı gelişen biyobasım; bilimsel ve etik dinamikleri tam tanımlanmamış olarak kendi zeminini de aramaktadır.

Basitçe insan biyolojik yapısı biyobasımın konusudur fakat uygulanabilecek radikal fikirlerin ve uç örneklerin artırdığı etik kaygılar da öne çıkmaktadır.

Ayrıca birçok çalışma, baskıdan sonra hücre canlılığını koruduğunu bildirmesine rağmen araştırmacıların bu hücrelerin sadece hayatta kalmayıp aynı zamanda doku temel işlevlerini yerine getirdiklerini göstermesi önemlidir.

Diğer taraftan, organ ihtiyacı ve yetersizliği, doku kayıpları ve eksikliklerine cevap isteği, insan ömrü ve hayat kalitesini artırma arayışları biyobasımın gelişmesini körüklemektedir. Bu motivasyon 3B biyoyazıcı ile fabrikasyon üretim olarak çözüm bulmaya da yakın görünmektedir.

Ülkemizde de biyobasım üzerine çalışmalar söz konudur. Örneğin damar baskısı amaçlı 3B biyoyazıcı üretimi, biyoyazıcı ile polikaprolakton-hidroksiapatit iskele üretimi, 3B yazıcı ile metakrilatlanmış jelatin/prp hidrojel ve mezenkimal kök hücre içeren osteokondral gradyan sistemlerin hazırlanması ve in vitro etkinliklerinin belirlenmesi, kemik deformitelerinin rekonstrüksiyonunda CT verilerinin katı modele dönüştürülmesi sayılabilir *(Irmak G. 3 Boyutlu Yazıcı ile Metakrilatlanmış Jelatin/PRP Hidrojel ve Mezenkimal Kök Hücre İçeren Osteokondral Gradyan Sistemlerin Hazırlanması ve in-Vitro Etkinliklerinin Belirlenmesi. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. 2019).*[150,151] Bu çalışmalarda, giderek artan ivmelenme, çalışma şartlarının zorluklarına rağmen umut vericidir.

Ayrıca bütün bu faktörler, küresel olarak mümkün gözükmese de belki ülkemiz anlamında, konunun paydaşlarının biyobasım için bilimsel, etik ve hukuki zemin üzerinde çalışma ihtiyacını göstermektedir.

Finansal Kaynak

Bu çalışma sırasında, yapılan araştırma konusu ile ilgili doğrudan bağlantısı bulunan herhangi bir ilaç firmasından, tıbbi alet, gereç ve malzeme sağlayan ve/veya üreten bir firma veya herhangi bir ticari firmadan, çalışmanın değerlendirme sürecinde, çalışma ile ilgili verilecek kararı olumsuz etkileyebilecek maddi ve/veya manevi herhangi bir destek alınmamıştır.

Çıkar Çatışması

Bu çalışma ile ilgili olarak yazarların ve/veya aile bireylerinin çıkar çatışması potansiyeli olabilecek bilimsel ve tıbbi komite üyeliği veya üyeleri ile ilişkisi, danışmanlık, bilirkişilik, herhangi bir firmada çalışma durumu, hissedarlık ve benzer durumları yoktur.

Yazar Katkıları

Fikir/Kavram: *Serdar Küçük, Ali İhsan Bülbül;* ***Tasarım:*** *Ali İhsan Bülbül;* ***Denetleme/Danışmanlık:*** *Ali İhsan Bülbül;* ***Veri Toplama ve/veya İşleme:*** *Ali İhsan Bülbül;* ***Analiz ve/veya Yorum:*** *Ali İhsan Bülbül;* ***Kaynak Taraması:*** *Ali İhsan Bülbül;* ***Makalenin Yazımı:*** *Serdar Küçük, Ali İhsan Bülbül;* ***Eleştirel İnceleme:*** *Ali İhsan Bülbül;* ***Kaynaklar ve Fon Sağlama:*** *Ali İhsan Bülbül;* ***Malzemeler:*** *Serdar Küçük, Ali İhsan Bülbül.*

KaYNaKLaR

1. Vacant JP, Vacanti Ca. Principles of Tissue Engineering. 4th ed. academic Press; 2014.
2. [Republic of Turkey Ministry of Health Public Organ Transplant Statistics] 2019 [31.02.2019].
3. Ozbolat IT, Yu Y. Bioprinting toward organ fabrication: challenges and future trends. IEEE Trans Biomed Eng. 2013;60(3):691-9. [Crossref] [PubMed]
4. Gao G, Huang Y, Schilling aF, Hubbell K, Cui X. Organ bioprinting: are we there yet? adv Healthc Mater. 2018;7(1). [Crossref] [PubMed]
5. Buchholz FL, Graham aT. Modern Superabsorbent Polymer Technology. New York: Wiley-VCH; 1998. p.279.
6. Li Y, Huang G, zhang X, Li B, Chen Y, Lu T, et al. Magnetic hydrogels and their potential biomedical applications. advanced Functional Materials. 2013;23(6):660-72. [Crossref]
7. ahmed EM. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: a review. j adv Res. 2015;6(2):105-21. [Crossref] [PubMed] [PMC]
8. Wen T, Wang Y. Sidelobe suppression in CR-OFDM system by adding extended data carriers. Communications and Network. 2013;5(03):327-32. [Crossref]
9. ahmed EM, aggor FS, awad aM, El-aref aT. an innovative method for preparation of nanometal hydroxide superabsorbent hydrogel. Carbohydr Polym. 2013;91(2):693-8. [Crossref] [PubMed]
10. Sentetik Hidrojel 2017. [Link]
11. Burkert S, Schmidt T, Gohs u, Dorschner H, arndt K-F. Cross-linking of poly (N-vinyl pyrrolidone) films by electron beam irradiation. Radiation Physics and Chemistry. 2007;76(8-9): 1324-8. [Crossref]
12. zohuriaan-Mehr Mj, Kabiri K. Superabsorbent polymer materials: a review. Iranian polymer journal. 2008;17(6):451. [Link]
13. Talaat H, Sorour M, aboulnour a, Shaalan H, ahmed EM, awad a, et al. Development of a multi-component fertilizing hydrogel with relevant techno-economic indicators. am-Euras j agric Environ Sci. 2008;3(5):764-70. [Link]
14. Eichhorn Sj. Cellulose nanowhiskers: promising materials for advanced applications. Soft Matter. 2011;7(2):303-15. [Crossref]
15. Eichhorn Sj, Dufresne a, aranguren M, Marcovich N, Capadona j, Rowan S, et al. Review: current international research into cellulose nanofibres and nanocomposites. journal of Materials Science. 2010;45(1):1. [Crossref]

16. Missoum K, Belgacem MN, Bras j. Nanofibrillated cellulose surface modification: a review. Materials (Basel). 2013;6(5):1745-66. [Crossref] [PubMed] [PMC]
17. janeček ER, McKee jR, Tan CS, Nykänen a, Kettunen M, Laine j, et al. Hybrid supramolecular and colloidal hydrogels that bridge multiple length scales. angew Chem Int Ed Engl. 2015;54(18):5383-8. [Crossref] [PubMed] [PMC]
18. Cohen S, Ba-o MC, Cima LG, allcock HR, Vacanti jP, Vacanti Ca, et al. Design of synthetic polymeric structures for cell transplantation and tissue engineering. Clin Mater. 1993;13(1-4):3-10. [Crossref] [PubMed]
19. Loh QL, Choong C. Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size. Tissue Eng Part B Rev. 2013;19(6):485-502. [Crossref] [PubMed] [PMC]
20. Salerno a, Di Maio E, Iannace S, Netti P. Tailoring the pore structure of PCL scaffolds for tissue engineering prepared via gas foaming of multi-phase blends. journal of Porous Materials. 2012;19(2):181-8. [Crossref]
21. Hollister Sj. Porous scaffold design for tissue engineering. Nature materials. 2005;4(7):518. [Crossref] [PubMed]
22. Causa F, Netti Pa, ambrosio L. a multi-functional scaffold for tissue regeneration: the need to engineer a tissue analogue. Biomaterials. 2007;28(34):5093-9. [Crossref] [PubMed]
23. Story Bj, Wagner WR, Gaisser DM, Cook SD, Rust-Dawicki aM. In vivo performance of a modified CSTi dental implant coating. Int j Oral Maxillofac Implants. 1998;13(6):749-57. [PubMed]
24. Chevalier E, Chulia D, Pouget C, Viana M. Fabrication of porous substrates: a review of processes using pore forming agents in the biomaterial field. j Pharm Sci. 2008;97(3):1135-54. [Crossref] [PubMed] [PMC]
25. Sung Hj, Meredith C, johnson C, Galis zS. The effect of scaffold degradation rate on three-dimensional cell growth and angiogenesis. Biomaterials. 2004;25(26):5735-42. [Crossref] [PubMed]
26. de Vos P, Marchetti P. Encapsulation of pancreatic islets for transplantation in diabetes: the untouchable islets. Trends Mol Med. 2002;8(8):363-6. [Crossref] [PubMed]
27. Keskar V, Marion NW, Mao jj, Gemeinhart Ra. In vitro evaluation of macroporous hydrogels to facilitate stem cell infiltration, growth, and mineralization. Tissue Eng Part a. 2009;15(7):1695-707. [Crossref] [PubMed] [PMC]
28. Luu YK, Kim K, Hsiao BS, Chu B, Hadjiargyrou M. Development of a nanostructured DNa delivery scaffold via electrospinning of PLGa and PLa-PEG block copolymers. j Control Release. 2003;89(2):341-53. [Crossref] [PubMed]
29. Cabral j, Moratti SC. Hydrogels for biomedical applications. Future Med Chem. 2011;3(15):1877-88. [Crossref] [PubMed]
30. Eiselt P, Yeh j, Latvala RK, Shea LD, Mooney Dj. Porous carriers for biomedical applications based on alginate hydrogels. Biomaterials. 2000;21(19):1921-7. [Crossref] [PubMed]
31. Kaigler D, Wang z, Horger K, Mooney Dj, Krebsbach PH. VEGF scaffolds enhance angiogenesis and bone regeneration in irradiated osseous defects. j Bone Miner Res. 2006;21(5):735-44. [Crossref] [PubMed]
32. Chiu YC, Larson jC, Isom a jr, Brey EM. Generation of porous poly(ethylene glycol) hydrogels by salt leaching. Tissue Eng Part C Methods. 2010;16(5):905-12. [Crossref] [PubMed]
33. Yang S, Leong KF, Du z, Chua CK. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. Tissue Eng. 2001;7(6):679-89. [Crossref] [PubMed]
34. Yang S, Leong KF, Du z, Chua CK. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part II. Rapid prototyping techniques. Tissue Eng. 2002;8(1):1-11. [Crossref] [PubMed]
35. Leong KF, Cheah CM, Chua CK. Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs. Biomaterials. 2003;24(13):2363-78. [Crossref] [PubMed]
36. 36.Yeong WY, Chua CK, Leong KF, Chandrasekaran M. Rapid prototyping in tissue engineering: challenges and potential. Trends Biotechnol. 2004;22(12):643-52. [Crossref] [PubMed]
37. Cheah C, Chua C, Leong K, Chua S. Development of a tissue engineering scaffold structure library for rapid prototyping. Part 1: investigation and classification. The International journal of advanced Manufacturing Technology. 2003;21(4):291-301. [Crossref]
38. Cheah C, Chua C, Leong K, Chua S. Development of a tissue engineering scaffold structure library for rapid prototyping. Part 2: parametric library and assembly program. The International journal of advanced Manufacturing Technology. 2003;21(4):302-12. [Crossref]
39. Cheah CM, Chua CK, Leong KF, Cheong CH, Naing MW. automatic algorithm for generating complex polyhedral scaffold structures for tissue engineering. Tissue Eng. 2004;10(3-4):595-610. [Crossref] [PubMed]
40. Sudarmadji N, Tan jY, Leong KF, Chua CK, Loh YT. Investigation of the mechanical properties and porosity relationships in selective laser-sintered polyhedral for functionally graded scaffolds. acta Biomater. 2011;7(2):530-7. [Crossref] [PubMed]
41. Naing M, Chua C, Leong K, Wang Y. Fabrication of customised scaffolds using computer-aided design and rapid prototyping techniques. Rapid Prototyping journal. 2005;11(4):249-59. [Crossref]
42. Leong KF, Chua CK, Sudarmadji N, Yeong WY. Engineering functionally graded tissue engineering scaffolds. j Mech Behav Biomed Mater. 2008;1(2):140-52. [Crossref] [PubMed]
43. Sudarmadji N, Chua CK, Leong KF. The development of computer-aided system for tissue scaffolds (CaSTS) system for functionally graded tissue-engineering scaffolds. Methods Mol Biol. 2012;868:111-23. [Crossref] [PubMed]
44. Chua C, Sudarmadji N, Leong K, Chou S, Lim S, Firdaus W. Process flow for designing functionally graded tissue engineering scaffolds. Innovative Developments in Design and Manufacturing: CRC Press; 2009. p. 63-8.
45. Chua C, Leong K, Sudarmadji N, Liu M, Chou S. Selective laser sintering of functionally graded tissue scaffolds. MRS bulletin. 2011;36(12):1006-14. [Crossref]
46. Cai S, Xi j, Chua CK. a novel bone scaffold design approach based on shape function and all-hexahedral mesh refinement. Methods Mol Biol. 2012;868:45-55. [Crossref] [PubMed]
47. Irvine Sa, Venkatraman SS. Bioprinting and Differentiation of Stem Cells. Molecules. 2016;21(9):1188. [Crossref] [PubMed] [PMC]
48. an j, Teoh jEM, Suntornnond R, Chua CK. Design and 3D printing of scaffolds and tissues. Engineering. 2015;1(2):261-8. [Crossref]
49. Rouwkema j, Rivron NC, van Blitterswijk Ca. Vascularization in tissue engineering. Trends Biotechnol. 2008;26(8):434-41. [Crossref] [PubMed]
50. Menger MD, Hammersen F, Walter P, Messmer K. Neovascularization of prosthetic vascular grafts. Quantitative analysis of angiogenesis and microhemodynamics by means of intravital microscopy. Thorac Cardiovasc Surg. 1990;38(3):139-45. [Crossref] [PubMed]
51. Langer S, Sinitsina I, Biberthaler P, Krombach F, Messmer K. Revascularization of transplanted adipose tissue: a study in the dorsal skinfold chamber of hamsters. ann Plast Surg. 2002;48(1):53-9. [Crossref] [PubMed]
52. Menger MD, Vajkoczy P, Beger C, Messmer K. Orientation of microvascular blood flow in pancreatic islet isografts. j Clin Invest. 1994;93(5):2280-5. [Crossref] [PubMed] [PMC]
53. Druecke D, Langer S, Lamme E, Pieper j, ugarkovic M, Steinau Hu, et al. Neovascularization of poly(ether ester) block-copolymer scaffolds in vivo: long-term investigations using intravital fluorescent microscopy. j Biomed Mater Res a. 2004;68(1):10-8. [Crossref] [PubMed]

54. Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. Biomaterials. 2005;26(27):5474-91. [Crossref] [PubMed]

55. Murphy SV, atala a. 3D bioprinting of tissues and organs. Nat Biotechnol. 2014;32(8):773-85. [Crossref] [PubMed]

56. Ovsianikov a, Gruene M, Pflaum M, Koch L, Maiorana F, Wilhelmi M, et al. Laser printing of cells into 3D scaffolds. Biofabrication. 2010;2(1):014104. [Crossref] [PubMed]

57. Boland T, Xu T, Damon B, Cui X. application of inkjet printing to tissue engineering. Biotechnol j. 2006;1(9):910-7. [Crossref] [PubMed]

58. 58.Xu T, Kincaid H, atala a, Yoo jj. High-throughput production of single-cell microparticles using an inkjet printing technology. journal of Manufacturing Science and Engineering. 2008;130(2):021017. [Crossref]

59. Xu C, Chai W, Huang Y, Markwald RR. Scaffold-free inkjet printing of three-dimensional zigzag cellular tubes. Biotechnol Bioeng. 2012;109(12):3152-60. [Crossref] [PubMed]

60. Cui X, Boland T, D'Lima DD, Lotz MK. Thermal inkjet printing in tissue engineering and regenerative medicine. Recent Pat Drug Deliv Formul. 2012;6(2):149-55. [Crossref] [PubMed] [PMC]

61. Okamoto T, Suzuki T, Yamamoto N. Microarray fabrication with covalent attachment of DNa using bubble jet technology. Nat Biotechnol. 2000;18(4):438-41. [Crossref] [PubMed]

62. Xu T, Gregory Ca, Molnar P, Cui X, jalota S, Bhaduri SB, et al. Viability and electrophysiology of neural cell structures generated by the inkjet printing method. Biomaterials. 2006; 27(19):3580-8. [Crossref] [PubMed] [PMC]

63. Tekin E, Smith Pj, Schubert uS. Inkjet printing as a deposition and patterning tool for polymers and inorganic particles. Soft Matter. 2008;4(4):703-13. [Crossref] [PubMed]

64. Saunders RE, Gough jE, Derby B. Delivery of human fibroblast cells by piezoelectric drop-on-demand inkjet printing. Biomaterials. 2008;29(2):193-203. [Crossref] [PubMed]

65. Nakamura M, Kobayashi a, Takagi F, Watanabe a, Hiruma Y, Ohuchi K, et al. Biocompatible inkjet printing technique for designed seeding of individual living cells. Tissue Eng. 2005;11(11-12):1658-66. [Crossref] [PubMed]

66. Khalil S, Sun W. Biopolymer deposition for freeform fabrication of hydrogel tissue constructs. Materials Science and Engineering: C. 2007;27(3):469-78. [Crossref]

67. Smith CM, Stone aL, Parkhill RL, Stewart RL, Simpkins MW, Kachurin aM, et al. Three-dimensional bioassembly tool for generating viable tissue-engineered constructs. Tissue Eng. 2004;10(9-10):1566-76. [Crossref] [PubMed]

68. Lee W, Lee V, Polio S, Keegan P, Lee jH, Fischer K, et al. On-demand three-dimensional freeform fabrication of multi-layered hydrogel scaffold with fluidic channels. Biotechnol Bioeng. 2010;105(6):1178-86. [Crossref] [PubMed]

69. Fedorovich NE, Swennen I, Girones j, Moroni L, van Blitterswijk Ca, Schacht E, et al. Evaluation of photocrosslinked Lutrol hydrogel for tissue printing applications. Biomacromolecules. 2009;10(7):1689-96. [Crossref] [PubMed]

70. Visser j, Peters B, Burger Tj, Boomstra j, Dhert Wj, Melchels FP, et al. Biofabrication of multi-material anatomically shaped tissue constructs. Biofabrication. 2013;5(3):035007. [Crossref] [PubMed]

71. Marga F, jakab K, Khatiwala C, Shephard B, Dorfman S, Forgacs G. Organ Printing: a Novel Tissue Engineering Paradigm. 5th European Conference of the International Federation for Medical and Biological Engineering; Springer; 2011. [Crossref]

72. Mironov V, Visconti RP, Kasyanov V, Forgacs G, Drake Cj, Markwald RR. Organ printing: tissue spheroids as building blocks. Biomaterials. 2009;30(12):2164-74. [Crossref] [PubMed] [PMC]

73. Marga F, jakab K, Khatiwala C, Shepherd B, Dorfman S, Hubbard B, et al. Toward engineering functional organ modules by additive manufacturing. Biofabrication. 2012;4(2): 022001. [Crossref] [PubMed]

74. Fedorovich NE, Schuurman W, Wijnberg HM, Prins Hj, van Weeren PR, Malda j, et al. Biofabrication of osteochondral tissue equivalents by printing topologically defined, cell-laden hydrogel scaffolds. Tissue Eng Part C Methods. 2012;18(1):33-44. [Crossref] [PubMed] [PMC]

75. Kolesky DB, Truby RL, Gladman aS, Busbee Ta, Homan Ka, Lewis ja. 3D bioprinting of vascularized, heterogeneous cell-laden tissue constructs. adv Mater. 2014;26(19):3124-30. [Crossref] [PubMed]

76. Wu C, Luo Y, Cuniberti G, Xiao Y, Gelinsky M. Three-dimensional printing of hierarchical and tough mesoporous bioactive glass scaffolds with a controllable pore architecture, excellent mechanical strength and mineralization ability. acta Biomater. 2011;7(6):2644-50. [Crossref] [PubMed]

77. Ghosh S, Parker ST, Wang X, Kaplan DL, Lewis ja. Direct-write assembly of microperiodic silk fibroin scaffolds for tissue engineering applications. advanced Functional Materials. 2008;18(13):1883-9. [Crossref]

78. Curodeau a, Sachs E, Caldarise S. Design and fabrication of cast orthopedic implants with freeform surface textures from 3-D printed ceramic shell. j Biomed Mater Res. 2000;53(5):525-35. [Crossref] [PubMed]

79. Kim SS, utsunomiya H, Koski ja, Wu BM, Cima Mj, Sohn j, et al. Survival and function of hepatocytes on a novel three-dimensional synthetic biodegradable polymer scaffold with an intrinsic network of channels. ann Surg. 1998;228(1):8-13. [Crossref] [PubMed] [PMC]

80. Yung CW, Wu LQ, Tullman ja, Payne GF, Bentley WE, Barbari Ta. Transglutaminase crosslinked gelatin as a tissue engineering scaffold. j Biomed Mater Res a. 2007;83(4):1039-46. [Crossref] [PubMed]

81. Yan Y, Wang X, Xiong z, Liu H, Liu F, Lin F, et al. Direct construction of a three-dimensional structure with cells and hydrogel. journal of bioactive and compatible polymers. 2005;20(3):259-69. [Crossref]

82. Chua C, Liu M, Chou S. additive manufacturing-assisted scaffold-based tissue engineering. In: da Silva Bartolo Pj, ed. Innovative Developments in Virtual and Physical Prototyping. Proceedings of the 5th International Conference on advanced Research in Virtual and Rapid Prototyping, Leiria, Portugal; 2011. [Crossref] [PubMed]

83. Yeong W-Y, Chua C-K, Leong K-F, Chandrasekaran M, Lee M-W. Indirect fabrication of collagen scaffold based on inkjet printing technique. Rapid Prototyping journal. 2006;12(4):229-37. [Crossref]

84. Yeong WY, Chua CK, Leong KF, Chandrasekaran M, Lee MW. Comparison of drying methods in the fabrication of collagen scaffold via indirect rapid prototyping. j Biomed Mater Res B appl Biomater. 2007;82(1): 260-6. [Crossref] [PubMed]

85. 85.Liu Mj, Chou SM, Chua CK, Tay BC, Ng BK. The development of silk fibroin scaffolds using an indirect rapid prototyping approach: morphological analysis and cell growth monitoring by spectral-domain optical coherence tomography. Med Eng Phys. 2013;35(2):253-62. [Crossref] [PubMed]

86. Chen CH, Liu jM, Chua CK, Chou SM, Shyu VB, Chen jP. Cartilage Tissue Engineering with Silk Fibroin Scaffolds Fabricated by Indirect additive Manufacturing Technology. Materials (Basel). 2014;7(3):2104-19. [Crossref] [PubMed] [PMC]

87. Ozler SB, Bakirci E, Kucukgul C, Koc B. Three-dimensional direct cell bioprinting for tissue engineering. j Biomed Mater Res B appl Biomater. 2017;105(8):2530-44. [Crossref] [PubMed]

88. Gopinathan j, Noh I. Recent trends in bioinks for 3D printing. Biomater Res. 2018;22:11. [Crossref] [PubMed] [PMC]

89. Hospodiuk M, Dey M, Sosnoski D, Ozbolat IT. The bioink: a comprehensive review on bioprintable materials. Biotechnol adv. 2017; 35(2):217-39. [Crossref] [PubMed]

90. jang j, Park jY, Gao G, Cho DW. Biomaterials-based 3D cell printing for next-generation therapeutics and diagnostics. Biomaterials. 2018;156:88-106. [Crossref] [PubMed]

91. Kucukgul C, Ozler SB, Inci I, Karakas E, Irmak S, Gozuacik D, et al. 3D bioprinting of biomimetic aortic vascular constructs with self-supporting cells. Biotechnol Bioeng. 2015; 112(4):811-21. [Crossref] [PubMed]
92. Kim JE, Kim SH, Jung Y. Current status of three-dimensional printing inks for soft tissue regeneration. Tissue Eng Regen Med. 2016; 13(6):636-46. [Crossref] [PubMed] [PMC]
93. Duarte Campos DF, Blaeser A, Korsten A, Neuss S, Jäkel J, Vogt M, et al. The stiffness and structure of three-dimensional printed hydrogels direct the differentiation of mesenchymal stromal cells toward adipogenic and osteogenic lineages. Tissue Eng Part A. 2015;21(3-4):740-56. [Crossref] [PubMed]
94. Christensen K, Xu C, Chai W, Zhang Z, Fu J, Huang Y. Freeform inkjet printing of cellular structures with bifurcations. Biotechnol Bioeng. 2015;112(5):1047-55. [Crossref] [PubMed]
95. AnilKumar S, Allen SC, Tasnim N, Akter T, Park S, Kumar A, et al. The applicability of furfuryl-gelatin as a novel bioink for tissue engineering applications. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2019;107(2):314-23. [Crossref] [PubMed] [PMC]
96. 96.Pati F, Jang J, Ha DH, Won Kim S, Rhie JW, Shim JH, et al. Printing three-dimensional tissue analogues with decellularized extracellular matrix bioink. Nat Commun. 2014;5:3935. [Crossref] [PubMed] [PMC]
97. Jang J, Park HJ, Kim SW, Kim H, Park JY, Na SJ, et al. 3D printed complex tissue construct using stem cell-laden decellularized extracellular matrix bioinks for cardiac repair. Biomaterials. 2017;112:264-74. [Crossref] [PubMed]
98. Zheng Z, Wu J, Liu M, Wang H, Li C, Rodriguez MJ, et al. 3D bioprinting of self-standing silk-based bioink. Adv Healthc Mater. 2018;7(6):e1701026. [Crossref] [PubMed]
99. Schiele NR, Chrisey DB, Corr DT. Gelatin-based laser direct-write technique for the precise spatial patterning of cells. Tissue Eng Part C Methods. 2011;17(3):289-98. [Crossref] [PubMed] [PMC]
100. Pimentel C R, Ko SK, Caviglia C, Wolff A, Emnéus J, Keller SS, et al. Three-dimensional fabrication of thick and densely populated soft constructs with complex and actively perfused channel network. Acta Biomater. 2018;65:174-84. [Crossref] [PubMed]
101. Duan B, Hockaday LA, Kang KH, Butcher JT. 3D bioprinting of heterogeneous aortic valve conduits with alginate/gelatin hydrogels. J Biomed Mater Res A. 2013;101(5):1255-64. [Crossref] [PubMed] [PMC]
102. Sakai S, Ohi H, Hotta T, Kamei H, Taya M. Differentiation potential of human adipose stem cells bioprinted with hyaluronic acid/gelatin-based bioink through microextrusion and visible light-initiated crosslinking. Biopolymers. 2018;109(2). [Crossref] [PubMed]
103. Law N, Doney B, Glover H, Qin Y, Aman ZM, Sercombe TB, et al. Characterisation of hyaluronic acid methylcellulose hydrogels for 3D bioprinting. J Mech Behav Biomed Mater. 2018;77:389-99. [Crossref] [PubMed]
104. 104.Billiet T, Gevaert E, De Schryver T, 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. [Crossref] [PubMed]
105. Levato R, Webb WR, Otto IA, Mensinga A, Zhang Y, van Rijen M, et al. The bio in the ink: cartilage regeneration with bioprintable hydrogels and articular cartilage-derived progenitor cells. Acta Biomater. 2017;61:41-53. [Crossref] [PubMed] [PMC]
106. 106.Mouser VH, Melchels FP, Visser J, Dhert WJ, Gawlitta D, Malda J. Yield stress determines bioprintability of hydrogels based on gelatin-methacryloyl and gellan gum for cartilage bioprinting. Biofabrication. 2016;8(3): 035003. [Crossref] [PubMed] [PMC]
107. Brown GCJ, Lim KS, Farrugia BL, Hooper GJ, Woodfield TBF. Covalent incorporation of heparin improves chondrogenesis in photocurable gelatin-methacryloyl hydrogels. Macromol Biosci. 2017;17(12). [Crossref] [PubMed]
108. Ali M, Pr AK, Yoo JJ, Zahran F, Atala A, Lee SJ. A photo-crosslinkable kidney ECM-derived bioink accelerates renal tissue formation. Adv Healtc Mater. 2019;8(7):e1800992. [Crossref] [PubMed] [PMC]
109. Yang X, Lu Z, Wu H, Li W, Zheng L, Zhao J. Collagen-alginate as bioink for three-dimensional (3D) cell printing based cartilage tissue engineering. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2018;83:195-201. [Crossref] [PubMed]
110. Jeon O, Bin Lee Y, Hinton TJ, Feinberg AW, Alsberg E. Cryopreserved cell-laden alginate microgel bioink for 3D bioprinting of living tissues. Mater Today Chem. 2019;12:61-70. [Crossref] [PubMed] [PMC]
111. Gao G, Yonezawa T, Hubbell K, Dai G, Cui X. Inkjet-bioprinted acrylated peptides and PEG hydrogel with human mesenchymal stem cells promote robust bone and cartilage formation with minimal printhead clogging. Biotechnol J. 2015;10(10):1568-77. [Crossref] [PubMed]
112. Müller M, Becher J, Schnabelrauch M, Zenobi-Wong M. Nanostructured Pluronic hydrogels as bioinks for 3D bioprinting. Biofabrication. 2015;7(3):035006. [Crossref] [PubMed]
113. Mozetic P, Giannitelli SM, Gori M, Trombetta M, Rainer A. Engineering muscle cell alignment through 3D bioprinting. J Biomed Mater Res A. 2017;105(9):2582-8. [Crossref] [PubMed]
114. An J, Chua CK, Yu T, Li H, Tan LP. Advanced nanobiomaterial strategies for the development of organized tissue engineering constructs. Nanomedicine (Lond). 2013;8(4): 591-602. [Crossref] [PubMed]
115. European Commision. Journalist Workshop on organ donation and transplantation, recent facts and figures. 2014. [Link]
116. 116.Weiner DE. Public health consequences of chronic kidney disease. Clin Pharmacol Ther. 2009;86(5):566-9. [Crossref] [PubMed] [PMC]
117. Bertram JF, Douglas-Denton RN, Diouf B, Hughson MD, Hoy WE. Human nephron number: implications for health and disease. Pediatr Nephrol. 2011;26(9):1529-33. [Crossref] [PubMed]
118. Ogunlade O, Connell JJ, Huang JL, Zhang E, Lythgoe MF, Long DA, et al. In vivo three-dimensional photoacoustic imaging of the renal vasculature in preclinical rodent models. Am J Physiol Renal Physiol. 2018;314(6):F1145-F53. [Crossref] [PubMed]
119. Long DA, Norman JT, Fine LG. Restoring the renal microvasculature to treat chronic kidney disease. Nat Rev Nephrol. 2012;8(4):244-50. [Crossref] [PubMed]
120. Maddox D. Deen WM, Brenner BM. Glomerular filtration. In: Windhager EE, ed. Handbook of Physiology Renal Physiology. Bethesda, MD: American Physiological Society; 1992. p.545-638.
121. Homan KA, Kolesky DB, Skylar-Scott MA, Herrmann J, Obuobi H, Moisan A, et al. Bioprinting of 3D convoluted renal proximal tubules on perfusable chips. Sci Rep. 2016;6:34845. [Crossref] [PubMed] [PMC]
122. Mironov V, Boland T, Trusk T, Forgacs G, Markwald RR. Organ printing: computer-aided jet-based 3D tissue engineering. Trends Biotechnol. 2003;21(4):157-61. [Crossref] [PubMed]
123. Mironov V, Kasyanov V, Drake C, Markwald RR. Organ printing: promises and challenges. Regen Med. 2008;3(1):93-103. [Crossref] [PubMed]
124. Turunen S, Kaisto S, Skovorodkin I, Mironov V, Kalpio T, Vainio S, et al. 3D bioprinting of the kidney-hype or hope? AIMS Cell and Tissue Engineering. 2018;2(3):119-62. [Crossref]
125. King SM, Higgins JW, Nino CR, Smith TR, Paffenroth EH, Fairbairn CE, et al. 3D proximal tubule tissues recapitulate key aspects of renal physiology to enable nephrotoxicity testing. Front Physiol. 2017;8:123. [Crossref] [PubMed] [PMC]
126. Higgins JW, Chambon A, Bishard K, Hartung A, Arndt D, Brugnano J, et al. Bioprinted pluripotent stem cell-derived kidney organoids provide opportunities for high content screening. BioRxiv. 2018. [Crossref]
127. George SK, Abolbashari M, Kim TH, Zhang C, Allickson J, Jackson JD, et al. Effect of human amniotic fluid stem cells on kidney function in a model of chronic kidney disease. Tissue Eng Part A. 2019;25(21-22):1493-503. [Crossref] [PubMed] [PMC]

128. Bulanova Ea, Koudan EV, Degosserie j, Heymans C, Pereira FD, Parfenov Va, et al. Bioprinting of a functional vascularized mouse thyroid gland construct. Biofabrication. 2017;9(3):034105. [Crossref] [PubMed]

129. Molitch-Hou M. From 3D Printing Circuit Boards to Organs, Nano Dimension's CEO Discusses New Bioprinting Subsidiary 2017. available from: [Link]

130. Beamish ja, Chen E, Putnam aj. Engineered extracellular matrices with controlled mechanics modulate renal proximal tubular cell epithelialization. PLoS One. 2017;12(7): e0181085. [Crossref] [PubMed] [PMC]

131. Ozbolat IT, Hospodiuk M. Current advances and future perspectives in extrusion-based bioprinting. Biomaterials. 2016;76:321-43. [Crossref] [PubMed]

132. Visconti RP, Kasyanov V, Gentile C, zhang j, Markwald RR, Mironov V. Towards organ printing: engineering an intra-organ branched vascular tree. Expert Opin Biol Ther. 2010;10(3): 409-20. [Crossref] [PubMed] [PMC]

133. Gentile C, Fleming Pa, Mironov V, argraves KM, argraves WS, Drake Cj. VEGF-mediated fusion in the generation of uniluminal vascular spheroids. Dev Dyn. 2008;237(10):2918-25. [Crossref] [PubMed] [PMC]

134. Fleming Pa, argraves WS, Gentile C, Neagu a, Forgacs G, Drake Cj. Fusion of uniluminal vascular spheroids: a model for assembly of blood vessels. Dev Dyn. 2010;239(2):398-406. [Crossref] [PubMed] [PMC]

135. Nunes SS, Krishnan L, Gerard CS, Dale jR, Maddie Ma, Benton RL, et al. angiogenic potential of microvessel fragments is independent of the tissue of origin and can be influenced by the cellular composition of the implants. Microcirculation. 2010;17(7):557-67. [Crossref] [PubMed] [PMC]

136. 136.Laschke MW, Menger MD. adipose tissue-derived microvascular fragments: natural vascularization units for regenerative medicine. Trends Biotechnol. 2015;33(8):442-8. [Crossref] [PubMed]

137. Skardal a, Mack D, Kapetanovic E, atala a, jackson jD, Yoo j, et al. Bioprinted amniotic fluid-derived stem cells accelerate healing of large skin wounds. Stem Cells Transl Med. 2012;1(11):792-802. [Crossref] [PubMed] [PMC]

138. Cui X, Breitenkamp K, Finn MG, Lotz M, D'Lima DD. Direct human cartilage repair using three-dimensional bioprinting technology. Tissue Eng Part a. 2012;18(11-12):1304-12. [Crossref] [PubMed] [PMC]

139. Campbell PG, Weiss LE. Tissue engineering with the aid of inkjet printers. Expert Opin Biol Ther. 2007;7(8):1123-7. [Crossref] [PubMed]

140. Tibbits S. 4D printing: multi-material shape change. architectural Design. 2014;84(1):116-21. [Crossref]

141. Ge Q, Dunn CK, Qi Hj, Dunn ML. active origami by 4D printing. Smart Materials and Structures. 2014;23(9):094007. [Crossref]

142. Pei E. 4D printing-revolution or fad? assembly automation. 2014;34(2):123-7. [Link]

143. Gao B, Yang Q, zhao X, jin G, Ma Y, Xu F. 4D bioprinting for biomedical applications. Trends Biotechnol. 2016;34(9):746-56. [Crossref] [PubMed]

144. Morouço P, Gil jF. Four-dimensional bioprinting for regenerative medicine: mechanisms to induce shape variation and potential applications. EMj Innovations. 2019;3(1):36-43. [Crossref]

145. Wang Cj, Hazlehurst KB. Orthopedic implant design and analysis: potential of 3D/4D bioprinting. In: Maniruzzaman M, ed. 3D and 4D Printing in Biomedical applications: Process Engineering and additive Manufacturing. Weinheim: john Wiley & Sons; 2019. p.423-42.

146. Ong CS, Yesantharao P, Hibino N. 3D and 4D scaffold-free bioprinting. In: Maniruzzaman M, ed. 3D and 4D Printing in Biomedical applications: Process Engineering and additive Manufacturing. Weinheim: john Wiley & Sons; 2019. p.317-42. [Crossref] [PubMed]

147. Liu j, Erol O, Pantula a, Liu W, jiang z, Kobayashi K, et al. Dual-gel 4D printing of bioinspired tubes. aCS appl Mater Interfaces. 2019;11(8):8492-8. [Crossref] [PubMed] [PMC]

148. Miotto M, Gouveia RM, Ionescu aM, Figueiredo F, Hamley IW, Connon Cj. 4D Corneal Tissue Engineering: achieving Time-Dependent Tissue Self-Curvature through Localized Control of Cell actuators. advanced Functional Materials. 2019:1807334. [Crossref]

149. Esmond RW, Phero GC. The additive manufacturing revolution and the corresponding legal landscape. Virtual and Physical Prototyping. 2015;10(1):9-12. [Crossref]

150. aydın L, Küçük S, Kenar H. Doku ve organ biyo yazdırma amaçlı 3B biyo yazıcı tasarımı ve geliştirilmesi. Tıp Teknolojileri ulusal Kongresi. 2015;1:153-7. [Link]

151. Bulus E, Sahin YM, Darici H, Sener LT. Investigation of the cellular behavior of polycaprolactone-hydroxyapatite tissue materials produced with bioprinter. International journal of Scientific and Technological Research. 2019;5(1):148-61. [Link]