



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

**Τεχνολογίες και Εφαρμογές Προσθετικής
Κατασκευής/3D Εκτύπωσης
Υπεύθυνος Καθηγητής: Σταμάτιος Ν. Πολύδωρας**

Εξαμηνιαία Εργασία

**3D εκτύπωση βιολογικών υλικών &
εφαρμογές: State of Art & Προοπτικές**

Καραβάς Ευάγγελος
Μανωλιάς Δημήτριος
Πατσούρας Νικόλαος Μάριος

Μάρτιος 2024

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η τεχνολογία της τρισδιάστατης (3D) εκτύπωσης βιολογικών υλικών αποτελεί έναν αναδυόμενο τομέα που συνδυάζει τη βιοτεχνολογία με την προηγμένη τεχνολογία εκτύπωσης. Αυτή η συνάντηση των δύο κλάδων έχει το δυναμικό να αλλάξει ριζικά τον τρόπο παραγωγής αντικειμένων και βιολογικών υλικών. Με τη διεύρυνση του φάσματος των εφαρμογών, από την ιατρική έως την επιστημονική έρευνα και τη βιομηχανία, η τεχνολογία αυτή επιφέρει μια πληθώρα προοπτικών και προκλήσεων. Στην παρούσα εργασία αναφέρουμε την τρέχουσα κατάσταση και τις μελλοντικές προοπτικές στον τομέα της 3D εκτύπωσης βιολογικών υλικών. Αρχικά, γίνεται αναφορά στη δημιουργία της τρισδιάστατης βιοεκτύπωσης και της σημαντικότητας της στον επιστημονικό κλάδο. Στη συνέχεια, γίνεται αναφορά σε διάφορους τρόπους τρισδιάστατης εκτύπωσης και υλικά τα οποία χρησιμοποιούνται. Επίσης, γίνεται σύγκριση των ειδών τρισδιάστατης εκτύπωσης και αναφορά σε εφαρμογές με βάση την εξόθηση, τον φωτοπολυμερισμό, και τα σταγονίδια. Τέλος, αναφέρονται προκλήσεις που αντιμετωπίζονται και μελλοντικοί στόχοι.

ABSTRACT

The technology of three-dimensional (3D) printing of biological materials is an emerging field that combines biotechnology with advanced printing technology. This meeting of the two disciplines has the potential to fundamentally change the way objects and biological materials are produced. With a widening range of applications, from medicine to scientific research and industry, this technology brings a wealth of prospects and challenges. In this paper, we report the current status and future prospects in the field of 3D printing of biological materials. First, reference is made to the creation of 3D bioprinting and its importance in the scientific field. Then, reference is made to various ways of 3D printing and the materials used. Also, 3D printing types are compared and applications based on annealing, photopolymerization, and droplets are reported. Finally, challenges faced and future goals are mentioned.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

| | |
|--|----|
| Κεφάλαιο 1 - Εισαγωγή..... | 10 |
| 1.1 Ορισμός | 10 |
| 1.2 Ιστορικό Πλαίσιο | 10 |
| 1.2.1 Τα πρώτα βήματα της στερεολιθογραφίας | 10 |
| 1.2.2 Η στερεολιθογραφία επισημοποιείται | 10 |
| 1.2.3 Πρόοδος στον τομέα της μηχανικής των ιστών | 11 |
| 1.2.4 Οι πρώτες σκέψεις για 3D βιοεκτύπωση..... | 11 |
| 1.2.5 Τα πρώτα πειράματα | 11 |
| 1.2.6 Η τεχνολογία εξώθησης υλικού | 12 |
| 1.2.7 Προβλήματα στην αγγείωση..... | 12 |
| 1.2.8 Εμπορευματοποίηση και συνεργασίες..... | 12 |
| 1.2.9 Το σήμερα..... | 13 |
| 1.3 Η σημαντικότητα της 3D βιοεκτύπωσης [9],[10]..... | 13 |
| 1.3.1 Ανάπλαση οργάνων και ιστών..... | 13 |
| 1.3.2 Ανάπτυξη φαρμάκων | 13 |
| 1.3.3 Διερεύνηση ασθενειών | 14 |
| 1.3.4 Βιοπροσθετικά εμφυτεύματα..... | 14 |
| 1.3.5 Θεραπεία πληγών και δερματικά μοσχεύματα | 14 |
| 1.3.6 Εκπαίδευση ιατρικού προσωπικού | 14 |
| 1.4 Υπόβαθρο..... | 14 |
| 1.5 Βασικές αρχές 3D βιοεκτύπωσης | 16 |
| Κεφάλαιο 2 - Είδη Βιοεκτύπωσης..... | 19 |
| 2.1 Βιοεκτύπωση με βάση την εξώθηση | 19 |
| 2.1.1 Εξώθηση με πνευματική κίνηση | 20 |
| 2.1.2 Εξώθηση με έμβολο..... | 20 |
| 2.1.3 Εξώθηση με κοχλία | 21 |
| 2.1.4 Βιοεκτυπωτές με βάση την εξώθηση: | 21 |
| 2.2. Βιοεκτύπωση με βάση σταγονίδια: | 23 |
| 2.2.1 Βιοεκτύπωση inkjet | 24 |
| 2.2.2 Ηλεκτροϋδροδυναμική εκτόξευση | 26 |
| 2.2.3 Βιοεκτύπωση με laser | 27 |

| | |
|--|----|
| 2.2.4 Βιοεκτυπωτές με βάση σταγονίδια: | 29 |
| 2.3. Βιοεκτύπωση με βάση το φωτοπολυμερισμό | 31 |
| 2.3.1 SLA | 32 |
| 2.3.2 DLP | 32 |
| 2.3.3 Βιοεκτυπωτές με βάση το φωτοπολυμερισμό | 33 |
| Κεφάλαιο 3 - Υλικά..... | 34 |
| 3.1 Πολυμερή..... | 34 |
| 3.1.1 Κολλαγόνο..... | 35 |
| 3.1.2 Ινίκη – Fibrin | 36 |
| 3.1.3 Μετάξι – Silk | 37 |
| 3.1.4 Χιτοζάνη – Chitosan | 37 |
| 3.1.5 Άλατα αλγινικών οξέων – Alginate..... | 37 |
| 3.1.6 Ζελατίνη..... | 38 |
| 3.1.7 Υαλουρονικό οξύ | 38 |
| 3.2 Εξελιγμένα Bio-inks..... | 38 |
| 3.2.1 Πολυστρωματικά Bioinks..... | 39 |
| 3.2.2 Έξυπνα Bioinks | 40 |
| 3.2.3 Αυτοσυναρμολογούμενα Bioinks..... | 41 |
| 3.2.4 Βιομοριακά Bioinks..... | 42 |
| 3.2.5 Bioinks νανοτεχνολογίας | 42 |
| 3.3 Σύνθετα Πολυμερή ενισχυμένα με νανοσωματίδια | 42 |
| 3.4 Κεραμικά νανοσυνθετικά..... | 43 |
| 3.5 Μεταλλικά νανοσυνθετικά | 44 |
| 3.6 Σύνθετα πολυμερή ενισχυμένα με ίνες | 44 |
| 3.7 Νανοσυνθετικά υλικά με βάση τον άνθρακα | 45 |
| 3.7.1 Υλικά με βάση τον γραφίτη | 45 |
| 3.7.2 Νανοσωλήνες άνθρακα..... | 46 |
| Κεφάλαιο 4 - Σύγκριση των ειδών τρισδιάστατης βιοεκτύπωσης | 48 |
| Κεφάλαιο 5 - Εφαρμογές της Βιοεκτύπωσης..... | 51 |
| 5.1 Γενικά Παραδείγματα & Εφαρμογές | 52 |
| 5.1.1 Εκτύπωση καρδιάς | 52 |
| 5.1.2 Εκτύπωση νεφρού..... | 52 |
| 5.1.3 Εκτύπωση κερατοειδούς | 52 |

| | |
|---|----|
| 5.1.4 Εκτύπωση ωοθηκών..... | 53 |
| 5.1.5 Εκτύπωση ήπατος | 53 |
| 5.1.6 Εκτύπωση αυτιών | 53 |
| 5.1.7 Εκτύπωση πάγκρεας..... | 54 |
| 5.1.8 Εκτύπωση δέρματος..... | 54 |
| 5.2 Εφαρμογές με βάση την εξώθηση | 55 |
| 5.2.1 Δέρμα | 55 |
| 5.2.2 Οστό - Χόνδρος | 57 |
| 5.2.3 Νευρικό Μόσχευμα | 58 |
| 5.2.4 Μύες – Τένοντες..... | 59 |
| 5.2.5 Αιμοφόρα αγγεία - αγγείωση | 59 |
| 5.2.6 Οργανοειδές | 60 |
| 5.2.7 Έρευνα για φάρμακα..... | 61 |
| 5.3 Εφαρμογές με βάση τα σταγονίδια | 62 |
| 5.3.1 Δέρμα | 62 |
| 5.3.2 Οστό – Χόνδρος | 63 |
| 5.3.3 Νεύρα..... | 64 |
| 5.3.4 Αιμοφόρα αγγεία - αγγείωση | 64 |
| 5.3.5 Οργανοειδές | 65 |
| 5.3.6 Φαρμακευτική έρευνα | 66 |
| 5.4 Εφαρμογές με βάση τον φωτοπολυμερισμό | 67 |
| 5.4.1 Χόνδρος αρθρώσεων..... | 67 |
| 5.4.2 Νεύρα..... | 68 |
| 5.4.3 Νωτιαίος μυελός | 69 |
| 5.4.4 Αιμοφόρα αγγεία | 70 |
| 5.4.5 Οργανοειδές | 70 |
| Κεφάλαιο 6 - Περιορισμοί και προκλήσεις..... | 72 |
| Κεφάλαιο 7 - Συμπεράσματα & Μέλλον | 75 |
| Βιβλιογραφία | 78 |

ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

| | |
|---|----|
| Figure 1 - Charles Hull – Father of Stereolithography..... | 11 |
| Figure 2 - Makoto Nakamura..... | 12 |
| Figure 3 - Slicing Method | 15 |
| Figure 4 - Μέθοδος FDM: ο πιο συχνός τρόπος 3D εκτύπωσης..... | 15 |
| Figure 5 - Οι 3 κύριες τεχνικές 3D βιοεκτύπωσης [17]..... | 16 |
| Figure 6 - Έρευνα Vantage Market Research: Η παγκόσμια αγορά 3D bioprinting [18] | 17 |
| Figure 7 - Δημοσιεύσεις για την 3D βιοεκτύπωση (κόκκινο) και για τα bio-inks (μπλε) μεταξύ 2017-2021 | 18 |
| Figure 8 - (Τα 3 είδη βιοεκτύπωσης με βάση την εξώθηση: πνευματική, με έμβολο και με βιδωτό) .. | 20 |
| Figure 9 - (Bioprinter™: ο πρώτος εμπορικός τρισδιάστατος βιοεκτυπωτής στον κόσμο.) | 22 |
| Figure 10 - (NovoGen MMX Bioprinter)..... | 23 |
| Figure 11 - (Τα 3 είδη με βάση σταγονίδια και η υποκατηγορίες τους: βιοεκτύπωση inkjet, ηλεκτροϋδροδυναμική εκτόξευση και βιοεκτύπωση με υποβοήθηση λέιζερ.)..... | 24 |
| Figure 12 - (Η βιοεκτύπωση θερμικής μελάνης (A), η βιοεκτύπωση με πιεζοηλεκτρική έγχυση μελάνης (B), Ηλεκτροϋδροδυναμική εκτόξευση(C), Βιοεκτύπωση με laser (D))..... | 26 |
| Figure 13 - (Thomas Bolond μαζί με τον πρώτο βιοεκτυπωτή inkjet) | 31 |
| Figure 14 - (Τα 2 είδη με βάση το φωτοπολυμερισμό SLA/DLP)..... | 31 |
| Figure 15 - (DLP εκτυπωτής) | 33 |
| Figure 16 - Bioinks and 3D Bioprinting [8] | 35 |
| Figure 17 - Bioinks and their structure | 36 |
| Figure 18 - Advanced Bioinks | 39 |
| Figure 19 - 3D βιοεκτυπωμένο ικρίωμα [8] | 41 |
| Figure 20 - Αυτοσυναρμολογούμενα διπεπτίδια | 41 |
| Figure 21 - Γραφένιο..... | 46 |
| Figure 22 - Nanotubes & Γραφένιο | 47 |
| Figure 23 - Εφαρμογές Βιοεκτύπωσης..... | 51 |
| Figure 24 - Α, Β, Γ, Δ..... | 56 |
| Figure 25 - lift, inkjet..... | 63 |
| Figure 26 - lift μικροσφαιριδίων | 66 |
| Figure 27 - NGC από μSLA και DLP | 69 |
| Figure 28 - Βιοαντιδραστήρας | 74 |

Συντομογραφίες

- 1.3D..... Three Dimensional
- 2.ADSCs..... Adipose-derived stem cells
- 3.AFA-LIFT..... Absorbing film assisted laser induced forward transfer
- 4.AFS..... Amniotic Fluid Serum
- 5.BMSC..... Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells
- 6.BVA..... Bovine serum albumin
- 7.CAD..... Computer Aided Design
- 8.CCD..... Charge-Coupled Device
- 9.CIJ..... Συνεχή Εκτύπωση με Λείζερ
- 10.CNT..... Carbon NanoTubes
- 11.CT..... Computer Tomography
- 12.DLP..... Digital Light Processing
- 13.DNA..... Deoxyribonucleic acid
- 14.DOD..... Drop On Demand
- 15.ECM..... Extracellular Matrix
- 16.EHDJ..... Electrohydrodynamic Jet
- 17.GelMa..... Gelatin Methacryloyl
- 18.GFs..... Growth Factors
- 19.HA..... Υδροξυαπατίτη
- 20.HCs..... Ηπατοκύτταρα
- 21.HLFs..... Human Lung Fibroblast
- 22.HUVEC..... Human umbilical vein endothelial cells
- 23.HUVSMCs..... Human Umbilical Vein Smooth Muscle Cells
- 24.HP..... Hewlett-Packard
- 25.ITOP..... Integrated Tissue and Organ Printing
- 26.FDM..... Fused Deposition Modelling
- 27.LAB..... Βιοεκτύπωση με υποβοήθηση λείζερ
- 28.LGDW..... Laser Guided Direct Writing
- 29.LIFT..... Laser Induced Forward Transfer
- 30.MRI..... Magnetic Resonance Imaging
- 31.MWCNT..... Multiple-Walled Carbon Nanotubes
- 32.PASMCs..... Pulmonary Artery Smooth Muscle Cell Senescence
- 33.PCL..... Polycaprolactone
- 34.PDMS..... Polydimethylsiloxane
- 35.PEG..... Polyethylene glycol
- 36.PEGDA..... Poly(ethylene glycol) diacrylate

| | |
|---------------|-------------------------------------|
| 37.PEO..... | Poly(ethylene oxide) |
| 38.PLGA..... | Poly(lactic-co-glycolic acid) |
| 39.PMSQ..... | Polymethylsilsesquioxane |
| 40.PVA..... | Polyvinyl alcohol |
| 41.RA..... | Right ascension |
| 42.RGD..... | Πεπτίδια Προσκόλλησης Arg-Gly-Asp |
| 43.SCs..... | Schwann Cells |
| 44.SLA..... | Stereolithography |
| 45.SLS..... | Selective Laser Sintering |
| 46.SWCNT..... | Single-Walled Carbon NanoTubes |
| 47.TCP..... | Σωματίδια Φωσφορικού Ασβεστίου |
| 48.QUT..... | Queensland University of Technology |
| 49.UV..... | Ultraviolet |
| 50.KΝΣ..... | Κεντρικό Νευρικό Σύστημα |
| 51.ΗΠΑ..... | Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής |
| 52.Υ.Ο..... | Υαλουρονικό Οξύ |

Κεφάλαιο 1 - Εισαγωγή

1.1 Ορισμός

Η τρισδιάστατη βιοεκτύπωση, γνωστή και ως 3D bioprinting, ορίζεται ως η χρήση τεχνικών, παρόμοιων με αυτών της 3D εκτύπωσης, για τον συνδυασμό κυττάρων, φυσικών ή τεχνητών πολυμερών (bioinks) και/ή βιο-υλικών (υλικά βιοσυμβατικά με τον ανθρώπινο οργανισμό) προκειμένου να κατασκευαστούν βιοϊατρικά εξαρτήματα που μιμούνται τα χαρακτηριστικά των φυσικών ιστών και να δημιουργηθούν λειτουργικά βιο-στρώματα (biofilms) [1]. Η τρισδιάστατη βιοεκτύπωση χρησιμοποιεί ουσιαστικά αλληπάλληλες στρώσεις bioinks (το υλικό δηλαδή της εκτύπωσης) για να παρασκευάσει δομές παρόμοιες με τον φυσικό ιστό, οι οποίες ύστερα χρησιμοποιούνται κυρίως στην ιατρική και στην μηχανική των ιστών. [2],[3]

1.2 Ιστορικό Πλαίσιο

Η 3D βιοεκτύπωση είναι μία σχετικά καινούργια τεχνολογική μέθοδος, όπως φυσικά και η προέλευσή της, η συμβατική 3D εκτύπωση. Στην συνέχεια θα παρουσιαστούν μερικές στιγμές «ορόσημα» στην πρόσφατη ιστορία της

1.2.1 Τα πρώτα βήματα της στερεολιθογραφίας

Το 1981, ο ιάπωνας ερευνητής Hideo Kodama πρώτος ανακαλύπτει μία σύγχρονη προσέγγιση της στερεολιθογραφίας χρησιμοποιώντας UV (UltraViolet) φως σε φωτοευαίσθητα πολυμερή. Ο δρόμος για το 3D printing μόλις αρχίζει... [4]

1.2.2 Η στερεολιθογραφία επισημοποιείται

Την δεκαετία του 1980 και συγκεκριμένα το 1984, ήταν πρώτος ο Charles (Chuck) Hull που «πατεντάρει» μια διαδικασία στερεολιθογραφίας και από τότε ο όρος αυτός αποκτά την δική του επισημότητα και διάσταση [5]. Η πατέντα του Hull ήταν η πρώτη επίσημη τεχνολογία 3D εκτύπωσης, η οποία επέτρεψε την κατασκευή φυσικών αντικειμένων από ψηφιακά μοντέλα. Τα φυσικά αυτά αντικείμενα κατασκευάζονται σε πολλές λεπτές στρώσεις διάφορων τύπων υλικών (από κάτω προς τα πάνω), με την παρουσία UV φωτός. Πιο αναλυτικά, η πατέντα περιέγραφε ότι μία ισχυρή ακτίνα UV φωτός «χτυπάει» συγκεκριμένα μέρη της επιφάνεια ενός κάδου που περιέχει υγρό φωτοπολυμερές. Η ακτίνα του φωτός προκαλεί την δημιουργία crosslinkers (διαμορικοί δεσμοί στα

πολυμερή), και έτσι σιγά σιγά σχηματίζονται επίπεδα από ένα επιθυμητό τρισδιάστατο αντικείμενο. [4],[6]



Figure 1 - Charles Hull – Father of Stereolithography

1.2.3 Πρόοδος στον τομέα της μηχανικής των ιστών

Στην μεγάλη τεχνολογική πρόοδο της δεκαετίας του 90 δεν θα μπορούσε να μην συμμετέχει η μηχανική με εφαρμογές στην βιολογία. Οι ερευνητές αναζητούσαν μεθόδους για την δημιουργία τεχνητών ιστών και οργάνων, συνδυάζοντας κύτταρα και ικρίώματα.

1.2.4 Οι πρώτες σκέψεις για 3D βιοεκτύπωση

Στις αρχές του αιώνα, οι επιστήμονες κάνουν τις πρώτες σκέψεις για τον συνδυασμό της μηχανικής των ιστών και του 3D printing. Το αποτέλεσμα; Η γέννηση του όρου 3D βιοεκτύπωση (3D bioprinting).

1.2.5 Τα πρώτα πειράματα

Το μέσο της πρώτης δεκαετίας ήταν ορόσημο για το 3D bioprinting, καθώς αρχίζουν διάφορες δοκιμές ανά τον κόσμο. Τροποποιημένοι 3D εκτυπωτές, εκτυπώνουν βιολογικό υλικό, όπως κύτταρα και βιοϋλικά. Η πιο σημαντική δοκιμή ήταν αυτή του καθηγητή Makoto Nakamura. Το 2003, αυτός και οι εργαστηριακοί συνεργάτες του, κατάφεραν επιτυχώς να εκτυπώσουν κύτταρα από συκώτι. [7]



Figure 2 - Makoto Nakamura

1.2.6 Η τεχνολογία εξώθησης υλικού

Τα πρώτα πειράματα που αναφέρθηκαν έγιναν με εκτυπωτές τύπου inkjet τεχνολογία inkjet και στην συνέχεια με την τεχνολογία εξώθησης υλικού, η οποία χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή οργανικών ιστών. Η μέθοδος αυτή είχε εξαιρετικά, για τα τότε δεδομένα, αποτελέσματα, καθώς μπορούσε να επιτύχει πολύ λεπτές στρώσεις υλικού. [7]

1.2.7 Προβλήματα στην αγγείωση

Ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα που κλήθηκαν να αντιμετωπίσουν οι επιστήμονες, ήταν αυτό της αγγείωσης. Την δημιουργία δηλαδή ενός δικτύου αιμοφόρων αγγείων στο εσωτερικό των εκτυπομένων βιο-αντικειμένων, μία διαδικασία που όπως αποδείχτηκε ήταν κάτι παραπάνω από απαιτητική. Η ανάλογη έρευνα όμως, όχι μόνο απέδωσε αποτελέσματα, αλλά επέτρεψε στους επιστήμονες να εκτυπώνουν ολόκληρα όργανα και ιστούς (συκώτι, χόνδρους, βαλβίδες καρδιάς). Οι επιτυχίες αυτές ήταν το ερέθισμα για την προσπάθεια εκτύπωσης ακόμη πιο περίπλοκων διατάξεων. [8]

1.2.8 Εμπορευματοποίηση και συνεργασίες

Οι καινοτόμες ανακαλύψεις στον χώρο έφεραν και τις πρώτες μεγάλης κλίμακας επενδύσεις από τεχνολογικούς κολοσσούς. Επίσης, αυξήθηκε σημαντικά

η συνεργασία πανεπιστημίων, ερευνητικών κέντρων και βιομηχανίας για θέματα 3D bioprinting

1.2.9 Το σήμερα

Η έρευνα σήμερα συνεχίζεται με αμείωτους ρυθμούς. Οι επιστήμονες αναπτύσσουν πιο σύνθετες τεχνικές, βελτιώνουν την ποιότητα των παραγόμενων προϊόντων και προχωράνε σε δοκιμές τόσο σε ανθρώπους (σε πολύ μικρή κλίμακα ακόμη) όσο και στο περιβάλλον

1.3 Η σημαντικότητα της 3D βιοεκτύπωσης [9],[10]

Η 3D βιοεκτύπωση μπορεί ακόμη να μην χρησιμοποιείται μαζικά στους ανθρώπους και οι περισσότεροι από εμάς να μην έχουμε συνειδητοποιήσει το πόσο σημαντική μπορεί να εξελιχθεί για την ανθρώπινη ζωή. Η 3D βιοεκτύπωση θα διαδραματίσει στο μέλλον σπουδαίο ρόλο στους εξής τομείς:

1.3.1 Ανάπλαση οργάνων και ιστών

Η 3D βιοεκτύπωση έχει την ικανότητα να δημιουργήσουν λειτουργικά και εξατομικευμένα όργανα και ιστούς για μεταμόσχευση. Μία τέτοια εξέλιξη θα μειώσει δραστικά την έλλειψη οργάνων για δωρεά και το ρίσκο για απόρριψη του μοσχεύματος, και αυτό επειδή τα τυπωμένα όργανα θα είναι κατασκευασμένα ώστε να καλύπτουν τις ανάγκες του ασθενούς.

1.3.2 Ανάπτυξη φαρμάκων

Οι βιοεκτυπωμένοι ιστοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν ώστε να γίνει έλεγχος της δράσης καινούργιων φαρμάκων και πιθανών παρενεργειών τους. Επίσης, οι επιστήμονες θα μπορέσουν να μελετήσουν πιο αποτελεσματικά την επίδραση του κάθε φαρμάκου σε συγκεκριμένα σημεία των ιστών, ώστε να βελτιώσουν την δράση τους.

1.3.3 Διερεύνηση ασθενειών

Οι βιοεκτυπωμένοι ιστοί μπορούν ακόμη να χρησιμοποιηθούν για την επίδραση που έχουν σε αυτούς διαφόρων ειδών ασθένειες. Οι επιστήμονες μπορούν έτσι να μελετήσουν τις ασθένειες και τον μηχανισμό ανάπτυξής τους.

1.3.4 Βιοπροσθετικά εμφυτεύματα

Η 3D βιοεκτύπωση μπορεί να κατασκευάσει βιοδομές που θα αποτελέσουν το κύριο συστατικό βιοσυμβατικών εμφυτευμάτων και άλλων προσθετικών μεγάλης λειτουργικότητας.

1.3.5 Θεραπεία πληγών και δερματικά μοσχεύματα

Μία ακόμη εφαρμογή είναι η δημιουργία υποκατάστατων δέρματος για θύματα εγκαυμάτων και ασθενείς με δερματικές μολύνσεις. Το βιοεκτυπωμένο δέρμα μπορεί να επιταχύνει την επούλωση πληγών και να βοηθήσει σημαντικά στο αισθητικό κομμάτι.

1.3.6 Εκπαίδευση ιατρικού προσωπικού

Τα μοντέλα που έχουν δημιουργηθεί με τη χρήση 3D εκτύπωσης βιοϋλικών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για σκοπούς χειρουργικής εκπαίδευσης. Οι χειρουργοί μπορούν να εξασκηθούν και να βελτιώσουν τις δεξιότητές τους σε ρεαλιστικά μοντέλα ιστών, βελτιώνοντας την απόδοσή τους και μειώνοντας τον χρόνο μάθησης που απαιτείται για πολύπλοκες χειρουργικές επεμβάσεις.

1.4 Υπόβαθρο

Με τον όρο 3D printing χαρακτηρίζουμε την μέθοδο προσθετικής κατασκευής στην οποία κατασκευάζονται αντικείμενα μέσω της διαδοχικής πρόσθεσης επάλληλων στρώσεων υλικού. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, το 3D bioprinting δεν θα μπορούσε εξ ορισμού να υπάρχει χωρίς την ύπαρξη του 3D printing. Κρίνεται λοιπόν μεγάλης σημασίας, να περιγραφούν οι βασικές πτυχές του τελευταίου. [11]

Αρχικά, όλα ξεκινάνε με τον ψηφιακό σχεδιασμό (σε προγράμματα CAD) του αντικειμένου που θα εκτυπωθεί. Στο ψηφιακό μοντέλο ύστερα γίνεται το λεγόμενο slicing («κόψιμο» σε λεπτές στρώσεις), σε ανάλογα ψηφιακά περιβάλλοντα (π.χ Cura). Το sliced μοντέλο είναι ο καθοδηγητής του εκτυπωτή

τόσο σε υλικό εκτύπωσης (συνήθως πλαστικό, ρητίνες και μέταλλο) όσο και σε διάφορες παραμέτρους (πάχος στρώσης, ταχύτητα εκτύπωσης, infill density). Ακόμη, υπάρχουν πολλοί τύποι 3D εκτύπωσης, με τους κυριότερους να είναι ο FDM, ο SLA και ο SLS.

Η βιοεκτύπωση είναι λοιπόν ένας ειδικός κλάδος της 3D εκτύπωσης, που έχει να κάνει με την χρήση βιοϋλικών, τα οποία θα αναλυθούν εκτενώς στην συνέχεια, ώστε να κατασκευαστούν δομές που να μοιάζουν με ιστούς ή ακόμη και ολόκληρα όργανα.

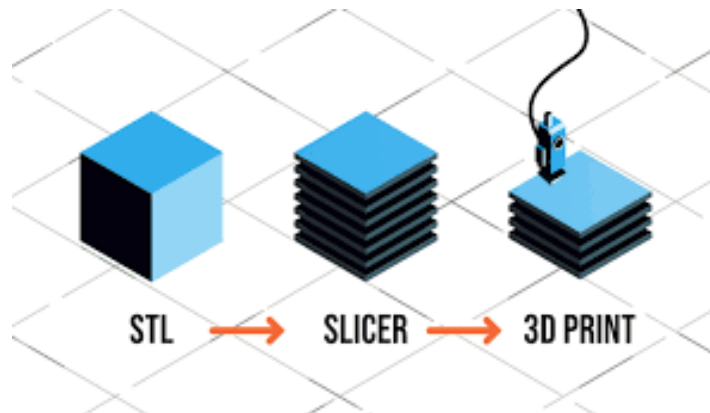


Figure 3 - Slicing Method

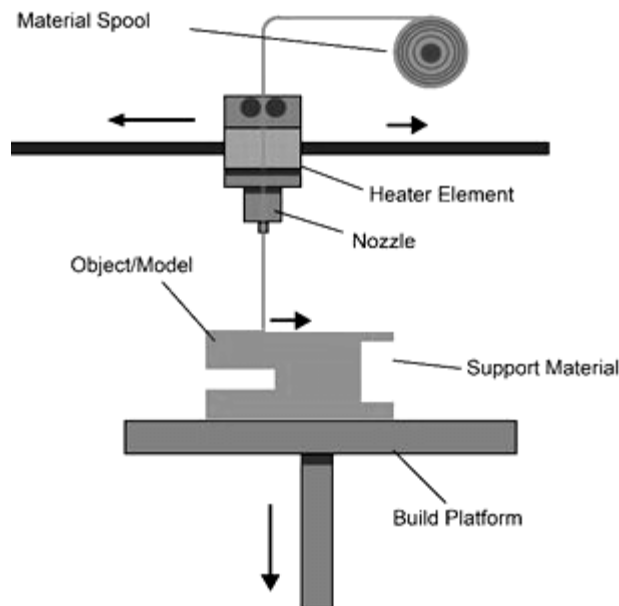


Figure 4 - Μέθοδος FDM: ο πιο συχνός τρόπος 3D εκτύπωσης

1.5 Βασικές αρχές 3D βιοεκτύπωσης

Ο βασικός στόχος της μηχανικής των ιστών ή των οργάνων είναι η ανακατασκευή ενός κατεστραμμένου ιστού ή οργάνου με κύτταρα, βιοϋλικά και βιοενεργά μόρια. Κατά την βασική μέθοδο μηχανικής των ιστών, έμβια κύτταρα ή/και βιολογικά ενεργά μόρια εμφυτεύονται σε ένα υψηλά πορώδες ικρίωμα (μηχανικά εξωκυτταρικά καλούπια) για να επισκευάσουν ή/και να αναγεννήσουν τους κατεστραμμένους ιστούς. Διάφορες μέθοδοι προσθετικής κατασκευής έχουν χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή ικριωμάτων από διάφορα υλικά. [12] – [16]

Ωστόσο, οι προσεγγίσεις που βασίζονται στα ικρίωματα αντιμετωπίζουν ακόμη ορισμένες προκλήσεις. Οι κύριες από αυτές είναι η δυσκολία στο να εμφυτεύονται τα κύτταρα σε όλο τον όγκο του ικριώματος, η περιορισμένη αγγείωση και η αδυναμία των κυττάρων να προσκολλώνται στο υλικό του ικριώματος. Επομένως, τα ζωντανά κύτταρα σε συνδυασμό με βιομόρια και βιοϋλικά πρέπει να ενωθούν στον τρισδιάστατο χώρο για μια αποτελεσματική μηχανική ιστού ή οργάνου. [17]

Η προαναφερθείσα ένωση λοιπόν μπορεί επιτευχθεί με την 3D βιοεκτύπωση, μία ειδική κατηγορία της προσθετικής κατασκευής κατά την οποία κατασκευάζονται σύνθετες βιολογικές δομές από έμβια κύτταρα, βιομόρια και βιοϋλικά. Όπως και στις binder jetting τεχνικές 3D εκτύπωσης, έτσι και στην 3D βιοεκτύπωση χρησιμοποιείται ένας ink-jet εκτυπωτής. Αντί όμως για μελάνι γίνεται χρήση βιολογικού υλικού (bio-ink) και αντί για χαρτί γίνεται χρήση βιοδιασπόμενου υποστηρικτικού υλικού. [17]

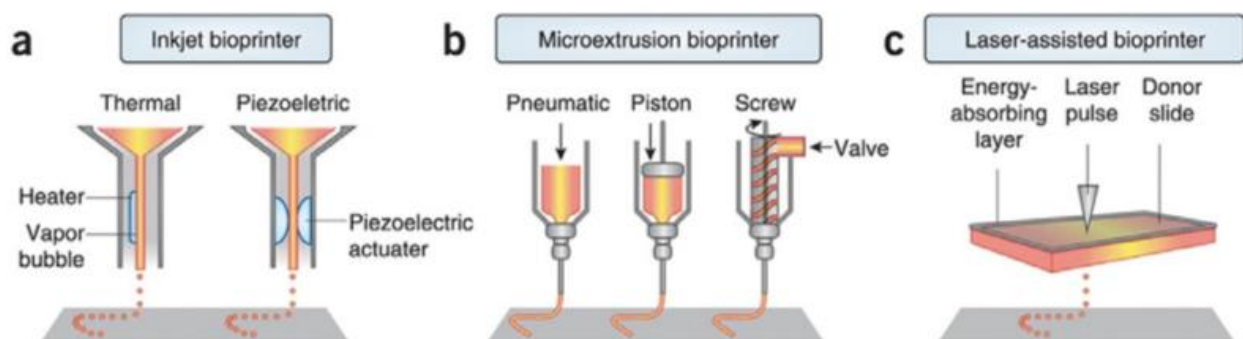


Figure 5 - Οι 3 κύριες τεχνικές 3D βιοεκτύπωσης [17]

Η τρισδιάστατη βιοεκτύπωση αποτελεί ένα ιδιαίτερα ανερχόμενο θέμα έρευνας και είναι υψίστης σημασίας από οικονομικής απόψεως. Σύμφωνα με έκθεση της Vantage Market Research, η αγορά της 3D βιοεκτύπωσης αξιολογήθηκε στα 1.2 δισεκατομμύρια δολάρια το 2022 και αναμένεται να αυξηθεί με ετήσιο ρυθμό ανάπτυξης 20.1% μεταξύ του 2022 και του 2030. Το 2024, η αγορά της τρισδιάστατης βιοεκτύπωσης θα αντιπροσωπεύει περίπου το 10% της συνολικής αγοράς τρισδιάστατης εκτύπωσης. Επιπλέον, η παγκόσμια αγορά της Μηχανικής Ιστών αξιολογήθηκε στα \$2 δισεκατομμύρια το 2019 και εκτιμάται ότι θα φτάσει τα \$7 δισεκατομμύρια μέχρι το 2027 [18]. Η ανάπτυξη της αγοράς της 3D βιοεκτύπωσης οφείλεται στο ενδιαφέρον των ιατρικών, των κοσμητικών και των φαρμακευτικών κλάδων. Η μεγάλη ζήτηση για μεταμόσχευση οργάνων και η έλλειψη διαθέσιμων είναι ένας από τους κύριους παράγοντες για την ανάπτυξη της 3D βιοεκτύπωσης, η οποία έχει ως κύριο στόχο την εξάλειψη του χρόνου αναμονής μοσχεύματος. Η ζήτηση οργάνων αναμένεται να αυξηθεί άμεσα στο μέλλον λόγω του μεγάλου ποσοστού ανθρώπων άνω των 60 ετών παγκοσμίως. [17]

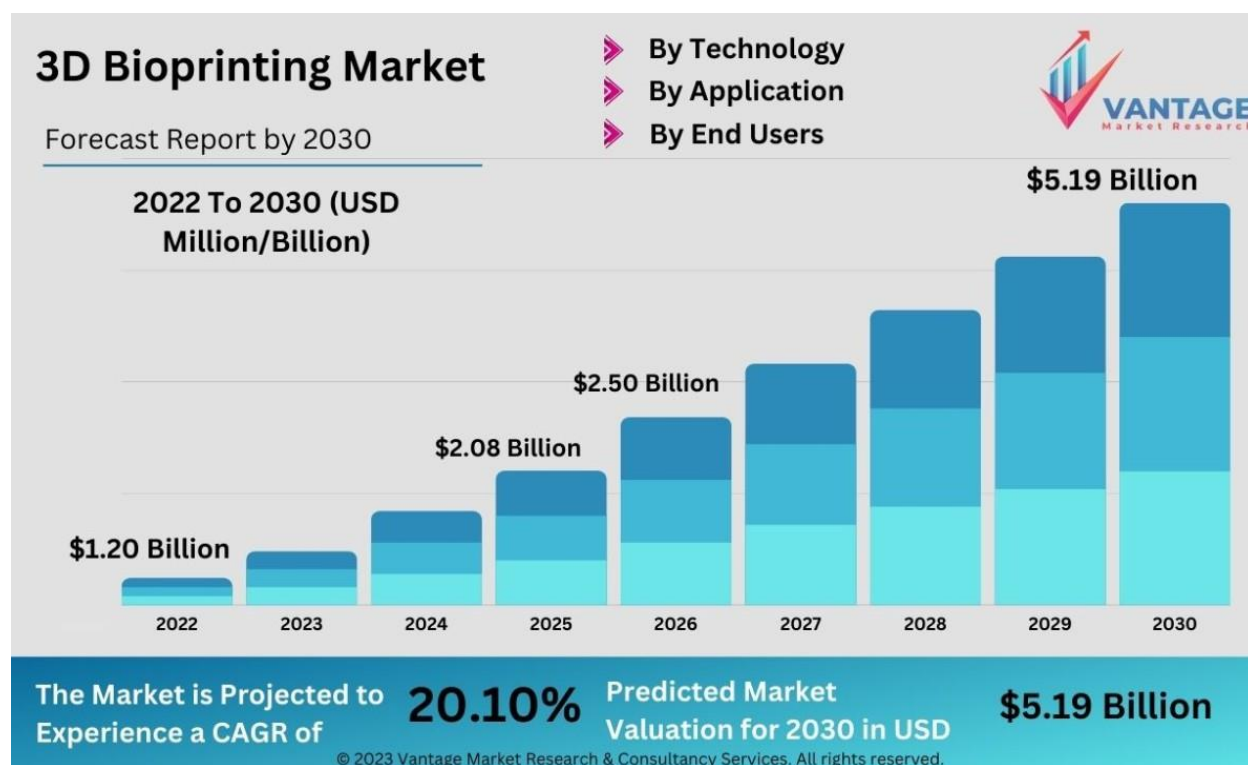


Figure 6 - Έρευνα Vantage Market Research: Η παγκόσμια αγορά 3D bioprinting [18]

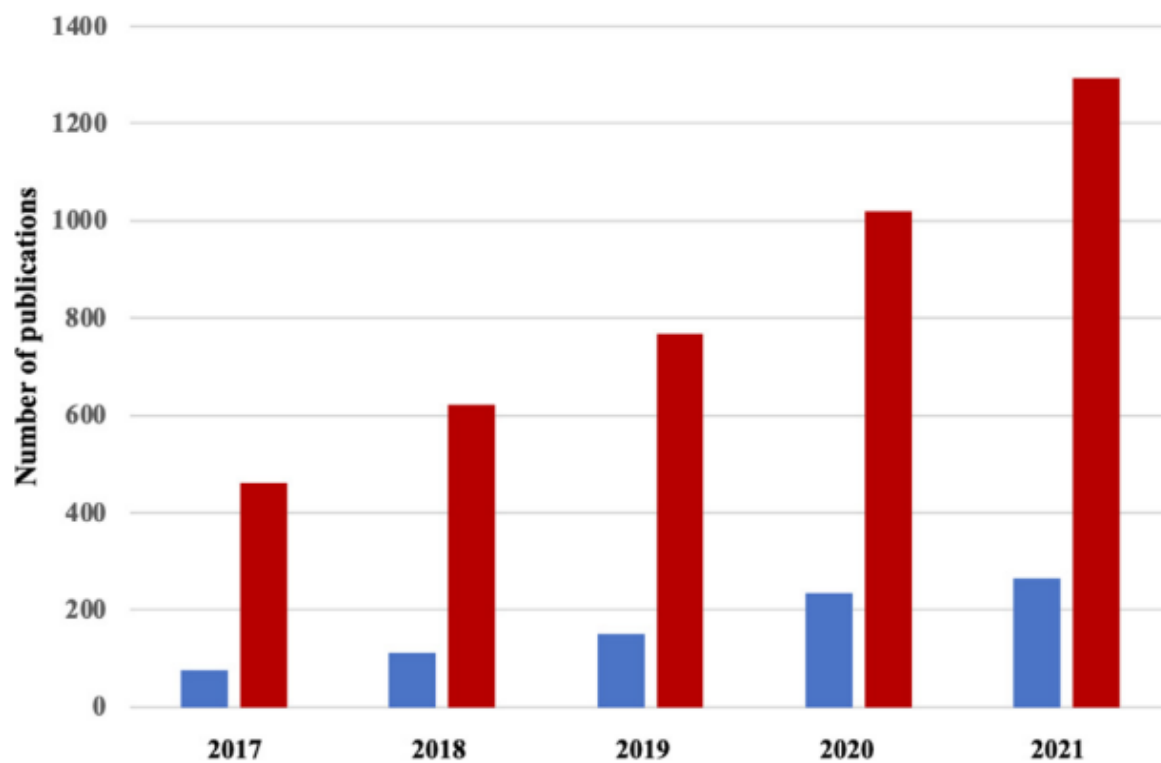


Figure 7 - Δημοσιεύσεις για την 3D βιοεκτύπωση (κόκκινο) και για τα bio-inks (μπλε) μεταξύ 2017-2021

Κεφάλαιο 2 - Είδη Βιοεκτύπωσης

2.1 Βιοεκτύπωση με βάση την εξώθηση

Η βιοεκτύπωση που βασίζεται σε εξώθηση (ονομάζεται επίσης άμεση γραφή με μελάνι), η οποία προέρχεται από την εκτύπωση inkjet, είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη προσέγγιση της τρισδιάστατης βιοεκτύπωσης λόγω της ευελιξίας και της οικονομικής της προσιτότητας. Αντί για μεμονωμένα σταγονίδια, η βιοεκτύπωση με βάση την εξώθηση παράγει συνεχόμενα νήματα μέσω συνεχούς δύναμης εξώθησης. Αυτή η προσέγγιση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτύπωση ενός ευρέος φάσματος ιζώδους βιοϋλικών και διαφορετικών συγκεντρώσεων κυττάρων. Για το λόγο αυτό, οι ερευνητές προτιμούν τη βιοεκτύπωση με βάση την εξώθηση για την κατασκευή δομών ιστού με επαρκή μηχανική ιδιότητα. Επιπλέον, η ομοαξονική βιοεκτύπωση και η βιοεκτύπωση πολλαπλών υλικών μπορεί επίσης να είναι απόλυτα συμβατή με τη βιοεκτύπωση που βασίζεται σε εξώθηση για διάφορα είδη εφαρμογών.

Θεωρητικά, η βιοεκτύπωση με βάση την εξώθηση εξωθεί το υλικό (συνήθως από μια σύριγγα) μέσω ενός ακροφυσίου μέσω μηχανικής ή πνευματικής κίνησης, για να σχηματίσει συνεχή μικρονημάτια τα οποία στη συνέχεια εναποτίθενται σε αυτά που λαμβάνουν υπόστρωμα και τελικά στοιβάζονται στις επιθυμητές δομές. Το υπόστρωμα μπορεί να είναι στερεό (π.χ. δίσκος καλλιέργειας), υγρό (π.χ. μέσο ανάπτυξης) ή υλικό που προέρχεται από γέλη. Η διαδρομή του ακροφυσίου συνήθως δημιουργείται από λογισμικό σύμφωνα με ψηφιακά μοντέλα μετά τη διαμόρφωση. Παράμετροι όπως η θερμοκρασία, η διάμετρος του ακροφυσίου, η πίεση εξώθησης, η ταχύτητα κίνησης, η ταχύτητα εξώθησης, το διάστημα διαδρομής κ.λπ. θα επηρεάσουν τις τελικές βιοεκτυπωμένες δομές. Σύμφωνα με τους διαφορετικούς τρόπους ενεργοποίησης του συστήματος διανομής υγρών, η κοινή βιοεκτύπωση με βάση την εξώθηση μπορεί να ταξινομηθεί σε πνευματική, με έμβολο και με βιδωτό. [19]

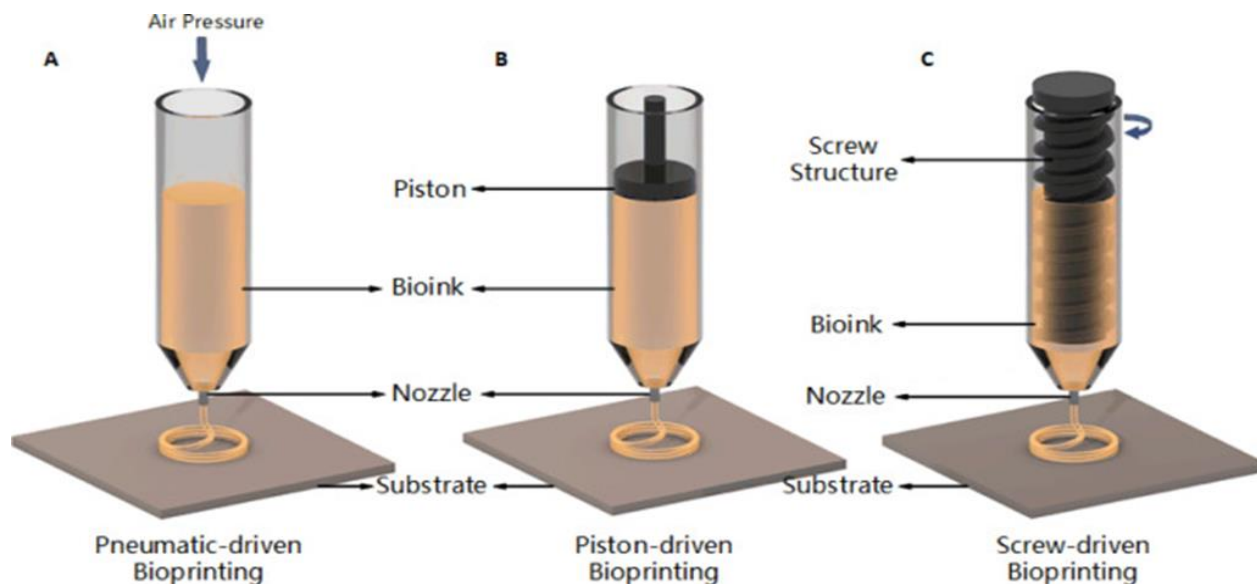


Figure 8 - (Τα 3 είδη βιοεκτύπωσης με βάση την εξώθηση: πνευματική, με έμβολο και με βιδωτό)

2.1.1 Εξώθηση με πνευματική κίνηση

Το πνευματικό σύστημα διέλασης χρησιμοποιεί πεπιεσμένο αέρα για να πραγματοποιήσει τη διανομή υγρού. Συνήθως περιλαμβάνει μια σύριγγα γεμάτη με βιομελάνι, η οποία συνδέεται με μια αντλία αέρα μέσω προσαρμογέα και σωλήνων (Εικόνα A, Figure 8). Οι υδρογέλες με ιδιότητα αραίωσης διάτμησης λειτουργούν επαρκώς με σύστημα πνευματικής κίνησης λόγω της διατήρησης της κατάστασης του νήματος μετά την εξώθηση. Το πνευματικό σύστημα απαιτεί αποστείρωση του αέρα από την αντλία αέρα. Έτσι, η χρήση ενός φίλτρου στον αεραγωγό θα ήταν ιδανική για την ελαχιστοποίηση της μόλυνσης των βιοεκτυπωμένων κατασκευών. Επιπλέον, η ομαλή εξώθηση πρέπει να είναι εγγυημένη όσο το δυνατόν περισσότερο, πράγμα που σημαίνει ότι πρέπει να προστεθεί επιπλέον υγρό ή πηκτωματοποιημένο μέσο όταν συναντά κανείς με ημι-στερεά ή στερεά κατάσταση βιολεκάνης για βελτιστοποίηση του ιξώδους του. [19]

2.1.2 Εξώθηση με έμβολο

Είναι γενικά αποδεκτό ότι το μηχανικό σύστημα διανομής υγρού είναι πιο κατάλληλο για την εξώθηση βιοϋλικών υψηλού ιξώδους, όπως συνθετικά ή φυσικά πολυμερή υψηλού μοριακού βάρους. Μεταξύ αυτών, η εξώθηση με έμβολο είναι αρκετά συνηθισμένη και σχετικές συσκευές όπως οι αντλίες μικροέγχυσης αποκτώνται εύκολα στην αγορά. Το έμβολο σε αυτό το σύστημα συνδέεται με έναν κινητήρα μέσω μιας βίδας οδήγησης. Όταν ξεκινά ο

κινητήρας, η περιστροφική κίνηση της βίδας οδήγησης μεταφέρεται σε γραμμική κίνηση του εμβόλου, η οποία σπρώχνει το βιολίθρο έξω από το ακροφύσιο για να σχηματίσει νήματα (Εικόνα Β, Figure 8). [19]

2.1.3 Εξώθηση με κοχλία

Ως άλλος τύπος μηχανικού συστήματος διανομής υγρών, οι βιδωτές συσκευές παρέχουν περισσότερο ογκομετρικό έλεγχο και συμβάλλουν στην εξώθηση βιοϋλικών με υψηλότερο ιξώδες. Η αρχή του βιδωτού συστήματος είναι παρόμοια με το σύστημα που κινείται με έμβολο, εκτός από το ότι μια βίδα που είναι συνδεδεμένη με τον κινητήρα, χρησιμοποιείται απευθείας για εξώθηση αντί για το έμβολο (Εικόνα Γ, Figure 8). Ωστόσο, οι βιδωτές συσκευές όχι μόνο παρέχουν μεγαλύτερη πίεση, αλλά και ενδέχεται να βλάψουν την κυψέλη που έχει τοποθετηθεί σε βιομελάνι στο μεταξύ. Ως εκ τούτου, απαιτείται προσεκτικός σχεδιασμός των εξαρτημάτων της βίδας. [19]

2.1.4 Βιοεκτυπωτές με βάση την εξώθηση:

Δεδομένου ότι η βιοεκτύπωση με βάση εξώθησης είναι η πιο βολική προσιτή και κοινή προσέγγιση, υπάρχουν πολλοί εμπορικοί βιοεκτυπωτές που βασίζονται στη μέθοδο εξώθησης στην αγορά.

Η εκτύπωση ικριωμάτων με βάση το FDM με μεταμόσχευση κυττάρων στη συνέχεια δεν είναι πραγματικά τεχνολογία βιοεκτύπωσης. Ως εκ τούτου, ο 3D Bioplotter που ήταν ικανός για βιοεκτύπωση με κυτταρικά φορτία, θα μπορούσε να οριστεί ως ο πρώτος εμπορικός τρισδιάστατος βιοεκτυπωτής στον κόσμο. Εφευρέθηκε από μια ερευνητική ομάδα του Πανεπιστημίου του Φράιμπουργκ και διατέθηκε στο εμπόριο από την EnvisionTEC (η οποία ιδρύθηκε το 1999 και ανασυγκροτήθηκε στην EnvisionTEC GmbH το 2002) αμέσως μετά. Δεν μπορεί μόνο να εκτυπώσει υδρογέλες φορτωμένες με κύτταρα όπως ζελατίνη, ινώδες, αλγινικό, αгарόζη κ.λπ., αλλά και να χρησιμοποιήσει σκληρά πολυμερή, ανόργανα κεραμικά υλικά όπως PCL, υδροξυαπατίτη (HA), σωματίδια φωσφορικού ασβεστίου (TCP) για την κατασκευή μη βιοαπορροφήσιμων σκαλωσιές.

Ένας άλλος αξιοσημείωτος βιοεκτυπωτής ήταν ο NovoGen MMX Bioprinter που εφευρέθηκε από την Organovo (η οποία ιδρύθηκε στο Delaware το 2007) το 2009. Αυτή η συμπαγής συσκευή που μπορούσε να τοποθετηθεί σε έναν τυπικό καθαρό πάγκο, είχε δύο ακροφύσια για την εξώθηση κυψελών, υδρογέλης, ικριωμάτων ή μήτρας στήριξης αντίστοιχα. Αυτή η συσκευή χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά για τη βιοεκτύπωση σφαιροειδών ιστού μαζί με μια δομή

στήριξης από υδρογέλη αγαρόζης. Τα σφαιροειδή ιστού συγχωνεύτηκαν και ωρίμασαν περαιτέρω σε μια οργάνωση που μοιάζει με ιστό μετά τη διαδικασία εκτύπωσης και η αγαρόζη αφαιρέθηκε στη συνέχεια. Προς το παρόν, αυτή η εταιρεία δεν πουλά πλέον βιοεκτυπωτές, αλλά μετατράπηκε σε μια πλατφόρμα που παρέχει τεχνικές υπηρεσίες, συμπεριλαμβανομένων δοκιμών *in vitro*, μοντέλων ασθενειών και δοκιμών ασφαλείας.

Επιπλέον, υπάρχουν αρκετοί βιοεκτυπωτές που απολαμβάνουν μεγάλη φήμη στη βιοεκτύπωση με εξώθηση: 3DDiscovery από RegenHU στην Ελβετία, FABION από 3D Bioprinting Solutions στα Ρωσικά, BIO V1 από REGEMAT3D στα Ισπανικά, INKREDIBLE από CELLINK στα σουηδικά, BIOBIOASSOMBOTLY από Ads. στα αμερικανικά, BioScaffolder από την GeSim στα γερμανικά, 3DS Alpha και Omega Bioprinter από την 3DYNAMIC SYSTEMS στα βρετανικά, ROKIT INVIVO από ROKIT στα κορεατικά, SYN από BIO3D στη Σιγκαπούρη, Bioarchitect από Regenovo στην Κίνα κ.λπ. [19]

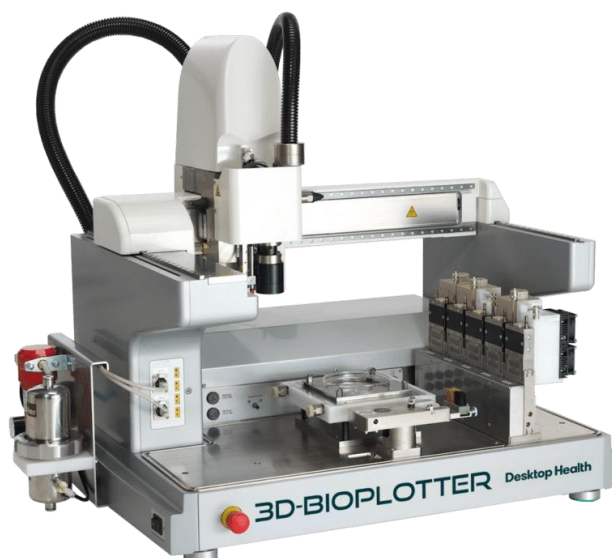


Figure 9 - (Bioprinter™: ο πρώτος εμπορικός τρισδιάστατος βιοεκτυπωτής στον κόσμο.)

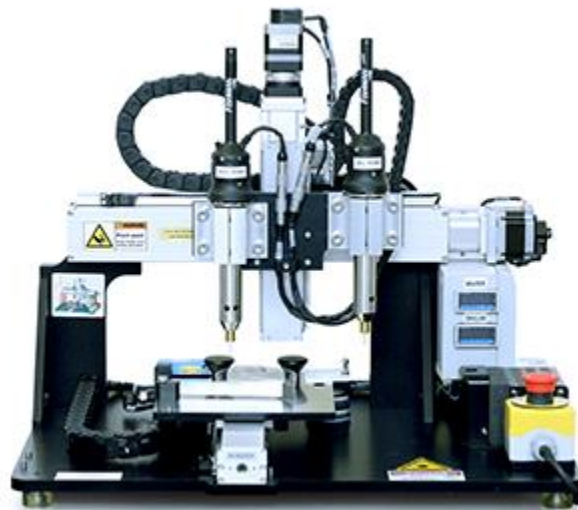


Figure 10 - (NovoGen MMX Bioprinter)

2.2. Βιοεκτύπωση με βάση σταγονίδια:

Εκτός από τη βιοεκτύπωση με βάση την εξώθηση που χρησιμοποιεί συνεχή νήματα ως βασική μονάδα, η βιοεκτύπωση με βάση σταγονίδια θεωρεί τα ανεξάρτητα και διακριτά σταγονίδια ως βασική μονάδα που οδηγεί σε σχετικά υψηλή ανάλυση σε σύγκριση με τη βιοεκτύπωση που βασίζεται σε εξώθηση με γενικό τρόπο. Λόγω της απλότητας και της ικανότητας ακριβούς ελέγχου των βιολογικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων κυττάρων, αυξητικών παραγόντων, γονιδίων, φαρμάκων, βιοϋλικών κ.λπ., η βιοεκτύπωση με σταγονίδια έχει πολλές εφαρμογές στη μηχανική ιστών, την αναγεννητική ιατρική, τη μεταμόσχευση, την κλινική, τη φαρμακευτική, τον έλεγχο υψηλής απόδοσης και έρευνα για τον καρκίνο.

Σύμφωνα με διαφορετικές αρχές σχηματισμού σταγονιδίων, η βιοεκτύπωση με βάση σταγονίδια μπορεί να χωριστεί σε βιοεκτύπωση inkjet, ηλεκτροϋδροδυναμική εκτόξευση (EHDJ) και βιοεκτύπωση με υποβοήθηση λέιζερ (LAB). Επιπλέον, η βιοεκτύπωση inkjet μπορεί να υποδιαιρεθεί σε συνεχή εκτύπωση inkjet (CIJ) και εκτύπωση inkjet drop-on-demand (DOD), ενώ η βιοεκτύπωση με λέιζερ σε άμεση γραφή καθοδήγησης με λέιζερ (LGDW) και μεταφορά με λέιζερ προς τα εμπρός (LIFT). [20]

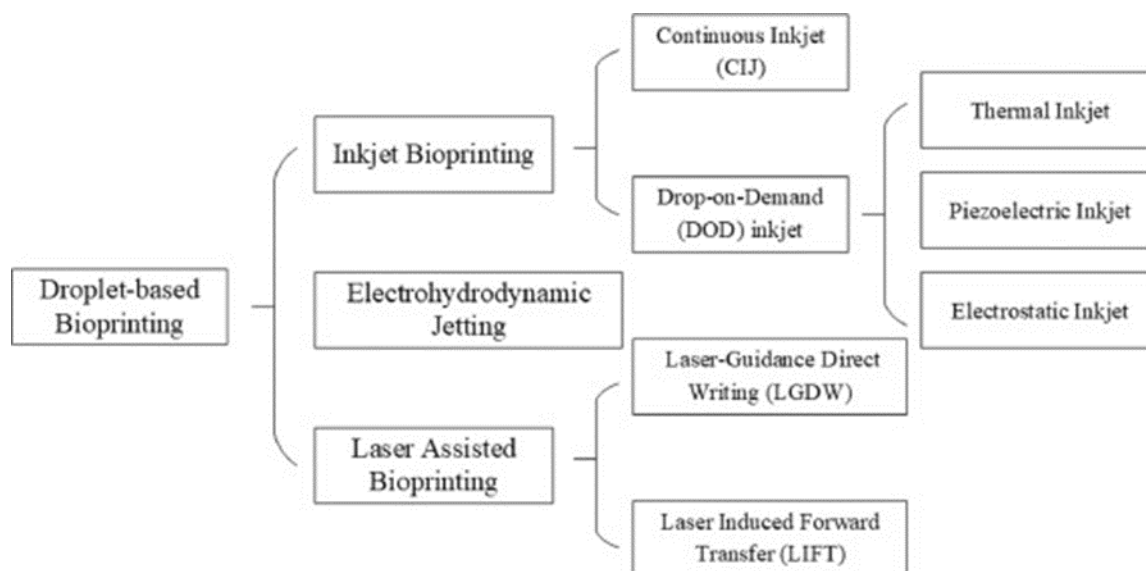


Figure 11 - (Τα 3 είδη με βάση σταγονίδια και η υποκατηγορίες τους: βιοεκτύπωση inkjet, ηλεκτροϋδροδυναμική εκτόξευση και βιοεκτύπωση με υποβοήθηση λέιζερ.)

2.2.1 Βιοεκτύπωση inkjet

Η βιοεκτύπωση inkjet θεωρείται ότι είναι η πρώτη τεχνολογία βιοεκτύπωσης, όταν ο Elmqvist της Siemens κατοχύρωσε με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας την πρώτη πρακτική συσκευή inkjet το 1951. Αργότερα στη δεκαετία του 1960, ο Sweet από το Πανεπιστήμιο του Στάνφορντ ανέπτυξε το σύστημα εκτύπωσης CIJ. Στη δεκαετία του 1970, οι Zoltan, Kyser και Sears ανακάλυψαν το σύστημα εκτύπωσης inkjet DOD, το οποίο έλαβε άδεια για τον πρώτο εμπορικό εκτυπωτή, τον Siemens PT-80, το 1977. Η Klebe χρησιμοποίησε έναν εμπορικά διαθέσιμο θερμικό εκτυπωτή inkjet DOD της Hewlett-Packard (HP) για να εναποθέσει ένα διάλυμα βιομελανιού που περιλαμβάνει κολλαγόνο και φιβρονεκτίνη το 1988, η οποία ήταν η πρώτη φορά που χρησιμοποιούσε τεχνολογία inkjet στη βιοεκτύπωση.

Η διαδικασία της εκτύπωσης inkjet μπορεί να θεωρηθεί ως δύο βήματα: 1. ο σχηματισμός διακριτών σταγονιδίων που κατευθύνονται σε μια επιθυμητή θέση του υποστρώματος, η αλληλεπίδραση μεταξύ σταγονιδίων και υποστρώματος. Όπως αναφέραμε παραπάνω, υπάρχουν δύο μέθοδοι για να σχηματιστούν σταγονίδια: η CIJ εκμεταλλεύεται ένα φυσικό φαινόμενο που ονομάζεται αστάθεια Rayleigh-plateau, το οποίο εμφανίζει τη φυσική τάση για ένα ρεύμα υγρού να υποβληθεί σε μορφολογική μετατροπή σε μια σειρά από διακριτές σταγόνες. Το μελάνι που εφαρμόζεται στο CIJ είναι συνήθως ηλεκτρικά αγώγιμο ώστε να μπορεί να καθοδηγείται από ηλεκτρικά ή μαγνητικά πεδία. Κατά τη διαδικασία εκτύπωσης, τα περιττά σταγονίδια θα επανακυκλοφορούσαν. Το DOD inkjet, αντίθετα, παράγει ένα σταγονίδιο όταν

απαιτείται και η εναπόθεση σταγονιδίων επιτυγχάνεται μετατοπίζοντας το ακροφύσιο πάνω από την επιθυμητή θέση πριν εκτοξευθεί ένα σταγονίδιο. Σε γενικές γραμμές, το CIJ διαθέτει υψηλότερες συχνότητες παραγωγής σταγόνων, ενώ το inkjet DOD λειτουργεί σε χαμηλότερες συχνότητες, αλλά επιτυγχάνει μικρότερους όγκους πτώσης που οδηγούν σε υψηλότερη ανάλυση εκτύπωσης. Ωστόσο, το CIJ σε βιολογικές εφαρμογές έχει αρκετά ζητήματα στειρότητας με ανακυκλοφορία μελανιού και σπατάλη εάν το ανεπιθύμητο μελάνι απορριφθεί. Ως εκ τούτου, οι περισσότερες προηγούμενες έρευνες βασισμένες στην τεχνολογία inkjet χρησιμοποίησαν την προσέγγιση DOD.

Η βιοεκτύπωση inkjet DOD μπορεί περαιτέρω να χωριστεί σε θερμική, πιεζοηλεκτρική, ηλεκτροστατική κ.λπ. σύμφωνα με διαφορετικούς μηχανισμούς παρακίνησης σταγονιδίων. Η βιοεκτύπωση θερμικής μελάνης χρησιμοποιεί ελεγχόμενη παλμική τάση για να θερμάνει τοπικά τον θερμικό ενεργοποιητή (π.χ. αντίσταση φιλμ) σε υψηλή θερμοκρασία (συνήθως 200–300°C), η οποία οδηγεί σε μερική εξάτμιση, σχηματίζοντας μια μικρή φυσαλίδα, δημιουργώντας έτσι παλμό πίεσης για να ξεπεραστεί το βιολίμο η επιφανειακή τάση που πρέπει να εκτιναχθεί έξω από το στόμιο του ακροφυσίου καθώς η φυσαλίδα καταρρέει (Εικ. Α, Figure 12). Μετά την εκτίναξη, το βιομελάνι στο ακροφύσιο συμπληρώνεται υπό την συν-επιρροή της ψύξης του θερμικού ενεργοποιητή και του τριχοειδούς σιφωνισμού του ακροφυσίου. Παρά τις υψηλές θερμοκρασίες που μπορούν να μετουσιώσουν το υλικό υδρογέλης, ο χρόνος θέρμανσης είναι αρκετά μικρός ώστε η θέρμανση να μην έχει επιζήμια επίδραση στη σταθερότητα των βιοσυστατικών. Η βιοεκτύπωση με θερμική έγχυση μελάνης χρησιμοποιείται ευρέως σε διάφορα είδη βιολογικών προϊόντων, συμπεριλαμβανομένων πρωτεϊνών, κυττάρων κ.λπ. Η βιοεκτύπωση με πιεζοηλεκτρική έγχυση μελάνης, από την άλλη πλευρά, εφαρμόζει έναν πιεζοηλεκτρικό ενεργοποιητή για να σχηματίσει σταγονίδια. Μια ταχεία και αναστρέψιμη παραμόρφωση του πιεζοηλεκτρικού κρυστάλλου δημιουργείται όταν εφαρμόζεται παλμική τάση, η οποία προκαλεί ξαφνική αλλαγή στον όγκο του θαλάμου, με αποτέλεσμα τη διάδοση ακουστικών κυμάτων, παρέχοντας παλμό πίεσης για βιολίθωμα που απαιτείται για να υπερβεί την επιφανειακή τάση στο στόμιο του ακροφυσίου (Εικ. Β, Figure 12). Ομοίως, η ηλεκτροστατική βιοεκτύπωση inkjet εκμεταλλεύεται τη στιγμιαία αύξηση του όγκου για να επιτύχει εκτίναξη, με την οποία εφαρμόζεται παλμική τάση σε μια πλάκα και έναν κινητήρα, οδηγώντας σε μια κάμψη της πλάκας για εξώθηση βιομελανιού. Το πρωτότυπο αυτής της τεχνικής προήλθε από ένα εμπορικό ακροφύσιο inkjet με ηλεκτροστατική κίνηση. [20]

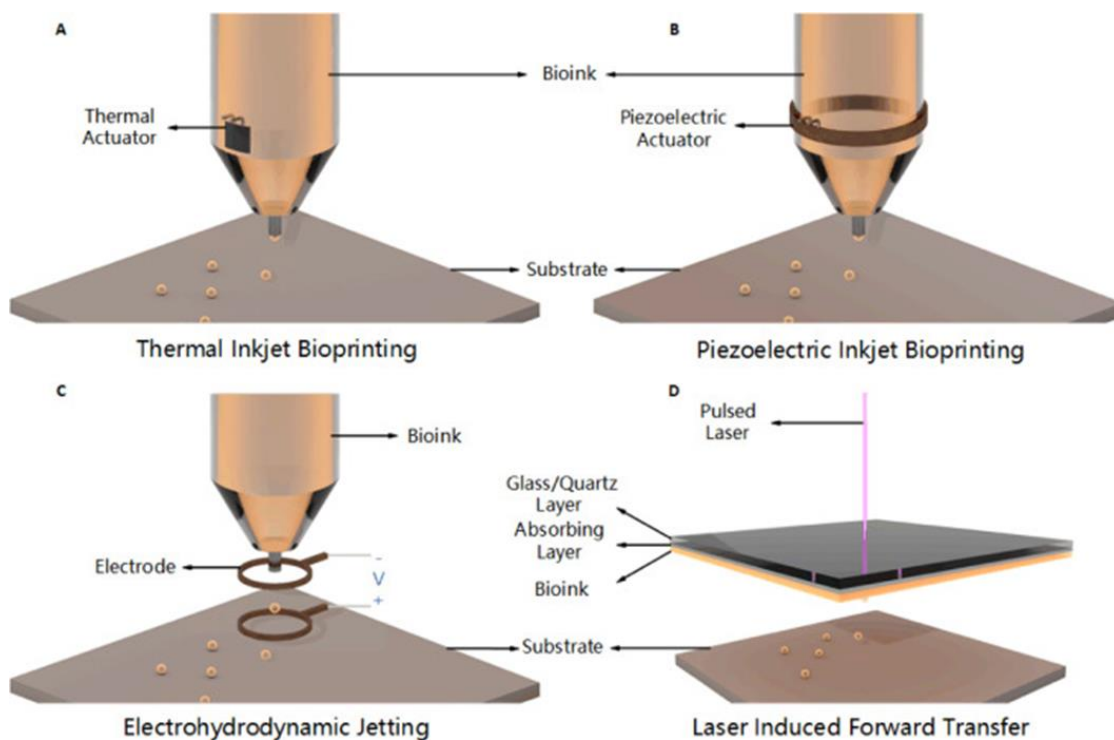


Figure 12 - (Η βιοεκτύπωση θερμικής μελάνης (Α), η βιοεκτύπωση με πιεζοηλεκτρική έγχυση μελάνης (Β), Ηλεκτροϋδροδυναμική εκτόξευση(Γ), Βιοεκτύπωση με laser (Δ))

2.2.2 Ηλεκτροϋδροδυναμική εκτόξευση

Η βιοεκτύπωση Inkjet παράγει σταγονίδια με εξώθηση βιολεκάνης μέσω των ακροφυσίων. Σε αυτή την περίπτωση, χρησιμοποιείται μια δραστική πίεση όταν χρησιμοποιείται ένα ακροφύσιο μικρής διαμέτρου, το οποίο περιστασιακά θα επηρεάσει τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Αντίθετα, το EHDJ εκμεταλλεύεται ένα ηλεκτρικό πεδίο, το οποίο προφανώς θα απέφευγε την υπερβολική πίεση στο βιομελάνι. Η αρχή λειτουργίας του EHDJ απεικονίζεται στο (Εικ. Γ, Figure 12). Αρχικά, γεμίστε το μεταλλικό ακροφύσιο με βιομελάνη για να σχηματιστεί ένας σφαιρικός μηνίσκος στην άκρη του ακροφυσίου λόγω επιφανειακής τάσης. τότε εφαρμόζεται υψηλή τάση μεταξύ ακροφυσίου και υποστρώματος για να παραχθεί ένα ηλεκτρικό πεδίο, που οδηγεί στη συσσώρευση κινητών ιόντων στον μηνίσκο. Ως αποτέλεσμα, ηλεκτροστατικές απωθήσεις μεταξύ των ιόντων παραμορφώνουν τον μηνίσκο σε κώνο Taylor. Τα σταγονίδια εκτοξεύονται όταν οι ηλεκτροστατικές τάσεις ξεπεράσουν την επιφανειακή τάση κάτω από μια αρκετά υψηλή τάση. Σύμφωνα με την τάση που αλλάζει από χαμηλή σε υψηλή, οι τρόποι του βιομελανιού φαίνεται να είναι διάφορες συνθήκες: μικρο-στάγδην, διακοπτόμενη εκτόξευση, εκτόξευση Taylor, ασταθής κατάσταση, βλάβη κ.λπ. Οι περισσότεροι βιοεκτυπωτές που βασίζονται σε EHDJ χρησιμοποιούν κατάλληλη τάση για την παραγωγή ανεξάρτητων,

διακριτά σταγονίδια. Μελέτες έχουν δείξει ότι παράγοντες όπως η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, η συγκέντρωση των κυττάρων, η σύνθεση βιολεκάνης κ.λπ. που εφαρμόζονται στο EHDJ θα επηρεάσουν τη μακροπρόθεσμη βιωσιμότητα των κυττάρων μετά την εκτύπωση. Η διακύμανση της τάσης θα επηρέαζε το μέγεθος των σταγονιδίων (συνήθως η υψηλότερη τάση οδηγεί σε μικρότερο μέγεθος σταγονιδίων) και η σύνθεση και η συγκέντρωση του βιομελανιού θα επηρεάσει τη μετάδοση του υλικού μεταξύ των κυττάρων. Το μέγεθος των σταγονιδίων και η συγκέντρωση των κυττάρων επηρεάζουν επίσης τον αριθμό των κυττάρων ανά σταγόνα. Όταν το μέγεθος των σταγονιδίων είναι μεγαλύτερο από 400 μm , η επίδραση της διάδοσης του υλικού μειώνεται σημαντικά. Γενικά, το EHDJ αποφεύγει την υπερβολική πίεση που θα ήταν επιβλαβής για τα κύτταρα και είναι ιδιαίτερα κατάλληλο για εκτύπωση βιομελάνης με μικρό στόμιο, υψηλή αναλογία βάρους/όγκου ή υψηλή συγκέντρωση κυττάρων. [20]

2.2.3 Βιοεκτύπωση με laser

LAB μια κατηγορία διαδικασίας εκτύπωσης χωρίς επαφή, χωρίς ακροφύσια για την ακριβή εναπόθεση βιολογικών υλικών σε ένα υπόστρωμα, συμπεριλαμβανομένων LGDW, LIFT, AFA-LIFT, βιολογικής επεξεργασίας λείζερ (BioLP), άμεσης γραφής με παλμική εξάτμιση λείζερ με υποβοήθηση μήτρας (MAPLE-DW), κ.λπ. Μεταξύ αυτών, οι τεχνολογίες AFA-LIFT, BioLP, MAPLE-DW έχουν βελτιστοποιηθεί από το LIFT για διαφορετικά σενάρια εφαρμογών.

Το 1999, οι Odde και Renn χρησιμοποίησαν οπτικές δυνάμεις που προκαλούνται από λείζερ για να εναποθέσουν ζωντανά κύτταρα με μοτίβο 2D, η οποία ονομάζεται άμεση γραφή καθοδήγησης με λείζερ. Η αρχή του LGDW είναι ότι μια ασθενώς εστιασμένη δέσμη λείζερ (π.χ. συντονισμένη δέσμη λείζερ διόδου με μήκος κύματος 800 nm) κατευθύνεται προς ένα αιώρημα κυψέλης, παγιδεύει οπτικά τα κύτταρα και τα οδηγεί σε ένα υπόστρωμα. Μια δύναμη κλίσης δημιουργείται όταν τα κύτταρα αλληλεπιδρούν με το φως μέσω της οποίας έλκονται τα κύτταρα στο κέντρο του φωτός και τα καθοδηγεί μεταφέροντάς τα σε ένα υπόστρωμα (π.χ. μια καλυπτρίδα) κατά μήκος της αξονικής κατεύθυνσης. Η βασική παράμετρος αυτής της τεχνολογίας είναι οι διαφορετικοί δείκτες διάθλασης των κυττάρων και του περιβάλλοντος υγρού. Ως εκ τούτου, πολύ λίγα συμβατά υλικά και βιολογικά μπορούν να εφαρμοστούν στο LGDW, με αποτέλεσμα σχεδόν καμία μελέτη να μην έχει αναφερθεί τα τελευταία χρόνια.

Το LIFT χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά για τη μεταφορά μετάλλων, τώρα χρησιμοποιείται για την εναπόθεση βιοϋλικών όπως πολυπεπτίδιο, DNA, κύτταρα. Όπως φαίνεται στην Εικ. D, Figure 12, ένας βιοεκτυπωτής που

βασίζεται στο LIFT έχει συνήθως τρία κύρια εξαρτήματα: μια πηγή παλμικού λέιζερ, μια δομή κορδέλας επικαλυμμένη με βιομελάνη και ένα υπόστρωμα λήψης. Η δομή της κορδέλας περιέχει συχνά ένα ενδιάμεσο στρώμα που απορροφά λέιζερ (συνήθως κατασκευασμένο από χρυσό ή τιτάνιο, που βρίσκεται μεταξύ του στρώματος γυαλιού/χαλαζία και του στρώματος βιολεκάνης), ανάλογα με τις οπτικές ιδιότητες και το μήκος κύματος λέιζερ του βιομελανιού. Η πηγή παλμικού λέιζερ είναι συνήθως ένα λέιζερ νανοδευτερόλεπτου με μήκος κύματος υπεριώδους ή σχεδόν υπεριώδους. η δομή της κορδέλας είναι βασικά ένα στρώμα γυαλιού/χαλαζία, το οποίο είναι διαφανές στο μήκος κύματος της ακτινοβολίας λέιζερ, με ένα στρώμα θερμοευαίσθητου βιολεκάνης (τα κύτταρα στο βιομελάνι είτε προσκολλώνται στο βιοπολυμερές είτε είναι ομοιόμορφα εγκλωβισμένα σε υδρογέλη) πάνω του. το υπόστρωμα υποδοχής, το οποίο είναι επικαλυμμένο με βιοπολυμερές ή κυτταρικό μέσο για να εξασφαλιστεί η προσκόλληση και η επακόλουθη ανάπτυξη των μεταφερόμενων κυττάρων, βρίσκεται κάτω από την επίστρωση βιολεκάνης και χρησιμοποιείται για τη λήψη σταγονιδίων που εκτοξεύονται με υψηλή ταχύτητα. Η αρχή του LIFT είναι ότι το εστιασμένο παλμικό λέιζερ κατευθύνεται στο απορροφητικό στρώμα της δομής της κορδέλας κατά την εκτύπωση, με αποτέλεσμα την τοπική εξάτμιση και το σχηματισμό φυσαλίδων υψηλής πίεσης, ωθώντας το υλικό που περιέχει το στοιχείο προς το υπόστρωμα υποδοχής. Η φυσική εξήγηση είναι ότι αυτή η περιοχή βρίσκεται σε κατάσταση δόνησης με υψηλή ενέργεια μετά τη λήψη της ενέργειας λέιζερ, η διαδικασία της μετάβασής της στη θεμελιώδη κατάσταση θα απελευθέρωσε τοπικά θερμότητα που προκαλεί την εξάτμιση του βιομελανιού (ή του ενδιάμεσου στρώματος), με αποτέλεσμα την έγχυση. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας μπορεί να συνοδεύονται από αφαίρεση, παραγωγή πλάσματος, θερμοακουστικά φαινόμενα, επομένως οι παράμετροι της ακτινοβολίας λέιζερ πρέπει να ελέγχονται με ακρίβεια. [20], [21]

Αρκετές άλλες μέθοδοι βιοεκτύπωσης με λέιζερ όπως AFA-LIFT, BioLP, MAPLE-DW, προέρχονται από το LIFT. Τα δύο πρώτα χρησιμοποιούν παλμικό λέιζερ υψηλής τάσης και φιλμ μετάλλου/οξειδίου μετάλλου ως ενδιάμεσο στρώμα, ενώ το δεύτερο χρησιμοποιεί παλμικό λέιζερ χαμηλής πίεσης και υδρογέλες θυσίας (π.χ. Matrigel) ως ενδιάμεσο στρώμα. Οι Horp et al. χρησιμοποίησε για πρώτη φορά το AFA-LIFT σε κυτταρική εκτύπωση το 2005, όπου το απορροφητικό στρώμα του είναι παχύτερο (100 nm) σε σύγκριση με το παραδοσιακό LIFT. Το BioLP εφαρμόστηκε για πρώτη φορά από τους Barron et al. το 2004 για να χαρτογραφήσει πολλαπλά πρότυπα βιολογικών υλικών με υψηλή ταχύτητα και υψηλή αναπαραγωγικότητα [98]. Εκτός από το παχύ στρώμα απορρόφησης παρόμοιο με το AFA-LIFT (75–100 nm), περιλαμβάνει επίσης κινητή πλατφόρμα λήψης και κάμερα CCD για εντοπισμό της κυτταρικής εκτύπωσης. Το MAPLE-DW εφαρμόστηκε για πρώτη φορά το 2001 στον τομέα

της βιοεκτύπωσης. Χρησιμοποίησαν παλμικό λέιζερ χαμηλής ισχύος (υπεριώδες ή σχεδόν υπεριώδες) και στρώμα μεταφοράς ενσωματωμένο στη μήτρα για να προωθήσουν την απορρόφηση του λέιζερ και τη μεταφορά ενέργειας.

Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα του LAB έγκειται στην ικανότητά του να εκτυπώνει μοτίβα από βιοϋλικά με υψηλή ταχύτητα και υψηλή ακρίβεια (κλίμακα μικρού μήκους), και ο συνδυασμός συστήματος CAD/CAM στη διαδικασία εκτύπωσης μπορεί να βελτιώσει περαιτέρω την ακρίβεια εκτύπωσης (μονοκύτταρο ή κοντά σε ένα κελί). Τέτοια υψηλή ακρίβεια καθιστά δυνατή τη χρήση συστοιχιών κυττάρων από τη μηχανική ιστών που συνδυάζει κύτταρα και αντίστοιχους βιολογικούς παράγοντες για την προσομοίωση της ανισοτροπίας και της πολυπλοκότητας των ιστών. Το LAB είναι επίσης σε θέση να βιοτυπώνει με ακρίβεια διάφορα συστατικά των ιστών (ειδικά των κυττάρων) και να αναπαράγει τη χωρική τους δομή, παρέχοντας έναν τρόπο αναπαραγωγής φυσικών ιστών και οργάνων με ακριβή δομή και λειτουργία. Επιπλέον, ακριβής συν-καλλιέργεια, όπως σύνθετες δομές κυττάρων, μπορεί επίσης να επιτευχθεί με τον έλεγχο της χωρικής κατανομής διαφορετικών τύπων κυττάρων μέσω του LAB. Επιπλέον, το LAB, ως ένα είδος τεχνολογίας χωρίς επαφή και χωρίς ακροφύσια, αποφεύγει εγγενώς προβλήματα όπως το φράξιμο των ακροφυσίων, το μη αναπαραγωγίμο λόγω του ιξώδους του διαλύματος, της διασταυρούμενης μόλυνσης ή της ζημιάς στο υπόστρωμα. Παράγει μικρότερα σταγονίδια (από nL σε fL) και έχει μεγαλύτερη ακρίβεια, σε σύγκριση με τη βιοεκτύπωση inkjet. Το βιομελάνι του έχει υψηλότερη συγκέντρωση κυττάρων που μειώνει τον χρόνο ωρίμανσης, σε σύγκριση με την τεχνολογία βιοεκτύπωσης με ακροφύσια. Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι το LAB είναι επίσης ευεργετικό για την κατασκευή πολυστρωματικής κυτταρικής δομής και είναι πιο κατάλληλο για *in situ* και *in vivo* βιοεκτύπωση. [21]

2.2.4 Βιοεκτυπωτές με βάση σταγονίδια:

Σε σύγκριση με την ανάπτυξη εμπορικών βιοεκτυπωτών που βασίζονται σε εξώθηση, δεν υπάρχουν πολλοί βιοεκτυπωτές με βάση σταγονίδια που διατίθενται στην αγορά.

Ο πρώτος βιοεκτυπωτής inkjet αναπτύχθηκε από τον Thomas Boland από το Πανεπιστήμιο Clemson το 2003 τροποποιώντας έναν τυπικό εκτυπωτή inkjet της HP. Σχετικά διπλώματα ευρεσιτεχνίας κατευθύνθηκαν στην Organovo στις ΗΠΑ, η οποία δεν έχει διαθέσει ακόμη στο εμπόριο κανέναν βιοεκτυπωτή inkjet. Οι περισσότεροι από τους βιοεκτυπωτές που βασίζονται στην τεχνολογία inkjet είναι σπιτικοί ή τροποποιημένοι τυπικοί εκτυπωτές inkjet σε εργαστήρια. Για παράδειγμα, οι Nishiyama et al. από το Πανεπιστήμιο της Toyama κατασκεύασε έναν ηλεκτροστατικό βιοεκτυπωτή inkjet το 2009 συνδυάζοντας βηματικούς

κινητήρες και ακροφύσια Sea-Jet™ της EPSON, τα οποία πέτυχαν να κατασκευάσουν δομή κοίλου κυλίνδρου. Εκτός από τα ακροφύσια Sea-Jet™, το DMP-2800 από τη Fujifilm Dimatrix, οι πιεζοηλεκτρικές κεφαλές εκτύπωσης inkjet Xaar-126, κ.λπ. έχουν επίσης αναφερθεί ότι βιοεκτυπώνουν μια ποικιλία κυττάρων και άλλων βιολογικών προϊόντων. Το LabJet-Bio από τη Microjet στην Ιαπωνία (ιδρύθηκε το 1997) είναι ένα πιεζοηλεκτρικό σύστημα διανομής inkjet με υψηλή ακρίβεια. Μπορεί να εφαρμοστεί στη βιοεκτύπωση πρωτεϊνών, αντισωμάτων, ενζύμων, κυττάρων και αντιδραστηρίων, παραγωγής βιο-τσιπ και βιο-αισθητήρων, σχεδιασμό κυκλώματος με νανομεταλλική μελάνη, έλεγχο φαρμάκων και δοκιμές κατασκευής κυτταρικών φύλλων. Η γαλλική εταιρεία Roetis ανέπτυξε εμπορικούς βιοεκτυπωτές βασισμένους στην τεχνολογία LIFT. Αλλά τώρα αυτή η εταιρεία δεν πουλά πλέον τις εκτυπωτικές της συσκευές επειδή το επιχειρηματικό της μοντέλο μεταφέρθηκε για να παρέχει υπηρεσίες όπως η βιοεκτύπωση ανθρώπινου δέρματος για μεγάλες εταιρείες καλλυντικών, χημικών και φαρμακευτικών προϊόντων. [20]

Εκτός από τις τεχνολογίες βιοεκτύπωσης inkjet, EHDJ ή LAB, η Cyfuse Biomedical (ιδρύθηκε το 2010) με έδρα το Τόκιο της Ιαπωνίας, ανέπτυξε ένα σύστημα βιοεκτύπωσης Regenova βασισμένο σε μια μέθοδο που ονομάζεται "Kenzan" το 2012, το οποίο θα μπορούσε να επιτύχει χρησιμοποιώντας μόνο κύτταρα για τη βιοεκτύπωση δομών. Χρησιμοποιώντας το λογισμικό εκτύπωσης της εταιρείας, αυτό το σύστημα εκτυπώνει κυτταρικές σφαίρες σε μια λεπτή συστοιχία βελόνων για καλλιέργεια, τοποθετώντας κάθε σφαίρα σε μια συγκεκριμένη σειρά και επιτρέποντας στα κύτταρα να συντηχθούν αυτόνομα χωρίς την ανάγκη κολλαγόνου ή υδρογέλης. Αυτή η συσκευή μπόρεσε να εκτυπώσει τρισδιάστατα αιμοφόρα αγγεία διαμέτρου 2–3 mm, καθώς και νεύρα, ηπατικό ιστό για έλεγχο και δοκιμή φαρμάκων, χόνδρο και υποχόνδριο οστό. Επιπλέον, υπάρχουν και άλλοι εμπορικοί βιοεκτυπωτές που βασίζονται σε σταγονίδια, όπως το Autodrop Compact από τη Microdrop Technologies στα γερμανικά, το jetlab 4 από τη MicroFab Technologies στις ΗΠΑ, το CellJet από την Digilab στις ΗΠΑ κ.λπ.



Figure 13 - (Thomas Bolond μαζί με τον πρώτο βιοεκτυπωτή inkjet)

2.3. Βιοεκτύπωση με βάση το φωτοπολυμερισμό

Η βιοεκτύπωση με βάση τη φωτοπολυμερισμό, κυριολεκτικά, είναι μια προσέγγιση βιοεκτύπωσης που χρησιμοποιεί φωτοπολυμερισμό χαρακτηριστικό των φωτοευαίσθητων πολυμερών υπό επακριβώς ελεγχόμενο φωτισμό. Σε σύγκριση με άλλες προσεγγίσεις βιοεκτύπωσης, έχει συνήθως σημαντική βελτίωση στην ανάλυση και την ταχύτητα εκτύπωσης. Επιπλέον, έχει ένα εκ γενετής πλεονέκτημα ότι δεν ανησυχεί για την απόφραξη των ακροφυσίων ή την τάση διάτμησης που επηρεάζει τη βιωσιμότητα των κυττάρων.

Η πιο κοινή χρήση της βιοεκτύπωσης με βάση τη φωτοπολυμερισμό είναι η κατασκευή ικριωμάτων χωρίς κύτταρα, για κύτταρα που πρόκειται να σπαρθούν μετά την εκτύπωση. Επί του παρόντος, ωστόσο, έχει επίσης αναφερθεί βιοεκτύπωση με βάση τη φωτοπολυμερισμό με κύτταρα. Σύμφωνα με διαφορετικούς τρόπους σάρωσης φωτός, η βιοεκτύπωση που βασίζεται σε φωτοπολυμερισμό μπορεί περαιτέρω να ταξινομηθεί σε στερεολιθογραφία (SLA) και επεξεργασία ψηφιακής φωτός (DLP) [21]

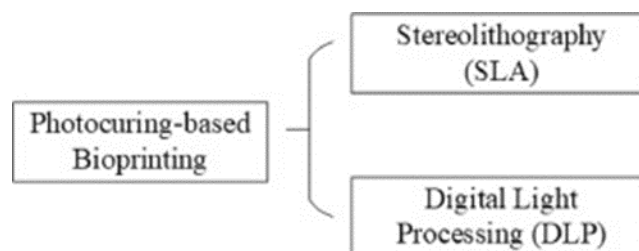


Figure 14 - (Τα 2 είδη με βάση το φωτοπολυμερισμό SLA/DLP)

2.3.1 SLA

Το SLA είναι η πρώτη εμπορική τεχνολογία τρισδιάστατης εκτύπωσης, η οποία εφευρέθηκε από τον Charles W. Hull το 1984. Δημιούργησε τρισδιάστατες δομές σαρώνοντας επιλεκτικά μια δεξαμενή φωτοευαίσθητου υλικού με υπεριώδεις φως, επιτρέποντάς του να ωριμάσει στρώμα προς στρώμα. Στην περιοχή της βιοεκτύπωσης, το SLA εφαρμόζεται συχνά για την εκτύπωση ικριωμάτων ακριβούς ιστού με ελεγχόμενη γεωμετρία και πορώδη δομή λόγω της υψηλής ανάλυσης του. Μόλις το 2004 η ομάδα του Boland στο Πανεπιστήμιο Clemson εφάρμοσε την εκτύπωση SLA φορτωμένης κυψέλης με έναν εμπορικό εκτυπωτή SLA (SLA-250, 3D Systems, Valencia, CA). Μετά από αυτό, περισσότερες ερευνητικές ομάδες βελτιστοποίησαν περαιτέρω την τεχνολογία SLA, γεγονός που οδήγησε στην περαιτέρω επέκτασή της στον τομέα της βιοεκτύπωσης. Προς το παρόν, ωστόσο, η τεχνολογία SLA έχει εφαρμοστεί περισσότερο στην εκτύπωση σκαλωσιάς παρά στη βιοεκτύπωση με κελί. Για έναν τυπικό βιοεκτυπωτή SLA, το βιομελάνι γεμίζεται σε μια δεξαμενή με μια πλατφόρμα που κινείται πάνω και κάτω. Κατά την εκτύπωση του πρώτου στρώματος, η πλατφόρμα μετατοπίζεται στην επιφάνεια του διαλύματος βιομελάνης και το υγρό στερεοποιείται κατά την έκθεση στο λέιζερ UV. Θεωρητικά, είναι η ενέργεια που παρέχει το λέιζερ που οδηγεί στο σχηματισμό ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ γειτονικών πολυμερών αλυσίδων σε διάλυμα βιολεκάνης. Για κάθε στρώμα, σάρωση λέιζερ μέσω ενός μοτίβου 2D. Αντί να εστιάζει απευθείας στο διάλυμα μελάνης, το λέιζερ ανακλά από έναν καθρέφτη για να φτάσει στο κατάλληλο σημείο κινούμενος προς τις κατευθύνσεις X και Y. Βυθίζοντας την πλατφόρμα στη δεξαμενή υγρού και μετακινώντας την πάνω/κάτω σε απόσταση ίση με το ύψος του στρώματος, το πρόσφατα σκληρυμένο διάλυμα μελάνης κολλάει σταθερά στο προηγούμενο στρώμα, αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι να ολοκληρωθεί η τελική τρισδιάστατη κατασκευή. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η περίσσεια του βιομελανιού πρέπει να καθαριστεί και απαιτείται περαιτέρω φωτοπολυμερισμός μετά την εκτύπωση. Παράγοντες όπως η ισχύς λέιζερ, η ταχύτητα σάρωσης, ο χρόνος έκθεσης, το μέγεθος κηλίδας λέιζερ, το μήκος κύματος λέιζερ, κ.λπ. θα καθόριζαν την ακρίβεια του SLA. [21]

2.3.2 DLP

Διαφέρει από το SLA, το DLP στερεοποιεί ένα πλήρες στρώμα ταυτόχρονα αντί για σημείο προς σημείο. Το Σχήμα δείχνει έναν τυπικό βιοεκτυπωτή DLP από κάτω προς τα πάνω, που σημαίνει ότι εκτυπώνετε πρώτα το κάτω στρώμα, κάθε νέο στρώμα είναι πάνω από το προηγούμενο. Αποτελείται από τρία συστατικά:

ένα δοχείο γεμάτο με βιομελάνη που περιλαμβάνει φωτοσκληρυνόμενη υδρογέλη ή φωτοευαίσθητη ρητίνη που μπορεί να στερεοποιηθεί εκτεθειμένη σε λείζερ συγκεκριμένου μήκους κύματος (συνήθως υπεριώδες φως), φωτοεκκινητή, κύτταρα κ.λπ. μια πλατφόρμα ανύψωσης εξασφαλίζει τη μείωση ενός ορισμένου ύψους (ίσο με το πάχος μιας στρώσης) μετά την ολοκλήρωση της έκθεσης ενός στρώματος, καθιστώντας το ένα νέο στρώμα για φωτοπολυμερισμό. και ένα σύστημα απεικόνισης πάνω από το δοχείο. [20]

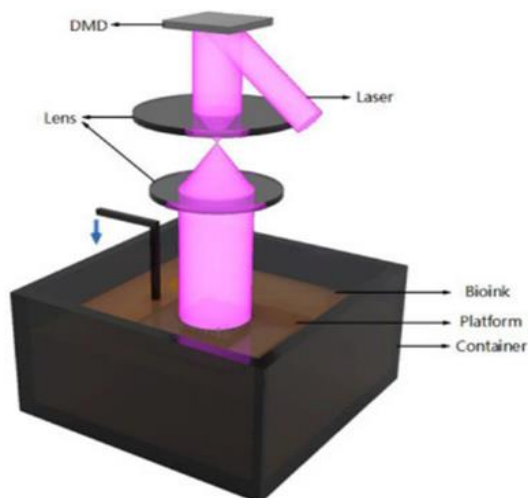


Figure 15 - (DLP εκτυπωτής)

2.3.3 Βιοεκτυπωτές με βάση το φωτοπολυμερισμό

Οι περισσότεροι εμπορικοί εκτυπωτές που βασίζονται σε φωτοπολυμερισμό (SLA ή DLP) μπορούν να τροποποιηθούν σε βιοεκτυπωτές χρησιμοποιώντας ένα μείγμα βιοσυμβατών ρητινών ως βιομελάνι, η οποία είναι η προσέγγιση που υιοθετείται από τις περισσότερες ερευνητικές ομάδες που βασίζονται σε φωτοπολυμερισμό παγκοσμίως. Αξίζει να αναφερθεί ότι η ομάδα του καθηγητή Shaochen Chen στο Πανεπιστήμιο της Καλιφόρνια στο Σαν Ντιέγκο χρησιμοποιεί εδώ και καιρό το σύστημα δυναμικής οπτικής στερεολιθογραφίας προβολής (DOPsL) σε έρευνες. Λόγω της ευρείας εφαρμογής, έχει λάβει μεγάλη προσοχή από τον ακαδημαϊκό χώρο και είναι μια αντιπροσωπευτική ομάδα που εφαρμόζει την τεχνολογία DLP στον τομέα της βιοεκτύπωσης. [20]

Κεφάλαιο 3 - Υλικά

Τα υλικά που χρησιμοποιούνται στην 3D βιοεκτύπωση για να παρασκευάσουν έναν ζωντανό ιστό ονομάζονται **bio-inks** (βιομελάνια). Η πολύ εξειδικευμένη κατηγορία αυτών των μελανιών αποτελείται από κύτταρα σε συνδυασμό με άλλα βιοϋλικά που τα περικλείουν (hydrogels, biopolymer gels κ.α) και τα προστατεύουν κατά την διαδικασία εκτύπωσης. Τα bio-inks πρέπει να έχουν παρόμοιες μηχανικές, χημικές, βιολειτουργικές και μορφολογικές ιδιότητες με τους πραγματικούς ιστούς και όργανα. Πιο συγκεκριμένα, το ιδανικό bio-ink θα πρέπει να έχει τις εξής ιδιότητες: άριστη εκτυπωσιμότητα, υψηλή μηχανική συμπεριφορά και σταθερότητα, παρόμοιο ρυθμό βιοδιάσπασης με την ανάπτυξη του ιστού, μη τοξικότητα, να έχει ιδιότητες για την προσκόλληση των κυττάρων και να μην διαλύεται στο καλλιεργητικό υλικό. Επιπλέον θα πρέπει να παρασκευάζεται γρήγορα και όχι με δυσθεώρητο κόστος. [22],[23]

3.1 Πολυμερή

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, ένα από τα πιο συχνά υλικά που χρησιμοποιούνται ως bioink είναι τα πολυμερή. Η ευρεία τους χρήση οφείλεται στο χαμηλό κόστος τους, στην αυξημένη βιοσυμβατότητά τους, στην αποδόμησή τους και στην ασφάλεια κατά την επεξεργασία τους. Ένα ακόμη πλεονέκτημα είναι η ικανότητά τους να αλλάζουν μορφή. Για παράδειγμα, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως νήματα (filaments) για fused-deposition τεχνικές ή ως σκόνη για τεχνολογίες laser. Τα υδατοδιαλυτά πολυμερή, ευρέως γνωστά ως hydrogels (υδρογέλες), χρησιμοποιούνται επίσης ως bioinks για βιοεκτυπώσεις [24]. Τα hydrogels είναι τρισδιάστατα υδρόφιλα πολυμερή υλικά που δημιουργούνται με χημικούς (μη αναστρέψιμα hydrogels) ή με φυσικούς τρόπους (αναστρέψιμα hydrogels), και επιδεικνύουν εκπληκτική ικανότητα στο να απορροφούν μεγάλες ποσότητες νερού χωρίς να διαλύονται. Ακόμη, είναι αρκετά μαλακά και ελαστικά υλικά, χρησιμοποιούνται κυρίως πάνω από την θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης και είναι διαπερατά από οξυγόνο, θρεπτικά συστατικά και διάφορους άλλους μεταβολιτές [25],[26]. Τα τελευταία χρόνια τα hydrogels χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο σε βιοϊατρικές εφαρμογές, όπως η 3D βιοεκτύπωση. Όσον αφορά στον κλάδο της μηχανικής των ιστών, η δημιουργία ικριωμάτων από hydrogels είναι ιδιαίτερης σημασίας λόγω της διαπερατότητάς τους σε θρεπτικά συστατικά, οξυγόνο και νερό. [27]

Όπως παρουσιάστηκε στην προηγούμενη παράγραφο, τα hydrogels μπορεί να είναι τόσο συνθετικά όσο και φυσικά ή υβριδικά (συνθετικά και φυσικά μαζί).

Τα φυσικά πολυμερή (π.χ. κολλαγόνο, ζελατίνη, υαλουρονικό οξύ, fibrin, silk, alginate) παρουσιάζουν βιοχημικές ομοιότητες με την φυσική εξωκυττάρια μήτρα (ECM; extracellular matrix), έχουν όμως περιορισμένες μηχανικές ιδιότητες, πιθανή ανοσογονικότητα και απαιτούν συνήθως πολύπλοκες διαδικασίες καθαρισμού. Αντιθέτως, τα συνθετικά hydrogels (π.χ. πολυαιθυλενογλυκόλη PEG, πολυοξειδίου του βουτελενίου PBO, πολυξυλικό αιθυλένιο PVA, PF, πολυοξειδίου του αιθυλενίου PEO) παρουσιάζουν ελεγχόμενες και υψηλότερα μηχανικές ιδιότητες, έχουν όμως περιορισμένη βιοσυμβατότητα, ικανότητα βιοδιάσπασης και ικανότητα αλληλεπίδρασης με τα κύτταρα. [28]-[31]

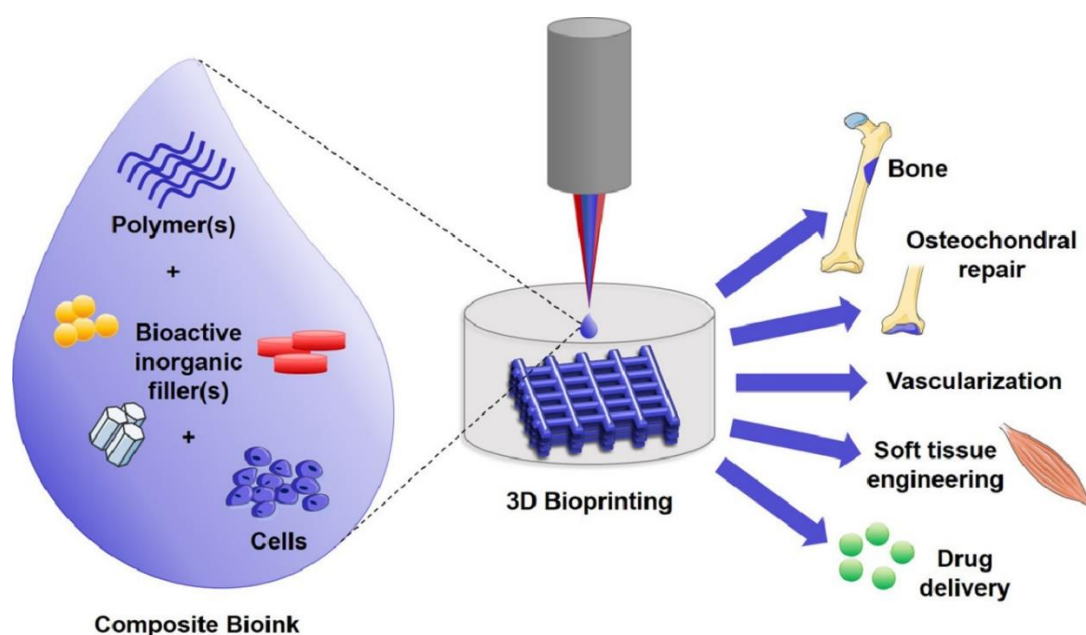


Figure 16 - Bioinks and 3D Bioprinting [8]

3.1.1 Κολλαγόνο

Το κολλαγόνο είναι ένα από τα πιο περιζήτητα και πιο εκτενώς μελετημένα πολυμερή σε εφαρμογές της μηχανικής των ιστών. Αποτελεί το κύριο συστατικό του μυοσκελετικού ιστού και της εξωκυττάριας μήτρας (ECM) των περισσότερων ιστών, ενώ τα ικρίωματα κολλαγόνου έχουν ελάχιστες αναστολογικές αντιδράσεις λόγω του ότι είναι (σ.σ το κολλαγόνο) μία τριπλή-ελικοειδής βιοσυμβατική πρωτεΐνη. Επίσης, το κολλαγόνο βοηθά δραστικά στην ανάπτυξη, στην προσκόλληση και στην πρόσφυση των κυττάρων. Αν και το κολλαγόνο τύπου Ι έχει δοκιμαστεί στο bioprinting, έχει κάποιους περιορισμούς

κατά την χρήση του. Πιο αναλυτικά, το κολλαγόνο τύπου I παραμένει σε υγρή κατάσταση σε χαμηλές θερμοκρασίες και σχηματίζει ινώδεις διατάξεις όσο η θερμοκρασία αυξάνεται. Η ολική ζελατινοποίηση (gelation) μπορεί να διαρκέσει έως και μισή ώρα στους 37° C, που σημαίνει ότι είναι αργή, και το γεγονός αυτό μπορεί να αποδειχθεί προβληματικό για την 3D βιοεκτύπωση. Ακόμη, μελέτες για την εκτυπωσιμότητα και τις ρεολογικές ιδιότητες του κολλαγόνου με βάση το pH του, έδειξαν ότι η ακρίβεια του σχήματος των εκτυπωμένων κατασκευών κατά την διάρκεια της ζελατινοποίησης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το pH. [32],[33]

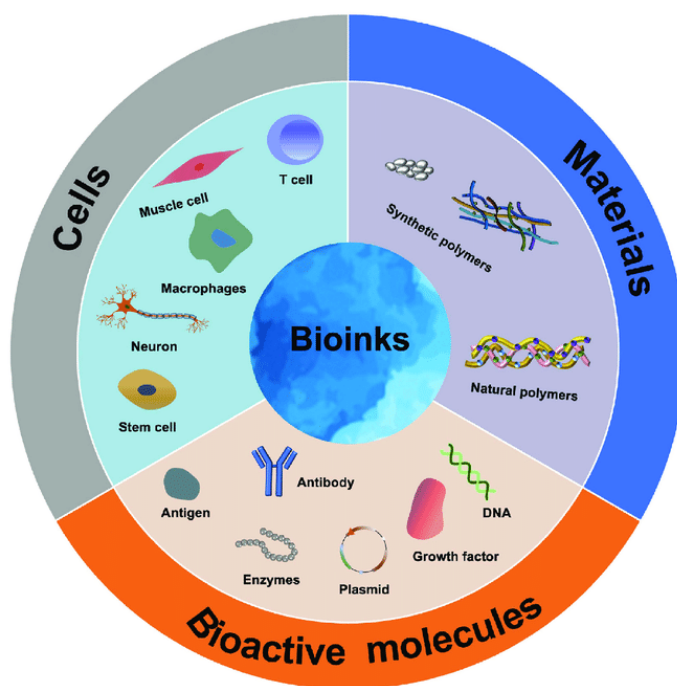


Figure 17 - Bioinks and their structure

3.1.2 Ινίκη – Fibrin

Η ινίκη (fibrin) είναι μία ζωτικής σημασίας πρωτεΐνης που συμμετέχει στην πήξη του αίματος και στην επούλωση πληγών [34]. Το ινωδογόνο (fibrinogen) είναι μία γλυκοπρωτεΐνη που παράγεται στο συκώτι και η ποσότητά του αυξάνεται έπειτα από ένα τραύμα. Μάλιστα, όταν υδρολύεται πολυμερίζεται σε ινίκη. Συνήθως, η ινίκη χρησιμοποιείται στον τομέα των drug delivery systems για την μεταφορά growth factors (GFs) και φαρμάκων αλλά και σε διάφορες εφαρμογές της μηχανικής ιστών για ικρίωματα. Τα gel ινίκης (που έχουν μικρότερο χρόνο πήξης), παρουσιάζουν ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά όπως η ικανότητα βιοδιάσπασης και ανάπτυξης των κυττάρων, η βιοσυμβατότητα, η

αναγέννηση των ιστών και η αγγειογένεση. Μερικά ακόμη πλεονεκτήματα της ινίκης είναι ότι έχει εξαιρετικές μηχανικές της ιδιότητες, χώρους σύνδεσης για άλλες πρωτεΐνες και growth factors. Ωστόσο, η ινίκη είναι ένα αρκετά ακριβό υλικό [35]-[37]. Σε έρευνες που έχουν γίνει σε ποντίκια, hydrogel ινίκης-ζελατίνης χρησιμοποιήθηκε ως βιοχαρτί για εφαρμογές σε bioprinting δέρματος και παρατηρήθηκε ότι είχε εξαιρετικές μηχανικές ιδιότητες, καλή προσκόλληση των κυττάρων και βελτίωσε τις βιολογικές ιδιότητες της δομής. Η παρουσία ινίκης στο βιοχαρτί συνέβαλε στην επούλωση του δέρματος του ποντικίου. [38]

3.1.3 Μετάξι – Silk

Υπάρχουν πολλά είδη μεταξιού που παράγονται από μεταξοσκώληκα και χρησιμοποιούνται στην μηχανική των ιστών, στην αναγέννηση χόνδρων, σε βιοαισθητήρες, σε οπτικούς οδηγούς κυμάτων και άλλες βιολογικές εφαρμογές [39]. Το 2017 όμως, χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά ανασυνδυασμένο μετάξι ως bioink. Το μετάξι από μεταξοσκώληκα αποτελείται από ινοΐνη (fibroin) και σερικίνη (sericin). Τα ικριώματα από ινοΐνη μεταξιού, σε σύγκριση με άλλα ικριώματα, έχουν μια σειρά από πλεονεκτήματα όπως υψηλή βιοσυμβατότητα, εξαιρετική μηχανική σταθερότητα, μη τοξικότητα και χαμηλή προσκόλληση βακτηρίων. Λόγω αυτών των ιδιοτήτων, τα bioinks που βασίζονται στο μετάξι είναι ιδιαίτερα δημοφιλή στην 3D βιοεκτύπωση. Ωστόσο έχουν και κάποια μειονεκτήματα, όπως είναι η ανάγκη αυτών των φυσικών πολυμερών για μίξη με άλλα πολυμερή προκειμένου να έχουν καλύτερες ρεολογικές ικανότητες. [40]

3.1.4 Χιτοζάνη – Chitosan

Η χιτοζάνη είναι ένα δημοφιλές πολυμερές σε εφαρμογές της μηχανικής των ιστών αφού χαρακτηρίζεται από βιοσυμβατότητα, αντιβακτηριδιακή δράση, ικανότητα βιοδιάσπασης και χαμηλό κόστος. Η χιτοζάνη είναι ένας πολυσακχαρίτης που προέρχεται από τη χιτίνη, μια ουσία των μαλακόστρακων. [41]

3.1.5 Άλατα αλγινικών οξέων – Alginate

Αν και υπάρχουν πολλά διαφορετικά υλικά που έχουν χρησιμοποιηθεί ως bioink, ένα από τα πιο γνωστά φυσικά hydrogels είναι τα αλγινικά. Ουσιαστικά είναι φυσικοί πολυσακχαρίτες με ιδιαίτερες ιδιότητες όπως η βιοσυμβατότητα, η χαμηλή τιμή και η συμβατότητα με πολλές μεθόδους βιοεκτύπωσης [42]. Μία

ακόμη ενδιαφέρουσα ιδιότητά τους είναι η ευκολία σχηματισμού τους. Τα αλγινικά είναι χρήσιμα στην μηχανική των ιστών, στα drug delivery systems και στην έγκλειση κυττάρων. Παρολ' αυτά, σε σχέση με άλλα φυσικά πολυμερή παρουσιάζουν χαμηλή προσκόλληση κυττάρων. Για την επίλυση αυτού το ζητήματος, κάποιοι ερευνητές χρησιμοποιούν ένα μίγμα αλγινικών με άλλα φυσικά πολυμερή, όπως είναι η ζελατίνη και το ινωδογόνο. [43]-[45]

3.1.6 Ζελατίνη

Η ζελατίνη είναι μία φυσική πρωτεΐνη που έχει αμφοτερική (amphoteric; (of a compound, especially a metal oxide or hydroxide) able to react both as a base and as an acid) συμπεριφορά λόγω της αλκαλικής και της οξινο-αμινο οξέων, και προέρχεται από την υδρόλυση του κολλαγόνου. Η ζελατίνη μπορεί να εξαχθεί από διάφορες πηγές. Πιο συγκεκριμένα, ζελατίνη από θηλαστικά έχει χρησιμοποιηθεί ως βιοϋλικό για αναπλαστικούς σκοπούς. Επίσης είναι μη-κυτταροτοξική, βοηθά την προσκόλληση των κυττάρων, υδατοδιαλυτή, βιοσυμβατική, βιοδιασπώμενη και με ανοσογονικότητα. Εξαιτίας αυτών των ιδιοτήτων, η ζελατίνη χρησιμοποιείται στην βιοεκτύπωση στην μορφή της ζελατίνης meth-acryloyl (GelMA). [46]-[48]

3.1.7 Υαλουρονικό οξύ

Το υαλουρονικό οξύ ή Υ.Ο είναι ένα ανιονικό βιοπολυμερές που βασίζεται στην D-glucuronic και D-N-acetylglucosamine μονάδων και έχει πολλές ομοιότητες με το κολλαγόνο τύπου I [49]. Το Υ.Ο είναι ένας πολυσακχαρίτης υψηλού μοριακού βάρους και αποτελεί το βασικό συστατικό της ECM [50]. Το υλικό αυτό παίζει σημαντικό ρόλο στην μηχανική των ιστών λόγω της εξαιρετικής βιοσυμβατότητάς του, της βιοαπορροφικότητας και της βιοαποδομησιμότητας. Επίσης, αποτρέπει τις θρομβώσεις, έχει υψηλή ανοσογονικότητα και την ικανότητα να σχηματίζει εύκαμπτα hydrogels.

3.2 Εξελιγμένα Bio-inks

Ορισμένες παράμετροι, όπως τα χημικά, τα φυσικά και τα χημικά χαρακτηριστικά έχουν άμεση επίδραση στον τρόπο που θα πραγματοποιηθεί μία βιοεκτύπωση αλλά και στις ιδιότητες των bioinks. Τα χαρακτηριστικά αυτά περιλαμβάνουν την ιξωδοελαστικότητα (viscoelasticity), την βιοδιάσπαση, την βιοσυμβατότητα, την κυτταροσυμβατότητα, το ιξώδες, τον βαθμό ενυδάτωσης την κινητική της ζελατινοποίησης και την ψευδοπλαστική ροή (το ιξώδες

μειώνεται με αύξηση των διατμητικών τάσεων). Για να προκύψει εξελιγμένο bioink, πρέπει να χρησιμοποιηθούν διαφορετικές μέθοδοι προκειμένου να αυξηθεί η εκτυπωσιμότητα και η κυτταροσυμβατότητα. Για παράδειγμα, κατά την διάρκεια της εξώθησης, τα bioinks με ψευδοπλαστική ροή έχουν διαφορετικές ιδιότητες, όπως χαμηλό ιξώδες όταν του ασκούνται υψηλές διατμητικές τάσεις. Τα προηγμένα bioink είναι ικανά να εμφανίσουν ψευδοπλαστικές ιδιότητες και χωρίζονται σε 5 κατηγορίες: 1) πολυστρωματικά bioinks, 2) έξυπνα bioinks, 3) αυτοσυναρμολογούμενα bioinks, 4) βιομοριακά bioinks και 5) bioinks νανοτεχνολογίας. [3]

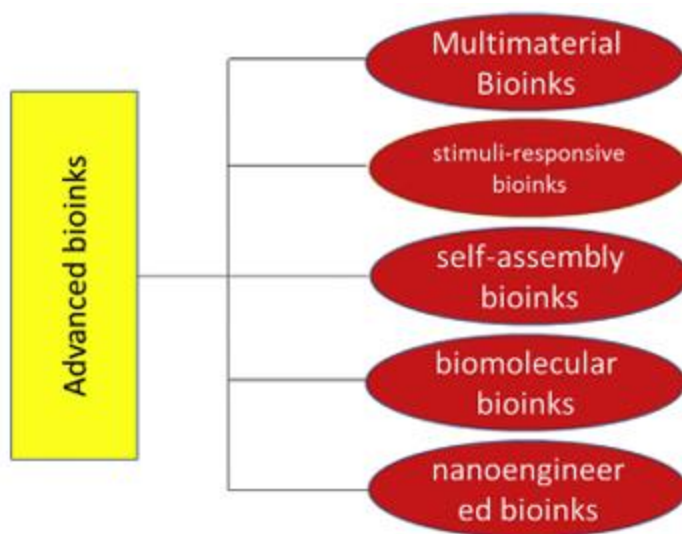


Figure 18 - Advanced Bioinks

3.2.1 Πολυστρωματικά Bioinks

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η δημιουργία προηγμένων bioinks πρέπει να αντιμετωπίσει δύο βασικές προκλήσεις προκειμένου να βελτιώσει την λειτουργικότητα των εκτυπωμένων ικριωμάτων: την εκτυπωσιμότητα διατηρώντας παράλληλα την μηχανική αντοχή και την ικανότητα να ενσωματώνει τα κύτταρα. Τα bioinks με μόνο ένα συστατικό είναι σχεδόν αδύνατο να ικανοποιήσουν αυτές τις απαιτήσεις και για αυτό οι έρευνες έχουν επικεντρωθεί στα πολυστρωματικά bioinks. Μερικούς από τους συνδυασμούς που έχουν πραγματοποιηθεί σε πρόσφατες έρευνες είναι η προσθήκη ιόντων ασβεστίου στα αλγινικά (αύξηση των μηχανολογικών ιδιοτήτων), η ανάμιξη κολλαγόνου τύπου I με αλγινικό νάτριο, και η ανάμιξη χιτοζάνης με μικροκρυσταλλικό υδροξυαπατίτη. [52],[53]

3.2.2 Έξυπνα Bioinks

Η μίμηση του φυσικού ιστού αποτελεί μία μεγάλη προκλήση στην έρευνα της βιοκατασκευής. Ως αποτέλεσμα, η εισαγωγή δυναμικών και έξυπνων bioinks ανοίγει νέα προοπτική στις μεθόδους 3D βιοεκτύπωσης. Μια άλλη τεχνολογία για την εκτύπωση φυσικού ιστού είναι η 4D βιοεκτύπωση. Η βιοεκτύπωση 4D έχει αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια, και σε αυτήν τη μέθοδο ο χρόνος θεωρείται ως η τέταρτη διάσταση και λαμβάνεται υπόψιν ως παράμετρος. Αξίζει όμως να σημειωθεί ότι ο χρόνος δεν αναφέρεται στην διάρκεια της εκτύπωσης αλλά στο γεγονός ότι τα τρισδιάστατα εκτυπωμένα βιοϋλικά (π.χ. τα κύτταρα) συνεχίζουν να αναπτύσσονται άκομη και μετά το πέρας αυτής. Τα υλικά που χρησιμοποιούνται για την 4D βιοεκτύπωση είναι έξυπνα και βιοσυμβατικά και αυτό τους δίνει την δυνατότητα να μπορούν να αλλάζουν τη λειτουργία τους ανάλογα με εξωτερικούς ερεθισμούς, όπως το μαγνητικό πεδίο, το νερό, η θερμοκρασία και άλλα. [54]-[57]

Όπως έχει αναφερθεί, τα hydrogels είναι τρισδιάστατα υλικά με φυσικούς και χημικούς συνδέσμους που απορροφούν μεγάλες ποσότητες νερού διατηρώντας το σχήμα τους. Σήμερα υπάρχουν πολλά είδη hydrogels με τα σημαντικότερα όμως να είναι τα έξυπνα, καθώς αντιδρούν στα εξωτερικά ερεθίσματα (θερμοκρασία, φως, pH, ηλεκτρικό και μαγνητικό πεδίο). [58]

Σε μία έρευνα δημιουργήθηκε θερμοαποκρινόμενο πολυμερές από πολυκαπρολακτόνη και ισοπροπυλακριμίδιο το οποίο ήταν ιδανικό για την ενθυλάκωση των κυττάρων, ενώ το 2018 μία ομάδα ερευνητών δημιούργησε ένα hydrogel ικανό να ανιχνεύσει αλλαγές στο pH, στα βιομόρια, στα ένζυμα αλλά και σε διάφορες άλλες χημικές διεργασίες. [59]



Figure 19 - 3D βιοεκτυπωμένο ικρίωμα [8]

3.2.3 Αυτοσυναρμολογούμενα Bioinks

Η χρήση αυτοσυναρμολογούμενων στοιχείων είναι μία αρκετά καινούργια τεχνολογία στον χώρο της βιοεκτύπωσης. Τα στοιχεία αυτά δρουν ως «κατασκευαστικές μονάδες» μεγαλύτερων κατασκευών [60]. Μέχρι στιγμής, ως bioink για scaffold-free βιοεκτύπωση έχουν χρησιμοποιηθεί αυτοσυναρμολογούμενα πεπτίδια και δέσμες ιστών. Τα αυτοσυναρμολογούμενα πεπτίδια έχουν δώσει ενθαρρυντικές ελπίδες για την κατασκευή nanofibrous hydrogels που θα είναι παρόμοια με την ECM [61]. Ουσιαστικά λοιπόν τα bioinks της συγκεκριμένης τεχνολογίας δεν απαιτούν ικρίωματα απλοποιώντας έτσι την διαδικασία εκτύπωσης και βελτιστοποιώντας την απορρόφηση από τους ήδη υπάρχοντες ιστούς.

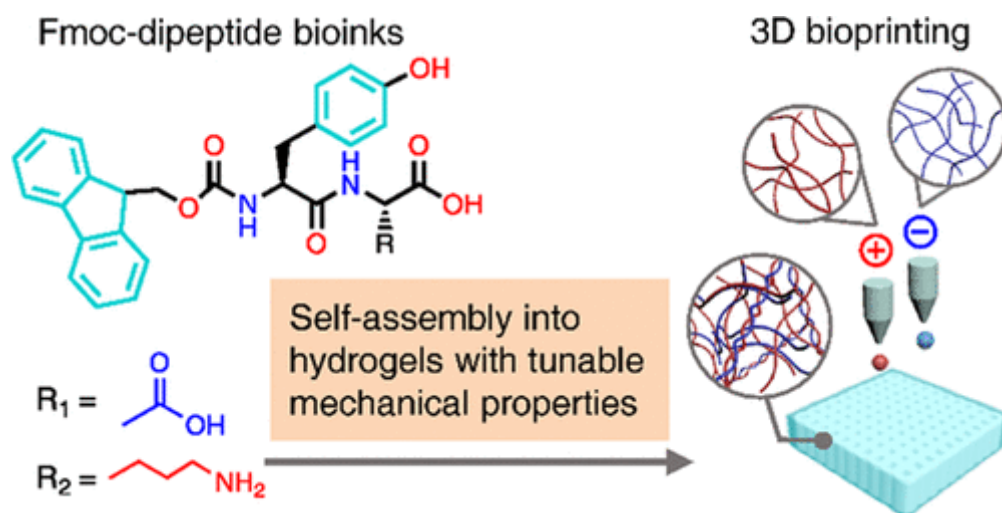


Figure 20 - Αυτοσυναρμολογούμενα διπεπτίδια

3.2.4 Βιομοριακά Bioinks

Ένα ακόμη μεγάλο ζήτημα στην 3D βιοεκτύπωση είναι η αλληλεπίδραση των κυττάρων με τα υπόλοιπα υλικά και για να το αντιμετωπίσουν αυτό οι επιστήμονες έχουν προσπαθήσει να χρησιμοποιήσουν απευθείας ζωντανούς ιστούς ως bioink [62]. Το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα εξ αυτών είναι η dECM, το οποίο ουσιαστικά είναι μία ECM που της έχουν αφαιρεθεί τα κύτταρα (αποκυττάρωση) [63]. Έπειτα αυτό που απομένει μετασχηματίζεται σε πούδρα και διαλύεται σε φιλικό προς τα κύτταρα διάλυμα για να παραχθεί το bioink. Αν και αυτού του είδους τα bioinks έχουν αρκετά πλεονεκτήματα, πολύ συχνά χαρακτηρίζονται από περιορισμούς όπως η μηχανική αντοχή τους. Για να περιορίσουν αυτά τα φαινόμενα οι επιστήμονες συχνά προσθέτουν στο bioink κάποιο πολυμερές. [64]

3.2.5 Bioinks νανοτεχνολογίας

Ακόμη και αν οι κατασκευές από πολυμερή υλικά για 3D εκτύπωση έχουν διάφορα πλεονεκτήματα (χαμηλό βάρος, χαμηλό σημείο λιώσιμου, χαμηλό κόστος και ευελιξία στην διαχείρισή τους), το σημαντικό πρόβλημα αυτών των κατασκευών είναι η μηχανική αντοχή τους και η λειτουργικότητά τους. Τα τελευταία χρόνια ωστόσο έχουν φτιαχτεί bioinks τα οποία έχουν «ενισχυθεί» με μόρια, ίνες ή νανοϋλικά, με τα τελευταία να έχουν πολλά πλεονεκτήματα στον χώρο της βιοτεχνολογίας, της βιοϊατρικής και της μηχανικής των ιστών. Τα νανοκατασκευασμένα bioinks σχεδιάζονται για να βελτιώσουν την εκτυπωσιμότητα του bioink κατά τη διάρκεια της τρισδιάστατης εκτύπωσης. Οι νανοδομές μπορούν να διευκολύνουν την ομαλότερη εκτύπωση, καλύτερη ανάλυση και τη δυνατότητα δημιουργίας λεπτομερειών σε εκτυπωμένες κατασκευές ιστών. Ωστόσο, ακόμα και αν υπάρχουν διάφορα νανοσυνθετικά hydrogels για τη μηχανική ιστών, ελάχιστες έρευνες έχουν επικεντρωθεί στη δυνατότητά τους για το 3D bioprinting. Στην συνέχεια, θα αναλυθούν νέες προσεγγίσεις στη χρήση νανοσυνθετικών υλικών ως bioinks. [65],[66]

3.3 Σύνθετα Πολυμερή ενισχυμένα με νανοσωματίδια

Τα νανοσωματίδια έχουν την ικανότητα να βελτιώνουν τα δομικά χαρακτηριστικά ενός hydrogel. Πιο συγκεκριμένα, μπορούν να τροποποιήσουν ιδιότητες όπως η δυσκαμψία ή το μέτρο ελαστικότητας, η αντοχή σε θραύση και η αντοχή σε ερπυσμό. Ακόμη, κάποια ειδικά νανοσωματίδια μπορούν να ρυθμίζουν ιδιότητες όπως η βιοδραστικότητα, η ηλεκτρική αγωγιμότητα, η απόκριση στο φως και ο μαγνητισμός. [67],[68]

Τα νανοσωματίδια αναμειγνύονται αρκετά εύκολα με πολυμερή και «σκορπίζονται» καλύτερα σε ένα σύνθετο υλικό. Αξίζει να σημειωθεί ότι διαφορετικές παράμετροι των νανοσωματιδίων όπως ο λόγος των διαστάσεών τους, το σχήμα τους, η κατανομή τους και το μέγεθός τους έχουν διαφορετικά αποτελέσματα στην συμπεριφορά του σύνθετου υλικού. [69],[70]

3.4 Κεραμικά νανοσυνθετικά

Τα βιοκεραμικά υλικά χρησιμοποιούνται ευρέως σε βιοϊατρικές εφαρμογές λόγω της βιοσυμβατότητας και της αντοχής τους, καθώς και λόγω των ομοιοτήτων που παρουσιάζουν με τα ανόργανα στοιχεία του ιστού των οστών (bone minerals) [32]. Επιπρόσθετα, χρησιμοποιούνται σε οδοντιατρικές και ορθοπεδικές εφαρμογές επειδή είναι οστοεπαγωγικά (σ.σ. βοηθάνε στον σχηματισμό οστών) [71],[72]. Ωστόσο, παρ' όλες τις εξαιρετικές ιδιότητές τους, οι διαθέσιμες μέθοδοι για 3D εκτύπωση κεραμικών υλικών είναι ελάχιστες. Πιο αναλυτικά, τα κεραμικά υλικά έχουν υψηλή θερμοκρασία τήξης, οπότε οι FDM τεχνολογίες μπορούν δύσκολα να ανταπεξέλθουν, ή δεν ανταποκρίνονται σε ερεθίσματα από φως και οπότε δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν μέθοδοι SLA. Αντιθέτως, η inkjet εκτύπωση (binder jetting) μπορεί εύκολα να τα παράξει. Ακόμη, τα υλικά αυτά μπορεί να μην είναι δύσκολο να εκτυπωθούν, είναι όμως σχετικά απλό να προστεθούν σε ένα σύνθετο υλικό και έτσι μέθοδοι όπως το FDM και το SLA μπορούν να λειτουργήσουν και με αυτού του είδους τα υλικά. [73]

Στην βιοεκτύπωση, τα προβλήματα που αναφέρθηκαν παραπάνω γίνονται ακόμη πιο περίπλοκα και αυτό λόγω της δυσκολίας ενσωμάτωσης των κυττάρων σε βιοκεραμικά υλικά. Έτσι, έως και σήμερα η χρήση βιοκεραμικών ως bioink είναι αρκετά περιορισμένη και γίνεται μόνο εάν το βιοκεραμικό υλικό προστεθεί εκ των υστέρων στο ήδη υπάρχον bioink. Ένα από τα πιο διαδεδομένα κεραμικά υλικά στο κεραμικά bioinks είναι ο υδροξυαπατίτης (HA), ο οποίος είναι βιοενεργός, μη-τοξικός και το κυριότερο συστατικό των οστών και των δοντιών. Σε πολλές έρευνες, νανοσωματίδια HA έχουν προστεθεί σε hydrogels και μερικά από τα αποτελέσματα ήταν η αύξηση του ιξώδους, των μηχανικών ιδιοτήτων, την εκτυπωσιμότητας και όπως είναι λογικό και της οστοεπαγωγικότητας. [74]

Ένα ακόμη κεραμικό υλικό που απασχολεί τους επιστήμονες σε εφαρμογές βιοεκτύπωσης είναι ο άργιλος. Λόγω των εξαιρετικών φυσικοχημικών του χαρακτηριστικών, όπως η ομοιογένεια του στο νερό, η υψηλή αντιδραστικότητα επιφάνειας και η βέλτιστη ρεολογική συμπεριφορά, τα προϊόντα αργίλου χρησιμοποιούνται συχνά σε εφαρμογές βιοεκτύπωσης

(φαρμακευτική, βιοαισθητήρες, κοσμητολογία, κτηνιατρική κ.α). Ο στόχος λοιπόν των ερευνητών είναι να κατασκευάσουν νανοσυνθετικά πολυμερή με στρώσεις αργίλου οι οποίες, θα ενισχύσουν το πολυμερές και κατ' επέκταση θα βελτιώσουν τις μηχανικές ιδιότητες της κατασκευής. [75]

3.5 Μεταλλικά νανοσυνθετικά

Στην βιοϊατρική χρησιμοποιούνται διάφορα μέταλλα και κράματα, όπως ο χρυσός, το ταντάλιο, Co-Cr, NiTi, ανοξείδωτο ατσάλι και κράματα τιτανίου. Ο κύριος λόγος επιλογής τους είναι η υψηλή τους αντοχή σε καταπονήσεις και σε οξείδωση και η ολκιμότητά τους. Στον τομέα της 3D βιοεκτύπωσης, η χρήση μεταλλικών νανοσυνθετικών στα bioinks έχει ως στόχο την αύξηση της δυσκαμψίας, της επεξεργασιμότητας (σ.σ. το πόσο εύκολα επεξεργάζεται ένα υλικό) και της εκτυπωσιμότητας [76],[77]. Οι εξελίξεις στον τομέα του 3D printing έχουν επιτρέψει την εναπόθεση μεταλλικής πούδρας σε βιοεκτυπώσεις, με τα πρώτα πειράματα να έχουν ήδη συμβεί. Ένα από αυτά ήταν η κατασκευή ικρίωματος από σιδηρούχο μαγνήσιο (FeMg) με την μέθοδο του inkjet και τα αποτελέσματα ήταν ιδιαίτερος ενθαρρυντικά. Το κατασκευασμένο ικρίωμα είχε παρόμοια εφελκυστική συμπεριφορά με τα cancellous οστά και πολύ καλή κυτταρική βιωσιμότητα. [78]

3.6 Σύνθετα πολυμερή ενισχυμένα με ίνες

Η χρήση ινών σε hydrogels μπορεί να βελτιώσει τις ιδιότητές τους και να ελέγξει την προσκόλληση των κυττάρων. Από την μία πλευρά, τα hydrogels δεν έχουν καλές μηχανικές ιδιότητες και από την άλλη πλευρά οι ίνες είναι δομικά συμπαγείς και άντεχουν σε καταπονήσεις. Έτσι, χρησιμοποιώντας τις δύο αυτές μορφές (ζελατίνη και ίνες) επιτυγχάνεται εξαιρετική μηχανική και βιομιμητική συμπεριφορά και κυτταρική «κυκλοφορία» στο εσωτερικό της δομής [79]. Η πιο διαδεδομένη μέθοδος κατασκευής πολυμερών ενισχυμένα με ίνες είναι η FDM, κατά την οποία το πολυμερές αναμειγνύεται με ίνες και έπειτα χρησιμοποιείται ως filament. Για τον συγκεκριμένο τύπο bioink η FDM μέθοδος προτιμάται λόγω της δυνατότητας ελέγχου της αρχιτεκτονικής και της τοποθέτησης των κυττάρων και της λειτουργικότητάς της. Οι ίνες μπορούν να είναι από διάφορα υλικά, με το πιο συχνό να είναι το PLA. [80]

3.7 Νανοσυνθετικά υλικά με βάση τον άνθρακα

Μετά το υδρογόνο και το οξυγόνο, ο άνθρακας είναι το πιο διαδεδομένο στοιχείο στο σύμπαν. Ένα από τα χαρακτηριστικά του άνθρακα είναι η δυνατότητά του να «συνδέεται» με τα περισσότερα στοιχεία. Λόγω της δομικής του μορφής, έχει μία σειρά από φυσικές και χημικές ιδιότητες. Οι νανο-άνθρακες έχουν ιδιαίτερες θερμικές, ηλεκτρικές και μηχανικές ιδιότητες. Ως αποτέλεσμα, η προσθήκη τους σε εκτυπώσιμες συνθετικές δομές μπορεί να ρυθμίσει τις φυσικές, τις χημικές και τις μηχανικές ιδιότητές του. Συνεπώς, η κατασκευή υψηλής απόδοσης λειτουργικών δομών χρησιμοποιώντας αυτά τα νανοϋλικά και πολυμερή για εκτύπωση θα μπορούσε να είναι χρήσιμη. [81],[82]

3.7.1 Υλικά με βάση τον γραφίτη

Μία από τις πιο διαδεδομένες μορφές άνθρακα είναι το γραφένιο, το οποίο αποτελείται από στοίβες φύλλων άνθρακα με εξαγωνική δομή. Λόγω της εφαρμογής του γραφενίου σε πολλές κατασκευές, οι ερευνητές εξερευνούν την χρήση του ως «οικοδομικό στοιχείο» για τη δημιουργία μακροσκοπικών υλικών [83],[84]. Τα τελευταία χρόνια, διάφορα νανοϋλικά έχουν χρησιμοποιηθεί για να βελτιώσουν την συμπεριφορά των πολυμερικών δομών, αλλά πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι το γραφένιο μπορεί να βελτιώσει τις μηχανικές και τις θερμικές ιδιότητες, την παρεμβολή ηλεκτρομαγνητικών πεδίων, τις οπτικές και τις ηλεκτρικές ιδιότητες των πολυμερών. Η μηχανική των νευρικών ιστών είναι ένας από τους τομείς που ωφελούνται από τις ηλεκτρικές ιδιότητες του γραφενίου. Η μελέτη του γραφενίου και των οξειδίων του ως bioink για νευρικούς ιστούς είναι πολλά υποσχόμενη και γρήγορα αναπτυσσόμενη. [85],[86]

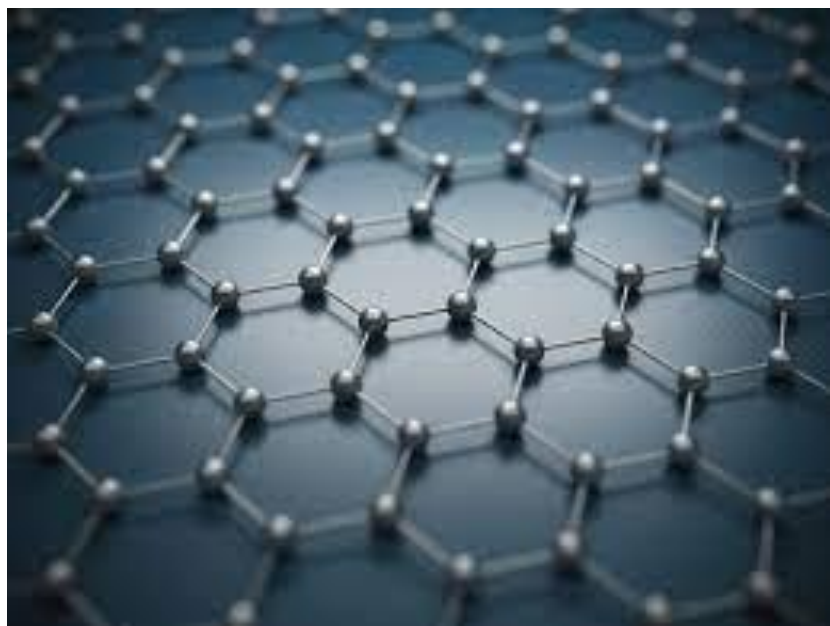


Figure 21 - Γραφένιο

3.7.2 Νανοσωλήνες άνθρακα

Από την ανακάλυψη των νανοσωλήνων άνθρακα (CNTs; Carbon NanoTubes), οι επιστήμονες έχουν επικεντρωθεί σε τεχνικές για την αξιοποίηση των εξαιρετικών τους ιδιοτήτων. Η πραγματικότητα είναι ότι κανένα άλλο υλικό δεν χαρακτηρίζεται από τόσο καλές μηχανικές, θερμικές και ηλεκτρικές ιδιότητες και είναι ουσιαστικά αυτές που καθιστούν τους CNTs ιδανικά υλικά για τις κατασκευαστικές δομές [87],[88]. Τα CNTs λόγω του υψηλού τους πορώδους, έχουν παρόμοια συμπεριφορά με τις ίνες κολλαγόνου του εξωκυττάριας μήτρας (ECM). Έτσι, μπορούν να επηρεάσουν την αναπαραγωγή, την προσκόλληση και τη διαφοροποίηση των κυττάρων [89]. Γενικά, τα CNTs κατηγοριοποιούνται βάσει του μεγέθους τους. Αν το μέγεθος τους είναι μεταξύ 0,8 και 2 nm, ονομάζονται νανοσωλήνες άνθρακα μίας στρώσης (SWCNT; Single-walled carbon nanotubes), και αν το μέγεθός τους είναι μεταξύ 2 και 100 nm, ονομάζονται πολυστρωματικοί νανοσωλήνες άνθρακα (MWCNT; Multiple walled carbon nanotubes) [90],[91]. Τέλος, τα CNTs είναι γενικά χημικά αδρανή και διανέμονται ανισομερώς σε πολλά πολυμερή, στις βιοϊατρικές εφαρμογές όμως απαιτείται η βελτίωση της βιοσυμβατότητας και η ομοιόμορφη ενσωμάτωσή τους στις δομές. [92]

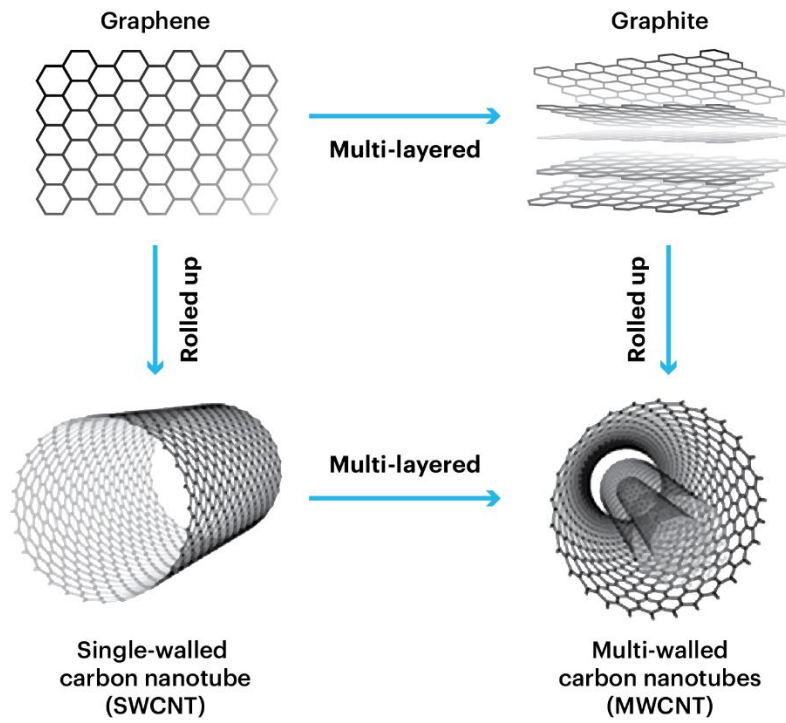


Figure 22 - Nanotubes & Γραφένιο

Κεφάλαιο 4 - Σύγκριση των ειδών τρισδιάστατης βιοεκτύπωσης

Η τρισδιάστατη βιοεκτύπωση έχει τα πλεονεκτήματα του πολυκυτταρικού χωρικού κατευθυντικού ελέγχου και της ελεγχόμενης εναπόθεσης διαφορετικών κυτταρικών πυκνοτήτων, γεγονός που την καθιστά το πιο ιδανικό μέσο για την κατασκευή μοντέλων οργάνων *in vitro*. Όπως συζητήσαμε παραπάνω, επινοούνται διάφορες μέθοδοι βιοεκτύπωσης για την επίλυση των προκλήσεων διαφορετικών εφαρμογών και διαφορετικές προσεγγίσεις βιοεκτύπωσης έχουν επίσης αντίστοιχα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα.

Η βιοεκτύπωση με βάση την εξώθηση είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος βιοεκτύπωσης επί του παρόντος. Σχεδόν 30.000 τρισδιάστατοι εκτυπωτές πωλούνται παγκοσμίως κάθε χρόνο, και τα ακαδημαϊκά ιδρύματα αγοράζουν και εφαρμόζουν όλο και περισσότερο τεχνική που βασίζεται στην εξώθηση στην έρευνα μηχανικής ιστών και οργάνων. Οι βιοεκτυπωτές βιομηχανικής ποιότητας είναι συχνά πολύ πιο ακριβοί, αλλά έχουν καλύτερη ανάλυση, ταχύτητα, δυνατότητα ελέγχου στο χώρο και μεγαλύτερη ευελιξία στο υλικό που μπορούν να εκτυπώσουν. Για τη βιοεκτύπωση που βασίζεται σε εξώθηση, οι ερευνητές συνήθως εκμεταλλεύονται τα πλεονεκτήματα των χαρακτηριστικών των βιολογικών υλικών που είναι ευαίσθητα στη θερμοκρασία διασταυρούμενης σύνδεσης, αραίωσης διάτμησης, κ.λπ. Για παράδειγμα, ορισμένα βιοϋλικά ρέουν σε θερμοκρασία δωματίου αλλά στερεοποιούνται περίπου στους 0°C, γεγονός που διασφαλίζει ότι μπορούν να εξωθηθούν από το ακροφύσιο σε θερμοκρασία δωματίου και να στερεοποιηθούν στις επιθυμητές δομές σε χαμηλές θερμοκρασίες. Ακόμη, η ιδιότητα αραίωσης διάτμησης του μη νευτώνειου ρευστού σημαίνει ότι το ιξώδες μειώνεται με την αύξηση της διατμητικής τάσης, γεγονός που εξασφαλίζει επίσης την ομαλή εξώθηση των βιοϋλικών. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της τεχνολογίας που βασίζεται στην εξώθηση είναι η δυνατότητα εκτύπωσης σε ένα πολύ ευρύ φάσμα βιοσυμβατών υλικών (όπως κυτταρικά συσσωματώματα, υδρογέλες φορτωμένες με κύτταρα, μικροφορείς, συστατικά μήτρας αποκυτταροποίησης κ.λπ.) που καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα ιδιοτήτων ρευστού. Υλικά με ιξώδες που κυμαίνονται από 30 έως 6×10^7 mPa/s έχουν αποδειχθεί ότι είναι συμβατά με βιοεκτυπωτές που βασίζονται σε εξώθηση, με υλικά υψηλότερου ιξώδους που συχνά παρέχουν δομική υποστήριξη για την τυπωμένη κατασκευή και υλικά χαμηλότερου ιξώδους που παρέχουν κατάλληλο περιβάλλον για τη διατήρηση της βιωσιμότητας και της λειτουργίας των κυττάρων. Η ευρεία γκάμα ιξωδών που διατίθεται με την τεχνολογία εξώθησης σημαίνει ότι η βιοεκτύπωση με βάση την εξώθηση μπορεί να χρησιμοποιήσει βιομελάνια υψηλής κυτταρικής πυκνότητας, ενώ η επίτευξη φυσιολογικής κυτταρικής

πυκνότητας σε τεχνητούς ιστούς είναι από καιρό κύριος στόχος για τη βιοεκτύπωση. Επιπλέον, η εγκατάσταση βιοεκτυπωτών που βασίζονται σε εξώθηση είναι αρκετά απλή, οι εμπορικοί πλότερ ή οι επιτραπέζιοι 3D εκτυπωτές μπορούν εύκολα να μετατραπούν σε βιοεκτυπωτές που βασίζονται σε εξώθηση, αυτή η μέθοδος εκτύπωσης είναι επίσης κατάλληλη για προσαρμοσμένες υπηρεσίες χαμηλού κόστους. [72]

Σε σύγκριση με άλλες προσεγγίσεις εκτύπωσης, η βιοεκτύπωση με εξώθηση έχει επίσης ορισμένα μειονεκτήματα. Πρώτα απ' όλα, η ακρίβεια περιορίζεται γενικά στα 100 μm, η οποία είναι χαμηλότερη από άλλες βιολογικές προσεγγίσεις. Δεύτερον, η επιλογή της βιομελάνης πρέπει επίσης να πληροί προϋποθέσεις, όπως ιδιότητες ζελατινοποίησης, ωρίμανσης και αραίωσης διάτμησης. Επιπλέον, επειδή η αναπόφευκτη δύναμη διάτμησης κατά τη διαδικασία εξώθησης θα επηρεάσει το ποσοστό επιβίωσης των κυττάρων, η βιωσιμότητα των κυττάρων της βιοεκτύπωσης με βάση την εξώθηση είναι χαμηλότερη από εκείνη της εκτύπωσης inkjet, η οποία είναι πιο σημαντική όταν η πυκνότητα κυψέλης είναι υψηλή. Ανάλογα με την πίεση και τη διάμετρο της βελόνας του ακροφυσίου, η κυτταρική δραστηριότητα της εξωθημένης βιοεκτύπωσης κυμαινόταν από 40% έως 86%.

Προς το παρόν, η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη βιοεκτύπωση με βάση σταγονίδια είναι η βιοεκτύπωση inkjet DOD και η βιοεκτύπωση με τη βοήθεια λείζερ. Δεδομένου ότι οι εμπορικοί εκτυπωτές inkjet είναι αρκετά προσιτές και μπορούν εύκολα να μετατραπούν σε συσκευές βιοεκτύπωσης, η βιοεκτύπωση inkjet είναι η τεχνολογία βιοεκτύπωσης με το χαμηλότερο κόστος. Εκτός από το χαμηλό κόστος, την υψηλή ακρίβεια, τη γρήγορη ταχύτητα και τη συμβατότητα με μια ποικιλία βιολογικών υλικών, οι βιοεκτυπωτές inkjet μπορούν επίσης να εξοπλιστούν με πολλαπλά ακροφύσια για την κάλυψη των αναγκών εκτύπωσης διαφορετικών κυττάρων, βιολογικών υλικών ή αυξητικών παραγόντων ταυτόχρονα, που όχι μόνο αυξάνει σημαντικά την ταχύτητα εκτύπωσης, αλλά πραγματοποιεί και διαφορετικές λειτουργίες.

Ωστόσο, ο περιορισμός του ιξώδους της βιομελάνης για βιοεκτύπωση inkjet περιορίζει το εύρος των κατάλληλων βιοϋλικών. Λόγω της μικρής πίεσης οδήγησης, η βιοεκτύπωση inkjet δεν μπορεί να εκτυπώσει υλικά υψηλού ιξώδους ή κύτταρα με υψηλή συγκέντρωση, ενώ το υλικό με χαμηλό ιξώδες μειώνει τη δομική αντοχή του καλουπιού εκτύπωσης, με αποτέλεσμα να μην ικανοποιούνται οι απαιτήσεις επακόλουθης in vitro καλλιέργειας και μεταμόσχευσης. Είναι δύσκολο να επιτευχθεί βιοεκτύπωση φυσιολογικής κυτταρικής πυκνότητας με την τεχνολογία inkjet επί του παρόντος. Προκειμένου να αποφευχθεί η απόφραξη των ακροφυσίων και να μειωθεί η διατμητική τάση, η εκτύπωση inkjet επιλέγει συχνά χαμηλή συγκέντρωση κυψελών (λιγότερη από 10 εκατομμύρια κύτταρα/ml) για να διευκολύνει το

σχηματισμό σταγονιδίων. Επιπλέον, μπορεί να υπάρξει μηχανική ή θερμική βλάβη στα κύτταρα κατά τη διαδικασία εκτύπωσης inkjet. Αυτές οι ελλείψεις περιορίζουν την ευρεία εφαρμογή της τεχνολογίας εκτύπωσης inkjet.

Η βιοεκτύπωση με τη βοήθεια λέιζερ έχει επίσης πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλες μεθόδους εκτύπωσης. Λόγω του τρόπου εκτύπωσης χωρίς ακροφύσια, το πρόβλημα της απόφραξης κυψελών/βιοϋλικών στα ακροφύσια είτε στη βιοεκτύπωση με εξώθηση είτε στη βιοεκτύπωση με ψεκασμό μελάνης δεν υπάρχει για τη βιοεκτύπωση με λέιζερ. Εν τω μεταξύ, η βιοεκτύπωση με τη βοήθεια λέιζερ μπορεί να αποφύγει την άμεση επαφή μεταξύ του βιομελανιού και των συσκευών. Αυτή η μέθοδος κατασκευής χωρίς επαφή δεν θα προκαλέσει μηχανική βλάβη στα κύτταρα. Τα βιοϋλικά με υψηλότερο ιξώδες (1–300 mPa/s) μπορούν να βιοτυπωθούν χρησιμοποιώντας αυτή τη μέθοδο, οδηγώντας σε ένα ευρύτερο φάσμα υλικών επιλογής από τη βιοεκτύπωση inkjet. Κάτω από τη δράση λέιζερ με ρυθμό επανάληψης παλμών έως και 5000 Hz, μπορεί να εκτυπώσει βιολεκάνη με πυκνότητα κυψέλης έως 108/ml με ταχύτητα 1600 mm/s και την ακρίβεια κάθε σταγονιδίου που περιέχει ένα μόνο στοιχείο.

Παρά όλα αυτά τα πλεονεκτήματα, η βιοεκτύπωση με λέιζερ έχει αρκετά προφανή μειονεκτήματα. Πρώτον, το κόστος των βιοεκτυπωτών με λέιζερ είναι σχετικά υψηλό, υπάρχει έλλειψη εμπορικών συσκευών εκτύπωσης και τα υλικά υδρογέλης κατάλληλα για βιοεκτύπωση με λέιζερ δεν είναι άφθονα. Δεύτερον, όπως περιγράφεται στην αρχή LIFT, είναι χρονοβόρο η επίστρωση βιολεκάνης στο στρώμα απορρόφησης λέιζερ της δομής της κορδέλας. Αυτό μπορεί να είναι ιδιαίτερα δυσκίνητο στην εκτύπωση πολλαπλών τύπων κελιών/υλικών. Επιπλέον, όταν η συσκευή εκτύπωσης περιέχει ένα μεταλλικό στρώμα απορρόφησης λέιζερ, η εξάτμιση του στρώματος μπορεί να προκαλέσει την εμφάνιση των υπολειμμάτων μετάλλου στις τελικές βιοεκτυπωμένες δομές.

Η χαμηλή μηχανική αντοχή των υδρογελών και η ευθραυστότητα των κυττάρων λαμβάνονται υπόψη στη βιοεκτύπωση με κελιά, ενώ η συνήθως χρησιμοποιούμενη βιοεκτύπωση με εξώθηση συνήθως παράγει νήματα με διάμετρο μεγαλύτερη από 100 μm, με αποτέλεσμα χαμηλότερη ακρίβεια τρισδιάστατων δομών και μη εγγυημένη επαναληψιμότητα. Σε σύγκριση με αυτό, το DLP είναι μια προσέγγιση που βασίζεται στην προβολή επιφάνειας με πολύ υψηλότερη ανάλυση εκτύπωσης. Επιπλέον, το μη σκληρυμένο υγρό βιομελάνι μπορεί επίσης να παρέχει καλή υποστήριξη για την τυπωμένη δομή και να αποφύγει την παραμόρφωση κατάρρευσης της υδρογέλης κατά τη διαδικασία εκτύπωσης. Δεν υπάρχει επίσης καμία διαταραχή της απόφραξης των ακροφυσιών και η διατμητική τάση που επηρεάζουν τη βιωσιμότητα των κυττάρων.

Κεφάλαιο 5 - Εφαρμογές της Βιοεκτύπωσης

Η σημαντικότερη χρήση της τεχνολογίας της βιοεκτύπωσης αφορά στην κατασκευή τεχνητών οργάνων για μεταμοσχεύσεις, όπως προαναφέρθηκε. Σήμερα, η απόρριψη οργάνων της μεταμόσχευσης από τους ασθενείς αποτελεί ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα της ιατρικής. Με τη βιοεκτύπωση έχουμε την ικανότητα να κατασκευάσουμε τεχνητά όργανα ειδικά για τον κάθε ασθενή σε μικρό χρονικό διάστημα. Δηλαδή, η βιοεκτύπωση έχει χρησιμότητα και στην κατασκευή ιστών για την εξέταση της αποτελεσματικότητας φαρμάκων. Η προσέγγιση αυτή μάς επιτρέπει να διαπιστώσουμε τις ανεπιθύμητες ενέργειες αλλά και την ιδανική δοσολογία των φαρμάκων χωρίς να γίνουν δοκιμές σε ανθρώπους εθελοντές. Επίσης, η πλαστική χειρουργική μπορεί να ωφεληθεί επίσης από την τεχνολογία της βιοεκτύπωσης. Ήδη σήμερα χρησιμοποιούνται τεχνητά μοσχεύματα δέρματος σε ασθενείς τα οποία έχουν κατασκευαστεί με την παραπάνω τεχνική.

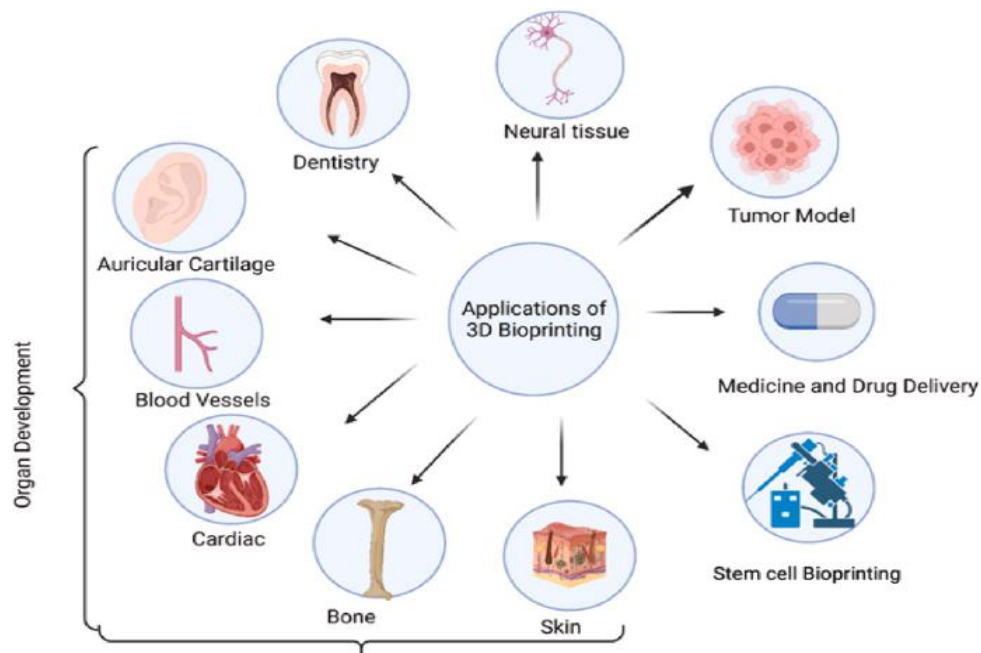


Figure 23 - Εφαρμογές Βιοεκτύπωσης

5.1 Γενικά Παραδείγματα & Εφαρμογές

5.1.1 Εκτύπωση καρδιάς

Τον Απρίλιο του 2023, μια ομάδα Ισραηλινών ερευνητών παρουσίασε μια βιοτυπωμένη καρδιά σε μέγεθος κερασιού. Το όργανο, που αποτελείται από κύτταρα, αιμοφόρα αγγεία, κοιλίες και θαλάμους είναι μια αρχή για την κατασκευή τεχνητής καρδιάς. Οι ερευνητές ανέπτυξαν μια υδρογέλη από τον λιπώδη ιστό ασθενούς, προκειμένου να μειώσουν τον κίνδυνο απόρριψης μόλις αυτή η καρδιά μεταμοσχευθεί. Η διαδικασία εκτύπωσής της υπολογίζεται ότι έχει διάρκεια μόνο 3 έως 4 ώρες. Η καρδιά δεν είναι μεγαλύτερη από την καρδιά του κουνελιού, αλλά είναι μια ενθαρρυντική αρχή. Παράλληλα, μια αμερικανική εταιρεία κατάφερε να εκτυπώσει μια μικρογραφία ανθρώπινης καρδιάς με κοιλίες και κοιλότητες. [19], [97]

5.1.2 Εκτύπωση νεφρού

Το 2011, παρουσιάστηκε για πρώτη φορά ένα τρισδιάστατο βιοτυπωμένο νεφρό. Η ομάδα που τον δημιούργησε, κατάφερε να σχεδιάσει αυτό το όργανο από βλαστικά κύτταρα, μέσα σε επτά ώρες. Το συγκεκριμένος νεφρό δεν μπόρεσε να «ζήσει» για πολύ, αλλά το γεγονός και μόνο της δημιουργίας του ήταν πολύ ελπιδοφόρο. Από τότε, η προσπάθεια συνεχίστηκε. Στο Χάρβαρντ, για παράδειγμα, οι ερευνητές κατάφεραν να τυπώσουν ένα τρισδιάστατο μοντέλο ενάγγειου εσπειραμένου σωληναρίου για να κατανοήσουν καλύτερα τη δομή και τη λειτουργία του νεφρού. [19], [97]

5.1.3 Εκτύπωση κερατοειδούς

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας εκτιμά ότι 10 εκατομμύρια άνθρωποι παγκοσμίως χρειάζονται χειρουργική επέμβαση για την πρόληψη της τύφλωσης εξαιτίας βλάβης του κερατοειδούς και 4,9 εκατομμύρια ήδη υποφέρουν από πλήρη τύφλωση λόγω ουλών του κερατοειδούς. Το 2019, ερευνητές από το Πανεπιστήμιο του Newcastle ανέπτυξαν για πρώτη φορά έναν τρισδιάστατο βιοτυπωμένο κερατοειδή που θα μπορούσε να μεταμοσχευτεί σε άτομα που τον έχουν ανάγκη. Μετά τη μελέτη και τη συλλογή δεδομένων από τα μάτια ενός εθελοντή, οι ερευνητές κατάφεραν να σχεδιάσουν ένα τρισδιάστατο μοντέλο του κερατοειδούς. Μία από τις πιο μεγάλες δυσκολίες ήταν η χρήση των σωστών υλικών για να επιτευχθεί το κοίλο σχήμα του κερατοειδούς, καθώς και

το να βρεθεί ένα μελάνι αρκετά λεπτόρρευστο για να ψεκαστεί μέσα από το ακροφύσιο ενός τρισδιάστατου εκτυπωτή. Χρησιμοποιώντας μόνο έναν υγιή ανθρώπινο κερατοειδή, μπόρεσαν να εκτυπώσουν 50 τεχνητούς. [19], [97]

5.1.4 Εκτύπωση ωοθηκών

Τον Μάιο του 2017, ερευνητές από το Πανεπιστήμιο Northwestern ανέπτυξαν μια λύση για γυναίκες με προβλήματα γονιμότητας. Πιο συγκεκριμένα, είχαν καταφέρει να εμφυτεύσουν μια βιοτυπωμένη ωοθήκη σε ένα στείρο ποντίκι. Δύο χρόνια αργότερα, οι ερευνητές σημείωσαν μια πολλά υποσχόμενη πρόοδο. Κατάφεραν να χαρτογραφήσουν τη θέση των δομικών πρωτεϊνών σε μια ωοθήκη χοίρου, γεγονός που τους επέτρεψε να δημιουργήσουν ένα βιομελάνι προκειμένου να δημιουργήσουν τρισδιάστατα τυπωμένες λειτουργικές ωοθήκες για ανθρώπινη χρήση. Επιπλέον, η ομάδα εξήγησε ότι η μεθοδολογία της θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό άλλων τύπων πρωτεϊνών που θα μπορούσαν να διευκολύνουν τη δημιουργία βιομελανιών - υλικών για να δημιουργηθούν άλλα όργανα. [19], [97]

5.1.5 Εκτύπωση ήπατος

Ερευνητές στο Πανεπιστήμιο του Σάο Πάολο στη Βραζιλία κατάφεραν να δημιουργήσουν μικροσκοπικές εκδόσεις ανθρώπινου ήπατος από κύτταρα αίματος. Η διαδικασία χρειάστηκε μόνο 90 ημέρες, από τη συλλογή του αίματος του ασθενούς έως την παραγωγή του ιστού. Αυτά τα όργανοειδή του ήπατος, που αναπτύχθηκαν με χρήση τεχνολογιών βιολογικής 3D εκτύπωσης, ενσωματώνουν τις λειτουργίες του συγκεκριμένου οργάνου. Αυτές περιλαμβάνουν την παραγωγή ζωτικών πρωτεϊνών, την αποθήκευση βιταμινών και την έκκριση της χολής. Για να δημιουργήσει τον ιστό του ήπατος, η ομάδα χρησιμοποίησε έναν εκπληκτικών ιδιοτήτων βιοεκτυπωτή από τους πιο αναγνωρισμένους στον κλάδο. [19], [97]

5.1.6 Εκτύπωση αυτιών

Αυτό το πρόγραμμα βιολογικής εκτύπωσης κατέστη δυνατό μέσω της συνεργασίας μεταξύ του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Queensland (QUT) και της Maia Van Mulligan, για να την βοηθήσει να ξανακερδίσει την ακοή της. Το Ίδρυμα HearSay, που συμμετέχει επίσης στην αποκατάσταση της ακοής του κοριτσιού, δηλώνει ότι το τρισδιάστατο τυπωμένο αυτί είναι πλήρως λειτουργικό και θα επιτρέψει στη Maia να ακούσει ξανά. Το εμφύτευμα αυτιού

δημιουργήθηκε χρησιμοποιώντας τα κύτταρα χόνδρου της ασθενούς, μειώνοντας έτσι τον κίνδυνο απόρριψής του από τον οργανισμό μόλις εμφυτευτεί. Επιπλέον, αυτός ο τύπος λύσης, η βιολογική εκτύπωση κατά περίπτωση, είναι στην πραγματικότητα λιγότερο ακριβός από άλλους τύπους εναλλακτικών λύσεων. [19], [97]

5.1.7 Εκτύπωση πάγκρεας

Το όνειρο και η προσπάθεια μιας ομάδας επιστημόνων από το «Ίδρυμα Έρευνας και Ανάπτυξης της Επιστήμης» να αναπτύξει ένα λειτουργικό τρισδιάστατο πάγκρεας θα βοηθήσει τους διαβητικούς ασθενείς να αποφύγουν την ένεση ινσουλίνης και να ελαχιστοποιήσουν τον κίνδυνο δευτερογενών επιπλοκών, οι οποίες συχνά οδηγούν στον θάνατο. Για τη βιολογική εκτύπωση, πραγματοποιείται βιοψία του ασθενούς και συγκομιδή βλαστικών κυττάρων. Μετά, τα κύτταρα αυτά μετατρέπονται σε κύτταρα ικανά να παράγουν ινσουλίνη και γλυκαγόνη. Αυτά στη συνέχεια χρησιμοποιούνται ως «βιολογικό μελάνι» για την εκτύπωση του παγκρέατος. [19], [97]

5.1.8 Εκτύπωση δέρματος

Η ανάγκη για βιολογικά εκτυπωμένο δέρμα αναπτύσσεται σταθερά: σύμφωνα με το BBC Research, η «αγορά» θα αυξηθεί από 24,7 δισεκατομμύρια δολάρια το 2018 σε 109,9 δισεκατομμύρια δολάρια το 2023. Η start up εταιρεία Poietis έχει αναπτύξει 4D τυπωμένο δέρμα, το οποίο στο μέλλον θα μπορούσε να μεταμοσχευτεί σε θύματα εγκαυμάτων ή δερματικών παθήσεων. Ένα λογισμικό που ονομάζεται Cytocentric CAD έχει αναπτυχθεί ειδικά για τη διαδικασία εκτύπωσης, καθώς έχει σχεδιαστεί για να «απαντήσει» στην πρόκληση της μίμησης του ιστού του σώματος. Πρόκειται για εκτύπωση 4D (με τον χρόνο ως 4ης διασταση), καθώς τα συστατικά ιστών είναι διατεταγμένα με ακρίβεια στο χώρο και υπόκεινται επίσης στη δράση αυτοοργάνωσης των κυττάρων. Λαμβάνοντας υπόψη τις διαδικασίες αυτοοργάνωσης, είναι δυνατόν να δημιουργηθούν πολύπλοκες δομές ιστών που είναι πολύ κοντά σε αυτές του ανθρώπινου σώματος. Το τυπωμένο 3D δέρμα δοκιμάζεται κλινικά σε συνεργασία με το Assistance Publique - Hôpitaux de Marseille. Ο μακροπρόθεσμος στόχος του Poietis είναι «η τοποθέτηση ενός βιοεκτυπωτή σε κάθε νοσοκομείο για να επιτρέψει την παραγωγή εξατομικευμένων ιστών και να βελτιώσει τον χρόνο αναμονής των ασθενών που περιμένουν μεταμοσχεύσεις». [19], [97]

Οι εφαρμογές των εκτυπωτών τριών διαστάσεων ολοένα και αυξάνονται. Είναι σίγουρο ότι στο μέλλον, και μάλιστα πολύ νωρίτερα απ' όσο φανταζόμαστε, η

αντικατάσταση ενός ανθρώπινου ιστού, οργάνου ή ακόμη και ενός μέλους θα είναι υπόθεση ρουτίνας. Στη συνέχεια, ακολουθούν διάφορες εφαρμογές με βάση την εξώθηση, τα σταγονίδια, και τον φωτοπολυμερισμό.

5.2 Εφαρμογές με βάση την εξώθηση

Οι εφαρμογές πάνω στην βιοεκτύπωση μπορούν να χωριστούν σε τέσσερις κατηγορίες: κυτταροβιολογία, έρευνα φαρμάκων, μοντέλα όγκου και αναγεννητική ιατρική. Η κυτταροβιολογία καλύπτει την κατασκευή μονοκυτταρικού ή πολυκυτταρικού συνδυασμού, συμπεριλαμβανομένης της έρευνας για βασικά ζητήματα σχετικά με την κυτταρική ανάπτυξη, τη μεσοκυτταρική σχέση, τη διαγονιδίωση. Έρευνα φαρμάκων σημαίνει φαρμακοκινητική, έλεγχος φαρμάκων, βοηθητική ανάπτυξη φαρμάκων. Το μοντέλο όγκου αφορά κυρίως τη δημιουργία διαφόρων ειδών παθολογικών μοντέλων όγκου, την έρευνα του μηχανισμού ογκογένεσης, τη στοχευμένη θεραπεία και ούτω καθεξής. Η αναγεννητική ιατρική, η οποία σχετίζεται περισσότερο με τη βιοεκτύπωση, περιλαμβάνει την κατασκευή τεχνητού ιστού και οργάνου, την κατασκευή νευρικού ιστού, καρδιοειδούς, ήπατος και ούτω καθεξής. Αυτές οι εφαρμογές καλύπτουν την τρισδιάστατη βιοεκτύπωση τόσο με την ευρεία όσο και με τη στενή έννοια, όπως αναφέραμε προηγουμένως. Στην συνέχεια, θα γίνει αναφορά σε εφαρμογές για βιοεκτύπωση με κυτταρική εξώθηση.

5.2.1 Δέρμα

Το 2009, οι Lee κ.α. (και άλλοι ερευνητές) χρησιμοποίησε πνευματική εξώθηση υποβοηθούμενη από έλεγχο μικροβαλβίδων για την κατασκευή βιοεκτυπωτή τεσσάρων ακροφυσίων. Χρησιμοποιώντας αυτόν τον βιοεκτυπωτή, τυπώθηκαν 10 στρώσεις πρόδρομου υδρογέλης κολλαγόνου με τρόπο στρώση προς στρώση, στις οποίες τυπώθηκαν ινοβλάστες στη δεύτερη στρώση και κερατινοκύτταρα στην όγδοη στρώση ξεχωριστά, για την υλοποίηση πολυεπίπεδων σύνθετων ιστών που μιμούνται φυσικά στιβάδες δέρματος (Εικ Α, Figure 24). Επιπλέον, προκειμένου να πιστοποιηθεί η δυνατότητα εκτύπωσης σε μη επίπεδες επιφάνειες για πιθανές εφαρμογές συμπεριλαμβανομένης της αποκατάστασης δερματικών τραυμάτων, παρατηρήθηκε πολύ βιώσιμος πολλαπλασιασμός κυττάρων σε καλούπι διμεθυλοσιλοξάνιο (PDMS) με τρισδιάστατα περιγράμματα επιφάνειας ως υπόστρωμα [98]. Το 2014, οι Lee κ.α. από μια άλλη ερευνητική ομάδα χρησιμοποίησε μια παρόμοια συσκευή βιοεκτύπωσης εκτός από την ανάπτυξη 8 ακροφυσίων, για βιοεκτύπωση κερατινοκυττάρων, ινοβλαστών και

κολλαγόνου για την αναπάρσταση της επιδερμίδας, του χορίου και της δερματικής μήτρας του φυσικού δέρματος. Η ιστολογία και ο χαρακτηρισμός ανοσοφθορισμού έδειξε ότι ο τρισδιάστατος εκτυπωμένος ιστός δέρματος ήταν μορφολογικά και βιολογικά αντιπροσωπευτικός του πραγματικού ανθρώπινου δερματικού ιστού. Η τρισδιάστατη βιοεκτύπωση προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα όσον αφορά τη διατήρηση του σχήματος και της μορφής, την ευελιξία, την αναπαραγωγιμότητα και την υψηλή απόδοση καλλιέργειας. Αυτή η μελέτη μπορεί επίσης να χρησιμεύσει ως πρότυπο για τη μελέτη της παθοφυσιολογίας των δερματικών παθήσεων [98]

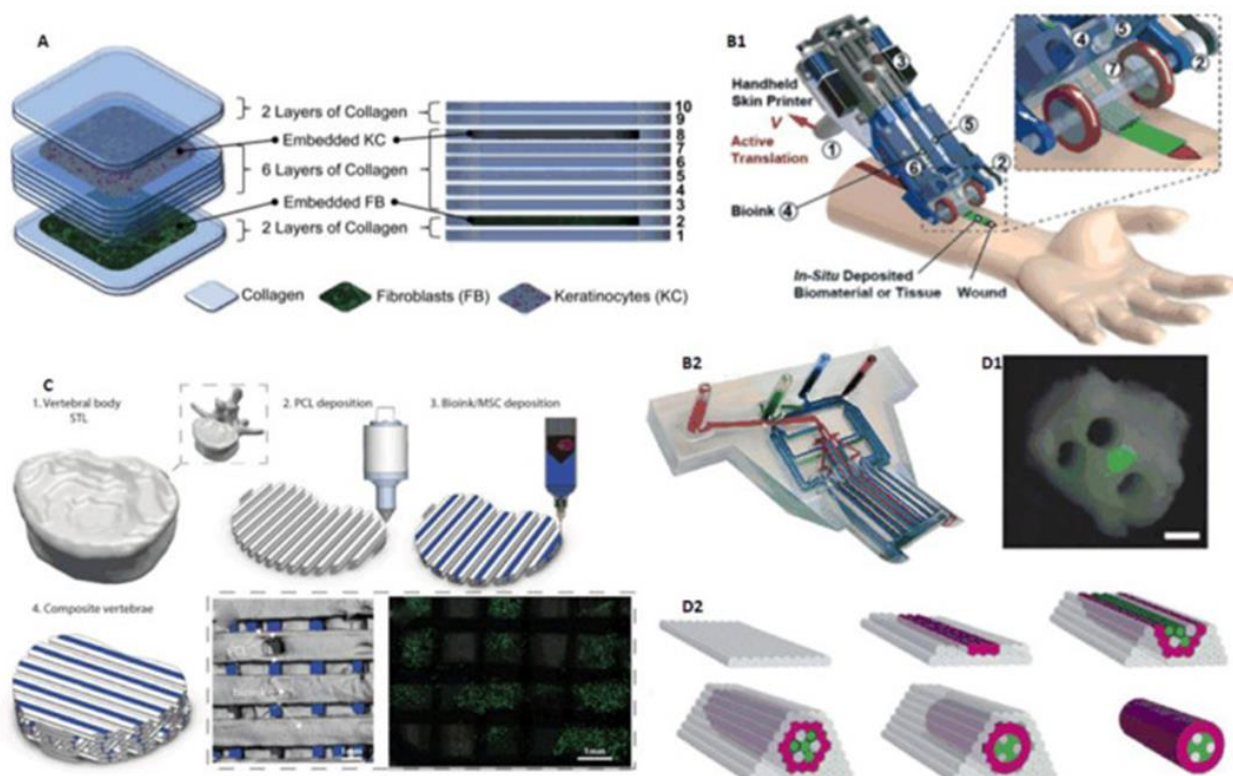


Figure 24 - A, B, Γ, Δ

- A: Εναλλακτικά βιοτυπωμένοι ινοβλάστες και κερατινοκύτταρα που μιμούνται φυσικές δομές δέρματος
 B: Χειροκίνητη τρισδιάστατη συσκευή βιοεκτύπωσης δέρματος που συνδυάζει μικρορευστοποιητική τεχνική
 Γ: Οστικός ιστός βιοεκτύπωσης πολλαπλών
 Δ: Κατασκευή νευρικών μοσχευμάτων χωρίς ικρίωμα

Το 2009, οι Kim κ.α. χρησιμοποίησαν ένα κρυογονικό σύστημα ψύξης για να κατασκευάσει πολύ πορώδη (>95%) ικρίωματα κολλαγόνου που αποτελούνται από κάθετους κλώνους κολλαγόνου σε διαδοχικά στρώματα. Μετά από επεξεργασία κάτω από το μηδέν (στους -76°C) και στερεοποίηση, εισήχθη μια συγκαλλιέργεια κερατινοκυττάρων/ινοβλαστών στα τυπωμένα ικρίωματα για να δείξει τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και τη διαφοροποίηση των κυττάρων. Λόγω της σχετικά χαμηλής μηχανικής αντοχής των ικριωμάτων, η

ίδια ερευνητική ομάδα εφάρμοσε ομοαξονική βιοεκτύπωση για την κατασκευή ικριωμάτων κολλαγόνου-αλγινικού το 2011, τα οποία αύξησαν το μέτρο περίπου επτά φορές. Σε αυτή τη μελέτη, χρησιμοποιήθηκε δοκιμή σε εν ζωή ποντίκια για να αποδειχθεί ο καλός σχηματισμός ιστού κοκκοποίησης και η ταχεία αγγείωση [99].

Το 2012, μετά την επαλήθευση των ανοσοτροποποιητικών και υψηλού πολλαπλασιαστικών ιδιοτήτων (όπως η παροχή εκκρινόμενων τροφικών παραγόντων, η πρόκληση μετανάστευσης ενδοθηλιακών κυττάρων) βλαστοκυττάρων που προέρχονται από αμνιακό υγρό (AFS), οι Skardal κ.α. χρησιμοποίησαν υδρογέλη ινώδους κολλαγόνου φορτωμένη με κύτταρα AFS ως βιολίπανση, για βιοεκτύπωση σε πληγές δέρματος πλήρους πάχους σε ποντίκια με τον τρόπο θρομβίνης/βιολεκάνης εναλλάξ επί τόπου, για να αποδείξει την ικανότητά του να θεραπεύει πληγές και εγκαύματα μεγάλης κλίμακας. [100]

5.2.2 Οστό - Χόνδρος

Στον τομέα της εφαρμογής οστικού ιστού, η χρήση τεχνικών τρισδιάστατης βιοεκτύπωσης για την κατασκευή ικριωμάτων είναι ένας κοινός τρόπος. Το 2015, οι Yao κ.α. χρησιμοποίησαν την τεχνολογία FDM για την εκτύπωση ικριωμάτων PCL-HA με βάση τα δεδομένα ανακατασκευής CT 3D. Η βιολογική ικανότητα φορτίου αυτών των ικριωμάτων δοκιμάστηκε περαιτέρω [101]. Το 2015, οι Pati κ.α. χρησιμοποίησε τη μέθοδο multi-nozzle για την εκτύπωση ικριωμάτων κατασκευασμένων από σύνθετο υλικό PCL, πολυ(γαλακτικό-συν-γλυκολικό οξύ) (PLGA), β-TCP και μεταλλοποιημένη εξωκυτταρική μήτρα (ECM) που τοποθετήθηκε από μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα που προέρχονται από ιστό κατώτερης ρινικής μύτης (hTMSCs). Αυτά τα ικριώματα διακοσμημένα με ECM παρουσιάζουν τόσο οστεοεπαγωγικές όσο και οστεοαγωγίμες ιδιότητες όπως αποκαλύπτεται από την ικανότητά τους να αυξάνουν τον σχηματισμό μεταλλοποιημένου ιστού εκτοπικά και να αυξάνουν την οστική αναγέννηση ορθοτοπικά. [102]

Το 2016, οι Daly κ.α. πρόσφεραν μια μέθοδο για το οστικό ιστό: βιοεκτύπωση ενός προδρόμου αναπτυξιακού οστικού ιστού σε σωλήνα, στη συνέχεια χρήση αυτού του κατασκευασμένου βασικού στοιχείου ως πρότυπο για επακόλουθη αγγείωση και οστεογένεση σε εν ζωή πείραμα. Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν αλγινικό ακτινοβολημένες ακτίνες γάμμα που ενσωματώνουν πεπτίδια προσκόλλησης Arg-Gly-Asp (RGD) (τα οποία υποστήριζαν ισχυρότερη χονδρογονική διαφοροποίηση), που έφεραν ενήλικα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα (MSCs), με εκτυπωμένες ίνες PCL, για την κατασκευή της

επιθυμητής δομής. Μετά από 12 εβδομάδες, αυτή η σύνθετη σπονδυλική δομή έδειξε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα σχηματισμού οστού. Αξίζει να αναφερθεί ότι ελέγχοντας την τοποθέτηση του βιομελανιού μέσα σε κάθε δεύτερη απόσταση μεταξύ των ινών PCL ήταν δυνατό να εισαχθεί ένα δίκτυο διασυνδεδεμένων καναλιών εντός του κατασκευάσματος PCL, οδηγώντας σε καλύτερη μεταφορά θρεπτικών ουσιών. [4.7]

Το 2015, χρησιμοποιήθηκε βιομελάνι αποτελούμενο από gellan, αλγινικό και ένα κλινικό προϊόν που ονομάζεται BioCartilage (σωματίδια εξωκυτταρικής μήτρας χόνδρου), για βιοεκτύπωση μοσχευμάτων χόνδρου. Αυτό το βιομελάνι αποδείχθηκε ότι υποστηρίζει τον πολλαπλασιασμό των χονδροκυττάρων και την ισχυρή εναπόθεση πρωτεϊνών της μήτρας του χόνδρου μέσω MRI και ιστολογικής αξιολόγησης μετά από 8 εβδομάδες. Επιπλέον, εισήχθη η συν-εξώθηση ενός μεταβατικού υποστηρικτικού πολυμερούς, φορτωμένου με κατιόντα για την προώθηση της φυσικής ζελατινοποίησης για τη σταθεροποίηση των δομών που προεξέχουν.

Το 2016, οι Kang κ.α. παρουσίασαν έναν ολοκληρωμένο εκτυπωτή ιστού-οργάνου (ITOP) που βασίζεται στην τεχνολογία εξώθησης. Οι ερευνητές εκτύπωσαν υδρογέλες φορτωμένες με κύτταρα μαζί με βιοαποδομήσιμα πολυμερή (αφήνοντας μικροκανάλια στα κατασκευάσματα των ιστών για να διευκολύνουν τη διάχυση των θρεπτικών ουσιών) σε ολοκληρωμένα μοτίβα και αγκυρώθηκαν σε υδρογέλες. Σε αυτή την προσέγγιση ανακατασκευάστηκαν τα οστά της κάτω γνάθου, ο χόνδρος και ο σκελετικός μυς. [103]

5.2.3 Νευρικό Μόσχευμα

Το 2013, οι Owens κ.α. ανέφερε μια προσέγγιση για την κατασκευή νευρικών μοσχευμάτων που αποτελούνται αποκλειστικά από κύτταρα και κυτταρικό υλικό. Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν βλαστοκύτταρα μυελού των οστών ποντικού (BMSC) και κύτταρα Schwann (SCs) ως βιομελάνι για να σχηματίσουν πολυκύτταρους κυλίνδρους διαμέτρου 0,5 mm μέσω εξώθησης. Η δομή υποστηρίχθηκε από μια σειρά ράβδων αγαρόζης (γκρι), οι οποίες συγκρατούν τον αγωγό στη θέση του και θα αφαιρούνταν μετά από 7 ημέρες ενώ οι διακριτοί κύλινδροι βιολεκάνης αυτοσυναρμολογούνταν. Ο εξωτερικός δακτύλιος ήταν κατασκευασμένος από βιομελάνι αποτελούμενος εξ ολοκλήρου από BMSC (κόκκινο) και κύλινδροι αποτελούμενοι από 90% BMSC και 10% SC (πράσινο) εναλλάσσονταν με ράβδους αγαρόζης, οι οποίες έφεραν πολλαπλούς φωτισμούς μέσα στα μοσχεύματα. Στη συνέχεια, αξιολογήθηκε η αναγεννητική ικανότητα των μοσχευμάτων, γεγονός που έδειξε ότι αυτή θα ήταν μια πολλά

υποσχόμενη προσέγγιση για την κατασκευή νευρικών μοσχευμάτων και ως συνέπεια για την αναγέννηση των νεύρων. [104]

5.2.4 Μύες – Τένοντες

Το 2015, ο T.K. Merceron χρησιμοποίησε έναν τρισδιάστατο βιοεκτυπωτή με τέσσερα φυσίγγια για την εναπόθεση τεσσάρων διαφορετικών εξαρτημάτων για την κατασκευή μιας ολοκληρωμένης κατασκευής μονάδας μυών-τενόντων (MTU). Η θερμοπλαστική πολυουρεθάνη (PU) συνεκτυπώθηκε με βιολεύκη υδρογέλης με κυτταρική φόρτιση C2C12 για ελαστικότητα και μυϊκή ανάπτυξη στη μία πλευρά, ενώ η PCL συνεκτυπώθηκε με NIH/3T3 κυτταρική υδρογέλη για ακαμψία και ανάπτυξη τενόντων σε το άλλο.

5.2.5 Αιμοφόρα αγγεία - αγγείωση

Το 2009, ο C. Norotte χρησιμοποίησε λεία μυϊκά κύτταρα ανθρώπινης ομφαλικής φλέβας (HUVSMCs), ινοβλάστες ανθρώπινου δέρματος (HSFs) και κύτταρα λείου μυός της αορτής χοίρου (PASMCs) για την κατασκευή σωληνοειδών αγγειακών μοσχευμάτων πολλαπλών στρωμάτων μικρής διαμέτρου χωρίς ικρίωμα. Τα κύτταρα συγκεντρώθηκαν σε διακριτές μονάδες, είτε πολυκύτταρα σφαιροειδή είτε κύλινδροι ελεγχόμενης διαμέτρου (300–500 nm), οι οποίοι τυπώθηκαν στρώμα-στρώμα με ράβδους αγαρόζης, που χρησιμοποιούνται εδώ ως πρότυπο καλουπώματος. Η μετά την εκτύπωση σύντηξη των διακριτών μονάδων οδήγησε σε αγγειακούς σωλήνες μικρής διαμέτρου μονής και διπλής στρώσης ενώ αφαιρέθηκε η αγαρόζη. Αυτή η μέθοδος παρείχε έναν τρόπο κατασκευής σκαφών διαφορετικών σχημάτων και ιεραρχικών δέντρων με ευδιάκριτες διαμέτρους. [105]

Το 2015, οι Hinton κ.α. ανέπτυξαν μια προσέγγιση που ονομάζεται FRESH σε ένα MakerBot Replicator τροποποιημένο με έναν προσαρμοσμένο εξωθητήρα που βασίζεται σε σύριγγα. Με βάση αυτή την τεχνική, κατασκευάστηκαν δομές με την ενσωμάτωση της τυπωμένης υδρογέλης μέσα σε μια δευτερεύουσα υδρογέλη που χρησίμευε ως προσωρινό, θερμοαναστρέψιμο και βιοσυμβατό στήριγμα. Το λουτρό στήριξης αποτελούνταν από μικροσωματίδια ζελατίνης που λειτουργούσαν σαν πλαστικό Bingham κατά τη διαδικασία εκτύπωσης, συμπεριφερόμενοι ως άκαμπτο σώμα σε χαμηλές διατμητικές τάσεις, αλλά ρέοντας ως παχύρρευστο ρευστό σε υψηλότερη διατμητική τάση. Αυτή η μέθοδος διευκόλυνε τη βιοεκτύπωση ένυδρων υλικών με μέτρο ελαστικότητας <500 kPa συμπεριλαμβανομένων αλγινικού, κολλαγόνου και ινώδους, για την κατασκευή πολύπλοκων βιολογικών δομών, όπως ένα αρτηριακό δέντρο.

5.2.6 Οργανοειδές

Το 2013, οι Billiet κ.α. επέλεξε το VA-086 ως φωτο-εκκινητή, μεθακρυλοΐλ ζελατίνης (GelMA) που ενθυλακώνει την κυτταρική σειρά ηπατοκαρκινώματος (HepG2) ως βιομελάνι, για την κατασκευή τρισδιάστατων κατασκευών. Εκτυπώθηκαν μηχανικά σταθερά ικριώματα GelMA, φορτωμένα με κύτταρα, τα οποία εμφανίζουν διατηρημένη έκφραση συγκεκριμένων λειτουργιών του ήπατος με υψηλή κυτταρική βιωσιμότητα (> 97%). [106]

Το 2016, οι Lee κ.α. χρησιμοποίησαν τη συσκευή πολλαπλών ακροφυσίων που αναφέρθηκε προηγουμένως, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο εκτύπωσης πλαισίου PCL και κολλαγόνου φορτωμένου με κύτταρα εναλλακτικά για την κατασκευή τρισδιάστατης κατασκευής. Δεδομένου ότι τα μη παρεγχυματικά κύτταρα δεν μπορούσαν να επιβιώσουν όταν καλλιεργήθηκαν μόνα τους *in vitro*, τα ηπατοκύτταρα (HCs), τα ενδοθηλιακά κύτταρα της ανθρώπινης ομφαλικής φλέβας (HUVES) και οι ινοβλάστες του ανθρώπινου πνεύμονα (HLFs) ενθυλακώθηκαν σε βιολίβανο κολλαγόνου. Η ετεροτυπική αλληλεπίδραση μεταξύ των HCs και των μη παρεγχυματικών κυττάρων αποδείχθηκε ότι αυξάνει την επιβίωση και τη λειτουργικότητα των HCs εντός της γέλης κολλαγόνου ως αποτέλεσμα του αγγειακού σχηματισμού και των λειτουργικών ικανοτήτων των HCs (δηλ. έκκριση λευκωματίνης και σύνθεση ουρίας). Αυτή η τεχνολογία έδειξε τη δυνατότητα δημιουργίας ετεροτυπικής κυτταρικής αλληλεπίδρασης μέσα σε μια δομή για τη μηχανική ηπατικού ιστού.[107]

Πρόσφατα, μια αναφορά για την πρώτη «πλήρη» βιοεκτύπωση καρδιάς τράβηξε τα βλέμματα όλων. Το 2019, οι Noor και άλλοι επιστήμονες από το Πανεπιστήμιο του Τελ Αβίβ υιοθέτησαν κύτταρα από νοητικό ιστό ασθενών που θα επαναπρογραμματιστούν σε πολυδύναμα βλαστοκύτταρα και θα διαφοροποιηθούν σε καρδιομυοκύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα. Αυτοί οι δύο τύποι κυττάρων συνδυάζονται με υδρογέλες για να ετοιμάσουν την κατασκευή παρεγχυματικού καρδιακού ιστού και αιμοφόρων αγγείων αντίστοιχα, γεγονός που απέδειξε την ικανότητα βιοεκτύπωσης προσαρμοσμένων αγγειοποιημένων επιθεμάτων. Επιπλέον, εκτυπώθηκε μια κυτταροποιημένη ανθρώπινη καρδιά με φυσική αρχιτεκτονική στο μέγεθος μιας καρδιάς κουνελιού (ύψος: 20 mm, διάμετρος: 14 mm) η οποία ήταν διαχύσιμη αλλά δεν μπορούσε λειτουργικά να αντλήσει αίμα. Αυτή η μελέτη έδειξε τις δυνατότητες της μηχανικής εξατομικευμένων ιστών και οργάνων ή για τον έλεγχο φαρμάκων σε μια κατάλληλη ανατομική δομή και βιοχημικό μικροπεριβάλλον ειδικό για τον ασθενή. Λίγους μήνες αργότερα, οι Lee κ.α. από το Πανεπιστήμιο Carnegie Mellon πέτυχε τη βιοεκτύπωση στοιχείων της ανθρώπινης καρδιάς σε διάφορες κλίμακες, από τα τριχοειδή έως το πλήρες όργανο, χρησιμοποιώντας μια

βελτιστοποιημένη τεχνική βασισμένη στο FRESH που αναφέρθηκε παραπάνω. Τεχνικά, η βιοεκτύπωση δομών τεχνητής καρδιάς με μικροκανάλια μέσα στη καρδιά και η συνειδητοποίηση των καρδιομυοκυττάρων να χτυπούν με τον ίδιο ρυθμό σε μια μικρή περιοχή δεν είναι τόσο δύσκολο. Αυτό που είναι πραγματικά δύσκολο είναι να επιτευχθούν εσωτερικά λειτουργικά αιμοφόρα αγγεία και μεγάλες περιοχές καρδιακού ιστού με επαρκή σκληρότητα και ελαστικότητα. Με στόχο την αντικατάσταση καρδιοειδών οργάνων, αφήνοντας κατά μέρος τις περίπλοκες κυτταρικές πηγές, η εσωτερική δομή της καρδιάς πρέπει να πληροί δύο σημεία:

1. Απαιτείται πολύπλοκο λειτουργικό αγγειακό δίκτυο μέσα στη δομή λόγω της έντονης ανταλλαγής ενέργειας των καρδιακών παλμών.

2. Μεγάλες περιοχές καρδιακού ιστού με επαρκή σκληρότητα και ελαστικότητα θα πρέπει να μπορούν να χτυπούν με τον ίδιο ρυθμό, διαφορετικά δεν μπορεί να επιτευχθεί η άντληση αίματος.

Δομικά και μορφολογικά, το ανθρώπινο όργανο είναι πολύ πιο περίπλοκο από ό,τι μπορούμε να φανταστούμε αυτή τη στιγμή. Πολλά μυστήρια απομένουν να λυθούν στον μηχανισμό ανάπτυξης και ανάπτυξης οργάνων που είναι επίσης το μεγαλύτερο πρόβλημα της τρισδιάστατης εκτύπωσης και αντικατάστασης οργάνων. Υπάρχει ακόμη πολύς δρόμος για την τρισδιάστατη βιοεκτύπωση από τη δομική ομοιότητα έως τη λειτουργική υλοποίηση.

5.2.7 Έρευνα για φάρμακα

Ένας από τους κύριους στόχους της μηχανικής ιστών είναι η καθιέρωση ενός φαρμακοκινητικού μοντέλου για τον έλεγχο φαρμάκων και την τοξικολογική μελέτη, για την ρεαλιστική και αξιόπιστη πρόβλεψη της ανθρώπινης απόκρισης στις επιδράσεις του φαρμάκου και τους πιθανούς τοξικούς κινδύνους. Το 2008, οι Chang κ.α. δημιούργησαν μια τρισδιάστατη μικρορευστοποιημένη, μικροοργανική συσκευή (3DM) για την προσομοίωση της φυσιολογικής ανθρώπινης απόκρισης στις χορηγήσεις φαρμάκων και στην έκθεση σε τοξικές χημικές ουσίες. Ενσωματωμένη με μια μικρορευστοποιημένη πλατφόρμα και τεχνική βιοεκτύπωσης με βάση την εξώθηση, αυτή η μελέτη πέτυχε αναπαραγωγίσιμη κατασκευή ιστού και 3D θαλάμους οργάνων με διατήρηση της δομικής ακεραιότητας, ενίσχυση της βιωσιμότητας των κυττάρων με έλεγχο της διαφοροποίησης σε κυτταρικό επίπεδο και της λειτουργίας του επιπέδου ιστού, που σημαίνει εφαρμοσμένη βιοεκτύπωση 3D Κατασκευών μηχανικής ιστού, ενθυλακωμένες σε κύτταρα που βασίζονται σε αλγινικά, μέσα σε θαλάμους ιστού για να σχηματίσουν ένα φαρμακοκινητικό μοντέλο.[108] Λίγο αργότερα, το 2010, η ίδια ερευνητική ομάδα ανέπτυξε έναν βιοεκτυπωτή

βασισμένο σε εξώθηση για να χρησιμοποιήσει τα ηπατικά κύτταρα (HepG2) που ενθυλακώνουν αλγινικά ως βιολίθωμα, για την κατασκευή μιας πλατφόρμας δοκιμών φαρμάκων στο ήπαρ. Σε αυτό το σύστημα, η μεταβολική ικανότητα του ήπατος του φαρμάκου παρατηρήθηκε μέσω της βέλτιστης προσομοίωσης σε εν ζωή τρισδιάστατο μικροπεριβάλλον, της αρχιτεκτονικής του ήπατος ή των ροών μικρορρευστού διάχυσης με τη μεσολάβηση διάτμησης.

5.3 Εφαρμογές με βάση τα σταγονίδια

5.3.1 Δέρμα

Το 2012, οι P. Sofokleous κ.α. σχεδίασαν μια φορητή συσκευή χειρός πολλαπλών βελόνων βασισμένη στο EHDJ. Καθοδηγούμενη από ένα ηλεκτρικό πεδίο υψηλής τάσης και ρυθμίζοντας τη γωνία του πιστολιού ψεκασμού σύμφωνα με τη γωνία αναφοράς (RA), αυτή η συσκευή θα μπορούσε να ψεκάσει διάλυμα PLGA ή πολυ(μεθυλσιλσεσκιοξάνης) (PMSQ) σε πολυλειτουργικά σωματίδια και ίνες σε μέγεθος μικρομέτρου [109]. Παρόλο που το κυτταρικό βιολεγκό δεν συμμετείχε σε αυτή τη μελέτη, το διαφωτιστικό αυτής της μελέτης είναι ότι, λόγω των ευέλικτων και ασφαλών χαρακτηριστικών αυτής της φορητής συσκευής, οι ερευνητές θα μπορούσαν να δοκιμάσουν να προσθέσουν φάρμακα, αυξητικούς παράγοντες, παράγοντες πήξης ή άλλες ουσίες σε διάλυμα PLGA που θα μπορούσε να εφαρμοστεί κλινικά όπως επίδεσμος τραύματος και αποκατάσταση δέρματος.

Το 2013, με βάση την προηγούμενη εργασία, ο Michael κ.α. χρησιμοποίησαν την ιδιότητα ότι το LIFT μπορούσε να τοποθετήσει με ακρίβεια διαφορετικούς τύπους κυττάρων σε 3D, βιοτυπωμένους, ινοβλάστες και κερατινοκύτταρα πάνω από μια σταθεροποιητική μήτρα (Matriderm), για να πάρει ένα υποκατάστατο δέρματος, το οποίο δοκιμάστηκε περαιτέρω σε γυμνά ποντίκια. Μετά από 11 ημέρες βιοεκτύπωσης, το μόσχευμα προσκολλήθηκε καλά στον ιστό γύρω από το τραύμα του δέρματος και παρατηρήθηκε πολλαπλασιασμός και διαφοροποίηση των κυττάρων στο μόσχευμα (Εικ Α, Figure 25). Η επίδραση της τεχνολογίας LAB στη θεραπεία εγκαυμάτων δέρματος επαληθεύτηκε. [110]

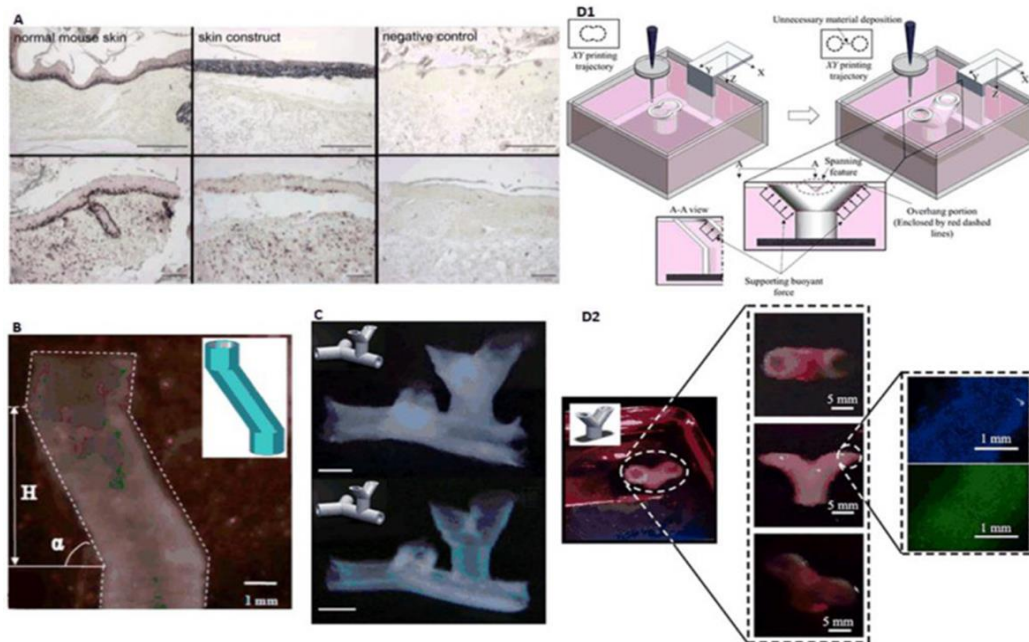


Figure 25 - lift, inkjet

- (Α. Κατάσταση πολλαπλασιασμού κυττάρων προσομοίωσης του δέρματος με LIFT)
 (Β. Σωληνοειδής δομή ζιγκ-ζαγκ εκτύπωσης inkjet)
 (Δ1-Δ2. Εκτύπωση inkjet οριζόντια και κατακόρυφα διακλαδισμένες αγγειακές δομές)

5.3.2 Οστό – Χόνδρος

Το 2007, οι De Corpi κ.α. παρήγαγαν δομές που μοιάζουν με οστά χρησιμοποιώντας βιοεκτυπωτές inkjet και τις εμφύτευσαν σε ποντίκια μετά από καλλιέργεια. Παρατηρήθηκε ιστός υψηλής ανοργανοποίησης με παρόμοια πυκνότητα με τον ενδογενή οστικό ιστό (τον πραγματικό ιστό των ποντικιών). Το 2010, χρησιμοποιώντας έναν σταθμό εργασίας βιοεκτύπωσης λέιζερ υψηλής απόδοσης που σχεδίασαν πριν, οι Keriquel κ.α. πραγματοποίησαν πείραμα επιδιόρθωσης κρανίου σε ποντίκια. Οι ερευνητές υιοθέτησαν νανο-υδροξυαπατίτη (n-HA) για πειραματική βιοεκτύπωση, γεμίζοντας ελαττώματα οστών κρίσιμου μεγέθους με διάμετρο περίπου 3 mm. Τα προκαταρκτικά αποτελέσματα έδειξαν ότι η εν ζωή βιοεκτύπωση είναι δυνατή για την αποκατάσταση των οστών.

Το 2012, οι Cui κ.α. χρησιμοποίησε έναν τροποποιημένο εκτυπωτή θερμικού inkjet HP Deskjet 500, για βιοεκτύπωση διμεθακρυλικής πολυ(αιθυλενογλυκόλης) (PEGDMA) με ανθρώπινα χονδροκύτταρα για την επιδιόρθωση ελαττωμάτων στα οστεοχόνδρια βύσματα σε λειτουργία στρώσης προς στρώση. Η μελέτη επαλήθευσε την ικανότητα της βιοεκτύπωσης inkjet για τον έλεγχο της τοποθέτησης μεμονωμένων κυττάρων, τη διατήρηση της

βιωσιμότητας των κυττάρων, τη διατήρηση του χονδρογενούς φαινοτύπου και την επίδειξη της ενσωμάτωσης με τον ιστό ξενιστή.

5.3.3 Νεύρα

Το 2006, οι Eagles κ.α. έδειξε ότι το EHDJ μπορούσε να εναποθέσει νευρώνες σε κλίμακα micron χωρίς σημαντική διαταραχή στους νευρώνες, τα κύτταρα θα μπορούσαν να επιβιώσουν και να διαφοροποιηθούν μετά την εκτύπωση. Το 2014, οι Lorber κ.α. επαλήθευσε τη σκοπιμότητα της βιοεκτύπωσης με πιεζοηλεκτρική έγχυση μελάνης γαγγλιακά κύτταρα αμφιβληστροειδούς ενηλίκου επίμυος (RGC) και νευρογλοιακά κύτταρα. Τα πειράματα έδειξαν ότι αυτή η μέθοδος εκτύπωσης δεν είχε σημαντική επίδραση στην επιβίωση των RGC/γλοιακών κυττάρων και στην ανάπτυξη των νευρίνων RGC και τα νευρογλοιακά κύτταρα διατήρησαν τις ιδιότητες που προωθούν την ανάπτυξη μετά την εκτύπωση. [110] [111]

5.3.4 Αιμοφόρα αγγεία - αγγείωση

Το 2012, χρησιμοποιώντας έναν πιεζοηλεκτρικό βιοεκτυπωτή inkjet, ο Xu κατασκεύασε κυτταρικούς σωλήνες ζιγκ-ζαγκ γεμάτοι με ινοβλάστες σε διάλυμα χλωριούχου ασβεστίου με τρόπο χωρίς ικρίωμα (Εικ. Β, Figure 25). Το διάλυμα χλωριούχου ασβεστίου χρησιμοποιήθηκε τόσο ως υλικό διασύνδεσης όσο και ως υλικό υποστήριξης για την παροχή άνωσης. Στην μετέπειτα έρευνά του το 2014, ο Xu συζήτησε περαιτέρω τη σκοπιμότητα του συνδυασμού κάθετης και οριζόντιας βιοεκτύπωσης για την αποτελεσματική κατασκευή σύνθετων σωληνοειδών δομών με χαρακτηριστικά κάθετης και οριζόντιας διακλάδωσης. Στη μελέτη παρακολούθησης της ίδιας ερευνητικής ομάδας το 2015, οι Christensen χρησιμοποίησε την ίδια συσκευή, χρησιμοποιώντας αλγινικό νάτριο και βιομελάνι γεμάτο με ινοβλάστες ποντικού, για να εκτυπώσει επιτυχώς αγγεία με οριζόντιους και κατακόρυφους κλάδους (Εικ. Δ1, Figure 25).

Το 2010, οι Wu και Ringeisen εφάρμοσαν την τεχνολογία BioLP, χρησιμοποιώντας HUVEC και HUVSMC για να κατασκευάσουν δομές κλάδων/βλαστών. Αυτή η μελέτη συζήτησε την επίδραση των δομών συνκαλλιέργειας στην κυτταρική ανάπτυξη και λειτουργικότητα, η οποία έδειξε περαιτέρω τη δυνατότητα να κατευθυνθεί ο σχηματισμός και η ανάπτυξη του αυλού και του δικτύου αυλού από το BioLP. Σε μια μεταγενέστερη μελέτη το 2011, ο Pirlo από την ίδια ερευνητική ομάδα, βελτίωσε περαιτέρω τη σταθερότητα των κλαδιών εκτυπώνοντας ένα άλλο στρώμα HUVSMCs πάνω από το στρώμα HUVEC για να σχηματίσει πολυεπίπεδες δομές.

Το 2015, οι Xiong και άλλοι επιστήμονες από την ίδια ομάδα υιοθέτησαν διάλυμα αλγινικού φορτωμένου με ινοβλάστες ποντικίου ως βιολίθωμα για βιοεκτύπωση ευθύγραμμου σχήματος «Υ» σωλήνων ινοβλαστών με τον τρόπο του MAPLE-DW (Εικ. Δ2, , Figure 25) οι βιωσιμότητα κυψελών μετά την εκτύπωση αμέσως μετά την εκτύπωση καθώς και μετά την επώαση 24 ωρών ήταν πάνω από 60% για και οι δύο δομές.

5.3.5 Οργανοειδές

Το 2011, οι Gaebel κ.α. εφάρμοσε την τεχνική LIFT και ετοίμασε ένα καρδιακό έμπλαστρο σπαρμένο με HUVEC και ανθρώπινο MSC (hMSC) σε ένα καθορισμένο μοτίβο για καρδιακή αναγέννηση. Μέσω πειραμάτων σε αρουραίους, αυτό το καρδιακό έμπλαστρο αποδείχθηκε ότι ενισχύει την αγγειογένεση στην οριακή ζώνη του εμφράγματος και διατηρεί τις καρδιακές λειτουργίες μετά από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου (Εικ. Α, Figure 25). Αυτή η μελέτη παρείχε έναν τρόπο καρδιακών επιθεμάτων με βάση την τεχνολογία LIFT για τη θεραπεία του εμφράγματος του μυοκαρδίου

Το 2013, οι Xu κ.α. ανέπτυξε μια μέθοδο για την κατασκευή πολύπλοκων και ετερογενών τρισδιάστατων κατασκευών με πολλαπλούς τύπους κυττάρων. Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν έναν τροποποιημένο βιοεκτυπωτή θερμικής έγχυσης μελάνης και ανάμειξαν ξεχωριστά ανθρώπινα κύτταρα AFS (hAFSCs), SMCs σκύλων (dSMCs), ενδοθηλιακά κύτταρα αορτής βοοειδών (bECs) με χλωριούχο ασβέστιο, φορτωμένα σε ξεχωριστά δοχεία μελάνης. Αυτά τα κύτταρα στη συνέχεια βιοτυπώθηκαν στρώση προς στρώμα σε θάλαμο γεμάτο με σύνθετο αλγινικό νάτριο-κολλαγόνο. Λόγω της ιοντικής σταυροσύνδεσης, τα κύτταρα που περιείχαν βιολίκ ακινητοποιήθηκαν στη συνέχεια σε σχεδιασμένες περιοχές εντός της γέλης. Σύνθετες υβριδικές κατασκευές πολλαπλών κυψελών 3D δημιουργήθηκαν μετά από επανάληψη αυτής της διαδικασίας εκτύπωσης για αρκετούς κύκλους (Εικ. Γ, Figure 25). Μεταγενέστερα πειράματα έδειξαν ευνοϊκή βιωσιμότητα κυττάρων, ρυθμούς πολλαπλασιασμού, φαινοτυπική έκφραση και φυσιολογικές λειτουργίες εντός των ετερογενών κατασκευών, που εξέφρασαν σημαντική λειτουργικότητα και αγγείωση *in vivo*.

Το 2018, οι Zhao κ.α. από την ερευνητική μας ομάδα πραγματοποίησε τη βιοεκτύπωση πολυκύτταρων ετερογενών δομών σε μικροσφαίρες με τον τρόπο EHDJ, με ακρίβεια έως ανάλυση ενός κυττάρου. Ένα μικρορευστοστόμιο εφαρμόστηκε για τη βελτίωση της ικανότητας περίπλοκης ενθυλάκωσης κυττάρων με ετεροτυπική επαφή. Πολύπλοκες δομές, όπως τριαντάφυλλο, μοτίβο Tai chi και μεμονωμένη κυτταρική σειρά μπορούν εύκολα να

επιτευχθούν στα σφαιροειδή (Εικ. Β, Figure 25). Αποδείξαμε περαιτέρω ότι η δομή των σπειροειδών σφαιροειδών ήταν ένα πρακτικό εργαλείο για την κατασκευή λειτουργικών οργανοειδών *in vitro* με την ενσωμάτωση πολλαπλών κυττάρων στο σφαιροειδές, συμβάλλοντας νέα βιομιμητικά ασύμμετρα πρωτότυπα για βασική ιατρική έρευνα και αναγεννητική ιατρική

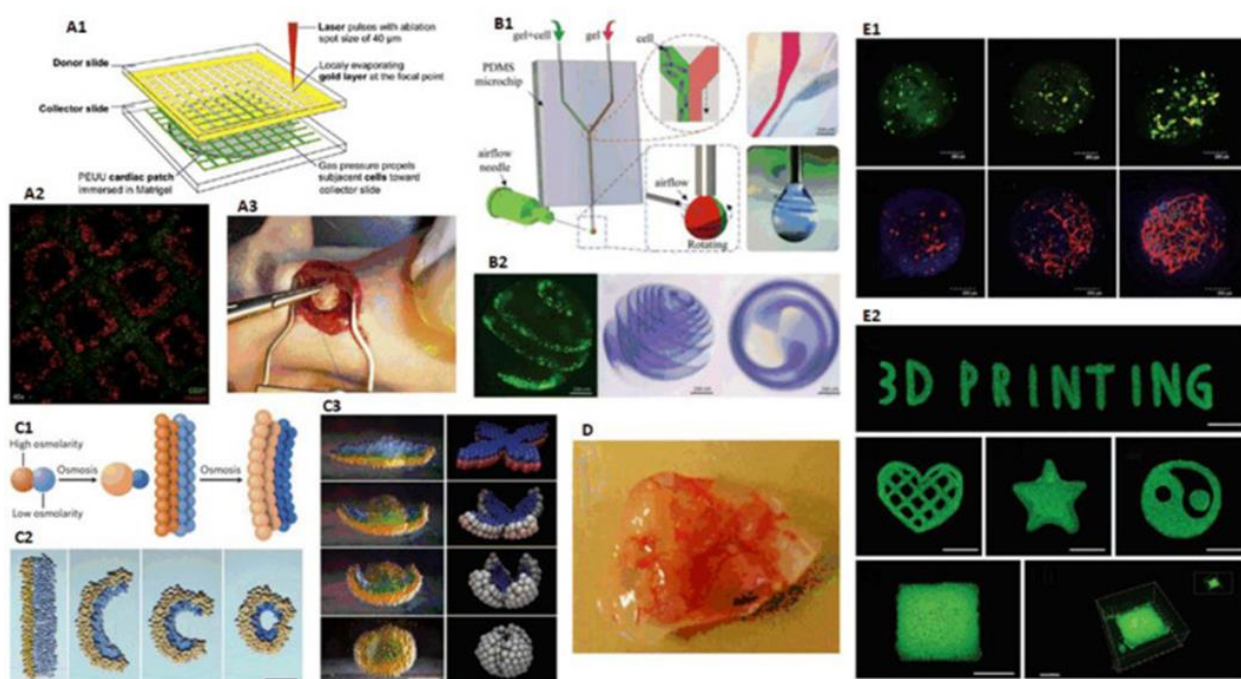


Figure 26 - lift μικροσφαιριδίων

(Εικόνα Α: Εμφύτευση καρδιακών επιθεμάτων που κατασκευάζονται με LIFT σε αρουραίους

Β: Η EHDJ κατασκευάζει μικροσφαιρίδια με πολύπλοκες δομές

Γ: Αυτοαναδιπλούμενα δίκτυα σταγονιδίων που προσομοιώνουν δομές ιστού

Δ: Δομή αγγειοποιημένης ιστικής εκτύπωσης inkjet

Ε: EHDJ που κατασκευάζει μικροσφαιρίδια και μοτίβα φορτωμένα με κύτταρα

5.3.6 Φαρμακευτική έρευνα

Το 2013, οι N.G. Durmus κ.α. ανέπτυξαν μια ειδική μέθοδο βιοεκτύπωσης με βάση σταγονίδια: τυπωμένα δίκτυα σταγονιδίων που μιμούνται τον ιστό που διαχωρίζονται από διπλές στοιβάδες λιπιδίων, τα οποία μπορούσαν να λειτουργήσουν με πρωτεΐνες μεμβράνης, ήταν σε θέση να διπλώνουν και να μεταδίδουν αυθόρμητα ηλεκτρικά ρεύματα κατά μήκος προκαθορισμένων

μονοπατιών. Τα αυτοαναδιπλούμενα, ανταποκρινόμενα στα ερεθίσματα σταγονίδια που λαμβάνονται με αυτόν τον τρόπο μπορούν περαιτέρω να εφαρμοστούν με μικρορευστικά για την τοπική σύλληψη, απομόνωση και απελευθέρωση σπάνιων κυττάρων για διαγνωστικές εφαρμογές (π.χ. κυκλοφορούν κύτταρα όγκου για ανίχνευση καρκίνου ή κύτταρα CD4 για παρακολούθηση HIV) (Εικ. Γ, Figure 26).

Το 2018, οι M. Xie και Q. Gao, από μια ερευνητική ομάδα πρότειναν μια μέθοδο για την παραγωγή μικροσφαιρών σε ποσότητα με βάση το EHDJ. Παρουσιάσαμε τρεις τυπικές εφαρμογές για να δείξουμε την ευρεία προοπτική εφαρμογής των τυπωμένων μικροσφαιρών.

1. Κυτταρική ενθυλάκωση: Τα BMSC διατήρησαν την ικανότητα εξάπλωσης σε μικροσφαίρες αφού υποβλήθηκαν σε διαδικασία ηλεκτρο-υποβοηθούμενης εκτύπωσης.
2. Ελεγχόμενη απελευθέρωση φαρμάκου: μικροσφαίρες που περιέχουν δεξτράνη και αλβουμίνη ορού βοοειδών (BSA) έδειξαν καλό αποτέλεσμα ελεγχόμενης απελευθέρωσης.
3. Τρισδιάστατη βιοεκτύπωση: χρησιμοποιώντας μικροσφαίρες φορτωμένες με κύτταρα ως μονάδες διαμόρφωσης, οι τρισδιάστατες δομές θα μπορούσαν να εκτυπωθούν απευθείας ελέγχοντας την ομαλή κίνηση του ακροφυσίου (Εικ. Δ, Figure 26)

5.4 Εφαρμογές με βάση τον φωτοπολυμερισμό

5.4.1 Χόνδρος αρθρώσεων

Το 2018, ο Zhu ανέφερε μια τεχνολογία για την κατασκευή ιστού φορτωμένου με κύτταρα με βάση τη στερεολιθογραφία. Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν βιομελάνι αποτελούμενο από MSC (τα οποία μπορούσαν να διαφοροποιηθούν σε χονδροκύτταρα), GelMA, διακρυλική πολυαιθυλενογλυκόλη (PEGDA) (που θα μπορούσε να βελτιώσει σημαντικά την ανάλυση και τις μηχανικές ιδιότητες εκτύπωσης), φωτοεκκινητή και ενσωματωμένες νανοσφαίρες μετασχηματιστικού αυξητικού παράγοντα βήτα 1 (TGF-β1), μέσω τεχνικής ηλεκτροψεκασμού πυρήνα-κελύφους. Πειράματα έδειξαν ότι τα κύτταρα και οι μικροσφαίρες κατανεμήθηκαν ομοιόμορφα στα βιοτυπωμένα κατασκευάσματα χόνδρου με καλά καθορισμένη αρχιτεκτονική. και ο TGF-β1 που είναι ενσωματωμένος σε νανοσφαίρες διατήρησε μια παρατεταμένη απελευθέρωση

έως και 21 ημέρες, βελτιώνοντας τη χονδρογονική διαφοροποίηση των ενθυλακωμένων MSCs. Αυτή η μελέτη παρείχε μια πολλά υποσχόμενη στρατηγική για την αναγέννηση του χόνδρου εφαρμόζοντας βιοεκτύπωση με βάση τη φωτοπολυμερισμό. [112]

5.4.2 Νεύρα

Το 2015, ο C.J. Pateman σχεδίασε μια διάταξη με βάση το μSLA με ανάλυση εκτύπωσης ~50 mm για την κατασκευή αγωγών καθοδήγησης νεύρων (NGCs) που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την επιδιόρθωση περιφερικών νεύρων. Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν ρητίνη PEG για να κατασκευάσουν NGC με διαστάσεις 1 mm εσωτερικής διαμέτρου, 5 mm μήκος και 250 mm πάχος τοιχώματος. Διεξήχθησαν πειράματα σε ποντίκια για να επαληθευτεί η σκοπιμότητά του (Εικ. Α, Figure 27). Αν και το PEG δεν ήταν συνήθως ευνοϊκό για κυτταρική προσκόλληση, οι ερευνητές παρατήρησαν ότι η φωτοθεραπεύσιμη μορφή του PEG που χρησιμοποιήθηκε εδώ ήταν επιτρεπτή για νευρωνική ανάπτυξη και πειραματική διαφοροποίηση. [113]

Το 2018, οι Zhu κ.α. χρησιμοποίησαν μια πλατφόρμα ταχείας συνεχούς τρισδιάστατης εκτύπωσης που βασίζεται σε φωτοπολυμερισμό για την κατασκευή NGC (Εικ. Β, Figure 27). Η εμφύτευση NGCs με μικροκανάλια σε πλήρεις διατομές ισχιακού νεύρου μοντέλων ποντικών απέδειξε την αποτελεσματική κατευθυντική καθοδήγηση της αναγέννησης των ισχιακών νεύρων μέσω διακλάδωσης σε μικροκανάλια και επέκτασης προς το περιφερικό άκρο της θέσης τραυματισμού. Η ιστολογική χρώση και ανοσοχρώση επιβεβαίωσαν περαιτέρω την προοδευτική κατευθυντική αναγέννηση των νεύρων και τη συμπεριφορά διακλάδωσης σε όλο το μήκος. [114]

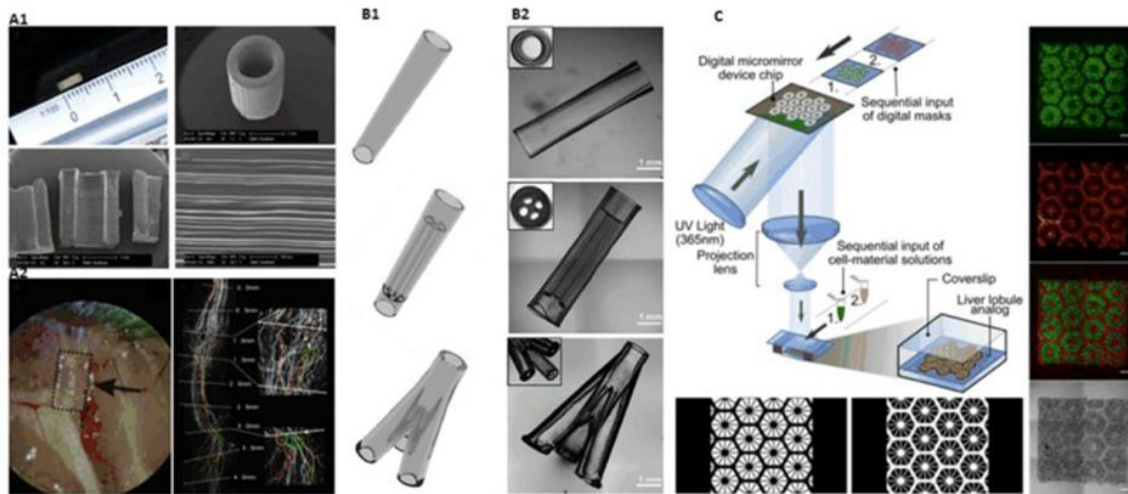


Figure 27 - NGC από μSLA και DLP

(A: NGC που κατασκευάστηκαν από μSLA και πείραμα αρουραίων)
 (B: NGC που κατασκευάζονται από την DLP)
 (Γ: Ηπατική δομή που βασίζεται σε υδρογέλη)

5.4.3 Νωτιαίος μυελός

Το 2019, οι Koffler κ.α. χρησιμοποίησε μια μέθοδο εκτύπωσης συνεχούς προβολής σε μικροκλίμακα (μCPP) για την κατασκευή πολύπλοκων εμφυτευμάτων κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ), για την προώθηση της ανάπτυξης των νεύρων και την αποκατάσταση των νευρικών συνδέσεων σε θέσεις τραυματισμού του νωτιαίου μυελού. Βιοτυπωμένες δομές εμφυτεύθηκαν στη θέση σοβαρού τραυματισμού του νωτιαίου μυελού σε αρουραίους, με πλήρη αναγέννηση νέου ιστού νωτιαίου μυελού που παρατηρήθηκε μετά από αρκετούς μήνες και η λειτουργική κίνηση των οπίσθιων άκρων αρουραίων βελτιώθηκε σημαντικά. Ενώ οι άξονες θα διαχέονταν και θα αναγεννιούνταν προς οποιαδήποτε κατεύθυνση, οι ερευνητές εκτύπωσαν εξατομικευμένα ικριώματα 3D που περιείχαν δεκάδες πόρους 200 micron, ευθυγραμμίζοντας τους αναγεννημένους άξονες του ενός άκρου του τραυματισμού του νωτιαίου μυελού με το άλλο, που κατεύθυνε την ανάπτυξη νευρικών βλαστοκυττάρων και νευραξόνων σε παράλληλους γραμμικούς πίνακες. Αξίζει να σημειωθεί ότι αυτή η μέθοδος παρήγαγε ανάλυση εκτύπωσης 1 μm. Και χρειάστηκε μόνο 1,6 δευτερόλεπτα για την εκτύπωση ενός ικριώματος 2 mm, η οποία ήταν σχεδόν χίλιες φορές ταχύτερη σε σύγκριση με τις παραδοσιακές προσεγγίσεις βιοεκτύπωσης. Τα ικριώματα από υδρογέλες PEGDA-GelMA παρείχαν σημαντική μηχανική αντοχή διασφαλίζοντας ότι τα κανάλια και ο στερεός πυρήνας στα ικριώματα δεν είχαν υποστεί ζημιά ή παραμόρφωση κατά τη

διάρκεια πειραμάτων σε ζώα. Για βιοσυμβατότητα, τα αντιδραστικά κυτταρικά στρώματα και οι κοκκοποιημένοι ιστοί που σχηματίστηκαν γύρω από τα ικρίωματα PEGDA-GelMA αποδυναμώθηκαν σημαντικά και η αντίδραση των αστροκυττάρων στο τραυματισμένο σημείο μπορούσε να ανακατασκευαστεί, έτσι ώστε τα αστροκύτταρα του ξενιστή να ευθυγραμμίζονται με τον άξονα ανάπτυξης των νευραξόνων του ξενιστή αντί να το μπλοκάρουν. Έλυσε τη φλεγμονώδη αντίδραση της εμφύτευσης ικτριωμάτων. Αυτή η μέθοδος θα μπορούσε να επεκταθεί για τα μεγέθη του ανθρώπινου νωτιαίου μυελού και τις γεωμετρίες των βλαβών, παρέχοντας μια ακριβή προσέγγιση για την αναγέννηση του κεντρικού νευρικού συστήματος.

5.4.4 Αιμοφόρα αγγεία

Το 2017, ο Zhu μαζί με μία ομάδα επιστημόνων χρησιμοποίησαν μία μέθοδο ταχείας βιοεκτύπωσης που ονομάζεται συνεχής οπτική βιοεκτύπωση σε μικροκλίμακα (μCOB) για τη δημιουργία προαγγειοποιημένων ιστών. Πολλαπλοί τύποι κυττάρων που μιμούνται τη σύνθεση των φυσικών αγγειακών κυττάρων ενθυλακώθηκαν απευθείας σε υδρογέλες με επακριβώς ελεγχόμενη κατανομή χωρίς την ανάγκη θυσιαστικών υλικών ή διάχυσης. Πειράματα *in vitro* έδειξαν ότι τα ενδοθηλιακά κύτταρα σχημάτισαν αυθόρμητα δομές που μοιάζουν με αυλό λόγω των ιδιοτήτων βιοϋλικού τους που ελέγχονται από την περιοχή. Η *in vivo* εμφύτευση έδειξε την επιβίωση και τον προοδευτικό σχηματισμό του ενδοθηλιακού δικτύου στον προαγγειωμένο ιστό, ενώ το βιοτυπωμένο ενδοθηλιακό δίκτυο με λειτουργικά αιμοφόρα αγγεία με ερυθρά αιμοσφαίρια αναστομώθηκε με την κυκλοφορία του ξενιστή. [114]

5.4.5 Οργανοειδές

Το 2016, ο Ma μαζί με την ομάδα του χρησιμοποίησαν την ίδια τεχνική με το προηγούμενο μέρος, για να κατασκευάσουν ένα τρισδιάστατο βιομιμητικό ηπατικό μοντέλο συν-καλλιέργειας που περιλαμβάνει τρεις τύπους κυττάρων: πολυδύναμα βλαστοκύτταρα που προκαλούνται από τον άνθρωπο (hiPSCs), HUVECs και βλαστοκύτταρα προερχόμενα από λίπος (ADSCs), ενώ χρησιμοποιήθηκε υδρογέλη GelMA ως υλικό μήτρας. Οι ερευνητές ενθυλάκωσαν διαφορετικούς τύπους κυττάρων σε συμπληρωματικά μοτίβα, μιμούμενοι τη δομή του ηπατικού λοβού με φωτοπολυμερισμό των μητρών υδρογέλης. Έπειτα, σχεδιάστηκαν δύο μοτίβα που μοιάζουν με τις ανατομικές δομές των ηπατοκυττάρων και των υποστηρικτικών κυττάρων, τα οποία προσαρμόστηκαν ώστε να έχουν κατά προσέγγιση διαστάσεις των λοβών του ανθρώπινου ήπατος. Τέλος, προτάθηκε περαιτέρω μια στρατηγική

φωτοπολυμερισμού δύο σταδίων που παρέχει μια αποτελεσματική και ευέλικτη μέθοδο για την κατασκευή *in vitro* μοντέλου ήπατος, το οποίο θα μπορούσε να βελτιώσει τη δομή και τη λειτουργία των ηπατικών προγονικών κυττάρων που προέρχονται από hiPSC (hiPSC-HPCs).

Κεφάλαιο 6 - Περιορισμοί και προκλήσεις

Ως ένας γρήγορα αναπτυσσόμενος κλάδος, η βιοεκτύπωση αντιμετωπίζει πολλές προκλήσεις. Οι βιολογικοί ιστοί είναι σύνθετες ιεραρχικές και, σε πολλές περιπτώσεις, ζωνικές (διαιρεμένες σε ζώνες) δομές με πολύπλοκη λειτουργία και χαρακτηριστικά, και οι βιοεκτυπωμένες κατασκευές πρέπει να αναπαράγουν αυτά τα χαρακτηριστικά. Επομένως, για την επισκευή/αναγέννηση κατεστραμμένων ιστών, η σύνθεση και η δομή των εκτυπωμένων κατασκευών διαδραματίζουν κομβικό ρόλο. Ωστόσο σήμερα, οι μελέτες βιοεκτύπωσης παρουσιάζουν δυσκολίες στο να αναπαράγουν την πολυπλοκότητα των φυσικών ιστών ή να δημιουργούν ιστούς με σταθερή λειτουργία. Για να γίνει στο μέλλον εφικτή μια βιοεκτύπωση με ελπιδοφόρα κλινικά αποτελέσματα απαιτείται μεγάλη πρόοδος και έρευνα. Στην συνέχεια, θα παρατεθούν μερικές από τις προκλήσεις που αντιμετωπίζει ή θα αντιμετωπίσει στο μέλλον η βιοεκτύπωση. [17]

Αρχικά, Τα ιδανικά bioinks θα πρέπει να ικανοποιούν αρκετές απαιτήσεις, όπως η καλή και ελεγχόμενη εκτυπωσιμότητα, η κυτταροσυμβατότητα για την επιβίωση των κυττάρων και ο έλεγχος της συμπεριφοράς τους μετά την ενσωμάτωση της κατασκευής σε έναν οργανισμό [90]. Τα ρεολογικά χαρακτηριστικά, όπως το ιξώδες που καθορίζεται από την σύνθεση του υλικού (π.χ. από το μοριακό του βάρος και την συγκέντρωσή του), μπορούν να επηρεάσουν την εκτυπωσιμότητα των bioinks και την κατανομή των κυττάρων κατά τη διάρκεια της εκτύπωσης. Επιπλέον, η βιοσυμβατότητα των υλικών, των κυττάρων και των βιομορίων εξασφαλίζει επιβίωσή τους. Ακόμη, σε περίπτωση φωτοπολυμερισμού, η επιλογή των photo-initiators είναι κρίσιμη και ο συνδυασμός διαφορετικών photo-initiators που είναι ευαίσθητοι σε διαφορετικά μήκη κύματος αποτελεί σημαντικό παράγοντα για τη δημιουργία λειτουργικών δομών. Η ένταση του φωτός και η χρονική διάρκεια έκθεσής του επίσης επηρεάζει την κυτταροτοξικότητα [94]. Επιπρόσθετα, για να ελέγχουν την συμπεριφορά των κυττάρων, οι εκτυπωμένες κατασκευές πρέπει να έχουν επαρκείς μηχανικές ιδιότητες προκειμένου να αντέχουν τις δυνάμεις των φυσικών ιστών. Επομένως, μετά το πέρας της εκτύπωσης πρέπει να λάβουν μέρος πρόσθετες διαδικασίες, όπως για παράδειγμα η επιτάχυνση της πήξης και διπλοί crosslinkers, οι οποίες μπορούν να παρέχουν βελτιωμένες τόσο μηχανικές όσο και βιολογικές ιδιότητες. Τέλος, ο ρυθμός αποσύνθεσης των εκτυπωμένων υλικών πρέπει να ταιριάζει με το ρυθμό του σχηματισμού νέων ιστών, το οποίο μπορεί να επιτευχθεί χρησιμοποιώντας προηγμένα υλικά.

Συνεχίζοντας, εξαιτίας του παρατεταμένου χρόνου κατασκευής που απαιτείται για την εκτύπωση πολύπλοκων και διαστασιολικά ορθών ιστών και οργάνων, τα bioinks (που περιέχουν τα εγκλεισμένα σε υδρογέλες ζωντανά κύτταρα)

πρέπει να αποθηκεύονται για σημαντικά χρονικά διαστήματα στους χώρους της μηχανής. Το γεγονός αυτό θέτει σε κίνδυνο την επιβίωση των κυττάρων και περιορίζει τη βιοδραστικότητά τους. Για αυτόν τον λόγο, απαιτούνται κατάλληλες συνθήκες αποθήκευσης των bioinks και ένας πιο αυτοματοποιημένος τρόπος «φόρτωσης» και εναπόθεσής τους. [17]

Μια ακόμη σημαντική πρόκληση στη ρομποτική χειρουργική βιοεκτύπωση είναι η καινοτομία και η ολοκλήρωση των τεχνικών απεικόνισης (imaging), ρομποτικής και βιοεκτύπωσης. Οι τρέχουσες τεχνικές σάρωσης εικόνας, όπως η υπολογιστική τομογραφία (CT; computed tomography) και η εικονική μαγνητική τομογραφία (MRI; magnetic resonance imaging) μπορεί να έχουν περιορισμένη ανάλυση και συνεπώς, οι κατασκευές που δημιουργούνται μπορεί να διαφέρουν από τις επιθυμητές. Επομένως, απαιτούνται νέα συστήματα υψηλής ποιότητας και δεδομένα σε πραγματικό χρόνο προκειμένου να επιτευχθεί υψηλή ταχύτητα, ανάλυση και μείωση σφαλμάτων. Επιπλέον, το μεγαλύτερο ποσοστό του εξοπλισμού βιοεκτύπωσης χρησιμοποιεί σύστημα κίνησης σε τρεις άξονες, πράγμα το οποίο περιορίζει την πολυπλοκότητα της εκτυπώσιμης δομής. Συνεπώς, αναμένεται ότι η χρήση πολυαξονικών ρομπότ, όπως 4ων, 5 και 6 αξόνων, θα αυξηθεί σημαντικά επιτρέποντας μεγαλύτερο εύρος ελευθερίας και κίνησης για τη βελτίωση της χειρουργικής απόδοσης και της πολυπλοκότητας των κατασκευών. Τέλος, κάποια χειρουργικά εργαλεία μπορούν επίσης να κατασκευαστούν σε μικρότερη κλίμακα, επιτρέποντας τον ακριβή χειρισμό από τους χειρουργούς σε πολύπλοκες ή μικρές περιοχές ιστών. [17],[95]

Όσον αφορά την επόμενη γενιά χειρουργικών ρομποτικών συστημάτων, αυτή θα πρέπει να ενσωματώνει βελτιωμένο imaging, αισθητήρες με ανατροφοδότηση (όπως π.χ. μέτρηση δύναμης, θέρμανσης, πίεσης και θέσης), πιο γρήγορη ψηφιακή επικοινωνία και βελτιωμένα συστήματα βιοεκτύπωσης. Ένα state-of-art σύστημα imaging μπορεί επίσης να παρέχει υψηλής ανάλυσης 3D βίντεο σε πραγματικό χρόνο το οποίο θα επιτρέπει την παρακολούθηση της διαδικασίας βιοεκτύπωσης. Ακόμη, προκειμένου η βιοεκτύπωση να αποτελέσει σταθερή λύση στα ιατρικά ζητήματα, απαιτείται η δημιουργία πρωτοκόλλων και προτύπων ποιότητας που θα περιγράφουν όλα τα στάδια της διαδικασίας εκτύπωσης (π.χ. βιοψία, προετοιμασία bioink, συστήματα βιοεκτύπωσης και συνθήκες λειτουργίας, καλλιέργεια και χειρισμός, κυτταρική κατανομή κ.α). [17], [95]

Τέλος, η 3D βιοεκτύπωση αντιμετωπίζει και άλλες προκλήσεις που είναι κοινές στη μηχανική ιστών και την ιατρική. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι τα προβλήματα εσωτερικής αγγειοποίησης στα βιοεκτυπωμένα κατασκευάσματα. Ορισμένες μελέτες έχουν επιδείξει την εφικτότητα της κατασκευής αγγειακών

δικτύων σε όργανα. Η δυσκολία στην εκτύπωση ενός αγγειακού δικτύου είναι η συμβατότητα των υλικών και των κυττάρων με τον εκτυπωτή και τις διαδικασίες εκτύπωσης. Επιπλέον, είναι πιθανόν να χρειάζεται περισσότερος χρόνος για την ανάπτυξη και την «ωρίμανση» των αγγειακών δικτύων σε όλη τη δομή του ιστού από τον χρόνο ζωής των κυττάρων. Για να δοθεί περισσότερος χρόνος στα κύτταρα και να διατηρηθεί η λειτουργία του ιστού μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένας βιοαντιδραστήρας (bioreactor; είναι ο αντιδραστήρας που διατηρεί και υποστηρίζει τη ζωή των κυττάρων και των καλλιιεργειών τους).

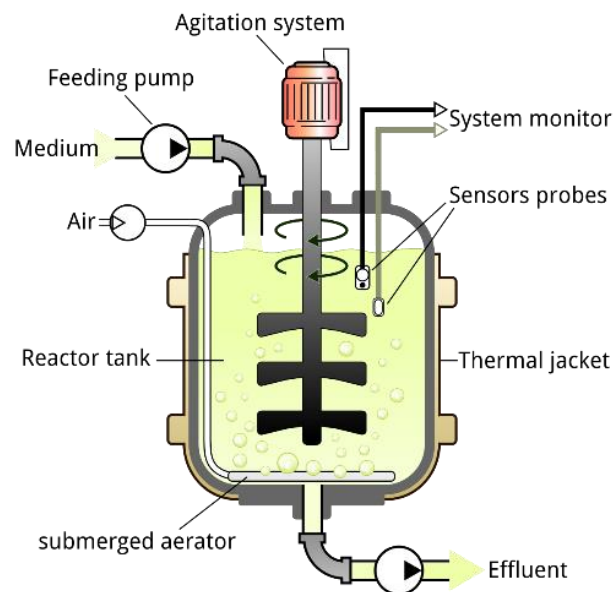


Figure 28 - Βιοαντιδραστήρας

Κεφάλαιο 7 - Συμπεράσματα & Μέλλον

Οι τεχνολογίες τρισδιάστατης βιοεκτύπωσης έχουν ακόμη πολλά περιθώρια βελτίωσης. Οι ιστοί και τα όργανα αποτελούνται από οργανωτικές δομές με διαφορετικά μεγέθη, διαφορετικές ακαμψίες και διαφορετικά κύτταρα. Τα αιμοφόρα αγγεία, για παράδειγμα, τα οποία κυμαίνονται από τριχοειδή αγγεία 20 μm έως αρτηρίες 2,5 cm, συνήθως αποτελούνται από τρία στρώματα κυτταρικών δομών που περιέχουν διαφορετικούς τύπους κυττάρων, με διαφορετικές κυτταρικές λειτουργίες. Η πολυπλοκότητα των ιστών και των οργάνων φέρνει μεγάλη δυσκολία στην ακριβή βιοεκτύπωση, για την επίλυση της οποίας, η βιοεκτύπωση πολλαπλών κλιμάκων, πολλαπλών υλικών και πολλαπλών κυττάρων γίνεται προτεραιότητα για μελλοντική ανάπτυξη.

Η χαμηλή ακρίβεια σε σύγκριση με τους φυσικούς ιστούς και όργανα είναι ένα από τα κύρια μειονεκτήματα των σημερινών τεχνικών βιοεκτύπωσης. Οι περισσότερες δομές ιστών/οργάνων είναι πιο ευαίσθητες από ό,τι μπορούν να φτάσουν οι τρέχουσες συσκευές βιοεκτύπωσης. Ένα άλλο κοινό μειονέκτημα των τεχνικών βιοεκτύπωσης είναι η χαμηλή ταχύτητα βιοεκτύπωσης των πολύπλοκων δομών κλιμάκωσης, ειδικά όταν πρόκειται για ταυτόχρονη βιοκατασκευή πολλαπλών υλικών. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το DLP είναι μια μέθοδος που βασίζεται στην προβολή επιφάνειας με πολύ υψηλότερη ανάλυση και ταχύτητα εκτύπωσης από άλλες προσεγγίσεις βιοεκτύπωσης λόγω της εγγενούς αρχής της. Επιπλέον, τα μοντέλα ιστών σε εν ζωή πειράματα, που είναι η βασική εφαρμογή της τρισδιάστατης βιοεκτύπωσης, πρέπει να τυποποιηθούν όχι μόνο σε μεγέθη, αλλά και σε βιολογικές και μηχανικές ιδιότητες, ενώ το DLP έχει εξαιρετική ομοιομορφία και αναπαραγωγιμότητα σε σύγκριση με άλλες μεθόδους. Αν και δεν μπορεί να φτάσει την ευελιξία της βιοεκτύπωσης με βάση την εξώθηση προς το παρόν και έχουν αναφερθεί μόνο λίγες μελέτες σχετικά με πολυ-υλικά, το DLP εξακολουθεί να είναι μια πολλά υποσχόμενη τεχνολογία βιοεκτύπωσης που εφαρμόζεται στον τομέα της μοντελοποίησης στο κοντινό μέλλον. [115]

Σήμερα, η βιοεκτύπωση βρίσκεται ακόμη σε ερευνητικό στάδιο. Παρά τις λίγες γκρίζες περιοχές αυτής της ιδέας, παραμένει μια πολλά υποσχόμενη και επαναστατική λύση για ένα καλύτερο μέλλον και προσφέρει νέες προοπτικές σε ερευνητές και επαγγελματίες που εργάζονται μαζί για να ανταποκριθούν σε αυτήν τη μεγάλης κλίμακας πρόκληση.

Μερικές από τις πιο ανεπτυγμένες περιοχές της τρισδιάστατης βιοεκτύπωσης είναι: [115]

1. Η δυνατότητα δημιουργίας λειτουργικών ανθρώπινων οργάνων για μεταμόσχευση. Ενώ αυτή η τεχνολογία βρίσκεται ακόμα στα αρχικά της στάδια, οι ερευνητές κάνουν σημαντικά βήματα στη βιοεκτύπωση ιστών και οργανοειδών για δοκιμές φαρμάκων και αναγεννητική ιατρική. Στο μέλλον, τα βιοεκτυπωμένα όργανα θα μπορούσαν να ανακουφίσουν την έλλειψη οργάνων δωρητών και να μειώσουν τον κίνδυνο απόρριψης στους λήπτες μοσχευμάτων. Η τρισδιάστατη βιοεκτύπωση επιτρέπει τη δημιουργία εξατομικευμένων ιατρικών εμφυτευμάτων και προσθετικών προσαρμοσμένων στις ατομικές ανάγκες του ασθενούς. Καθώς η τεχνολογία προχωρά, τα βιοεκτυπωμένα εμφυτεύματα θα μπορούσαν να προσφέρουν ανώτερη βιοσυμβατότητα και λειτουργικότητα σε σύγκριση με τα παραδοσιακά εμφυτεύματα, οδηγώντας σε βελτιωμένα αποτελέσματα και ποιότητα ζωής των ασθενών.
2. Τα βιοεκτυπωμένα μοντέλα ιστών παρέχουν μια πιο ακριβή αναπαράσταση της ανθρώπινης φυσιολογίας σε σύγκριση με τις παραδοσιακές 2D κυτταροκαλλιέργειες. Αυτά τα τρισδιάστατα μοντέλα ιστού μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην ανακάλυψη φαρμάκων και στις τοξικολογικές δοκιμές για τον εντοπισμό πιθανών υποψηφίων φαρμάκων και την αξιολόγηση της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητάς τους. Στο μέλλον, οι βιοεκτυπωμένοι ιστοί μπορεί επίσης να διευκολύνουν την ανάπτυξη εξατομικευμένων ιατρικών προσεγγίσεων επιτρέποντας στους ερευνητές να δοκιμάζουν φάρμακα σε ιστούς ειδικούς για τον ασθενή.
3. Οι πρόοδοι στην τεχνολογία βιοεκτύπωσης επιτρέπουν την κατασκευή όλο και πιο πολύπλοκων ιστών και δομών, συμπεριλαμβανομένων των αγγειακών δικτύων, των νευρικών ιστών και των κατασκευών πολλαπλών υλικών. Με την ενσωμάτωση πολλαπλών τύπων κυττάρων και βιοϋλικών στη διαδικασία βιοεκτύπωσης, οι ερευνητές μπορούν να δημιουργήσουν πιο ρεαλιστικά μοντέλα ιστών με βελτιωμένη λειτουργικότητα και αγγείωση.
4. Πέρα από τις βιοϊατρικές εφαρμογές, η τρισδιάστατη βιοεκτύπωση έχει τη δυνατότητα να φέρει επανάσταση στη βιομηχανία τροφίμων,

επιτρέποντας την παραγωγή συνθετικών κρεάτων, γαλακτοκομικών προϊόντων και εναλλακτικών προϊόντων με βάση τα φυτά. Τα βιοτυπωμένα τρόφιμα θα μπορούσαν να προσφέρουν βιώσιμες και φιλικές προς το περιβάλλον εναλλακτικές λύσεις στα παραδοσιακά προϊόντα με βάση τα ζώα, αντιμετωπίζοντας παγκόσμιες προκλήσεις όπως η επισιτιστική ανασφάλεια και η κλιματική αλλαγή.

5. Η ενσωμάτωση της τρισδιάστατης βιοεκτύπωσης με τεχνολογίες τεχνητής νοημοσύνης και ρομποτικής αναμένεται να επιταχύνει την ανάπτυξη και τη βελτιστοποίηση βιοεκτυπωμένων ιστών και οργάνων. Οι αλγόριθμοι ΑΙ μπορούν να αναλύσουν μεγάλα σύνολα δεδομένων και να βελτιστοποιήσουν τις παραμέτρους βιοεκτύπωσης για να βελτιώσουν την ποιότητα και την αναπαραγωγικότητα των βιοεκτυπωμένων κατασκευών. Οι πλατφόρμες ρομποτικής μπορούν να αυτοματοποιήσουν τη διαδικασία βιοεκτύπωσης, αυξάνοντας την αποτελεσματικότητα και την επεκτασιμότητα.

Συνολικά, το μέλλον της τρισδιάστατης βιοεκτύπωσης έχει τεράστιες δυνατότητες να μεταμορφώσει την υγειονομική περίθαλψη, τη βιομηχανία και την κοινωνία, επιτρέποντας την κατασκευή πολύπλοκων ιστών και οργάνων, εξατομικευμένων ιατρικών θεραπειών και βιώσιμων εναλλακτικών τροφίμων. Η συνεχής έρευνα και η καινοτομία στην τεχνολογία βιοεκτύπωσης θα είναι ουσιαστικής σημασίας για την αξιοποίηση αυτού του δυναμικού και την υπέρβαση των υφιστάμενων προκλήσεων. Θα μπορούσε αυτό να είναι ένα εξαιρετικό βήμα προς την 4D εκτύπωση;

Βιβλιογραφία

- [1] Murphy, Sean V.; Atala, Anthony (August 2014). ["3D bioprinting of tissues and organs"](#). Nature Biotechnology. 32 (8): 773–785.
- [2] Roche CD, Brereton RJ, Ashton AW, Jackson C, Gentile C (2020). ["Current challenges in three-dimensional bioprinting heart tissues for cardiac surgery"](#). European Journal of Cardio-Thoracic Surgery. 58 (3): 500–510.
- [3] Chimene D, Lennox KK, Kaunas RR, Gaharwar AK (2016). ["Advanced Bioinks for 3D Printing: A Materials Science Perspective"](#). Annals of Biomedical Engineering. 44 (6): 2090–2102.
- [4] Gibson, Ian, and Jorge Bártolo, Paulo. ["History of Stereolithography."](#) Stereolithography: Materials, Processes, and Applications. (2011): 41-43. Print. 7 October 2015.
- [5] [U.S. Patent 4,575,330](#) ("Apparatus for Production of Three-Dimensional Objects by Stereolithography")
- [6] Hull, Chuck (2012). ["On Stereolithography"](#). Virtual and Physical Prototyping. 7 (3): 177.
- [7] Makoto Nakamura, Y. Nishiyama, Chizuka Henmi (2006). ["InkJet bioprinting as an effective tool for tissue fabrication."](#) NIP & Digital Fabrication Conference.
- [8] Mohammadmahdi Mobaraki, Maryam Ghaffari, Abolfazl Yazdanpanah, Yangyang Luo, D.K. Mills. Biopinks and bioprinting: [A focused review, Bioprinting](#), Volume 18 (2020)
- [9] Pati Falguni, Gantelius Jesper, Svahn Helene Andersson. [3D Bioprinting of Tissue/Organ Models](#). Angewandte Chemie International Edition (2016)
- [10] N Sigaux, L Pourchet, P Breton, S Brosset, A Louvrier, CA Marquette, [3D Bioprinting: principles, fantasies and prospects](#), Journal of Stomatology, Oral and Maxillofacial Surgery, Volume 120, Issue 2, 2019, Pages 128-132.
- [11] Gao, Wei; Zhang, Yunbo; Ramanujan, Devarajan; Ramani, Karthik; Chen, Yong; Williams, Christopher B.; Wang, Charlie C. L.; Shin, Yung C.; Zhang, Song; Zavattieri, Pablo D. (2015). ["The status, challenges, and future of additive manufacturing in engineering"](#). Computer-Aided Design. 69: 65–89.

- [12] Dikyol C, Altunbek M, Bartolo P, Koc B (2021) [Multimaterial Bioprinting Approaches and Their Implementations for Vascular and Vascularized Tissues](#). *Bioprinting* 24:e00159.
- [13] Akbari A, Jabbari N, Sharifi R, Ahmadi M, Vahhabi A, Seyedzadeh S, Nawaz M, Szafert S, Mohamoodi M, Jabbari E, Asghari R, Rezaie J (2020) ["Free and Hydrogel Encapsulated Exosome-Based Therapies in Regenerative Medicine"](#). *Life Sciences*
- [14] Kanetaka K, Eguchi S (2020) [Regenerative Medicine for the Upper Gastrointestinal Tract](#). *Regenerative Therapy* 15:129–137.
- [15] Hamid O, Eltaher H, Sottile V, Yang J (2021) ["3D Bioprinting of a Stem Cell-Laden, Multi-Material Tubular Composite: An Approach for Spinal Cord Repair"](#). *Materials Science and Engineering*.
- [16] Hann S, Cui H, Esworthy T, Miao S, Zhou X, Lee S-J, Fischer J, Zhang L (2019) [Recent Advances in 3D Printing: Vascular Network for Tissue and Organ Regeneration](#). *Translational Research* 211:46–63
- [17] Paulo Bartolo, Ajay Malshe, Eleonora Ferraris, Bahattin Koc, 3D bioprinting: [Materials, processes, and applications](#), CIRP Annals, Volume 71, Issue 2, 2022, Pages 577-597.
- [18] Vantage Market Research. 3D bioprinting Market – Global industry assessment & forecast. <https://www.vantagemarketresearch.com/>
- [19] Zeming Gu, Jianzhong Fu, Hui Lin, Yong He, [Development of 3D bioprinting: From printing methods to biomedical applications](#), *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, Volume 15, Issue 5, 2020, Pages 529-557
- [20] Xiang, Y., Miller, K., Guan, J. et al. [3D bioprinting of complex tissues in vitro: state-of-the-art and future perspectives](#). *Arch Toxicol* 96, 691–710 (2022).
- [21] Dey, M., Ozbolat, I.T. [3D bioprinting of cells, tissues and organs](#). *Sci Rep* 10, 14023 (2020).
- [22] A.L. Rutz, P.L. Lewis, R.N. Shah, [Toward next-generation bioinks: tuning material properties pre-and post-printing to optimize cell viability](#), *MRS Bull.* 42 (8) (2017) 563–570.
- [23] M. Hospodiuk, M. Dey, D. Sosnoski, I.T. Ozbolat, [The bioink: a comprehensive review on bioprintable materials](#), *Biotechnol. Adv.* 35 (2) (2017) 217–239.

- [24] M.Lei, X. Wang, [Biodegradable polymers and stem cells for bioprinting](#), *Molecules* 21 (5) (2016) 539.
- [25] F. Raza, et al., [A review on recent advances in stabilizing peptides/proteins upon fabrication in hydrogels from biodegradable polymers](#), *Pharmaceutics* 10 (1) (2018) 16.
- [26] C. Di Bella, A. Fosang, D.M. Donati, G.G. Wallace, P.F.M. Choong, [3D bioprinting of cartilage for orthopedic surgeons: reading between the lines](#), *Front. Surg.* 2 (2015) 39.
- [27] S.V. Murphy, A. Skardal, A. Atala, "Evaluation of hydrogels for bio-printing applications, *J. Biomed. Mater. Res.* 101 (1) (2013) 272–284.
- [28] S.J. Buwalda, K.W.M. Boere, P.J. Dijkstra, J. Feijen, T. Vermonden, W.E. Hennink, [Hydrogels in a historical perspective: from simple networks to smart materials](#), *J. Control. release* 190 (2014) 254–273.
- [29] L. Brunsveld, B.J.B. Folmer, E.W. Meijer, R.P. Sijbesma, [Supramolecular polymers](#), *Chem. Rev.* 101 (12) (2001) 4071–4098.
- [30] J. Malda, et al., 25th anniversary article: [engineering hydrogels for bio-fabrication](#), *Adv. Mater.* 25 (36) (2013) 5011–5028.
- [31] D.B. Kolesky, R.L. Truby, A.S. Gladman, T.A. Busbee, K.A. Homan, J.A. Lewis, [3D bioprinting of vascularized, heterogeneous cell-laden tissue constructs](#), *Adv. Mater.* 26 (19) (2014) 3124–3130.
- [32] M. Guvendiren, J. Molde, R.M.D. Soares, J. Kohn, [Designing biomaterials for 3D printing](#), *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2 (10) (2016) 1679–1693.
- [33] N. Diamantides, et al., [Correlating rheological properties and printability of collagen bioinks: the effects of riboflavin photocrosslinking and pH](#), *Biofabrication* 9 (3) (2017).
- [34] L. Gasperini, J.F. Mano, R.L. Reis, [Natural polymers for the microencapsulation of cells](#), *J. R. Soc. Interface* 11 (100) (2014).
- [35] P.B. Malafaya, G.A. Silva, R.L. Reis, [Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications](#), *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (4–5) (2007) 207–233.
- [36] S. Chawla, S. Midha, A. Sharma, S. Ghosh, [Silk-Based bioinks for 3D bioprinting](#), *Adv. Healthc. Mater.* (2018).

- [37] M.S. Hakam, R. Imani, N. Abolfathi, H. Fakhrzadeh, A.M. Sharifi, [Evaluation of fibrin-gelatin hydrogel as biopaper for application in skin bioprinting: an in-vitro study](#), *Bio Med. Mater. Eng.* 27 (6) (2016) 669–682.
- [38] S. England, A. Rajaram, D.J. Schreyer, X. Chen, [Bioprinted fibrin-factor XIII hyaluronate hydrogel scaffolds with encapsulated Schwann cells and their in vitro characterization for use in nerve regeneration](#), *Bioprinting* 5 (2017) 1–9.
- [39] O. Tokareva, V.A. Michalczechen-Lacerda, E.L. Rech, D.L. Kaplan, [Recombinant DNA production of spider silk proteins](#), *Microb. Biotechnol.* 6 (6) (2013) 651–663.
- [40] B. Yetiskin, O. Okay, [High-strength silk fibroin scaffolds with anisotropic mechanical properties](#), *Polymer* 112 (2017) 61–70.
- [41] A. Di Martino, M. Sittinger, M. V Risbud, Chitosan: [a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering](#), *Biomaterials* 26 (30) (2005) 5983–5990.
- [42] H. Gudapati, M. Dey, I. Ozbolat, [A comprehensive review on droplet-based bioprinting: past, present and future](#), *Biomaterials* 102 (2016) 20–42.
- [43]] S.N. Pawar, K.J. Edgar, [Alginate derivatization: a review of chemistry, properties and applications](#), *Biomaterials* 33 (11) (2012) 3279–3305.
- [44] E. Hill, T. Boontheekul, D.J. Mooney, [Designing scaffolds to enhance transplanted myoblast survival and migration](#), *Tissue Eng.* 12 (5) (2006) 1295–1304.
- [45] T. Xu, C. Baicu, M. Aho, M. Zile, T. Boland, [Fabrication and characterization of bio-engineered cardiac pseudo tissues](#), *Biofabrication* 1 (3) (2009)
- [46] M.C. Gomez-Guillen, J. Turnay, M.D. Fernandez-Diaz, N. Ulmo, M.A. Lizarbe, P. Montero, [Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study](#), *Food Hydrocolloids* 16 (1) (2002) 25–34.
- [47] M.C. Echave, P. Sanchez, J.L. Pedraz, G. Orive, [Progress of gelatin-based 3D approaches for bone regeneration](#), *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* (2017).
- [48] L.E. Bertassoni, et al., [Direct-write bioprinting of cell-laden methacrylated gelatin hydrogels](#), *Biofabrication* 6 (2) (2014) 24105.
- [49] D. Coradini, C. Pellizzaro, G. Miglierini, M.G. Daidone, A. Perbellini, [Hyaluronic acid as drug delivery for sodium butyrate: improvement of the](#)

anti-proliferative activity on a breast-cancer cell line, *Int. J. cancer* 81 (3) (1999) 411–416.

[50] S.J. Falcone, D. Palmeri, R.A. Berg, *Biomedical Applications of Hyaluronic Acid*, ACS Publications, 2006.

[51] G. Camci-Unal, D. Cuttica, N. Annabi, D. Demarchi, A. Khademhosseini, *Synthesis and characterization of hybrid hyaluronic acid-gelatin hydrogels*, *Biomacromolecules* 14 (4) (2013) 1085–1092.

[52] A.L. Rutz, K.E. Hyland, A.E. Jakus, W.R. Burghardt, R.N. Shah, "A multimaterial bioink method for 3D printing tunable, cell-compatible hydrogels", *Adv. Mater.* 27 (9) (2015) 1607–1614.

[53] J.A. Rowley, G. Madlambayan, D.J. Mooney, *Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials*, *Biomaterials* 20 (1) (1999) 45–53.

[54] D. Kokkinis, M. Schaffner, A.R. Studart, *Multimaterial magnetically assisted 3D printing of composite materials*, *Nat. Commun.* 6 (2015) 8643.

[55] S. Tibbits, "4D printing: multi-material shape change", *Architect. Des* 84 (1) (2014) 116–121.

[56] X. Wang, Y. Sun, C. Peng, H. Luo, R. Wang, D. Zhang, *Transitional suspensions containing thermosensitive dispersant for three-dimensional printing*, *ACS Appl.Mater. Interfaces* 7 (47) (2015) 26131–26136.

[57] B. Gao, Q. Yang, X. Zhao, G. Jin, Y. Ma, F. Xu, *4D bioprinting for biomedical applications*, *Trends Biotechnol.* 34 (9) (2016) 746–756.

[58] M.Ebara, et al., *Smart hydrogels*, in: *Smart Biomaterials*, Springer, 2014, pp. 9–65.

[59] C. Shen, et al., *Dynamically crosslinked carbon dots/biopolymer hydrogels exhibiting fluorescence and multi-stimuli logic-gate response*, *Polym. Chem.*(2018).

[60] K. Jakab, C. Norotte, F. Marga, K. Murphy, G. Vunjak-Novakovic, G. Forgacs, *Tissue engineering by self-assembly and bio-printing of living cells*, *Biofabrication* 2 (2) (2010) 22001

[61] Y. Loo, C.A.E. Hauser, *Bioprinting synthetic self-assembling peptide hydrogels for biomedical applications*, *Biomed. Mater.* 11 (1) (2015) 14103.

[62] S.R. Husain, Y. Ohya, R.K. Puri, *Current status and challenges of three-dimensional modeling and printing of tissues and organs*, *Tissue Eng.* 23 (11–12) (2017) 471–473.

- [63] F. Pati, et al., [Printing three-dimensional tissue analogues with decellularized extracellular matrix bioink](#), Nat. Commun. 5 (2014) 3935.
- [64] C. Mandrycky, Z. Wang, K. Kim, D.-H. Kim, [3D bioprinting for engineering complex tissues](#), Biotechnol. Adv. 34 (4) (2016) 422–434.
- [65] E.T. Thostenson, Z. Ren, T.-W. Chou, [Advances in the science and technology of carbon nanotubes and their composites: a review](#), Compos. Sci. Technol. 61 (13) (2001) 1899–1912.
- [66] A.K. Gaharwar, N.A. Peppas, A. Khademhosseini, [Nanocomposite hydrogels for biomedical applications](#), Biotechnol. Bioeng. 111 (3) (2014) 441–453.
- [67] S. Ahmed, F.R. Jones, [A review of particulate reinforcement theories for polymer composites](#), J. Mater. Sci. 25 (12) (1990) 4933–4942.
- [68] P. Thoniyot, M.J. Tan, A.A. Karim, D.J. Young, X.J. Loh, [“Nanoparticle–hydrogel composites: concept, design, and applications of these promising, multi-functional materials”](#), Adv. Sci. 2 (1–2) (2015).
- [69] R.D. Goodridge, C.J. Tuck, R.J.M. Hague, [Laser sintering of polyamides and other polymers](#), Prog. Mater. Sci. 57 (2) (2012) 229–267.
- [70] S.C. Ligon, R. Liska, J. Stampfl, M. Gurr, R. Mülhaupt, [Polymers for 3D Printing and Customized Additive Manufacturing](#), 2017.
- [71] E.C. Hammel, O.-R. Ighodaro, O.I. Okoli, [Processing and properties of advanced porous ceramics: an application-based review](#), Ceram. Int. 40 (10) (2014) 15351–15370.
- [72] Z.C. Eckel, C. Zhou, J.H. Martin, A.J. Jacobsen, W.B. Carter, T.A. Schaedler, [Additive manufacturing of polymer-derived ceramics](#), Science 351 (2016) 58–62.
- [73] R. Trombetta, J.A. Inzana, E.M. Schwarz, S.L. Kates, H.A. Awad, [3D printing of calcium phosphate ceramics for bone tissue engineering and drug delivery](#), Ann. Biomed. Eng. 45 (1) (2017) 23–44
- [74] B. Leukers, et al., [Hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering made by 3D printing](#), J. Mater. Sci. Mater. Med. 16 (12) (2005) 1121–1124.
- [75] M. Ghadiri, W. Chrzanowski, R. Rohanizadeh, [Biomedical applications of cationic clay minerals](#), RSC Adv. 5 (37) (2015) 29467–29481.

- [76] S. Ramakrishna, J. Mayer, E. Wintermantel, K.W. Leong, [Biomedical applications of polymer-composite materials: a review](#), *Compos. Sci. Technol.* 61 (9) (2001) 1189–1224.
- [77] M.P. Staiger, A.M. Pietak, J. Huadmai, G. Dias, [Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: a review](#), *Biomaterials* 27 (9) (2006) 1728–1734.
- [78] D.-T. Chou, D. Wells, D. Hong, B. Lee, H. Kuhn, P.N. Kumta, "Novel processing of iron–manganese alloy-based biomaterials by inkjet 3-D printing, *Acta Biomater.* 9 (10) (2013) 8593–8603.
- [79] A. De Mori, M. Pena Fernandez, G. Blunn, G. Tozzi, M. Roldo, [3D printing and electrospinning of composite hydrogels for cartilage and bone tissue engineering](#), *Polymers* 10 (3) (2018) 285.
- [80] X. Wang, M. Jiang, Z. Zhou, J. Gou, D. Hui, [3D printing of polymer matrix composites: a review and prospective](#), *Compos. B Eng.* 110 (2017) 442–458.
- [81] J.R. Siqueira, O.N. Oliveira, "Carbon-Based Nanomaterials," in *Nanostructures*, Elsevier, 2017, pp. 233–249.
- [82] K. Huang, et al., [Anisotropy of Graphene Scaffolds Assembled by Three Dimensional Printing](#), *Carbon N. Y.*, 2018.
- [83] S.R. Shin, et al., [Graphene-based materials for tissue engineering](#), *Adv. Drug Deliv. Rev.* 105 (2016) 255–274.
- [84] R.J. Young, I.A. Kinloch, L. Gong, K.S. Novoselov, [The mechanics of graphene nanocomposites: a review](#), *Compos. Sci. Technol.* 72 (12) (2012) 1459–1476.
- [85] V.B. Mohan, K. Lau, D. Hui, D. Bhattacharyya, [Graphene-based materials and their composites: a review on production, applications and product limitations](#), *Compos. B Eng.* (2018).
- [86] W. Zhu, B.T. Harris, L.G. Zhang, [Gelatin methacrylamide hydrogel with graphene nanoplatelets for neural cell-laden 3D bioprinting](#), in: *Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC), 2016 IEEE 38th Annual International Conference of the*, 2016, pp. 4185–4188.
- [87] J.N. Coleman, U. Khan, W.J. Blau, Y.K. Gun'ko, "Small but strong: a review of the mechanical properties of carbon nanotube–polymer composites, *Carbon N. Y.* 44 (9) (2006) 1624–1652.
- [88] W. Zhao, et al., [Mechanical properties of nanocomposites reinforced by carbon nanotube sponges](#), *J. Mater.* (2018).

- [89] J.P. Tate, [The Effects of Carbon Nanotubes on Cells in a Synthetic Oxygen Carrier Enriched Alginate Scaffold](#), LSU Master's Theses. 3126 (2016).
- [90] H.-M. Cheng, C. Liu, P.-X. Hou, [Field emission from carbon nanotubes](#), in: [Nanomaterials Handbook](#), second ed., CRC Press, 2017, pp. 255–272.
- [91] A.J. Page, F. Ding, S. Irle, K. Morokuma, [Insights into carbon nanotube and graphene formation mechanisms from molecular simulations: a review](#), Rep. Prog. Phys. 78 (3) (2015) 36501.
- [92] B. Zhao, H. Hu, S.K. Mandal, R.C. Haddon, [A bone mimic based on the self-assembly of hydroxyapatite on chemically functionalized single-walled carbon nanotubes](#), Chem. Mater. 17 (12) (2005) 3235–3241.
- [93] Parak.A, Pradeep.P, duToit.L, Kumar.P, Choonara.Y, Pillay.V (2019) [Functionalizing Bioinks for 3D Bioprinting Applications](#). Drug Discovery Today 24(1):198–205.
- [94] Cadet J, Douki T (2018) [Formation of UV-induced DNA Damage Contributing to Skin Cancer Development](#). Photochemical & Photobiological Sciences 17 (12):1818–1841.
- [95] Thai M ,Phan.P , Hoang.T, Wong.S ,Lovell. N,(2020) [Advanced Intelligent Systems for Surgical Robotics](#). Advanced Intelligent Systems 2(8):1900138.
- [96] Barreiro Carpio Mabel, Dabaghi Mohammadhossein, Ungureanu Julia, Kolb Martin R., Hirota Jeremy A., Moran-Mirabal Jose Manuel, [3D Bioprinting Strategies, Challenges, and Opportunities to Model the Lung Tissue Microenvironment and Its Function](#), Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, Vol. 9 (2021)
- [97] Kato B, Wisser G, Agrawal DK, Wood T, Thankam FG. [3D bioprinting of cardiac tissue: current challenges and perspectives](#). J Mater Sci Mater Med. 2021 May 6;32(5):54
- [98] Wonhye Lee, Jason Cushing Debasitis, Vivian Kim Lee, Jong-Hwan Lee, Krisztina Fischer, Karl Edminster, Je-Kyun Park, Seung-Schik Yoo, [Multi-layered culture of human skin fibroblasts and keratinocytes through three-dimensional freeform fabrication](#), Biomaterials, Volume 30, Issue 8, 2009,Pages 1587-1595
- [99] Kim, GeunHyung and Ahn, Seunghyun and Kim, YunYoung and Cho, Youngseok and Chun, Wook", [Coaxial structured collagen–alginate scaffolds: fabrication,physical properties, and biomedical application for skin tissue regeneration](#) ,J. Mater. Chem.",2011

- [100] Skardal, A., Mack, D., Kapetanovic, E., Atala, A., Jackson, J. D., Yoo, J., & Soker, S. (2012). [Bioprinted amniotic fluid-derived stem cells accelerate healing of large skin wounds](#). Stem cells translational medicine, 1(11), 792-802.
- [101] Yao, Q., Wei, B., Guo, Y., Jin, C., Du, X., Yan, C., ... & Wang, L. (2015). [Design, construction and mechanical testing of digital 3D anatomical data-based PCL–HA bone tissue engineering scaffold](#). Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 26, 1-9.
- [102] Falguni Pati, Tae-Ha Song, Girdhari Rijal, Jinah Jang, Sung Won Kim, Dong-Woo Cho, [Ornamenting 3D printed scaffolds with cell-laid extracellular matrix for bone tissue regeneration](#), Biomaterials, 2015, Pages 230-241.
- [103] Kang, H. W., Lee, S. J., Ko, I. K., Kengla, C., Yoo, J. J., & Atala, A. (2016). [A 3D bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity](#). Nature biotechnology, 34(3), 312-319.
- [104] Christopher M Owens, Francoise Marga, Gabor Forgacs and Cheryl M Heesch, [Biofabrication and testing of a fully cellular nerve graft](#) ,Published 6 November 2013
- [105] Cyrille Norotte, Francois S. Marga, Laura E. Niklason, Gabor Forgacs, [Scaffold-free vascular tissue engineering using bioprinting](#) ,Biomaterials, Volume 30, Issue 30, 2009
- [106] Thomas Billiet, Elien Gevaert, Thomas De Schryver, Maria Cornelissen, Peter Dubruel, [The 3D printing of gelatin methacrylamide cell-laden tissue-engineered constructs with high cell viability](#), Biomaterials, 2014, Pages 49-62
- [107] Jin Woo Lee and Yeong-Jin Choi and Woon-Jae Yong and Falguni Pati and Jin-Hyung Shim and Kyung Shin Kang and In-Hye Kang and Jaesung Park and Dong-Woo Cho, [Development of a 3D cell printed construct considering angiogenesis for liver tissue engineering](#), Biofabrication, 2016
- [108] Chang, Robert and Nam, Jae and Sun, Wei, [Direct Cell Writing of 3D Microorgan for In Vitro Pharmacokinetic Model](#), Tissue Engineering Part C: Methods, 157-166, 2008
- [109] Panagiotis Sofokleous, Eleanor Stride, William Bonfield, Mohan Edirisinghe, [Design, construction and performance of a portable handheld electrohydrodynamic multi-needle spray gun for biomedical applications](#), Materials Science and Engineering: C, 2013,

- [110] Michael S, Sorg H, Peck C-T, Koch L, Deiwick A, Chichkov B, et al. (2013) [Tissue Engineered Skin Substitutes Created by Laser-Assisted Bioprinting Form Skin-Like Structures in the Dorsal Skin Fold Chamber in Mice.](#)
- [111] Barbara Lorber and Wen-Kai Hsiao and Ian M Hutchings and Keith R Martin, [Adult rat retinal ganglion cells and glia can be printed by piezoelectric inkjet printing](#), Biofabrication, 2011.
- [112] Wei Zhu and Haitao Cui and Benchaa Boualam and Fahed Masood and Erin Flynn and Raj D Rao and Zhi-Yong Zhang and Lijie Grace Zhang, [3D bioprinting mesenchymal stem cell-laden construct with core-shell nanospheres for cartilage tissue engineering](#), Nanotechnology , 2013
- [113] Christopher J. Pateman, Adam J. Harding, Adam Glen, Caroline S. Taylor, Claire R. Christmas, Peter P. Robinson, Steve Rimmer, Fiona M. Boissonade, Frederik Claeyssens, John W. Haycock, [Nerve guides manufactured from photocurable polymers to aid peripheral nerve repair](#), Biomaterials, Volume 49, 2015, Pages 77-89
- [114] Wei Zhu, Kathryn R. Tringale, Sarah A. Woller, Shangting You, Susie Johnson, Haixu Shen, Jacob Schimelman, Michael Whitney, Joanne Steinauer, Weizhe Xu, Tony L. Yaksh, Quyen T. Nguyen, Shaochen Chen, [Rapid continuous 3D printing of customizable peripheral nerve guidance conduits](#), Materials Today, Volume 21, Issue 9, 2018, Pages 951-959
- [115] Muskan, Deepika Gupta, Neelam Prabha Negi, [3D bioprinting: Printing the future and recent advances](#), Bioprinting, Volume 27, 2022.