



DOKU VE ORGAN BİYO YAZDIRMA AMAÇLI 3B BİYO YAZICI TASARIMI VE GELİŞTİRİLMESİ DESIGN AND CONSTRUCTION OF A 3D BIOPRINTER FOR BIOPRINTING OF TISSUES AND ORGANS

Levent AYDIN¹, Doç. Dr. Serdar KÜÇÜK¹, Yrd. Doç. Dr. Halime KENAR²

¹ Biyomedikal Mühendisliği
Kocaeli Üniversitesi
146162002@kocaeli.edu.tr
skucuk@kocaeli.edu.tr

² Deneysel ve Klinik Araştırmalar Merkezi
Kocaeli Üniversitesi
halime.kenar@kocaeli.edu.tr

Özetçe

Üç boyutlu biyo yazıcılar, özellikle Rejeneratif Tıp ve Doku Mühendisliği alanında kullanılan ve pek çok sorun için umut vaat edici çözümler üreten ileri teknolojik biyomedikal cihazlardır. Bilinen üç boyutlu yazıcılar erimiş birikimi modelleme (FDM), stereolitografi (SLA), selektif lazer eritme (SLM), selektif lazer sinterleme (SLS) ve doğrudan metal lazer sinterleme (DMLS) gibi yöntemleri kullanarak ABS (Akrilonitril Bütadien Stiren), PLA (Poli Laktik Asit) ve benzeri sentetik polimerler ile sıvı reçine ve metal tozlarından üç boyutlu yapılar oluşturabilmektedir. Bu malzemelerden üretilen doku iskeleleri; i) vücut içerisinde istenmeyen tepkilere yol açabilme, ii) bozunma oranları ile hücrelerin kendi hücre dışı ortamlarını üretme yeteneklerinde uyumsuzluk, iii) toksisite, iv) yapısal ve mekanik özelliklerde hedef dokuya göre uygunsuzluk gibi bazı problemlere neden olmaktadır. Bu çalışmada, yukarıda açıklanan problemleri yok edebilmek için doğrudan canlı hücreleri üç boyutlu uzayda, mikroenjeksiyon yöntemiyle hassas konumlandırarak canlı dokuları oluşturabilen özgün bir üç boyutlu biyo yazıcı üretilmiştir.

Abstract

Three dimensional bio-printers are advanced technological biomedical devices used especially in the fields of Regenerative Medicine & Tissue Engineering and offer promising solutions to many problems. Conventional 3d printers form 3d structures by using ABS, PLA, synthetic polymers, liquid resin and metal powder applying one of the printing methods such as FDM, SLA, SLM, SLS and DMLS. Tissue scaffolds obtained from these materials may produce some problems: i) undesired reactions inside the body, ii) disharmony between the cells' own ECM deposition ability and scaffold's degradation rate, iii) toxicity and iv) mismatch in the structural and mechanical properties in comparison to the target tissue. In this study, in order to eliminate the

problems mentioned above, a 3d bio-printer is developed to print tissues and organs from alive cells by using microinjection method.

1. Giriş

3b baskı, üç boyutlu bir modelin madde olarak çıktısının alınması olarak tanımlanır. Elde edilen bu maddesel çıktı, iki boyutlu katmanların ardışık olarak üst üste biriktirilmesinden meydana gelir [1]. 3b baskı, kesme ve delme yöntemleri ile malzemenin çıkarılmasına dayanan geleneksel işleme tekniklerinden farklı kabul edilmektedir. 3b yazıcı, bilgisayar kontrollü üç boyutlu maddesel çıktı üreten bir endüstriyel robot türüdür.

3b baskı teknolojisi, endüstriyel tasarım (araba), mühendislik, mimarlık (ev), askeri, medikal sektörü (ortez, protez), biyoteknoloji (insan dokusu özdeşleri), moda (ayakkabı, elbise), gıda (pasta, et) ve diğer birçok alanda kullanılmaktadır [2]. Bu teknolojiyle yazdırma işlemi, Tablo 1'de de gösterildiği üzere erimiş birikimi modelleme (FDM), inkjet malzeme biriktirme, sinterleme (SLS - seçici lazer sinterleme, DLMS - doğrudan lazer metal sinterleme), seçici lazer eritme (SLM), laminalı nesne imalatı (LOM) gibi temel tekniklerin kullanımı ile gerçekleştirilir [3].

Günümüzde üç boyutlu nesnelere oluşturulmasında katkılı üretim ve malzeme eksiltme olmak üzere iki ana yöntem kullanılmaktadır. Katkılı üretim sıralı katmanlar oluşturarak, malzeme eksiltme ise talaş kaldırarak 3 boyutlu nesnelere meydana getirilmesini sağlar. Hem katkılı üretimde hem de malzeme eksiltmede, Stereolitografi olarak bilinen (üç boyutlu nesnelere, enine kesitler alınarak üretilmesi) teknik kullanılarak nesnelere şekil verilir [4].

Tablo 1'de ilk kolonda yazdırma türü, ikinci kolonda yazdırma teknolojisi ve son kolonda ise kullanılan malzemeler verilmiştir.

Tıbbi Cihaz Tasarımı 3

2. Gün / 16 Ekim 2015, Cuma

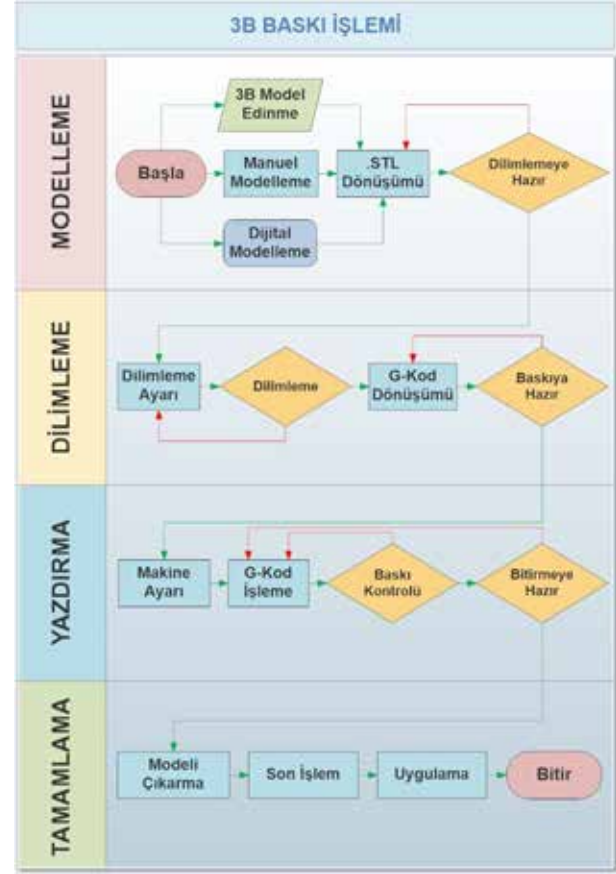
Tablo 1: 3b baskı teknolojisi

| Tip | Teknoloji | Malzeme |
|----------------------|--|--|
| Ekstrüzyon | Kaynaşmış birikim modelleme (FDM) | Polilaktasit (PLA), Akrilonitril bütadien stiren (ABS) |
| Bağlama | Elektron ışını serbest fabrikasyon (EBF ₃) | Neredeyse bütün metal alaşımlar |
| Granüler | Doğrudan metal lazer sinterleme (DMLS) | Neredeyse bütün metal alaşımlar |
| | Elektron ışın ergitme (EBM) | Titanyum alaşımları |
| | Seçici lazer eritme (SLM) | Titanyum alaşımları, paslanmaz çelik, alüminyum |
| | Seçici ısı sinterleme (SHS) | Termoplastik toz |
| | Seçici lazer sinterleme (SLS) | Termoplastik, metal tozları, seramik tozları |
| Mürekkep püskürtmeli | Alçı tabanlı 3b baskı (PP) | Alçı |
| Katmanlı | Lamine nesne imalatı (LOM) | Tabaka, metal folyo, plastik folyo |
| Işık polimerize | Stereolitografi (SLA) | Fotopolimer |
| | Dijital ışık işleme (DLP) | Fotopolimer |

Yukarıda anlatılan yöntemler kullanılarak nesnel oluşturulurken 3b yazdırılabilir modellerden faydalanılır. Bu modeller, bir bilgisayar destekli tasarım yazılımı veya 3b tarayıcıyla elde edilen nesneye ait dijital çizimlerden oluşmaktadır. Her iki yöntemle de STL uzantılı yazdırılabilir bir dosya meydana getirilir. Bir baskı gerçekleştirmek için, makine bu 3b yazdırılabilir dosyayı (.STL dosyası) okur ve bir dizi enine kesitler oluşturarak katman malzemelerini birbiri ardına yerleştirir. Elde edilen bu katmanlar, katkı işlemleriyle ya da kendiliğinden kaynaşarak gerçek nesnenin şeklini oluşturur.

Şekil 1'de akış diyagramı verilen üç boyutlu yazıcı ile yazdırma işlemi modelleme, dilimleme, yazdırma ve tamamlama olmak üzere dört ana başlıktan oluşmaktadır. Modelleme adımı, bir bilgisayar destekli tasarım programı ya da bir 3b tarayıcı kullanılarak gerçek nesneye ait 3b model oluşturulur. Bu model daha sonra pek çok CAD/CAM yazılımlarında ortak olarak bulunan STL dosya uzantısıyla kaydedilir. Dilimleme adımı, STL olarak kaydedilen 3b model bir dilimleme algoritması kullanılarak belirli kalınlıklarda enine 2b kesitlere ayrılır. Bu kesitler, pek çok otomasyon işlemlerinde ortak olarak kullanılan ve G-Kod olarak adlandırılan kodlara dönüştürülür. Bu kodlar, makinenin anlayacağı dilde her bir 2b katman için belirlenen noktalarda ve belirlenen miktarlarda malzeme işlenmesini sağlayan kod bilgilerini içermektedir. Yazdırma adımı, 3b yazıcı G-Kod'lar vasıtasıyla, her bir 2b katmanı birbiri ardına sıralayarak 3b gerçek nesnenin el ile tutulabilen katı modelini oluşturur. Bu katı modellerin oluşturulmasında isteğe bağlı olarak sıvı, toz ya da katı herhangi bir polimer malzeme kullanılabilir. Tamamlama adımı, 3b yazdırma işlemi sonrasında oluşan katman çizgileri ısıtılarak, gaz ve çözelti

gibi yöntemler kullanılarak yok edilir. Böylece malzeme yüzeyinin pürüzsüzleştirilmesi sağlanır.



Şekil 1: 3b baskı işlemi akış diyagramı

Yazıcı çözünürlüğü, katman kalınlığı ve dpi (inç başına nokta) olarak ya da mikrometre (μm) ile ifade edilir. Bir model basımı, kullanılan yöntem, modelin boyutuna ve karmaşıklığına bağlı olarak, birkaç saatten birkaç güne kadar sürebilir. Bazı katkı üretim teknikleri parçaların üretimi süresince birden fazla malzeme kullanma yeteneğine sahiptir. Bazıları aynı anda birden fazla renk ve renk kombinasyonları yazdırabilir. Bazıları da oluşturulurken destekler kullanmaktadır. Bu destekler yapım sırasında sarkan yapıları desteklemek için kullanılır. Destekler baskı tamamlandıktan sonra çıkarılabilir veya eriyebilir türden seçilir.

2. Biyo-baskı

Biyo-baskı, 3b baskı işleminin, canlı hücrelerin hassas konumlandırılmasıyla, kompleks biyolojik yapıların (doku, organ) katman katman oluşturulmasıdır [5].

Biyolojik yapıların oluşturulmasında; biyomimikri, otonom birleşme ve mini doku yapı blokları gibi bir kaç yaklaşım mevcuttur [6]. Biyolojik yapılar oluşturulurken, hücrelerin işlem sırasında canlılığını koruyabilmesi gerekmektedir.

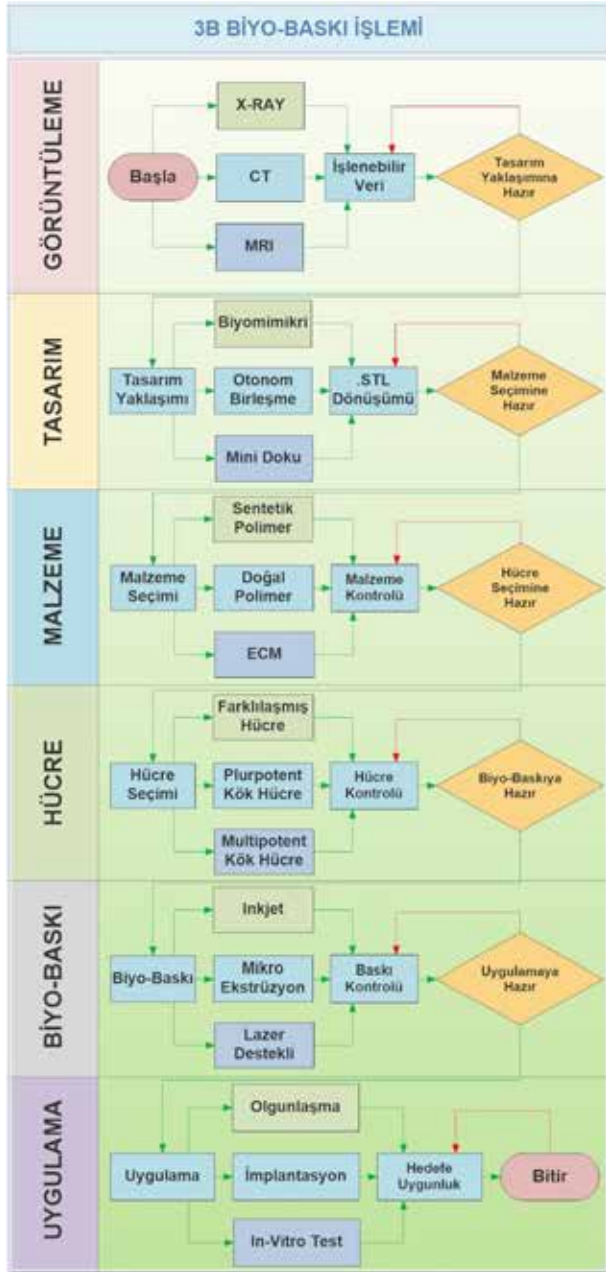
Biyomimikri, hücrelerin doğasının ve işlevselliğinin incelenerek, gerçek biyolojik yapıyla aynı özellikleri taşıyan biyolojik yapıların üretilmesini hedefler. Otonom birleşme, hücrelerin birbirleriyle olan etkileşimleri incelenerek, gerçek biyolojik yapıyla aynı yapısal özelliklerin, hücre

Tıbbi Cihaz Tasarımı 3

2. Gün / 16 Ekim 2015, Cuma

lokalizasyonunun ve doku işlevselliğinin sağlanması hedefler. Mini doku kavramı, yukarıdaki iki strateji ile ilişkili olarak, küçük işlevsel yapı bloklarının birleştirilmesiyle elde edilen doku ya da organları ifade eder.

Şekil 2'de akış diyagramı verilen 3b biyo yazdırma işlemi görüntüleme, tasarım, malzeme, hücre, biyo-baskı ve uygulama olmak üzere altı ana başlıktan oluşmaktadır.



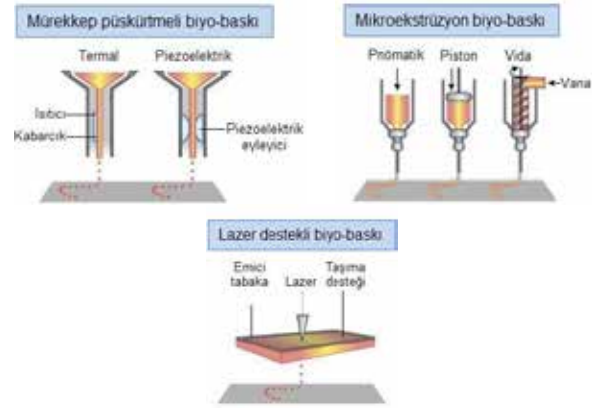
Şekil 2: 3b biyo-baskı işlemi akış diyagramı

Görüntüleme adımında, tıbbi görüntüleme cihazları kullanılarak biyolojik yapıların, bilgisayar destekli tasarımı ve matematiksel modellenmesinde kullanılacak kompleks mimari bilgileri elde edilir. Görüntüleme cihazları ile elde edilen ham veriler, bilgisayar destekli yazılım paketi kullanılarak 3b dijital (CAD/CAM) çizimlere dönüştürülür. Tasarım adımında, üretilmesi planlanan hedef dokuya uygun tasarım yaklaşımı ya

da bu yaklaşımların kombinasyonları belirlenir. Tasarım yaklaşımlarına göre işlenen 3b dijital çizimler biyo-baskı işlemi için hazırlanarak belirli kalınlıklarda iki boyutlu ardışık katmanlara dilimlenir. Malzeme ve Hücre adımlarında, hedef doku şekli ve işlevi için uygun malzeme ve hücre kaynağı seçilir. Malzeme adımında yaygın olarak sentetik ve doğal polimerler ile hücre dışı ortam (ECM) kullanılır. Hücre adımında kullanılan hücre kaynağı allojenik ya da olog olabilir. Bu bileşenler, mürekkep püskürtmeli, mikroekstrüzyon ya da lazer destekli biyo yazıcılara entegre edilir. Biyo-baskı adımında, seçilen malzeme ve hücre kaynakları, hedef dokuya özgü geliştirilen inkjet, mikroekstrüzyon ve lazer destekli yazdırma teknolojileri ile birlikte kullanılarak canlı yapıların oluşması sağlanır. Uygulama adımında, bazı dokular için transplantasyon öncesi biyoreaktörde olgunlaşma periyodu gerekebilir. Bu dokular, alternatif olarak in-vitro (lab ortamı) uygulamalarda kullanılabilir. Olgunlaşma periyodunu tamamlayan dokular analiz edilerek hedef dokuya uygunluk belirlenir.

Temel olarak kullanılan biyo yazdırma teknolojileri; mürekkep püskürtmeli, mikroekstrüzyon ve lazer destekli yazdırma sistemleridir.

Mürekkep püskürtmeli yazıcılarda, elektrik ile yazdırma başlığı ısıtılır ve başlıkta damlamayı sağlayan hava basıncı darbeleri üretilir. Sesli yazıcılar, piezoelektrik ya da ultrason basıncından oluşan darbeleri kullanır. Mikroekstrüzyon yazıcılarda, ekstrüzyon için pnömatrik ya da mekanik sistemler kullanılır. Lazer destekli yazıcılarda, emici yüzey üzerine odaklı lazer kullanılarak puls oluşturulur. Bu basınçla hücreler alt tarafta bulunan bir toplayıcı yüzeye doğru itilir. Şekil 3'te biyo yazdırma teknolojileri görülmektedir.



Şekil 3: Biyo yazdırma teknolojileri [7]

Mikroekstrüzyon baskı teknolojisi, en sık kullanılan ve en uygun maliyetli olan yazdırma teknolojisidir. Bu yazdırma teknolojisi genellikle X,Y ve Z eksenleri boyunca 3 boyutta kontrollü hareket edebilen, sıcaklık kontrollü malzeme iletimi ve ekstrüzyonu ile gerçekleşir. Bazı biyo-yazıcılar farklı hücre tipini yazdırmayı sağlayan birden fazla yazdırma başlığına sahiptir. Mikroekstrüzyon teknolojisi kullanan yazıcılar, robot kontrollü materyal ekstrüzyonu gerçekleştirir.

Mikroekstrüzyon teknolojisinde ekstrüzyon, pnömatrik ya da mekanik (piston ya da mil) sistemler ile gerçekleştirilir. Mekanik sistemler, pnömatrik sistemlere göre daha sağlıklı bir ekstrüzyon gerçekleştirir. Bunun sebebi pnömatrik sistemlerde bu olayın gaz basıncı, mekanik sistemlerde ise bir piston ya da mil ile gerçekleştirilmesidir. Pnömatik sistemler büyük ve

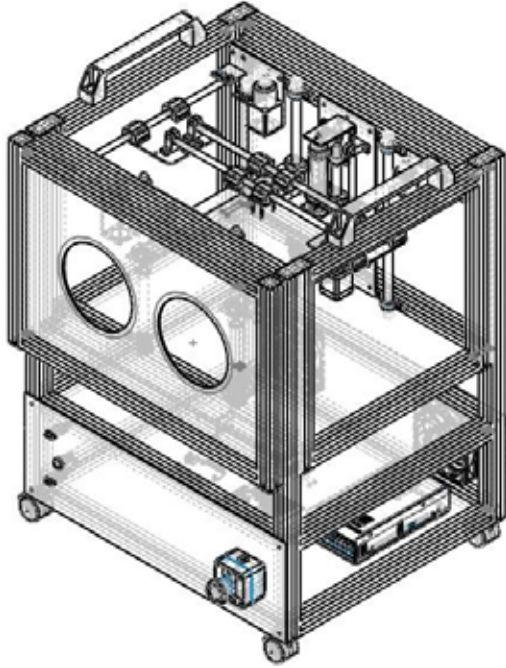
Tıbbi Cihaz Tasarımı 3

2. Gün / 16 Ekim 2015, Cuma

kolay uygulanabilir sistemler iken, mekanik sistemler daha küçük, hassas ve kompleks bir yapıya sahiptir. Mikroekstrüzyon teknolojisi, akışkan özelliklerine sahip, literatürde bilinen pek çok biyo-uyumlu malzeme ile kullanılabilir.

2.1. 3b Biyo Yazıcı Tasarımı

Laboratuvar ortamlarında canlı hücrelerin ve/veya doğal veya sentetik biyomalzemelerin hassas konumlandırılmasıyla doku iskelelerinin veya canlı doku/organların oluşturulmasını sağlayan üç boyutlu biyo yazıcı, üst kabin ve alt kabin olmak üzere iki ana kabini birleşiminden oluşmaktadır. Üst kabinde belirlenen uzayda ve atmosfer koşulları altında mikroenjeksiyon baskı teknolojisiyle bir doku iskelesinin veya canlı doku/organların oluşturulması sağlanmaktadır. Alt kabinde ise cihaz otomasyonunu gerçekleştiren bileşenler yer almaktadır [8]. Şekil 4'te BiyoLojik adlı, yerli üretim 3b biyo yazıcı görülmektedir.



Şekil 4: BiyoLojik perspektif görünüşü

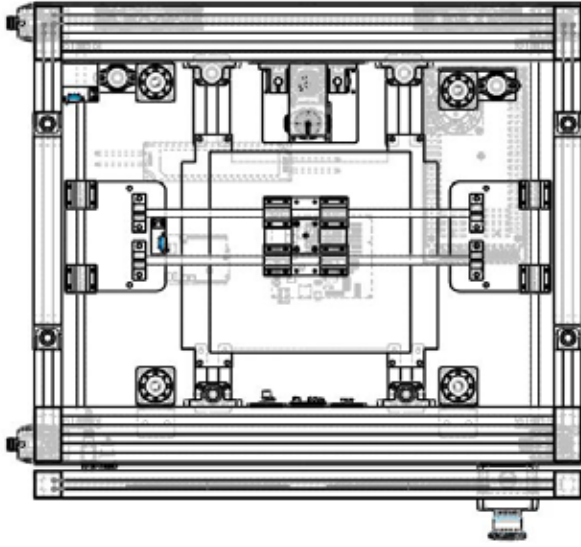
Üst kabin içerisinde belirlenen üç boyutlu uzayda; X ve Y eksenleri senkronize hareket edecek şekilde düz kayış ve kasnak sisteminden oluşan H-Bot kinematiği ile Z eksenini bunlardan ayrı hareket edecek şekilde vidalı millerden oluşan lineer sistem kullanılarak üç eksenle hareketlilik sağlanmıştır. Enjeksiyon sistemi tüm şırıngaların tam otomatize kullanımını destekleyecek şekilde universal olarak tasarlanmıştır. Üç boyutlu biyo yazdırma prosesinde üst kabin içerisinde uygun atmosferik koşulların sağlanması için mevcut ortam ölçümleri; karbondioksit miktarının ölçümü, karbondioksit sensör bağlantısı üzerine yerleştirilen karbondioksit sensörü ile sıcaklık ve nemin sırasıyla derece ve yüzde olarak ölçümü, sıcaklık-nem sensör bağlantısı üzerine yerleştirilen sıcaklık-nem sensörü ile gerçekleştirilmektedir. Sıcaklığın derecesi, yazdırma tablasının ortasında bulunan ısıtıcı plaka ve enjeksiyon sisteminde şırınganın ucunda bulunan ısıtıcı ile ayarlanmaktadır. Üst kabin içi sterilizasyonu için, üst kabini

üst yüzeyine içeriden kabin içi yüzeyin tamamını aydınlatacak UV aydınlatma sistemi yerleştirilmiştir. Tablo 2'de BiyoLojik ile mevcut biyo yazıcıların özellikleri karşılaştırılmıştır.

Tablo 2: Dünyadaki biyo yazıcılar ve özellikleri

| Üretici | Model | Özellikler |
|--------------------------------|------------------------|---|
| Organovo (ABD) | NovoGen MMX Bioprinter | <ul style="list-style-type: none"> • Üç boyutlu kompleks bir geometri oluşturamıyor • Sadece tek tip malzemeden hücre iskelesi üretebiliyor (hidrojel) |
| Regenovo (Çin) | 3D-Bioprinter | <ul style="list-style-type: none"> • Sadece tek tip malzemeden hücre iskelesi üretebiliyor (biyobozunur malzeme) • 20 µ en iyi çözünürlük • 160x160x150 mm maksimum baskı alanı • 260° maksimum başlık sıcaklığı • 64x50x70 cm cihaz ölçüleri • 50 kg ağırlık • Sadece Windows işletim sistemi ile çalışıyor |
| Kocaeli Üniversitesi (Türkiye) | BiyoLojik v1.0 | <ul style="list-style-type: none"> • Doğrudan üç farklı hücre tipini hassas konumlandırabiliyor • Kompleks geometrileri oluşturabiliyor • Sarkıt yapıları destekliyor • 446 nm en iyi çözünürlük • 375x250x275 mm maksimum baskı alanı • 350° maksimum başlık sıcaklığı • 50x60x70 cm cihaz ölçüleri • ≈ 80 kg ağırlık • Tüm işletim sistemleri ile çalışabiliyor • Grafik LCD ya da 7 " lik dokunmatik panel ile SD karttan bilgisayarsız çıktı alabiliyor • Atmosferik ortam ölçümleri (CO₂, nem ve sıcaklık) • Elektronik birimlerden tamamen yalıtılmış tamamen kapalı kabin • UV sterilizasyon sistemi • Eldiven port girişleri ile ön kapak kapalı iken baskı alanına müdahale |

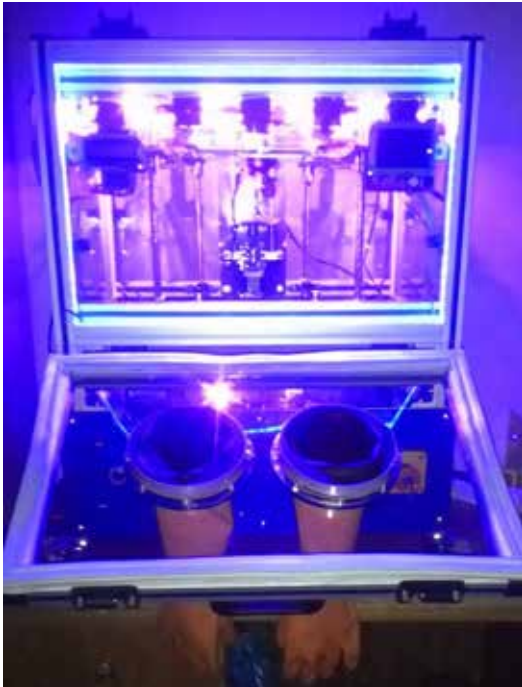
Şekil 4'te imal edilen biyomedikal cihaz görülmektedir.



Şekil 4: BiyoLojik üstten görünüşü

Ülkemiz literatürüne bakıldığında şimdiye kadar yapılan araştırmalarda bu teknolojileri kullanan bir cihaz geliştirilmemiş olup üç boyutlu yazıcı teknolojilerinin sağlık alanında umut vaat eden çözümler ürettiği dünya genelinde kabul görmüştür.

Kocaeli Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği ile Deneysel ve Klinik Araştırmalar Merkezi, Diyabet ve Obezite Araştırma Birimi arasında multidisipliner bir çalışma alanları içerisinde bulunan, Rejeneratif Tıp ve Doku Mühendisliği alanında araştırma imkânı sağlayacak, yerli imkânlarla üretilmiş bir üç boyutlu biyo yazıcı kazandırılmıştır. Şekil 5'te montajı tamamlanan cihaz görülmektedir.



Şekil 5: BiyoLojik

3. Sonuçlar

Geleneksel yöntemlerde meydana gelebilecek problemleri ortadan kaldıran bir 3b biyo yazıcı üretilmiştir. Bu yazıcı üç boyutlu canlı yapıların, doku ve organların oluşturulması için doğrudan canlı hücreleri hassas konumlandırabilecek bir yapıya sahiptir. Gerçekleştirilen bu yazıcı mevcut yazıcılardan ayıran önemli özellikleri; i) 446 nm en iyi çözünürlük, ii) sarkıt yapıları oluşturabilme, iii) 375x250x275 mm maksimum baskı alanı, iv) atmosferik ortam ölçümleri (CO₂, nem ve sıcaklık), v) UV sterilizasyon sistemi ve vi) eldiven port girişleri ile ön kapak kapalı iken baskı alanına müdahale edilebilmesi olarak sıralanabilir.

Canlı hücrelerin doğrudan hassas konumlandırılmasıyla geleneksel yöntemlerle hedef dokunun oluşturulması sırasında meydana gelen zaman ve maddi kayıplar önlenecektir. Ayrıca transplantasyon sonrası malzeme kaynaklı uyumsuzluğun tamamen ortadan kaldırılması mümkün olabilecektir.

4. Kaynakça

- [1] Aydın, L. (2014) *Üç boyutlu yazıcıyla ayak bileği ortezinin tasarımı ve geliştirilmesi*. Master tezi, Kocaeli Üniversitesi.
- [2] Lipson, H. & Kurman M. (2013) *Fabricated*. Indianapolis: John Wiley & Sons.
- [3] Wikipedia, https://en.wikipedia.org/wiki/3D_printing. [Ziyaret Tarihi: 1 Haziran 2015].
- [4] Hull, CW 1986, *Apparatus for production of three-dimensional objects by stereolithography*, US4575330 A.
- [5] Murphy, S. V. & Atala, A. (2014) 3d bioprinting of tissues and organs. *Nature Biotechnology*. 32 (8). p. 773.
- [6] Murphy, S. V. & Atala, A. (2014) 3d bioprinting of tissues and organs. *Nature Biotechnology*. 32 (8). p. 773-774.
- [7] Murphy, S. V. & Atala, A. (2014) 3d bioprinting of tissues and organs. *Nature Biotechnology*. 32 (8). p. 775.
- [8] Aydın, L, Kenar H 2015, *Üç boyutlu biyo yazıcı*, P2015/07063(Başvuru).