



Yapay Organlar ve Biyoyazıcılar

Ali AKPEK^{1,2}

¹ Gebze Teknik Üniversitesi Kocaeli-Türkiye

² Sabancı Üniversitesi, Tuzla İstanbul Türkiye

1. Giriş

Her geçen yıl organ transplantasyonu konusundaki ihtiyaç sürekli olarak artmaktadır. Organ nakline ihtiyaç sürekli olarak artarken organ bağıışı sayısında ciddi bir artış gözlenmemektedir. Bu sebeple her sene yüzbinlerce insan organ nakli için sırada beklerken hayatlarını kaybetmektedir.

Bu durumun ciddiyetini göstermek açısından verilebilecek en önemli örneklerden bir tanesi kalp hastalıklarıdır. Kardiyovasküler hastalıklar dünya çapında insanların ölümüne neden olan en yaygın hastalıklardır. Bu hastalıklar her yıl yaklaşık 20 milyon insanın ölümüne neden olmaktadır. Kardiyovasküler dokulara her yıl 600,000 cerrahi müdahalede bulunmaktadır ve bunun maliyeti yaklaşık olarak 200 milyar dolar civarındadır. Kardiyovasküler hastalıklar arasında en yaygın olanları kalp krizine neden olan kalp kası hastalıkları ve kalp kapakçıkları hastalıklarıdır. Mevcut trend göz önünde bulundurulduğunda kardiyovasküler hastalıkların 2050 yılına kadar günümüzde olduğundan üç katı daha yaygın olması beklenmektedir.

Ne yazık ki kalp kaslarının ya da kalp kapakçıklarının kendiliğinden yenilenmesi mümkün değildir. Kalp kapakçıkları bazı durumlar için cerrahi müdahaleler ile tedavi edilebilir ancak çoğunlukla biyolojik veya mekanik protezler tedavi için tek alternatiftir. Maalesef bu yapay kalp kapakçıkları da kusursuz değildir. Trombojenez (pıhtılaşma), kalsifikasyon (kireçlenme) ve çocuk hastalar için kalp kapakçıklarının büyüdükçe tekrar tekrar modellenmesi ihtiyaçları ciddi sorunlardır. Kalp kasları ise kalp krizi durumlarında kısa bir süre için dahi çalışamaz hale gelirse dokular ölmeye başlar ve hasta kalp krizini atlatsa dahi dokular ölü kalır. Bu da kalpte kan pompalamasında ciddi sorunlara neden olacağı gibi yeni kalp krizlerine davetiye çıkartır. Hasta ömür boyu ilaçlara bağımlı yaşar.

Bu sorunun en önemli çözüm metotlarından birisi başta biyoyazıcılar olmak üzere çeşitli 3B organ biyofabrikasyonu metotları ile üretilmiş kalp dokusu ve aortik kalp kapakçıklarının geliştirilmesidir. Biyoyazıcılar ile 3B organ biyofabrikasyonu; belirlenmiş biyomalzemelerin iki boyutlu olarak üretilip, üst üste yerleştirilip kaynaştırılmaları sonucunda üç boyutlu yapıların ortaya çıkmasını sağlayan eklemeli bir üretim teknolojisidir. Bu teknoloji ile sadece biyomalzemeler değil, ekstraselüler matriks, proteinler, büyüme faktörleri gibi biyokimyasal ajanlar ve hatta hücreler dahi baskı sürecine dahil edilebilir veya biyomalzemeler ile doku iskelesi üretildikten sonra bunlar eklenebilir. 3B organ baskısı tekniğinin diğer doku mühendisliği tekniklerine nazaran pek çok avantajı vardır. İlk olarak kullanımı kolay bir yöntemdir. Grifit yapılar kolaylıkla üretilir. Düzgün bir planlama ile hücreler ve diğer bütün biyokimyasal ürünler arzu edilen bölgelere yerleştirilebilir.

Bu çalışmada biyoyazıcı teknolojileri ile ilgili temel kavramlardan, biyoyazıcı ile üretilmiş belirli yapay organlardan, biyoyazıcı stratejilerinden ve günümüzdeki biyoyazıcı teknolojisinin geldiği nokta ile eksikliklerinden bahsedilecektir.

2. 3 Boyutlu Yazıcılardan 3 Boyutlu Biyoyazıcılara

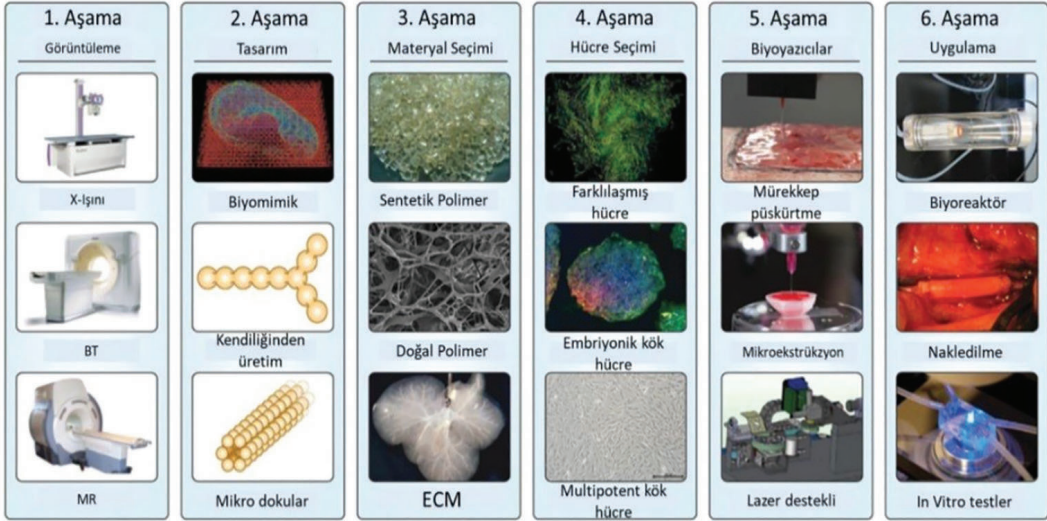
Üç boyutlu yazıcıların kullanılması üretim teknolojileri açısından son derece büyük bir yenilik olmuştur. Bu sayede sadece büyük üretim tesislerinden son derece pahalı cihazlar aracılığı ile gerçekleştirilebilen seri üretimin evlerde son derece ekonomik bir biçimde üretilebileceği gösterilmiştir (Li vd., 2015). Üç boyutlu yazıcı teknolojileri dünya genelinde yaygınlaşmış olmasına rağmen teknolojileri henüz hala daha gelişme evresindedir. Buna rağmen temel ev araç gereçlerinden silahlara, denizaltılardan arabalara, tanklardan mobilyalara, kahvelerden pizzalara ve hatta ev ve gökdelen inşaatlarına kadar sayısız pek çok alanda üç boyutlu yazıcılar hali hazırda kullanılmakta ve üreticilere hem maliyet hem de tasarım sınırsızlığı imkanı sağlaması açısından çok büyük avantajlar sağlamaktadır. Teknoloji geliştirilmesinde doyum noktasına ulaşıldığında her evde her bir kullanıcının tamamen kendilerine özgü olarak hemen hemen her ürünü üretebilmesi beklenmektedir. Böylelikle üretim teknolojileri açısından yeni bir çağ başlamış olacaktır (Ozbolat & Yu, 2013).

Sağlık sektörü de üç boyutlu yazıcılardan nasibini almıştır. Üç boyutlu yazıcılar implant üretiminde ve de cerrahlara riskli ameliyatlar için gerçekçi cerrahi modeller üretebilmek amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır.

Ancak üç boyutlu yazıcıların sağlık alanında kullanımı sadece bundan ibaret değildir. Organ ve doku üretimi açısından da biyoyazıcı adı verilen yeni teknolojiler geliştirilmiştir. Bu teknoloji aracılığı ile canlı hücreler dokulara nakledilmekte ve ihtiyaç duyan hastalara nakledilmeye uygun doku ve organlar üretilmeye çalışılmaktadır (Akpek, 2018).

Biyoyazıcılar ilk olarak Klebe tarafından 1988 yılında kolajen ve fibronektinin uygun noktalara yerleştirilerek mikro pozisyonlanmasının sağlanması sayesinde gerçekleştirilmiştir (Klebe, 1988). Bu çalışma Hewlett-Packard (HP) marka mürekkep püskürtmeli bir yazıcının bir grafik arayüzü aracılığı ile programlanması ve

biyolojik malzemelerin belirlenen noktalara yerleştirilmesi sayesinde gerçekleştirilmiştir. Çalışma, 1999 yılında Odde ve Renn tarafından daha da geliştirilmiş ve hücrelerde doku tasarımında kullanılmıştır (Odde & Renn, 1999).



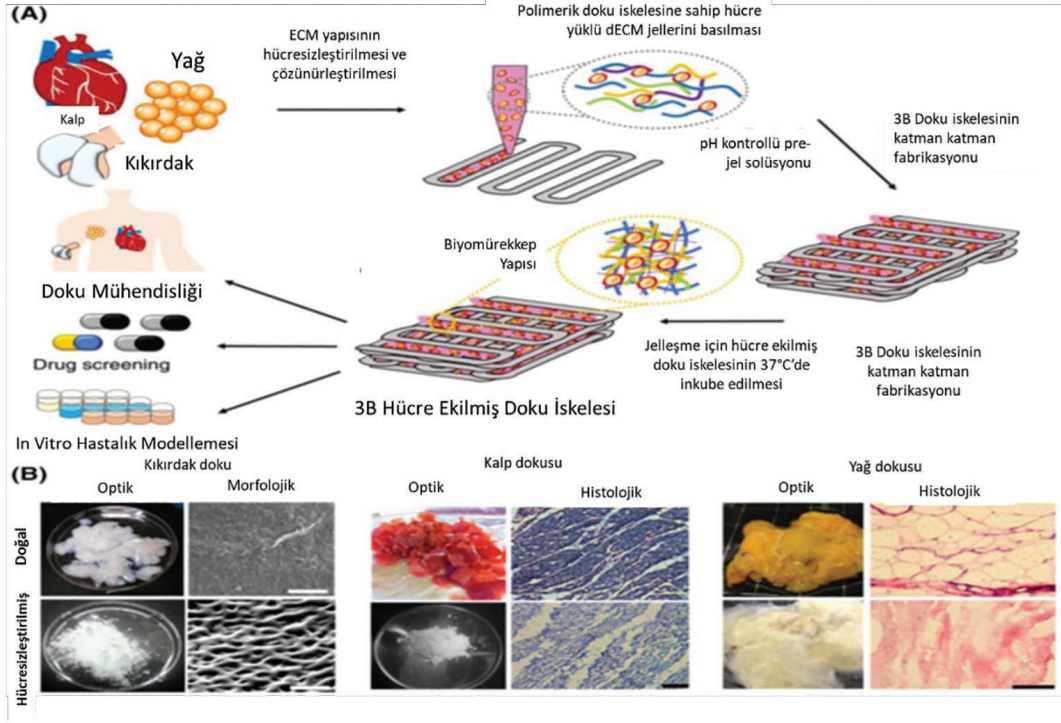
Şekil 1: Biyoyazıcılar ile 3B biyoüretimin süreçleri (Murphy & Atala, 2014)

Çalışmada lazer temelli bir biyoyazıcı kullanılmıştır. Bu sayede hücrelerinde hedeflenen noktalara yerleştirilebileceği ve 3B yapay doku ve hatta organ üretebileceği gösterilmiştir. Bu çalışma ile birlikte biyoyazıcılar konusuna ilgi artmış ve pek çok araştırmacı bu alanda çalışmalar gerçekleştirmeye başlamıştır (Hutmacher vd., 2004; Rai vd., 2005). Sayısız araştırmacı pek çok spin-off kurmuş ve biyoyazıcı teknolojilerini daha ileri taşımıştır (Narayan, 2014; Ozbolat vd., 2014). Günümüzde biyoyazıcı teknolojilerinin odağında damarlarında eklemlenebildiği doku üretimlerini gerçekleştirmek vardır. Bu sayede amaç kısa vadede nakledilmeye uygun hastaya özel olarak tasarlanmış doku geliştirmek orta vadede ise amaç hastanın kendi hücrelerinden üretilmiş ve hastaya özel olarak tasarlanmış organlar üretmektir. Şekil 1'de biyoyazıcı metodolojisinin temellerinden bahsedilmiştir.

3. Biyomürekkep

Biyomürekkep seçimi biyoyazıcı teknolojileri aracılığı ile yapay organ üretilmesi açısından en kritik noktalardan bir tanesini oluşturmaktadır. Biyomürekkep üretilmesi planlanan yapay doku ve organların hem çimentosu hem de tuğlaları hükmündedir. Doğru malzeme ve doğru oranlar kullanılmadığı takdirde yapay doku üretiminin başarılı olması mümkün değildir (Chung vd., 2013). Biyomürekkep seçimlerinde gözönünde bulundurulması gereken pek çok kriter vardır. Kullanılacak olan biyomalzemenin doğal mı sentetik mi olacağı, eğer çeşitli karışımlarda olaksa hangi oranlarda olacağı, biyoyayumluluk ve biyomekanik özellikleri, kullanılacak olan biyoyazıcı tekniğine ve stratejisine uyumlu olup olmadığı gibi pek çok kriter mevcuttur (Murphy & Atala, 2014; Murphy vd., 2013).

Bugüne kadar aljinat, jelatin, kolajen, fibrin, hyaluronik asit, kitosan, agaroz gibi hidrojel temelli doğal biyopolimerler ile PEG ve pluronik gibi sentetik polimerlerin biyomürekkep olarak yüksek bir etkinlikle kullanılabileceği gösterilmiştir. Bu biyomürekkepler sadece yapısal olarak doku ve organların üzerinde inşa edileceği iskeletleri oluşturmakla kalmamakta bunun üzerine ekilecek hücrelerin canlılığını da temin etmektedirler (Censi vd. 2011; Cui vd., 2012; Kolesky vd., 2014).



Şekil 2: Hücreleştirilmiş hücreler arası matriksten (dECM) oluşan biyomürekkepler ile farklı dokuların 3B olarak üretilmesi a) Pek çok farklı süreçten sonra farklı dokulardan elde edilen dECM ve b) Doğal dokular ile dECM ile üretilmiş dokuların karşılaştırılması (Murphy & Atala, 2014; Pati vd., 2014)

Son zamanlarda hücreleştirilmiş hücrelerarası matriks (dECM) adı verilen yeni bir çeşit doğal biyomalzeme biyomürekkep olarak ilgi çekmeye başlamıştır. Bu malzemenin avantajı hedef dokudan temin edilen hücrenin bu malzeme ile eklemlenmesi ve 3B olarak yazdırılması sonucunda son derece kompleks ve yapısal olarak son derece sağlam dokuların üretilebilmesi olmuştur. Şekil 2'de bu biyomalzeme ile üretilen örnek dokular sergilenmiştir (Murphy & Atala, 2014; Pati vd., 2014).

4. Biyoyazıcı stratejileri

Biyoyazıcı stratejileri sürekli olarak hedef organ ve dokuya yönelik olarak farklılaşmaktadır. Biyoyazıcı stratejilerinin seçiminde biyomürekkep tercihi, kullanılan biyoyazıcı ve arzu edilen organ ve doku tasarımı önemli bir yer kaplamaktadır. Biyoyoumluluk ve biyomekanik gereklilikleri temel alınarak incelendiğinde özünde

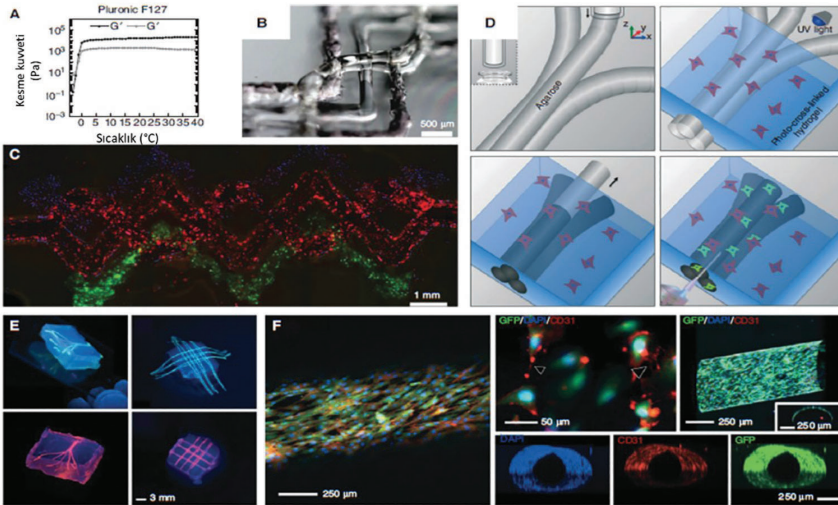
her kişiye özgü olarak geliştirilmesi planlanan doku için ayrı ayrı bir biyofabrikasyon stratejisi geliştirmek gerekli olsada temel olarak analiz edildiğinde dört çeşit biyoyazıcı stratejisi mevcuttur.

4.1 Kayıplı biyoyazıcı stratejisi

Günümüzde biyoyazıcı teknolojinin karşılaştığı en önemli sorunlardan bir tanesi damarlanmış doku oluşumunu sağlamaktır. Damarlar, üretilmiş doku ve organların canlılığını sürdürme noktasında en hayati fonksiyonları yerine getirmekte ve dokulara kan aracılığı ile oksijen ve gerekli besinleri ulaştırmaktadır. Dokular damarlarla düzenli olarak beslenmediği takdirde her ne kadar doku benzeri yapılar 3B biyoyazıcılar aracılığı ile üretilbilse dahi hayatiyetlerini sürdürmeleri mümkün değildir. Bu nedenle dokular için damar üretimi de 3B biyoyazıcı stratejileri geliştirirken üzerinde en çok durulan konuların başında gelmektedir (Nomi vd., 2002).

Bütün bu nedenlerden ötürü geçen birkaç yıl içerisinde birbiri ile eklemlenebilen ve her uzunluk genişlik ve tasarımda geliştirilebilen, damar olarak değerlendirilebilecek mikrokanal üretme potansiyeline sahip kayıplı (sacrificial) biyoyazıcı stratejisi adı verilen yeni bir strateji geliştirilmiştir. Bu strateji temel olarak dört basamakla ifade edilebilir. 1) mikrokanal olacak olan mikroağları oluşturan biyomükkebin istenilen tasarımda ekilmesi 2) hedeflenen dokuyu oluşturmak için hücre içeren hidrojellerin mikroağların üzerine eklemlenmesi 3) oluşan mikrokanal kalıbının çeşitli yöntemlerle hidrojelden ayrıştırılması ve 4) mikrokanalların içerisine endotel hücrelerinin ekilmesi (Bae vd., 2012; Zhang vd., 2015).

Kayıplı biyoyazıcı stratejisine bu basamaklar ve bazı örnekler örnekler Şekil 3'te gösterilmiştir.

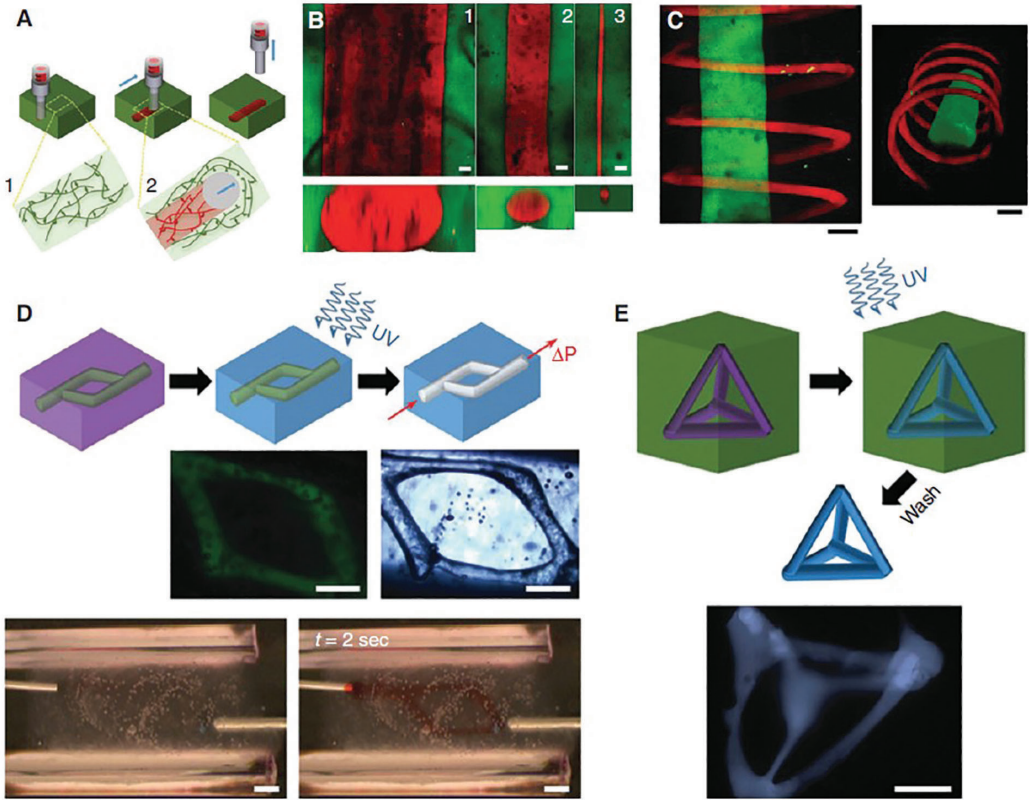


Şekil 3: Kayıplı 3B biyoyazıcı a) Pluronic F127 malzemesinin sıcaklığa göre biyoaşınırılık oranları (eklenen malzeme bu sayede zaman içerisinde eriyecek), b) çok katmanlı jel yapısının 3B olarak üretilmesi, c) florasan görüntüsü fibroblast mavi, dermal fibroblast yeşil, d) Kayıplı biyoyazıcı stratejisinin şematik olarak gösterimi, e) biyoyazılmış ürünlerin fotoğrafları, f) damar yapılarının konfokal mikroskop ile elde edilmiş görüntüsü (Kolesky vd., 2014; Bertassoni vd., 2014)

4.2 Hidrojel destekli biyoyazıcı stratejisi

3B doku üretimleri esnasında karşılaşılan en önemli sorunlardan bir tanesi doku üretimi esnasında asıl dokudan biraz daha uzak yada biraz daha ayrıntılı olan katmanların altlarında bir destek dokusu olmadan üretilmesinin mümkün olmasıdır. Böylesi bir durumda üretilmiş ve henüz yeteri kadar sertleşmemiş olan doku kendi kendisine bağımsız olarak ayakta duramamakta ve çökmektedir. Bu sorunu azaltmak amacıyla hidrojel destekli doku üretimine dayanan biyoyazıcı stratejileri geliştirilmiştir. Bu strateji önce istenen dokunun şeklinde bir hidrojel kalıp üretilmesini sonrasında ise kullanılacak olan biyomürekkebin bu kalıbın içerisine dökülmesi basamaklarını içermektedir. Doku 3B olarak üretildikten ve çapraz bağlama ile sertleştirildikten sonra bu destek kalıbı ya zaman içerisinde kendiliğinden ortadan kalkar ya da çeşitli kimsiyal çözücülerle geriye sadece 3B üretilen doku kalacak şekilde tasarımdan temizlenir.

Hidrojel destekli biyoyazıcı stratejisine ait bu basamaklar ve bazı örnekler örnekler Şekil 4'te gösterilmiştir.

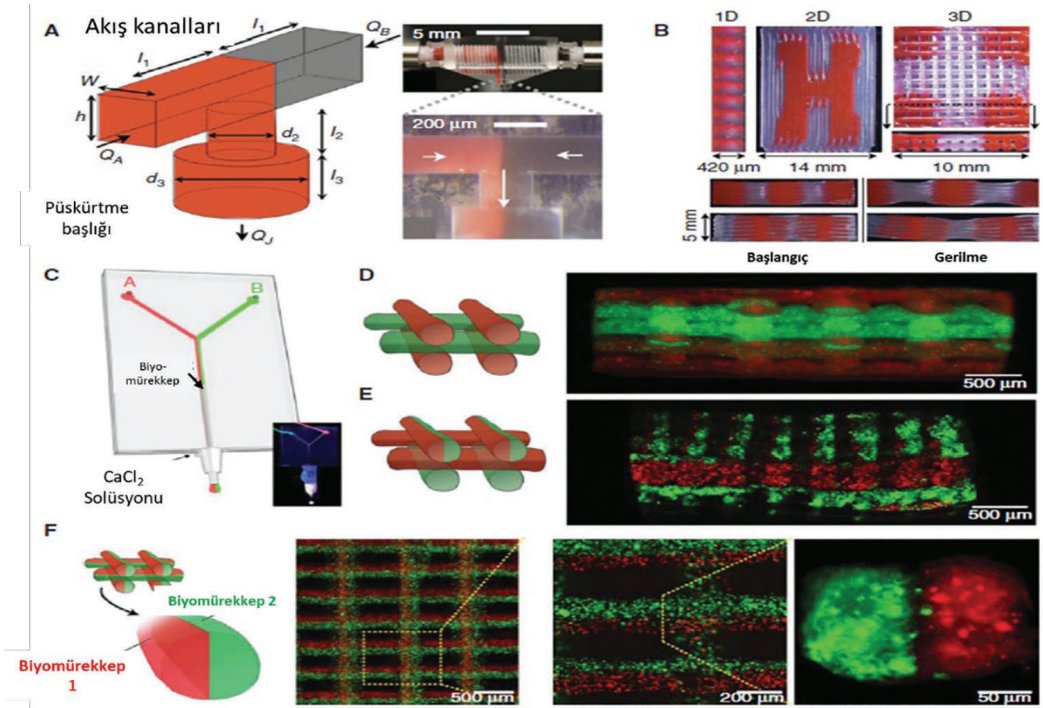


Şekil 4: Hidrojel destekli 3B biyoyazıcı a) bir biyomürekkep (kırmızı) bir destek jelinin içerisinde (yeşil) 1) biyomürekkep öncesi jel 2) biyomürekkep sonrası jel b) Rhodamine işaretli kırmızı biyomürekkep c) konfokal görüntüsü d) mikrokanalların oluşturulması ve UV ışınımı ile çapraz bağlanması e) bir doku modelinin destek jel ile çapraz bağlanması sonrasında destek jelinin sistemden uzaklaştırılması (Highley vd., 2015)

4.3 Multimateryal biyoyazıcı stratejisi

Biyolojik dokular incelendiği zaman karşımıza çıkan en temel gerçeklerden bir tanesi bu dokuların birbirleri ile çeşitli oranlarda kaynaşmış ve içiçe geçmiş olan çok farklı biyolojik ünitelerin birleşiminden meydana gelmiş olması gerçeğidir. Bu nedenle birden fazla biyomürekkebin eş zamanlı olarak kullanılması gerekliliği kaçınılmazdır. Multimateryal biyoyazıcı stratejisi bu gereklilik üzerine inşa edilmiştir.

Mikro ve nanoakışkan teknolojileri bu çeşitliliği sağlayabilmek ve bir biyomürekkepten diğerine anında geçişi sağlayabilmesi sebebiyle multimateryal biyoyazıcı stratejileri açısından oldukça önemlidir. Mikro ve nanoakışkan teknikleri geliştikçe multimateryal biyoyazıcı stratejileri de gelişmeye devam edecektir. Şekil 5'te multimateryal biyoyazıcı stratejisine dair örnekler gösterilmiştir.

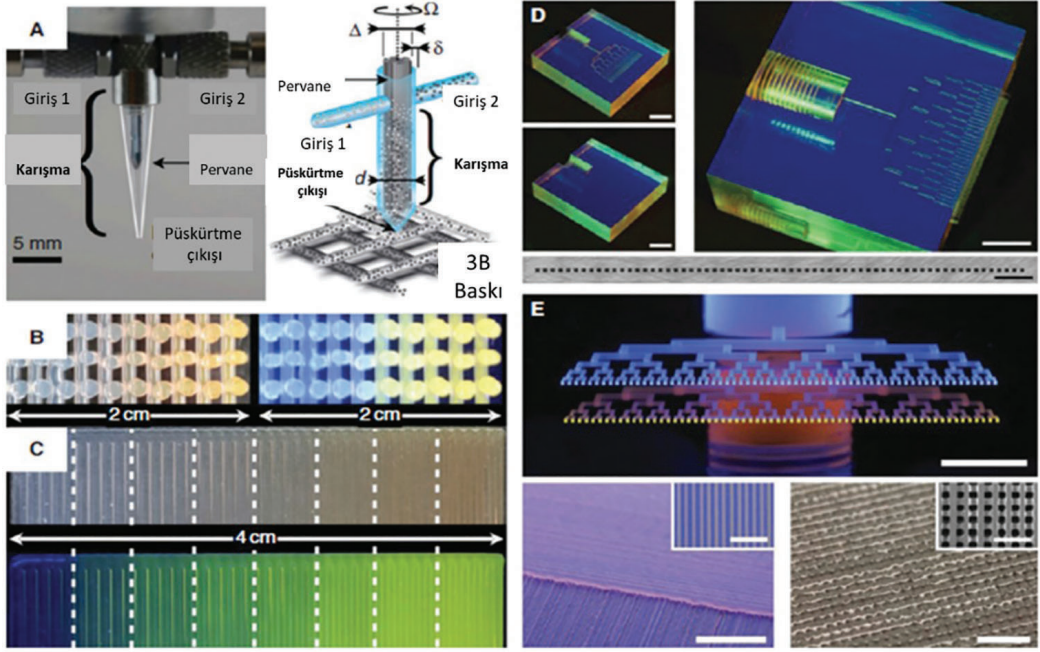


Şekil 5: Multimateryal 3B biyoyazıcı a) iki kanallı bir biyoyazıcının mikroakışkan başlığı b) iki başlıklı biyoyazıcı ile üretilmiş tasarım c) iki biyomürekkebi tek kanaldan ileten mikroakışkan başlık tasarımı d) ve e) farklı püskürtme metodları, f) aynı anda püskürtme (Hardin vd. ,2015; Colosi vd. 2015)

4.4 Kademe geçişli biyoyazıcı stratejisi

Biyolojik dokuların pek çoğunda hücre ve biyomalzeme konsantrasyonu homojen olarak dağılmıştır. Bu biyolojik dokularda genel olarak kademeli halde hücre ve biyomalzeme yoğunluğu artmakta yada azalmaktadır. Özellikle kemik ve kıkırdak ile ilintili (osteochondral) dokuların iç yapılarında, kemik bağ doku arasında ve kemik ile kas doku arasında kademeli geçişler sıklıkla gerçekleşmektedir. Bu doku tiplerini ve dokular arasındaki bu geçişleri gerçekleştirebilmek için kademeli geçişli biyoyazıcı stratejisi geliştirilmiştir.

Burada da yine mikro ve nanoakışkan teknikler önemlidir. Bu teknikler aracılığı ile mikrosantimetre boyutunda dahi farklı kompozisyonlara sahip dokular üretilebilmektedir. Bu alanda teknikler geliştikçe doğal dokuya daha yakın ve kişinin yaşına, cinsiyetine, kilosuna ve boyuna uygun olarak değişiklik gösterebilen dokular üretmek mümkün olacaktır. Şekil 6'da kademeli geçişli biyoyazıcı stratejisine dair örnekler gösterilmiştir.



Şekil 6: Kademeli geçişli 3B biyoyazıcı a) İçerisinde biyomürekkebin karışmasını da temin eden bir yazıcı başlığı b) Solda beyaz ışıkta karıştırılmış biyomürekkep ile oluşturulmuş kafes tipi yapılar, sağda UV ışıkta karıştırılmış biyomürekkep ile oluşturulmuş kafes tipi yapılar. c) üstte, 8 farklı karıştırma tipinde oluşturulmuş halı tipi yapıların beyaz ışık altında alınmış mikroskop görüntüsü. Altta, 8 farklı karıştırma tipinde oluşturulmuş halı tipi yapıların UV ışık altında alınmış mikroskop görüntüsü. d) akrilik içerisine oyulmuş 64 kanallı bir yazıcı başlığı, bu başlık aracılığı ile farklı biyomürekkepler değişik hızlarda karıştırılabilir ve kademeli biyoyazıcı işlemi gerçekleştirilebilir. çizgi büyüklüğü 2 mm. Altta resimde 64 tane kanalın giriş bölgesi görülmektedir e) Biyoyazıcı başlığı resimde iki adet biyomürekkebin sisteme girmesini göstermektedir. Yukarıdan mavi renkli biyomürekkep aşağıdan sarı renkli biyomürekkep girmektedir. Aşağıda soldaki resim aynı mikroakışkan başlık ile balmumu kullanılarak oluşturulmuş bir düzeneği sağdaki ise epoksi reçine kullanılarak elde edilmiş bir tasarımı göstermektedir (Ober vd., 2015; Hansen vd., 2013)

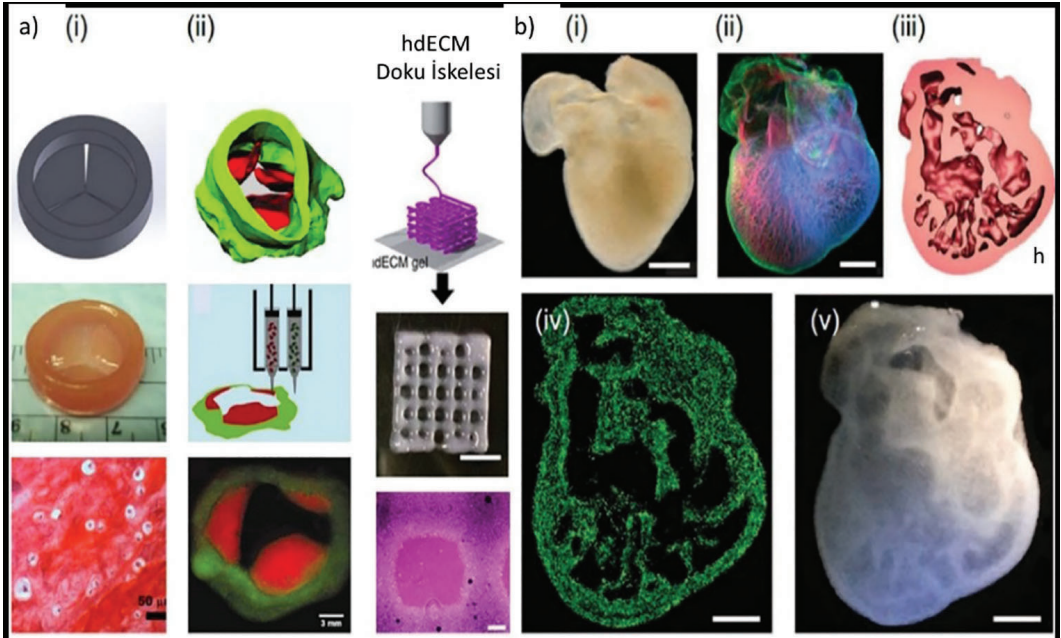
5. Yapay Organlar

3B biyoyazıcılar aracılığıyla doku mühendisliği teknolojisi hastaların ihtiyaç duyduğu organ ve dokuların üretilmesinde aynı zamanda ise farmasotik araştırmaların geliştirilmesinde araştırmacılara hayati önemde katkı sağlamaktadır. Özellikle geçtiğimiz on yıl içerisinde doku mühendisliği teknolojisinin sınırları ve kabiliyetleri oldukça gelişmiştir. Pek çok alanda in vivo olarak kullanılabilecek kalitede dokular laboratuvar ortamında üretilebilmiş ve hastalar nakledilmiştir. Bunların bir kısmı 3B biyoyazıcılar aracılığıyla kısmen ya da tamamen üretilmiştir. 3B biyoyazıcılar

ile üretilen doku ve organ modellerinin bir kısmı ise in vitro olarak organ çipleri olarak anılan mikroakışkan platformlarda ilaç geliştirilmesi ve ilaç etkinliklerinin araştırılmasında kullanılmaktadır (Avcı, 2017).

Bütün bu çalışmalara rağmen yine de alınacak çok mesafe vardır. Kornea gibi ihtiyaç duyduğu damarlanma yapısı çok zayıf olan dokuların biyofabrikasyonu nispeten daha kolayken pek çok organ ve dokunun yüksek damarlanma ihtiyacı ve kompleks doğası sebebiyle üretimi oldukça zordur (Tortoro & Derickson, 2017). Bu kısımda 3B biyoyazıcı teknolojisi ile üretilmiş yapay organların bugün hangi noktada olduklarından bahsedilecektir.

5.1 Kalp

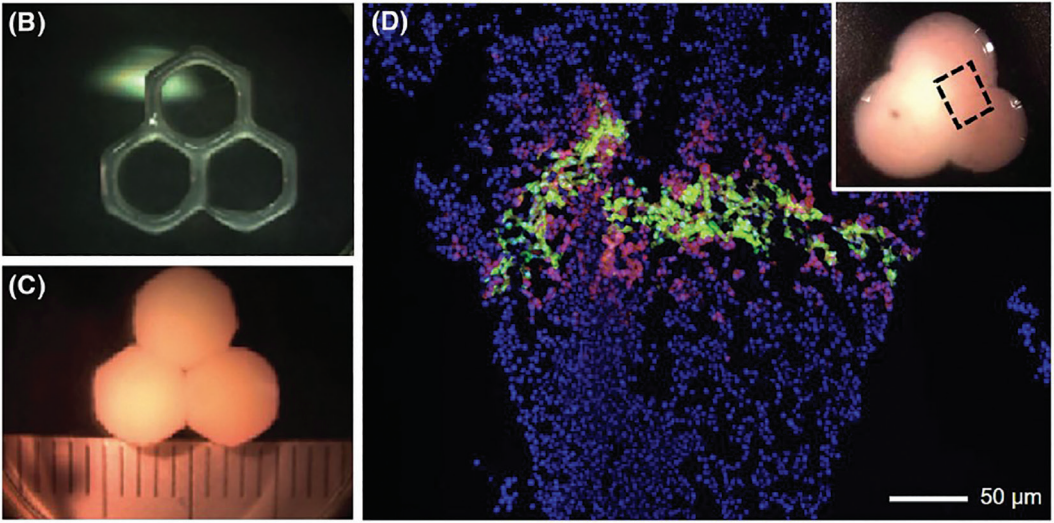


Şekil 7: Kalp kapakçıklarının 3B biyoyazıcılarla üretimi a) i) Solidworks ile tasarlanmış kalp kapakçığı modeli ii) Aortik kalp kapakçığının BT görüntüsü ile elde edilmiş tasarımı b) Kalp dokusunun 3B biyoyazıcılar aracılığı ile üretilmesi i) Bir embriyonik tavuk kalbinin karanlık alan (darkfield image) görüntüsü ii) fibronektin (yeşil), nuclei (mavi) ve F-actin (kırmızı) ile boyanmış kalp dokusunun konfokal mikroskop ile elde edilmiş görüntüsü iii) Konfokal mikroskop ile elde edilen görüntü sonrasında üretilmiş 3B tasarlanmış bilgisayar çizimi iv) 3B biyoyazıcılarla hücre ekimi (canlı hücreler, yeşil) gerçekleştirildikten sonra elde edilmiş bir kesit v) Aynı görüntünün karanlık alan görüntüsü. Büyüklük i ve ii için 1mm, iii, iv ve v için 1 cm'dir (Tortoro & Derickson, 2017; Duan vd. 2013; Duan vd.; 2014; Pati vd., 2014; Hinton vd., 2015).

Fonksiyonel kalp kası dokusu üretebilmek için sayısız teknik geliştirilmiştir. Gelecekteki doku mühendisliği metotlarından farklı olarak 3B biyoyazıcı teknikleri de son yıllar içerisinde fonksiyonel kardiyovasküler dokular üretebilmek adına kullanılmaktadır. Kalp kası dokusundan başka özel olarak kalp kapakçıkları üretmek adına ciddi çalışmalar gerçekleştirilmektedir (Akpek, 2018; Duan vd., 2013). Bu çalışmalarda amaç uygun konsantrasyonlardaki kardiyomiyosit, kardiyak fibroblast ve endotel hücreleri kullanarak yeterli biyomekanik ve biyouyumluluk özelliklerine

sahip kalp kası dokuları ya da kalp kapakçıkları geliştirmek ve nihayetinde bunu ihtiyaç duyan hastalara nakledebilmektir. Kalp kası üretiminde önemli olan nokta kardiyomiyosit hücrelerinin kalp atımı gerçekleştirmelerini sağlamak iken, kalp kapakçığı üretiminde asıl önemli olan husus ise kanın akışına dayanabilen ve yeterli süreklilik ile yeterli dayanıklılıkta açıp kapanabilen kalp kapakçıkları üretebilmektir. Bu özelliklere tam olarak sahip olan ve nakledilmeye uygun bir haldeki kalp kası ya da kalp kapakçığı üretilebildiği bugüne kadar hala rapor edilmemiştir. Bu nedenle hala kardiyovasküler hastalıklar için en önemli tedavi yöntemi, kalp destek üniteler ile mekanik ya da biyoprostetik kalp kapakçıklarıdır. Bu çalışmalara dair bazı örnekler Şekil 7’de gösterilmiştir.

5.2 Karaciğer



Şekil 8: Karaciğer dokusunun 3B olarak üretilmesi (b-d) karaciğerin doğal hepatik lobülü biçiminde olan 3B biyoyazıcılarla üretilmiş karaciğer dokusu, doku birbirileri ile etkili bir birleşim içerisinde olabilmeleri için beşgenlerin birleşimi şeklinde olmuştur. Dokuların üretilmesinde hepatositler, endotel hücreler ve hepatik hücreler kullanılmıştır. (b-c) Görüntüler 3B biyoyazıcılar aracılığıyla karaciğer dokusu üretimi gerçekleştirildikten hemen sonra alınmıştır. d) Doku geliştirilmesinden sonra floresan mikroskopu ile elde edilmiş karaciğer dokusu görüntüsü. Hepatik hücreler yeşil, endotel hücreler kırmızı ve hücre çekirdekleri mavi ile işaretlenmiştir (Robbins vd., 2013).

Karaciğer insan bedenindeki en karmaşık organların başında gelmektedir. Bu nedenle araştırmacılar tarafından üzerinde en çok çalışılan konuların başında gelmektedir. Geçtiğimiz yıllar içerisinde çok çeşitli doku mühendisliği metodları ile parenkimal hücrelerin farklılaşması ile 2B hücre kültürleri oluşturulmuştur (Lee & Cho, 2012). Ancak bu metotlarla hücrelerin ve hücreler arası matriksin etkileşimleri oldukça zayıf olmuştur. Bu nedenle hücrelerin canlı kalma süreleri de oldukça limitli olmuştur. Bu nedenle 3B biyoyazıcı teknolojileri ile karaciğerin temel hücreleri olan hepatoma hücrelerini içeren mikroyapılar üretilmiştir. Bu çalışmalarda hepatoma hücreleri ve hepatositler, MeHa, PEG, jelatin ve aljinat gibi çeşitli hidrojenlerin değişik konsantrasyonlarda bir araya getirilmesiyle oluşturulan biyomürekkepler kullanılmıştır (Khetani & Bhatia, 2008). Bu konu üzerinde



OrganovoTM isimli şirket özel olarak çalışmış ve nihayetinde yüksek yoğunlukta hepatosit, endotel hücreler ve bir karaciğerin doğal hepatik lobülünde olduğu gibi beşgen hepatik hücreleri içeren, yüksek hücre canlılığına sahip, damar yapısı oluşturulmuş karaciğer dokusunu üretmeyi başarmıştır (Kim vd., 2010). Bu ürünü sayesinde çeşitli karaciğer çipleri üretilebilmekte ve kişiye özel ilaç geliştirilmesine yönelik çalışmalar gerçekleştirilebilmektedir. 3B Biyoyazıcılar aracılığı ile karaciğer dokusu üretilebilmesine yönelik çalışmalardan bazı örnekler Şekil 8'de verilmiştir.

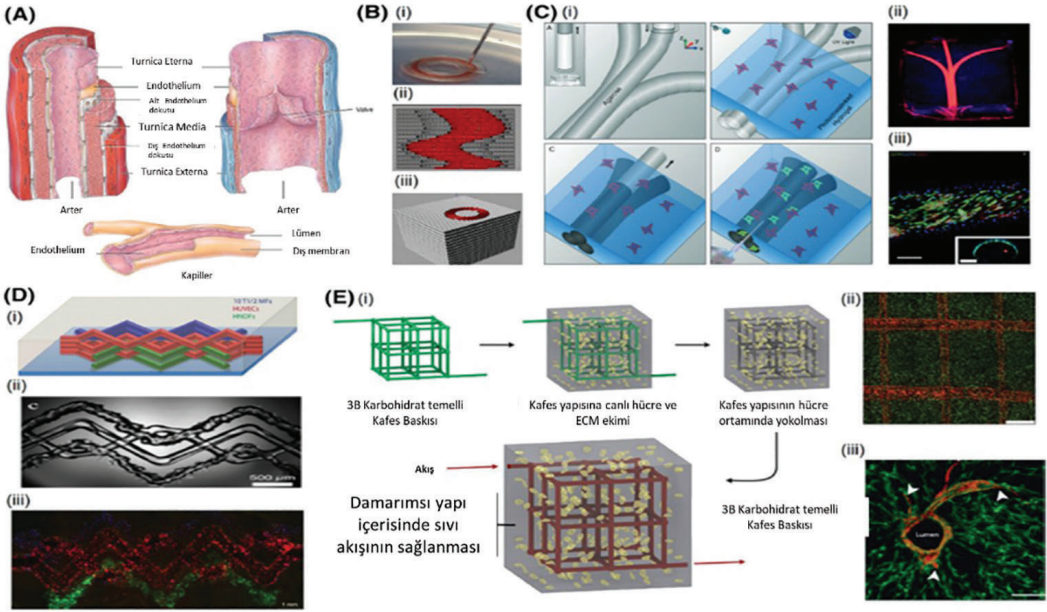
5.3 Damar

Günümüzde 3B biyoyazıcı çalışmalarında araştırmacıların karşısına çıkan en büyük sorun üretilmiş olan 3B doku ve organların biyoreaktör ortamları dışında da canlılığını sürdürebilmesini temin edebilmektir. Canlı hücreler eğer ihtiyaç duydukları oksijen ve besinleri kan aracılığı ile temin edemezlerse canlılıklarını sürdürmeleri mümkün olamaz (Tortoro & Derickson, 2017). Bu nedenden ötürü bütün dokuların üretilmesinin yanında bu dokulara kan damarlarının her bir hücreye varıncaya kadar ulaşmasını sağlamakta 3B Biyoyazıcı teknolojilerinin çözmeleri gereken en önemli sorunların başında gelmektedir.

Doku yapıları arasında damar ağlarının oluşturulması fikri ilk aşamada çok zor bir projeymiş gibi durmayabilir ancak damar ağları çok katmanlı yapılardan oluşan ve ihtiyaca göre esneyebilen karmaşık tasarımlara sahip yapılardır. Bu özellikleri sağlayabilmek adına temel olarak üç katmandan oluşurlar. En iç katmanın adı endotel hücrelerden oluşan "tunica intima", orta katman "tunica media" ve en üst katman ise düz kas hücrelerinden oluşan "tunica externa" olarak adlandırılır (Tortoro & Derickson, 2017). Bu doku esnemeye temin edebilmesi adına elastik bağ dokudan ve kolajen fiber yapılardan oluşmaktadır.

Her ne kadar damar yapılarının hayati öneme sahip oldukları anlaşılmış olsa da bu kadar karmaşık bir düzenlemeyi gerçekleştirmek son derece güçtür. Bunu gerçekleştirmek için genel olarak kullanılan metodoloji öncelikle istenilen boyutlarda oluşturulmuş olan biyoaşınır malzemelerden oluşmuş olan mikroyapılar tasarlamak sonrasında bu mikroyapıların üzerine istenilen biyomalzeme ve hücre konsantrasyonuna sahip biyomürekkep eklemek, bu yapıların çeşitli metodlarla çapraz bağlanmasını sağlamak, nihayetinde ise biyoaşınır malzemelerin üzerine endotel hücrelerini ekmek ve damar yapılarının kendiliğinden oluşmasını beklemektir (Bertassoni vd., 2014).

Şekil 9'da 3B biyoyazıcılar aracılığıyla damar oluşturulmasına dair çeşitli örnekler verilmiştir.



Şekil 9: Damar yapılarının biyoyazıcılar ile üretilmesi a) Arter ve toplar damarların fizyolojileri b) damarların petri üzerinde 3B olarak üretilmesi c) (i) agoroz kullanılarak kayıplı biyoyazıcı stratejisi kullanılarak elde edilen (ii) GelMA hidrojel içerisinde oluşturulmuş damar yapıları (iii) Damar yapılarının yüzeylerine kök hücre ekilerek elde edilen konfokal mikroskop görüntüsü büyüklük çubukları: 250µm d) Pluronik kullanılarak gerçekleştirilmiş biyoüretimde şematik gösterim i) mavi çizgiler fibroblast ekilmiş GelMA malzemesini, kırmızı plüronik malzemeyi ve yeşil ise HNDF ekimi gerçekleştiren GelMA malzemesini temsil etmektedir. ii) üretilmiş damar yapılarının ışık mikroskobu ile elde edilmiş parlak alan (bright field) görüntüsü iii) konfokal mikroskop ile farklı malzemelerden oluşturulmuş damar yapısının detayları görülebilmektedir. e) küp şekeri tasarlanmış ve kayıplı biyoyazıcı stratejisi kullanılarak üretilmiş damar ağı i) bahsedilen damar ağının şematik gösterimi ii) Damar dokusuna kök hücre ekildikten sonra konfokal mikroskop ile elde edilmiş görüntü iii) konfokal mikroskop ile damar girişine bir bakış (Tortoro & Derickson, 2017; Kucukgul vd., 2013; Bertassoni vd., 2014; Kolesky vd., 2014; Miller vd., 2012)

5.4 Deri

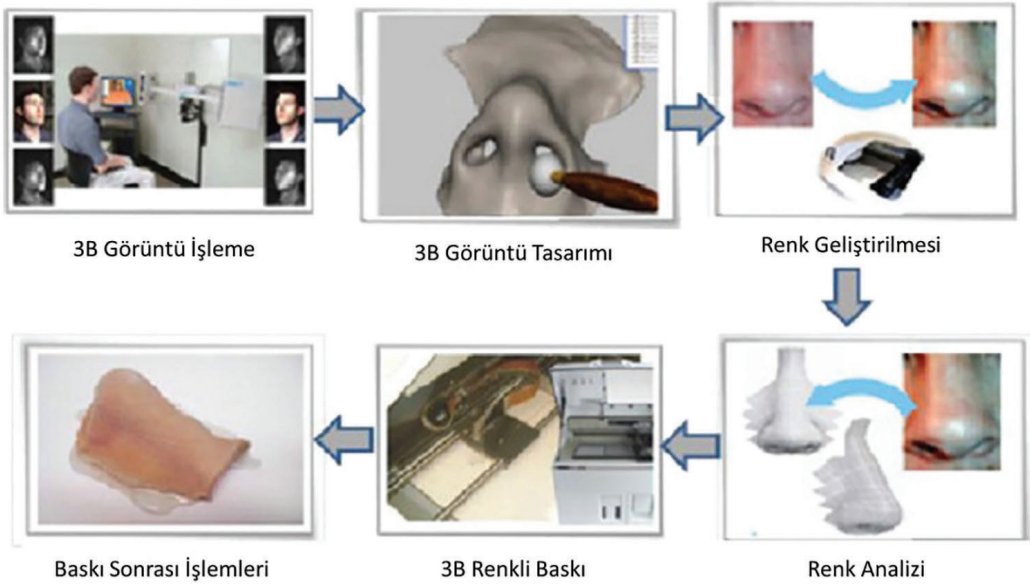
Deri insan vücudunun en büyük organıdır. Çok katmanlı bir yapısı mevcuttur. Kendi altında bulunan kemik yapılarını, kas yapılarını ve organları korur. Vücut güvenliğinin ilk basamağını oluşturur. Bu nedenle dış etmenlere en açık olan ve yaralanmaya en müsatin olan organ derimizdir. 3B Biyoyazıcı teknolojisinin kullanmasının yaygınlaşması durumunda yoğun kullanım anlamında en sık kullanılacak olan organın deri dokusu olması öngörülmektedir.

Uzun yıllardan beri geleneksel doku mühendisliği yöntemleri ile deri eşdeğeri doku üretilmeye çalışılsa da bu oldukça zaman alan ve son derece masraf gerektiren uygulamalardır. Bu açıdan 3B Biyoyazıcı uygulamaları deri dokusu geliştirme noktasında araştırmacılara süre ve maliyet açısından avantaj kazandırma iddiasında olan bir teknolojidir.



Deri biyofabrikasyonu konusundaki 3B biyoyazıcı temelli araştırmalar günümüzde piyasa da oldukça yaygındır ve sürekli olarak geliştirilmektedir. Özellikle kozmetik ve dermatolojiye yönelik kimyasal ve ilaç geliştirme çalışmaları için dünyanın en geniş kozmetik üreticisi olan L'oreal Organovo isimli biyoyazıcı şirketi ile bir üretilecek olan kimyasalların 3B biyoyazıcılarda üretilmiş deri dokularında test edilmesine yönelik bir işbirliği anlaşması imzalamıştır.

Genel olarak konuşmak gerekirse 3B biyoyazıcılarla deri üretimine yönelik üç temel adım vardır. Birincisi modelleme, ikincisi 3B biyoüretim ve sonuncusu ise biyoreaktörler ile hücrelerin olgunlaştırılmasına yönelik çalışmalardır. 3B deri üretimine yönelik temel adımlar Şekil 10'da gösterilmiştir.



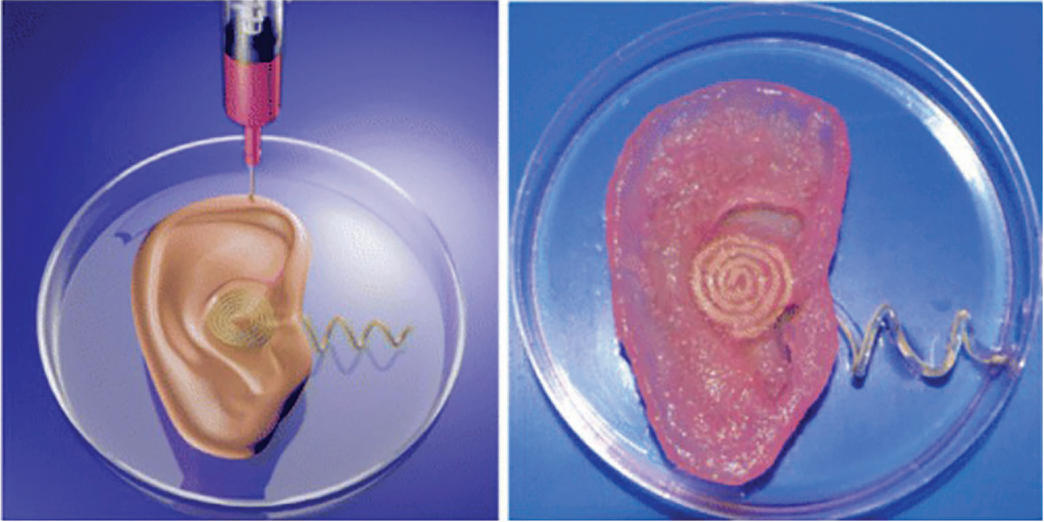
Şekil 10: 3B biyoyazıcılar aracılığı ile deri biyofabrikasyonuna dair üretim süreçleri

5.5 Diğer organlar

3B Biyoyazıcı teknolojisinin kullanıldığı organlar sadece kalp, karaciğer, deri ve damar yapıları değildir. Bundan başka kıkırdak, kemik, böbrek, akciğer gibi organlar da farklı stratejileri içeren çeşitli 3B biyoyazıcı metodolojileri ile kısmen üretilebilmektedir. Elbetteki üretilen bu organların hemen hiçbirisi henüz hastalara nakledilebilecek seviyede değildir. Bu çalışmalar daha ziyade organ çipleri geliştirilmesinde ve hastaya yönelik olarak ilaç geliştirilmesi çalışmalarında kullanılmaktadır. Bu araştırmalarda araştırmacıların karşısına çıkan en önemli engel kullanılan biyomalzemenin biyoyuymululuk ve biyomekanik özelliklerini optimize edebilmek ve ekilen hücre canlılığını biyoreaktör ortamı haricinde uzun süreler için koruyabilmektir. İlki için farklı biyoyazıcı stratejileri ve farklı biyomalzeme ve hücre kombinasyonları geliştirilmekteyken ikincisini sağlamak için ise dokuları kanla besleyebilmek adına damar yapılarının oluşturulması sağlanmaya çalışılmaktadır. Bu konularda araştırmalar düzenli olarak geliştirilmektedir.

Konu ile ilgili olarak kısa bir özet geçmek gerekirse 3B biyoyazıcılar ile böbrek üretmeye yönelik en kapsamlı çalışma (Homan vd., 2016) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada böbreklerin en temel yapıtaşı olan renal tubüller 3B biyoyazıcılar aracılığı ile üretilmiş ve birer çip üzerine yerleştirilerek ilaç denemeleri için değerlendirilmiştir. Akciğer dokusunun biyofabrikasyonuna yönelik bir çalışma ise (Horvath, 2016) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada da temel olarak akciğerlerin temel ünitesi olan alveollar oluşturulmuş ve hava kan bariyeri taklit edilmiştir. Bu da yine bir çip üzerine yerleştirilmiş ve ilaç etkinliklerini incelemek amacıyla kullanılmıştır.

3B biyoyazıcılar ile gerçekleştirilmiş en ilgi çekici çalışmalardan bir tanesi ise 3B biyoyazıcılar ile üretilmiş olan biyonic kulak çalışmasıdır (Manoor vd., 2013). Bu çalışma kapsamında hücre ekilmiş ve aljinat temelli olarak oluşturulmuş olan kıkırdak dokusu elektronik bir duyma ekipmanı ile birleştirilmiştir. Bu çalışma Şekil 11'de gösterilmiştir.



Şekil 11: Aljinat temelli bir kıkırdak dokusu kullanılarak oluşturulmuş ve elektronik bir duyma ekipmanı eklemlenmiş bir kulak tasarımı (Manoor vd., 2013)

6. Gelecek

Biyoyazıcı teknolojilerindeki son yıllarda gerçekleşen bütün büyük atılımlara rağmen teknolojinin ilerlemesinin önünde hala çok ciddi imkanlar mevcuttur. Üretilen biyoyazıcıların büyük çoğunluğu ekstrüzyon ilkesine sahip olan biyoyazıcılardır. Stereolitografi ilkesine sahip olan hiç bir yazıcı henüz üretilmemiştir. (Akpek, 2018) bu konuda araştırmalarda bulunmuştur ancak henüz hala piyasaya stereolitografi temeli ile çalışan bir biyoyazıcı sunulmamıştır. Stereolitografi ilkesi ile çalışan bir biyoyazıcı geleneksel üç boyutlu yazıcılar gibi muhtemelen ekstrüzyon ilkesi ile çalışan 3B yazıcılardan çok daha karmaşık yapıları çok daha yüksek biyomekanik etkinlikle üretebilecektir. Ekstrüzyon ilkesi ile çalışan biyoyazıcılar poroz yapılar oluşturma noktasında oldukça yeteneklidir. Bu nedenle de hücre tutunması sağ-



lamak konusunda başarılıdır ancak işlem süratleri son derece yavaştır, pahalıdır ve kullanması her durum için kolay değildir. Daha önce de değindiği gibi her geometri için uygun olmayabilir ve destek materyalleri kullanmak gerekebilir. Bunları tasarlamakta çoğunlukla uzmanlık gerektirmektedir. Bu durum biyoyazıcı kullanımının yaygınlaşmasını engellemektedir.

Yeni biyomalzemelerin üretilmesi yeni biyomürekkep üretilmesine neden olmaktadır. Özellikle yeni gelişmekte olan 4B yazıcı teknolojisi bu alanda büyük yeniliklere gebe (Li, 2017). Bu biyomüreklepler için genellikle ekstrüzyon ilkesine sahip biyoyazıcılarda üretilmektedir ancak bu ilkeye sahip olan biyoyazıcılar biyomüreklepleri püskürtürken hücrelerin ölmesine ya da biyomalzemenin zarar görmesine neden olabilmektedir. (Liu, 2017) tarafından gerçekleştirilen çalışmada bu konu üzerinde durulmuştur. Bunun için her ne kadar lazer destekli biyoyazıcılar geliştirilmiş olsa da bu teknoloji ekstrüzyon teknolojisinden dahi daha pahalı ve kullanımı konusunda yetkin olmak ise bundan dahi çok daha zordur. Biyomürekleplerin geliştirilmesi noktasında sahip oldukları viskozite özellikleri en önemli parametrelerin başında gelmektedir. Bu noktada Akpek (2013, 2014a, 2014b, 2016) tarafından viskozite kontrolüne yönelik olarak gerçekleştirilmiş çalışmalar mevcuttur. İyon ekimi teknolojileri ile üretilmiş doku ve organlara çeşitli iyonlar aracılığı ile yeni özellikler kazandırılması ihtimali de yine gelecekte karşılaşılabilecek teknolojiler arasındadır (Öztaş, 2010; Nikolaev, 2014).

Bu bağlamda gelecekte karşımıza çıkabilecek olan önemli bir husus hibrid biyoyazıcılardır. Bu yazıcılar pek çok farklı modelde ve stratejiye sahip biyoyazıcıların özelliklerini bünyelerinde barındırabilir ve daha ekonomik, daha süratli ve daha karmaşık organ ve doku tasarımlarının üretilmesini sağlayabilir.

Bundan başka manevra kabiliyeti açısından da biyoyazıcılar geliştirilmeye muhtaç durumdadır. Bağımsız robotik kollar biyoyazıcıların işlem hızını arttıracak gibi tasarım kabiliyetlerini de arttıracaktır. (Çiftçi, 2015) ve (Altın, 2016) tarafından bu yönde çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Dokulardan net görüntü elde edilebilmesi ve bu sayede daha üst kalite 3B baskılar gerçekleştirilebilmesine yönelik olarak (Bulut, 2015) tarafından çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Böylelikle 3 aksiste baskı gerçekleştirebilen modellerden 5 ve 6 aksiste baskı gerçekleştirebilen modellere geçiş sağlanacaktır. Bu durum özellikle in situ çalışmalar gerçekleştirildiği zaman biyofabrikasyon çalışmaları için çok faydalı olacaktır.

7. Sonuç

Geçtiğimiz yıllar içerisinde biyoyazıcı teknolojisi araştırmacıların son derece ilgisini çekmiş bir konu pozisyonunu almıştır. Doku mühendisliği, rejeneratif tıp, organ transplantasyonu, klinik araştırmalar, ilaç geliştirme, ilaç etkinliklerini gözlemleme, kanser araştırmaları ve kozmetik gibi alanlarda 3B biyoyazıcılardan faydalanılmaktadır. Bu çalışmada biyoyazıcılara dair en temel kavramlardan bahsedilmiş, en güncel biyoyazıcı teknolojileri üzerinde durulmuş ve günümüzde 3B biyoyazıcılarla organ biyofabrikasyonunun ulaştığı noktalardan bahsedilmiştir.

Biyoyazıcılar hala pek çok açıdan geliştirilmeye muhtaç durumdadır. Düşük çözünürlük, yüksek maliyet ve yüksek boyut, sınırlı hareket kabiliyeti, son derece sınırlı bir aralıkta bulunan biyomürekkeplerle uyumluluk yeteneğine sahip olma, son derece az çeşit, genelde fonksiyonel olmayan hastaya nakledilmesi mümkün olmayan son ürünler ortaya çıkarması biyoyazıcı teknolojisinin karşısındaki zorlu engellerden sadece birkaçıdır. Ancak yine de günümüzde gerçekleştirilen ve adım adım kalitesi artan çalışmalar özellikle önümüzdeki on yıl içerisinde biyoyazıcı teknolojisinin olağanüstü bir atılım yapacağının sinyallerini vermektedir.

8. Kaynaklar

- Akpek, Ali. "Triküspit Kalp Kapakçıklarının Üç Boyutlu (3B) Biyobaskı Metotları ile Fabrikasyonu." Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi (2018): DOI: 10.19113/sdu.fbed. 57066
- Akpek A, Youn C, Kagawa T. "A study on vibrational viscometers considering temperature distribution effect" 2014a, JFPS International Journal of Fluid Power System, 7.1: 1-8.
- Akpek A., Youn C., Maeda A., Fujisawa N., Kagawa T. Effect of thermal convection on viscosity measurement in vibrational viscometer. 2014b. Journal of Flow Control, Measurement & Visualization, 2(01), 12.
- Akpek A., Youn C., Kagawa T. Temperature measurement control problem of vibrational viscometers considering heat generation and heat transfer effect of oscillators. 2013. In Control Conference (ASCC), 2013 9th Asian (pp. 1-6). IEEE.
- Akpek A. Effect of non-uniform temperature field in viscosity measurement. Journal of Visualization, 2016, 19(2), 291-299.
- Altınsu B., Koçak O., Akpek A., Design and analysis of an autoclave simulation using MATLAB/Simulink. In: Medical Technologies National Congress (TIPTEKNO), Antalya-Turkey, 16707775, 27-29 October 2016.
- Avci H, Doğan Güzel F, Erol S, Akpek A. Recent advances in organ-on-a-chip technologies and future challenges: a review., 2018, Turkish Journal of Chemistry, 42(3).
- Bae H, Puranik AS, Gauvin R, Edalat F, Carrillo-Conde B, Peppas NA, Khademhosseini A. 2012. Building vascular networks. Sci Transl Med 4: 160ps123.
- Bertassoni LE, Cecconi M, Manoharan V, Nikkha M, Hjortnaes J, Cristino AL, Barabaschi G, Demarchi D, Dokmeci MR, Yang Y. 2014. Hydrogel bioprinted microchannel networks for vascularization of tissue engineering constructs. Lab Chip 14: 2202–2211.
- Bulut S, Özçınar A, Çiftçiöğlu Ç, Akpek A, A new algorithm for segmentation and fracture detection in X-ray images, 2015 Medical Technologies National Conference (TIPTEKNO), Bodrum TURKEY, 15690193, 15-18 October 2015
- Censi, R., W. Schuurman, J. Malda, G. Di Dato, P. E. Burgisser, W. J. A. Dhert, C. F. Van Nostrum, P. Di Martino, T. Vermonden, and W. E. Hennink. A printable photopolymerizable thermosensitive p (hpmam-lactate)- peg hydrogel for tissue engineering. Adv. Funct. Mater. 21:1833–1842, 2011.
- Chung, J. H. Y., S. Naficy, Z. Yue, R. Kapsa, A. Quigley, S. E. Moulton, and G. G. Wallace. Bio-ink properties and printability for extrusion printing living cells. Biomater. Sci. 1:763–773, 2013.
- Ciftcioglu C., Kocak O. Akpek A., Remote control of centrifuge and injection systems via MATLAB and ARDUINO, Medical Technologies National Conference, Bodrum-Turkey, 15698644, 15-18 October 2015.
- Colosi C, Shin SR, Manoharan V, Massa S, Constantini M, Barbetta A, Dokmeci MR, Dentini M, Khademhosseini A. 2015. Microfluidic bioprinting of heterogeneous 3D tissue constructs using low viscosity bioink. Adv Mater 28: 677–684.



- Cui, X., K. Breitenkamp, M. G. Finn, M. Lotz, and D. D. D'lima. Direct human cartilage repair using three-dimensional bioprinting technology. *Tissue Eng. A* 18:1304–1312, 2012.
- Duan, B., E. Kapetanovic, L. A. Hockaday, and J. T. Butcher. Three-dimensional printed trileaflet valve conduits using biological hydrogels and human valve interstitial cells. *Acta Biomater.* 10:1836–1846, 2014.
- Duan, B., L. A. Hockaday, K. H. Kang, and J. T. Butcher. 3D bioprinting of heterogeneous aortic valve conduits with alginate/gelatin hydrogels. *J. Biomed. Mater. Res. A* 101:1255–1264, 2013.
- Hardin JO, Ober TJ, Valentine AD, Lewis JA. 2015. Microfluidic printheads for multimaterial 3D printing of viscoelastic inks. *Adv Mater* 27: 3279–3284.
- Hansen CJ, Saksena R, Kolesky DB, Vericella JJ, Kranz SJ, Muldowney GP, Christensen KT, Lewis JA. 2013. Highthroughput printing via microvascular multinozzle arrays. *Adv Mater* 25: 96–102.
- Highley CB, Rodell CB, Burdick JA. 2015. Direct 3D printing of shear-thinning hydrogels into self-healing hydrogels. *Adv Mater* 27: 5075–5079.
- Hinton, T. J., Q. Jallerat, R. N. Palchesko, J. H. Park, M. S. Grodzicki, H. J. Shue, M. H. Ramadan, A. R. Hudson, and A. W. Feinberg. Three-dimensional printing of complex biological structures by freeform reversible embedding of suspended hydrogels. *Sci. Adv.* 1:e1500758, 2015.
- Homan, Kimberly A., et al. "Bioprinting of 3D convoluted renal proximal tubules on perfusable chips." *Scientific reports* 6 (2016): 34845.
- Horváth, Lenke, et al. "Engineering an in vitro air-blood barrier by 3D bioprinting." *Scientific reports* 5 (2015): srep07974.
- Hutmacher DW, M. Sittlinger, M. V Risbud, Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems, *Trends Biotechnol.* 22 (2004) 354–62.
- Khetani, S. R., and S. N. Bhatia. Microscale culture of human liver cells for drug development. *Nat. Biotechnol.* 26:120–126, 2008.
- Kim, M., J. Y. Lee, C. N. Jones, A. Revzin, and G. Tae. Heparin-based hydrogel as a matrix for encapsulation and cultivation of primary hepatocytes. *Biomaterials* 31:3596–3603, 2010.
- Klebe R., Cytoscribing: A method for micropositioning cells and the construction of two- and three-dimensional synthetic tissues, *Exp. Cell Res.* 179 (1988) 362–373.
- Kolesky, D. B., R. L. Truby, A. S. Gladman, T. A. Busbee, K. A. Homan, and J. A. Lewis. 3D bioprinting of vascularized, heterogeneous cell-laden tissue constructs. *Adv. Mater.* 26:3124–3130, 2014.
- Kucukgul, C., B. Ozler, H. E. Karakas, D. Gozuacik, and B. Koc. 3D hybrid bioprinting of macrovascular structures. *Procedia Eng.* 59:183–192, 2013.
- Lee, J. S., and S.-W. Cho. Liver tissue engineering: recent advances in the development of a bio-artificial liver. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 17:427–438, 2012.
- Lee, Vivian, et al. "Design and fabrication of human skin by three-dimensional bioprinting." *Tissue Engineering Part C: Methods* 20.6 (2013): 473-484.
- Li Y., D. Li, B. Lu, D. Gao, J. Zhou, Current status of additive manufacturing for tissue engineering scaffold, *Rapid Prototyp. J.* 21 (6) (2015) 747-762.
- Li Y.C., Zhang Y.S., Akpek A., Shin S.R., Khademhosseini A., 4D bioprinting: the next-generation technology for biofabrication enabled by stimuli-responsive materials, *Biofabrication*, 9, 012001, 2017.
- Liu W., Heinrich M.A., Zhou Y., Akpek A., Hu N., Liu X., Guan X., Zhong Z., Jin X., Khademhosseini A., Zhang Y.S., Extrusion Bioprinting of Shear Thinning Gelatin Methacryloyl Bioinks, *Advanced Healthcare Materials*, 6(12), 1601451, 2017.
- Mannoor, Manu S., et al. "3D printed bionic ears." *Nano letters* 13.6 (2013): 2634-2639.

- Miller, J. S., K. R. Stevens, M. T. Yang, B. M. Baker, D. H. Nguyen, D. M. Cohen, E. Toro, A. A. Chen, P. A. Galie, X. Yu, R. Chaturvedi, S. N. Bhatia, and C. S. Chen. Rapid casting of patterned vascular networks for perfusable engineered three-dimensional tissues. *Nat. Mater.* 11:768–774, 2012.
- Murphy, S. V., and A. Atala. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat. Biotechnol.* 32:773–785, 2014.
- Murphy, S. V., A. Skardal, and A. Atala. Evaluation of hydrogels for bio-printing applications. *J. Biomed. Mater. Res. A* 101:272–284, 2013.
- Narayan RJ, *Rapid Prototyping of Biomaterials*, Elsevier, 2014.
- Nikolaev AG, Yushkov GY, Oks EM, Oztarhan A, Akpek A, Hames-Kocabas E, Brown IG. Modification of anti-bacterial surface properties of textile polymers by vacuum arc ion source implantation. *Applied Surface Science*, 310, 51-55. 2014
- Nomi M, Atala A, Coppi PD, Soker S. 2002. Principals of neovascularization for tissue engineering. *Mol Aspects Med* 23: 463–483.
- Ober TJ, ForestiD, Lewis JA. 2015. Active mixing of complex fluids at the microscale. *Proct Natl Acad Sci* 112: 12293–12298.
- Odde DJ, M.J. Renn, Laser-guided direct writing for applications in biotechnology, *Trends Biotechnol.* 17 (1999) 385–389.
- Ozbolat IT, H. Chen, Y. Yu, Development of “Multi-arm Bioprinter” for hybrid biofabrication of tissue engineering constructs, *Robot. Comput. Integr. Manuf.* 30 (2014) 295–304.
- Ozbolat I.T., Y. Yu, Bioprinting toward organ fabrication: challenges and future trends, *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 60 (2013) 691–9.
- Öztarhan, A., Akpek, A., Oks, E., & Nikolaev, A. (2010, April). Modifying medical textiles with anti-bacterial and friction resistance abilities by an alternative nanotextile technology called ion implantation technique. In *Biomedical Engineering Meeting (BIYOMUT), 2010 15th National* (pp. 1-4). IEEE.
- Pati, F., J. Jang, D. H. Ha, S. W. Kim, J. W. Rhie, J. H. Shim, D. H. Kim, and D. W. Cho. Printing three-dimensional tissue analogues with decellularized extracellular matrix bioink. *Nat. Commun.* 5:3935, 2014.
- Rai B., S.H. Teoh, D.W. Hutmacher, T. Cao, K.H. Ho, Novel PCL-based honeycomb scaffolds as drug delivery systems for rhBMP-2., *Biomaterials* 26 (2005) 3739–48.
- Robbins, J. B., V. Gorgen, P. Min, B. R. Shepherd, and S. C. Presnell. A novel in vitro three-dimensional bioprinted liver tissue system for drug development. *FASEB J.* 27:872.12, 2013.
- Tortora, G. J., and B. H. Derrickson. *Principles of Anatomy and Physiology*. New York: Wiley, 2011.
- Zhang YS, Aleman J, Ameri A, Bersini S, Piraino F, Shin SR, Dokmeci MR, Khademhosseini A. 2015. From cardiac tissue engineering to heart-on-a-chip: Beating challenges. *Biomed Mater* 10: 034006.