



# Stereolitografi Yöntemi ile Doku Mühendisliği Uygulanmış Yapay Kalp Kapakçıklarının Üç Boyutlu (3D) Olarak Yazılması

## Three Dimensional Bioprinting of Tissue Engineered Artificial Heart Valves by Stereolithography

Ali Akpek<sup>1</sup>

Gebze Teknik Üniversitesi,  
Biyomühendislik Bölümü,  
Kocaeli, Türkiye  
aliakpek@gtu.edu.tr

**Özetçe-** Geçen yıllar içerisinde organ transplantasyonu konusunda olan ihtiyaç sürekli olarak artmıştır. Organ nakline ihtiyaç sürekli olarak artarken organ bağısı sayısında ciddi bir artış gözlenmemiştir. Organ naklinin kendisini bir ihtiyaç olarak en çok belli ettiği alanlardan bir tanesi de kalp kapakçığı hastalıklarıdır. Kalp kapakçığı hastalıklarının tedavisi amacıyla iki tür yapay kalp kapakçığı kullanılmaktadır. Birincisi mekanik yapay kalp kapakçıkları diğeri ise biyoprostetik yapay kalp kapakçıklarıdır. Ancak bu kalp kapakçıklarının düzeltilmesi son derece komplike problemleri vardır. Bütün bu sebepler dolayısıyla doku mühendisliği aracılığı ile kişinin kendi kök hücreleri kullanarak oluşturulabilen, biyoyumluluğu 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 3D baskı modellerinden önde olsa da biyoyazıcı olarak değerlendirilmemiştir. Bu çalışma da bunun başarılması sağlanmaya çalışılmıştır.

**Abstract-** Over the past several decades, there has been an ever-increasing demand for organ transplants. 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. There are two types of artificial heart valves are utilized for heart valve replacement operations. These are mechanical heart valves and bioprosthetic heart valves. However, there are severe intrinsic problems exist for both type of artificial heart valves that are hard to be solved. Due to these reasons, growing or fabricating tissue engineered heart valves using biomaterial scaffolds with a person's own cells with

high biocompatibility. 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.

### I. Giriş

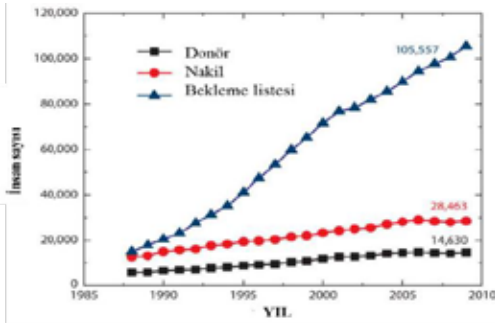
Geçen yıllar içerisinde organ transplantasyonu konusunda olan ihtiyaç sürekli olarak artmıştır. Organ nakline ihtiyaç sürekli olarak artarken organ bağısı sayısında ciddi bir artış gözlenmemiştir. Bu sebeple her sene yüzbinlerce insan organ nakli için sırada beklerken hayatlarını kaybetmektedir ve bu sayı her yıl artmaktadır. Bu durum Şekil 1'de gösterilmiştir [1]. Organ naklinin kendisini bir ihtiyaç olarak en çok belli ettiği alanlardan bir tanesi de kalp kapakçığı hastalıklarıdır. Kalp kapakçığı hastalıkları halen dünya üzerindeki en büyük ölüm nedenlerinden bir tanesi durumundadır [2]. Her yıl 290,000'den fazla hasta kalp kapakçığı ameliyatı geçirmektedir. Bu sayının 2050 yılına kadar yılda 850,000'e ulaşacağı tahmin edilmektedir [3, 4].

Kalp kapakçığı hastalıklarının tedavisi amacıyla iki tür yapay kalp kapakçığı kullanılmaktadır. Birincisi mekanik yapay kalp kapakçıkları diğeri ise biyoprostetik yapay kalp kapakçıklarıdır [5]. Bu iki yapay kalp kapakçığının da en büyük dezavantajı; nakledilmelerinden sonra vücut içerisinde büyüyememeleri ve tekrar modellenmeye imkan tanımamalarıdır. Bu özellikle çocuklarda ciddi sorunlara sebebiyet vermektedir. Çocuklar büyüdükçe kalp kapakçıkları da büyümek zorundadır. Halbuki bu yapay kalp kapakçıklarının boyutları büyüyemediği için çocuklar her iki uç yılda bir tekrar ameliyat geçirmek ve kalp

kapakçıklarını yeni bir modelle değiştirmek zorunda kalmaktadırlar. Bunun yanında mekanik kalp kapakçıkları enfeksiyon, iltihap ve tromboz oluşumuna açık durumdadırlar. Benzer şekilde biyoprostetik kalp kapakçıkları da kireçlenme sebebiyle kalp kapakçıklarında kalınlasmaya ve sertleşmeye bu nedenle de yetersiz kapanmaya ve böylelikle de sızıntıya neden olmaktadır [6].

Bütün bu sebepler dolayısıyla doku mühendisliği aracılığı ile kişinin kendi kök hücreleri kullanarak oluşturulabilen, biyoyumluluğu yüksek, nakledildikten sonra hasta ile birlikte gelişebilen ve diğer yapay kalp kapakçıklarının sahip olduğu dezavantajlara sahip olmayan yapay kalp kapakçıkları üretilmeye çalışılması mecburidir. Bu araştırmanın motivasyonu bu özelliklere sahip bir yapay kalp kapakçığı üretebilmek ve kalp kapakçığı hastalıkları tedavisine yardımcı olmaya çalışmaktır.

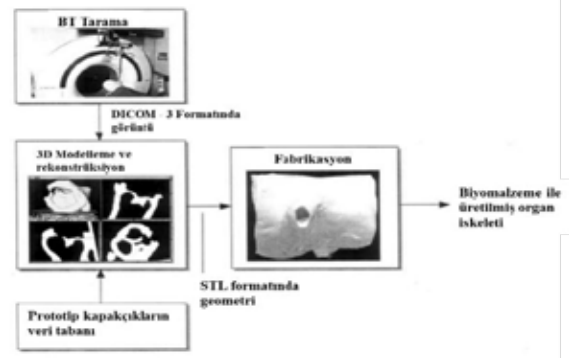
Bu çalışmada amaçlanan, kalp kapakçıkları hastalıklarında kullanılmak üzere stereolitografi yöntemi ile üretilmiş yapay bir kalp kapakçığı üretmektir. Günümüze kadar çeşitli doku mühendisliği metodları ile üretilen değişik yapay kalp kapakçığı modellerinin hiçbirisi hayvan deneylerinde bir kaç aydan daha uzun süre işlevselliğini sürdürmemiştir. Bunun nedeni üretilen bu yapay kalp kapakçıklarının biyomekanik özelliklerinin bir kaç aydan daha uzun süreler kullanmak için yetersiz olmasıdır. Stereolitografi yöntemi yüksek çözünürlüğe sahip son derece güçlü mekanik özelliklere sahip olan yapılar üretme konusunda bütün diğer 3D baskı modellerinden önde olsa da biyoyazıcı olarak değerlendirilmemiştir. Bu çalışma da bunun başarılması sağlanmaya çalışılmıştır.



Şekil 1 Yıllara göre donör ve nakil listesi



Şekil 2 Biyofabrikasyon süreci [7]



Şekil 3 Stereolitografi tekniğinin işlem süreci [8]

## II. Materyal/Metod

### 2.1. Materyal

#### 2.1.1. PEGDA Hazırlanması

PEGDA (Polyethylene Glycol Diacrylate: Type A:M<sub>n</sub> 700) Sigma-Aldrich şirketinden edinildi ve 30% oranında sulandırıldı. 0.5% photoinitiator hazırlandı ve sulandırılmış PEGDA ile kullanıldı.

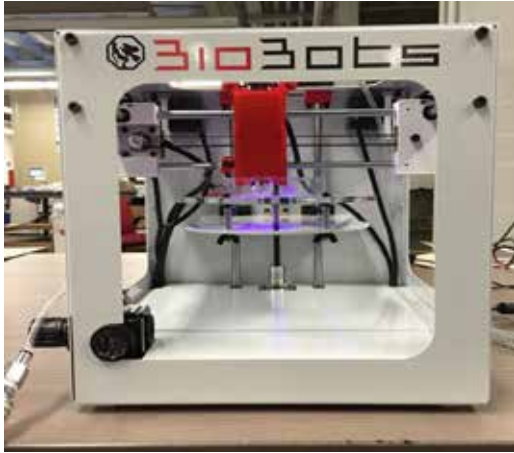
#### 2.1.2. PEGDA-GELMA Karışımı Hazırlığı

GelMA Hosseini *et al.* [9] 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 süzölmüştür. Akabinde bir hafta süre ile liyofize edilmiştir.

#### 2.1.3. 3D Yazıcı



Fig. 4 Formlabs 1+ 3D Yazıcı [10]



**Şekil 5** Biobots Biyoyazıcı [11]

FormLabs Form 1+ üç boyutlu yazıcısı stereolitografi adı verilen bir teknoloji kullanmaktadır. 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 ultraviyole lazer ışını cam olan rezervuar tankın altından sıvı reçineye ulaşmakta, buradan geçerek yazıcı başlığına ulaşmaktadır. Ultraviyole 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 [12].

#### 2.1.4. Biyobaskılama

Biyoyazıcılar plastik materyalleri kullanan küçük ve ekonomik üç boyutlu yazıcılardan ilham alınarak oluşturulmuştur.

Ancak BioBots 3D biyoyazıcı plastik yerine biyomalzemeler ve yaşayan hücrelerle birleştirilmiş özel bir mürekkep kullanarak 3D yaşayan doku ve organ üretmeyi amaçlamaktadır. Biyoyazıcıların hali hazırda hala ilaç testleri gibi deneysel amaçlarla kullanılmaktadır. Böylelikle hayvan testlerinin sona ermesi hedeflenmektedir. Biyobaskılama yakın zamanlı hedef olarak kişiye özel ilaç üretimi geliştirilmesinde uzun zamanlı hedef olarak ise kişilerin kendi hücrelerinden yapılmış organların üretilmesinde fayda sağlayabilir [13].

#### 2.1.5. Hücre Kültürü

Fare fibroblast hücreleri (NIH-3T3) DMEM, 10% (v/v) FBS ile 5% CO<sub>2</sub> atmosfer basıncı altında 37°C ve 1% (v/v) P/S ile kültür edilmiştir. Hücre mediası uzun inkübasyon süreci nedeni ile her üç günde bir taze media ile değiştirilmiştir. Hücreler 70-80% konfluans ile 0.25% (w/v) trypsin/0.1% (w/v) EDTA kullanılarak toplanmış ve deneyler için kullanılmıştır.

#### 2.1.6. PEGDA-GELMA Karışımında Hücre Süspansiyonu Hazırlanması

Hücre yüklü yapıların oluşturulabilmesi için Pegda:GelMA (1.5%:10% w/v) ve 0.5% (w/v) photoinitiator hazırlanmıştır. Akabinde oluşturulan hidrojel içerisinde hücre kültürü gerçekleştirilmiş, trypsin ile muamele edildikten ve hücre mediasında bir süre bekletildikten sonra 2-5×10<sup>6</sup> cells mL<sup>-1</sup> konfluans ulaşması sağlanmıştır. Son olarak hücre yüklü hidrojel yapılar stereolitografi için özel olarak tasarlanmış rezervuara yerleştirilmiş ve cihazın UV ışınlarına maruz kalması ve arzulanan modelde kalp kapakçığı olması temin edilmeye çalışılmıştır. Model üretildikten sonra da hücre çoğalması ve bağlanmasının temin edilebilmesi maksadı ile inkubatörde 2-3 gün bekletilmiştir.

#### 2.1.7. Mikroskop Analizi

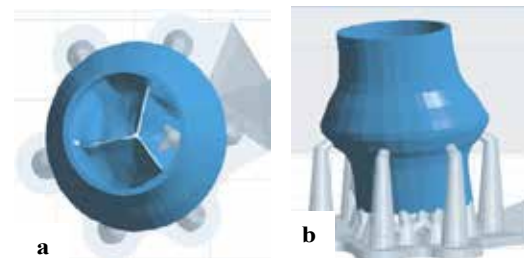
Mikroskop görüntüleri Zeiss Axio Vert.A1 inverted mikroskop ve inverted Nikon Eclipse Ti mikroskop aracılığı ile elde edilmiştir. Mikroskopa bağlı bir CCD kamera görüntüleri kaydetmek için kullanılmıştır.

#### 2.2. Deney

Şekil 3'de açıklandığı gibi BT görüntüsü stereolitografi amacı ile kullanılabilir. Ancak kalp kapakçıkları hastaları için yüksek çözünürlükte kalp kapakçığı görüntüsü elde etmek kolay değildir. Bu nedenle bu çalışma da hali hazırda üretilmiş olan 3D CAM kalp kapakçığı modelleri kullanılmıştır.

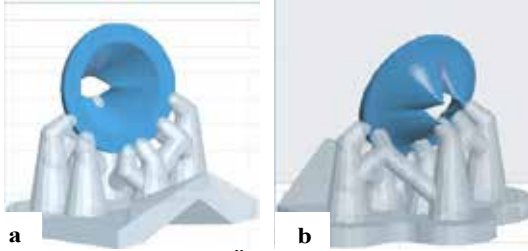
Bu çalışma esnasında iki tür kalp kapakçığı kullanılmıştır. Versiyon 1 Şekil 6'da gösterilmiştir. Bu görüntüde aort damarı da kalp kapakçığına eklenmiştir. Bu görüntü kan akışının etkin bir biçimde incelenmesi içinde kullanılacaktır. Versiyon 2 Şekil 7'da sergilenmiştir. Bu modelde yapay kalp kapakçığının merkezinde bulunan boşluk daha belirgindir. Bu damar yapısından bağımsız olarak kalp kapakçığının biyomekanik özelliklerini anlamamızda bize fayda temine debilir. Bu model daha ziyade gelecek çalışmalarda kalp kapakçığının bizatihi kendisinin biyomekanik özelliklerinin incelenebilmesi amacıyla kullanılmıştır.

#### 2.2.1. Kalp Kapakçığı Tasarımları



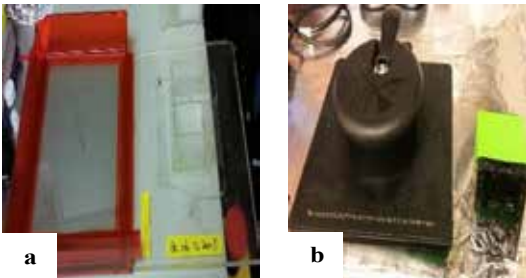
**Şekil 6** Versiyon 1 a) Üstten b) Önden görünüş.

Bu versiyonda kalp kapakçığı ile birlikte aort damarı da kısmen modellenmiştir.

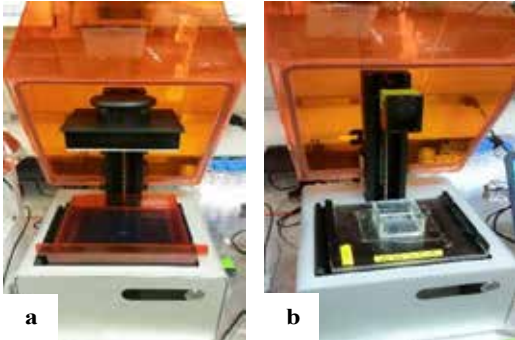


Şekil 7 Versiyon 2. Üç yapraklı kalp kapakçığı modeli a) Önden b) Arkadan görünüş

### 2.2.2. 3D Yazıcının Biyoyazıcı olarak tasarlanması



Şekil 8 a) Yazıcı başlıkları. Soldaki Formlabs 1+ orijinal yazıcı başlığı sağdaki ise biyoyazıcı olması için yeniden tasarlanmış yazıcı başlığı b) Rezervuar. Soldaki orijinal Formlabs 1+ rezervuarı, sağdaki biyoyazıcı olarak kullanılacak yeniden tasarlanmış rezervuar.



Şekil 9 a) Formlab Form 1+ 3D Yazıcı orijinal tasarım b) Biyoyazıcı olarak yeniden uyarlanmış tasarlanmış

Formlab Form 1+, üç boyutlu yazıcılık 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 8 ve Şekil 9.'da gösterilmiştir.

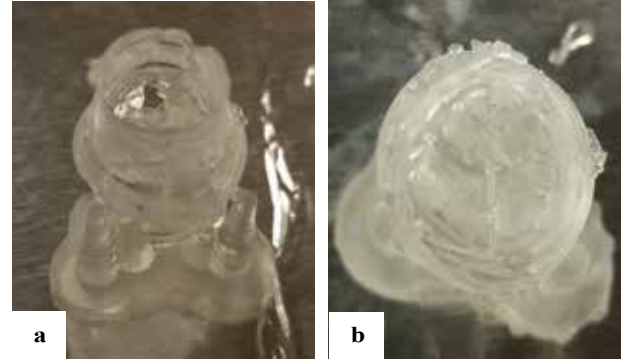
## III. DENEY SONUÇLARI

### 3.1. REÇİNE PERFORMANSI

Şekil 10a'da Şekil 6'da versiyon 1 olarak gösterilen yapay kalp kapakçığı Formlabs Form 1+ 3D yazıcı tarafından reçine kullanılarak üretilmiştir. Şekil 10a'da üretilmiş olan yapay kalp kapakçığı yazıcı başlığına tutunmasına ve yapısal bütünlüğünü korumasını sağlayan desteklerle

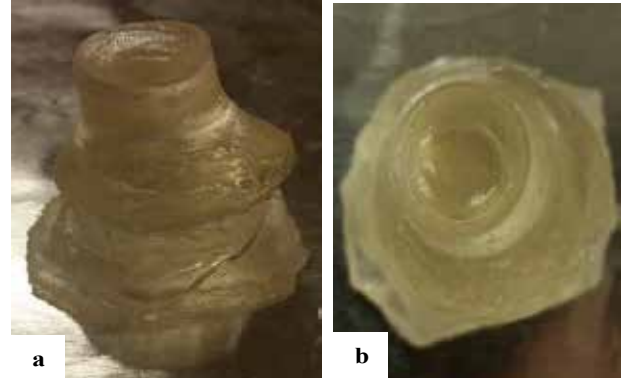
birlikte fotoğraflanmıştır. Bu destekler Şekil 6'da gri parçalar olarak gösterilmiştir.

Üretilen yapı genel olarak başarılıdır ve stereolitografi sisteminin yüksek hassasiyetini ve başarısını kanıtlamaktadır. Kalp kapakçığının boyutu x düzleminde

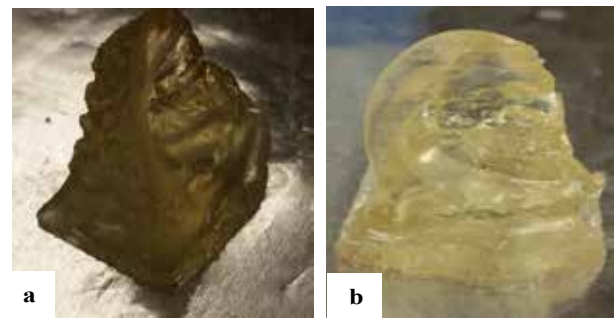


Şekil 10 a) Kalp kapakçığının önden görünüşü, b) Kalp kapakçığının yukarıdan görünüşü

### 3.2. PEGDA PERFORMANSI



Şekil 11 a) Önden görünüş b) Yukarıdan görünüş



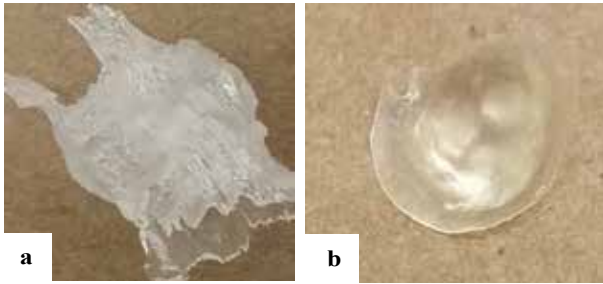
Şekil 12 a) Yandan görünüş b) Önden görünüş

Şekil 11'de Şekil 6'da gösterilen versiyon 1 kalp kapakçığı üretilmiştir. Bu amaçla PEGDA (Polyethylene Glycol Diacrylate: Type A:  $M_n$  7009) kullanılmıştır. Yapısal bütünlük olarak reçine den daha az verimlidir ancak yine de uygundur. En önemli sorun kan akışının geçişi için gerekli olan boşluk oluşturulamamıştır. Bu üretim sonrasında çeşitli kesiciler aracılığı ile oluşturulmuştur. Aynı problem Şekil 7'de gösterilen versiyon 2 kalp kapakçığı için de ortaya çıkmıştır. Bu

modellerde Formlabs Form 1+ 3D Yazıcı aracılığı ile baskılanmıştır.

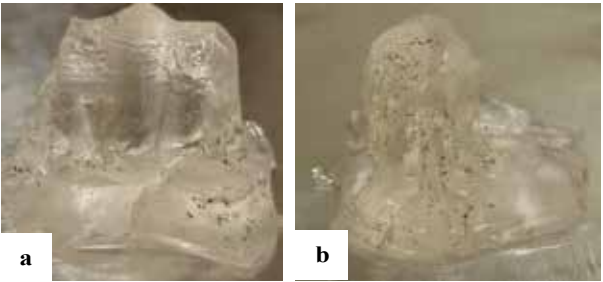
### 3.3. BİYOYAZICI İÇİN PEGDA PERFORMANSI

Şekil 12'de versiyon 1 ve versiyon 2 kalp kapakçıkları Biobots Biyoyazıcı aracılığı ile üretilmiştir. Kan akışı için gerekli olan boşluğun basılamamış olması gibi belli başlı bazı baskı hataları mevcut olsa da temel olarak bir fabrikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 13 a) Versiyon 1 b) Versiyon 2

### 3.4. GELMA-PEGDA KARIŞIMI PERFORMANSI



Şekil 14 a) Yandangörünüş b) Önden görünüş

Şekil 14'te GELMA ve PEGDA karışımı stereolitografi aracılığı ile basılmıştır. Yapısal bütünlük GELMA'nın sahip olduğu düşük mekanik özellikler sebebiyle azalmıştır. GELMA'nın burada kullanılma nedeni yüksek biyoyumumluluğa sahip olması ve hücrelerin çoğalabilmesi için elverişli bir ortama sahip olmasıdır. Tek başına PEGDA'nın biyoyumumluluğu 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.

## IV. SONUÇ

Çalışmada karşılaşılan en ciddi sorun baskı esnasında karşımıza çıkan üretime dair yapısal hatalardır. Özellikle biyoyumumluluğu yüksek olan malzemeler stereolitografinin şiddeti düşük olan ultraviyole ışını altında yeteri kadar sertleşmemekte, bu nedenle de yapısal bütünlüğünü yeteri kadar koruyamamaktadır. Bu sorun temel olarak kan akışının geçmesi için gerekli olan boşluğun üretilmemesi gibi bazı sorunlar yaratmaktadır. Ancak bu sorun da üretilen kalp kapakçığında çeşitli kesiciler yardımıyla ihtiyaç duyulan boşluğun

oluşturulması ile aşılmıştır. Yine de süreç kusursuzlaştırmak üzere optimize edilmelidir.

## V. GELECEK ÇALIŞMALAR

Bu çalışmadaki temel strateji stereolitografi metodu ile yapısal bütünlüğe sahip biyoyumumluluğu olan yapay kalp kapakçıkları üretmektir. Gelecek çalışmalar olarak üretilmiş olan bu yapay kalp kapakçıklarında biyomekanik testler gerçekleştirilebilir. Çekme ve gerilme testleri, esneme testleri gerçekleştirilebilir. Elde edilecek olan sonuçlar mekanik kalp kapakçıklarının biyomekanik sonuçları ile kıyaslanabilir ve böylelikle üretim süreçleri zaman içerisinde tekrar tekrar optimize edilerek çalışma geliştirilebilir.

## KAYNAKLAR

- [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. <http://www.organdonor.gov/about/data.html>
- [2] Driessen, J.V.C., Mol, A., Bouten, C.V.C., Baaijens, F.P.T., 2007., Modeling the mechanics of tissue engineered human heart valve leaflets. *J. Biomech.* 40, 325-334.
- [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., 2007. The role of collagen cross links in biomechanical behaviour of human aortic heart valve leaflets – relevance for tissue engineering. *Tissue Eng.* 13, 1501-1511.
- [4] Engelmayer, G.C., Rabkin, E., Sutherland, F.W.H., Schoen, F.J., Mayer, J.E., Sacks, M.S., 2005. The independent role of cyclic flexure in the early in vitro development of an engineered heart valve tissue. *Biomaterials* 26, 175-187.
- [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., 2000a. Early in vivo experience with tissue engineered trileaflet heart valves. *Circulation* 102, 22-29.
- [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., 2000. Functional living trileaflet heart valves grown in vitro. *Circulation* 102, 44-49.
- [7] Bajaj, P., Schweller, R.M., Khademhosseini, A., West, J.L., Bashir, R. 2014. 3D biofabrication strategies for tissue engineering and regenerative medicine. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 16: 247-76.
- [8] Sodian, R., Loebe M., Hein, A., Martin, D.P., Hoerstrup S. 2002. Application of stereolithography for scaffold fabrication for tissue engineered heart valves. *ASAIO Journal* 48: 12-16.
- [9] Hosseini, V., Ahadian, S., Ostrovidov, S., Camci-Unal, G., Chen, S., Kaji, H., Khademhosseini, A. (2012). Engineered contractile skeletal muscle tissue on a microgrooved methacrylated gelatin substrate. *Tissue Engineering Part A*, 18(23-24), 2453-2465
- [10] [33] Reichelt Elektronik, (2016, March 23) Retrieved from <https://www.reichelt.nl/>
- [11] Biobots, (2016, March 23) Retrieved from <http://biobotsprinters.tumblr.com/>
- [12] Cnet, (2016, March 23) Retrieved from <http://www.cnet.com/products/formlabs-form-2-3d-printer/>
- [13] Techcrunch, (2016, March 23) Retrieved from <http://techcrunch.com/2015/05/04/biobots-is-a-3d-printer-for-living-cells/>