

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS
PROGRAMI**

**ASKIDA HİDROJELLERİN SERBEST BİÇİMLİ TERSİNİR
GÖMÜLMESİ METODU İLE KARMAŞIK YAPILARIN 3 BOYUTLU
BİYOBASKILANMASI**

HAZIRLAYAN

ŞEYMA NUR YILMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA- 2023

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS
PROGRAMI**

**ASKIDA HİDROJELLERİN SERBEST BİÇİMLİ TERSİNİR
GÖMÜLMESİ METODU İLE KARMAŞIK YAPILARIN 3 BOYUTLU
BİYOBASKILANMASI**

HAZIRLAYAN

ŞEYMA NUR YILMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Dr. Öğr. Üyesi ORHAN ERDEM HABERAL

ANKARA- 2023

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı Biyomedikal Mühendisliği Tezli Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Şeyma Nur YIMAZ tarafından hazırlanan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 10 / 08 / 2023

Tez Adı: Askıda Hidrojellerin Serbest Biçimli Tersinir Gömülmesi Metodu ile Karmaşık Yapıların 3 Boyutlu Biyobaskılanması

Tez Jüri Üyeleri (Unvanı, Adı - Soyadı, Kurumu)

İmza

Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ, Başkent Üniversitesi

.....

Doç. Dr. Pelin TELKOPARAN AKILILAR, Yüksek İhtisas Üniversitesi

.....

Dr. Öğr. Üyesi Orhan Erdem HABERAL, Başkent Üniversitesi

.....

ONAY

Prof. Dr. Faruk ELALDI

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Tarih: ... / ... /

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

Tarih: 10 / 08/ 2023

Öğrencinin Adı, Soyadı: Şeyma Nur YILMAZ

Öğrencinin Numarası: 22020070

Anabilim Dalı: Biyomedikal Mühendisliği

Programı: Biyomedikal Mühendisliği

Danışmanın Unvanı/Adı, Soyadı: Dr. Öğr. Üyesi Orhan Erdem HABERAL

Tez Başlığı: Askıda Hidrojellerın Serbest Biçimli Tersinir Gömülmesi Metodu İle Karmaşık Yapıların 3 Boyutlu Biyobaskılanması

Yukarıda başlığı belirtilen Yüksek Lisans tez çalışmamın; Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç Bölümünden oluşan, toplam 61 sayfalık kısmına ilişkin, 24/ 08/ 2023 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 1’dir.

Uygulanan filtrelemeler:

1. Kaynakça hariç
2. Alıntılar hariç
3. Beş (5) kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

“Başkent Üniversitesi Enstitüleri Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Usul ve Esaslarını” inceledim ve bu uygulama esaslarında belirtilen azami benzerlik oranlarına tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceğimuhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Öğrenci İmzası:

ONAY

24 / 08/ 2023

Dr. Öğr. Üyesi Orhan Erdem HABERAL

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans sürecim boyunca sadece akademik değil aynı zamanda hayat dersleri de aldığım, bilgi ve tecrübesine sonsuz güvendiğim, bu zor yolda desteğini her zaman hissettiğim, o bitmez tükenmez enerjisiyle ve çalışma aşkıyla hayran kaldığım sayın danışman Hocam Dr. Öğr. Üyesi Orhan Erdem HABERAL'a saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmalarım boyunca yardım aldığım ve sabrı sayesinde her soruma karşılık bulduğum, akademik bilgisiyle yol gösteren sayın Hocam Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ'a, yardımları ve desteği için sayın Prof. Dr. Hakan AYHAN ve Gökhan SAĞLAM'a saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel çalışmalarımı yürütebilmem için laboratuvar olanaklarını sunan Biyotek TEKMER Genel Müdürü sayın Ali İhsan ÜNLÜ'ye, güler yüzü, samimiyeti ve her türlü yardımlarıyla yanımda olan Laboratuvar Sorumlusu Arzu GÖZAR'a saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu zorlu süreçte beraber girdiğim, kendisiyle beraber çalışmaktan gurur duyduğum, hayatımı neşelendiren ve her zaman yanımda hissettiğim biricik arkadaşlarım Ayşenur ACUNER'e ve Şems AÇAR'a teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitim hayatımın başında tanıdığım neşesi, güler yüzü ve arkadaş canlılığı ile hayatıma giren, birlikte gülüp ağlayabildiğim, bu süreçte her an yanımda hissettiğim ve benden desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen canım arkadaşım İrem Özersay'a teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans sürecimi, deneysel çalışmalarımı ve laboratuvar ortamımı keyifli hale getiren, üzüldüğümde üzülen sevindiğimde sevinen, yardımlarını hiç esirgemeyen arkadaşlarım Name PERKTAŞ'a ve Rümeyza EKİCİ'ye teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın baş kahramanları, fedakarlıklarıyla, sevgileriyle, her daim destekçilerim, her zaman yanımda hissettiğim ve onların çocuğu olmaktan gurur duyduğum biricik annem Şenay YILMAZ'a ve babam Halil YILMAZ'a, bu hayattaki en büyük destekçim, arkadaşım, canım abiciğim Rıdvan YILMAZ'a bu süreçte yanımda oldukları için teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

ŞEYMA NUR YILMAZ

ASKIDA HİDROJELLERİN SERBEST BİÇİMLİ TERSİNİR GÖMÜLMESİ METODU İLE KARMAŞIK YAPILARIN 3 BOYUTLU BİYOBASKILANMASI

**Başkent Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı 2023**

Hem rejeneratif tıpta hem de ilaç taramasında kullanılmak üzere biyo-mühendislikte kan damarlarına yönelik artan bir talep olmuştur. Bununla birlikte, gerçek bir biyo-mühendislikte vasküler greftin mevcudiyeti sınırlı kalmaktadır. Üç boyutlu (3B) biyo-baskı, transplantasyon ve rejenerasyon için çeşitli mimaride ve boyutlarda kan damarları veya vaskülarize doku yapıları üretmek için potansiyel bir yaklaşım sunmaktadır. Bazı araştırmalar, insan vücudundaki büyük boyutlu kan damarlarının 3B baskısının elde edildiğini bildirmiş olsa da, hala tamamlanmamış mikrovasküler simülasyon ve iskele malzemelerinin düşük biyouyumluluğu ve mekanik mukavemeti gibi acil olarak çözülmesi gereken bazı problemler mevcuttur. Geleneksel dikey istifleme yöntemi, düzgün olmayan boru çapı ve basılan katman sayısı(uzunluğu) gibi bazı dezavantajlara sahiptir. Bu sorunları çözmek için alternatif bir çözüme ihtiyaç vardır. Çalışmamızda alternatif çözüm olarak ekstrüde edilmiş bir 3B yazıcı kullanılarak jelatin destek banyosu içerisine içi boş damar benzeri yapı iskelelerini uygun destek banyosu formülasyonunu kullanarak basılabilirliğini test etmiştir. Aljinat, vasküler doku yapılarının ekstrüzyon biyobaskısında yaygın olarak kullanılmaktadır. Örneğin; aljinat, biyolojik olarak basılmış içi boş yapıların yapısal aslına uygunluğunu sağlamak için aynı anda verilen kalsiyum klorür (CaCl_2) çözeltisi ile fiziksel olarak çapraz bağlanabilir. Çalışmamızda biyomürekkep olarak %1'lik aljinat çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çalışmanın amacı; ekstrüde edilmiş bir 3B yazıcı kullanarak hidrojel yardımıyla damar benzeri yapı iskelelerinin basılmasını sağlamaktır. Ekstrüde edilmiş bir 3B yazıcı kullanarak FRESH method ile damar benzeri yapı iskelelerinin aljinat biyomürekkep ile biyobasımı gerçekleştirildi. Çalışmamızda iki farklı destek banyosu formülasyonu kullanıldı ve basılabilirlikleri değerlendirildi. Jelatin destek banyosu V0'da baskı sırasında şişme gözlemlendi. Bu yüzden v1 in basılabilirlik için daha uygun olduğuna karar verildi. Jelatin destek banyosu V1 ile elde edilen içi boş damar benzeri yapı iskelesinin akış testi ve çekme testi sonuçları gözlemlendi. İçi boş damar benzeri yapı iskelesinin akış testine 6 saatten daha fazla dayanıklılık gösterdiği gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: 3B biyobaskı, FRESH Metod, 3B biyoyazıcı, Damar yapıları



ABSTRACT

ŞEYMA NUR YILMAZ

3D BIOPRINTING OF COMPLEX STRUCTURES BY THE METHOD OF FREEFORM REVERSIBLE EMBEDDING OF SUSPENDED HYDROGELS

Baskent University Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biomedical Engineering

2023

There has been an increasing demand for bioengineered blood vessels for use in both regenerative medicine and drug screening. However, availability of a true bioengineered vascular graft remains limited. Three-dimensional (3D) bioprinting offers a potential approach to fabricate blood vessels or vascularized tissue structures of various architectures and sizes for transplantation and regeneration. Although some studies have reported the achievement of 3D printing of large-sized blood vessels in the human body, there are still some urgent problems to be solved, such as incomplete microvascular simulation and low biocompatibility and mechanical strength of scaffold materials. Traditional vertical stacking method has some disadvantages like uneven pipe diameter and number of layers printed. An alternative solution is needed to solve these problems. In our study, we tested printability of hollow vessel-like scaffolds into the gelatin support bath using an extruded 3D printer as an alternative solution, using appropriate support bath formulation. Alginate is widely used in extrusion bioprinting of vascular tissue structures. For example, alginate can be physically crosslinked with the concomitant calcium chloride (CaCl_2) solution to ensure structural fidelity of bioprinted hollow structures. In our study, a 1% alginate solution was prepared as a bioink. The aim of this study is to print vessel-like scaffolds with the aid of hydrogel using an extruded 3D printer. Using an extruded 3D printer, vessel-like scaffolds were bioprinted with alginate bioink using the FRESH method. In our study, two different support bath formulations were used, and their printability was evaluated. Swelling was observed during printing in the gelatin support bath V0. Therefore, it was decided that v1 is more suitable for printability. Flow test and tensile test results of hollow vessel-like scaffold obtained with gelatin support bath V1 were observed. The hollow vessel-like scaffold was observed to withstand the flow test for more than 3 hours.

Keywords: 3D bioprinting, FRESH Method, 3D bioprinter, Vascular structures



İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar LİSTESİ	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1.Damar Yapıları Ve İşlevleri	2
2.2. 3 Boyutlu Biyobaskı Teknolojisinin Gelişimi.....	5
2.3. 3B Biyobaskı.....	8
2.4. Ekstrüzyon tabanlı biyobaskı sistemi	9
2.4.1. EBB’de Hidrojel seçimi için Gereklikler.....	11
2.4.1.1. Biyouyumluluk.....	11
2.4.1.2. Biyolojik bozunma profili	11
2.4.1.3 . Biyotaklit ve mekanobiyolojik özellikler	12
2.4.1.4 . Reolojik ve baskı gereklilikleri.....	12
2.4.1.5 . Çapraz bağlama özellikleri	12
2.4.2. EBB ile uygulamalarBiyouyumluluk	13
2.5. Biyomürekkep Kavramı Ve Gelişimi.....	13
2.5.1.Biyomürekkepte kullanılan malzemeler	16
2.5.1.1. Aljinat	17
3. MATERYAL METOD.....	20
3.1. Materyal	20
3.2. Metod	20
3.2.1. Jelatin destek banyosu v0	20

3.2.2. Jelatin destek banyosu v1	22
3.2.3. Aljinat jel hazırlanması.....	23
3.2.4. CaCl ₂ Çözeltisinin hazırlanması.....	24
3.2.5. Baskı süreci	24
3.2.6. Ultimaker Cura.....	25
3.2.6.1. Ultimaker Cura dilimleme ayarları	26
3.2.7. Baskı işlemi sonrası çapraz bağlama	28
3.3. Akış Testi.....	29
3.4. Çekme Testi.....	30
3.5. Şişme Testi.....	34
3.6. Bozunma Testi	34
4. DENEYSEL BULGULAR.....	35
4.1. Basılabilirlik.....	35
4.2. Jel Karşılaştırma	37
4.3. Akış Testi.....	40
4.4. Çekme Testi.....	46
4.5. Şişme Testi.....	48
4.6. Bozunma Testi	50
5. SONUÇLAR.....	52
KAYNAKLAR.....	54

TABLÖLAR LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1. Kan damarlarının genel yapıları ve işlevleri [9].....	4
Tablo 3.1. İçi boş damar benzeri yapı için Ultimaker Cura dilimleme ayarları	26
Tablo 4.1. Altıgen için Ultimaker Cura dilimleme ayarları.....	37
Tablo 4.2. Akış testinin literatür ile karşılaştırılması.....	41
Tablo 4.3. Akış testinin 6 saat akış testine maruz bırakılması sonucu sızıntı hacim miktarları	42
Tablo 4.4. %1 viskoziteli CaCl ₂ ile çapraz bağlanmış içi boş damar yapısının sızıntı hacmi	43
Tablo 4.5. %2 viskoziteli CaCl ₂ ile çapraz bağlanmış içi boş damar yapısının sızıntı hacmi	44
Tablo 4.6. %3 viskoziteli CaCl ₂ ile çapraz bağlanmış içi boş damar yapısının sızıntı hacmi	45
Tablo 4.7. Çekme testi sonuçları	46
Tablo 4.8. Çekme testi sonuçlarını literatür ile karşılaştırma.....	47
Tablo 4.9. Şişme testinin literatür ile karşılaştırılması	48
Tablo 4.10. Saf su ile yapılan şişme testi sonuçları.....	48
Tablo 4.11. Gliserin ile yapılan şişme testi sonuçları	49
Tablo 4.12. Şişme testinin literatür ile karşılaştırılması	50
Tablo 4.13. Saf su ile yapılan şişme testi sonuçları.....	50
Tabla 4.14. Gliserin ile yapılan şişme testi sonuçları	51

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1. Damar yapısı [8].....	3
Şekil 2.2 3B baskı teknolojisinin biyomedikal uygulamalarda gelişimi [23].....	6
Şekil 2.3. 3B biyobaskıda üç ana adımı gösteren şematik diyagram: Ön işleme, İşleme ve İşlem Sonrası [25].	7
Şekil 2.4. 3B Biyobaskı ana akımları ve alt türleri hakkında şematik diyagram[25]	9
Şekil 2.5. Ekstrüzyon tabanlı biyobaskı	10
Şekil 2.6. EBB’de pnömatik, mekanik pistonlu ve mekanik vidalı tabanlı sistem baskısı [33]	11
Şekil 2.7. Hidrojellerin sınıflandırılması [52]	15
Şekil 2.8. Aljinatta G bloğu, M bloğu ve alternatif bloğun kimyasal yapıları [70]	18
Şekil 3.1. 1. Adımdan sonra jelin görünümü	20
Şekil 3.2. 2.Adımdan sonra jelin görünümü.....	21
Şekil 3.3. 3.ve 4. Adımdan sonra jelatin solisyonunun görünümü.....	21
Şekil 3.4. 5. Adımdan sonra jelatin solisyonun son görünümü	22
Şekil 3.5. Jelin son görünümü	22
Şekil 3.6. Jelin Falcon tüplerinde görünümü.....	23
Şekil 3.7. Aljinat çözeltisinin mor gıda boyası eklenmiş görünümü	23
Şekil 3.8. Autodesk Fusion 360 programı ile çizilmiş olan içi boş damar benzeri yapı iskelesi.....	24
Şekil 3.9. İçi boş damar benzeri yapı iskelesi şeklinin Ultimaker Cura programında görünümü	25

Şekil 3.10. İçi boş damar benzeri yapı iskelesi şeklinin Ultimaker Cura programında üstten görünümü a) Duvar kalınlığı 0.4 mm seçildiğinde b) Duvar kalınlığı 0.8 mm seçildiğinde	26
Şekil 3.11. Baskı hızı ve hareket hızının değişimine göre baskının görünümü a) Baskı hızı hareket hızına göre daha hızlı olduğunda b) baskı hızı hareket hızına göre daha yavaş olduğunda c) Baskı hızı ve hareket hızı birbirine uygun olacak şekilde ayarlandığında	27
Şekil 3.12. İçi boş damar benzeri yapı iskelesi şeklinin Ultimaker Cura programında üstten görünümü a) dolgu doygunluğu %0 b) dolgu doygunluğu %20	27
Şekil 3.13. Tablo 3.1'deki baskı parametrelerine göre içi boş damar benzeri yapı iskelesi şeklinin Ultimaker Cura programında üstten görünümü	28
Şekil 3.14. Akış testi düzeneği	29
Şekil 3.15. içi boş damar benzeri yapının kelepçe yardımı ile akışın çıkışına sabitlemesi	30
Şekil 3.16. Wh-a08 sabitlemek için Fusion 360 programında çizilen başlık a) başlığın önden görünümü b) başlığın arkadan görünümü	31
Şekil 3.17. Wh-a08'i sabitlemek için Fusion 360 programında çizilen başlığın 3b baskı sonrası çıktısı	31
Şekil 3.18- 3B yazıcıdan baskısı alınan başlık ve Wh-A08.....	32
Şekil 3.19. Çekme testi için kurulan düzenek	32
Şekil 3.20. İçi boş damar yapısının çekme testi için krokodil uçlarına yerleşimi	33
Şekil 3.21. İçi boş damar benzeri yapısının çekme testi sırasında kopma aşamalarının gösterimi	33

Şekil 4.1. İçi boş damar benzeri yapı iskelesinin Fresh metod kullanılarak yapılan baskı işlemi.....	35
Şekil 4.2. İçi boş damar benzeri yapı iskelesinin jelatin destek banyosundan çıkarıldıktan sonraki görüntüsü.....	35
Şekil 4.3. İçi boş damar benzeri yapı iskelesinin çapraz bağlandıktan sonra bir cımbız yardımıyla tutularak gösterimi.....	36
Şekil 4.4. İçi boş damar benzeri yapı iskelesinin çapraz bağlandıktan sonra uzunluğu	36
Şekil 4.5. Altıgenin Cura Ultimaker Slicer programında görünümü	37
Şekil 4.6. Altıgenin Jelatin destek banyosu v0 ile basıldıktan sonra CaCl ₂ içindeki görünümü.....	38
Şekil 4.7. Jelatin destek banyosu v0 ile basılan altıgenin çapraz bağlanma işleminden sonraki görünümü	38
Şekil 4.8. Altıgenin jelatin destek banyosu v1 ile basıldıktan sonra CaCl ₂ içindeki görünümü	39
Şekil 4.9. Jelatin destek banyosu v0 ile basılan altıgenin çapraz bağlanma işleminden sonraki görünümü.....	39
Şekil 4.10. Akış testinde içi boş damar benzeri yapıdan gliserinin geçtiği an.....	40
Şekil 4.11. İçi boş damar benzeri yapının akış testinden önceki ve 6 saat akışa maruz bırakıldıktan sonraki görüntüsü	41
Şekil 4.12. 15 dk ara ile ölçülen %1, %2 ve %3 viskoziteli CaCl ₂ ile çapraz bağlanmış içi boş damar yapılarının sızıntı hacmi/süre grafiği.....	46
Şekil 4.13. Saf su ve gliserinin şişme oranı/süre grafiği	49

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABS	Akrilonitril Bütadien Stiren
AM	Eklemeli Üretim
Ba 2+	Baryum İyonu
°C	Derece
Ca+2	Kalsiyum İyonu
CaCl ₂	Kalsiyum Klorür
cm	Santimetre
CT	Bilgisayarlı Tomografi
DECM	Hücesizleştirilmiş Hücre Dışı Matris
DIW	Deiyonize Su
EBB	Ekstrüzyon Tabanlı Biyobaskı
ECM	Hücre Dışı Matris
M	Molar
mg/mL	Mililitre Başına Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
MRI	Manyetik Rezonans Görüntüleme
PBS	Fosfat Tamponlu Salın
PBT	Polibütilen Tereftalat
PCL	Poli Kaprolakton
PDLLA	Poly-D,L-Lactic Asit
PEEK	Polieter Eter Keton
PEG	Polietilen Glikol
PGA	Poli-glikolik asit
pH	Potansiyel Hidrojen
PLA	Polilaktik Asit
PLGA	Polilaktik-Ko-Glikolik Asit
PU	Poliüretan
PVA	Poli-Vinil Alkol
RFC	Göreceli Santrifüj Kuvveti
RPM	Dakikadaki Devir Sayısı

SA

Sodyum Aljinat

3B

Üç Boyutlu



1.GİRİŞ

Koroner arter hastalığı ve periferik arter hastalığı, 2030 yılı itibariyle çeyrek milyon insanın ölümüyle sonuçlanacağı tahmin edilen dünya çapında önde gelen ölüm ve hastalık nedenleridir [1]. Anjiyoplasti, stent implantasyonu ve cerrahi baypas cerrahisi sıkça uygulanan revaskülarizasyon yöntemleridir [2]. Esas olarak internal meme arteri veya juguler ven olmak üzere doğal arterlerin veya venlerin kullanımı, koroner ve periferik vasküler hastalık gibi vasküler hastalıklar için baypas cerrahisinde altın standart olmaya devam etmektedir [2]. Bununla birlikte, bozulmamış otolog damarlar her zaman mevcut olmadığından, invaziv hasat gerektirir ve düşük uzun vadeli açıklık oranlarına sahiptir [3, 4].

Vasküler biyomühendislikte kaydedilen ilerlemeyle, üç boyutlu (3B) biyobaskı, vasküler hastalığı in vivo büyütme, yeniden şekillendirme ve onarma yeteneğine sahip kan damarları oluşturmak için potansiyel bir yaklaşım olarak ortaya çıktı. Biyomimetik kan damarlarını imal etmek için son yıllarda farklı 3B biyobaskı teknikleri ve stratejileri araştırılmış ve oluşturulmuştur ve sürekli olarak iyileştirilmekte ve geliştirilmektedir [5] .

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Damar Yapıları Ve İşlevleri

Damarlar, besin maddelerini organlara/dokulara, atıkları ise kanda organlardan/dokulardan uzaklaştırmak için taşırlar. Damar sisteminin asıl amacı ve önemli rolü vücudun oksijenlenmesine katılmaktır. Periferik damarlardan gelen oksijensiz kan, kılcal damarlardan kalbe, venüllere, damarlara, kalbin sağ tarafına ve tekrar akciğerlere gider. Akciğerlerden gelen oksijenli kan, aort tarafından kalbin sol tarafına, ardından arterlere, arteriyollere ve son olarak da besin alışverişinin yapıldığı kılcal damarlara taşınır. Oksijen ve besinlerin yüklenmesi ve boşaltılması esas olarak kılcal damarlarda gerçekleşir [6]. Aort, vücudumuzdaki en büyük kan damarı özelliğini taşır ve oksijence zengin olan kanı kalpten alarak vücudun diğer kısımlarına iletir. Aort, arterler. Arterioller sonunda küçük kılcal damarlara ayrılır; kan ve yerel dokular arasında oksijen, besin, karbondioksit ve diğer metabolizma kalıntılarının difüzyonunu sağlayan en küçük kan damarlarıdır [7].

Kılcal damarlar, tek bir endotel tabakasından oluşan ince duvarlı kan damarlarıdır. Kılcal damarların ince duvarları nedeniyle, besinlerin ve metabolitlerin değişimi esas olarak difüzyonla gerçekleşir. Arteriyoler lümenler, kılcal damarlardan kan akışını düzenler [6]. Arterler ve kan damarları değişik görevlerde yer almalarına rağmen birbirine benzeyen duvar yapılarına sahiptirler, üç farklı katmandan ve farklı hücresel, hücre dışı matris (ECM) bileşenlerinden oluşur, bunlar; iç intima, medya ve dış adventisya [8].

Tablo 2.1. Kan damarlarının genel yapıları ve işlevleri [9]

Kan damarı	Duvar katmanı	Özellik	İşlev
Arterler/damarlar	Tunica adventitia	En dıştaki tabaka, damarlarda daha kalın	Hücre kaçakçılığında, bağışıklık yanıtı aracılığında ve vasküler yeniden yapılanmada önemli bir rol oynar
	Tunica ortamı	Orta tabaka, atardamarlarda toplardamarlardan çok daha kalındır	Damarların vazokonstriksiyonu ve vazodilatasyonunu kontrol ederek kan akışını ve basıncını düzenler.
	intima tabakası	En içteki ve en ince katman	Yarı geçirgen zar ve ısıya dayanıklı duvar oluşturarak kan damarının yapısal bütünlüğünü sağlar; ayrıca kan akışını ve damar tonunu kontrol eder
Kılcal damarlar	intima tabakası	Son derece ince tek katman	Kan ve yerel doku ortamı arasında oksijen, besinler, karbondioksit ve metabolik atıkların difüzyonu için yarı geçirgen bir zar sağlar.

Daha büyük yapay doku üretimi ve hastalara doku implantasyonu amacıyla, mevcut araştırma fonksiyonel, yapay kan damarı sistemlerinin in vitro üretimine odaklanmaktadır. Ayrıca, küçük çaplı vasküler greftlerin eksikliği, yeni tedavilere yönelik vasküler yapılar oluşturabilecek teknoloji ve materyallerin araştırılmasına yol açmıştır [10].

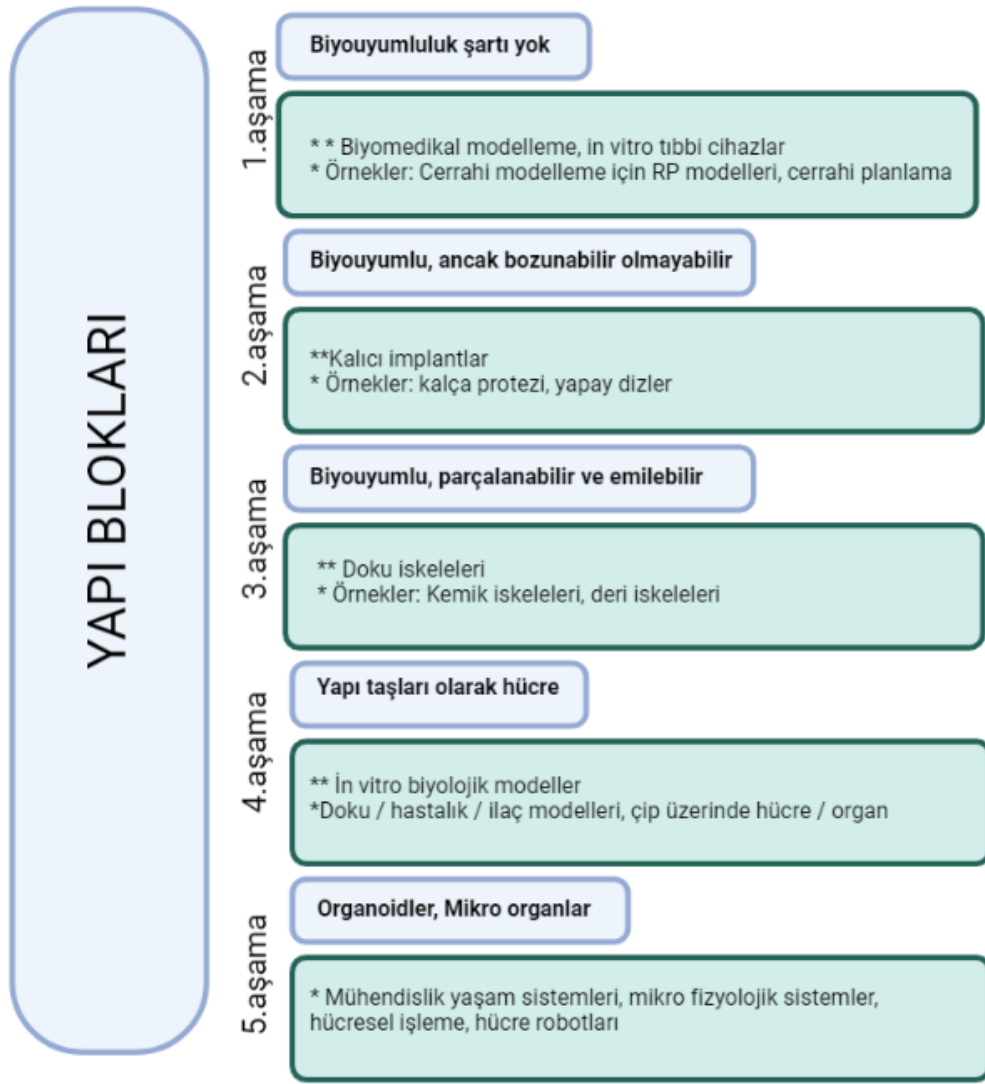
Halihazırda kullanılan bir yaklaşım olarak, hücrel stratejiler, (kendi kendine bir araya gelen) vasküler hücreler tarafından anjiyogenezi oluşturma stratejisine dayanır ve oluşumu teşvik eder. Örneğin Moya ve ark . 'arteriyel' ve 'venüler' kanallar arasında yeterli basınç düşüşlerini ayarlarken, mikroakışkan bir cihazın parçası olarak birbirine bağlı ve perfüze

edilebilir bir insan kılcal damar ağı oluşturmak için EC'lerin düzeneğini göstermişlerdir [10]. Mikroakışkan cihaz tarafından sağlanan tanımlanmış giriş ve çıkış dallarının kombinasyonu ile cihaz içinde gerçek bir kılcal ağ oluşumu in vitro olarak perfüze vasküler ağlar sağladı, ancak mevcut haliyle 3B dokunun birleştirilmesi veya canlıya implantasyon için kullanışlı değil organizmalar. İn-vivo ile ilgili olarak yapay doku uygulamasında, Tremblay ve diğerleri tarafından yapılan ilk çalışmalarda gözlemlenmiştir [11]. Örneğin Nunes ve ark. kılcal damar fragmanları içeren doku yapılarının implantasyon üzerine bir konakçının doğal vasküler sistemine bu tür vasküler ön yapılara sahip olmayan dokulardan çok daha hızlı bağlandığı. Ayrıca, bu tür yapılar in vitro sürekli tübüler vaskülatörü sağlamaz ve bu nedenle 3D TE için gerekli olan çevreleyen hücreleri sağlamak için kullanılamaz [12].

Bu nedenle, hem iyi tanımlanmış giriş ve çıkış dalları hem de mükemmel hidrodinamik için biyomimetik damar geometrisine sahip kılcal benzeri bir ağ, perfüze vaskülarize dokular oluşturmak için temel bir gereklilik gibi görünmektedir [13].

2.2. Boyutlu Biyobaskı Teknolojisinin Gelişimi

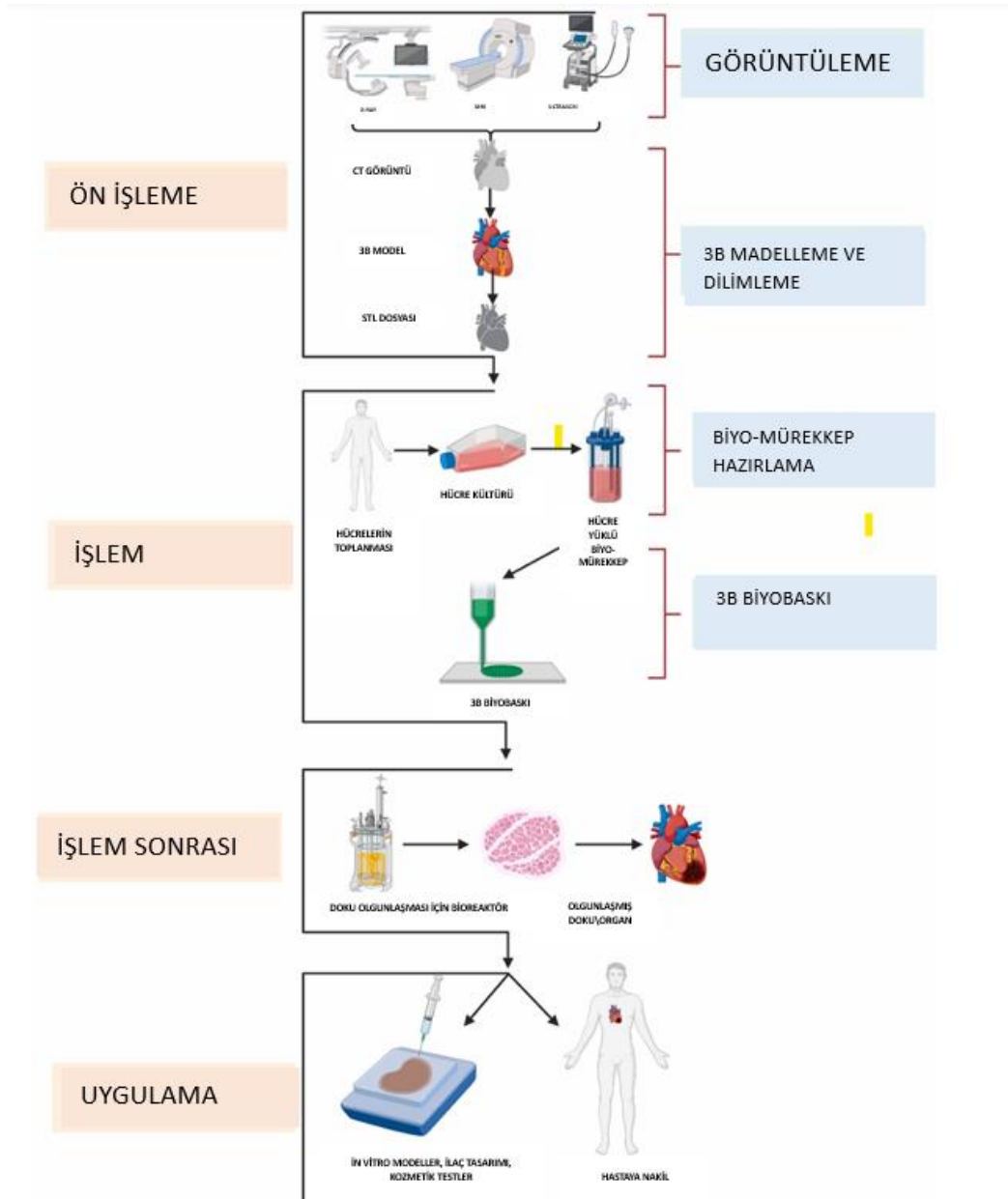
Hızlı prototipleme teknolojisi olarak da bilinen 3B baskı teknolojisi 1980'lerde icat edildi, dijital modelleri dilimler halinde taramak ve ardından 3B geometri oluşturmak ve katman katman yazdırmak için bilgisayar destekli üretim teknolojisini kullanan yeni bir teknolojidir [14, 15]. Bu teknolojinin yaşam bilimi ve tıpta uygulanması, özelleştirilmiş model, insan kalıcı implantları, biyomimetik yapı iskeleleri, ilaç test modeli ve kontrollü ilaç salımı modern biyomedikal uygulamalarda giderek daha önemli bir rol oynamaktadır [16, 17, 18]. 3D biyobaskı teknolojisi, sıradan 3B baskı teknolojisinden farklı olarak, doku ve organların 3 boyutlu modellerini oluşturmak için bilgisayar destekli tasarım yazılımı uygular ve üretilen bilgiyi iletir [19]. 3D biyobaskının temel amacı, belirli bir hücre tipinin hücre dışı matrisi olarak bilinen doğal mikro ortamı eski haline getirmektir. Bir yandan hücreleri desteklemek için mekanik bir iskele sağlayan, diğer yandan hücrelerin düzgün çalışmasını ve refahını sağlayan karmaşık bir biyokimyasal ortam sağlayan 3 boyutlu bir yapıdır [20,21,22].



Şekil 2.2 3B baskı teknolojisinin biyomedikal uygulamalarda gelişimi [23]

Biyomedikal bilimde canlı formdan cansız forma geçişte 3 boyutlu baskı teknolojisinin ilerleyişi farklı hammaddelerin ve basılı ürünlerin özelliklerine göre, beş aşamaya ayrılır [23]. İlk aşamadaki amaç in vitro tıbbi cihazlar gibi aletler ve vücut ile teması olmayan, yüksek biyouyumluluk özelliği aranmayan cerrahi modeller basmaktır. İkinci aşama, bir miktar biyouyumluluk gerektiren ancak mutlaka bozulma gerektirmeyen kalça protezleri ve yapay dizler gibi 3B baskılı vücutta kalıcı implantlardan oluşur. Üçüncü aşama, standart bir iskele özellikli doku mühendisliği çalışmalarında olduğu gibi 3 boyutlu baskılı yapıların hücre büyümesi ve doku oluşumu için iskele görevi gördüğü aşamadır. Doku mühendisliği iskele çalışmalarında kullanılan materyaller, dokunun oluşumu ve penetrasyonuna göre biyouyumlu, parçalanabilir ve emilebilir olmalıdır. Dördüncü adımda,

canlı hücreler biyomimetik dokular ve organlar basmak için doğrudan yapı taşlarının üzerine basılır. 3B biyobaskı, rejeneratif tıp ve farmasötiklerde kullanılmak üzere in vitro biyolojik ürünlerin doğrudan üretilmesini sağlar. Son zamanlarda biyomedikal uygulamalarda 3B baskı teknolojisi, organoidlerin kullanıldığı beşinci aşamaya kadar ilerlemiştir. Alternatif olarak, mikroorganizmalar karmaşık in vitro biyolojik ve ya mikro fizyolojik sistemler oluşturmak için tasarlanır ve bir araya getirilir. Bu inceleme, 3B baskı sürecinde canlı hücrelerin varlığının ayırt edici bir özellik olduğu 4. aşama ve ötesine odaklanacaktır [24].



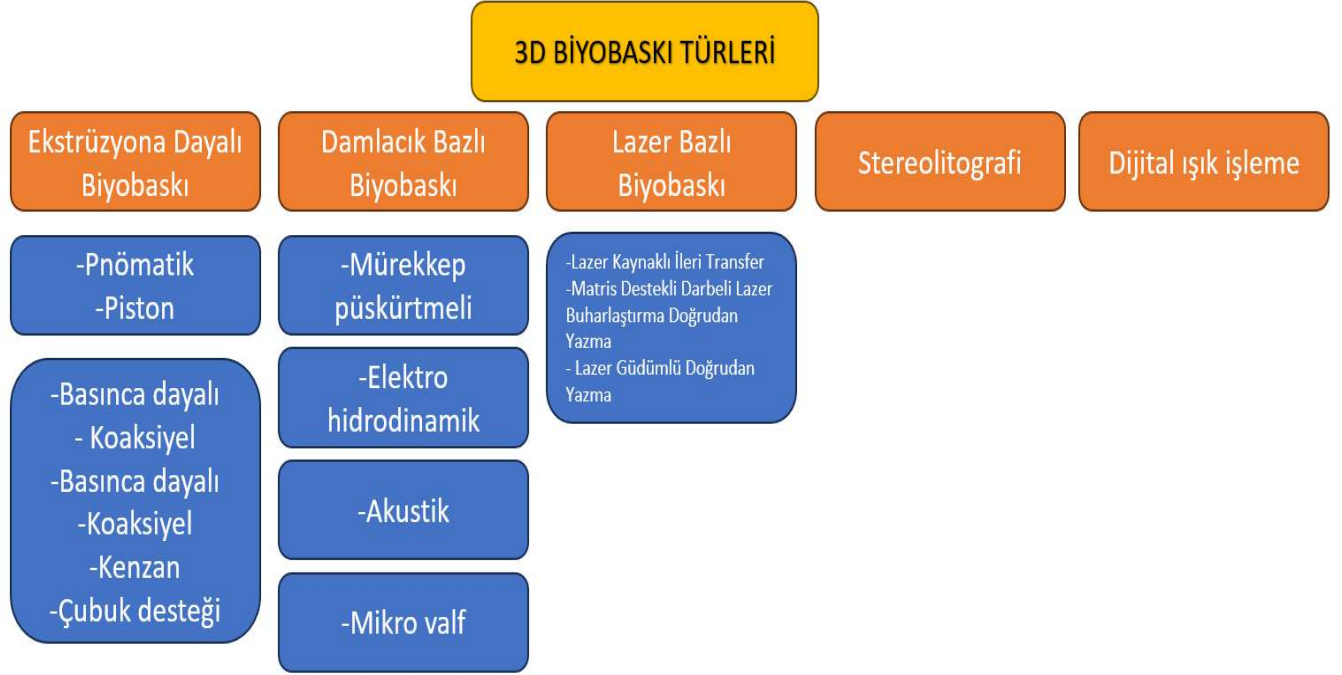
Şekil 2.3. 3B biyobaskı için kullanılan üç temel yolu gösteren şematik diyagram: Ön işleme, İşleme ve İşlem Sonrası [25].

Biyobaskı'nın üç ana adımı vardır: CT (Bilgisayarlı Tomografi), MRI (Manyetik rezonans görüntüleme), X-ışını veya ultrason, 3B modelleme ve segmentasyon kullanılarak ilgili organın görüntülenmesinden oluşan ön işleme. 3B yazıcı için kullanılacak uygun bir uygun biyomürekkebin hazırlanması. İşlem sonrası, burada biyobaskılanmış organın olgunlaşması. 3B biyobaskı üç ana yaklaşıma sahiptir: (i) biyomimik veya biyomimetik, (ii) otonom kendi kendine montaj ve (iii) mini doku yapı taşları. Şekil 2.3'te 3B biyobaskının ana ilkesi özetlenmiştir [25].

2.3. 3B Biyobaskı

Biyobaskı, doku benzeri yapılar üretmek için biyomürekkebin kontrollü olarak biriktirilmesiyle gerçekleştirilen bir katkılı üretim stratejisidir. Çoğu durumda, biyomürekkep, ilaçların veya biyolojik faktörlerin eklenebildiği canlı hücrelere sahip iskele malzemesinden yapılır [26].

Biyobaskı birkaç farklı süreçten oluşur (Şekil 2.4) ve genel olarak dört kategoriye ayrılabilir: a) Lazer tabanlı biyobaskı, (b) Ekstrüzyon tabanlı biyobaskı, (c) Damlacık tabanlı biyobaskı ve (d) Stereolitografi . En yaygın kullanılan 3B biyobaskı teknolojisi, çok yönlülüğü ve maliyet etkinliği nedeniyle ekstrüzyon tabanlı biyobaskıdır. Ekstrüzyon biyobaskı, bir mikro nozul aracılığıyla hidrojel ile karıştırılmış hücrelerden oluşan sonsuz filament malzeme dağıtarak 2D veya 3B yapılar oluşturur. Ekstrüzyon tabanlı biyobaskı, sıvı dağıtım sisteminin farklı modlarına bağlı olarak üç türe ayrılabilir: pnömatik, pistonlu ve vidalı. Pnömatik tahrikli ekstrüzyon sistemlerinde basınçlı hava kullanılırken, vidalı tip daha yüksek hacim kontrolüne ve yüksek viskozitel biyomateryallerin ekstrüzyonuna olanak tanır[27 ,28].

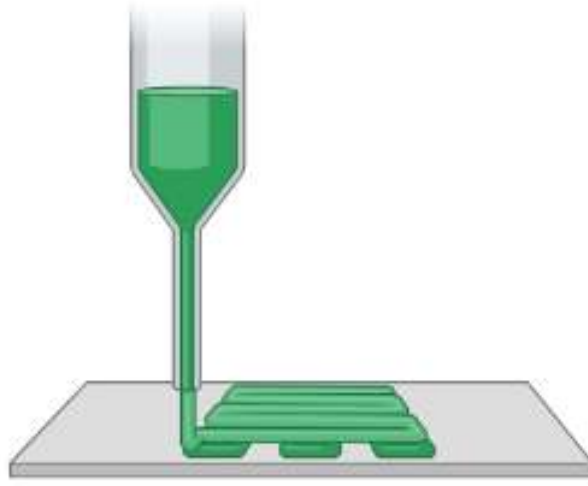


Şekil 2.4. 3B Biyobaskı ana akımları ve alt türleri hakkında şematik diyagram [25].

2.4. Ekstrüzyon Tabanlı Biyobaskı Sistemi

Biyofabrikasyondaki ana eklemeli üretim yöntemleri ekstrüzyon, damlacık biriktirme, lazer destekli ve stereolitografidir. Bu teknolojiler arasında ekstrüzyon tabanlı biyobaskı (EBB) en yaygın kullanılan teknolojilerden biridir [29]. Ekstrüzyon tabanlı biyobaskı, kontrollü mikro mimariye sahip 3 boyutlu yapılar oluşturmak için hidrojel, biyomoleküller ve canlı hücreleri manipüle etmek için geliştirilmiş Biyomedikal uygulamalar için eklemeli üretim (AM) tekniğidir [30].

Stereolitografi, mürekkep püskürtmeli biyobaskı veya lazer destekli biyobaskı gibi diğer tekniklerle karşılaştırıldığında EBB, kullanım kolaylığı, düşük maliyeti, ölçeklenebilirliği ve geniş çapta yazdırılabilir malzeme yelpazesi nedeniyle en yaygın ve erişilebilir biyobaskı teknolojisidir [31].



Şekil 2.5. ekstrüzyon tabanlı biyobaskı

Ekstrüzyon tabanlı biyobaskı yöntemleri, biriktirme mekanizmasına bağlı olarak üç kategoriye ayrılabilir: pnömatik, mekanik (pistonlu veya vidalı) ve solenoid. EBB'ler yüksek hızlı biriktirme ve baskı kapasitesine sahiptir ve nispeten kısa bir süre içinde ölçeklendirilebilir. Ek olarak, EBB ayrıca hücreler, hücre kümeleri, hücre yüklü hidrojeller, mikro taşıyıcılar ve hücre matris bileşenleri gibi çeşitli biyomalzemelerin biyobaskısını da yapabilir. Bununla birlikte, diğer teknikler yalnızca hücre yüklü hidrojellerin baskılanmasını kolaylaştırabilir [32].



Şekil 2.6. EBB’de pnömatik, mekanik pistonlu ve mekanik vidalı tabanlı sistem baskısı [33]

2.4.1. EBB’de hidrojel seçimi için gereklilikler

2.4.1.1. Biyouyumluluk

Biyouyumluluk, bir biyomateryalin, istenen bir işlevi olumsuz biyolojik etkilere neden olmadan yerine getirme kabiliyetini ifade eder [34].

2.4.1.2. Biyolojik bozunma profili

Biyobaskı uygulamalarında hidrojellerin başarısı, biyomalzemenin temel fizikokimyasal özelliklerine, yeterli mekanik desteğe, doku onarımı ve büyümesi için uygun ortama, taşımaya ve/veya tanımlanmış farmakokinetik salınımına ve fizyolojik olarak ilgili zaman ölçekleri boyunca biyolojik stabiliteye bağlıdır [35].

2.4.1.3. Biyotaklit ve mekanobiyolojik özellikler

Doku mühendisliği alanında, doğal hücre dışı matrisin (ECM) davranışını ve reaksiyonlarını taklit etme girişimlerine biyomimikri denir. ECM, kendisini sürekli olarak yeniden şekillendiren, büyüme, göç ve farklılaşma faktörleri ve hücre yönelim faktörlerini ifade eden yüzlerce protein ve karbonhidrattan oluşan karmaşık, dinamik bir çevredir [36,37]. Mekanobiyoloji alanı, hücre yapışmasını, şeklini ve proliferatif kapasitesini önemli ölçüde etkileyen aktif bir hücresel mikroçevre yaratarak fiziksel kuvvetlerdeki ve mekanik özelliklerdeki değişikliklere odaklanmaktadır [38].

2.4.1.4. Reolojik ve baskı gereklilikleri

2013 yılında, 3B yapıların şeklini korumak için yeterince dirençli olmasını sağlarken aynı zamanda hücrenin hayatta kalmasını ve büyümesini desteklemek için yeterli mikro ortam sağlayan biyomürekkep yazdırılabilir bir alan olarak bir "biyofabrikasyon penceresi" kavramı tanıtıldı. Bu özellikler, biyofabrikasyonun ve biyobaskılamanın karmaşıklığını ve zorluğunu yansıtır [39].

2.4.1.5. Çapraz bağlama özellikleri

Çapraz bağlama, bitişik ve üst üste binen polimer zincirleri arasındaki karmaşık etkileşimler yoluyla yarı katı haller oluşturan, mekanik özellikleri, biyolojik ve fizikokimyasal özellikleri ve genel hidrojel işlevselliğini önemli ölçüde etkileyen önemli bir süreçtir. EBB'lerin genellikle iyi bir şekil doğruluğu elde etmek için ekstrüzyondan hemen sonra jelleşmeye başlaması gerekir [40].

Çapraz bağlama mekanizması biyoyumlu olmalı ve jelleşmiş yapı, istenen uygulamada beklenen fizyolojik koşullara (örn. sıcaklık, iyonik güç ve pH) benzer sulu bir ortamda kararlı olmalıdır. Biyo mürekkebin çapraz bağlanma yoğunluğu, ilk basılı katmana yeterli mekanik mukavemet sağlamak ve ortaya çıkan yapı çökmeden önce sonraki katmanları desteklemek için yeterli olmalıdır [41].

2.4.2. EBB ile uygulamalar

Son on yılda, biyomedikal araştırma ve geliştirmede EBB tabanlı 3B biyobaskı teknolojisinin uygulanması geniş çapta rapor edilmiştir.

Yun Chu ve arkadaşları kıkırdak doku mühendisliği için çift çapraz bağlı bir ALG hidrojel geliştirdi. Sonuçlar, hidrojinin stabil olduğunu, yüksek mukavemete ve reolojik özelliklere sahip olduğunu, oda sıcaklığında mükemmel sıkıştırılabilirlik sağladığını ve EBB'yi destekleyerek düşük basınçlarda hücre canlılığını iyileştirdiğini göstermiştir [42].

Noor ve arkadaşlarının hasta hücreleri ve biyolojik materyaller kullanarak gerçekleştirdiği 3B biyobaskılı kalp, son yıllardaki en önemli gelişmelerden biri olmuştur. Bu gelişme, elverişli, doğala yakın bir anatomik yapıda organ replasmanı ve ilaç testleri için yeni yöntemlerin önünü açmıştır. Burada destek veya destek ortamı kavramı tanıtılmaktadır. Oldukça büyük boyutlara ve yüksek karmaşıklığa sahip organların veya dokuların basılması gerektiğinde, hidrojinin kendisi ağırlığı taşıyamaz [43].

Liu ve meslektaşları hızlı ve sürekli bir çoklu malzeme ekstrüzyon biyoyazıcı geliştirdiler. Aynı boyutta yedi kanal içeren tek bir baskı kafasına doğru yönlendirilmiş ortogonal bir robot aşaması ve çoklu biyoenjektör odalarından oluşur. Bu, nozulları değiştirmek zorunda kalmadan yedi adede kadar farklı biyomürekkebin basılabileceği anlamına gelir[44].

Son olarak, 3B biyobaskı ilaç ve eczacılık endüstrilerindeki gelişmelere de uygulanabilir. Çok geniş bir teknoloji olarak, kontrollü salım formülasyonları ve ilaç kombinasyonları da olmak üzere çok çeşitli tanımlanmış salım profilleri ve özel olarak tasarlanmış polimer (ilaç) matrisleri hazırlanabilir [45].

EBB'nin diğer 3B baskı yöntemlerine göre başlıca avantajları şunlardır: (1) çok çeşitli hidrojeller ve hücre tipleri kullanarak doku iskeleleri üretme yeteneği; (2) fizyolojik hücre yoğunluğuna sahip biyomalzeme katmanlarını tasarlanmış bir şekilde biriktirme yeteneği; (3) diğer yöntemlere kıyasla nispeten daha az işlem kaynaklı hücre hasarı ve (4) bu teknolojiyle ilişkili uygulama ekipmanının ve hidrojellerin ekonomik yönleri ve ticari kullanılabilirliği [46].

2.5. Biyomürekkep Kavramı ve Gelişimi

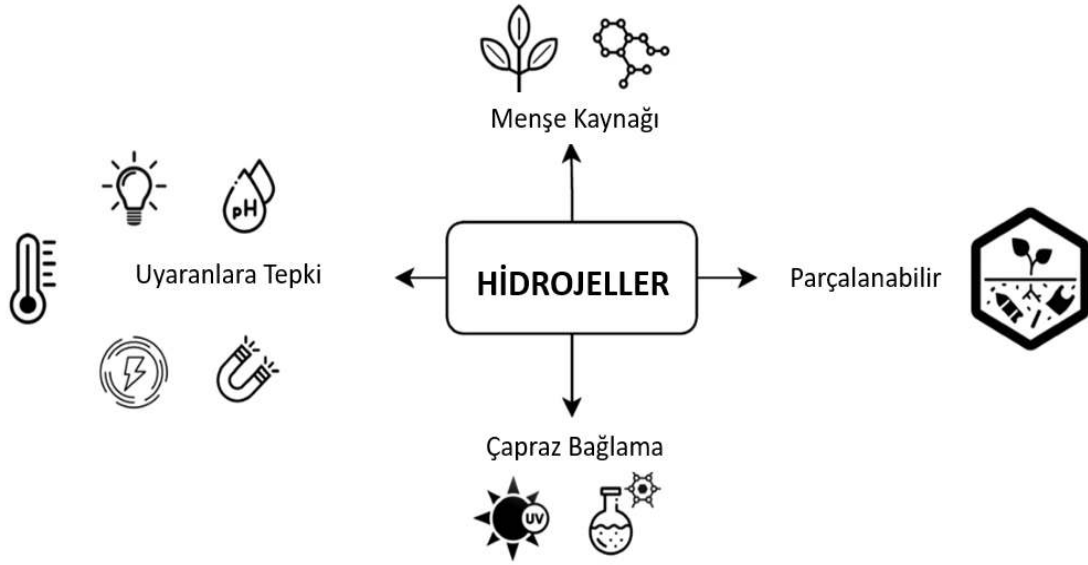
3 boyutlu biyobaskı, biyomürekkep kullanılarak üç boyutlu bir yapının üretildiği bir üretim teknolojisidir[47]. 3B biyobaskı işleminde biyomürekkep, baskı sırasında yüklenen hücreler için bir taşıyıcı görevi görür, hücrelerin, biyomalzemelerin ve biyolojik olarak aktif

ajanların bir karışımıdır, basılan hücrelerin hayatta kalmasını, baskı sonrası hücrelerin büyümesini, doğruluğunu belirler. Biyomürekkepler, hücreler veya hücrelerin etrafına sarılmış malzeme kompleksleri olabilir [48], [32]. Karmaşık bir üç boyutlu yapı oluşturmak için termoplastiklerin eritilmesi ve kürlenmesi yoluyla 3B baskı teknolojisinin hücrenin hayatta kalması için uygun olmadığı göz önüne alındığında [23, 49], canlı hücrelerin basılması için kullanılan biyomürekkepler genellikle baskı sırasında hücreleri koruyan ve hücrelerin yayılabilmesi, büyüebilmesi ve çoğalabilmesi için hücre yapışma yerleri sağlayan biyomakro moleküller tarafından oluşturulan jellerdir [50] .

Biyomürekkep terimi, 3B veya biyomalzemelere gömülü hücreler veya hücre agregaları anlamına gelir. Ayrıca, biyobaskı alanında, biyomürekkepler (yani hücre yüklü) ve biyomateryal mürekkepler (hücresiz) arasında ayırım yapmak gereklidir. Bu sebeple, biyomürekkepleri oluşturan biyometeryaller, formülasyon ve biyobaskı işlemi sırasında hücreleri taşımak için hücre taşıyıcıları görevi görmelidir, oysa biyomalzeme mürekkepleri basılabilir, ancak hücreler yalnızca baskıdan sonra tohumlanır. Bu nedenle, biyomalzeme mürekkepler biyomürekkep olarak nitelendirilmez, çünkü hücreler genellikle biyo-baskılı biyomalzeme iskelesinde ayrı bir ekim işleminde tanıtılır [47].

Hidrojeller, baskılı ince kağıtların mekanik ve üç boyutlu stabilitesinde çok önemli bir rol oynar. Biyomürekkep olarak hidrojellerin en önemli özelliklerinden biri de belirli şartlar altında sıvıdan katı hal arasındaki geçişi tamamlayarak baskı işlemini tamamlayabilmeleridir çünkü geçiş şartları 3B biyobaskı yöntemini etkiler. Varolan araştırma, hücre çoğalmasına izin vermek için boyutsal kararlılığı ve biyoyumluluğu devam ettirmek için yeterli reolojik özelliklere sahip biyomürekkep materyalleri ve formülasyonları tasarlamaya odaklanmıştır [51]

Hidrojeller, Şekil 2.7'de açıklandığı gibi menşei, bozunabilirlik, çapraz bağlama yöntemleri ve uyaranlara tepki temelinde ayrılabilir. Doku mühendisliğini potansiyel bir uygulama olarak hedeflerken dikkate alınması gereken bir diğer önemli husus Hidrojellerin parçalanabilirliğidir [52]. Biyomedikal alanında, özellikle doku mühendisliği ve kemik mühendisliğinde çeşitli imalat yöntemleri kullanılarak gerekli 3 boyutlu şekil ve boyutta üretilebilir [53]. Hidrojellerden yapılan iskeleler, yara iyileşmesi ve doku rejenerasyonu sırasında hücre büyümesini, organizasyonunu ve göçünü destekler. Ek olarak, hücre kapsüllemesi için hidrojeller uygun bir malzemedir [54].



Şekil 2.7. Hidrojellerin sınıflandırılması [52].

Hidrojeller yaygın olarak 3B hücre iskeleleri oluşturmak için kullanılır. Hücre dostu bir ortam sunan hidrofilik bir polimer ağdan yapılmıştır. Çapraz kovalent bağlardan veya elektrostatik etkileşimlerden kaynaklanan bağların oluşumu, elde edilen çapraz bağlı hidrojellerin mekanik özelliklerini belirler [55]. Çoğu baskı malzemesi arasında hidrojeller; fiziksel kuvvetler veya kimyasal bağlar tarafından oluşturulan bir 3B ağ polimerleri sınıfıdır. Suda şişebilirler ancak suda çözünmezler. Birkaç hidrojel, geçirgen bir yapıya sahip olduğu için doğal hücre dışı matris (ECM) benzerdir. Bu yapı, olağanüstü bir 3B mikro ortam oluşturur. Bu özelliklerinden dolayı, doku mühendisliğinin çeşitli alanlarında çeşitli hidrojeller kullanılabilir [56].

Biyomürekkep, baskının amacı olan 3B biyobaskının önemli bir parçasıdır ve baskı ekipmanının işleyişinde ve etkisinde önemli bir rol oynar. Bu nedenle, birçok araştırma biyomürekkep tasarımına odaklanmıştır. Ek olarak, boyutsal kararlılığı ve basılabilirliği önemli olduğundan, baskı sonrası biyomürekkebin farklı özellikleri için bir değerlendirme sistemi geliştirilmektedir [57].

Hidrojeller kökenlerine göre iki kategoriye ayrılabilir, yani doğal olarak oluşan veya sentetik. Doğal biyomürekkepler çoğunlukla toksik değildir ve birçok avantajlı özelliğe

sahiptir. Doğal biyomürekkeplerin çoğu iyi biyouyumluluğa, daha hızlı biyobozunmaya, optimum mekanik kararlılığa, daha yüksek nem içeriğine ve yara bakımında uygulanabilirliğe sahiptir [58]. Bunun aksine, sentetik biyomalzemeler (örneğin, polietilen glikol bazlı biyomürekkepler) farklı ve ayarlanabilir fizikokimyasal özelliklere sahiptir ve güvenilir doku ve organ üretimi için daha iyi bir alternatif sunar. Bununla birlikte, çoğu sentetik biyomalzeme biyolojik olarak aktif değildir [59].

Sentetik polimerlere; Poli-glikolik asit (pga), Akrilonitril bütadien stiren (abs), Polilaktik asit (pla), Polietilen glikol (peg), Poliüretan (pu), Polieter eter keton (peek), Poli kaprolakton (pcl), Polibütillen tereftalat (pbt), Poly-d,l-lactic asit (pdlla), Poli-vinil alkol (pva), Polilaktik-ko-glikolik asit (plga) örnek verilebilir[60]. Doğal polimerlere ise; jelatin, aljinat, hiyalüronik asit, ipek fibroin, kollajen, fibrin, hücresizleştirilmiş hücre dışı matris (decn), agaroz örnekleri verilebilir [61].

2.5.1.Biyomürekkepte kullanılan malzemeler

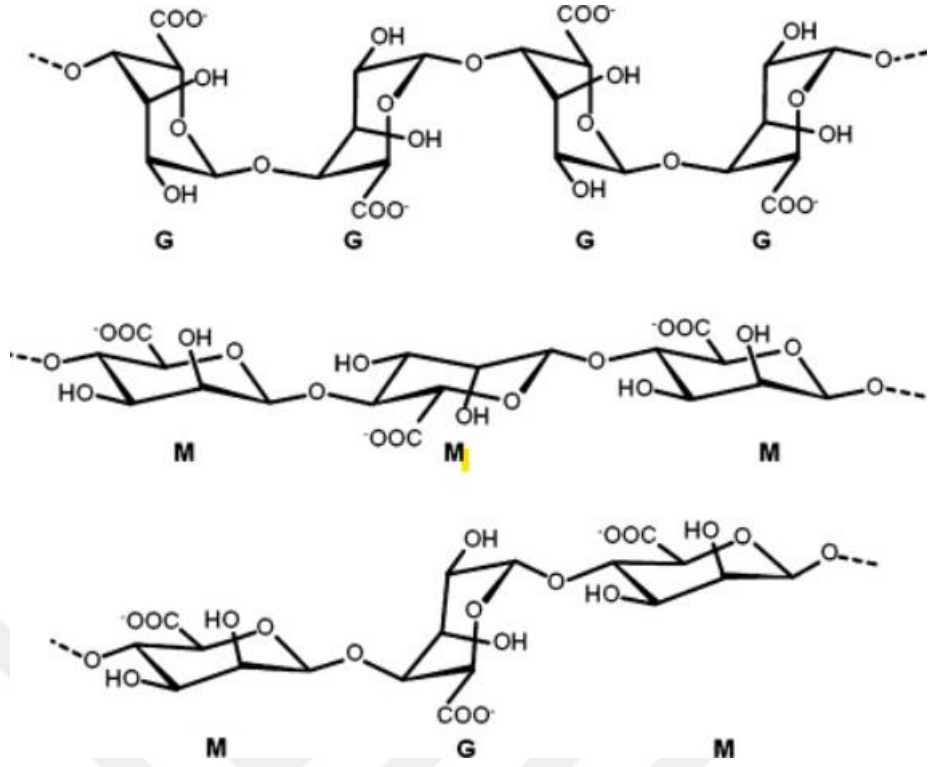
Biyomalzemeler, çeşitli üretim ve işleme tekniklerine uygun malzemelerdir. Biyomürekkep gereksinimlerini karşılayan biyomalzemeler, formülasyon ve işleme sırasında hücreler için bir taşıma ortamı görevi görmelidir [51]. Bu sebeple, tüm biyomalzemeler biyomürekkep malzemesi olarak kullanılamaz. Bazı biyomalzemeler basılamaz veya baskı işlemi hücrelere zarar verir ve biyobaskısı için uygun değildir. Basılabilen ve ardından baskıdan sonra hücrelerle tohumlanabilen, ancak hücrelerle doğrudan formüle edilmeyen bu biyomalzemeler, biyomürekkeplerin gereksinimlerini karşılamaz; bu biyomalzeme mürekkeplerini, örneğin termoplastiklerin eritilmesi ve kürlenmesi yoluyla kompleks bir 3 boyutlu yapı oluşturulmasıdır [49,62]. Genel olarak, biyomürekkep malzemeleri genellikle üç çeşit malzemedan oluşur: hidrojeller, hücre dışı matris ve mikro taşıyıcılar [63]. Bu malzemeler, biyomürekkep baskısı için yüklü hücreleri bir arada paketlemek için kullanılır.

Biyomürekkep olarak birçok farklı malzeme kullanılsa bile kullanılan doğal hidrojellerin en popülerlerinden biri aljinattır. Biyouyumluluk, düşük maliyet, farklı çapraz bağlama olanakları ve farklı baskı yöntemleri gibi özel özelliklere sahip doğal bir polisakkarittir. Aljinatın bir başka özelliği de basit bileşimidir; aljinat, doku mühendisliği, ilaç ve hücre iletimi ve iskelet miyoblastları da dahil olmak üzere hücrelerin kapsüllenmesi için kullanışlı bir malzemedir [64].

2.5.1.1. Aljinat

Aljinat genellikle deniz yosunundan elde edilen doğal olarak oluşan, düşük toksisitesi, biyouyumluluğu, nispeten düşük maliyeti ve Ca^{2+} gibi iki değerlikli katyonlar eklendiğinde kolay jelleşmesi nedeniyle bir anyonik polimerdir. Birçok biyomedikal uygulamada geniş çapta çalışılmış ve kullanılmıştır [65]. Aljinat hidrojel, çeşitli çapraz bağlama yöntemleriyle hazırlanabilir ve canlı dokunun hücre dışı matrisine yapısal benzerliği, onu yara iyileşmesinde, biyoaktif ajanların (küçük kimyasal ilaçlar ve proteinler gibi) verilmesinde ve hücre naklinde yaygın olarak kullanılmasını sağlar. Aljinat yara iyileşmesinde, yara bölgesinde bakteriyel enfeksiyonu en aza indiren ve yara iyileşmesini destekleyen fizyolojik olarak nemli bir mikro ortam sağlar. Küçük kimyasal ilaçlardan makromoleküler proteinlere kadar ilaç molekülleri, çapraz bağlanma tipine ve çapraz bağlanma yöntemine bağlı olarak aljinat jellerinden kontrollü bir şekilde salınır. Ek olarak, aljinat jeli vücuda ağızdan veya minimal invaziv olarak enjekte edilebilir ve farmasötik alanda geniş bir uygulamaya sahiptir. Aljinat jelleri ayrıca doku mühendisliğinde hücre nakli için umut vadeder. Doku mühendisliği, organ veya doku kaybı veya başarısızlığından muzdarip hastalar için yapay dokular ve organ ikameleri sağlamayı amaçlar [66]. Bu yaklaşımda, hücreleri istenen yere taşımak, yeni doku oluşumu için alan yaratmak ve tasarlanmış dokunun yapısını ve işlevini kontrol etmek için hidrojeller kullanılır [67].

Günümüzde, sodyum aljinat (SA) en yaygın kullanılan hidrojellerden biridir ve yumuşak doku yapı iskeleleri için uygun bir aday haline gelmiştir [68]. Kahverengi alglerdeki yosun veya Sargassum'dan mannitol ve iyodin ekstraksiyonundan sonra bir yan ürün olan sodyum aljinat, molekülleri 1 → 4 bağı dayalı olarak bağlanmış β-mannuronik asit (M) ve α-guluronik asitten (G) oluşan doğal bir polisakkarittir. Belirli oranda GM, MM ve GG segmentlerinden oluşan uzun zincirli bir polimerdir (Şekil 2.8) [69].



Şekil 2.8. Aljinatta G bloğu, M bloğu ve alternatif bloğun kimyasal yapıları [70].

G segmentinin iki değerlikli katyonlarla (Ca^{2+} , Ba^{2+}) reaksiyona girebildiğinden ile çapraz bağlanmış yüksek G segment içeriğine sahip sodyum aljinatın hidrojenleri sert ve kırılğanken, yüksek M segment içeriğine sahip sodyum aljinatın oluşturduğu hidrojenler daha az sert fakat daha elastiktir [71]. Ek olarak, sodyum aljinat, düşük sitotoksisite, kolay işleme, hızlı jelleşme ve düşük maliyetli, özelliklerine sahiptir [72, 73]. Hücreleri yüksek oranda hidratlı bir 3b ortamda kapsülleyebilen hidrojenlerin yapısal ve fizikokimyasal özellikleri, yumuşak doku yapılarının yapımında ve fonksiyonel rekonstrüksiyonunda önemli rol oynar [74].

Doku mühendisliği alanında birçok yumuşak doku organı çeşidi vardır ve farklı organ dokuları farklı anatomik yapı ve işlevlere sahiptir, bu da biyo iskele matris malzemeleri için farklı performans gereksinimleri gerekir ve sodyum aljinat bazlı hidrojel biyomalzemelerin belirli uygulama senaryolarına göre gerekli biyolojik/fiziksel özellikleri sağlaması gerekir. Ayrıca, çoğu yumuşak doku yapısal olarak karmaşıktır ve bu da şüphesiz sodyum aljinat bazlı hidrojenlerin oluşumuna yeni zorluklar getirir. Şu anda, sodyum aljinat kalıplama yöntemleri arasında ekstrüzyon biyobaskı, mürekkep püskürtmeli biyobaskı ve foto sertleştirme yer alır; Bunlardan, ekstrüzyon biyobaskı en gelişmiş olanı ve en yaygın kullanılanıdır [75].

Tabriz ve arkadaşları, aljinat bazlı hidrojel yapıların 3B baskısı için yeni bir biyobaskı tekniği geliştirmiş ve boru şeklinde ve daha karmaşık ve sürekli 3B hidrojel yapılar oluşturmak için ayarlanabilir mekanik özelliklere sahip kısmen çapraz bağlı aljinat hidrojeller oluşturan yeni bir serbest form üretim tekniği kullanarak tümör hücrelerinin 3B biyobaskısı için uygulanabilirliğini değerlendirmiştir[76].



3.METARYAL VE METOD

3.1. Metaryal

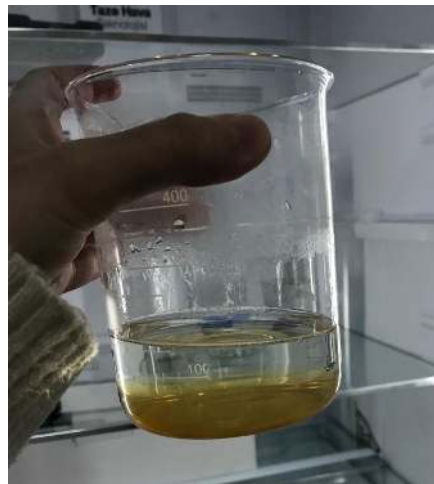
Sodyum aljinat (A2033, orta viskozite) Sigma- Aldrich firmasından, Kalsiyum klorür (CaCl_2)MERCK firmasından, Toz Sığır Jelatin (200 Bloom) Öz Yıldız Kimyevi firmasından , gliserin Bikar İlaç üreticisinden ticari olarak teminedilmiştir.

Weightlab Instruments markalı WL 303L model tartı kullanılmış, deiyonize su ihtiyacı MERCK marka Direct-Q modelinden karşılanmıştır. Snijder marka 34532 model manyetik karıştırıcı, Inovialab marka BRC- 5180T model santrifüj cihazı, NUVE marka Fn 400 model Kuru Hava Sterilizatörü, mini-pompa değişken akış (mini-pump variable flow) cihazı, Portable Electronic Scale - Wh-a08 , Creality marka Ender 3 Pro 3B yazıcı kullanılmıştır. 3B biyoyazıcı Başkent Üniveritesi Biyomedikal Mühendisliği tarafından üretilmiştir.

3.2. Metod

3.2.1. Jelatin destek banyosu v0

1. Adım- 2L 8°C soğutulmuş 10mm CaCl_2 çözeltisi hazırlandı. Bir blender kavanozunda 150 ml %0.1 vizkozitede CaCl_2 çözeltisi kullanarak 6,7 g jelatin (%4,5 a/h) çözüldü. Mikrodalgada 2-3 dakika ısıtıldıktan sonra gece boyunca 4°C 'de jelleşmeye bırakıldı[77,78].



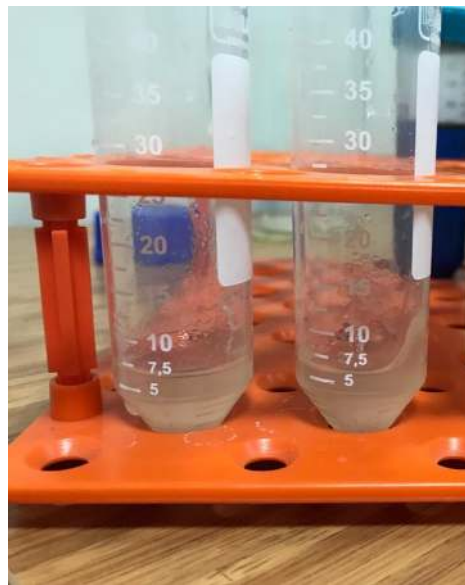
Şekil 3.1. 1. Adımdan sonra jelin görünümü

2. Adım- Sertleştikten sonra kavanozu yarısına kadar 10mm CaCl_2 çözeltisi ile doldurulup jelatini çıkarmak için bir spatula kullanıldı. Ardından, hava girmesini önlemek için maksimuma kadar dolduruldu ve 4 bıçaklı bir blender kapağı kullanarak kapağı kapatıldı. Santrifüjü 4°C 'ye soğumasını beklerken kapalı kavanoz 30 dakika boyunca -20°C 'lik bir dondurucuya konuldu[77,78].



Şekil 3.2. 2. Adımdan sonra jelin görünümü

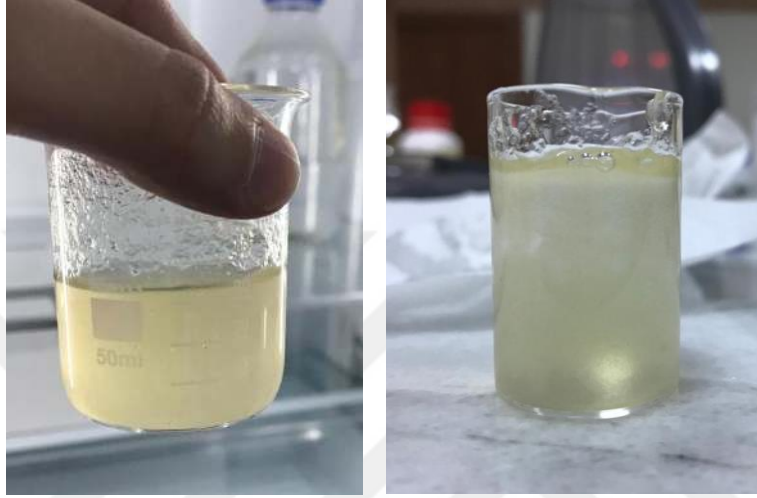
3. Adım- Karışımı 120 saniye boyunca düz bir şekilde karıştırıldı[77,78].
4. Adım- Jelatin solüsyonunu 50ml Falcon tüplerine eşit dağıtıldı ve Tüpler 4°C 'de 3000 RCF'de 2 dakika santrifüjlendi. Sonrasında süpernatantı atıldı ve tüpler 45–50 ml'ye kadar önceden soğutulmuş 10mm CaCl_2 çözeltisiyle yeniden dolduruldu. Jelatin parçacıklarını ayırmak için kuvvetlice çalkalandı. Santrifüjleme ve ayırma işlemi 3 kez tekrarlandı. Süpernatant şeffaf olmalıdır[77,78].



Şekil 3.3. 3.ve 4. Adımdan sonra jelatin solüsyonunun görünümü

5. Adım- Temizlendikten sonra, 10mm CaCl_2 çözeltisini kullanarak iki yarım şekilde doldurulmuş (25 ml) tüp birleştirilerek jelatin solisyonu konsantre edildi[77,78].

Not: Jelatin solisyonu 4°C'de saklanmalı ve 2 hafta içinde kullanılmalıdır[77,78,79].



Şekil 3.4. 5. Adımdan sonra jelatin solisyonun son görünümü

3.2.2. Jelatin destek banyosu v1

200 ml saf su kullanılarak %4.5'luk jelatin çözeltisi 37°C'de, manyetik karıştırıcı ile 300 rpm'de 30 dk karıştırıldı. Daha sonra içine 0.2 mg katı CaCl_2 eklendi ve 30 dk daha karıştırılmaya devam edildi. Jel şeffaf olmalıdır.



Şekil 3.5. Jelin son görünümü

Destek banyosu hazırlandıktan sonra önceden kesilmiş olan falkon tüplerine veya cam kaplara konuldu. 40 ± 5 dk boyunca (bignam plastiği davranışı gösterene kadar, bir başka deyişle bal kıvamı alana kadar) 15°C 'de bekletildi.



Şekil 3.6. Jelin Falcon tüplerinde görünümü

3.2.3. Aljinat jel hazırlanması

200 ml saf su kullanılarak %1'lik aljinat çözeltisi, manyetik karıştırıcı ile 300 rpm'de 2 saat karıştırıldı. Daha sonra içine 0.1 mg katı gıda boyası eklendi ve 30 dk daha karıştırılmaya devam edildi. Hazırlanan aljinat çözeltisi yaklaşık 20 gün 20°C 'de saklanılarak kullanılabilir. 20 günden daha uzun süre bekletildiğinde küflenme başlangıcı tespit edilmiştir[80].



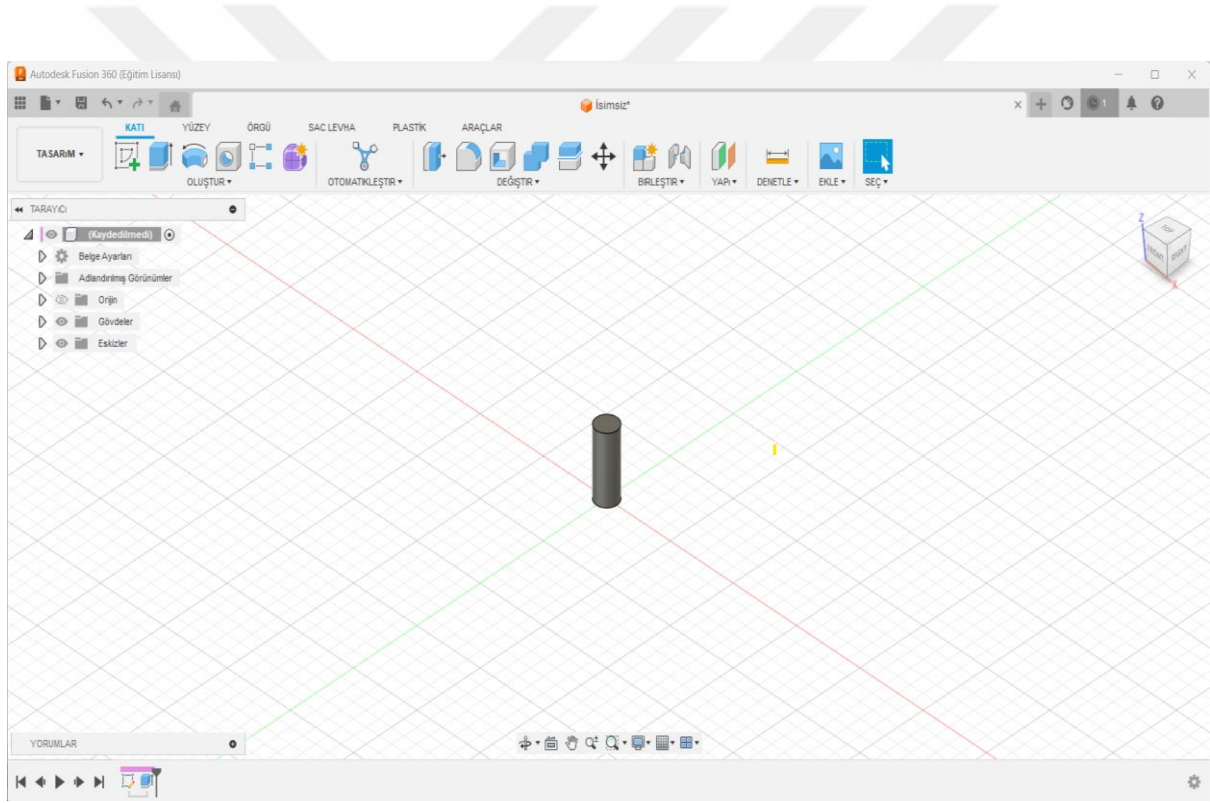
Şekil 3.7. Aljinat çözeltisinin mor gıda boyası eklenmiş görünümü

3.2.4. CaCl₂ çözeltisinin hazırlanması

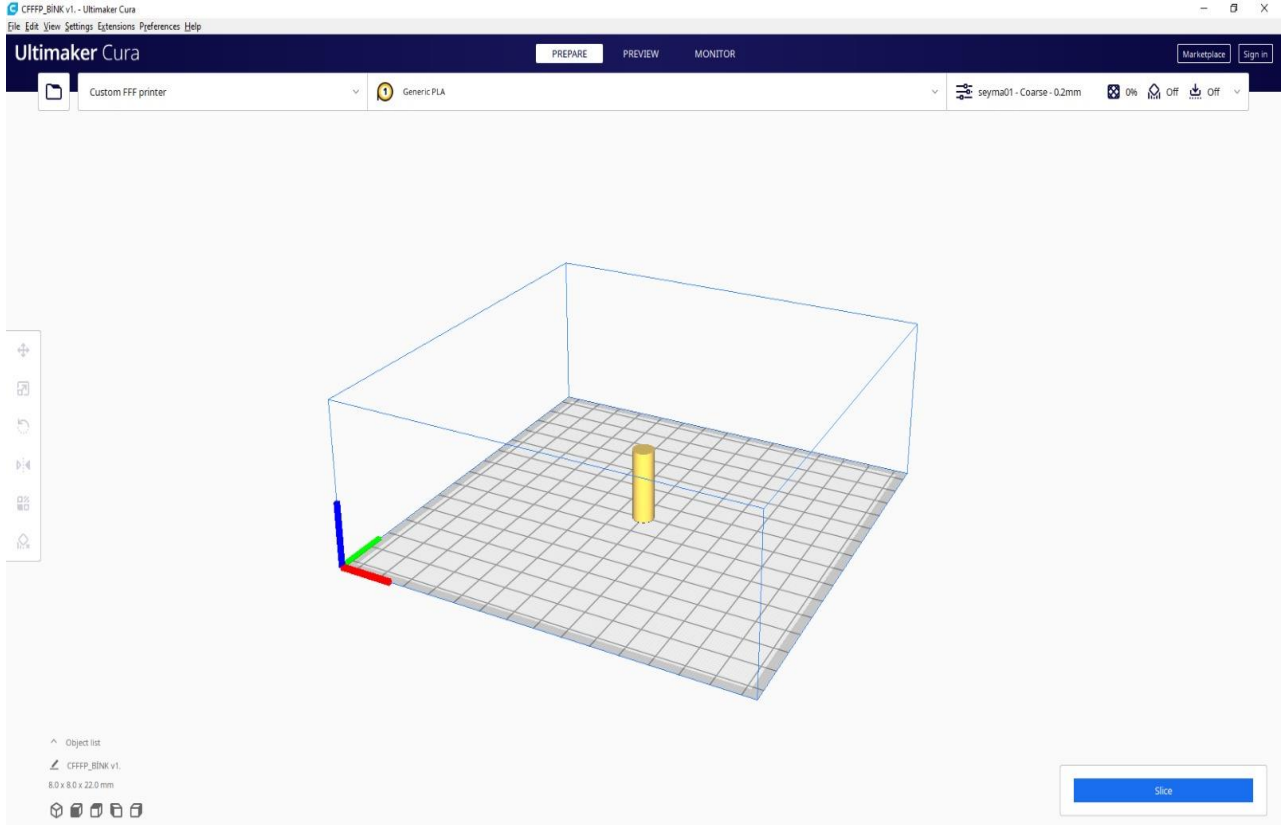
200 ml saf su kullanılarak %5'lik CaCl₂ çözeltisi, manyetik karıştırıcı ile 300 rpm'de 30 dk karıştırıldı. Hazırlanan CaCl₂ çözeltisi 20°C' de saklanılarak kullanılabilir[81].

3.2.5. Baskı süreci

Biyobaskı işlemine başlamadan önce baskı sürecinin ilk aşamalarından biri olan 3B çizim gerekmektedir. Çalışmamızda içi boş damar benzeri yapı iskelesinin biyobaskılanabilirliği için 8mm çapında, 22 mm yükseklikde bir silindir Autodesk Fusion 360 programı ile çizildi.



Şekil 3.8. Autodesk Fusion 360 programı ile çizilmiş olan içi boş damar benzeri yapı iskelesi.



Şekil 3.9. İçi boş damar benzeri yapı iskelesi şeklinin Ultimaker Cura programında görünümü

Çizilen içi boş damar benzeri yapı iskelesi daha sonra stl dosyasına dönüştürülerek dışa aktarıldı. Cura ultimaker slicer programı kullanarak gcode dosyasına dönüştürüldü ve biyoyazıcı için uygun format haline getirildi.

3.2.6. Ultimaker Cura

Ultimaker Cura, popüler bir 3B baskı yazılımıdır. 3B yazıcılar için ücretsiz ve açık kaynaklı bir dilimleme yazılımı olarak kullanılır. Dilimleme, 3B modelin katmanlara yapılar ve bu katmanların 3B yazıcıda baz alınabilir hale getirilmesi işlemidir.

Cura stl dosyaları olarak dışa aktarılan 3B parçaların modellemesi için kullanılır. Stl formatı, Ultimaker Cura yazılımı kullanılarak içe aktarılır. Açık kaynak yazılımı Ultimaker Cura, FDM tekniğini kullanan 3B nesneleri yazdırmak için kullanılır. Cura, kullanıcının parçaları oluşturmadan önce çeşitli işlem parametrelerini değiştirmesine, modeli montaj alanına yerleştirmesine, parçanın özelliklerini ve belirli bir parçanın nasıl oluşturulduğunu görselleştirmesine imkan tanır[82].Ultimaker Cura, kullanıcı dostu bir yapıya sahip olup, farklı 3B yazıcı modelleriyle uyumludur. Hem amatör hem de profesyonel kullanıcılar için tasarlanan ve hızlı ve kolay bir dilimleme süreci sunar.

Ultimaker Cura adımları aşağıdaki gibidir[82]:

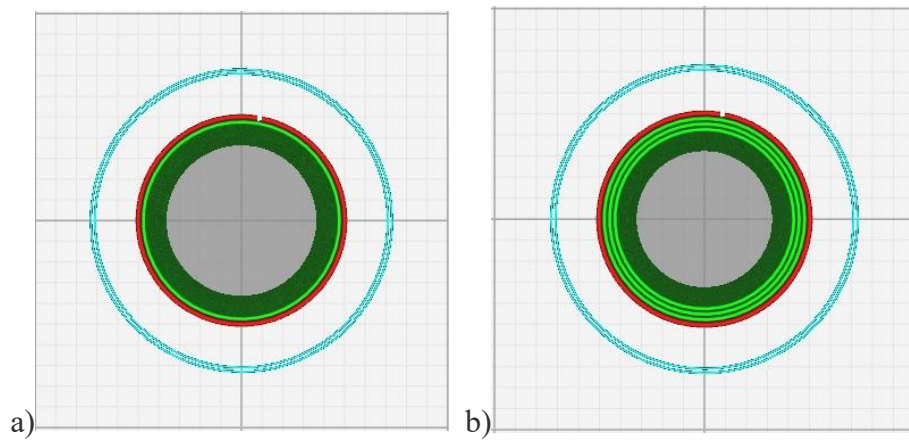
- Parçaların yüklenmesi
- İşlem parametrelerinin ayarlanması
- Katmanların dilimlenmesi
- Katmanları G Kodlarına Dönüştürme

3.2.6.1 Ultimaker Cura dilimleme ayarları

Tablo 3.1. İçi boş damar benzeri yapı için Ultimaker Cura dilimleme ayarları

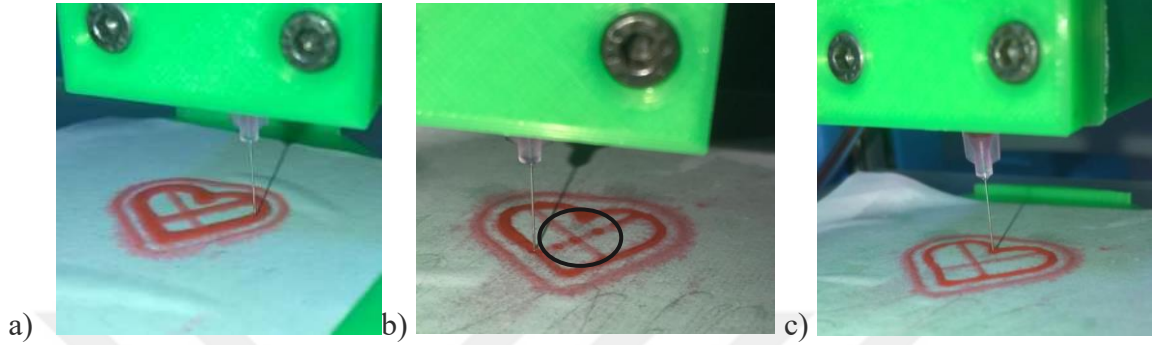
Katman Yüksekliği	0.2mm
İlk Katman Yüksekliği	0.2mm
Çizgi Genişliği	0.2mm
Duvar Kalınlığı	0.2mm
Duvar Hattı Sayısı	1
Dış Duvar Silme Mesafesi	0.1
Baskı Hızı	2.0 mm/sn
Duvar Hızı	2.0 mm/sn
Hareket Hızı	40 mm/sn
İlk Katman Baskı Hızı	2.0 mm/sn
İlk Katman Hareket Hızı	40 mm/sn
Geri Çekilme	Etkin değil
Dolgu Doygunluğu	%0

Cura dilimleme ayarlarında Katman yüksekliği, İlk katman yüksekliği ve Çizgi genişliği 0.2 mm seçildi. Duvar kalınlığının tek katmandan oluşması için 0.2 mm seçildi. Duvar kalınlığı 0.2 katlarında arttırıldığında duvar kalınlığı orantılı olarak artmaktadır. Örneğin duvar kalınlığı 0.4 mm seçildiğinde 2 katmanlı 0.8 mm seçildiğinde 4 katmanlı olmaktadır.



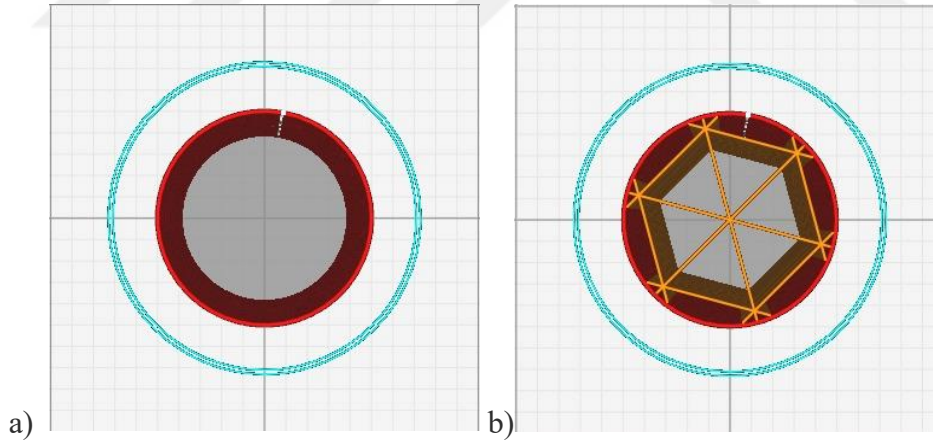
Şekil 3.10. İçi boş damar benzeri yapı iskelesi şeklinin Ultimaker Cura programında üstten görünümü a) duvar kalınlığı 0.4 mm seçildiğinde b) duvar kalınlığı 0.8 mm seçildiğinde

Baskı hızı biyomürekkepin akış hızıdır hareket hızı ise ekstruderin hareket hızıdır. Baskı hızı ve hareket hızı birbirine uygun olacak şekilde ayarlandı. Baskı hızı hareket hızına göre daha hızlı olursa baskı sırasında biyomürekkep akışı harekete göre hızlı olacağından istenilen duvar kalınlığından daha kalın bir şekil ortaya çıkar. Eğer baskı hızı hareket hızına göre daha yavaş olursa basım sırasında süreklilik olmayacaktır ve basılan şekilde kopmalar meydana gelir.



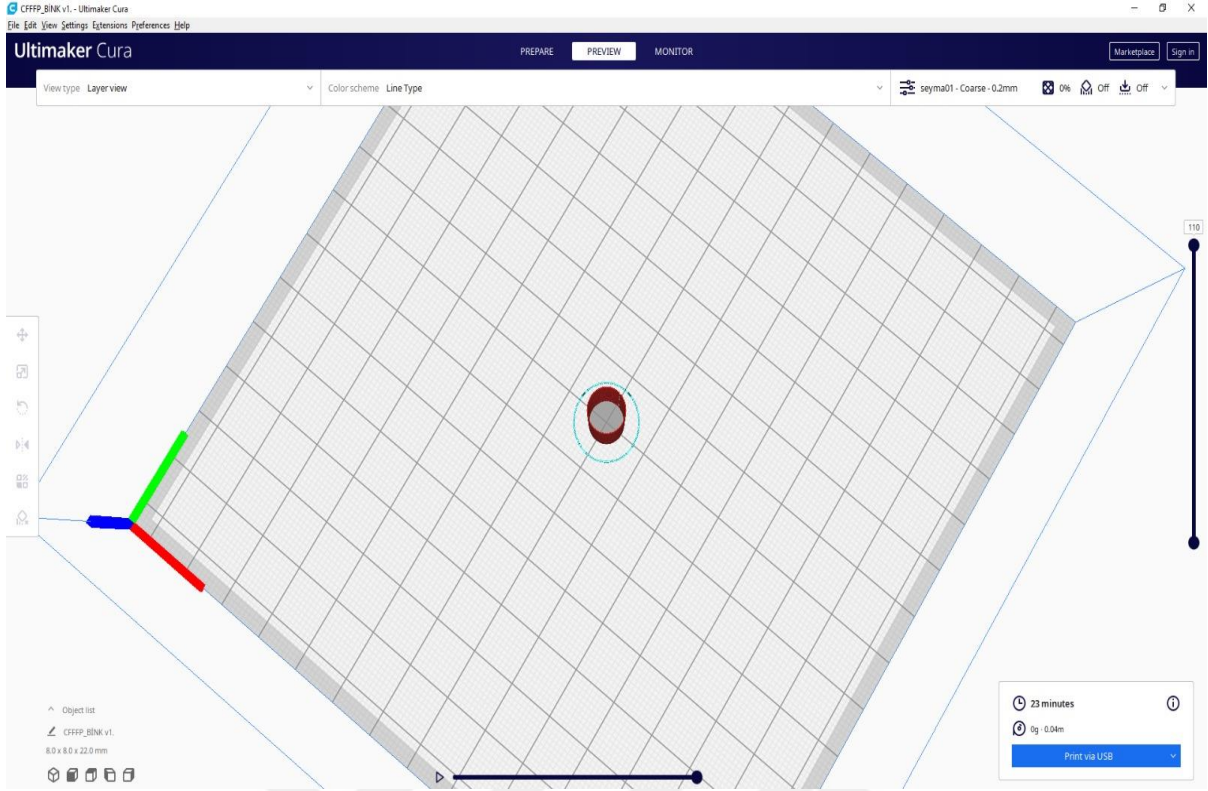
Şekil 3.11. Baskı hızı ve hareket hızının değişimine göre baskının görünümü a) Baskı hızı hareket hızına göre daha hızlı olduğunda b) baskı hızı hareket hızına göre daha yavaş olduğunda c) Baskı hızı ve hareket hızı birbirine uygun olacak şekilde ayarlandığında

İçi boş damar benzeri yapı iskelesi elde edilmek istenildiği için dolgu doygunluğu %0 seçilerek içi boş bir yapı elde edildi.



Şekil 3.12. İçi boş damar benzeri yapı iskelesi şeklinin Ultimaker Cura programında üstten görünümü a) dolgu doygunluğu %0 b) dolgu doygunluğu %20

İçi boş damar benzeri yapı iskelesi basımında dolgu doygunluğu ve yapısal karmaşıklık olmadığından ve ekstrüder hareketi sürekli ve aynı yönde hareket ettiğinden geri çekilmeye ihtiyaç duyulmamıştır.



Şekil 3.13. Tablo 3.1’deki baskı parametrelerine göre içi boş damar benzeri yapı iskelesi şeklinin Ultimaker Cura programında üstten görünümü

Cura ultimaker slicer programıyla dilimleme yapılarak stl dosyası gcode’a dönüştürüldü. Baskı süresi 23 dakika olarak program tarafından belirlendi. İçi boş damar benzeri yapı iskelesinin Fresh methodu kullanarak gerçekleştirilen baskısı sırasında 800 µl %1’lik aljinat çözeltisi harcanmıştır.

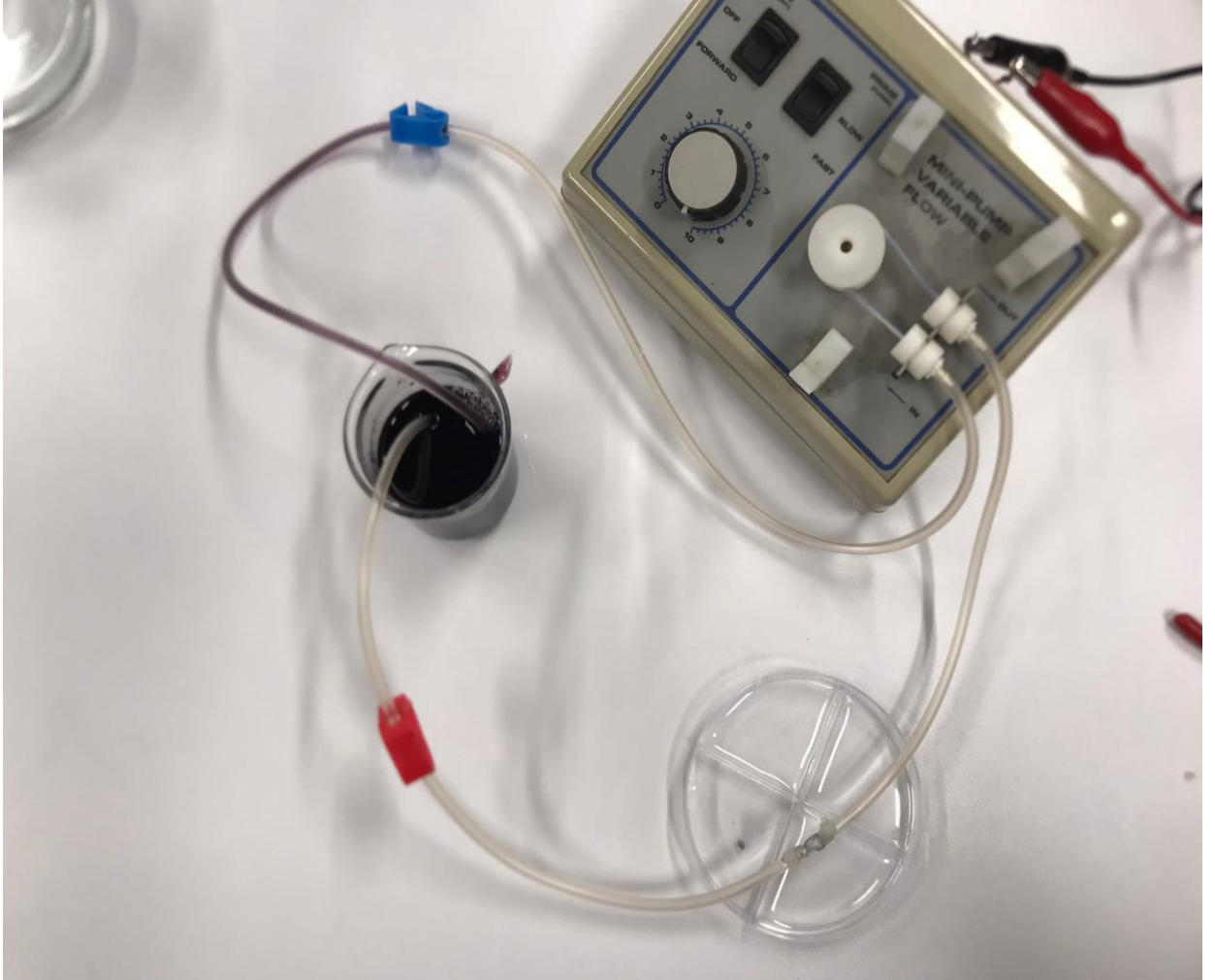
3.2.7. Baskı işlemi sonrası çapraz bağlama

Baskı işlemi sona erdikten sonra içi boş damar benzeri yapı iskelesini destek banyosundan zararsız bir şekilde ayırmak için jel 20 dk boyunca 37 ‘de bekletildi. Jel eridikten sonra bir cımbız yardımıyla içi boş damar benzeri yapı iskelesi destek banyosundan nazikçe çıkarıldı. Destek banyosunun içinde eser miktarda çapraz bağlayıcı bulunuyor olsa da içi boş damar benzeri yapı iskelesi tam olarak çapraz bağlanmadığı için hassas davranılmalıdır. İçi boş damar benzeri yapı iskelesi destek banyosundan çıkarıldıktan sonra CaCl_2 çözeltisinde bekletildi.

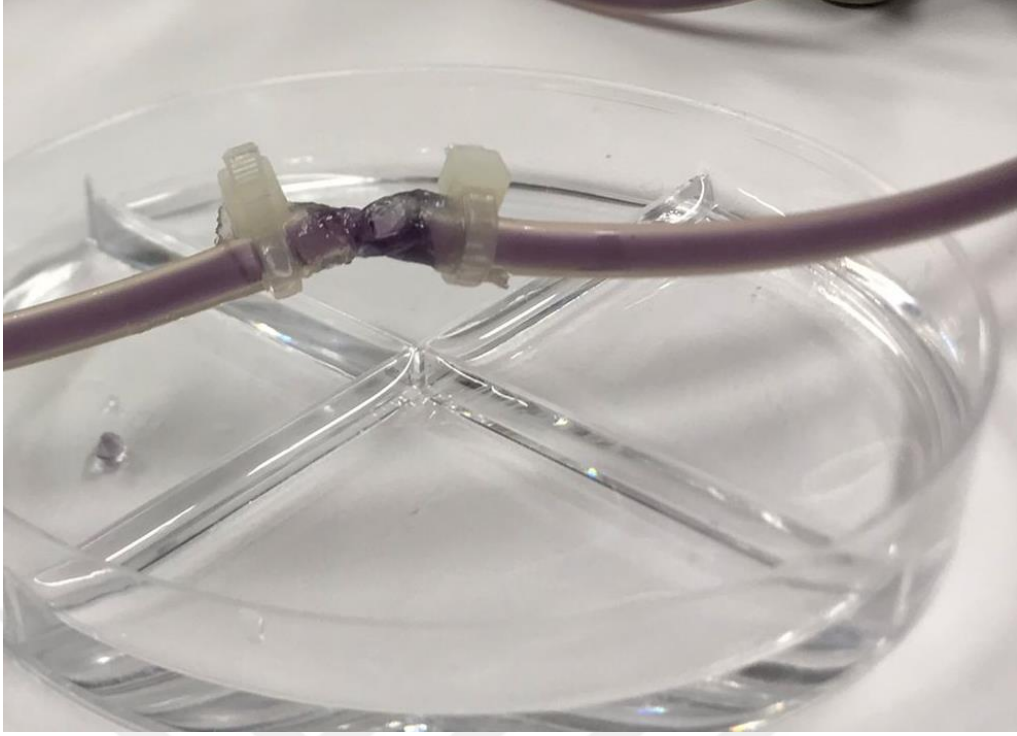
3.3. Akış Testi

3B biyoyazıcı ile basılan içi boş damar benzeri yapının sızıntı hacmini belirlemek ve akış testi için en uygun vizkozitede çapraz bağlama işlemini gerçekleştirmek için sürekli akış testi uygulanmıştır. Akış testinin ilk amacı 3B biyoyazıcı ile basılan damar benzeri yapının gerçek bir damar yapısındaki kan akışına dayanımını gözlemlemektir.

Akış testi için şekil 3.14'deki düzenek hazırlanmıştır. Akış için mini-pompa değişken akış (mini-pump variable flow) cihazı 10. Seviyede hızlı ayarda kullanıldı. Giriş kısmından gliserin girerken çıkış kısmından akış devam eder. İçi boş damar benzeri yapı çıkış kısmına kelepçe yardımıyla sabitlendi.



Şekil 3.14. Akış testi düzeneği



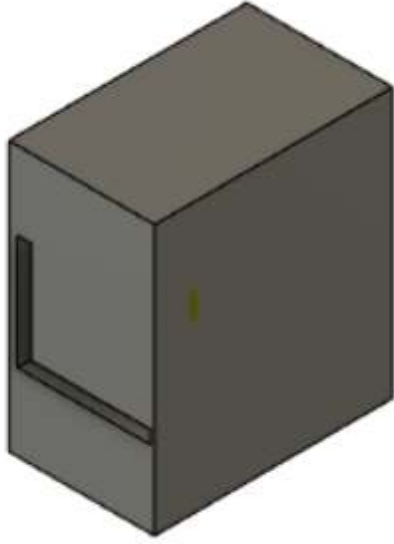
Şekil 3.15. içi boş damar benzeri yapının kelepçe yardımı ile akışın çıkışına sabitlenmesi

İçi boş damar benzeri yapı 30 dk çapraz bağlamaya maruz bırakıldıktan hemen sonra akış testi yapıldı. Akış testine başlandığında içi boş damar benzeri yapıda sızıntı görülmedi.

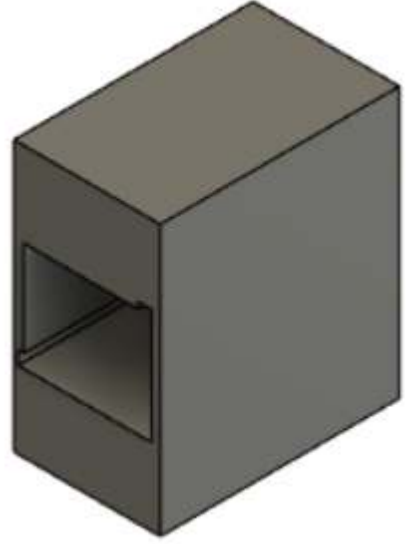
3.4. Çekme Testi

3B biyoyazıcı ile elde ettiğimiz içi boş damar benzeri yapının maksimum çekme gerilmesini belirlemek için çekme testi uygulandı. Çekme testi için kendi düzeneğimizi hazırladık. Hazırladığımız düzende prototip bir ölçüm cihazı, bir sabitleyici, ölçüm cihazını sabitlemek için 3 boyutlu bir tasarım ve çekme testini stabil olarak gerçekleştirmek için 3B biyoyazıcının x eksen düzlemi boyunca hızı ayarlanabilir ekstrüderi kullanıldı.

Çekme testi için Portable Electronic Scale - Wh-a08 kullanılarak biyoyazıcı yardımı ile bir düzenek hazırlandı. Biyoyazıcı ekstrüder yerine Wh-a08 sabitlemek için Fusion 360 programında bir başlık çizildi ve 3B yazıcıdan baskısı alındı. Ekstrüder yerine çizilen başlık takıldı. Wh-a08'e basılan yapıyı tutması için bir krokodil bağlandı. Basılan yapının diğer tarafını da sabitlemek için bir sabitleyiciye de krokodil bağlandı.



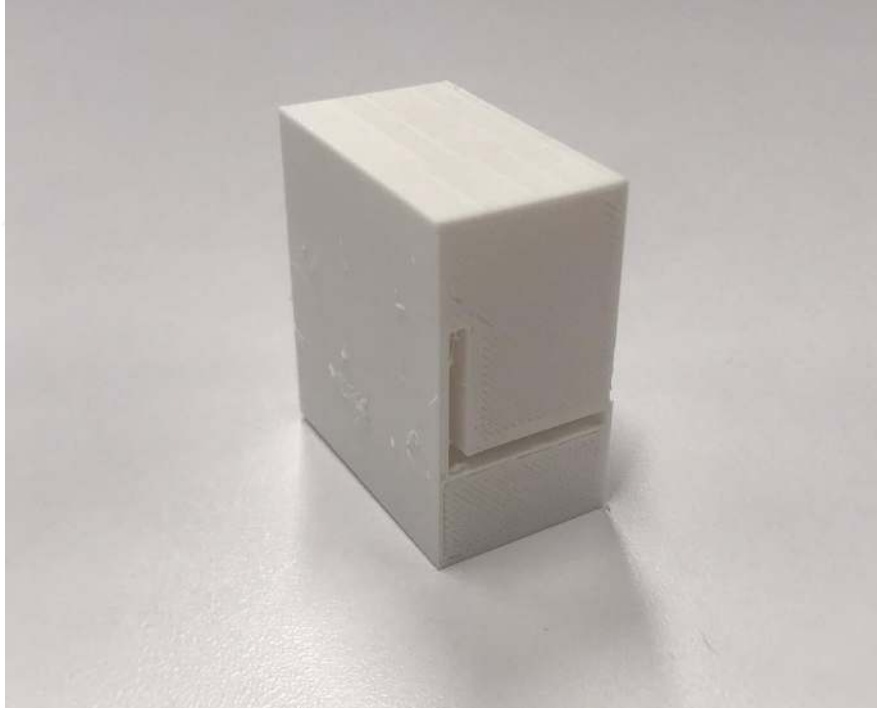
a)



b)

Şekil 3.16. Wh-a08 sabitlemek için Fusion 360 programında çizilen başlık a)başlığın önden görünümü b)

başlığın arkadan görünümü



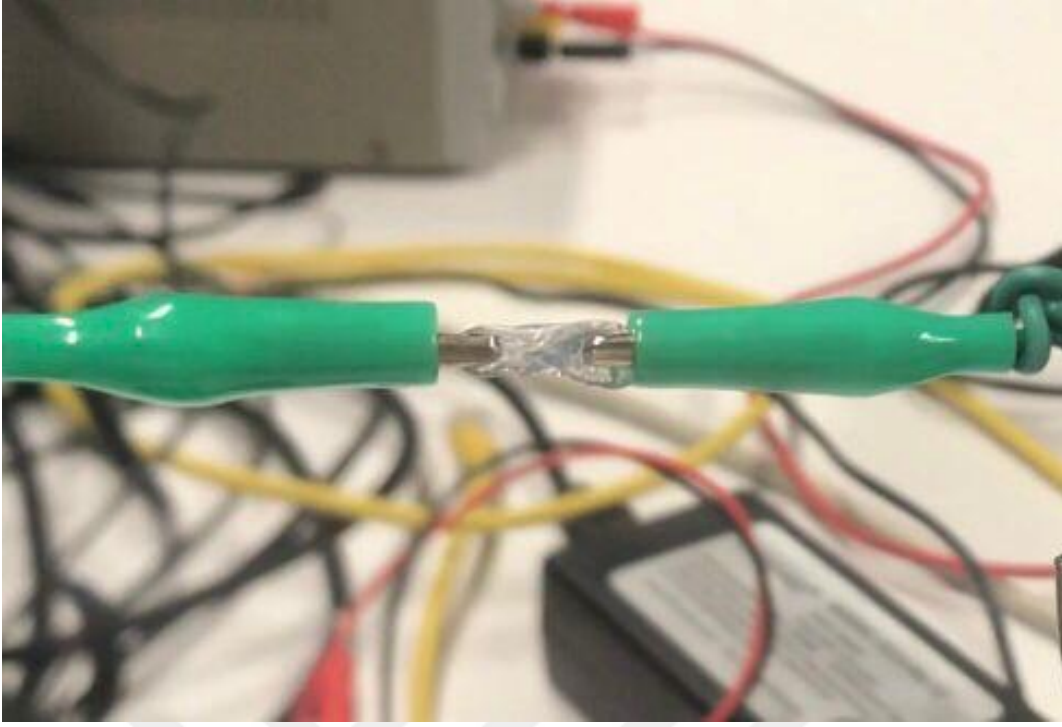
Şekil 3.17. Wh-a08'i sabitlemek için Fusion 360 programında çizilen başlığın 3b baskı sonrası çıktısı



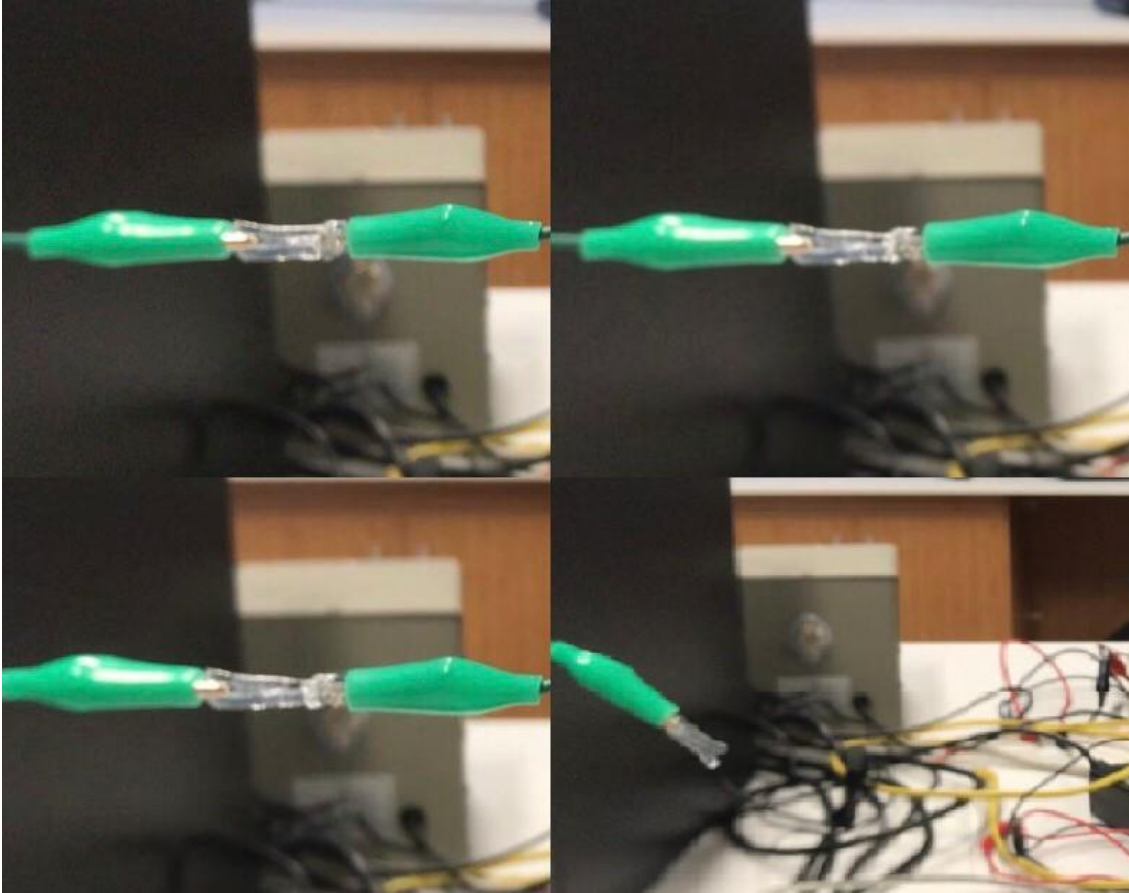
Şekil 3.18- 3B yazıcıdan baskısı alınan başlık ve Wh-A08



Şekil 3.19. Çekme testi için kurulan düzenek



Şekil 3.20. İçi boş damar yapısının çekme testi için krokodil uçlarına yerleşimi



Şekil 3.21. İçi boş damar benzeri yapısının çekme testi sırasında kopma aşamalarının gösterimi

Çekme testi için duvar kalınlığı 0.2mm ve 0.4mm, çapı 8mm ve uzunluğu 10 mm olan içi boş damar benzeri yapılar basıldı. %3 ve % 5 lik CaCl_2 çözeltilerinde 30 dk boyunca çapraz bağlandı.

3.5. Şişme Testi

Hidrojel yapıları, yüzeysel çözelti boşaltılmadan ve tartılmadan önce 37 °C'de 0, 15, 30, 60, 120, 240, 360 dakika saf su ve gliserin içinde ısıtıldı. %1 lik aljinat ile basılan içi boş damar benzeri yapının şişme oranı, Denklem 1'de gösterildiği gibi Amirian yöntemiyle hesaplandı. (1) [83]. şişmeden sonra artan hidrojel kütlesinin farkının başlangıç kütlesine oranı şişme oranını verir.

$$\text{Şişme oranı (\%)} = \frac{W_t - W_0}{W_0} \times 100 \quad (1)$$

burada W_t içi boş damar benzeri yapının önceden belirlenmiş olan zamanda ki ağırlığıydı ve W_0 başlangıç ağırlığıydı[84].

3.6 Bozunma Testi

Hidrojel yapıları, 0, 1, 3 ve 7 gün boyunca 37 °C'de saf su ve gliserin içinde ısıtıldı. SA hidrojelinin bozunma oranı, Denklem 2'de gösterildiği gibi Zhang yöntemiyle hesaplandı. (2) [85]. Bozunmadan sonra azalan hidrojel kütlesinin farkının başlangıç kütlesine oranı bozunma oranını verir.

$$\text{Bozulma oranı (\%)} = \frac{W_{dt} - W_{d0}}{W_{d0}} \times 100$$

(2)

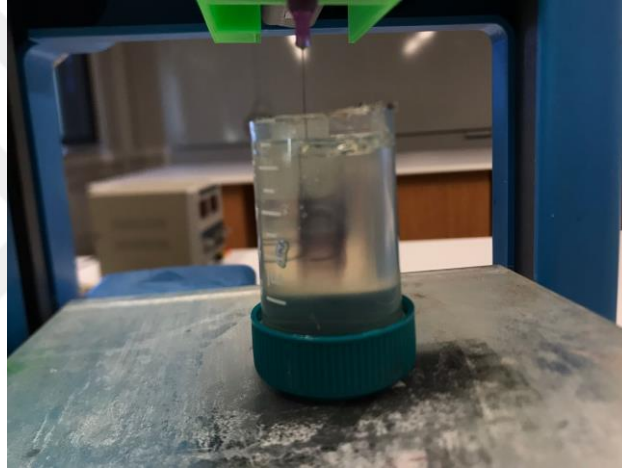
burada W_{dt} , bozunma numunesinin önceden belirlenmiş bir zamandaki ağırlığıydı ve W_{d0} , başlangıç ağırlığıydı[84].

4. DENEYSEL BULGULAR

4.1. Basılabilirlik

%1 viskoziteli aljinat hidrojel jelatin destek banyosu v1 ile desteklenerek 28G iğne ucu ile içi boş damar benzeri yapının baskılanabildiği gözlemlendi. Baskı sonucunda içi boş damar benzeri yapının istenilen boyutta basıldığı gözlemlendi.

Baskı sırasında destek jelinin içindeki çapraz bağlayıcı sayesinde basılan hidrojel dağılmadı. İçi boş damar benzeri yapının baskı işlemi sırasındaki görüntüsü şekil 4.1’de gösterildi.

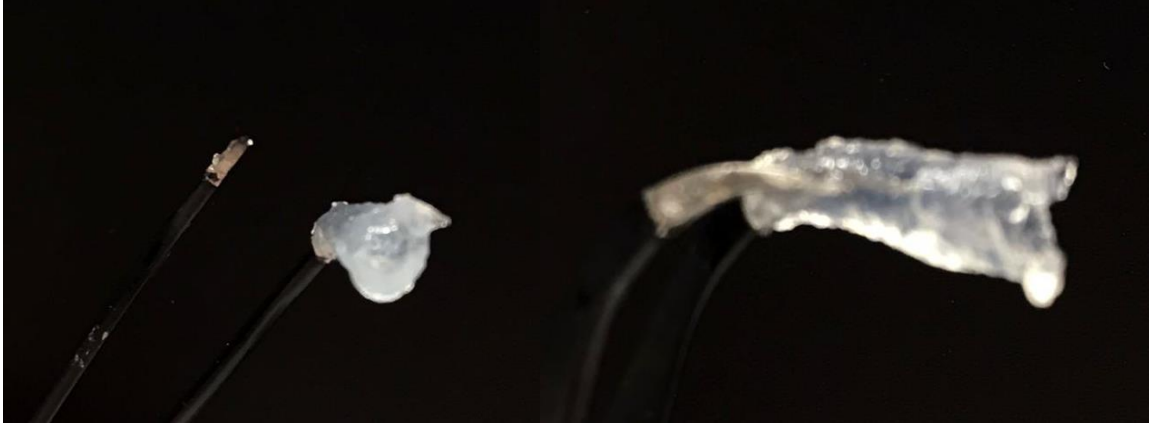


Şekil 4.1. İçi boş damar benzeri yapı iskelesinin Fresh metod kullanılarak yapılan baskı işlemi



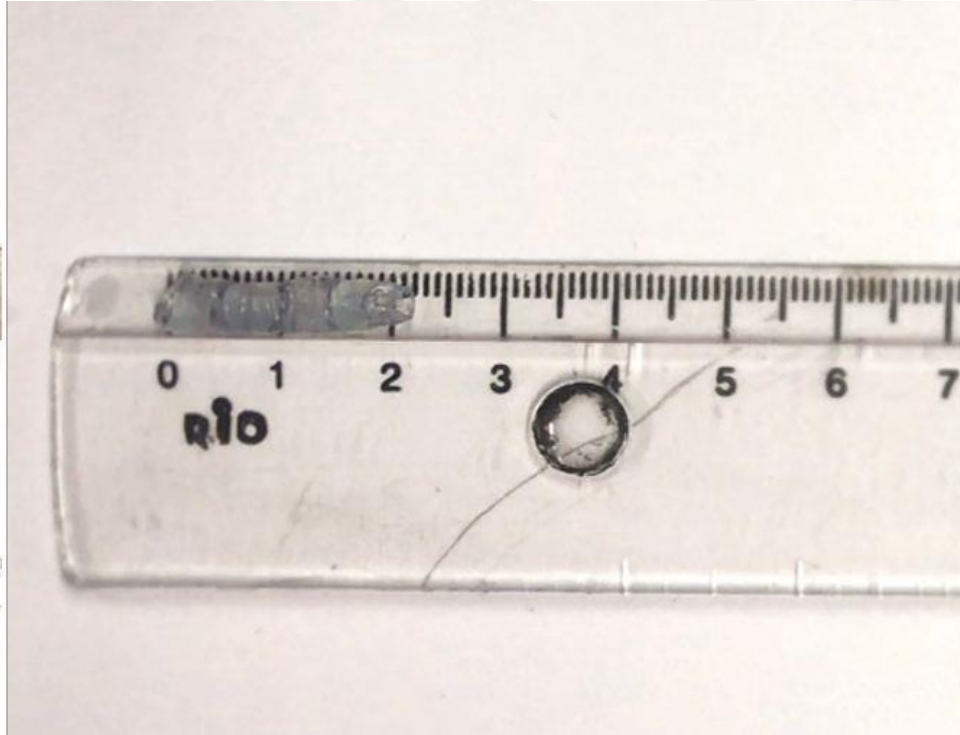
Şekil 4.2. İçi boş damar benzeri yapı iskelesinin jelatin destek banyosundan çıkarıldıktan sonraki görüntüsü

İçi boş damar benzeri yapı iskelesi %5’lik CaCl_2 içerisinde 20 dk süre boyunca çapraz bağlanması için bekletildi. 20 dk dan az süre bekletildiğinde yapının tutulamayacak kadar yumuşak oldu bu yüzden dokunulduğunda bozulduğu gözlemlendi.



Şekil 4.3. İçi boş damar benzeri yapı iskelesinin çapraz bağlandıktan sonra bir cımbız yardımıyla tutularak gösterimi

Baskılanan yapının ön ayarlarında yüksekliği 22mm olarak belirlendi. İçi boş damar benzeri yapı iskelesi %5'lik CaCl_2 içerisinde çapraz bağlandıktan sonra baskı işleminde ayarlanan yüksekliği sabit kaldı. Bu sonuçtan yola çıkarak dijital ortamda ayarladığımız baskı parametreleri basılabilirlik için uygundu.



Şekil 4.4. İçi boş damar benzeri yapı iskelesinin çapraz bağlandıktan sonra uzunluğu

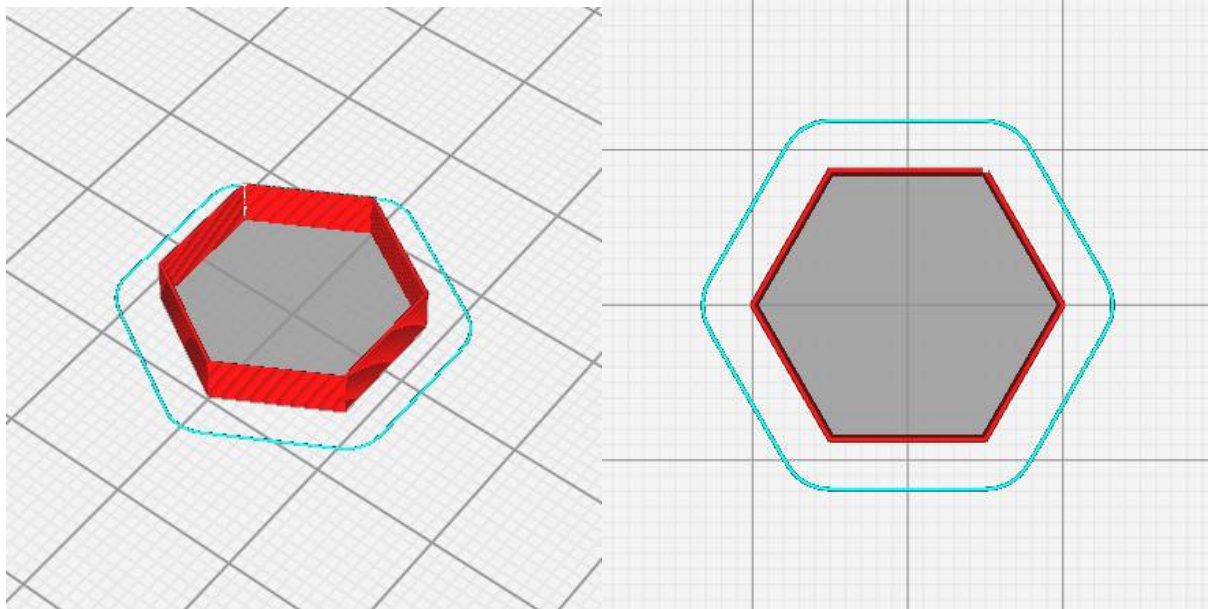
4.2. Jel Karşılaştırma

Jelatin destek banyosu v0' dan istenilen sonucu elde edilemediği için Jelatin destek banyosu v1 protokolünü zamanla geliştirildi. Ve bu iki destek banyosu formülasyonlarının basılabilirlikleri karşılaştırıldı. Jelatin destek banyosu v1'in basılabilirlik için uygun olduğuna karar verildi.

Jelatin destek banyosu v0 ve v1'i karşılaştırmak için fusion 360 programında 5mm yüksekliğinde bir altıgen oluşturuldu. Ve cura ultimaker programıyla ayarları yapıldı. 25G iğne ucu kullanıldığı için duvar kalınlığını ve çizgi genişliğini 0.4 mm olarak ayarlandı. Onun dışındaki ayarlar değiştirilmedi.

Tablo 4.1. Altıgen için Cura Ultimaker dilimleme ayarları

Katman Yüksekliği	0.2mm
İlk Katman Yüksekliği	0.2mm
Çizgi Genişliği	0.4mm
Duvar Kalınlığı	0.4mm
Geri Çekilme	Etkin değil
Dolgu Doygunluğu	%0



Şekil 4.5. Altıgenin Cura Ultimaker Slicer programında görünümü

Jelatin destek banyosu v0 ve Jelatin destek banyosu v1'in basılabilirlikleri karşılaştırdığında Jelatin destek banyosu v1'in daha yüksek baskı kalitesine sahip olduğunu görüldü. Jelatin destek banyosu v0' da baskı sırasında şişme meydana geldiğini gözlemlendi. Bu yüzden istenilen duvar kalınlığını ve yüksekliği elde edilemedi.



Şekil 4.6. Altıgenin Jelatin destek banyosu v0 ile basıldıktan sonra CaCl_2 içindeki görünümü

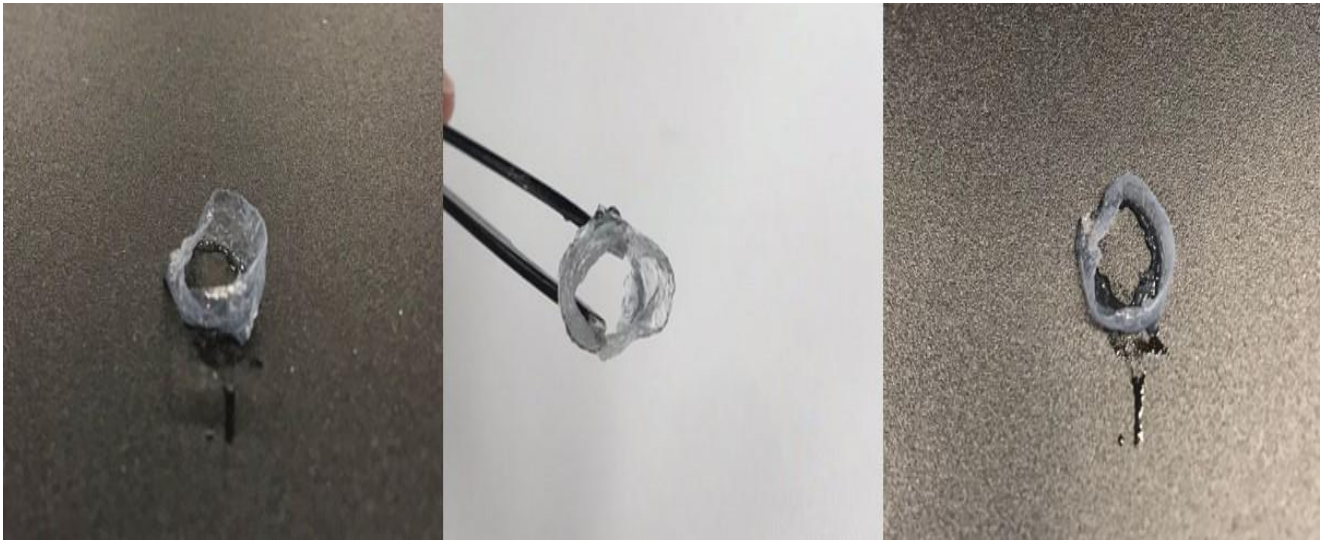


Şekil 4.7. Jelatin destek banyosu v0 ile basılan altıgenin çapraz bağlanma işleminden sonraki görünümü

Jelatin destek banyosu v1’de ise daha yüksek kalitede bir baskı çıktısı elde edildi. Baskı sırasında şişme meydana gelmedi. Bu da bize dijital ortamda belirlediğimiz duvar kalınlığı ve yükseklikte yapıyı elde etme imkânı verdi.



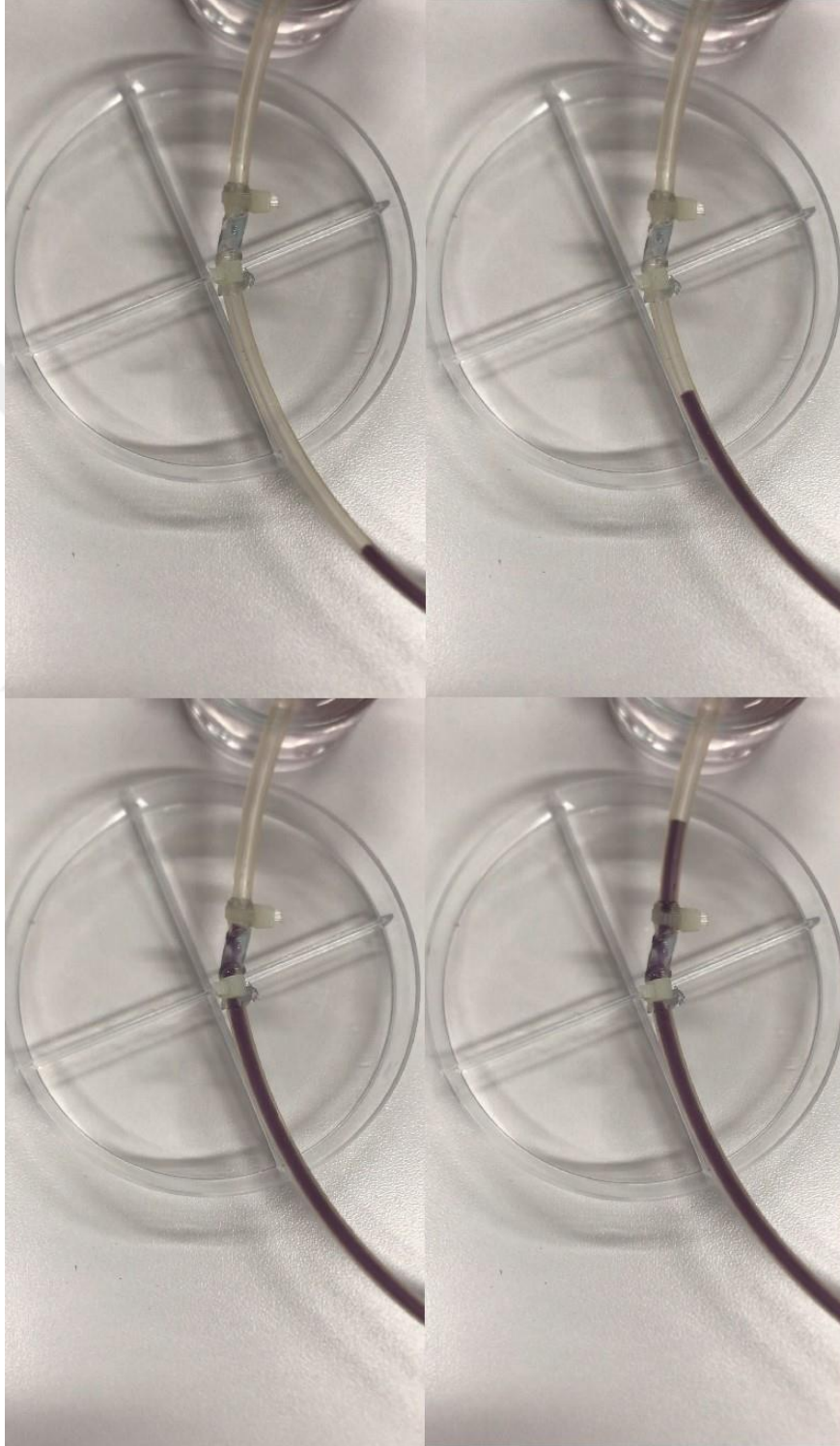
Şekil 4.8. Altıgenin jelatin destek banyosu v1 ile basıldıktan sonra CaCl_2 içindeki görünümü



Şekil 4.9. Jelatin destek banyosu v0 ile basılan altıgenin çapraz bağlanma işleminden sonraki görünümü

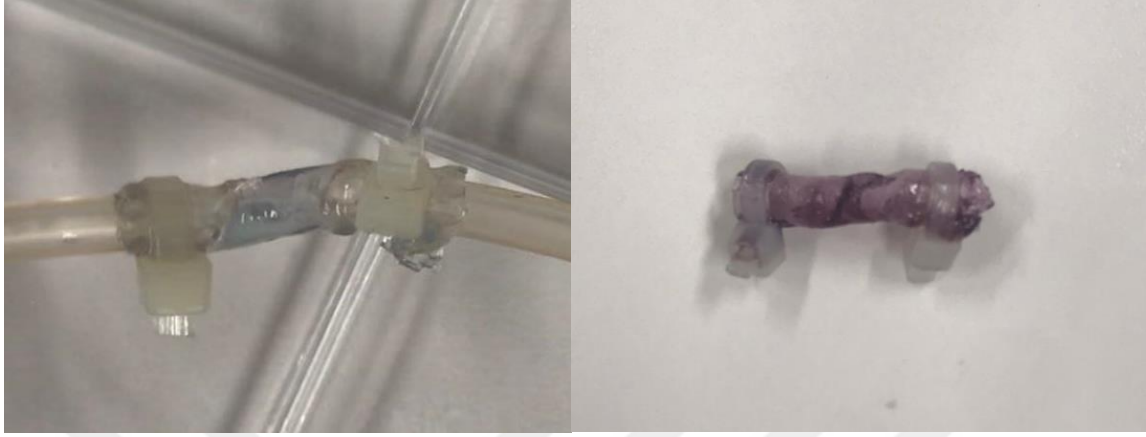
4.3. Akış Testi

Akış testine ilk başlandığında herhangi bir sızıntı görülmedi. Fakat zamanla orantılı olarak sızıntı hacminin arttığını gözlemlendi. Akış testinde gliserinin damar yapısından geçtiği ilk an şekil 4.10'da gösterildi.



Şekil 4.10. Akış testinde içi boş damar benzeri yapıdan gliserinin geçtiği an

İçi boş damar benzeri yapının akış testinden önceki ve 6 saat akışa maruz bırakıldıktan sonraki şekli karşılaştırıldığında 6 saat sonunda baskılanan içi boş damar benzeri yapının şeklinde bir bozulma gözlemlenmedi.



Şekil 4.11. İçi boş damar benzeri yapının akış testinden önceki ve 6 saat akışa maruz bırakıldıktan sonraki görüntüsü

Tablo 4.2. Akış testinin literatür ile karşılaştırılması

Biyomürekkep	Çapraz Bağ.	Duvar Kalınlığı	Boyut	Akış Test Sıvısı	Süre	Destek	Kaynak
PMSA hidrojel Akrilamid (AAm), <i>N,N'</i> - metilenbisakrilamid (MBA) ve sodyum aljinattan (SA) Amonyum persülfat (APS) -kalıplama	Kalsiyum klorür ve TEMED(<i>N,N,N'</i> , <i>N'</i> - tetrametiletilendi amin)	3mm	R=6mm	Şırınga ile -kırmızı mürekkep	Anlık	Kalıp	[86]
%4 aljinat	CaCl ₂		H=4.5cm R=5mm	Gliserol	Anlık	Jelatin	[87]
%1 aljinat	cacl	0.2	R=8 H=22mm	Gliserol	Sürekli 6 saat	Jelatin	

Literatüre bakıldığında akış testleri sadece anlık olarak değerlendirilmiş olup sızıntı olmadığı gözlemlenmişti. Çalışmamızda ise 6 saatlik sürekli bir akış testi uygulandı. Gliserolün yoğunluğunun kanın yoğunluğuyla aynı olduğu bilinmektedir [87]. Bu sebeple akış testinde gliserol kullanıldı.

Tablo 4.3. Akış testinin 6 saat akış testine maruz bırakılması sonucu sızıntı hacim miktarları

CaCl ₂ (%)	Sızıntı Hacmi (ml)	Süre(saat)
%1	14.7ml	6
%2	10.3 ml	6
%3	6.2ml	6

Akış testinde içi boş damar benzeri yapıları sırasıyla %1, %2, %3 viskoziteli CaCl₂ ile 30 dk çapraz bağlama işlemine maruz bırakıldı. %1 viskoziteli CaCl₂ ile bağlanan içi boş damar benzeri yapıda 6 saat sonunda 14.7 ml, %2 viskoziteli CaCl₂ ile bağlanan içi boş damar benzeri yapıda 10.3 ml, %3 viskoziteli CaCl₂ ile bağlanan içi boş damar benzeri yapıda 6.2 ml sızıntı hacmi gözlemlendi. %3 viskoziteli CaCl₂ ile çapraz bağlanmaya maruz bırakılan içi boş damar benzeri yapının en az hacimde sızıntı gerçekleştirildiği için en uygun çapraz bağlama viskozitesi olduğu belirlendi. Çapraz bağlama viskozitesi %5'e çıkarıldığında %3 viskoziteliye göre sızıntı hacminde bir değişiklik gözlemlenmedi. %3 ve üzeri viskoziteli bir çapraz bağlama işlemine maruz bırakıldığında stabilite gösterdi. Deneylerde %5 vizkozite üzerine çıkıldığında çapraz bağlama işlemi sonrası yapı gereğinden fazla sertleştiği için daha kırılğan bir hal aldı. Bu yüzden akış deneylerinde %5 viskoziteli bir CaCl₂ çapraz bağlama işleminin üzerine çıkılmadı.

Farklı vizkozitelerde çapraz bağlanmaya maruz bırakılan içi boş damar benzeri yapıların 15dk ara ile sızıntı hacimleri ölçüldü. Sızıntı hacmi zamana bağlı olarak stabil kaldı.

Tablo 4.4. %1 viskoziteli CaCl₂ ile çapraz bağlanmış içi boş damar yapısının sızıntı hacmi

Süre(dk)	Sızıntı Hacmi(ml)
0	0
15	0.2
30	1.1
45	2
60	2.7
75	3.3
90	3.8
105	4.3
120	4.7
135	5.3
150	5.9
165	6.5
180	7.1
360	14.7

Tablo 4.5. %2 viskoziteli CaCl₂ ile çapraz bağlanmış içi boş damar yapısının sızıntı hacmi

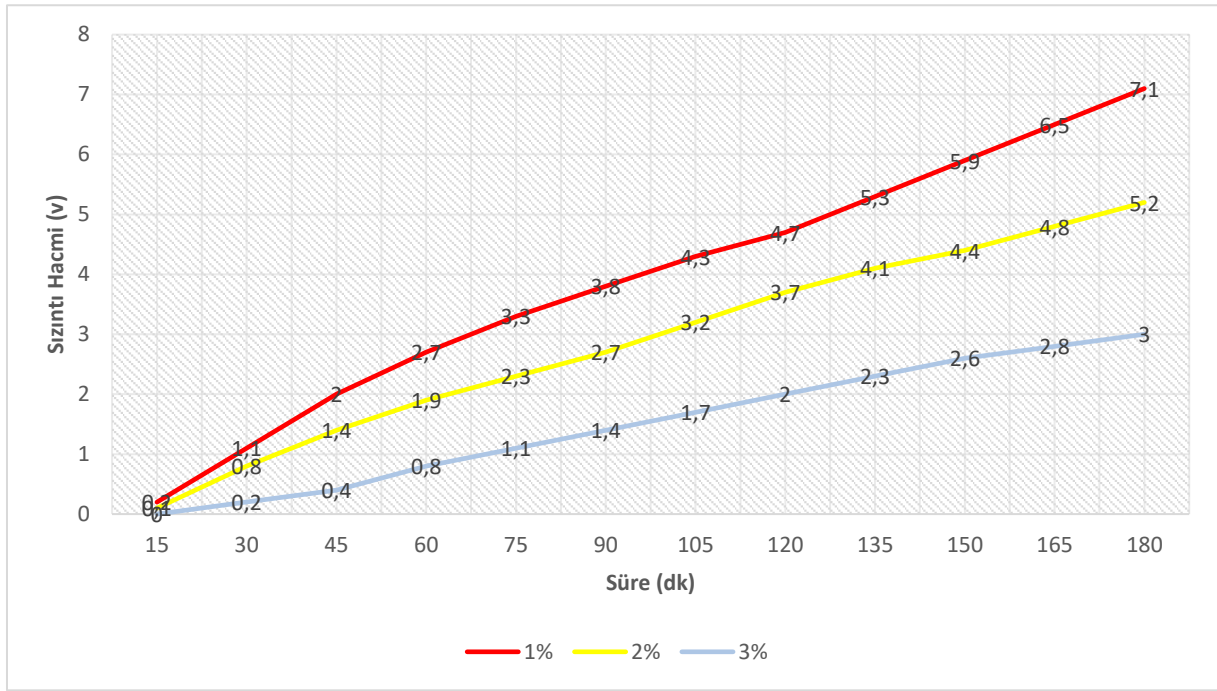
Süre(dk)	Sızıntı Hacmi(ml)
0	0
15	0.1
30	0.8
45	1.4
60	1.9
75	2.3
90	2.7
105	3.2
120	3.7
135	4.1
150	4.4
165	4.8
180	5.2
360	10.3

Tablo 4.6. %3 viskoziteli CaCl_2 ile çapraz bağlanmış içi boş damar yapısının sızıntı hacmi

Süre(dk)	Sızıntı Hacmi(ml)
0	0
15	0
30	0.2
45	0.4
60	0.8
75	1.1
90	1.4
105	1.7
120	2
135	2.3
150	2.6
165	2.8
180	3
360	6.2

15 dk ara ile ölçülen %1, %2 ve %3 viskoziteli CaCl_2 ile çapraz bağlanmış içi boş damar yapılarının sızıntı hacmi/süre grafiği Tablo 4.6' da gösterildi.

Grafikte de görüldüğü gibi %3 viskoziteli CaCl_2 ile çapraz bağlanmaya maruz bırakılan içi boş damar benzeri yapı en az hacimde sızıntı gerçekleştirdi. Bu yüzden akış testi için en uygun çapraz bağlama vizkozitesi %3'tü. Son olarak en az sızıntı hacmine sahip olduğu için %3 viskoziteli CaCl_2 ile çapraz bağlanan içi boş damar benzeri yapının gerçek bir damardaki gibi sürekli akışa daha uygun olduğu gözlemlendi.



Şekil 4.12. 15 dk ara ile ölçülen %1, %2 ve %3 viskoziteli CaCl₂ ile çapraz bağlanmış içi boş damar yapılarının sızıntı hacmi/süre grafiği

4.4. Çekme testi

%3 lük CaCl₂ çözeltisinde çapraz bağlanan yapı çekme testinden sabit bir sonuç alamayacak kadar dengesizdi. %5 lik CaCl₂ ile çapraz bağlanan yapının çekme testi sonucu 1.26 Pa olduğu görüldü. İçi boş damar benzri yapının duvar kalınlığını 0.4mm'e çıkardığımızda çekme testi sonucunda ~ 0.4 Pa bir artış gözlemlendi. Çapraz bağlama vizkozitesine ve duvar kalınlığına bağlı sonuçlar tablo 4.7'de gösterildi.

Tablo 4.7. Çekme testi sonuçları

CaCl ₂	Duvar Kalınlığı	Sonuç
%3	0.2mm	Ölçüm alamayacak kadar küçük
%5	0.2mm	1.26pa
%5	0.4mm	1.62pa

Çalışmamızda gerçekleştirdiğimiz çekme testi sonuçları literatür ile karşılaştırıldı. Yaptığımız karşılaştırma tablo 4.8' de gösterildi.

Tablo 4.8. Çekme testi sonuçlarını literatür ile karşılaştırma

Biyomüre kkep	İğne	Çekme Testi	Çapraz Bağ.	Boyut	Duvar Kalınlığı	Destek Banyosu	Kaynak
Tiramin Fonksiyonl u Aljinat/kol lejen	26G Ekstrüzyon	85.96 Pa	H ₂ O ₂	R=10mm H=6mm	2mm	Pluronic F- 127	[88]
%1 MAlg	Koaksiyel ekstrüzyon	242.1kpa	%2 CaCl ₂	H=165cm	150-180 µm	Yok	[89]
%1 MAlg	Koaksiyel ekstrüzyon	34.6 kPa	%2 mTG	H=165cm	150-180 µm	Yok	[89]
PR15-Alg	300 µm Ekstrüzyon	43 kPa				Jelatin	[90]
%1 Aljinat	28G Ekstrüzyon	1.26Pa	%5 CaCl ₂	R=8 H=22mm	0.2mm	Jelatin	

Literatürle karşılaştırdığımızda özellikle çalışmamıza benzer biyomürekkap ve çapraz bağlayıcı kullanılmasına ek olarak yapımızın duvar kalınlığının yakınlığıyla %1 MAlg biyomürekkap kullanılarak yapılan çalışma baskı yöntemi farklı olmuş olsa da bulduğumuz sonuçtan oldukça farklıydı. Bulduğumuz sonuç literatür ile karşılaştırıldığında çok düşük kalmaktadır.

4.5. Şişme Testi

Tablo 4.9. Şişme testinin literatür ile karşılaştırılması

Biyomürekkep	Stabil Şişme Oranı	Test Ortamı	Kaynak
Gel-SA Jelatin bazlı aljinat	%334.02	PBS	[91]
KCMA/SA hidrojel metakrilatlanmış karragenan (KCMA) ve sodyum aljinat (SA)	%10,88	PBS	[92]
%1 Aljinat	%35.38	Saf su	
%1 Aljinat	%65.5	Gliserin	

Tablo 4.9’ da görüldüğü gibi sonuçlarımız literatür ile karşılaştırdığımızda birbirinden farklı sonuçlar gözlemlendi. Bunun sebebi biyomürekkeplerin farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmekte. Kendi yaptığımız şişme testi sonuçlarına göre şişme testi içinde kullandığımız sıvı değiştiğinde bile %30 oranında bir farklılık görülmektedir. Şişme oranı gliserinde bekletildiğinde daha yüksek şişme oranı gözlemlendi.

Tablo 4.10. Saf su ile yapılan şişme testi sonuçları

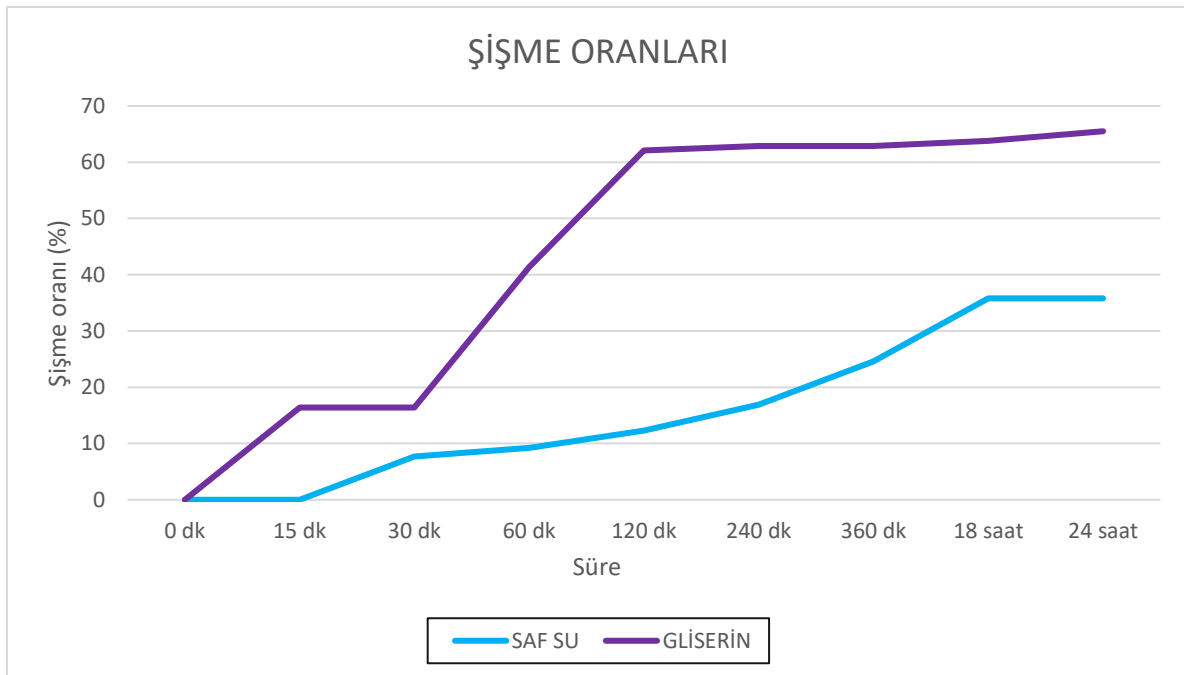
Saf Su	Şişme Oranı (%)	Süre
0,065	0	0 dk
0,065	0	15 dk
0,070	7,69	30 dk
0,071	9.2	60 dk
0,073	12,3	120 dk
0,076	16,9	240 dk
0,081	24,6	360 dk
0,088	35,38	18 saat
0,088	35,38	24 saat

Saf su ile yapılan şişme testi sonuçları tablo 4.10’da gösterildi. Sonuçlara göre saf su ile yapılan şişme testinde stabil şişme oranı %35,38 olarak gözlemlendi. 18 saat ve sonrası için içi boş damar benzeri yapı maksimum kapasitesine ulaştı.

Tablo 4.11. Gliserin ile yapılan şişme testi sonuçları

Gliserin	Şişme Oranı(%)	Süre
0,116	0	0 dk
0,135	16,38	15 dk
0,135	16,38	30 dk
0,164	41,38	60 dk
0,188	62,07	120 dk
0,189	62,9	240 dk
0,189	62,9	360 dk
0,190	63,79	18 saat
0,092	65,5	24 saat

Tablo 4.11’de gliserin ile yapılan şişme testi sonuçları gösterildi. Bu Sonuçlara göre gliserin ile yapılan şişme testinde stabil şişme oranı %65,5 olarak gözlemlendi. 120 dk sonrasında şişme oranı artışı yavaşladı.



Şekil 4.13. Saf su ve gliserinin şişme oranı/süre grafiği

Şekil 4.13’de görüldüğü gibi gliserin ve saf suda yapılan şişme testi sonucunda gliserinin şişme oranı 120dk ve sonrasında yavaşça stabil hale gelmişken saf su ile yapılan teste 18 saat ve sonrasında stabil hale geldi. Saf su ve gliserin ile yapılan şişme testi karşılaştırıldığında gliserin ile yapılan testteki şişme oranı saf su ile yapılan teste göre daha yüksekti.

4.6. Bozunma Testi

%1 vizikozitedeki aljinat hidrojelini içi boş damar benzeri yapıda baskıladıktan sonra bozunma testi gerçekleştirildi. Sonuçlar literatürle karşılaştırıldığında bozunma süresinin daha uzun olduğu görüldü. GEL-SA hidrojeli 10. Günde tamamen bozulurken tasarladığımız biyomürekkep 7. Günde gliserin içinde %58,95 saf su da ise %47,7 bozunma oranına sahipti.

Tablo 4.12. Şişme testinin literatür ile karşılaştırılması

Biyomürekkep	Şişme oranı	Test ortamı	Kaynak
Gel-SA Jelatin bazlı aljinat	10.günde %100	PBS	[91]
%1 Aljinat	7.günde %47,7	Saf su	
%1 Aljinat	7.gün %58,95	Gliserin	

Saf su ile yaptığımız bozunma testinde 7. Günde bozunma oranının %47,7 olduğu görüldü. Bozunma oranındaki artış en çok 2.günde görüldü. 2. Günden sonra bozunma oranı stabil bir şekilde arttı.

Tablo 4.13. Saf su ile yapılan şişme testi sonuçları

Saf Su	Bozunma Oranı(%)	Süre(Gün)
0,086	0	0
0,080	6,98	1
0,051	40,7	2
0.049	43	3
0.045	47,7	7

Gliserin ile yaptığımız bozunma testinde bozunma oranındaki artış saf suda olduğu gibi en çok 2.günde görüldü. 2. Günden sonra bozunma oranı stabil bir şekilde arttı. 7. Günde bozunma oranının %58,95 olduğu görüldü.

Tabla 4.14. Gliserin ile yapılan şişme testi sonuçları

Gliserin	Bozunma Oranı(%)	Süre(Gün)
0,190	0	0
0.142	25,3	1
0,087	54,2	2
0.085	55,3	3
0.078	58,95	7

5.SONUÇLAR

Araştırma sonuçlarına göre, %1 viskoziteli aljinat hidrojel kullanarak jelatin destek banyosu v1 ile içi boş damar benzeri yapının 28G iğne ucu kullanarak baskılanabildiği gözlemlendi. Baskı işleminin ön ayarlarında yükseklik 22mm olarak belirlendi. İçi boş damar benzeri yapı, %5'lik CaCl_2 içinde çapraz bağlandıktan sonra, baskı işlemi sırasında ayarlanan yapının ölçülerini sabit tuttu. Bu sonuçlar, dijital ortamda ayarlanan baskı parametrelerinin başarılı bir şekilde duruşunu gösterdi.

Jelatin destek banyo v0 ile jelatin destek banyo v1'in basılabilirlikleri karşılaştırıldığında, jelatin destek banyo v1'in daha yüksek baskı kalitesine sahip olduğu görüldü. Jelatin destek banyosu v0'da baskı sırasında şişmenin meydana geldiği gözlemlendi ve bu nedenle istenen duvar kalınlığı ve genişliği elde edilemedi.

Akış testi sırasında içi boş damar benzeri yapılar sırasıyla %1, %2 ve %3 viskoziteli CaCl_2 çözeltileri ile 30 dakika boyunca çapraz bağlama işlemine tutuldu. %1 viskoziteli CaCl_2 ile çapraz bağlanan içi boş damar benzeri yapı 6 saat sonu 14.7 ml, %2 viskoziteli CaCl_2 ile çapraz bağlanan yapı 10.3 ml ve %3 viskoziteli CaCl_2 ile çapraz bağlanan yapı ise 6.2 ml sızıntı hacmi gözlemlendi. Bu sonuçlara göre, %3 viskoziteli CaCl_2 ile yapılan çapraz bağlamanın en az sızıntı hacmine neden olduğu ve en uygun çapraz bağlama viskozitesi olduğu belirlendi.

%3 CaCl_2 solüsyonundaki çapraz bağlı yapı, çekme testinin stabil bir sonucunu elde etmek için fazla kararsızdı. %5 CaCl_2 ile çapraz bağlı yapının çekme testi sonucu 1,26 Pa'dı. İçi boş damar benzeri yapının et kalınlığını 0,4 mm'ye yükselttiğimizde çekme testinde ~0,4 Pa'lık bir artış gözlemlendi.

Sonuçlara göre saf su ile yapılan şişme testinde stabil şişme oranı %35,38 olarak gözlemlendi. 18 saat ve sonrası için içi boş damar benzeri yapı maksimum kapasitesine ulaştı. Gliserin ile yapılan şişme testinde stabil şişme oranı %65,5 olarak gözlemlendi. 120 dk sonrasında şişme oranı artışı yavaşlamıştı. Burada içi boş damar yapısında gliserinin daha fazla hacimde ve daha hızlı emildiği sonucuna varıldı.

Saf su ile yapılan bozunma testinde 7. günde bozunma hızının %47,7 olduğu bulundu. Bozunmadaki maksimum artış 2. günde gözlemlendi. İkinci günden sonra bozulma hızı istikrarlı bir şekilde arttı. Gliserin ile bozunma testinde saf suda olduğu gibi bozunma hızında maksimum 2. günde artış gözlemlendi. İkinci günden sonra, bozulma oranı istikrarlı bir şekilde arttı. 7. günde bozunma oranının %58,95 olduğu bulundu. Bu sonuca göre hem saf su hemde

gliserinle yapılan bozunma tetinde 2. Günden sonra bozunma oranı maksimumdu. Gliserin içinde içi boş damar yapısının bozunması daha hızlıydı.



KAYNAKLAR

- [1] Mathers, Colin D., and Dejan Loncar. "Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030." *PLoS medicine* 3.11 (2006): e442.
- [2] Pashneh-Tala, Samand, Sheila MacNeil, and Frederik Claeyssens. "The tissue-engineered vascular graft—past, present, and future." *Tissue Engineering Part B: Reviews* 22.1 (2016): 68-100.
- [3] Taylor, Lloyd M., et al. "Autogenous reversed vein bypass for lower extremity ischemia in patients with absent or inadequate greater saphenous vein." *The American journal of surgery* 153.5 (1987): 505-510.
- [4] Harskamp, Ralf E., et al. "Saphenous vein graft failure after coronary artery bypass surgery: pathophysiology, management, and future directions." *Annals of surgery* 257.5 (2013): 824-833.
- [5] Han, Xiaoxiao, Richard Bibb, and Russell Harris. "Engineering design of artificial vascular junctions for 3D printing." *Biofabrication* 8.2 (2016): 025018.
- [6] Tucker, William D., Yingyot Arora, and Kunal Mahajan. "Anatomy, blood vessels." (2017).
- [7] Miri, Amir K., et al. "Multiscale bioprinting of vascularized models." *Biomaterials* 198 (2019): 204-216.
- [8] Hammes, Mary. "Hemodynamic and biologic determinates of arteriovenous fistula outcomes in renal failure patients." *BioMed research international* 2015 (2015).
- [9] Cao, Xia, et al. "Bioprinting of small-diameter blood vessels." *Engineering* 7.6 (2021): 832-844.
- [10] Moya, Monica L., et al. "In vitro perfused human capillary networks." *Tissue Engineering Part C: Methods* 19.9 (2013): 730-737.
- [11] Tremblay, Pierre-Luc, et al. "Inosculation of tissue-engineered capillaries with the host's vasculature in a reconstructed skin transplanted on mice." *American journal of transplantation* 5.5 (2005): 1002-1010.
- [12] Nunes, Sara S., 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* 17.7 (2010): 557-567.

- [13] Kannan, Ruben Y., et al. "The roles of tissue engineering and vascularisation in the development of micro-vascular networks: a review." *Biomaterials* 26.14 (2005): 1857-1875.
- [14] Mironov, Vladimir, et al. "Organ printing: promises and challenges." (2008): 93-103.
- [15] Gao, Wei, et al. "The status, challenges, and future of additive manufacturing in engineering." *Computer-Aided Design* 69 (2015): 65-89.
- [16] Kolesky, David B., et al. "3D bioprinting of vascularized, heterogeneous cell-laden tissue constructs." *Advanced materials* 26.19 (2014): 3124-3130.
- [17] Bergmann, Christian, et al. "3D printing of bone substitute implants using calcium phosphate and bioactive glasses." *Journal of the European Ceramic Society* 30.12 (2010): 2563-2567.
- [18] Ozbolat, Ibrahim T., Weijie Peng, and Veli Ozbolat. "Application areas of 3D bioprinting." *Drug discovery today* 21.8 (2016): 1257-1271.
- [19] Zhang, Bin, et al. "3D bioprinting: an emerging technology full of opportunities and challenges." *Bio-Design and Manufacturing* 1 (2018): 2-13.
- [20] Frantz, Christian, Kathleen M. Stewart, and Valerie M. Weaver. "The extracellular matrix at a glance." *Journal of cell science* 123.24 (2010): 4195-4200.
- [21] Bosman, Fred T., and Ivan Stamenkovic. "Functional structure and composition of the extracellular matrix." *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland* 200.4 (2003): 423-428.
- [22] Porzionato, Andrea, et al. "Tissue-engineered grafts from human decellularized extracellular matrices: a systematic review and future perspectives." *International journal of molecular sciences* 19.12 (2018): 4117.
- [23] Sun, Wei, et al. "The bioprinting roadmap." *Biofabrication* 12.2 (2020): 022002.
- [24] Fang, Yongcong, et al. "Advances in 3D bioprinting." *Chinese Journal of Mechanical Engineering: Additive Manufacturing Frontiers* 1.1 (2022): 100011.
- [25] Bejoy, Aathma Merin, et al. "An insight on advances and applications of 3d bioprinting: A review." *Bioprinting* 24 (2021): e00176.
- [26] Samandari, Mohamadmahdi, et al. "Bioinks and bioprinting strategies for skeletal muscle tissue engineering." *Advanced Materials* 34.12 (2022): 2105883.

- [27] Gu, Zeming, et al. "Development of 3D bioprinting: From printing methods to biomedical applications." *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 15.5 (2020): 529-557.
- [28] Seol, Young-Joon, et al. "Bioprinting technology and its applications." *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* 46.3 (2014): 342-348.
- [29] Unagolla, Janitha M., and Ambalangodage C. Jayasuriya. "Hydrogel-based 3D bioprinting: A comprehensive review on cell-laden hydrogels, bioink formulations, and future perspectives." *Applied materials today* 18 (2020): 100479.
- [30] Elemoso, Anton, et al. "3D Bioprinting: The roller coaster ride to commercialization." *International Journal of Bioprinting* 6.3 (2020).
- [31] Donderwinkel, Ilze, Jan CM Van Hest, and Neil R. Cameron. "Bio-inks for 3D bioprinting: recent advances and future prospects." *Polymer Chemistry* 8.31 (2017): 4451-4471.
- [32] Ozbolat, Ibrahim T., and Monika Hospodiuk. "Current advances and future perspectives in extrusion-based bioprinting." *Biomaterials* 76 (2016): 321-343.
- [33] Karvinen, Jennika, and Minna Kellomäki. "Design aspects and characterization of hydrogel-based bioinks for extrusion-based bioprinting." *Bioprinting* (2023): e00274.
- [34] Williams, David F. "On the mechanisms of biocompatibility." *Biomaterials* 29.20 (2008): 2941-2953.
- [35] Brandl, Ferdinand, Florian Sommer, and Achim Goepferich. "Rational design of hydrogels for tissue engineering: impact of physical factors on cell behavior." *Biomaterials* 28.2 (2007): 134-146.
- [36] Atala, Anthony, and James J. Yoo. *Essentials of 3D biofabrication and translation*. Academic Press, 2015.
- [37] Merceron, Tyler K., and Sean V. Murphy. "Hydrogels for 3D bioprinting applications." *Essentials of 3D biofabrication and translation*. Academic Press, 2015. 249-270.
- [38] Hynes, Richard O., and Alexandra Naba. "Overview of the matrisome—an inventory of extracellular matrix constituents and functions." *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4.1 (2012): a004903.
- [39] Malda, Jos, et al. "25th anniversary article: engineering hydrogels for biofabrication." *Advanced materials* 25.36 (2013): 5011-5028.

- [40] Ning, Liquan, and Xiongbiao Chen. "A brief review of extrusion-based tissue scaffold bio-printing." *Biotechnology journal* 12.8 (2017): 1600671.
- [41] GhavamiNejad, Amin, et al. "Crosslinking strategies for 3D bioprinting of polymeric hydrogels." *Small* 16.35 (2020): 2002931.
- [42] Chu, Yun, et al. "Long-term stability, high strength, and 3D printable alginate hydrogel for cartilage tissue engineering application." *Biomedical Materials* 16.6 (2021): 064102.
- [43] Noor, Nadav, et al. "3D printing of personalized thick and perfusable cardiac patches and hearts." *Advanced science* 6.11 (2019): 1900344.
- [44] Liu, Wanjun, et al. "Bioprinting: Rapid continuous multimaterial extrusion bioprinting (Adv. Mater. 3/2017)." *Advanced Materials* 29.3 (2017).
- [45] Khaled, Shaban A., et al. "3D extrusion printing of high drug loading immediate release paracetamol tablets." *International journal of pharmaceutics* 538.1-2 (2018): 223-230.
- [46] Jacob, Guillermo Tejada, et al. "Hydrogels for extrusion-based bioprinting: General considerations." *Bioprinting* 27 (2022): e00212.
- [47] Fatimi, Ahmed, et al. "Natural hydrogel-based bio-inks for 3D bioprinting in tissue engineering: A review." *Gels* 8.3 (2022): 179.
- [48] Hospodiuk, Monika, et al. "The bioink: A comprehensive review on bioprintable materials." *Biotechnology advances* 35.2 (2017): 217-239.
- [49] Schuurman, Wouter, et al. "Bioprinting of hybrid tissue constructs with tailorable mechanical properties." *Biofabrication* 3.2 (2011): 021001.
- [50] Cui, Xiaolin, et al. "Advances in extrusion 3D bioprinting: a focus on multicomponent hydrogel-based bioinks." *Advanced healthcare materials* 9.15 (2020): 1901648.
- [51] Zhang, Tao, et al. "Bioink design for extrusion-based bioprinting." *Applied Materials Today* 25 (2021): 101227.
- [52] Taneja, Himanshu, et al. "Hydrogel based 3D printing: Bio ink for tissue engineering." *Journal of Molecular Liquids* (2022): 120390.
- [53] Chin, Sau Yin, et al. "Additive manufacturing of hydrogel-based materials for next-generation implantable medical devices." *Science robotics* 2.2 (2017): eaah6451.

- [54] Silva, Raquel, Ben Fabry, and Aldo R. Boccaccini. "Fibrous protein-based hydrogels for cell encapsulation." *Biomaterials* 35.25 (2014): 6727-6738.
- [55] Klak, Marta, et al. "Novel strategies in artificial organ development: what is the future of medicine?." *Micromachines* 11.7 (2020): 646.
- [56] Zheng, Zizhuo ve ark. "Görünür ışık kaynaklı 3B biyobaskı teknolojileri ve doku mühendisliği için ilgili biyomürekkep malzemeleri: bir inceleme." *Mühendislik*
- [57] Ribeiro, Alexandre, et al. "Assessing bioink shape fidelity to aid material development in 3D bioprinting." *Biofabrication* 10.1 (2017): 014102.
- [58] He, Peng, et al. "Bioprinting of skin constructs for wound healing." *Burns & trauma* 6 (2018).
- [59] Ahadian, Samad, and Ali Khademhosseini. "A perspective on 3D bioprinting in tissue regeneration." *Bio-design and manufacturing* 1.3 (2018): 157-160.
- [60] Choi, Yeong-Jin, et al. "3D bioprinting of in vitro models using hydrogel-based bioinks." *Polymers* 13.3 (2021): 366.
- [61] GV, Yashaswini Devi, et al. "Preparation and characterization of dexamethasone loaded sodium alginate-graphene oxide microspheres for bone tissue engineering." *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 64 (2021): 102624.
- [62] Radhakrishnan, Socrates, et al. "Doku mühendisliği uygulamaları için 3D baskılı antimikrobiyal polikaprolakton yapı iskelelerinin imalatı." *Malzeme Bilimi ve Mühendisliği: C* 118 (2021): 111525.
- [63] Skardal, Aleksander, and Anthony Atala. "Biomaterials for integration with 3-D bioprinting." *Annals of biomedical engineering* 43.3 (2015): 730-746.
- [64] Mobaraki, Mohammadmahdi, et al. "Bioinks and bioprinting: A focused review." *Bioprinting* 18 (2020): e00080.
- [65] Gombotz, Wayne R., and Siow Fong Wee. "Protein release from alginate matrices." *Advanced drug delivery reviews* 64 (2012): 194-205.
- [66] Vacanti, Joseph P., and Robert Langer. "Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation." *The lancet* 354 (1999): S32-S34.

- [67] Lee, Kuen Yong, and David J. Mooney. "Hydrogels for tissue engineering." *Chemical reviews* 101.7 (2001): 1869-1880.
- [68] Pahlevanzadeh, Farnoosh, et al. "Recent trends in three-dimensional bioinks based on alginate for biomedical applications." *Materials* 13.18 (2020): 3980.
- [69] Khalil, H. P. S., et al. "A review of extractions of seaweed hydrocolloids: Properties and applications." *Express Polymer Letters* 12.4 (2018).
- [70] Lee, Kuen Yong, and David J. Mooney. "Alginate: properties and biomedical applications." *Progress in polymer science* 37.1 (2012): 106-126.
- [71] Hecht, Hadas, and Simcha Srebnik. "Structural characterization of sodium alginate and calcium alginate." *Biomacromolecules* 17.6 (2016): 2160-2167.
- [72] Murab, Sumit, et al. "Alginate based hydrogel inks for 3D bioprinting of engineered orthopedic tissues." *Carbohydrate Polymers* (2022): 119964.
- [73] Gurikov, Pavel, and Irina Smirnova. "Non-conventional methods for gelation of alginate." *Gels* 4.1 (2018): 14.
- [74] Schütz, Kathleen, et al. "Three-dimensional plotting of a cell-laden alginate/methylcellulose blend: towards biofabrication of tissue engineering constructs with clinically relevant dimensions." *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 11.5 (2017): 1574-1587.
- [75] Jiang, Tao, et al. "Extrusion bioprinting of soft materials: An emerging technique for biological model fabrication." *Applied Physics Reviews* 6.1 (2019).
- [76] Tabriz, Atabak Ghanizadeh, et al. "Three-dimensional bioprinting of complex cell laden alginate hydrogel structures." *Biofabrication* 7.4 (2015): 045012.
- [77] Allencherry, Joel, et al. "Investigation of hydrogel and gelatin bath formulations for extrusion-based 3D bioprinting using deep learning." *Procedia CIRP* 110 (2022): 360-365.
- [78] Pellegrino, Amanda. "Bioprinting alginate structures using the FRESH method." (2021).
- [79] Bessler, Nils, et al. "NyduS One Syringe Extruder (NOSE): A Prusa i3 3D printer conversion for bioprinting applications utilizing the FRESH-method." *HardwareX* 6 (2019): e00069.

- [80] Song, Seung-Joon, et al. "Sodium alginate hydrogel-based bioprinting using a novel multinozzle bioprinting system." *Artificial organs* 35.11 (2011): 1132-1136.
- [81] Khalil, Saif, and Wei Sun. "Bioprinting endothelial cells with alginate for 3D tissue constructs." (2009): 111002.
- [82] Kumar, S. Deepak, G. Arun Manohar, and R. Surya Teja. "The state of art 3D printing: A case study of Ganesh Idol." *Materials Today: Proceedings* 56 (2022): 455-461.
- [83] Amirian, Jhaleh, et al. "In-situ crosslinked hydrogel based on amidated pectin/oxidized chitosan as potential wound dressing for skin repairing." *Carbohydrate Polymers* 251 (2021): 117005.
- [84] Tian Jiao, Q. L., et al. "Properties of collagen/sodium alginate hydrogels for bioprinting of skin models." (2022).
- [85] Zhang, Yeshun, et al. "A transparent sericin-polyacrylamide interpenetrating network hydrogel as visualized dressing material." *Polymer Testing* 87 (2020): 106517.
- [86] Zhou, Lingtong, et al. "A 3D printing mold method for rapid fabrication of artificial blood vessels." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 662 (2023): 130952.
- [87] Mirdamadi, Eman, et al. "FRESH 3D bioprinting a full-size model of the human heart." *ACS Biomaterials Science & Engineering* 6.11 (2020): 6453-6459.
- [88] Kim, Sung Dong, et al. "Tyramine-functionalized alginate-collagen hybrid hydrogel inks for 3d-bioprinting." *Polymers* 14.15 (2022): 3173.
- [89] Wang, Di, et al. "Microfluidic bioprinting of tough hydrogel-based vascular conduits for functional blood vessels." *Science Advances* 8.43 (2022): eabq6900.
- [90] Liu, Yuanshan, et al. "Slide-ring structure-based double-network hydrogel with enhanced stretchability and toughness for 3D-bio-printing and its potential application as artificial small-diameter blood vessels." *ACS Applied Bio Materials* 4.12 (2021): 8597-8606.
- [91] Li, Liying, et al. "Engineering gelatin-based alginate/carbon nanotubes blend bioink for direct 3D printing of vessel constructs." *International journal of biological macromolecules* 145 (2020): 262-271.

[92] Zhou, Anduo, et al. "3D bioprintable methacrylated carrageenan/sodium alginate dual network hydrogel for vascular tissue engineering scaffolding." *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* 72.7 (2023): 550-560.

