



Analysis of biocompatibility characteristics of stereolithography applied three dimensional (3D) bioprinted artificial heart valves

Ali Akpek*^{ID}

Department of Bioengineering, Gebze Technical University, 41400, Kocaeli-Turkey

Highlights:

- First time fabrication of heart valves by stereolithography
- Biocompatibility characterization of 3D bioprinted heart valves
- Satisfactory results obtained when compared with the other techniques in literature

Keywords:

- Stereolithography
- 3D printer
- Bioprinter
- Artificial heart valves

Article Info:

Received: 09.01.17

Accepted: 31.07.17

DOI:

10.17341/gazimmfd.416396

Acknowledgement:

Correspondence:

Author: Ali Akpek
e-mail: aliakpek@gtu.edu.tr
phone: +90(0262) 605 3318

Graphical/Tabular Abstract

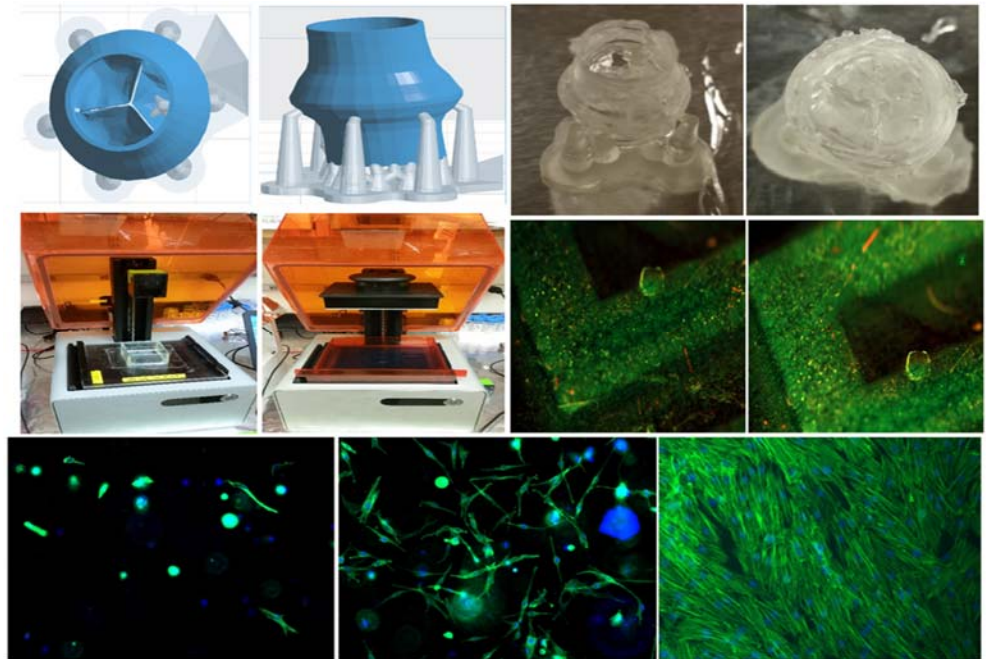


Figure A. Flow chart of Stereolithography bioprinting of heart valves. Heart valve design a) up view b) side view, stereolithography bioprinter c) innovated printer head d) innovated reservoir, bioprinted heart valves e) side view f) up view, cell viability tests g) x40 h) x100, DAPI/ACTIN tests i) First day, j) Third day, k) Seventh day

Purpose: The purpose of this study is; fabricating 3D artificial heart valves by stereolithography that has potential to be obtained for heart valve replacements.

Theory and Methods:

Stereolithography has proven potential for fabricating 3D models with high structural integrity and strong mechanical properties, yet it has not been evaluated as a bioprinter. In this study stereolithography is evaluated as a bioprinter to provide heart valves with high biomechanical characteristics.

Results:

As a result of the study, heart valves with high structural integrity and strong mechanical properties were fabricated. In addition more than %80 cell viability and high level of cell proliferation at the seventh day of the experiments were observed.

Conclusion:

As a conclusion the study proved the potential of stereolithography as a bioprinting technology. In addition it proved the capability of PEGDA: GelMA mixture for heart valve biofabrication.



Stereolitografi ile üç boyutlu (3B) biyobaskılanmış yapay kalp kapakçıklarının biyoyoumluluk özelliklerinin analizi

Ali Akpek*¹

Gebze Teknik Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, Kocaeli, 41400, Türkiye

Ö N E Ç İ K A N L A R

- Mikro Stereolitografi tekniği ile ilk kez yapay kalp kapakçıklarının üretilmesi
- 3B biyobaskılanmış kalp kapakçıklarında biyoyoumluluk karakterizasyonu yapılması
- Sonuçların literatürde kullanılan başka tekniklerle aynı başarıyı yakalaması

Makale Bilgileri

Geliş: 09.01.2017
Kabul: 31.07.2017

DOI:

10.17341/gazimmfd.416396

Anahtar Kelimeler:

Stereolitografi,
3b yazıcı,
biyoyazıcı,
yapay kalp kapakçığı

ÖZET

Her geçen yıl organ transplantasyonu için organ nakli ihtiyacı sürekli olarak geometrik ölçeklerde artmıştır. Organ nakline ihtiyaç sürekli olarak artarken organ bağısı sayısında ise ciddi bir artış gözlenmemiştir. Organ nakline en çok ihtiyaç duyulan alanlardan bir tanesi ise kalp kapakçığı hastalıklarıdır. Biyoprostetik ve mekanik kalp kapakçıklarının kendi içerisinde pek çok sorun bulundurmakta bu nedenle yeterli tedaviyi sağlayamamaktadır. Bütün bu sebepler dolayısıyla doku mühendisliği aracılığı ile kişinin kendi kök hücreleri kullanarak oluşturulabilen, biyoyoumluluğu yüksek yapay kalp kapakçıkları üretmek mecburidir. Bu çalışmada amaçlanan, kalp kapakçıkları hastalıklarında kullanılmak üzere stereolitografi yöntemi ile üretilmiş yapay bir kalp kapakçığı üretmektir. Stereolitografi yöntemi yüksek çözünürlüğe sahip son derece güçlü mekanik özelliklere sahip olan yapılar üretme konusunda bütün diğer 3B baskı modellerinden önde olsa da biyoyazıcı olarak değerlendirilmemiştir. Bu çalışma da bu başarılmaya çalışılmış ve üretilmiş olan kalp kapakçıklarının biyoyoumluluk özellikleri detaylı olarak analiz edilmiştir.

Analysis of biocompatibility characteristics of stereolithography applied three dimensional (3D) bioprinted artificial heart valves

H I G H L I G H T S

- First time fabrication of heart valves by stereolithography
- Biocompatibility characterization of 3D bioprinted heart valves
- Satisfactory results obtained when compared with the other techniques in literature

Article Info

Received: 09.01.2017
Accepted: 31.07.2017

DOI:

10.17341/gazimmfd.416396

Keywords:

Stereolithography,
3d printer,
bioprinter,
artificial heart valves

ABSTRACT

Each and every year, there has been an ever-increasing demand for organ transplants in geometric scales. There are no significant increase observed in organ donations while the need for organ transplantation is keep increasing. Organ donation emerges as the most feasible solution especially in heart valve diseases. Bioprosthetic and mechanical valves have serious intrinsic problems and therefore they do not provide sufficient treatment for heart valve deficiencies. Due to these reasons, growing or fabricating tissue engineered heart valves using biomaterial scaffolds with a person's own stem cells with high biocompatibility is an obligatory. The purpose of this study is; fabricating 3D artificial heart valves by stereolithography that has potential to be obtained for heart valve replacements. Stereolithography has proven potential for fabricating 3D models with high structural integrity and strong mechanical properties, yet it has not been evaluated as a bioprinter. In this study, this purpose is aimed to be succeeded and analyzed detailed biocompatibility characteristics of fabricated heart valves.

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: aliakpek@gtu.edu.tr / Tel: +90 262 605 3318

1. GİRİŞ (INTRODUCTION)

Her geçen yıl organ transplantasyonu için organ nakli ihtiyacı sürekli olarak geometrik ölçeklerde artmıştır. Organ nakline ihtiyaç sürekli olarak artarken organ bağıışı sayısında ise ciddi bir artış gözlemlenmemiştir. Donör sayısındaki bu yetersizlik sebebiyle yüzbinlerce insan organ transplantasyonu için sırada beklerken hayatlarını kaybetmektedir. Bu sayının her sene geometrik bir biçimde artmasının önü alınmamaktadır. Şekil 1'de bu durum açık bir biçimde gösterilmiştir [1]. Kalp kapakçıkları hastalıkları organ naklinin en çok ihtiyaç duyulduğu alanlardan bir tanesidir. Dünya üzerindeki en büyük ölüm nedenlerinin başında kalp kapakçıkları hastalıkları gelmektedir [2]. Her yıl dünya çapında 290,000'den fazla hasta kalp kapakçığı ameliyatı geçirmektedir [3]. 2050 yılına kadar bu sayının yılda 850,000'e ulaşacağı tahmin edilmektedir [4].

Günümüzde kalp kapakçığı hastalıklarının tedavisi amacıyla iki tür yapay kalp kapakçığı kullanılmaktadır. Bunların birincisi mekanik yapay kalp kapakçıkları diğeri ise biyoprostetik yapay kalp kapakçıklarıdır [5]. Bu iki yapay kalp kapakçığının en büyük dezavantajı; nakledilmelerinden sonra vücut içerisinde büyümemeleri ve tekrar modellenmeye imkan tanımamalarıdır. Bu özellikle bebekler ve çocuklar için çok ciddi sorunlara sebebiyet vermektedir. Bebekler ve çocuklar büyüdükçe kalp kapakçıklarının yarıçaplarında büyür. Halbuki mekanik yapay kalp kapakçıklarının yarıçapları büyümediği için çocuklar her iki üç yılda bir tekrar ameliyat geçirmek ve kalp kapakçıklarını daha büyük yarıçapa sahip yeni bir modelle değiştirmeye mecbur kalmaktadırlar. Özellikle bu nedenle mekanik kalp kapakçıkları enfeksiyon, iltihap ve tromboz oluşumuna açık durumdadırlar.

Benzer şekilde biyoprostetik kalp kapakçıklarının da kireçlenmeye sebep oldukları bilinmektedir. Bu durum ise kalp kapakçıklarında kalınlaşmaya ve sertleşmeye sebebiyet vermektedir. Bu durum ise yetersiz kapanmaya neden olmaktadır. Böylelikle kapakçıklar üzerinden akan kan sonra tekrar kalbe geri dönmekte ve ters akışa sebep olmaktadır. Bu durum kan akışında türbülansa sebep olur. Bu ise türbülansın boyutuna göre zaman içerisinde kalp krizlerine dahi sebebiyet verebilir [6]. Bütün bu sebepler dolayısıyla doku mühendisliği bu sorunun nihai çözümü için tek gerçek seçenek olarak kendini ortaya koymaktadır. Burada amaç kişinin kendi kök hücrelerini kullanarak, biyoyumluluk ve biyomekanik özellikleri yüksek, nakledildikten sonra hasta ile birlikte boyutları gelişebilen ve kireçlenme, enfeksiyon, iltihap gibi mekanik ve biyoprostetik kalp kapakçıklarının sahip olduğu dezavantajlara sahip olmayan kalp kapakçıkları üretmektir. Bu bağlamda Şekil 2'de organ biyofabrikasyonu için ihtiyaç duyulan süreçler gösterilmiştir. Bu araştırmanın temel amacı stereolitografi temelli doku mühendisliği ile yeni nesil bir yapay kalp kapakçığı üretmeye yardımcı olma potansiyeline sahip bir ürün geliştirmektir. Buraya kadar bahsedilen doku mühendisliği tekniklerinin günümüzde en

önde gelenlerinden bir tanesi biyoyazıcı tekniğidir. Elbette ki biyoyazıcı teknolojisi doku geliştirilmesi için tek teknik değildir. Bu güne kadar fonksiyonel doku üretilmesi için 3B doku iskeleleri kurulması [7], mikromühendislik temelli öztoplanma [8], sinir mühendisliği [9], doku iskelesi kullanmadan üretilen doku üretim teknikleri [10] ve pek çok diğerk teknik [11] kullanılmıştır. Bütün bu tekniklerin kendisine göre pek çok avantajı vardır ancak hiçbirisi 3B biyoyazıcı metotlarının yüksek hassasiyetle hücre ve dokuları üst üste yerleştirerek 3B organ üretmesindeki kabiliyetlerine sahip değildir. 3B biyobaskı yeni geliştirilmiş bir biyofabrikasyon teknolojisi olup çok çeşitli biyomalzemeleri ve hücreleri emsalsiz bir hassasiyet ile yerleştirerek 3B doku yapıları oluşturma amacıyla kullanılırlar. Üretilen 3B doku yapıları tekrar tekrar rahatlıkla tamamen aynı şekilde üretilebilir. Bu yüksek üretim hassasiyeti diğerk biyofabrikasyon metotlarının hiçbirisinde bulunmamaktadır. Bu güne kadar birbirinden çok farklı biyoyazıcı metotları geliştirilmiştir. Stereolitografi, biyomürekkep destekli biyoyazıcı, enjeksiyon aracılığı ile biyoyazıcı ve lazer destekli biyoyazıcı bunlardan bazılarıdır. Stereolitografi yöntemi haricinde diğerk teknikler biyoyazıcı alanında sıklıkla kullanılsa da stereolitografi bu alanda ihmal edilmiştir. Halbuki stereolitografi yüksek biyomekanik özelliklere sahip yapılar üretebilmesi açısından eşsizdir hem %85'e varan yüksek hücre canlılığı temin edebilmesi açısından eşsizdir hem de diğerk biyoyazıcı metotlarında olduğu gibi biyomalzeme dar bir enjeksiyon alanından geçmek zorunda kalmadığı, yüksek kayma gerilmesine maruz bırakılmadığı ve bu yüzden hücre ölümüne ve biyomalzemenin fiziksel özelliklerinde kayıba neden olmadığı için avantajlıdır. Bu çalışmada temel olarak hedeflenen, kalp kapakçıkları hastalıkları için stereolitografi yöntemi temel alınarak üretilmiş yeni nesil yapay bir kalp kapakçığı üretmektir. Bugüne kadar rapor edilen çalışmaların hiçbirisinde doku mühendisliği metotları ile üretilen birbirinden farklı yapay kalp kapakçığı modellerinin hiçbirisi hayvan deneylerinde bir kaç aydan daha uzun süre fonksiyonelliğini sürdürmemiştir. Bunun en temel sebebi üretilen bu yapay kalp kapakçıklarının biyomekanik özelliklerinin bir kaç aydan daha uzun süreler kullanmak için yetersiz kalmış olmasıdır. Stereolitografi yöntemi özellikle yüksek biyomekanik özelliklere ve yüksek çözünürlük özelliklerine sahip yapay doku ve organlar üretme konusunda bütün diğerk 3D biyoyazıcı modellerinden önde olsa da bir biyoyazıcı olarak değerlendirilmemiştir. Bu konudaki çalışmalar çok eksiktir ve hiçbirisi kalp kapakçıklarına hücre ekimi üzerine gerçekleştirilmemiştir. Bu çalışma da yüksek biyomekanik ve yüksek biyoyumluluk özelliklerine sahip bir kalp kapakçığının üretilmesi amaçlanmıştır.

Stereolitografi ile üretilmiş yapay kalp kapakçıklarının hücre ekimi gerçekleştirilmiş ve sonrasında detaylı olarak biyoyumluluk özellikleri analiz edilmeye çalışılmıştır. Özellikle geçen on yıl içerisinde kalp kapakçıklarının biyoyazıcılar aracılığı ile üretilmesini amaçlayan çeşitli araştırmalar gerçekleştirilmiştir ancak bunlar çoğunlukla bir

petride iki boyutlu olarak gerçekleştirilen çalışmalar olup nadiren üç boyutlu araştırmalar olmuştur. Bu çalışma aracılığı ile bu alanda belli başlı üç yenilik gerçekleştirilmiştir. Birincisi ilk kez GelMa (Gelatin Methacrylate), PEGDA (Polyethylen glycol diacrylate) çeşitli oranlarda kullanılarak bir biyomalzeme olarak stereolitografi için kullanılmıştır. Bu çalışmanın yöntem olarak yeniliğidir. İkincisi bu biyomalzemeler ilk kez stereolitografi tekniği ile yapay kalp kapakçıklarında kullanılmıştır. Bu da çalışmanın alan açısından yenilikçi yönüdür. Yeni biyomalzemeler ve yeni yöntem ile geliştirilen bu kalp kapakçıklarının detaylı biyoyumluluk özelliklerinin analiz edilmesi ve önümüzdeki yıllar içerisinde nakil amaçlı olarak kullanılıp kullanılmayacağını araştırılması da çalışmanın yenilikçi yönünü güçlendirmektedir. Dünya çapında günümüze kadar bu araştırmanın öncü çalışması olan Akpek (2018) tarafından gerçekleştirilen çalışma haricinde, stereolitografi ile biyofabrikasyonu gerçekleştirilmiş ve üretilen doku iskelesinin üzerine hücre ekimi gerçekleştirilmiş hiçbir kalp kapakçığı araştırması yayınlanmamıştır [12]. Bu da çalışmanın üçüncü yenilikçi yönü olarak değerlendirilebilir.

2. DENEYSSEL METOT (EXPERIMENTAL METHODS)

2.1. Materyaller (Materials)

2.1.1. PEGDA hazırlanması (PEGDA preparation)

PEGDA (Polyethylene Glycol Diacrylate: Type A:M_n 700) Sigma-Aldrich şirketinden edinildi ve 30% oranında sulandırıldı. 0,5% photoinitiator hazırlandı ve sulandırılmış PEGDA ile kullanıldı.

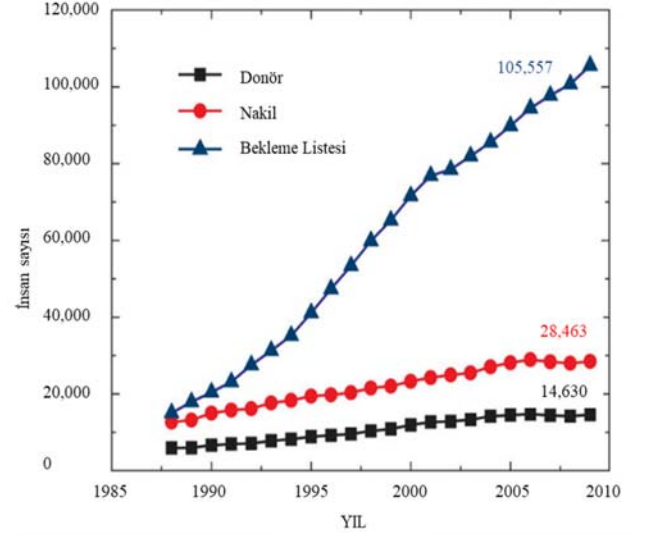
2.1.2. PEGDA:GelMA Karışımı Hazırlığı (PEGDA: GelMA mixture preparation)

GelMA Hosseini et al. [13] tarafından belirtildiği gibi hazırlandı. 10 g gelatin domuz derisi, 8 mL methacrylic anhydride ve 100 mL PBS karıştırıldı. Acrylation reaksiyonu 50°C altında 3 saat karıştırılarak elde edilmiştir. Reaksiyon karışım ıltılmış PBS (40°C) ile karıştırıldıktan sonra sona ermiştir. Karışım daha sonra 40°C'ye ıltılmış damıtılmış su ile 1 hafta süre ile 12-14 kDa'luk süzme tüplerinde süzülmüştür. Akabinde bir hafta süre ile liyofize edilmiştir.

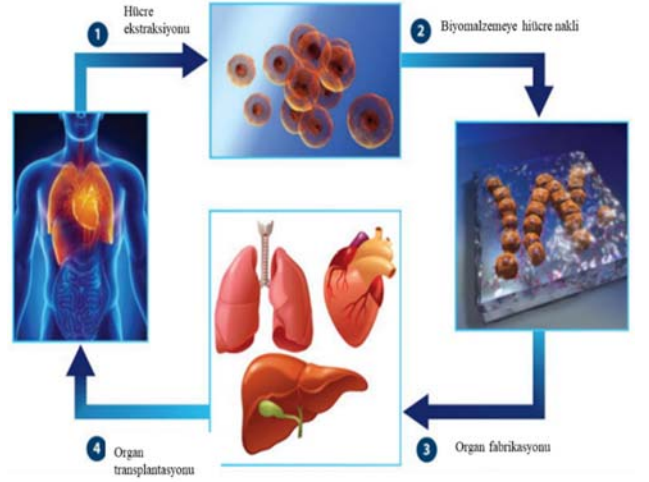
2.1.3. 3B yazıcılar (3D printers)

Bu çalışmada stereolitografi üretimini gerçekleştirmek için FormLabs Form 1+ üç boyutlu yazıcısı kullanılmıştır. Bu teknoloji ile yazıcı başlığı sıvı reçine dolu bir rezervuarın içerisine daldırılmakta ve ağır ağır yukarı hareket ettirilerek katı bir üç boyutlu yapının ortaya çıkması sağlanmaktadır. Daha detaylıca açıklamak gerekirse, yazıcı başlığı yavaşça rezervuardan yukarı doğru kaldırıldıkça bir ultraviole lazer ışını cam olan rezervuar tankın altından sıvı reçineye ulaşmakta, buradan geçerek yazıcı başlığına ulaşmaktadır. Ultraviole lazere maruz kalmış olan reçine sertleşmektedir. Katman katman reçine sertleştikçe yavaş yavaş yazıcı başlığı

yukarı çekilmekte ve her katman birbiri ile bağ yapılar oluşturarak üç boyutlu şekli oluşturmaktadır. Bu şekilde bir süre sonra üç boyutlu yapı tamamen rezervuar tankından ayrılmakta ve yazıcı başlığı üzerinde şekillenmektedir.



Şekil 1 Yıllara göre donör ve nakil listesi (Donor and transplantation list per year)

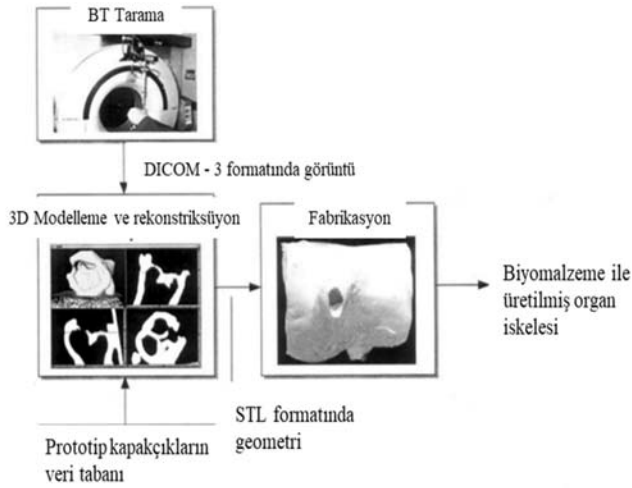


Şekil 2 Biyofabrikasyon süreci [14] (Biofabrication process)

Bu modelde kullanılan kalp kapakçığı modelleri üç boyutlu tasarım programları aracılığı ile üretilmiştir. Bu modeller bilgisayar ortamında üretildikten sonra stereolitografi yöntemi ile biyofabrikasyonu gerçekleştirilmiş akabinde ise bu modellerin üzerine hücre ekimi gerçekleştirilmiştir.

2.1.4. Hücre kültürü (Cell culture)

Kardiyak fibroblast hücreleri DMEM, 10% (v/v) FBS ile 5% CO₂ atmosfer basıncı altında 37°C ve 1% (v/v) P/S ile kültür edilmiştir. Hücre medyası uzun inkübasyon süreci nedeni ile her üç günde bir taze media ile değiştirilmiştir. Hücreler 70-80% konflüans ile 0,25% (w/v) trypsin/0,1% (w/v) EDTA kullanılarak toplanmış ve deneyler için kullanılmıştır.



Şekil 3. Stereolitografi tekniğinin işlem süreci [15]
(Process for Stereolithography technique)

2.1.5. PEGDA:GelMA Karışımında Hücre Süspansiyonu Hazırlanması (Preparation of Cell Suspension for PEGDA - GelMA Mixture)

PEGDA güçlü biyomekanik özellikler kazandırırken GelMA ise güçlü biyouyumluluk özellikleri kazandırmaktadır. Bu nedenle hücre ekimleri ve biyouyumluluk testleri PEGDA: GelMA karışımları üzerinde gerçekleştirilmektedir. Kalp kapakçıkları üretildikten sonra bunlar 1 mm^2 'lik küçük parçalara ayrılmış ve 96'lık kuyu tipi petrilere yerleştirilmiştir. Böylelikle üretilen kalp kapakçığı toplam 18 parçaya ayrılmıştır. Hücre yüklü yapıların oluşturulabilmesi için PEGDA: GelMA (1,5%: 10% w/v) ve 0,5% (w/v) photoinitiyator hazırlanmıştır. Akabinde stereolitografi ile kalp kapakçığı üretilmiş ve bu kapakçık 1 mm^2 'lik dilimlere ayrılarak 96'lık kuyu tipi petrilere yerleştirilmiştir. Sonrasında hücre kültürü gerçekleştirilmiş, trypsin ile muamele edildikten ve hücre mediasında bir süre bekletildikten sonra $2-5 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$ konfluense ulaşması sağlanmıştır. Hücre çoğalması ve bağlanmasının temin edilebilmesi maksadı ile inkubatörde 2-3 gün bekletilmiştir.

2.1.6. Hücre Canlılığı Testleri (Cell Viability Tests)

Stereolitografi ile üretilmiş olan kalp kapakçıklarına hücre ekimi gerçekleştirildikten sonra hücre canlılığı testleri gerçekleştirilmiştir. Bunun için $2 \mu\text{l}$ Calcein ve $4 \mu\text{l}$ Ethidium Homodimer 1 ml PBS ile karıştırılmıştır. Daha önceden inkubatörde bekletilen 1 mm^2 'lik dilimlere ayrılmış üç adet kalp kapakçığı parçası yeni bir petriye yerleştirilir ve kardiyak fibroblast hücreleri sistemden uzaklaştırılır. Bu parçacıklara $300 \mu\text{l}$ Calcein ve Ethidium Homodimer karıştırılmış PBS eklenmiştir. Bu yapılar 37°C 'de 20 dakika inkübe edilmiş ve sonra içinde karışım bulunan PBS sistemden uzaklaştırılmıştır. Son olarak kalp kapakçığı parçacıkları üçer defa PBS ile yıkanmıştır. Böylelikle mikroskop altında hücre canlılığının test edilmesi mümkün olmuştur. Bu test birinci gün, üçüncü gün ve yedinci günde tekrarlanmıştır. Her test için üç tane olmak üzere kalp

kapakçığının toplam dokuz parçası kullanılmıştır. Her bir test sonrasında mikroskop altında canlı kalan hücrelerin sayımı gerçekleştirilmiş ve canlı hücrelerin oranı ekilen hücreler ile kıyaslanmıştır. Bu sayede tasarımın hücre canlılığına ne kadar müsaade ettiği yüksek bir hassasiyetle anlaşılmıştır.

2.1.7. DAPI/ACTIN testleri (DAPI/ACTIN tests)

DAPI/ACTIN Testleri hücrelerin birbirleri ile olan etkileşimlerini ve hücre çoğalmasını anlamak için gerçekleştirilen bir testtir. Bu test için öncelikle daha önceden kardiyak fibroblast ekilmiş olan 1 mm^2 'lik kalp kapakçığı parçacıklarından üç tanesi seçilir ve hücreler sistemden uzaklaştırılarak, PBS ile üç defa yıkanır. Sonrasında %4 formaldehit eklenir ve otuz dakika beklenir. Akabinde yine PBS ile üç defa yıkanır. %0,1 triton ile otuz dakika inkübe edilir ve PBS ile yine yıkanır. Sonra %1 BSA eklenir, otuz dakika inkübe edilir ve PBS ile üç defa yıkanır. Son olarak ACTIN eklenir, kırk dakika beklenir ve PBS ile üç defa yıkanır. Sonra DAPI eklenir, beş dakika beklenir ve PBS ile üç kez yıkanır. Yapılar artık mikroskop ile incelemeye uygun hale gelmiştir. İşlem birinci gün, üçüncü gün ve yedinci gün olarak üç defa tekrar edilir. Her test için üç parçacık kullanılır böylelikle toplam dokuz parçacık kullanılmış olur. Her bir test sonrasında mikroskop altında hücrelerin görüntüleri alınmış ve birbirleri ile etkileşimleri anlaşılmasına çalışılmıştır. Bu sayede tasarımın hücre çoğalmasına ve hücrelerin birbirleri ile etkileşime geçmesine ne kadar müsaade ettiği yüksek bir hassasiyetle anlaşılmıştır.

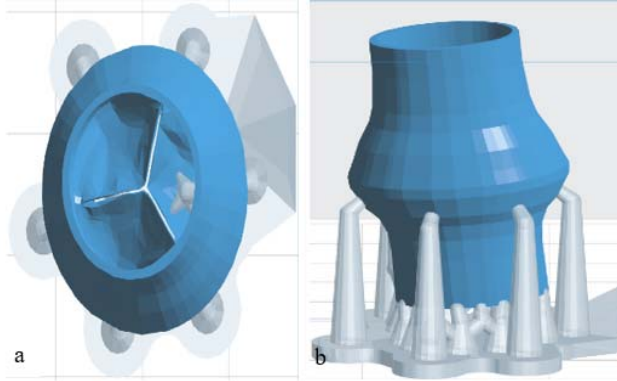
2.1.8. Mikroskop analizi (Microscope analysis)

Mikroskop görüntüleri Zeiss Axio Vert.A1 inverted mikroskop ve inverted Nikon Eclipse Ti mikroskop aracılığı ile elde edilmiştir. Mikroskopa bağlı bir CCD kamera görüntüleri kaydetmek için kullanılmıştır.

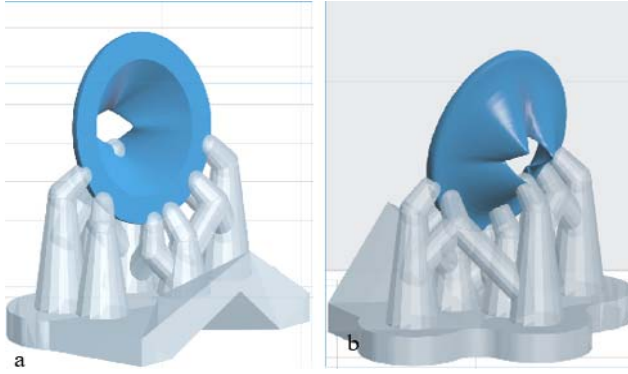
2.2. Metot (Method)

Şekil 3'te açıklandığı gibi BT görüntüsü stereolitografi yöntemi için fabrikasyon modeli olarak kullanılabilir. Ancak kalp kapakçıkları hastaları için yüksek çözünürlükte kalp kapakçığı görüntüsü elde etmek kolay değildir. Üstelik bunun için oldukça zahmetli etik kurul izinleri almak gerekir. Bu nedenle bu çalışma da 3D tasarım programları aracılığı ile kalp kapakçığı modelleri üretilmiştir. Bu çalışma esnasında iki tür kalp kapakçığı tasarlanmıştır. Versiyon 1 Şekil 4'te gösterilmiştir. Bu tasarımda aort damarında kalp kapakçığı ile birlikte tasarlanmıştır. Bu tasarım kalp kapakçığı içerisinden geçen kan akışının etkin bir biçimde analiz edilmesi için kullanılacaktır. Versiyon 2 Şekil 5'te sergilenmiştir. Bu tasarımda yapay kalp kapakçığının merkezinde bulunan boşluk daha belirgindir. Bu tasarım açısından önemlidir. Bu sayede bağlı damar yapısından bağımsız olarak kalp kapakçığının biyomekanik özellikleri analiz edilebilir. Bu tasarım daha ziyade gelecek çalışmalarda kalp kapakçığının bizatihi kendisinin biyomekanik özelliklerinin incelenmesi amacıyla kullanılmıştır.

2.2.1. Kalp kapakçığı tasarımları (Heart valve designs)

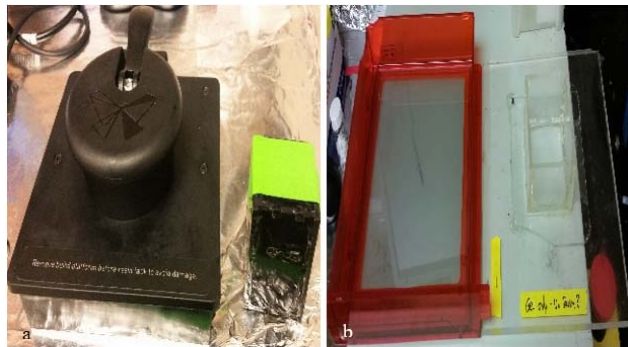


Şekil 4. Versiyon 1 a) Üstten b) Önden görünüş. Bu versiyonda kalp kapakçığı ile birlikte aort damarı da kısmen modellenmiştir.
(Version 1 a) upper view b) front view. In this version heart valves includes aort vein partially)

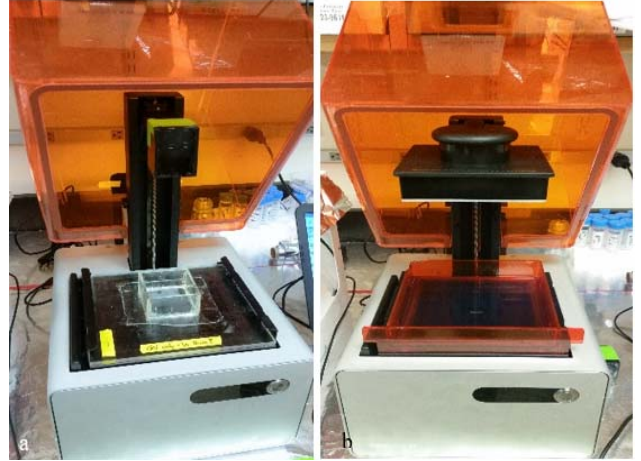


Şekil 5. Versiyon 2. Üç yapraklı kalp kapakçığı modeli a) Önden b) Arkadan görünüş
(Version 2 tricuspid heart valve model a) front b) back view)

2.2.2. 3D Yazıcının biyoyazıcı olarak tasarlanması (Designing a 3D printer as a bioprinter)



Şekil 6 a) Yazıcı başlıkları. Soldaki Formlabs 1+ orijinal yazıcı başlığı, sağdaki ise biyoyazıcı olması için yeniden tasarlanmış yazıcı başlığı b) Reseruar. Soldaki orijinal Formlabs 1+ rezervuarı, sağdaki biyoyazıcı olarak kullanılacak yeniden tasarlanmış rezervuar (Printer heads. On left Formlabs 1+ original print head, on right redesigned printer head to utilize it as a bioprinter Reservoir. On left Formlabs 1+ original reservoir, on right redesigned reservoir to utilize it as a bioprinter)



Şekil 7. a) Formlab Form 1+ 3B Yazıcı orijinal tasarım b) Biyoyazıcı olarak yeniden uyarlanmış tasarlanmış
(a) Formlabs Form 1+ 3D printer original design b) Redesigned as a bioprinter)

Formlab Form 1+, üç boyutlu baskı işlemini gerçekleştirmek üzere tasarlanmıştır. Bu nedenle yazıcı başlığı ve rezervuarda bu amaca uygun olarak tasarlanmıştır. Ancak biyobaskılama amacıyla kullanılacak biyomalzemeler oldukça pahalı ve üretilmesi güç olduğu için daha küçük bir rezervuar ve buna uygun daha küçük bir yazıcı başlığı tasarlamak şart olmuştur. Bu amaca uygun olarak tasarlanmış yazıcı başlığı ve rezervuar Şekil 6 ve Şekil 7.'de gösterilmiştir.

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR (RESULTS AND DISCUSSIONS)

3.1. PEGDA Performansı (PEGDA Performance)

Şekil 8a'da Şekil 4'te versiyon 1 olarak gösterilen yapay kalp kapakçığı Formlabs Form 1+ 3D yazıcı tarafından PEGDA kullanılarak üretilmiştir. Şekil 8a'da üretilmiş olan yapay kalp kapakçığı yazıcı başlığına tutunmasına ve yapısal bütünlüğünü korumasını sağlayan desteklerle birlikte fotoğraflanmıştır. Bu destekler Şekil 4'te gri parçalar olarak gösterilmiştir. Üretilen yapı genel olarak başarılıdır ve stereolitografi sisteminin yüksek hassasiyetini ve başarısını kanıtlamaktadır. Bu başarıya kanıt olarak gösterilebilecek en önemli unsur herhangi bir biyomekanik analize ihtiyaç duymadan, görsel olarak rahatlıkla anlaşılabilirliği üzere stereolitografi aracılığı ile üretilen kalp kapakçığı modellerinin basit desteklerle veya tamamen desteksiz olarak kendi başlarına sağlam bir biçimde ayakta durabiliyor olmalarıdır. Özellikle biyomürekkep aracılığı ile biyobaskı metodu ile kalp kapakçıkları daha önce üretilmeye çalışılmıştır ancak üretilen bu kalp kapakçıklarının hiçbirisinin bir destek kullanmadan kendi başlarına ayakta durması mümkün değildir [16,17]. Bu açıdan çalışma biyomekanik özellikler açısından diğer biyoyazıcı metodlarından üstünlük arzeder. Bu çalışmanın öncesinde stereolitografi ile biyomalzemeler kullanılarak biyoyazıcı çalışması gerçekleştirilmediği için bu noktada bir

biyomekaniz analiz ve karşılaştırma yapmak mümkün değildir. Bu çalışma kendisinden sonra bu alanda çalışma yapacak olanlara referans teşkil edecektir. Şekil 8’de Şekil 4’te gösterilen versiyon 1 kalp kapakçığı üretilmiştir. Bu amaçla PEGDA (Polyethylene Glycol Diacrylate: Type A: M_n 7009) kullanılmıştır.

En önemli sorun süratli bir fabrikasyon süreci istendiği durumda kan akışının geçişi için gerekli olan boşluk oluşturabilecek olan çözünürlüğün elde edilememesidir. Bu hayati bir kusur değildir. Stereolitografi ile üretilmesi her halukarda fabrikasyon sürecini hızlandıracak ve kalp kapakçığının kalitesini arttıracaktır. Ancak kalp kapakçığının yaprakları arasındaki boşluğun bu şekilde üretilmemesi durumunda yine de çeşitli kesiciler ve deliciler aracılığı ile kan akışı için uygun olan boşluk oluşturulabilir. Bu çalışmada da ilk çalışmada kan akışı için gerekli olan boşluk üretim sonrasında çeşitli kesiciler aracılığı ile oluşturulmuştur. Daha sonra biyoyazıcının sürati azaltılmış, bu sayede çözünürlük artırılmıştır. Bu sayede yaprakçıklar arasındaki boşluk sağlıklı bir biçimde elde edilmiştir. Şekil 8’de gösterilen kalp kapakçığı modeli bu şekilde üretilmiştir. Aynı problem Şekil 5’te gösterilen versiyon 2 kalp kapakçığı için de ortaya çıkmıştır. Baskı süresi uzadıkça çözünürlük artmış ve yaprakçıklar arasındaki kan akışının gerçekleşeceği boşluk yüksek verimle elde edilmiştir. Bu üretim Şekil 8c’de görülebilir.

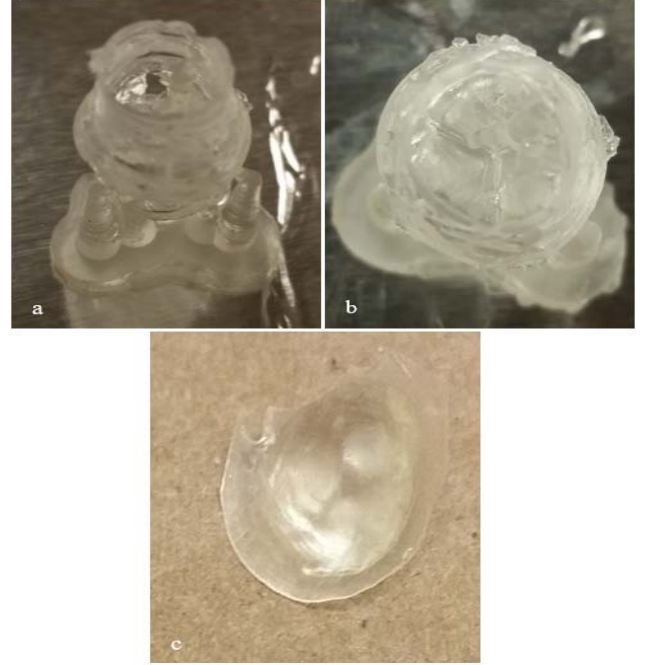
3.2. PEGDA:GelMA Karışımı Performansı (PEGDA:GelMA Mixture Performance)

Şekil 9’da GelMA ve PEGDA karışımı stereolitografi aracılığı ile basılmıştır. Yapısal bütünlük GelMA’nın sahip olduğu düşük mekanik özellikler sebebiyle azalmıştır. Kan akışı için gerekli olan boşluğun basılamamış olması gibi belli başlı bazı baskı hataları mevcut olsa da temel olarak bir fabrikasyon işlemi gerçekleşmiştir. GelMA’nın burada kullanılma nedeni yüksek biyoyumluluğa sahip olması ve hücrelerin çoğalabilmesi için elverişli bir ortama sahip olmasıdır. Tek başına PEGDA’nın biyoyumluluğu düşüktür ve hücre canlılığı için GelMA kadar uygun değildir. Bu nedenle hem PEGDA’nın yüksek mekanik özelliklerinden faydalanabilmek hem de GelMA’nın yüksek hücre canlılığı temin edebilmesi amacıyla bu iki biyomalzeme birleştirilerek kullanılmıştır.

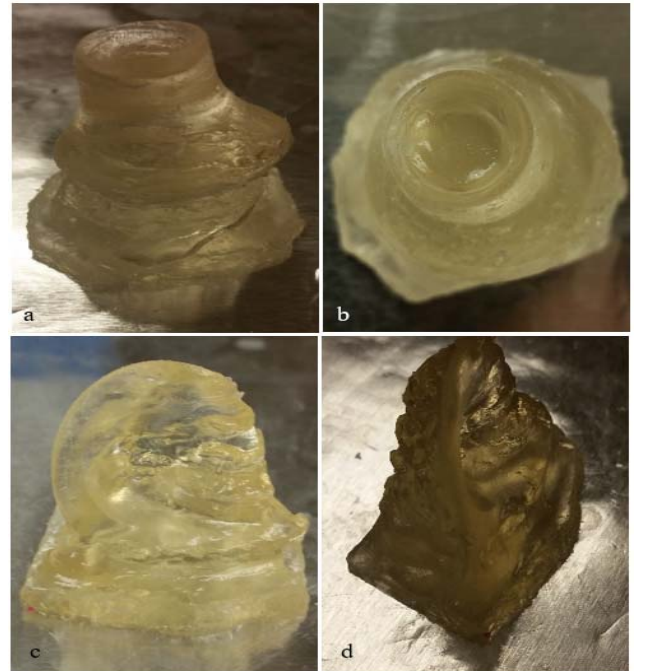
3.3. Hücre Canlılığı Test Sonuçları (Cell Viability Test Results)

Şekil 10’da ters mikroskop ile kalp kapakçıklarından alınmış görüntülere yer verilmiştir. Şekil 11’de ise birinci gün ve üçüncü gün için canlı ve ölü hücreler gösterilmiştir. Canlı hücreler yeşil, ölü hücreler ise kırmızıdır. Buna göre birinci gün için %90 hücre canlılığı üçüncü gün için ise %70 hücre canlılığı gözlemlenmiştir. Bu testler literatürde yer alan enjeksiyon metodu ile üretilen yapay kalp kapakçıkları ile kıyaslandığında oldukça yeterli görülmektedir. Bu testlerde de aynı süreler için yapılan hücre canlılığı testlerinde Hockadey vd [16], Duan 2013a vd [17], Duan 2013b vd.

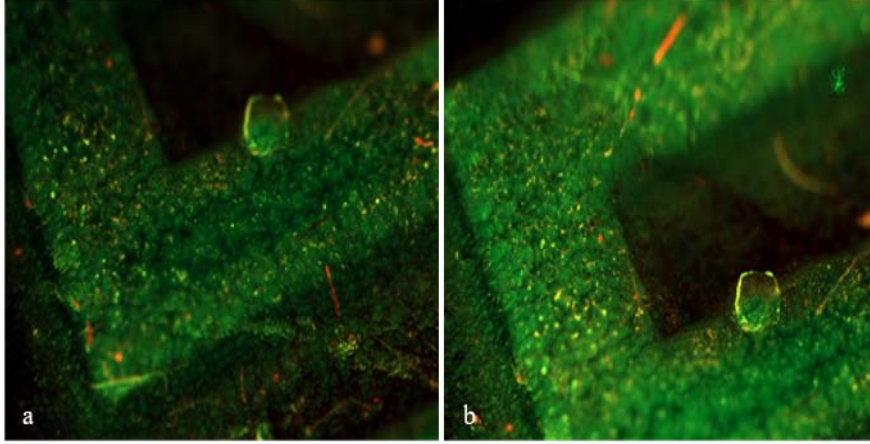
[18], Duan 2014 [19] ve Chang vd [20] gerçekleştirdiği çalışmalarda stereolitografi hariç başka tekniklerle ürettikleri yapay kalp kapakçıklarında %80 civarında hücre canlılığı gözlemlendiğini rapor etmiştir.



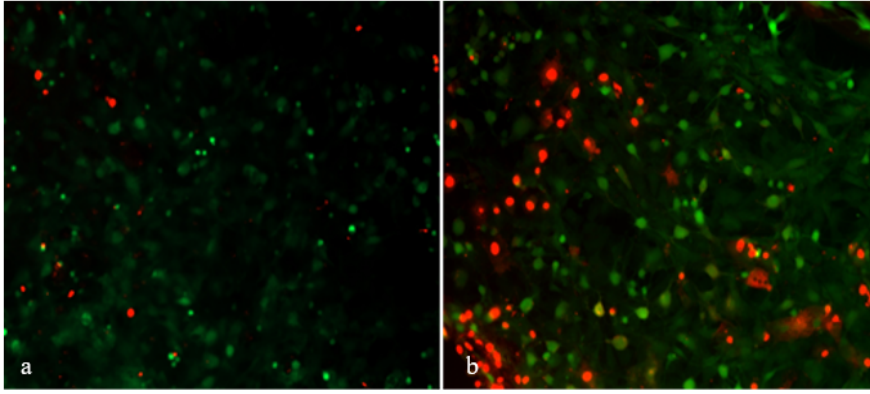
Şekil 8 Versiyon 1 a) Kalp kapakçığının önden görünüşü, b) Kalp kapakçığının yukarıdan görünüşü Versiyon 2 c) Kalp kapakçığı önden görünüşü (Version 1 a) Front view of heart valve b) Top view of heart valve Version 2 c) Front view of heart valve)



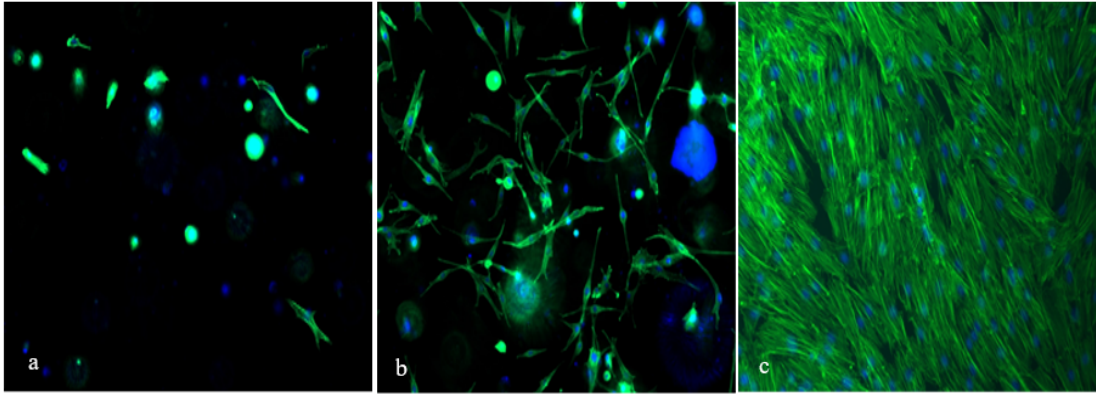
Şekil 9. Versiyon 1 a) Önden görünüş b) Yukarıdan görünüş Versiyon 2 c) Önden görünüş d) Yandan görünüş (Version 1 a) Front view b) Top view Version 2 c) Front view b) Side vies)



Şekil 10. Ters Mikroskop ile elde edilmiş kalp kapakçıkları üzerine ekilmiş kardiyak fibroblast hücreleri arasındaki canlı ve ölü hücreler (Dead/alive cardiac fibroblast cells that are seeded on to heart valves and imaged by an inverted microscope)



Şekil 11. Hücre Canlılığı Testleri a) Birinci gün b) Üçüncü gün (Cell Viability Tests a) First day b) Third day)



Şekil 12. DAPI / ACTIN Testleri a) Birinci gün b) Üçüncü gün c) Yedinci gün (DAPI/ACTIN tests a) First day b) Third day c) Seventh day)

3.4 DAPI/ACTIN Test Sonuçları (DAPI/ACTIN Test Results)

Şekil 12’de DAPI/ ACTIN testlerinin sonuçları incelenmiştir. Buna göre birinci günden yedinci güne doğru hücrelerin etkileşimlerinin arttığı ve hücre çoğalmasının verimli olduğu gözlemlenebilir. Bu sonuçlarda aynı hücre canlılığı testleri gibi muadil çalışmalar ile kıyaslandığı takdirde yeterli başarıyı sağladığı anlaşılacaktır.

4. SONUÇLAR (CONCLUSIONS)

Stereolitografi ile daha önce yapay kalp kapakçığı üzerine gerçekleştirilmiş çalışmalar eser miktardadır [21]. Bu çalışmadaki temel strateji stereolitografi metodu ile yapısal bütünlüğe sahip biyoyumluluğu olan yapay kalp kapakçıkları üretmektir. Bu çalışma kapsamında ilk kez GelMa ve PEGDA gibi biyomalzemeler ilk kez

stereolitografi yöntemi ile ilk kez yapay bir kalp kapakçığının üretimi için kullanılmıştır. Bu dahi stereolitografi ile biyobaskı teknolojisinin emekleme çağında olmasından dolayı çalışmayı fazlasıyla yenilikçi kılmaktayken, bununla yetinilmemiş birde bunun üzerine hücre canlılığı testleri gerçekleştirilmiştir. Gelecek çalışmalar olarak üretilmiş olan bu yapay kalp kapakçıklarında biyomekanik testler gerçekleştirilebilir. Çekme ve gerilme testleri, esneme testleri gerçekleştirilebilir. Elde edilecek olan sonuçlar biyoprostetik kalp kapakçıklarının biyomekanik sonuçları ile kıyaslanabilir ve böylelikle üretim süreçleri zaman içerisinde tekrar tekrar optimize edilerek çalışma geliştirilebilir. Biyomekanik analizden başka biyoyumluluk konusunda da analizler derinleştirilebilir. Kimyasal karakterizasyon ve biyolojik ortamda degradasyon gibi analizlerde gelecek çalışmalar için düşünülebilir. Gerçekleştirilecek bütün bu in vitro çalışmalardan sonra nihayet in vivo çalışmalara geçilebilir. İn vivo çalışmalara başlanmak istendiği takdirde üretilen kalp kapakçığı modeli burada hücre canlılığı ve DAPI/ACTIN testlerinde gösterilen 7 günlük süreden çok daha uzun süreler için hücre kültürüne maruz bırakılmalıdır. Bunun için biyoreaktörler kullanılmalı ve hücrelerin biyomalzeme üzerinde iyice tutunması ve birbiri ile kenetlenmesi temin edilmelidir. Bu gerçekleştikten sonra biyomalzeme biyobozunur olduğu için kısa zaman içerisinde kendiliğinden çözünecek ve geriye sadece hücreler kalacaktır. Bu süreç Şekil 2'de anlatılmıştır. Geriye hiçbir biyomalzeme kalmayacağı ve kalp kası hücreleri de kendiliğinden hidrofobik oldukları için kan pıhtılarının tutunması ve kan akışının bir şekilde etkilenmesi olamayacaktır. Önümüzdeki yıllarda odaklanabilecek bir diğer konu başlığı ise kalp kapakçıklarının ihtiyaç duyacakları kan damarlarının da 3B yazıcılar aracılığı ile üretilecek dokuya eklenmesi olacaktır. Bu konu ile ilgili olarak pek çok ilginç çalışma yapılmaktadır [22]. Bir diğer muhtemel yenilik yeni yeni geliştirilen dört boyutlu yazıcı teknolojilerinin gelişmesine istinaden üç boyutlu yazıcı sistemlerinden sonra dört boyutlu yazıcı sistemlerinin de yapay kalp kapakçığı fabrikasyonu çalışmalarında kullanılması da mümkün görülmektedir [23]. Son olarak bu çalışma ülkemizde henüz yeni yeni güçlenmekte olan biyoteknoloji ve biyomedikal mühendisliği çalışmalarının güçlenmesi açısından bir adım teşkil edecek, pek çok çalışmaya öncülük edecektir [24, 43].

KAYNAKLAR (REFERENCES)

1. US Dep. Health Hum. Serv. 2014. The need is real: data. Donate the gifts of life statistics and figures, US Dep. Health Hum. Serv., Washington, D.C, retrieved February 26, 2014.
2. Driessen J.V.C., Mol A., Bouten C.V.C., Baaijens F.P.T., Modeling the mechanics of tissue engineered human heart valve leaflets. *J. Biomech.* 40, 325-334. 2007.
3. Balguid A., Rubbens M.P., Mol A., Bank R.A., Bogers A., Van Kats J.P., De Mol B., Baaijens F.P.T., Bouten C.V.C., The role of collagen cross links in biomechanical behaviour of human aortic heart valve leaflets - relevance for tissue engineering. *Tissue Eng.* 13, 1501-1511, 2007.
4. Engelmayr G.C., Rabkin E., Sutherland F.W.H., Schoen F.J., Mayer J.E., Sacks M.S., The independent role of cyclic flexure in the early in vitro development of an engineered heart valve tissue. *Biomaterials* 26, 175-187, 2005.
5. Sodian R., Hoerstrup S.P., Sperling J.S., Daebritz S., Martin D.P., Moran A.M., Kim B.S., Schoen F.J., Vacanti J.P., Mayer J.E., Early in vivo experience with tissue engineered trileaflet heart valves. *Circulation* 102, 22-29, 2000.
6. Hoerstrup S.P., Sodian R., Daebritz S., Wang J., Bacha E.A., Martin D.P., Moran A.M., Guleserian K.J., Sperling J.S., Kaushal S., Vacanti J.P., Schoen F.J., Mayer J.E., Functional living trileaflet heart valves grown in vitro. *Circulation* 102, 44-49, 2000.
7. Wade R.J., Burdick J.A., Advances in nanofibrous scaffolds for biomedical applications: From electrospinning to self-assembly, *Nano Today*, 9, 722-742, 2014.
8. Khademhosseini A., Langer R., Microengineered hydrogels for tissue engineering, *Biomaterials*, 28, 5087-5092, 2007.
9. Onoe H., Okitsu T., Itou A., Kato-Negishi M., Gojo R., Kiriya D., Sato K., Miura S., Iwanaga S., Kuribayashi-Shigetomi K., et al. Metre long cell laden microfibres exhibit tissue morphologies and functions *Nat. Mater.*, 12, 584-590, 2013.
10. Yamato M., Okano T., Cell Sheet Engineering, *Mater. Today*, 7 (5), 42-47, 2004.
11. Atala A., Kasper F.K., Mikos A.G., Engineering Complex Tissues, *Sci. Transl. Med.* 4, 160rv12-160rv12., 2012.
12. Akpek A., Triküspit Kalp Kapakçıklarının Üç Boyutlu (3B) Biyobaskı Metotları ile Fabrikasyonu. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 10.19113/sdufbed. 57066, 2018.
13. Hosseini V., Ahadian S., Ostrovidov S., Camci-Unal G., Chen S., Kaji H., Khademhosseini A., Engineered contractile skeletal muscle tissue on a microgrooved methacrylated gelatin substrate. *Tissue Engineering Part A*, 18 (23-24), 2453-2465, 2012.
14. Bajaj P., Schweller R.M., Khademhosseini A., West, J.L., Bashir R., 3D biofabrication strategies for tissue engineering and regenerative medicine. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 16, 247-276, 2014.
15. Sodian R., Loebe M., Hein A., Martin D.P., Hoerstrup S., Application of stereolithography for scaffold fabrication for tissue engineered heart valves, *ASAIO Journal*, 48, 12-16, 2002.
16. Hockaday L.A., Kang K.H., Colangelo N.W., Cheung P.Y.C., Duan B., Malone E., Wu J., Girardi L.N., Bonassar J.L., Lipson H., "Rapid 3D printing of anatomically accurate and mechanically heterogeneous aortic valve hydrogel scaffolds", *Biofabrication*, 4 (3), 035005, 2012.
17. Duan B., Hockaday L.A., Kang K.H., Butcher J.T., 3D Bioprinting of heterogeneous aortic valve conduits with alginate/gelatin hydrogels, *J. Biomed. Mat. Research Part A*, 101A (5), 1255-1264, 2013.

18. Duan B., Hockaday L.A., Kapetanovic E., Kang K.H., Butcher J.T., Stiffness and adhesivity control aortic valve interstitial cell behavior within hyaluronic acid based hydrogels, *Acta Biomaterialia*, 9 (8), 7640-7650, 2013.
19. Duan B., Kapetanovic E., Hockaday L.A., Butcher J.T., Three-dimensional printed trileaflet valve conduits using biological hydrogels and human valve interstitial cells, *Acta Biomaterialia*, 10 (5), 1836-1846, 2014.
20. Chang C., Boland E.D., Williams S.K., Hoying J.B., Direct-write bioprinting three-dimensional biohybrid systems for future regenerative therapies, *Journal of Biomedical Materials Research*, 98B (1), 160-170, 2011.
21. Akpek A., Zhang Y.S., Khademhosseini A., Three Dimensional (3D) Bioprinting of Stereolithography Applied Tissue Engineered Artificial Heart Valves, *The Proceedings of XX. National Biomedical Engineering Congress, İzmir-Türkiye*, 45 - 49, 3-5 November 2016.
22. 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.
23. 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.
24. Öztarhan A., Akpek A., Oks E., Nikolaev A., Modifying medical textiles with antibacterial and friction resistance abilities by an alternative nanotextile technology called ion implantation technique, *Biomedical Engineering Meeting (BIYOMUT)*, Antalya-Turkey, 11441982, 21-24 April 2010.
25. Akdoğan K.E., Yılmaz A., Analysis of gait motion equations and application of proportional derivative control for electronic above knee prosthesis, *Journal of the Faculty of Engineering and Architecture of Gazi University*, 31 (1), 201-209, 2016.
26. Nikolaev A.G., Yushkov G.Y., Oks E.M., Öztarhan A., Akpek A., Hames-Kocabas E., Urkac E.S., Brown I.G., Modification of anti-bacterial surface properties of textile polymers by vacuum arc ion source implantation. *Applied Surface Science*, 310, 51-55, 2014.
27. Akpek A., Youn C., Kagawa T., Temperature measurement control problem of vibrational viscometers considering heat generation and heat transfer effect of oscillators, *Asian Control Conference (ASCC)*, Istanbul-Turkey, 1-6, 23-26 June 2013.
28. Gönen D., Karaoglan A.D., Ocaktan M.A.B., Oral A., Atıcı H., Kaya B., A new risk assessment approach for the analysis of musculoskeletal disorders, *Journal of the Faculty of Engineering and Architecture of Gazi University*, 33 (2), 425-44, 2018
29. Akpek A., Youn C., Maeda A., Fujisawa N., Kagawa T., Effect of thermal convection on viscosity measurement in vibrational viscometer. *Journal of Flow Control, Measurement & Visualization*, 2, 12-17, 2014
30. Akpek A., Youn C., Kagawa T., A study on vibrational viscometers considering temperature distribution effect. *Transaction of the Japan Fluid Power System Society*, 45.3, 29-36, 2014.
31. Sarı S., Akpek A., Design of a system that measures the effect of environmental temperature on ultrasonic nebulizers, *Electrical, Electronics and Biomedical Engineering (ELECO)*, Bursa-Turkey, 16669930, 1-3 December 2016.
32. Uçar T., Koçak O., Akpek A., New concept design of an insulin pen for visually impaired or blind diabetes mellitus patients. *Medical Technologies National Congress (TIPTEKNO)*, Antalya-Turkey, 16707777, 27-29 October 2016.
33. Çatalbaş M.C., Gülten A., A novel super-resolution approach for computed tomography images by inverse distance weighting method, *Journal of the Faculty of Engineering and Architecture of Gazi University*, 33 (2), 697-711, 2018.
34. 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.
35. Takcı H., Diagnosis of breast cancer by the help of centroid based classifiers, *Journal of the Faculty of Engineering and Architecture of Gazi University*, 31 (2), 323-330, 2016.
36. Koçak O., Kurtuldu H., Akpek A., Koçoğlu A., Eroğul O., A medical waste management model for public private partnership hospitals. *Medical Technologies National Congress (TIPTEKNO)*, Antalya-Turkey, 16707819, 27-29 October 2016.
37. Akpek A., Effect of non-uniform temperature field in viscosity measurement, *Journal of Visualization*, 19.2, 291-299, 2016.
38. 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.
39. Irmak E., Calpbınici A., A novel design for e-laboratories: Simultaneously accessible experimental application platform, *Journal of the Faculty of Engineering and Architecture of Gazi University*, 32 (2), 363-375, 2017.
40. Cebeci SA, Ciftcioglu C., Kocak O., Akpek A., Electronic Pillbox Design for Demantia Patients, *Medical Technologies National Conference (TIPTEKNO)*, Bodrum-Turkey, 15690190, 15-18 October 2015.
41. Avcı H., Guzel FD., Erol S., Akpek A., Recent advances in organ-on-a-chip technologies and future challenges: A Review, *Turkish Journal of Chemistry*. 42 (3), 587-610, 2017.
42. Kocak O., Gurel F., Akpek A., Kocoglu A., Control Of Wheel Chair For Quadriplegia Patients: Design A BioreMOTEcontrol. 9th International Conference On Electircal and Electronics Engineering (ELECO), Bursa-Turkey, 26-28 November 2015.
43. Akpek A., Effect of Ambient Temperature Variations on Particle Dimesions in Ultrasonic Nebulizers during Cold Vaporization, *Adv. Sci. Technol. Eng. Syst. J.*, 2 (3), 946-950, 2017.