

TEKNOFEST

HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ FESTİVALİ

BİYOTEKNOLOJİ İNOVASYON YARIŞMASI

PROJE DETAY RAPORU

TAKIM ADI

CollBio

PROJE ADI

EKSTRÜZYON BAZLI 3B BİYOYAZICILAR İÇİN KOLAJEN

BAZLI BİYOMÜREKKEP FORMÜLASYONU

BAŞVURU ID

#83315

KATEGORİ

BİYOTEKNOLOJİ İNOVASYON YARIŞMASI

İçindekiler

Proje Özeti (Proje Tanımı)	1
Problem/Sorun	1-2
Çözüm/önerisi	2
Yöntem	3-4-5
Yenilikçi(inovatif)yönü	5
Uygulanabilirlik	6
Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması	6
Proje Fikrinin Hedef Kitlesi (Kullanıcılar):	7
Riskler	7
Proje Ekibi	7
Kaynaklar	8-9



1. Proje Özeti (Proje Tanımı)

3b Biyoyazıcı araştırmaları, uygun maliyetli yazıcıların icadından bu yana büyümüştür. Birçok bioink formülasyonu tasarlanmıştır, ancak bunların çoğu farklı uygulamalar için etkili özellikler sağlayamayabilir. Etkili biyomürekkepler oluşturmak için, 3b Biyoyazıcı tekniğine bağlı olarak basılabilirlik, mekanik dayanıklılık, biyoyumluluk, baskı sonrası değişiklikler gibi belirli özellikleri karşılamaları gerekir. Temel olarak, ekstrüzyon tabanlı biyoyazıcılar, iyi baskı yetenekleri, yüksek hücre canlılığı ve yoğunluğu, çoklu biyomateryal uygulamaları için kullanılabilirliği ve kullanımı kolay özellikleri nedeniyle araştırmacılar arasında kullanılmaktadır. Uygun biyomürekkeplerin canlı hücrelere uyum sağlaması için baskı sonrası yüksek biyoyumluluk, mekanik stabilite gibi bazı özellikleri sağlaması gerekir. Hidrojeller, canlı hücreleri, değiştirilebilir kimyasal yapıları, ayarlanabilir mekanik ve biyolojik bozunma özelliklerini ve baskı sırasında iyi çözünürlüğü mükemmel şekilde korur. Mükemmel basılabilirlik özellikleri sağlamadıkları için çoğu durumda farklı hidrojellerin veya biyomalzemelerin karışık kullanımı gerekir. En çok kullanılan doğal hidrojeller Kolajen Tip 1, Aljinat, Fibrin ve agaroz kullanılarak üretilir. Kolajen, ECM yapısında en bol bulunan proteindir. Kolajenin jelleşme özelliğinin olmaması nedeniyle biyomürekkep oluşturmak için kolajenin diğer hidrojellerle hibrit kullanımı tercih edilir. Bunu başarmak için, farklı konsantrasyon seviyelerindeki malzemeler, ekstrüzyon tabanlı bir biyoyazıcı olan Cellink Inkredible+ Biyoyazıcı ile biyomürekkep olarak karıştırılacak ve test edilecektir. Üretilen biyomürekkepler jelleşme kapasiteleri (doku analizi), viskozite (viskozimetre), mekanik mukavemet (Dinamik Mekanik Analiz) ve gözeneklilik (atomik kuvvet mikroskobu) açısından test edilecektir.

2. Problem/Sorun

3 boyutlu Biyoyazıcı teknolojisi, klasik 3 boyutlu yazıcı teknolojisi ile; hücre, biyomalzeme ve hücresel faktörlerin birleştirilmesi ile ortaya çıkmış, doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanında yenilikçi bir tekniktir.(Cui vd., 2020) Genellikle 3B biyoyazıcıların çalışma mantığı genel 3B yazıcılarla aynıdır. Günümüzde 3 boyutlu Biyoyazıcı teknolojisi, doku mühendisliği ürünleri ile hücre iskeleleri üretiminde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir.(Guvendiren vd., 2016) Hücre ve biyomalzeme karışımından elde edilen biyomürekkepler de 3B biyoyazıcılar kullanılarak hücre iskeleleri üretiminde kullanılmaktadır. 3B Biyoyazıcı teknolojisi, hücre iskeleleri üretmedeki başarisından dolayı doku mühendisliğinde aktif olarak kullanılmaktadır.(Derakhshanfar vd., 2018) Farklı polimer çeşitleri ve biyomalzemeler biyomürekkep yapımında kullanılmaktadır.(Marques, 2019) Kolajen, aljinat ve polietilen glikol (PEG) bu biyomürekkep bileşenlerinden bazılarıdır. Her biyomürekkep karışımının çeşitli hücre türleri için özel avantajları ve dezavantajları vardır.(Gungor-Ozkerim vd., 2018) Kolajen farklı dokularda bulunun toplam proteinin %30'unu oluşturan, hücre dışı matris ve çeşitli baę dokularda, hücreler ve organlarda önemli rol oynayan bir proteindir.(Simões vd., 2014)

Özellikle ekstrüzyon bazlı 3B biyoyazıcılar için ülkemizdeki araştırmacılar ihtiyaç duydukları biyomürekkebi genellikle ya yurtdışından temin etmeye ya da kendilerini üretmeye çalışmaktadır. Yurtdışından teminde hem döviz kaybı hem de yüksek maliyet söz konusudur. Kendileri ürettiğinde ise standardize bir ürün kullanılmadığı için, verilerde güvensizliğe ve deneylerde tekrarlanabilirlik sorununa yol açmaktadır.

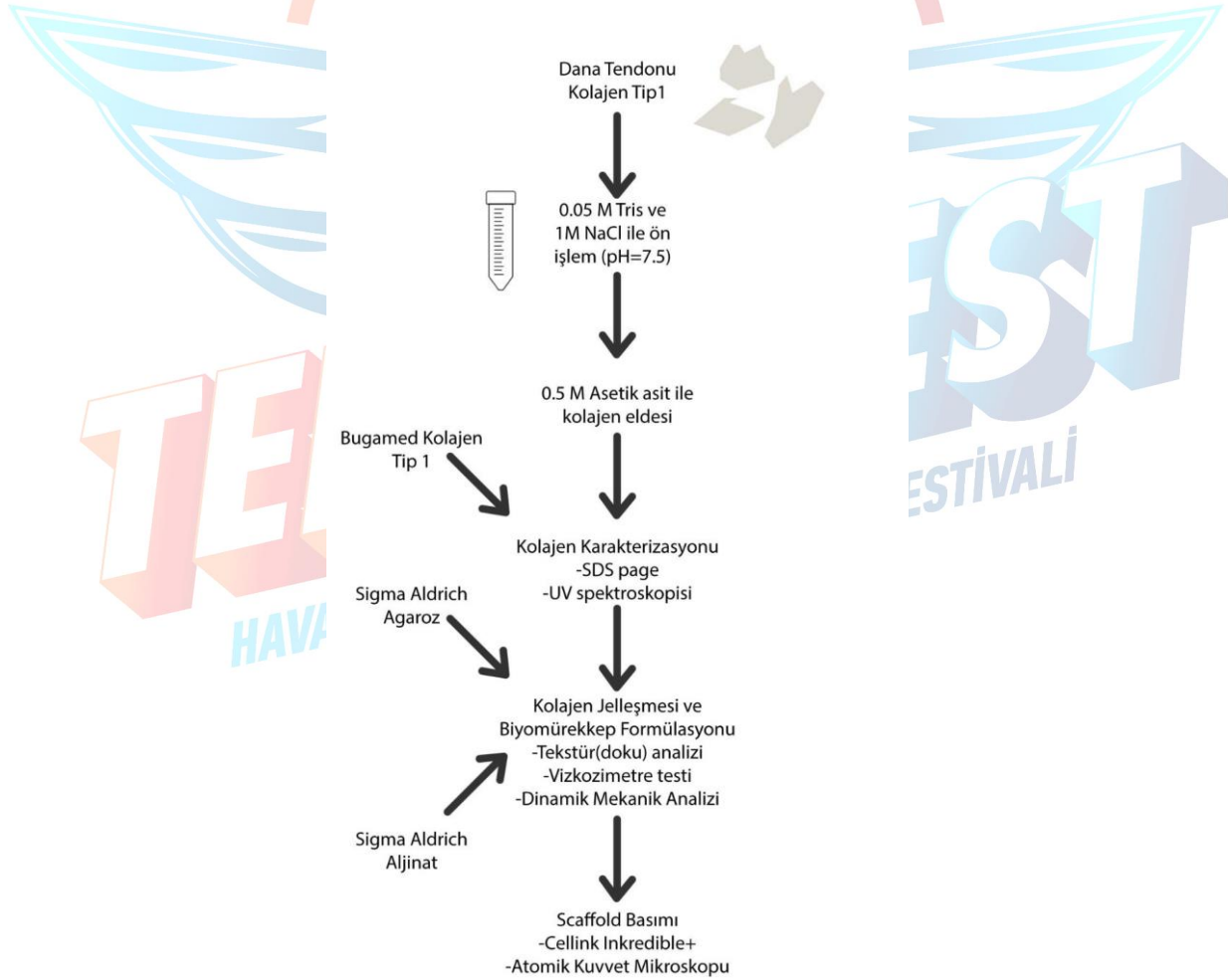
Başta doku ve organ modellemeleri olmak üzere 3B Biyoyazıcı teknolojisinin geniş kullanım alanları vardır. Ayrıca bu doku ve organ modellemeleri, hayvan deneylerinin yerini almaya adaydır. 3B Biyoyazıcı teknolojisinin kullanıldığı alanlara göre özel ve farklı biyomürekkep formülasyonuna ihtiyaç vardır.(Cui vd., 2020) Bu projede, insan vücudundaki proteinlerin önemli bir yüzdesini oluşturan kolajen, yüksek biyo-uyumluluk ve mekanik özellikleri nedeniyle biyomürekkep üretimi için ana malzeme olarak kullanılacaktır. Biyomürekkep üretimi için sadece kolajen kullanıldığında, elde edilen biyomürekkep jelleşme kapasitesi bakımından zayıf olacaktır. Kolajenle beraber aljinat, jelatin ve agaroz kullanımının hem bu problemi çözdüğü hem de basılabilirlik açısından büyük avantaj sağladığı ve ekstraselüler matriks (ECM) benzeri yapısı nedeniyle hücre uyum ve canlılığını arttırdığı kaydedilmiştir. (Marques, 2019)

3. Çözüm/önerisi

3b Biyoyazıcı teknolojisinin birçok kullanım alanı vardır. En popüler alanlar doku mühendisliği, ilaç iletimi ve hastalık-doku-organ modellemesidir. Her doku, farklı türde bir biyomürekkep formülasyonuna ihtiyaç duyabilir. Çok alanlı kullanım için, genellikle biyoyumluluk özelliklerinden dolayı hidrojeller (doğal polimerler) kullanılır. Bu projede, insan vücudunda en çok bulunan proteinlerden olan kolajen, mekanik özellikleri ve biyoyumluluğu nedeniyle biyomürekkep tasarımının ana kaynağı olarak seçilmiştir. Kolajen bazlı biyomürekkepler veya sadece kolajen biyomürekkepler jelleşme özelliklerinden yoksundur, ancak jelatin ve aljinat gibi karıştırma ajanları ile kolajenin hibrit kullanımı, mekanik yapıları nedeniyle bu sorunu basılabilirliğe uygunluğu ile çözebilir. Kolajen ile birlikte en çok kullanılan malzemeler agaroz, aljinat ve fibrindir. Bu noktada yapmış olduğumuz literatür taramalarımız sonucu agaroz-aljinat ve kolajenin birlikte kullanıldığı biyomürekkepler rastlanılmamış ve bu üçlünün kombinasyonlarının biyomalzeme yapısını biyomürekkepler için gerekli olan özellikleri sağlayabileceği öngörülmüştür. Ayrıca, kolajen bazlı biyomürekkep formülasyonu için atık olarak görülen maddelerin kullanılması, dünyanın istenmeyen ürünleri katma değerli bir şekilde uzaklaştırmasına yardımcı olabilir. Son yıllarda gündemde olan hayvan deneylerinin sonlandırılması için gerekli deney ortamı bu biyomürekkepler ile üretilen ortamlar ile sağlanabilmektedir. Her biyomürekkebin kendine has avantaj ve dezavantajları olması göz önünde bulundurularak en uygun formülasyonu bulmak üzere çalışacağız. Özetlemek gerekirse, birden fazla doku için çeşitliliğe sahip olmak, hem hücrelerin yaşaması için gereken uygun ortamı oluşturmak hem de fiziksel ve mekanik özelliklere sahip olmak ve geri dönüştürülebilir malzemelerin kullanımı bu projenin çözümü için üzerinde duracağımız ana değerlerdir.

4. Yöntem

Kolajen eldesinde sıklıkla kullanılmakta olan 3 yöntem vardır. Bunlar alkali, asidik ve enzimatik elde yöntemleridir (Schmidt vd., 2016). Literatürde sıklıkla dana tendonu için asidik elde yöntemi kullanılmış olup asit olarak asetik asit tercih edilmiştir (Nocera vd., 2018; Parenteau-Bareil vd., 2010; Sheehy vd., 2018; Yulianti vd., 2018). Bu projede de asetik asit ile dana tendonundan kolajen eldesi planlanmaktadır. Kolajen eldesinden sonra kolajen karakterizasyonu ile elde edilen kolajenin tipinin belirlenmesi ve saflık testi gerçekleştirilecektir. Bu aşamada referans olarak Bugamed firmasından kolajen tip 1 satın alınması planlanmaktadır. Bu referans kolajen ve SDS-Page tekniği kullanılarak kolajen saflık ve molekül ağırlığı belirlenecektir. Ardından UV spektroskopisi kullanılarak kolajen eldesinin verimi test edilecektir. Elde edilen kolajenin gerekli değerleri sağlaması halinde kolajenin jelleşmesi için farklı oranlarda agaroz ve aljinat ile birleştirilecektir. Karışım hidrojelin jelleşme kapasitesi tekstür analiz cihazı ile, viskozitesi vizkozimetre ile ve mekanik dayanım dinamik mekanik analizci ile test edilecektir. Son aşamada ise üretilen biyomürekkep Cellink Inkredible+ Biyoyazıcı ile basılarak scaffold formasyonu oluşturulacaktır. Daha sonrasında oluşan scaffold'un gözenekliliği atomik kuvvet mikroskopu ile test edilerek çalışmanın sonuçları derlenecektir.



Şekil 1(Proje Deney Akış Şeması)

1. Dana Tendonundan Kolajen Eldesi

Yöntem, (Nocera vd., 2018; Wahyuningsih vd., 2018) makaleleri kullanılarak elde edildi.

- I. Et, yerel bir kasaptan elde edilmiş ve tendon olmayan kısımlarından ayrılmıştır.
- II. Elde edilen sığır tendonu küçük parçalara (0,5 cm) bölünür.
- III. Deiyonize su ile 48 saat manyetik karıştırıcıda ve 4C'de yıkanır. Bu aşamada deiyonize su günde 5 kez, toplamda 10 kez değiştirilir. (1 gr tendon / 10 ml dH₂O)
- IV. Ön işlem olarak, kolajeni yıkamak için 0,05 M TRIS ve 1M NaCl (pH 7,5) kimyasalları kullanılır. Yıkama 4°C'de 48 saat manyetik karıştırıcıda gerçekleştirilir ve çözelti günde iki kez değiştirilir.
- V. Tendonu eritmek için 48 saat boyunca 0,5 M asetik asit uygulanır.
- VI. Çözelti 10.000 x g'de 30 dakika santrifüj edilir.
- VII. Daha sonra süpernatant 3M NaCl'ye eklenir.
- VIII. Çözelti 10,000 x g'de 30 dakika santrifüjlenir, 24 saat sonra pellet çıkarılır ve 0,5 M asetik asit içinde çözülür.
- IX. 0.5 M asetik asit içeren solüsyon ile 1-0.5 M asetik asit içeren diyaliz membranı eklenerek diyaliz edilir.
- X. Uzun süreli saklama için kolajen numuneleri liyofilize edilir ve -20C'ye konur.

2. Kolajen Karakterizasyonu

2.1 SDS-Page (saflik testi ve moleküler ağırlık tayini için) (Nocera vd., 2018)

- I. %4 Stacking jeli ve %10 çözme jeli hazırlanır.
- II. Liyofilize kolajen 0.1 M asetik asit içinde çözülür ve 1:1 numune tampon çözeltisi ile birleştirilir.
- III. İlk kuyudaki protein markörü ile numuneler diğer kuyucuklara yüklenir.
- IV. Elektroforez işlemi 100V'de 4 saat boyunca gerçekleştirilir.
- V. Daha sonra jel %50 (h/h) metanol ve %10 asetik asit ile 30 dakika muamele edilerek sabitlenir.
- VI. Jel boyama %0.05 (w/v) Coomassie blue R-250 boyası ile %15 (v/v) metanol ve %5 (h/v) asetik asit içinde 3 saat süreyle gerçekleştirilir.
- VII. Ardından jel %30 (h/h) metanol ve %10 (h/v) asetik asit ile yıkanır ve VILBER Infinity ile analiz edilir.

2.2 UV Görünür Spektroskopi (verim testi için) (Üreticinin talimatlarına göre gerçekleştirilir.)

3. Ekstrakte Kollajenlerin Jelleşmesi ve Bioink Formülasyonu

Kolajen tip 1'in jelleşmesi için diğer doğal hidrojeller (agaroz, aljinat) konsantrasyon oranlarına göre karıştırılarak jelleşme sağlanır. Daha sonra karışık hidrojeller tekstür analizörü (jelasyon kapasitesi), viskozimetre (viskozite) ve Dinamik Mekanik Analizör (mekanik mukavemet) ile test edilecektir. Genellikle, ekstrüzyona dayalı biyoyazıcılar 30 ila 6×10^7 mPa·s arasında viskozite ister ve shear rateleri $<10^3$ s⁻¹ ve $>10^2$.s⁻¹ arasında olmalıdır. (Deo et al., 2020)

4. Hücre İskelesinin 3b Biyoyazıcı ile Basımı

Hücre ve doku tipine göre 3b baskılı materyalin şekli belirlenir. 3b biyoyazıcılar, yapı iskeleleri, damarlar, kıkırdak dokular, kulak ve burun gibi taklit edilen ortamları basma yeteneğine sahiptir.

- I. 3 boyutlu tasarım programları kullanılarak, 3 boyutlu gözenekli yapı iskeleleri STL formatında tasarlanır ve kaydedilir.(Cui vd., 2020; Dinescu vd., 2019; Guvendiren vd., 2016)
- II. 3B yapı iskelesini içeren STL dosyası bir biyoyazıcı ile yazdırılır.
- III. Baskıdan sonra çapraz bağlama ajanı veya ajanları iskeleye eklenir.
- IV. Çapraz bağlanmak için 5 dakika boyunca UV ışığının ($\lambda = 365 \text{ nm}$) altına yerleştirilen 3b yapı iskelesi.
- V. Son olarak, 3b baskılı iskele, hücre kültürü ve doku mühendisliği uygulamalarında kullanıma hazırdır.

5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü

3 boyutlu biyoyazıcı teknolojisi, klasik 3 boyutlu yazıcı teknolojisi ile; hücre, biyomalzeme ve hücresel faktörlerin birleştirilmesi ile ortaya çıkmış, doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanında yenilikçi bir tekniktir (Cui vd., 2020). Günümüzde 3 boyutlu biyoyazıcı teknolojisi, doku mühendisliği ürünleri ile hücre iskeleleri üretiminde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Guvendiren vd., 2016) Bu yöntemin etkili bir şekilde uygulanabilmesi için belirli özelliklere sahip biyomürekkeplerin kullanılması esastır. Bu özellikler basılabilirlik, mekanik dayanım, biyouyumluluk ve baskı sonrası modifikasyonlara elverişlilik (Ji & Guvendiren, 2017). Özellikle hidrojeller belirli seviyelerde bu özellikleri karşılayabilmekte fakat tek başlarına kullanımda yeterli gelmemektedirler(Hospodiuk vd., 2017). Bundan dolayı iki farklı biyomalzemenin (örn; kolajen ve agaroz) hibrit kullanımına sıkça başvurulmaktadır. Fakat halen istenilen seviyelerde başarı elde edilemediği için biyomürekkep araştırmaları ve geliştirmeli özellikle son 5 yılda hız kazanmıştır. Burada ortaya çıkan biyouyumluluk, basılabilirlik, mekanik dayanım ve hücre uyumluluğu problemleri 3B biyoyazıcıların ve bağlantılı olarak biyoteknoloji araştırmaların en büyük sorunudur. Bu sorunu çözüm bulmak ve ek olarak kolajenin jelleşme kapasitesini arttırmak için üçlü biyomalzeme kullanılması literatür taramalarımızda rastlanılmamış ve yapılabilirlik konusunda bizlere olumlu sinyaller vermiştir. Ayrıca biyomürekkepler ülkemiz dışında üretildiği ve yerli bir muadilinin olmaması nedeniyle ülkemizde de atık olarak görülen sığır tendonundan üretilen kolajen kaynaklı bir biyomürekkep ile atık maddelerin katma değere kazandırılması ile ülkemizde biyobasılabilirlik ve biyouyumluluğu olan verimli bir ürünün üretimi ilklerden olacaktır.

6. Uygulanabilirlik

Küresel 3b biyoyazıcı pazarının değeri 2019'da 586,13 milyon ABD Doları olduğu ve 2025 yılına kadar 1949,94 milyon ABD Dolarına ulaşması beklendiği pazar analizlerinde ve kitap bölümlerinde belirtiliyor. 3b biyoyazıcı pazarının sağlık ve ilaç endüstrilerinde büyüme göstermesi bekleniyor.(ltd, t.y.; Ozbolat, 2016; Soloman, t.y.)

Bu anlamda yapılan literatür araştırmalarımız ile projenin bilimsel prensiplere uygun olduğu ve günümüzde Teknoloji Hazırlık Seviyesi 2. Aşamada (THS2) olduğunu, bu yarışma ile gerekli desteklerden faydalandıktan sonra laboratuvar ortamında oluşturulacak bir prototip ile THS5 seviyesine kadar varılması ve başarılı olunması halinde diğer destek programlarından da başvurulara açık bir proje olduğunun farkındayız. Bu destekler neticesinde proje patentlenebilir ticari bir ürüne dönüşebilecek ve yukarıda bahsedilen yurtiçi ve yurt dışı pazarlara satışı sağlanarak döviz girişi ülke adına sağlanabilir.

7. Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması

Tahmini Maliyet Tablosu		
Ürün adı	Kullanım amacı	Fiyatı
Sodyum Aljnat	Biyomürekkep formülasyonunda hammadde olarak	₺ 50,00
Kolajen	Biyomürekkep formülasyonunda hammadde ve kıyaslama aracı olarak	₺ 1.300,00
Tris	Kolajen eldesi sırasında kullanılacaktır	₺ 550,00
SDS kit	SDS deneylerinde kullanılacaktır	₺ 800,00
NaCl	Kolajen eldesi sırasında kullanılacaktır	₺ 30,00
Agaroz	Biyomürekkep formülasyonunda hammadde olarak	₺ 1.300,00
Toplam		₺ 4.030,00

Tahmini Proje Zaman Planlaması			
	26.Tem.21	26.Ağu.21	21.Eyl.21
Kolajen eldesi ve SDS deneyleri			
Biyomürekkep formülasyonunun belirlenip, belirlenen formülasyona göre biyomürekkebin üretilmesi			
Üretilen biyomürekkebin basılabilirlik testlerinin yapılması ve diğer biyomürekkeplerle kıyaslanması			

Yukarıda tahmini proje maliyet tablosu ve zaman planlaması görülmektedir. Cellink firması ürettiği 30 ml biyomürekkep 841 dolara (16.06.2021 tarihindeki kurla yaklaşık 7.200 ₺) satılmaktadır. Üretilmesi planlanan biyomürekkep bu açıdan bakıldığında maliyet açısından da avantajlıdır.

8. Proje Fikrinin Hedef Kitle (Kullanıcılar):

Birincil potansiyel kullanıcı kitlesi olarak biyomalzeme alanında araştırma-geliştirme yapan kuruluşlar yer alacaktır. Bunlar 3B Biyoyazıcı teknolojisini kullanan üniversitelerin akademik birimleri, küçük ve orta ölçekli firmalar ile hayvan deneylerini ortadan kaldırmak için deri modeli üreten firma ve araştırma gruplarıdır.

Biyoteknoloji sektörü ARGE'ye vermiş olduğu önem ve yenilikçi yaklaşımları ile ön plana çıkmaktadır. Aynı şekilde biyomalzeme sektörü de hızla gelişen ve henüz tüm yenilikçiliğini sektöre aktaramamıştır. Bu yüzden sektörel oyuncuların az olduğu-rekabete açık ve arz talebinin yüksek olduğu bir sektör olarak ön plana çıkmaktadır.

9. Riskler

Kolajen eldesi aşamasının başarısızlıkla sonuçlanması (%30)

Protokolün çalışmaması durumunda alternatif protokollere başvurularak kolajen eldesi gerçekleştirilecektir.

Kolajen, Aljinat ve Agaroz materyallerinin birleşme oranlarının belirlenmesi (%30)

Kullanılacak olan materyallerin oranları literatür taramaları doğrultusunda belirli bir aralığa indirgenecek ve daha sonrasında bu aralıkta farklı birleşme oranları test edilerek optimal bir değer elde edilmeye çalışılacaktır.

Biyobasılabilirlik ve jelleşme kapasitesinin belirtilen aralıklarda olmaması

Bu durumda birleştirme oranları tekrar gözden geçirilerek yeni formülasyonlar üzerine çalışılacaktır.

10. Proje Ekibi

Adı Soyadı	Projedeki Görevi	Okul	Projeyle veya problemle ilgili tecrübesi
Eren Altınışık	Takım Lideri	İzmir Ekonomi Üniversitesi	Biyoyazıcıların kullanımı
Dr. Burçak Alp	Danışman	İzmir Ekonomi Üniversitesi	Polimerik Kolajen Biyomateryaller üzerine Patent sahibi
Tolga Danışmaz	Takım Üyesi	İzmir Ekonomi Üniversitesi	Kolajen üzerine yürütülen projeler
Mehmet Deniz Yelli	Takım Üyesi	İzmir Ekonomi Üniversitesi	Laboratuvar Teknikleri

11. Kaynaklar

- Cui, X., Li, J., Hartanto, Y., Durham, M., Tang, J., Zhang, H., Hooper, G., Lim, K., & Woodfield, T. (2020). Advances in Extrusion 3D Bioprinting: A Focus on Multicomponent Hydrogel-Based Bioinks. *Advanced Healthcare Materials*, 9(15), 1901648. <https://doi.org/10.1002/adhm.201901648>
- Derakhshanfar, S., Mbeleck, R., Xu, K., Zhang, X., Zhong, W., & Xing, M. (2018). 3D bioprinting for biomedical devices and tissue engineering: A review of recent trends and advances. *Bioactive Materials*, 3(2), 144-156. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.11.008>
- Dinescu, S., Albu Kaya, M., Chitoiu, L., Ignat, S., Kaya, D. A., & Costache, M. (2019). Collagen-Based Hydrogels and Their Applications for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. İçinde Md. I. H. Mondal (Ed.), *Cellulose-Based Superabsorbent Hydrogels* (ss. 1643-1664). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-77830-3_54
- Gungor-Ozkerim, P. S., Inci, I., Zhang, Y. S., Khademhosseini, A., & Dokmeci, M. R. (2018). Bioinks for 3D bioprinting: An overview. *Biomaterials Science*, 6(5), 915-946. <https://doi.org/10.1039/C7BM00765E>
- Guvendiren, M., Molde, J., Soares, R. M. D., & Kohn, J. (2016). Designing Biomaterials for 3D Printing. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2(10), 1679-1693. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.6b00121>
- Hospodiuk, M., Dey, M., Sosnoski, D., & Ozbolat, I. T. (2017). The bioink: A comprehensive review on bioprintable materials. *Biotechnology Advances*, 35(2), 217-239. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.12.006>
- Ji, S., & Guvendiren, M. (2017). Recent Advances in Bioink Design for 3D Bioprinting of Tissues and Organs. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2017.00023>
- ltd, R. and M. (t.y.). *3D Bioprinting Market—Growth, Trends and Forecasts (2020—2025)*. Geliş tarihi 16 Haziran 2021, gönderen <https://www.researchandmarkets.com/reports/4758250/3d-bioprinting-market-growth-trends-and>
- Marques, C. F. (2019). Collagen-based bioinks for hard tissue engineering applications: A comprehensive review. *Journal of Materials Science*, 12.
- Nocera, A. D., Comín, R., Salvatierra, N. A., & Cid, M. P. (2018). Development of 3D printed fibrillar collagen scaffold for tissue engineering. *Biomedical Microdevices*, 20(2), 26. <https://doi.org/10.1007/s10544-018-0270-z>
- Ozbolat, D. I. T. (2016). *3D Bioprinting: Fundamentals, Principles and Applications*. Academic Press.
- Parenteau-Bareil, R., Gauvin, R., & Berthod, F. (2010). Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications. *Materials*, 3(3), 1863-1887. <https://doi.org/10.3390/ma3031863>
- Schmidt, M. M., Dornelles, R. C. P., Mello, R. O., Kubota, E. H., Mazutti, M. A., Kempka, A. P., & Demiate, I. M. (2016). Collagen extraction process. *International Food Research Journal*, 23(3), 913-922.
- Sheehy, E. J., Cunniffe, G. M., & O'Brien, F. J. (2018). Collagen-based biomaterials for tissue regeneration and repair. İçinde *Peptides and Proteins as Biomaterials for Tissue*

Regeneration and Repair (ss. 127-150). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100803-4.00005-X>

Simões, G. S., Silveira, E. T. F., de Oliveira, S. R., Poleze, E., Allison, J. R. D., Ida, E. I., & Shimokomaki, M. (2014). Optimum conditions for extracting collagen from the tunica albuginea of immunologically castrated pig testes and the functional properties of the isolated collagen. *Meat Science*, 96(4), 1460-1468.

<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.10.038>

Soloman, D. S. (t.y.). *3D Bioprinting Revolution*. Khanna Publishing House.

Wahyuningsih, R., Nurliyani, R., Pertiwinigrum, A., Rohman, A., Fitriyanto, N. A., & Erwanto, Y. (2018). Optimization of Acid Soluble Collagen Extraction from Indonesian Local “Kacang” Goat Skin and Physico-Chemical Properties Characterization. *Chemical Engineering Transactions*, 63, 703-708. <https://doi.org/10.3303/CET1863118>

Yulianti, D., Harmita, & Rukmana, T. I. (2018). ISOLATION, PURIFICATION, AND CHARACTERIZATION OF BOVINE TENDON COLLAGEN AND ANALYSIS OF GLYCINE, PROLINE, AND HYDROXYPROLINE BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY-FLUORESCENCE. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 311-315. <https://doi.org/10.22159/ijap.2018.v10s1.69>

