

بیوپرینت سه بعدی: از متدهای پرینت کردن تا کاربردهای پزشکی

گردآوری و ترجمه: محراب کرامتی

952011533042

شهریور 99

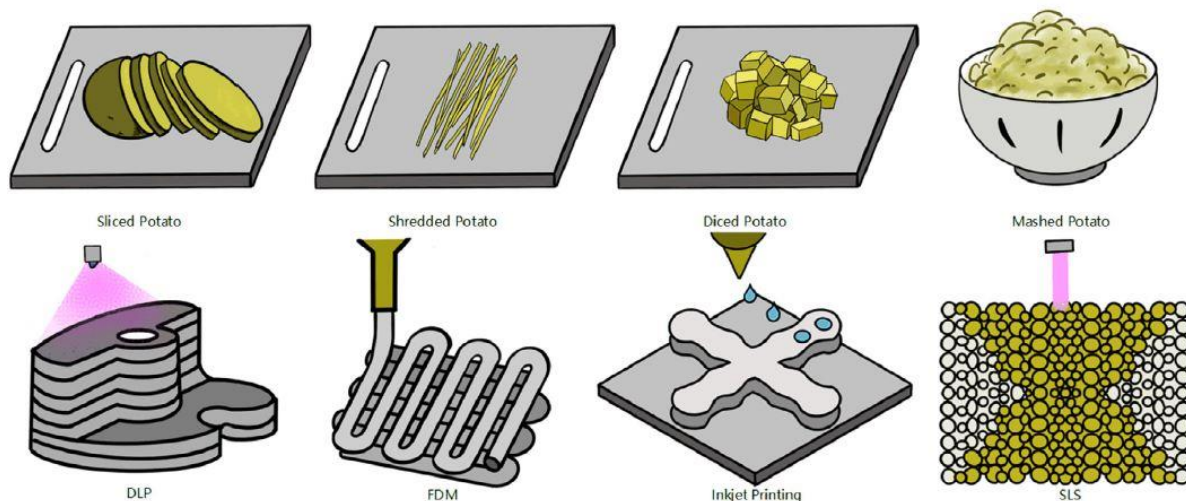
چکیده

تولید بافت ها و ارگان ها بصورت *in vitro* رویایی بزرگ است که به خاطر دو نیاز پدید آمده است: پیوند عضو و مدل های بافتی با دقت بالا. در دهه های گذشته بیوپرینت سه بعدی بصورت گسترده ای در ساخت بسیاری از بافت ها/ارگان ها همانند پوست، عروق خونی، قلب و ... بکار رفته است و نه تنها پایه و اساسی برای هدف بزرگ پیوند اعضا ایجاد کرده است، بلکه به عنوان مدل های *in vitro* در رهایش دارویی (Pharmacokinetics)، غربالگری دارویی و ... نیز بکار رفته است. چون ارگان ها پیچیده هستند از بسیاری متدهای بیوپرینت کردن برای فهم چالش های پیش رو در کاربردهای متفاوت استفاده شد. سوال اصلی این است که چگونه متد بیوپرینت مناسب را انتخاب کنیم؟ در اینجا ما تکامل، پروسه و دسته بندی بیوپرینت سه بعدی را با تأکید بر اصول پرینت پایه ای و بیوپرینترهای تجاری شده مورد بررسی قرار میدهم. ما متدهای بیوپرینت برپایه اکستروژن، جوهر افشانی (قطره افشانی) و فتوکور را دسته بندی کرده و خلاصه میکنیم و سپس برای کاربردهای آن ها پیشنهاداتی را ارائه میدهم. بصورت مختصر بر نحوه طراحی جوهرهای زیستی میپردازیم و اشاراتی نیز به بیوپرینت کردن هم محوره (Coaxial) و چند ماده ای (Multi-material) و اصول آن ها میکنیم.

کلمات کلیدی: بیوپرینت سه بعدی، بیوپرینت برپایه اکستروژن، بیوپرینت برپایه جوهر افشانی، بیوپرینت برپایه فتوکور، جوهر زیستی

1. معرفی

بیوپرینت سه بعدی که به Additive Manufacturing یا نمونه سازی سریع (Rapid prototyping) نیز معروف است فعالیتی است که در آن محصولات بصورت لایه به لایه توسط برش های سطح مقطعی خاصی ساخته میشوند. در مواقع مشابه برعکس فعالیت برش زدن یک سیب زمینی، بصورت نواری در آوردن آن، حبه حبه کردن آن و له کردن آن است و پرینت کردن سه بعدی آن ها را به یکپارچگی قبلی میرساند. این چهار مدل اسمبل کردن سیب زمینی نشانگر چهار فرایند پرینت سه بعدی است: پردازش نوری دیجیتال (DLP) با استفاده از انعکاس صفحه ای، مدل سازی رسوب ذوب شده (FDM) با استفاده از فیلامنت ها، پرینت جوهر افشانی با استفاده از میکروکره ها، بست و سخت شدن توسط لیزر انتخابی (SLS) با استفاده از پودرهای سفت شونده (شکل 1)



شکل 1. چهار نوع برش دادن سیب زمینی مشابه چهار فرایند پرینت سه بعدی

بیوپرینت سه بعدی که یک دانش میان رشته ای است به علم پزشکی، بیولوژی، مهندسی مکانیک و علم مواد نزدیک است و میتوان آن را به دو مفهوم تقسیم کرد: بطور کلی پرینت سه بعدی مربوط به شاخه ای از پزشکی مستقیم است. در تعریفی دیگر پرینت سه بعدی فرایند تغییر در جوهرهای زیستی حاوی سلول برای تولید ساختارهای زنده است. در حالت گسترده بیوپرینت کردن را در چهار دسته تقسیم بندی میکنند. دسته اول تولید ساختارهایی بدون زیست سازگاری است مثل محصولاتی که در برنامه ریزی قبل از جراحی یا شبیه سازی آن بکار میرود. دسته دوم ایجاد محصولات تخریب نشدنی است که باید زیست سازگار باشند مثل مفاصل آلایژ تیتانیوم و پروتزهای سیلیکونی برای تعمیر نقایص. دسته سوم تولید محصولات زیست سازگار و زیست تخریب پذیر است مثل استخوان های فعال سرامیکی و استنت های عروقی زیست تخریب پذیر. دسته چهارم همان تعریف دوم بیوپرینت کردن است که کمی قبل به آن اشاره کردیم که دستکاری در سلول های زنده برای ساخت بافت های میمیک شده زنده سه بعدی است همانند مدل های سلولی بکار رفته در غربالگری دارویی و تحقیقات مکانیزمی، واحدهای کبدی، پوستی و عروق خونی. مفهوم پرینت سه بعدی که در این مقاله به بررسی آن میپردازیم از نوع چهارم است که به پرینت سلولی نیز معروف است.

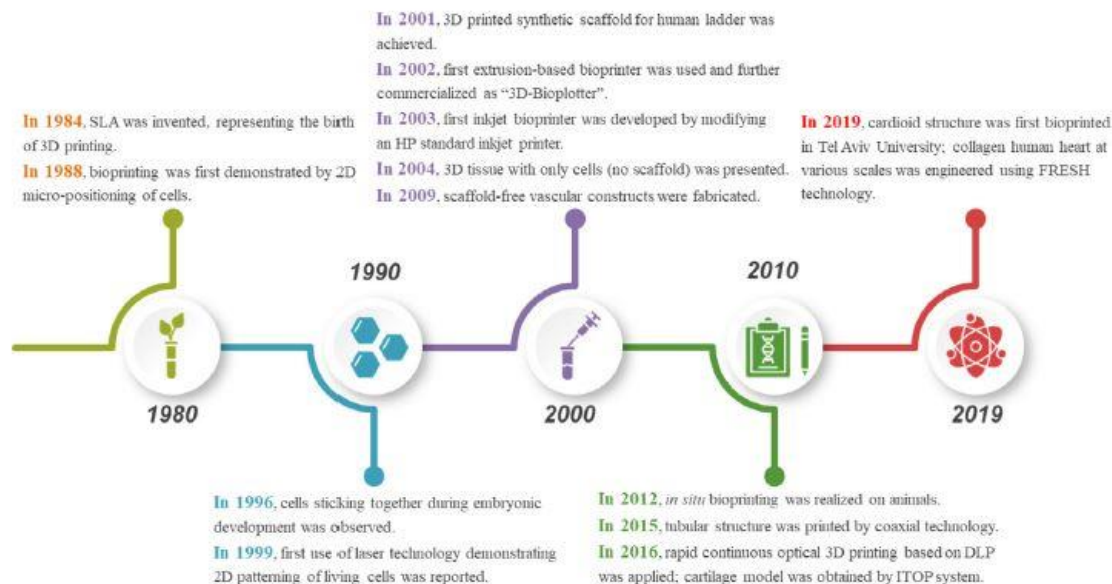
تولید زیستی بافت ها و ارگان ها بصورت *in vitro* رویایی بزرگ برای انسان ها بوده که به خاطر حضور دو نیاز بوجود آمده است: نیاز به پیوند اعضا و نیاز به مدل های بافتی با دقت بالا. کمبود شدید اهداکننده های عضو و ارگان بصورت سالیانه سبب مرگ بسیاری از بیماران در صف پیوند عضو میشود. در حال حاضر استفاده از بیوپرینت سه بعدی برای حل این مشکل امکان پذیر نیست زیرا ارگان های بدن انسان درجه پیچیدگی بسیار بالایی دارند و برخی عملکردهای زیستی سلول ها مثل رشد و تکثیر هنوز برما بطور کامل مشخص نشده است. مورد دوم این است که متدهای قدیمی مثل کشت سلولی دوبعدی یا آزمایشات حیوانی برای غربالگری دارویی و بررسی مکانیزم های پزشکی مشکلات زیادی دارند. ریزمحیط های *in vivo* نسبت به کشت سلولی دوبعدی پیچیدگی بسیار بیشتری دارند و نتایج این دو در مقایسه با هم قابل اطمینان نخواهد بود. در نهایت نیز نکته واضح این است که محیط داخلی انسان ها و حیوانات تفاوت بزرگی با هم دارند. این عوامل نیاز برای وجود مدل های دقیق *in vitro* را بیشتر و بیشتر ضروری میکنند و بیوپرینت سه بعدی در این مورد بسیار مناسب است. با داشتن ظرفیت رسیدن به دستکاری مکانی-زمانی جهت سلول های متفاوت این تکنولوژی راهی ایده آل برای تولید ساختارهای سه بعدی سلول دار *in vitro* شده است. شکی نیست که بیوپرینت سه بعدی در تولید مدل های *in vitro* ارگان ها در آینده ای نزدیک نقش مهمی را ایفا خواهد کرد.

این مقاله با تکامل بیوپرینت کردن شروع میشود. به فرآیندها و دسته بندی بیوپرینت کردن میپردازد. اصول و اساس و بیوپرینترهای معمول در هر متد را مشخص میسازد. سپس با ترکیب کردن کارهای گروه نویسنده این مقاله، بررسی کاربردهای تولید و تحقیقات دارویی برای هر روش بیوپرینت کردن فراهم میشود. سپس بین روش های موجود ارزیابی صورت میگیرد و نقاط قوت و ضعف هر کدام بیان میشود. همچنین روش

انتخال متدهای پرینت بنا بر کاربرد مد نظر نیز گفته میشود. ارزیابی استانداردهای جوهرهای زیستی و انواع آن در انتها آورده شده است. هیچ روش کاملی برای بیوپرینت کردن، یا جوهر زیستی وجود ندارد. اما ما بنا بر کاربردهای مدنظر روشی که نتایج بهتری را عرضه کرده است را پیشنهاد میکنیم.

2. تکامل، پروسه و دسته بندی بیوپرینت سه بعدی

در حال حاضر دست یافتن به بیوپرینت سه بعدی ارگان های کاملاً فعال برای پیوند عضو چندان منطقی نیست. اما این حقیقتی انکار نشدنی است که تکنیک های این تکنولوژی تکامل قابل توجهی داشته اند. شکل 2 تکامل این تکنولوژی را در گذر زمان نشان میدهد.



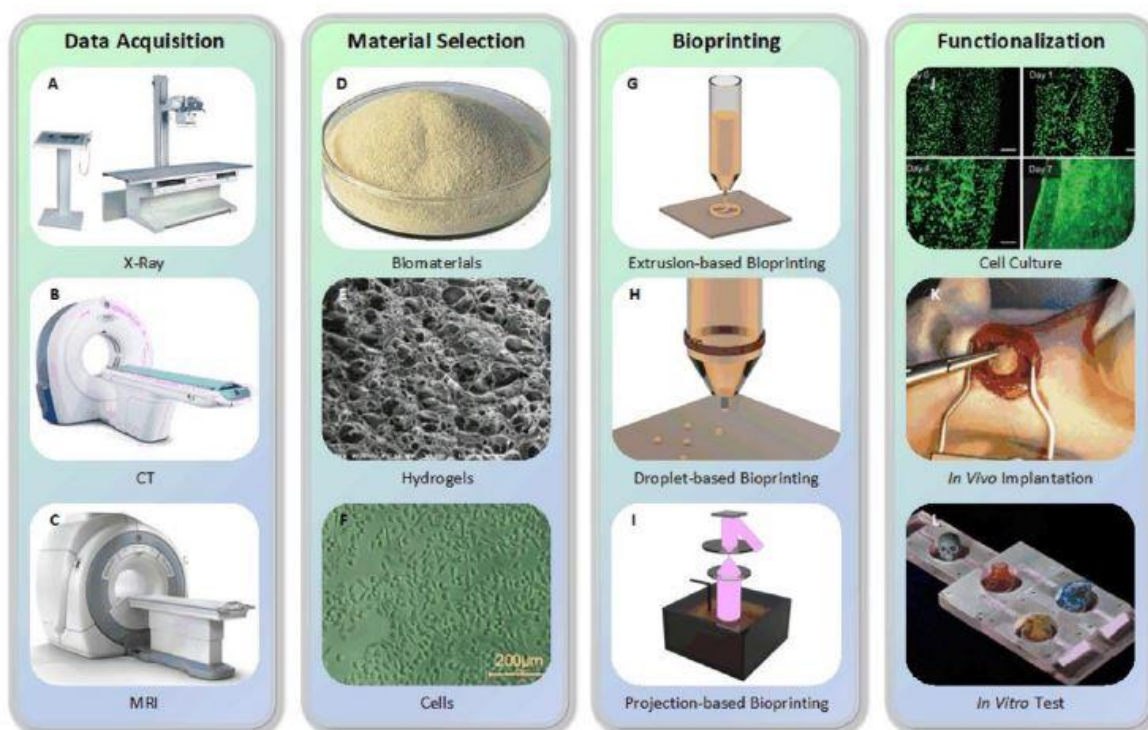
شکل 2. تاریخچه کوچکی از بیوپرینت کردن

در 1984 Charles Hull توانست استریولیتوگرافی (SLA) را برای پرینت اشیا سه بعدی از داده های دیجیتالی اختراع کند. بیوپرینت کردن اولین بار در 1988 توسط Klebe با استفاده از پرینتر جوهرافشان Hewlett-Packard (HP) برای چاپ سلولی توسط تکنولوژی Cytoscribing (سلول نویسی) معرفی شد. در 1996 Forgacs و همکارانش به این نتیجه رسیدند که تنش سطحی بافت در واقع نمود ماکروسکوپی چسبندگی مولکولی بین سلول ها بود و در واقع معیار اندازه گیری کمی ای برای همبستگی بافتی فراهم شد. در 1999 Odde و Renn بیوپرینت به کمک لیزر برای چاپ سلول های زنده را بکار برد. در 2001 پرینت مستقیم داربست به شکل یک مئانه و کشت سلول های انسانی انجام شد. در 2002 اولین استفاده از تکنولوژی بیوپرینت برپایه اکستروژن توسط Landers و همکارانش انجام شد که بعدها به نام 3D-Bioplotter تجاری شد. Wilson و Boland اولین بیوپرینتر جوهرافشان را در 2003 با بهینه سازی یک پرینتر استاندارد جوهرافشان HP ساختند. یک سال بعد تیم آن ها بیوپرینت حاوی سلول را با یک پرینتر تجاری SLA انجام داد. در همان سال بافت سه بعدی فقط سلولی (بدون داربست) توسعه یافت. در 2006 سیستم تخلیه (jetting) الکتروهیپودینامیک برای چاپ سلول های زنده اعمال شد. بافت عروق دار بدون داربست با بیوپرینت کردن توسط Norotte و همکارانش در 2009 ساخته شد. در 2012 بیوپرینت کردن *in situ* توسط Skardal و همکارانش روی موش ها صورت گرفت. در سال های بعدی محصولات بسیاری توسط بیوپرینت کردن معرفی شدند مثل: غضروف مفصلی و کبد مصنوعی در 2012، ادغام بافت با سیستم گردش خون در 2014 و ... در 2015 تکنولوژی هم محوره (Coaxial) توسط Gao و همکارانش برای تولید ساختارهای تیوبی (لوله ای) بکار گرفته شد. در 2016 Pyo و همکارانش پرینت سه بعدی اپتیکال (نوری لیزری) سرعتی پیوسته برپایه DLP (پرینت برپایه قطره افشانی) را بکار بردند. در همان سال مدل غضروف توسط گروه تحقیقاتی Anthony Atala با استفاده از پرینتر ترکیبی

بافت-ارگانی (ITOP) تولید شد. در Noor 2019 و همکارانش در تولید قلب با مقیاس کوچکتر موفق شدند. چند ماه بعد بیوپرینت قلب کلاژنی انسان در مقیاس های مختلف با استفاده از تکنولوژی FRESH (نصب قابل برگشت شکل آزاد هیدروژل های معلق) توسط Lee و همکارانش بدست آمد.

فرآیند بیوپرینت سه بعدی را به چهار مرحله دسته بندی میکنند (شکل 3):

- 1) جمع آوری داده. مدل های سه بعدی را میتوان با استفاده از اشعه ایکس، توموگرافی پردازشی (CT)، تصویر برداری رزونانس مغناطیسی (MRI) و ... برای اسکن و دوباره سازی، یا استفاده مستقیم از نرم افزارهای طراحی به کمک کامپیوتر (CAD)، سپس مدل های سه بعدی به قسمت های افقی دوبعدی (با جهت گیری و اندازه قابل تنظیم) توسط نرم افزار مخصوص انجام میگردد. این داده ها در قالب ذرات یا فیلامنت ها، بنا بر روش های متفاوت بیوپرینت کردن، پردازش میشوند.
- 2) انتخاب مواد (متریال). مواد شامل سلول ها، فاکتورهای رشدی، هیدروژل ها و ... میشوند و باید بنا بر ملزومات ساختارهای پرینت شده و روش انتخابی به درستی و دقت انتخاب شوند. درواقع ترکیب این بیومتریال ها را جوهر زیستی می نامند با اینکه در بیشتر مواقع هیدروژلی هستند که درون آن سلول وجود دارد. انتخاب جوهر زیستی برای اطمینان حاصل کردن از زیست سازگاری، قابل پرینت بودن و خواص مکانیکی حیاتی است و در ادامه به آن پرداخته میشود.
- 3) بیوپرینت کردن. قبل از بیوپرینت کردن تنظیمات مناسب پارامترهای پرینت کردن را باید مشخص کرد. همینطور نظارت حین فرایند پرینت کردن نیز ضروری است تا در هنگام بروز مشکل اصلاحات انجام شوند.
- 4) عملکردی شدن. پس از پرینت کردن برای اینکه سلول های پراکنده با یکدیگر ارتباط برقرار کنند و برخی عملکردهای بافت/ارگان طبیعی را ایجاد کنند باید تحریک فیزیکی و شیمیایی رخ دهد.



شکل 3. فرایند بیوپرینت سه بعدی (A) دستگاه اشعه ایکس، (B) دستگاه CT، (C) دستگاه MRI، (D) آلژینات، (E) تصویر میکروسکوپ اسکن الکترونی (SEM) از GeIMA، (F) تصویر سلول های اندوتلیال ورید نافی انسان (HUVECs)، (G) اساس بیوپرینت بر پایه اکستروژن، (H) اساس

بیوپرینت برپایه جوهرافشانی پیزوالکتریک، (I) اساس پردازش نور دیجیتال (DLP)، (J) کشت نمونه های اندوتلیال پر از سلول عروق خونی، (K) نصب in vivo پیچ های قلبی ساخته شده توسط انتقال مستقیم القا شده به کمک لیزر (LIFT) در موش ها، (L) چپ زیستی بکار رفته در تست in vitro از کارهای چاپ نشده گروه ما

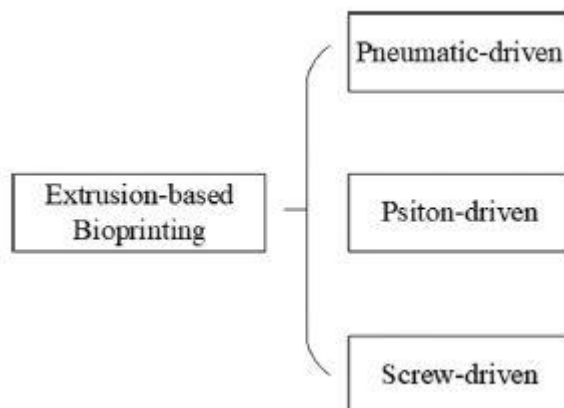
بنا بر قواعد متفاوت نمونه های اولیه و متریال های پرینت، بیوپرینت سه بعدی اساسا توسط سه روش انجام میگردد: برپایه اکستروژن، برپایه قطره افشانی و برپایه فتوکور. در بیوپرینت برپایه اکستروژن جوهر زیستی برای تشکیل فیلامنت های پیوسته در تشکیل ساختارها اکستروژد میشود (ریخته میشود). در بیوپرینت برپایه قطره چکانی قطرات برای انباشته شدن در ساختارها بکار میروند. در بیوپرینت برپایه فتوکور مواد فوتو-پخت (موادی که در برابر نور خواص آن دستخوش تغییر قرار میگیرند) برای جامدسازی و انباشته شدن لایه لایه تا رسیدن به مدل های سه بعدی دلخواه بکار میروند.

3. بیوپرینت بر پایه اکستروژن

بیوپرینت برپایه اکستروژن (به آن Direct ink writing نیز گفته میشود) که از چاپ جوهری نشأت گرفت رایج ترین روش در بیوپرینت سه بعدی است زیرا تطبیق پذیری و مقرون به صرفگی بالایی دارد. به جای تک قطره بودن با نیروی اکستروژن پیوسته فیلامنت ها بصورت مداوم تولید میشوند. این روش را برای پرینت محدوده وسیع ویسکوزیته بیومتریال ها و غلظت های مختلف سلولی بکار برد. بدین دلیل محققان بیوپرینت برپایه اکستروژن را برای تولید ساختارهای بافت با خواص مکانیکی مناسب ترجیح میدهند. علاوه بر آن بیوپرینت چندمحوره و چند ماده ای با این روش در کاربردهای زیادی سازگار است.

3.1. اصول

بصورت تئوری، بیوپرینت برپایه اکستروژن با اکستروژد جوهر زیستی (معمولا از یک سرنگ) به داخل نازل توسط نیروی مکانیکی یا پنوماتیکی (فشار هوایی) انجام میشود تا میکرو فیلامنت های پیوسته تشکیل شوند و بصورت مداوم روی آن ها لایه های گیرنده قرار میگیرند و تثبیت میشود و در نهایت به داخل ساختارهای مورد نظر انباشته میشود. زیر لایه ها میتوانند جامد (مانند ظرف کشت)، مایع (محیط واسط رشد) یا ماده ای ژل مانند باشند. مسیر نازل معمولا توسط نرم افزار بنا بر مدل های دیجیتال پس از اندازی گیری ایجاد میشود. پارامترهایی از قبیل دما، قطر نازل، فشار اکستروژن، سرعت حرکت، سرعت اکستروژن، اینتروال مسیر و ... بر ساختار نهایی بیوپرینت شده تاثیر میگذارد. بنا بر مدهای محرک سیستم توزیع مایع، بیوپرینت برپایه اکستروژن را میتوان به پنوماتیک، پیستونی و پیچی دسته بندی کرد (شکل 4).



شکل 4. دسته بندی بیوپرینت برپایه اکستروژن

3.1.1. اکستروژن پنوماتیکی

سیستم اکستروژن پنوماتیکی هوای ممتراکم را در سیستم توزیع مایع بکار میبرد. معمولاً شامل سرنگی پر از جوهر زیستی میشود که به پمپ هوایی به داخل آداپتور و لوله ها متصل میشود (شکل 5A). هیدروژل ها دارای خواص باریک شدگی تحت برش با این سیستم به خوبی کار میکنند اگر که فیلامنت پس از اکستروژن ثابت بماند. سیستم پنوماتیکی نیازمند استرلیزه کردن هوای درون پمپ هوا است. بدین خاطر با استفاده از یک فیلتر در راه هوایی برای به حداقل رساندن آلودگی ساختارهای بیوپرینت شده ایده آل است. همچنین اکستروژن روان تا حد امکان باید تضمین شده باشد. این بدان معناست که مایع یا واسطه برپایه ژل اضافی میبایست در حالت نیمه جامد یا جامد جوهر زیستی اضافه شود تا ویسکوزیته مطلوب داشته باشیم.

3.1.2. اکستروژن پیستونی

سیستم توزیع مایع مکانیکی برای بیومتریال هایی با ویسکوزیته بالا، همانند پلیمرهای مولکولی بالا طبیعی یا مصنوعی، مناسب تر است. بین این پلیمرها اکستروژن پیستونی بسیار رایج است و دستگاه های مربوطه همانند پمپ های تزریق میکرو نیز به سادگی قابل تهیه هستند. پیستون در این سیستم متصل با یک پیچ هدایت متصل به موتور است. زمانی که موتور روشن میشود حرکت گردشی پیچ هدایت موجب حرکت خطی پیستون میشود که جوهر زیستی را به خارج از نازل برای تشکیل فیلامنت ها می راند (شکل 5B).

3.1.3. اکستروژن پیچی

نوعی دیگر از سیستم های توزیع مایع مکانیکی است که دستگاه های پیچ دار کنترل حجمی بیشتری را فراهم میکنند و برای اکستروژن بیومتریال ها با ویسکوزیته بالاتر مناسب هستند. اصول این سیستم مشابه اکستروژن پیستونی است اما با این تفاوت که پیچی که متصل به موتور است بصورت مستقیم برای اکستروژن بکار میرود و کار پیستون را انجام میدهد (شکل 5C). با این وجود دستگاه های پیچ دار نه تنها فشار بیشتری را فراهم میکنند بلکه ممکن است به سلول های موجود در جوهر زیستی آسیب برسانند. بدین ترتیب طراحی بخش های پیچی باید محتاطانه باشد.

محققانی نیز گزارش شده اند که سیستم های پیستونی و پیچی را با هم ترکیب کرده اند. Visser و همکارانش ابتدا توسط روش پیچی PCL (پلی کاپرولاکتون) را پرینت کردند و سپس هیدروژل را روی PCL به روش پیستونی پرینت کردند. در مقایسه با متد پنوماتیکی، متد های پیستونی و پیچی رزولوشن بالاتر و قابلیت پرینت بهتری را بین بیومتریال های جامد یا نیمه جامد (مانند توده سلول ها) دارند. دستگاه هایی که از این دو متد استفاده میکنند از نظر حجمی محدودیت دارند، مشکلاتی در ضد عفونی و تمیز کردن آن ها وجود دارد (مخصوصاً برای پیچی ها) و قیمتشان بالاتر است.

با جوهر زیستی مناسب، پرینت برپایه اکستروژن ابزاری قابل اطمینان برای ساخت بیومتریال ها، مخصوصاً برای هیدروژل هایی با باریک شدگی برشی و خواص اتصال عرضی سریع است. قطر نازل، ویسکوزیته جوهر زیستی، سرعت حرکت نازل، سرعت اکستروژن جوهر زیستی، فشار اکستروژن، خواص سطح زیرلایه و ... بر شکل نهایی پرینت شده تاثیر میگذارد. به خاطر تنوع، مقرون به صرفه بودن و قابلیت چاپ ساختارهای متخلخل، بیوپرینت بر پایه اکستروژن توسط محققان در سرتاسر جهان بکار میرود.

3.2. بیوپرینت ها

از آنجاییکه که بیوپرینت برپایه اکستروژن راحت ترین و مقرون به صرفه ترین و رایج ترین روش است تعداد بیشماری بیوپرینتر های تجاری برپایه اکستروژن در بازار موجود است.

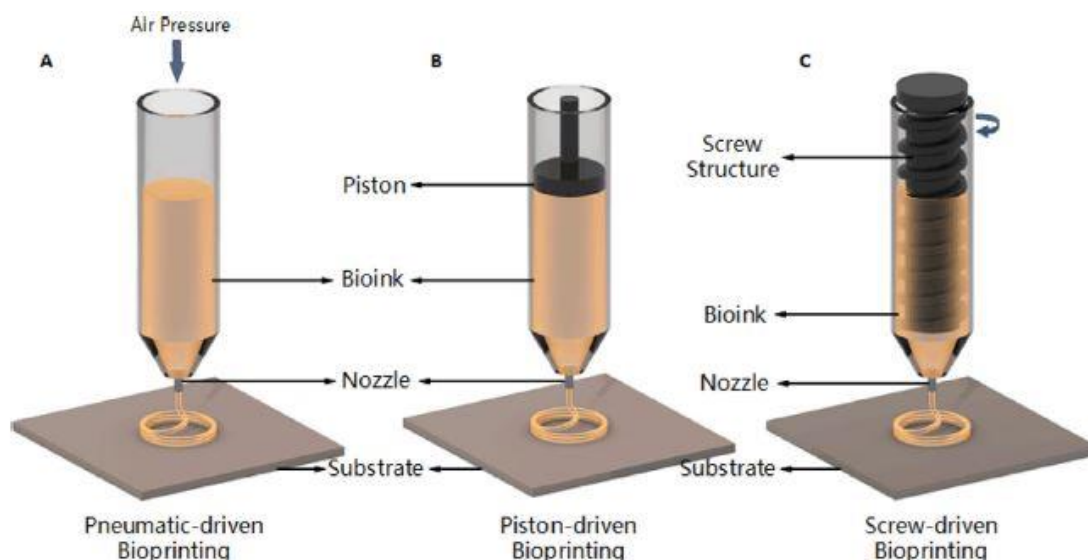
در نظر ما داربست های پرینت شده برپایه FDM همراه با سلول هایی که بعد از نصب رویش کاشته میشوند واقعاً تکنولوژی بیوپرینت کردن حساب نمی آیند. بدین خاطر Bioplotter سه بعدی که قادر به بیوپرینت سلولی بود را میتوان به عنوان اولین بیوپرینتر تجاری جهان حساب

کرد. توسط گروه از محققان دانشگاه Freiburg ساخته شد و توسط EnvisionTEC به زودی وارد بازار شد. نه تنها میتواند هیدروژل های سلول دار همانند ژلاتین، فیبرین، آلژینات، آگارز و ... را پرینت کند بلکه در ساخت پلیمرهای سخت، مواد سرامیکی غیرارگانیک همانند PCL، هیدروکسی آپاتیت (HA) و ذرات تری کلسیم فسفات (TCP) برای ساخت داربست های جذب نشدنی بکار میرود.

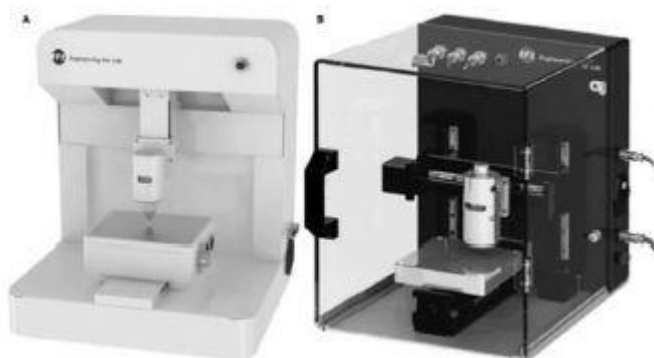
دیگر بیوپرینتر قابل توجه NovoGen MMX بود که توسط Organovo اختراع شد. این دستگاه دو نازل برای اکستروژن سلول ها، هیدروژل ها، داربست ها یا ماتریس حامل داشت. از این دستگاه اولین بار در بیوپرینت بافت های کروی چسبیده به هم که در آینده تشکیل بافت میداد درون ساختاری حفاظت کننده از هیدروژل آگارز استفاده شد. آگارز پس از اتمام فرآیند پرینت جدا شد.

از دیگر بیوپرینترهای معروف برپایه اکستروژن:

3DDiscovery از regenHU در سوئیس، FABION از 3D Bioprinting Solutions در روسیه، BIO V1 از REGMAT3D در اسپانیا



شکل 5. اصول و اساس بیوپرینت برپایه اکستروژن



شکل 6. (A) بیوپرینتر برپایه اکستروژن EFL-BP6601، (B) پرینتر دقت بالای EFL-BP5800 (رزولوشن 3 میکرومتر)

BP5800 میتواند فیلامنت هایی با قطر 3 میکرومتر (رزولوشن بیشتر پرینترهای سه بعدی 100 تا 200 میکرومتر است) پرینت کند که برای داربست هایی با دقت بالا مناسب است. رزولوشن بالا سبب زیست سازگاری بهتر میشود.

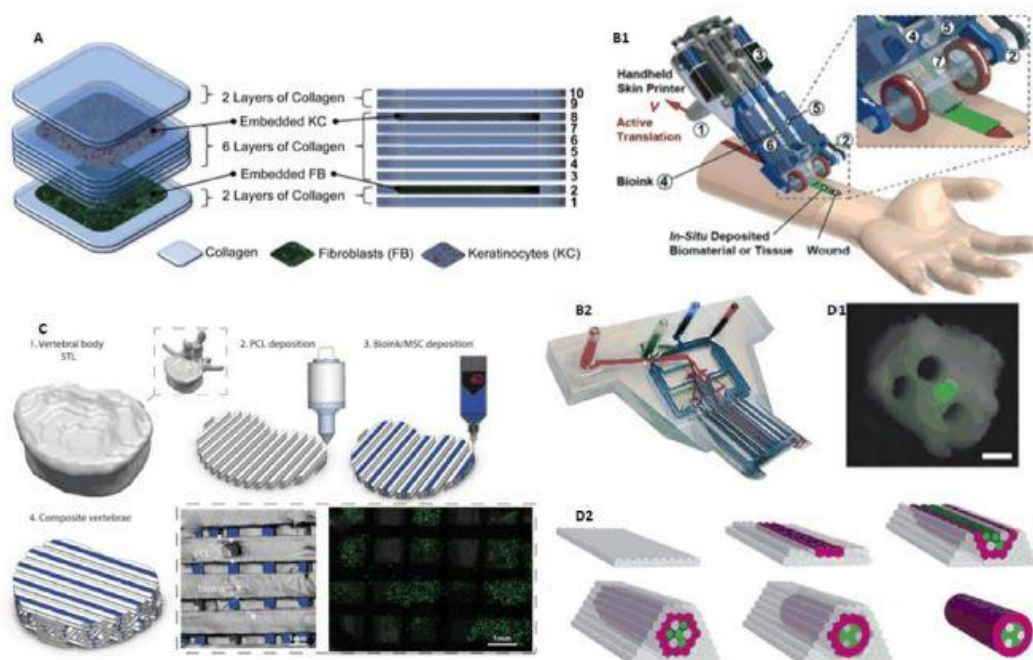
3.3. کاربردها

- سیتوبیولوژی
- تحقیقات دارویی
- مدل سازی تومور
- پزشکی بازسازی

سیتوبیولوژی ساخت ترکیبات تک سلولی یا چندسلولی است که شامل تحقیقات بر روی مشکلات اصلی در رشد سلولی، روابط بین سلولی و تراریخته شدن می شود. تحقیقات دارویی به معنای رهایش دارو (فارما کو کینتیک)، غربالگری دارو و توسعه داروهای فرعی است. مدل سازی تومور اساساً راجع به ساخت مدل های پاتولوژیک متفاوت از تومورها، تحقیقات در مورد مکانیزم پیدایش تومور، تپایی و درمان هدفمند و ... است. پزشکی بازسازی بیشتر مربوط به بیوپرینت کردن است و شامل تولید بافت و ارگان های مصنوعی، ساخت بافت های عصبی، قلبی، کبد و عروق سازی در بافت ها و سلول درمانی است.

3.3.1. پوست

در سال 2009 Lee و همکارانش از اکستروژن پنوماتیکی و کنترل دریچه های میکرو برای ساخت بیوپرینتر 4 نازله استفاده کرد. با استفاده از این بیوپرینتر 10 لایه هیدروژلی از کلاژن لایه روی هم پرینت شدند. فیبروبلاست ها در لایه دوم بصورت جداگانه پرینت شدند و کراتینوسیت ها در لایه هشتم بصورت مجزا پرینت شدند تا مشابه لایه های بافت پوست طبیعی باشد (شکل 7A). برای افزایش قابلیت پرینت روی سطوح غیر صفحه ای و کاربردهای احتمالی در ترمیم زخم پوست، رشد بالایی از سلول ها در قالب پلی (دی متیل سیلوکسان) (PDMS) ای با خطوط سطح سه بعدی به عنوان زیرلایه استفاده شد.



شکل 7. (A) فیبروبلاست ها و کراتینوسیت های بیوپرینت شده مشابه ساختار پوست طبیعی، (B) دستگاه دستی بیوپرینت سه بعدی پوست شامل تکنیک میکروسپال ها، (C) بافت استخوان که توسط بیوپرینتر چندنازل دار پرینت شده، (D) ساختار بدون داربست گرفت های عصبی

در سال 2014 Lee و همکارانش از دستگاه بیوپرینت مشابهی استفاده کردند اما این بار 8 نازل را برای بیوپرینت کراتینوسیت ها، فیبروبلاست ها و کلاژن استفاده کردند تا به عنوان اپیدرم، درم و ماتریس درم پوست طبیعی باشد. تعیین مشخصات ایمونوفلئورسانس و بافت شناسی نشان داد که بافت پوستی سه بعدی پرینت شده در مورفولوژی و بیولوژی مشابه بافت پوستی انسان *in vivo* بود. بیوپرینت سه بعدی برتری هایی در زمینه های شکلی، حفظ حالت، انعطاف پذیری، قابلیت تکثیر و امکان کشت سلولی مناسب می دهد.

در 2009 Kim و همکارانش از یک سیستم خنک کننده Cryogenic استفاده کرد تا داربست های کلاژنی با تخلخل بالا (>95%) از نوارهای کلاژن عمودی در لایه های پی در پی تولید کند. پس از در معرض دماهای زیر صفر درجه قرار گرفتن (در -76°C) و جامد سازی، یک کشت دوتایی کراتینوسیت/فیبروبلاست بر داربست های پرینت شده ایجاد شد تا تکثیر، جابجایی و رشد سلول ها نمایش داده شود. اما استحکام مکانیکی داربست های ضعیف بود و در سال 2011 این تیم دوباره همین پژوهش را بر روی داربست هایی با مدول هفت برابر تکرار کرد.

در 2012 پس از تایید خواصی همانند مناسب برای سیستم ایمنی و رشد بالا (همانند رسانش فاکتورهای مغذی ترشح شده، القای جابجایی سلول اندوتلیال *in vitro*) در سلول های AFS، Skardal و همکارانش از هیدروژلی حاوی سلول های AFS به عنوان جوهر زیستی استفاده کردند تا بر زخم های موش بصورت ضخیم بیوپرینت انجام دهند و این کار بصورت ترومبین/جوهر زیستی *in situ* انجام گرفت تا ظرفیت درمان را برای سوختگی ها و زخم های در مقیاس بزرگ نمایش داده شود.

در سال 2018 Hakimi و همکارانش دستگاه دستی پرینتر پوستی را بهینه سازی کردند تا در ترمیم سرعتی زخم های عمیق کاربرد داشته باشد. این بیوپرینتر ورقه های پوستی پر از سلول را بر روی زخم های شدید ایجاد می کرد (شکل 7B). با اعمال سلول های درمال و اپیدرمال در هیدروژل های دارای اتصالات عرضی متفاوت حاوی آلژینات یا فیبرین ترکیب شده با کلاژن و هیدروکسی آپاتیت، آن ها قادر به تولید ورقه های پوست با ضخامت، عرض و ترکیب قابل تنظیم بودند.

3.3.2. استخوان/غضروف

در سال 2015 Yao و همکارانش از تکنولوژی FDM برای پرینت داربست های PCL-HA توسط داده های بازسازی CT سه بعدی استفاده کرد. در سال 2015 Pati و همکارانش از متد چند نازله برای پرینت داربست هایی با ترکیب PCL، پلی (لاکتیک کو گلایکولیک اسید) (PLGA) و β -TCP و ماتریس خارج سلولی (ECM) معدنی شده که روی آن سلول های استرومایی مزانشیمی گرفته شده از بافت توربینت تحتانی بینی (hTMS) قرار داشت استفاده کردند. این داربست ها خواص استخوان رسانی و القایش استخوانی را از خود نشان دادند. همچنین سبب افزایش بازسازی استخوانی شدند.

در 2016 Daly و همکارانش متدی جدید برای بیوپرینت بافت استخوانی را پیشنهاد کردند: یک پیش ماده (precursor) بافت استخوانی *in vitro* و سپس با استفاده از این ماده مقدماتی مهندسی شده به عنوان قالب برای عروق سازی و استخوان سازی های *in vivo* بعدی پرداختند. محققان از آلژینات تحت تابش گاما قرار گرفته تلفیق شده با پپتاید های چسبنده Arg-Gly-Asp (RGD) که حاوی سلول های بنیادی مزانشیمی بالغ (MSC) بودند به عنوان جوهر زیستی استفاده کردند و همراه فیبرهای PCL پرینت شده (به عنوان ماده زمینه ای تقویت کننده خواص مکانیکی) توسط روش چند نازله به تولید ساختارهای دلخواه پرداختند (شکل 7C). پس از 12 هفته این کامپوزیت در حالت *in vivo* سبب افزایش شکلگیری استخوانی شد.

باید اشاره کرد که با کنترل قرارگیری جوهر زیستی در هر ثانیه فضای فیبری PCL امکان ایجاد شبکه ای دارای کانال های عاری از جوهر زیستی و متصل به هم در ساختار PCL فراهم شد که منجر به انتقال مواد مغذی بهتر شد.

در Kundu 2013 و همکارانش روشی مشابه Daly و همکارانش را بکار بردند تا بافت استخوانی را بیوپرینت کنند. آن ها از سیستم ته نشینی چند سره (MHDS) برای پرینت PCL و هیدروژل آلژینات حاوی سلول های کندروسیت بصورت لایه لایه و یکی در میان استفاده کردند تا داربست های سلول دار کندروسیتی را بدست آورند. آزمایش 4 هفته ای با موش ها بافت غضروف بهبود یافته و شکلگیری فیبریل کلاژن نوع II را در این داربست هیبریدی نشان داد.

در Lee 2014 و همکارانش دستگاه اکستروژن چند نازله ای را برای بازسازی گوش بکار بردند. این محققان PCL و هیدروژل سلول دار را یکی در میان بیوپرینت کردند تا غضروف سماعی (Auricular) و بافت چربی گوش را با پلی (اتیلن گلیکول) (PEG) به عنوان لایه قربانی برای حمایت از ساختار اصلی ساختند. کندروسیت ها و آدیپوسیت ها از سلول های استرومایی گرفته شدند و در هیدروژل قرار داده شدند تا بر روی غضروف و نواحی چربی توزیع شوند.

3.3.3. عصب

در Owens 2013 و همکارانش روشی را برای ساخت گرفت های عصبی پیشنهاد کردند که مخصوصا برای سلول ها و مواد ترشح شده از سلول ها بود. این محققان از سلول های بنیادین مغز استخوان موش (BMSC) و سلول های شوآن (SC ها) به عنوان جوهر زیستی برای تشکیل استوانه هایی چندسلوله با قطر 0.5mm توسط اکستروژن استفاده کردند. همانگونه که در شکل 7D قابل مشاهده است ساختار توسط ردیف های میله ای شکل آگارز (خاکستری رنگ) حمایت میشد که مجرا (conduit) را سر جای خود نگه میداشت و پس از هفت روز از بین میرفت و استوانه های جوهرزیستی خود مونتاژ میشدند. حلقه خارجی کاملا از جوهرزیستی BMSC (قرمز رنگ) تشکیل شده بود و استوانه ها حاوی 90% از BMSC و 10% از SC (سبز رنگ) بود که بصورت یک در میان با میله های آگارز قرار گرفته بودند و لومینا (lumina) های متعددی را درون گرفت آورده بود. ظرفیت بازسازی گرفت ها مورد ارزیابی قرار گرفت و نشان داد که این روش راهی امیدوار کننده برای تولید گرفت های عصبی بود و ممکن است به بازسازی عصبی منجر شود.

3.3.4. عضله/تاندون

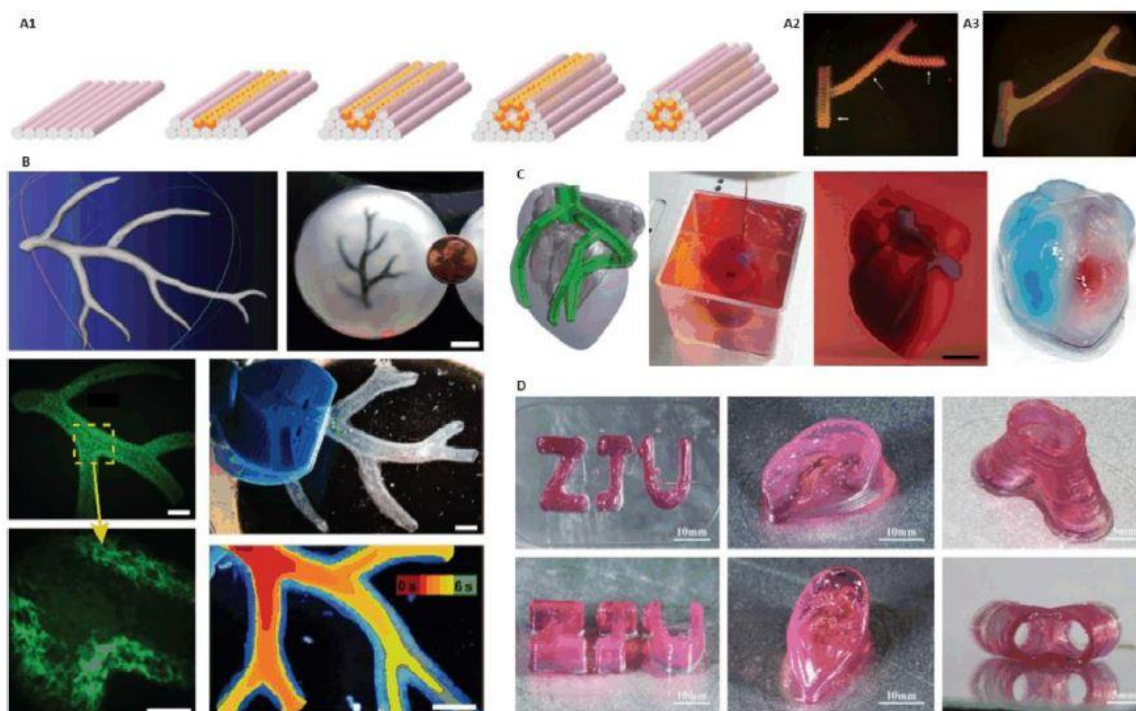
در Merecron 2015 و همکارانش از یک بیوپرینتر سه بعدی با چهار کارتریج توزیعی از چهار اجزای متفاوت استفاده کردند تا ساختار واحد ترکیبی تاندون-عضله (MTU) را تولید کنند. پلی اورتان (PU) ترموپلاستیک با جوهرزیستی هیدروژلی C2C12 سلول دار پرینت مشترک (Co-print) شد تا الاستیسیته و رشد عضلانی حاصل شود. همچنین PCL با جوهرزیستی هیدروژلی NIH/3T3 سلول دار پرینت مشترک شد تا سفتی و رشد تاندونی نیز حاصل شود. این پژوهش ظرفیت ساختارهای بافت ترکیبی بیوپرینت شده با خواص بیولوژیکی و مکانیکی مختص ناحیه ای را نشان میدهد.

3.3.5. بافت چربی (آدیپوز)

ساختارهای بافت چربی مصنوعی را میتوان برای بازسازی بافت نرم در جراحی پلاستیک و جراحی ترمیمی استفاده کرد. در سال 2015 Pati و همکارانش ماتریس بافت چربی دی سلول شده (DAT) که در آن سلول های بنیادی مزانشیمی گرفته شده از بافت چربی انسان (hASC ها) قرار گرفته بود را به عنوان جوهر زیستی برای بیوپرینت ساختارهای طاق شکل با تخلخل مهندسی شده درون فریم PCL بکار بردند. این فرایند توسط دستگاه چند نازله انجام شد. آزمایش ایمپلنت کردن در موش نشان داد که ساختار پس از نصب سبب التهاب کرونیک (مضمّن) و یا مسمومیت سلولی نشد اما سبب نفوذ مثبت بافت، بازسازی بافت و شکلگیری بافت چربی شد.

3.3.6. عروق خونی

در سال 2009 Norotte و همکارانش از سلول های عضله ای صاف ورید نافی انسان (HUVSMC ها)، فیبروبلاست های پوست انسان (HSF ها) و سلول های عضله ای صاف آئورت خوکی (PASMC ها) برای ساخت داربست های آزاد با قطر کم چندلایه تیوب مانند در گرفت های عروقی استفاده کردند. سلول ها در واحدهای مشخصی متراکم شدند که یا حالت کروی یا استوانه ای چندسلوله داشت و قطرش قابل تنظیم بود (-300 500mm) و با میله های آگارز لایه لایه پرینت شدند و این ماده قالب بود. ادغام (fusion) پس از پرینت واحد ها سبب تشکیل تیوب های با قطر کم و تک یا دولایه عروقی شد پس از آنکه آگارز خارج شد (شکل 8A). این متد راهی برای مهندسی عروق با اشکال و ساختار سلسله مراتبی مشخص با قطر خاص بود.



شکل 8. (A) تولید ساختارهای عروقی با استفاده از آگارز به عنوان ماده قربانی، (B) شبکه عروقی چاپ شده در هیدروژل معلق، (C) بیوپرینت سه بعدی قلب کامل حاوی عروق خونی اصلی، (D) بیوپرینت ساختارهای پیچیده هیبریدی با نانورس و GeIMA

در سال 2010 Skardal و همکارانش گرفت های شبه-عروقی بیوممنوعی با استفاده از سیستم پرینت Fab@Home را ایجاد کردند. دو نوع TetraPEG تبدیل به مشتقات تترا-آکریلات (TetraPacs) شدند. سپس برای اتصال عرضی مشترک با اسید هیالورونیک تیول شده و مشتقات ژلاتین استفاده شدند تا هیدروژل قابل اسکروژن برای پرینت ساختارهای بافتی آماده شود. محققان هیدروژل سلول دار NIH3T3 را برای ساخت ساختارهای تیوبی شکل بافت بکار بردند که تا 4 هفته فعالیت زیستی کشت را دارا بود.

در 2015 Hinton و همکارانش روشی به نام FRESH را توسعه دادند که روی MakerBot Replicator انجام میشد و با یک اکسترودر کننده سرنگی مخصوص بهینه سازی شده بود. در این تکنیک ساختارها با قرار دادن هیدروژل درون هیدروژلی ثانویه که نقش ساپورتی زیست سازگار، ترمو برگشت پذیر و موقت را داشت تولید میشدند. این ساپورت حاوی میکروذرات ژلاتین بود که حین فرایند پرینت همانند پلاستیک Bingham عمل میکرد. در معرض تنش های برشی ضعیف همانند جسمی سخت و در معرض تنش های برشی بیشتر همانند مایعی ویسکوز عمل میکرد.

این متد بیوپرینت مواد هیدراته با مدول الاستیک کمتر از 500kPa مثل آلژینات، کلاژن و فیبرین را ساده تر کرد. این کار برای تولید ساختارهای پیچیده بیولوژیکی همانند درخت شریانی (شکل 8B) حیاتی بود.

بیوپرینت هم محوره در ساخت عروق خونی و عروق سازی بسیار پرکاربرد است.

3.3.7 تحقیقات دارویی

بسیاری از مقالات که به آن ها اشاره کردیم را میتوان در زمینه تحقیقات دارویی حساب کرد. مثلاً Horvath و همکارانش آنالوگ حصار بافتی خون-هوا را تولید کرد. Noor و همکارانش ساختار قلب سلول دار شده مخصوص بیمار را طراحی کردند.

یکی از اهداف اصلی مهندسی بافت پایه گزاری مدل های رهائش دارویی *in vitro* برای غربالگری دارویی و بررسی های تاکسیکولوژیک (سم شناسی) است تا پاسخ واقع گرایانه و مطمئن انسان به تاثیرات دارو و خطرات احتمالی سمیت آن را پیش بینی شود. در 2008 Chang و همکارانش دستگاه میکروسیال، میکرو تحلیگر و میکروارگانی سه بعدی (3DM) را بصورت *in vitro* برای شبیه سازی پاسخ فیزیولوژیک انسان برای نظارت دارویی و در معرض سموم شیمیایی قرار گرفتن طراحی کردند. با ترکیب این پلتفرم میکروسیال با تکنیک بیوپرینت برپایه اکستروژن این مقاله توانست ساختارهای سه بعدی ارگانی با حفظ یکپارچگی، افزایش فعالیت زیستی با کنترل پراکندگی سلولی و عملکرد در حد بافت داشته باشد. این بدان معناست که ساختارهای مهندسی بافت شده برپایه آلژینات سلول دار پرینت سه بعدی شده میتوانند درون محفظه هایی در بافت شکل رهائش دارویی نیز داشته باشند. در 2012 همین گروه تحقیقاتی بیوپرینتر برپایه اکستروژنی را طراحی کرد که با استفاده از آلژینات حاوی سلول های کبدی HepG2 به عنوان جوهرزیستی بتوانند پلتفرم آزمایشگر دارویی کبد را بسازند. در این سیستم ظرفیت متابولیک دارو برای کبد در میکرومحیط های *in vivo* سه بعدی، معماری کبد یا جریان های میکروسیال های برشی به خوبی شبیه سازی شد.

در 2011 Snyder و همکارانش سیستم بالا را گسترش دادند تا مدل پایه برای بررسی تغییرات دارویی و حفاظت تشعشعی آنالوگ های زنده بافت کبد داشته باشند. محققان از این دو نوع سلول استفاده کردند: HepG2 و اپیتلیال پستانی انسان (M10)، تا تغییرات پس از دارویی را در یک چیپ بافتی میکروسیالی و نتایج حفاظت تشعشعی کبد را ببینند که به فهم پاسخ سیستم های بیولوژیکی چندسلوله در کاوشهای بلندمدت، مدل سازی بیماری ها و بیوسنسورها کمک میکند.

3.3.8 بیوپرینت چند-ماده ای

در حال حاضر بیوپرینت سه بعدی شامل چندماده (دوتا یا بیشتر) برای تولید ساختارها هرروزه بیشتر مورد استفاده قرار میگیرد. منظور از چند-ماده بودن میتواند مثل Daly و همکارانش باشد که پلیمر PCL بدون سلول را با جوهرزیستی حاوی سلول بکار گرفتند تا پیش ماده بافت استخوانی را پرینت کنند. میتواند مثل Lee و همکارانش باشد که از جوهرهای زیستی مختلف حاوی کراتینوسیت ها، فیبروبلاست ها و کلاژن برای پرینت قسمت های مختلف بافت پوست استفاده کردند. میتوان از خواص مواد مختلفی استفاده کردن تا جوهرزیستی کامپوزیت فرمی ایجاد شود که محدودیت های تکنولوژی های موجود و کشت سلولی پس از پرینت کردن را برطرف سازد. همچنین میتوان برای ساخت جوهرزیستی با انواع مختلفی از سلول های سوسپانسیون شده باشد تا الزامات فعالیت زیستی و عملکردی سازی بافت را پاسخ دهد.

در 2014 Levato و همکارانش متدی برای ترکیب بیوپرینت کردن با تکنواژی میکرو حامل ها (microcarrier) را پیشنهاد دادند. پس از مقایسه شش ترکیب مختلف از جوهرهای زیستی، برتری GeIMA-GG MC-MSC ها که حاوی GeIMA، ژلان و میکرو حامل های پلی لاکتیک اسید حاوی سلول های MSC (استورمال مزانشیمی) بود مشخص شد. محققان این جوهرزیستی را در تولید ساختار غضروفی بکار بردند و پتانسیل این روش را در تولید استخوان و استئوکندرال ها نشان دادند.

در 2019 Gao و همکارانش استراتژی بیوپرینت هیبریدی نانورس/GelMA را طراحی کرد که قابلیت پرینت پذیری بالای GelMA همراه با زیست سازگاری عالی حاصل شد (شکل 8D). این متد راهی آسان برای پرینت داربست های پیچیده با درستی ظاهری و عملکرد بیولوژیکی مناسب ارائه کرد.

3.3.9 بیوپرینت هم محور

بیوپرینت هم محور روش رایجی در پرینت برپایه اکستروژن است (مخصوصاً در ساخت عروق و عروق سازی). دسته بندی بیوپرینت برپایه اکستروژن به پنوماتیکی، پیستونی و پیچی به خاطر انواع سیستم های توزیع مایع است. در حالیکه نام گذاری بیوپرینت هم محور به خاطر چگونگی نازل ها است که میتوانند خود پنوماتیکی یا پیستونی باشند. بهترین مزیت بیوپرینت هم محور توانایی تولید کنترل شده ساختارهای سلسله مراتبی داخلی یا خارجی است. همانگونه که میدانیم هیدروژل هایی با زیست سازگاری بالا معمولاً استحکام مکانیکی پایینی دارند که این مشکل با بیوپرینت هم محور در ساختارهای هسته-پوسته حل میشود: ماده هسته ای زیست سازگاری را فراهم میکند و ماده پوسته ای استحکام مکانیکی را فراهم میکند (یا برعکس). همچنین پرینت هم محور زمانیکه با مواد قربانی شونده ترکیب شود تولید ساختارهای تیوبی را آسان تر میکند.

مواد مختلف را میتوان توسط نازل های داخلی یا خارجی در این حالت اکستروژن کرد که اولین بار در چرخش الکترواستاتیک برای تولید ساختار فیبری ناهمگون از این روش استفاده شد. در 2015 Gao و همکارانش روشی را برای ساخت فیلامنت های توخالی آلژینات کلسیم با استفاده از نازل هم محوره پیشنهاد کردند. ساختارهای سه بعدی هیدروژل سلول دار با استحکام بالا همراه با میکروکانال های داخلی را توانستند با کنترل زمان اتصالات عرضی برای ادغام فیلامنت های توخالی مجاور تولید کنند. ظرفیت فیلامنت های قابل ادغام نیز مشخص شد (شکل 9B). بنا بر این بررسی آن ها ساختارهای عروقی برپایه هیدروژل سه بعدی ساختند که کانال های سیالی چندسطحی داشت (کانال های ماکرو برای تحریک مکانیکی و کانال های میکرو برای رسانش مواد مغذی و تحریک شیمیایی). یک سیستم جریان گردشی عروقی، یک شبیه ساز جراحی سرخرگ مغذی و یک مدل کشت سلولی برای نمایش پتانسیل کاربردهای مهندسی بافت در این متد پرینت ساخته شد (شکل 9D).

در 2016 Jia و همکارانش از GeiMA، آلژینات، 4-پلی (اتیلن گلیکول) تترا آکریلات (PETGTA) به عنوان جوهر زیستی استفاده کردند تا ساختارهای عروقی ادغام پذیر را با نظم جهت گیری بالا توسط روش هم محوری ایجاد کنند (شکل 9C). در 2016 Akkineni و همکاران با استفاده از یک نازل هم محوره معمولی (شکل 9A) آلژینات و پلی (وینیل الکل) (PVA) را به عنوان ماده پوسته و هیدروژل های نرم مثل آلژینات، کیتوسان، صمغ ژلان، ژلاتین و کلاژن را به عنوان هسته در نظر گرفتند تا ساختارهایی بوجود آورند که خواص مکانیکی بهتری در تولید مدل های بافتی داشته باشند.

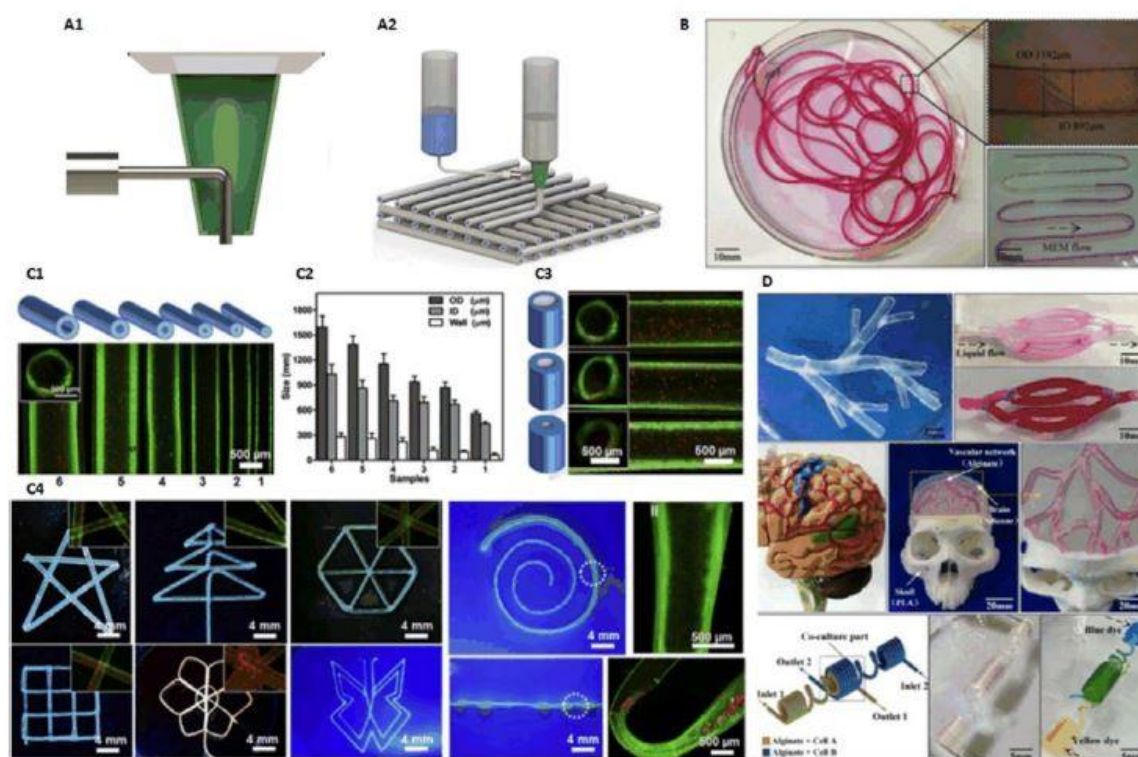
در 2016 Zhang و همکاران متدی را برپایه پرینت هم محور و اتصالات دو مرحله ای پیشنهاد دادند: جوهر زیستی حاوی سول های اندوتلیال که یک لایه همریز اندوتلیوم ایجاد کند تا در ساخت داربست های هیدروژلی میکرو فیبری استفاده شود. سپس کاردیومیوسیت ها روی آن کشت شوند تا میوکاردیومی با قابلیت انقباض ناگهانی و هماهنگ (Synchronous) بوجود آید. محققان ارگانوئیدهای بیوپرینت شده را به درون بیوریکتور ادغامی میکروسیال حاوی پلی (متیل متا آکریلات) (PMMA) و PDMS قرار دادند تا پلتفرم میوکاردیوم اندوتلیال شده روی یک چیپ برای ارزیابی سمیت قلبی عروقی کامل شود (شکل 10D).

در 2017 Gao و همکارانش روشی برای تولید عروق خونی (BBV) توسط بیوپرینت هم محوره در درمان بیماری های ایسکمیک پیشنهاد دادند. ماده قربانی شونده پلورونیک F127 به عنوان ماده هسته انتخاب شد و جوهر زیستی هیبریدی که شامل سلول های اندوتلیال Proenitor (پدری-مولودی) (EPC ها)، میکرو کره های PLGA حامل آتروواستاتین (AMPS)، آلژینات به عنوان پوسته برای بیوپرینت BBV استفاده شدند. اثر ساختارهای بیوپرینت شده در آزمایش بر روی موش ها مشخص شد (شکل 10B).

در 2018 Pi و همکارانش سیستم اکستروژن هم محور مولتی کاناله (MCCES) را برای تولید بافت های تیوبی چندلایه محیطی توسعه دادند. ساختارهای کانولار قابل ادغام را میتوان با اینتروال های مشخص در طول تیوب بیوپرینت شده از تک لایه به سه لایه تبدیل کرد (شکل

10A). همچنین از سلول های مجاری ادراری، SMC های مثانه برای بیوپرینت ساختارهای بافت مجاری ادراری کانولار استفاده شد. از سلول های اندوتلیال ورید نافی، SMC های انسانی برای تولید ساختارهای بافت عروقی استفاده شد.

در Shao 2018 و همکارانش روشی را برای بیوپرینت فیبرهای هیدروژل ناهمگن در تولید مدل های عروق خونی پیشنهاد داد. بیوپرینت هم محور برای تولید میکروفیبرهای GeIMA با مورفولوژی قابل تنظیم محصور شده در آلژینات کلسیم بکار رفت. با تنظیم نرخ جریان، میکروفیبرهای GeIMA با مورفولوژی های صاف، موجی و مارپیچ بدست می آید (شکل 10C). با استفاده از این فیبرها ریز بافت های حاوی سلول های اندوتلیال ورید نافی ساخته شد که سلول ها تدریجاً روی آن حرکت کرده و بهم متصل میشوند تا لومن مشابه عروق خونی تشکیل شود.



شکل 9. (A) شکل نازل هم محور، (B) ساختار عروقی توخالی ادغام پذیر، (C) الگوهای دوبعدی ساخته شده از تیوب های ادغام پذیر، (D) ساختارهای شبه عروقی با کانال های سیالی چندسطحی

4. بیوپرینت برپایه قطره افشانی

برخلاف بیوپرینت برپایه اکستروژن که از فیلامنت های پیوسته به عنوان واحد استفاده میکند، بیوپرینت برپایه قطره افشانی از قطره های جدا و مستقل به عنوان پایه استفاده میکند که به رزولوشنی بالا در مقایسه با اکستروژن منجر میشود. به خاطر سادگی و ظرفیت بالای خود در کنترل دقیق بیولوژیکی از قبیل سلول ها، فاکتورهای رشد، ژن ها، داروها، بیومتریال ها و ... این تکنولوژی کاربرد زیادی در مهندسی بافت، پزشکی ترمیمی، پیوند عضو، پزشکی دارویی و غربالگری دارویی و تحقیقات سرطان محور دارد.

4.1 اصول و اساس

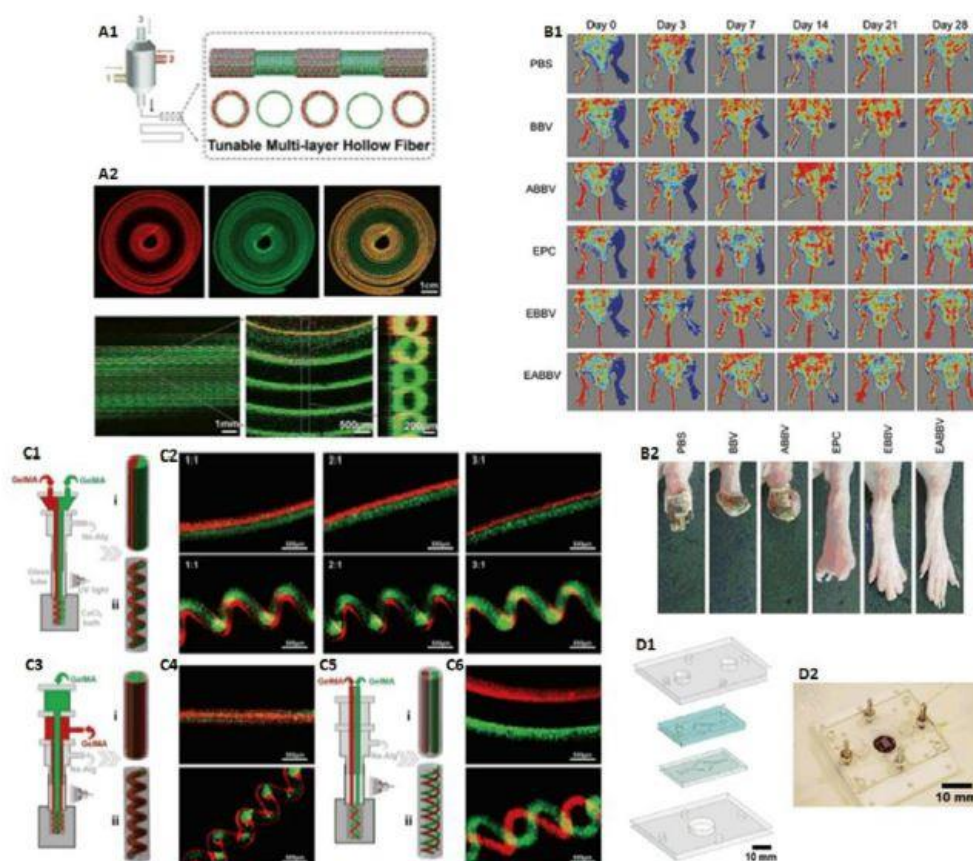
بیوپرینت برپایه قطره افشانی را میتوان به بیوپرینت جوهرافشانی، افشاندن الکترو هیدرودینامیک (EHDJ) و بیوپرینت به کمک لیزر (LAB) دسته بندی کرد. بیوپرینت جوهرافشانی به زیرشاخه های پرینت جوهرافشانی پیوسته (CIJ) و پرینت جوهرافشانی Drop-on-demand (قطره افشانی تقاضایی) (DOD) دسته بندی کرد. بیوپرینت به کمک لیزر نیز به زیرشاخه های نوشتن مستقیم هدایتی لیزری (LGDW) و انتقال روبه جلو القایی لیزری (LIFT) دسته بندی کرد (شکل 11).

4.1.1 بیوپرینت جوهرافشانی

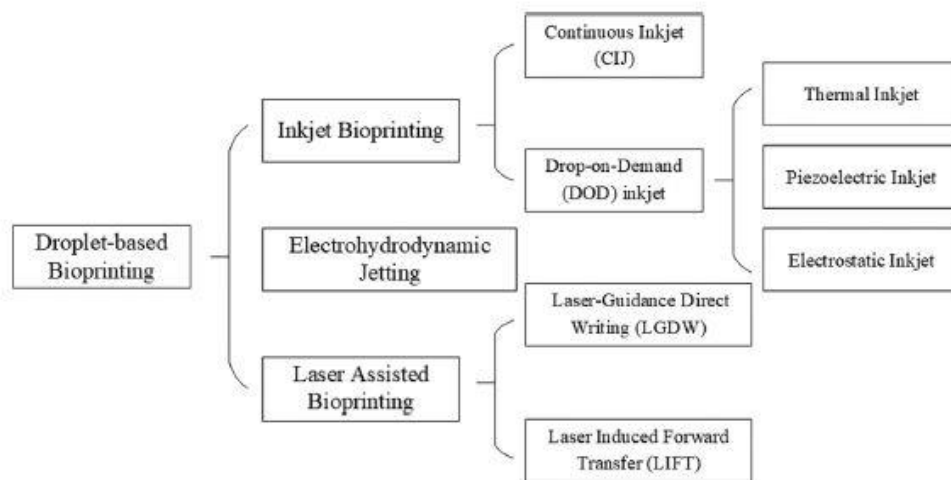
بیوپرینت جوهرافشانی اولین تکنولوژی بیوپرینت کردن بود. فرایند پرینت جوهرافشانی دو مرحله دارد:

1. شکل گیری قطره جداگانه که به مکانی دلخواه از زیرلایه منتقل میشوند.

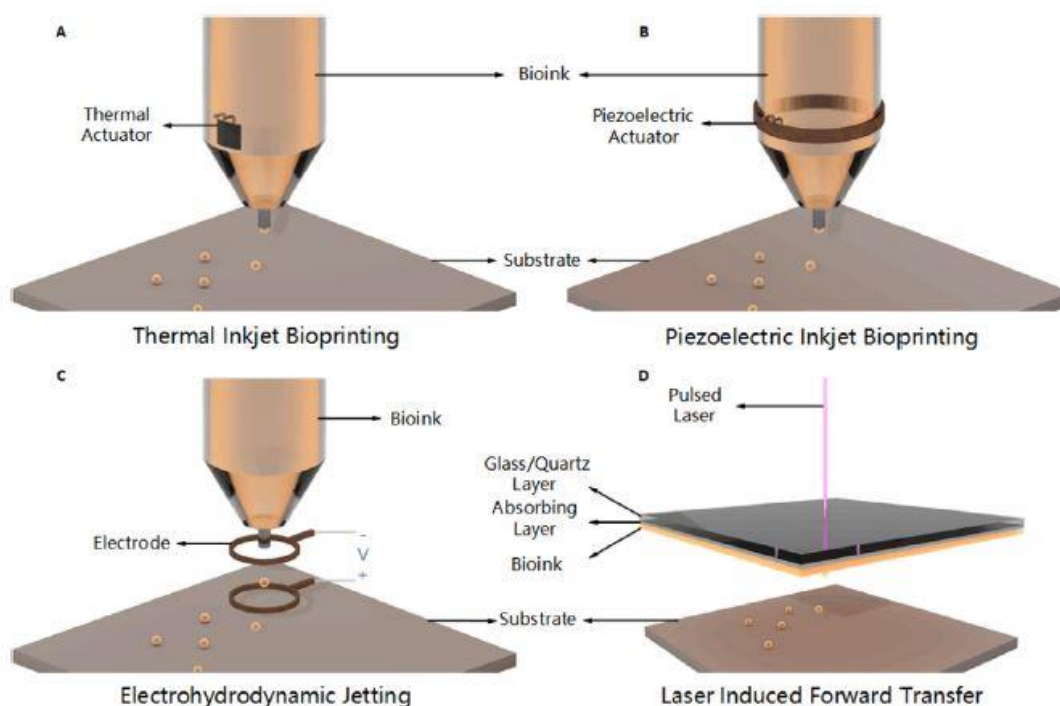
2. تعامل بین قطرات و زیرلایه



شکل 10. (A) نازل هم محور سه کاناله در تولید ساختارهای تیوبی با قابلیت انتخاب تک/دو لایه، (B) آزمایشات روی موش ساختارهای عروقی بیوپرینت شده با استفاده از پلورونیک به عنوان ماده قربانی شونده، (C) پرینت هم محور دو لایه، چند لایه، مارپیچ میکروفیبرهای GeIMA، (D) پرینت هم محور برای ساخت بیوریکتور میکروسیالی



شکل 11. دسته بندی بیوپرینت برپایه قطره افشانی



شکل 12. اصول و اساس بیوپرینت برپایه قطره افشانی

همانگونه که در قبل اشاره کردیم دو متد برای شکلگیری قطره ها وجود دارد: CIJ از پدیده ی طبیعی به نام ناپایداری Rayleigh-plateau بهره میبرد که تمایل طبیعی جریان مایعی برای تغییر شکل موفولوژیک به ردیفی از قطره ها است. جوهر اعمال شده در CIJ معمولا از نظر الکتریکی رسانا است تا بتواند توسط الکتریسیته یا میدان های مغناطیسی هدایت شود. حین فرآیند پرینت قطرات زائد گردش مجدد خواهند داشت. اما جوهرافشانی DOD تنها زمانی قطرات را ایجاد میکند که نیاز (تقاضا) وجود داشته باشد و قرارگیری قطرات نیز با تغییر مکان نازل بالای نقطه دلخواه است قبل از اینکه قطره تخلیه شود. در کل CIJ فرکانس تولید قطره بالاتری دارد ولی جوهرافشانی DOD فرکانس پایین تری دارد اما حجم قطره پایین تری دارد که منجر به رزولوشن بالاتر میشود. همچنین روش CIJ از نظر پاکیزگی برخی مشکلات را دارد و در بیشتر تحقیقات مربوط به بیوپرینت برپایه قطره افشانی از DOD استفاده میشود.

بیوپرینت جوهرافشانی DOD را با توجه به مکانیزم های خروج قطره به دسته های حرارتی، پیزوالکتریک، الکترواستاتیک و ... تقسیم میکنند. بیوپرینت جوهرافشانی حرارتی از ولتاژ ضربه قابل کنترل استفاده میکند تا محرک حرارتی (فیلم مقاومتی) را تا دمایی بالا (معمولا 200-300c) گرم کند که سبب تبخیر جزئی، شکل گیری حباب کوچک میشود و پالسی فشاری برای جوهرزیستی فراهم میکند تا بر تنش سطحی چیره شود و بتوان از روزه نازل خارج شود (شکل 12A) قبل از اینکه حباب از بین برود. پس از تخلیه جوهرزیستی در نازل تحت تاثیر خنک شدن محرک حرارتی و سیفون شدگی حفره نازل قرار میگیرد. با اینکه دماهای بالا میتوانند ماده هیدروژل را غیرطبیعی کند اما مدت زمان گرمایش بسیار کوتاه است تا این حرارت هیچ تاثیری بر پایداری ذرات نداشته باشد. بیوپرینت جوهرافشان حرارتی را در انواع بیولوژی ها مانند پروتئین ها، سلول ها و ... استفاده میکنند اما بیوپرینت جوهرافشان پیزوالکتریک از یک محرک پیزوالکتریک برای شکل گیری قطرات استفاده میکند. یک تغییر شکل سریع و برگشت پذیر در کریستال پیزوالکتریک در هنگام اعمال ولتاژ اتفاق می افتد که سبب تغییرات حجمی در مخزن میشود و در ادامه باعث انتشار موج های آکوستیک میشود و پالش فشاری برای جوهرزیستی را فراهم میکند که برای غلبه بر تنش سطحی در روزه نازل مورد نیاز است حاصل میشود (شکل 12B). بیوپرینت جوهرافشان الکترواستاتیک نیز از افزایش حجم ناگهانی برای رسیدن به مرحله تخلیه قطره استفاده میکند. ولتاژ ضربه به صفحه ای پهن و یک موتور اعمال میشود که سبب خم شدن صفحه برای اکستروژن جوهرزیستی میشود.

نوع بیوپرینت جوهرافشان DOD هرچه هم باشد خواص تنش سطحی و رئولوژیکی جوهرزیستی قابلیت پرینت شدگی آن را مشخص میکند. ملزومات ویسکوزیته جوهرزیستی بین سیستم های پرینت متفاوت هستند اما حد آستانه آن 30mPa/s است. عواملی مثل قطر نازل، فاصله بین نازل و زیرلایه، فرکانس ضربه جریان/ولتاژ، گرادیان دمایی (برای جوهرافشانی حرارتی)، خاصیت تغییر شکل پیزوالکتریک (برای جوهرافشانی پیزوالکتریک) و ... بر اندازه قطرات و رزولوشن پرینت تاثیر میگذارند.

4.1.2 جوهرافشانی الکترو هیدرودینامیک

بیوپرینت جوهرافشان قطراتی را با افشاندن جوهرزیستی به داخل نازل ایجاد میکند. بدین ترتیب فشاری زیادی اعمال خواهد شد اگر نازل قطر کمی داشته باشد که معمولا این فشار بر فعالیت زیستی سلول ها تاثیر خواهد گذاشت. EHDJ از یک میدان الکتریکی بهره میبرد که باعث کاهش فشار روی جوهرزیستی میشود. مکانیزم فعالیت EHDJ در شکل 12C قابل مشاهده است. اول نازل فلزی با جوهرزیستی پر شده تا شکل منیسک کروی در نوک نازل به خاطر تنش سطحی ایجاد شود. سپس ولتاژ بالایی بین نازل و زیرلایه اعمال میشود تا میدان الکتریکی ایجاد شود که سبب انباشتگی یون های متحرک در منیسک میشود. بدین خاطر دفع الکترواستاتیکی بین یون ها منیسک را به شکل مخروط Taylor تغییر شکل میدهد. قطرات زمانی که تنش الکترواستاتیک بر تنش سطحی غلبه میکند در ولتاژی بالا خارج میشوند. بنا بر تغییرات ولتاژ از کم به زیاد، جوهرزیستی در حالات مختلفی ممکن است ظاهر شود: چکیدن میکرو، افشانش متناوب، افشانش Tayler، حالت ناپایدار، از کار افتاده و ... بیشتر بیوپرینترهای برپایه EHDJ ولتاژی مناسب را برای تولید قطرات مجزا و مستقل اعمال میکنند. بررسی ها نشان داده عواملی همچون شدت میدان الکتریکی، غلظت سلولی، ترکیبات جوهرزیستی و ... که در EHDJ اعمال میشود بر فعالیت زیستی طولانی مدت سلول پس از پرینت تاثیر میگذارد. اختلاف در ولتاژ بر اندازه قطرات (معمولا ولتاژ بالا سبب قطرات ریزتر میشود)، ترکیبات و غلظت جوهرزیستی بر انتقال ماده بین سلول ها تاثیر میگذارد. اندازه قطرات و غلظت سلول ها بر تعداد سلول ها در هر افتادن تاثیر میگذارد. زمانیکه اندازه قطره بیشتر از 400μm است تاثیر انتشار ماده به شدت

کاهش پیدا میکند. در کل EHDJ از وارد شدن فشار بیش از حد که ممکن است برای سلول ها آسیب زا باشد دوری میکند و مخصوصا برای پرینت جوهرزیستی با روزه نازل کوچک، نرخ بالای وزن/حجم یا غلظت سلولی بالا مناسب است.

4.1.3 بیوپرینت به کمک لیزر (LAB)

LAB دسته ای از فرایندهای پرینت های بدون تماس و بدون نازل است که بیومتریال ها را بطور دقیق روی زیرلایه است که از جمله این فرایندها LGDW، LIFT، AFA-LIFT، پردازش لیزری بیولوژیکی (BioLP)، MAPLE-DW (نوشتن مستقیم لیزر تبخیری پالسی به کمک ماتریس) و ... را میتوان نام برد. بین این ها MAPLE-DW، BioLP، AFA-LIFT برای سناریوهای مختلف طراحی شده اند ولی در واقع همگی بهینه سازی شده LIFT هستند.

در 1999 Odde و Renn از نیروهای اپتیکی القا شده توسط لیزر استفاده کردند تا الگوهای دوبعدی سلول ها را چاپ کنند که به آن LGDW (نوشتن مستقیم هدایت شونده از لیزر) گفته شد. اساس LGDW این است که یک پرتو لیزری متمرکز ضعیف (پرتو لیزر دیودی قابل تنظیم با طول موج 800nm) بر سوسپانسیون سلولی تابیده میشود که بصورت اپتیکی سلول ها را به دام انداخته و آن ها را به درون زیرلایه هدایت میکند. نیروی گرادیان زمانیکه سلول ها با نور تعامل دارند ایجاد میشود که سلول ها را به مرکز نور کشانده و آن ها را در جهت زیرلایه (مانند یک لغزش) در جهت محوری هدایت میکند. پارامتر کلیدی این تکنولوژی شاخص های شکست متفاوت سلول ها و سیال محاطی است. بدین ترتیب مواد سازگار و بیولوژیک کمی را میتوان در LGDW بکار برد. بدین ترتیب بررسی خاصی مربوط به این تکنولوژی ثبت نشده است.

اولین بار از LIFT برای انتقال فلزات استفاده شد و امروزه از آن برای چاپ بیومتریال ها مثل پلی پپتاید ها، DNA، سلول ها و ... استفاده میشود. همانگونه که در شکل 12D نشان داده شده است یک بیوپرینتر برپایه LIFT معمولا سه بخش اصلی دارد: منبع لیزر پالسی، ساختار ربانی پوشیده شده با جوهرزیستی و زیرلایه گیرنده. ساختار ربانی معمولا حاوی لایه میانی جاذب لیزر (ساخته شده از طلا یا تیتانیوم، مکان آن بین لایه شیشه/کوارتزی و لایه جوهرزیستی) است که بستگی به خواص نوری و طول موج لیزر جوهرزیستی دارد. منبع لیزر پالسی معمولا یک لیزر نانوثانیه ای با طول موج فرابنفش یا نزدیک فرابنفش است. ساختار ربانی در واقع لایه ای شیشه/کوارتزی است که نسبت به تشعشع طول موج لیزر شفاف است. همچنین یک لایه جوهرزیستی حساس به حرارت (سلول ها در جوهرزیستی یا به بیوپلیمر چسبیده یا بصورت متقارن در هیدروژل کپسوله میشوند) روی آن قرار دارد. زیرلایه گیرنده که با بیوپلیمر یا واسطه سلولی روکش شده تا از چسبندگی و رشد پیوسته سلول های منتقل شده اطمینان حاصل شود. این زیرلایه در زیر روکش جوهرزیستی قرار دارد و برای دریافت قطراتی که با سرعت بالا خارج میشوند استفاده میشود. اساس LIFT این است که لیزر متمرکز پالسی بر لایه جاذب لیزر در ساختار ربانی حین پرینت تابانده میشود که سبب تبخیر منطقه ای و تشکیل حباب ها فشار بالا میشود. این مهم مواد حاوی سلول ها را به سمت زیرلایه گیرنده پیش میراند. توضیح فیزیکی بدین صورت است که این ناحیه پس از دریافت انرژی لیزر در حالت ارتعاشی با انرژی بالاست و فرایند برگشت آن به حالت پایه سبب آزادسازی گرما میشود که این گرما سبب تبخیر جوهرزیستی (یا لایه میانی) شده که باعث افشانش میشود. ممکن است برخی پدیده ها مثل فرسایش، تشکیل پلاسما، پدیده ترموآکوستیک و ... حین این فرایند رخ دهند. پس باید پارامترهای تشعشعی لیزر به دقت کنترل شود.

متدهای دیگری از بیوپرینت به کمک لیزری همانند MAPLE-DW، BioLP، AFA-LIFT از LIFT می آیند. دوتای اول از ولتاژ بالای لیزر پالسی و فیلم فلز/اکسید فلز به عنوان لایه میانی استفاده میکند در حالیکه دوتای آخری از لیزر پالسی فشار پایین و هیدروژل های قربانی شونده (ماتریزل) به عنوان لایه میانی استفاده میکنند. Hopp و همکارانش اولین بار از AFA-LIFT در پرینت سلولی در سال 2005 استفاده برد که لایه جاذب در مقایسه با LIFT معمول ضخیم تر بود (100nm). BioLP اولین بار توسط Barron و همکارانش در 2004 برای مشخص سازی چندین الگوی مواد بیولوژیکی در سرعت بالا و قابلیت تکرار پذیری بالا بکار رفت. علاوه بر لایه جاذب ضخیم همانند AFA-LIFT (75-100nm) یک پلتفرم در حرکت گیرنده و CAM CCD برای محلی سازی پرینت سلولی نیز بکار رفت. اولین بار MAPLE-DW توسط Wu و همکارانش در 2001 در بیوپرینت کردن بکار رفت. آن ها از لیزر با فشار پایین (فرابنفش یا نزدیک به آن) و ماتریسی داخل لایه انتقال دهنده استفاده کردند تا جذب لیزر و انرژی انتقالی را بیشتر کنند.

مهمترین مزیت LAB در توانایی آن برای پرینت الگوها از بیومتریال ها با سرعت و دقت بالا (مقیاس میکرونی) است و ترکیب سیستم CAD/CAM در فرایند پرینت صحت آن بهبود میبخشد (تک سلوله یا نزدیک به آن). چنین دقت بالایی استفاده از ردیف سلول ها از مهندسی بافت حاوی سلول های مختلف و فاکتورهای بیولوژیکی مربوط به شبیه سازی غیر ایزوتروپ و پیچیدگی بافت ها را ممکن می سازد. LAB نیز قادر به بیوپرینت دقیق اجزای مختلف بافت ها (مخصوصا سلول ها) و بازتولید ساختار فضایی آن هاست و راهی را برای بازتولید بافت ها و ارگان های طبیعی با ساختار و عملکردی دقیق فراهم آورده است. کشت دقیق در ساختارهای سلولی پیچیده را نیز میتوان با کنترل توزیع فضایی انواع مختلف سلول ها در LAB انجام داد. علاوه بر آن LAB نیز به صورت نوعی تکنولوژی بدون تماس و بدون نیاز به نازل باعث از بین رفتن برخی مشکلات مثل گیر کردن نازل، عدم بازتولیدی به خاطر ویسکوزیته محلول، عفونت یا رسیدن آسیب به زیرلایه و ... میشود. قطره های کوچکتري تولید میکند (از nL به fL) و رزولوشن بالاتری در مقایسه با بیوپرینت جوهرافشانی دارد. جوهرزیستی آن غلظت بیشتری از سلول ها را دارد که سبب کاهش زمان رشد میشود (در مقایسه با تکنولوژی حاوی نازل). دیگر بررسی ها نشان داده که LAB برای تولید ساختارهای سلولی چندلایه مناسب است و همچنین برای بیوپرینت *in situ* و *in vivo* مطلوب است.

4.2. بیوپرینترها

در مقایسه با بیوپرینترهای برپایه اکستروژن، تعداد زیادی از بیوپرینتر های برپایه جوهرافشانی در بازار وجود ندارد.

اولین بیوپرینتر جوهر افشان توسط Thomas Boland از دانشگاه Clemson در سال 2003 با بهینه سازی پرینتر استاندارد جوهرافشان HP ایجاد شد. LabJet-Bio از Microjet در ژاپن سیستم توزیع جوهرافشان پیزوالکتریک با دقت بالا است که میتوان در بیوپرینت پروتئین، آنتی بادی، آنزیم، سلول ها و معرف ها، بیوپچپ ها و بیوسنسورها، غربالگری داروها و طراحی مدارها با جوهر نانوفلز از آن استفاده کرد. کمپانی فرانسوی Poetis نیز بیوپرینتری را برپایه تکنولوژی LIFT ساخت که بیشتر جنبه تجاری داشت. Cyfuse Biomedical واقع در توکیو، ژاپن سیستم بیوپرینت Regenova را توسعه داد که برپایه متدی به نام Kenzan بود و با استفاده از سلول قادر به بیوپرینت ساختارها بود. با استفاده از نرم افزار مخصوص خود کمپانی این سیستم قادر به پرینت کره های سلولی به ردیف های نازک سوزنی برای کشت بود. هر کره را در ترتیبی خاص قرار میداد و به سلول ها اجازه ادغام بدون نیاز به کلاژن یا هیدروژل را میداد. این دستگاه توانایی پرینت عروق خونی با قطر 2-3mm، عصب ها، غضروف و استخوان ساب کندرال و بافت کبد برای غربالگری دارویی و تست گیری را داشت.

4.3. کاربردها

4.3.1. پوست

در 2012 Sofokleous و همکارانش دستگاهی چندسوزنه دستی قابل حمل را برپایه EHDJ طراحی کردند که از میدان الکتریکی با ولتاژ بالا استفاده میکرد و بنا بر زاویه رفرنس (RA) زاویه تفنگ اسپری تنظیم میشد. این دستگاه میتواند محلول PLGA یا PMSQ را در ذرات چندکاربرده و فیبرها با اندازه میکرومتر و کوچک تر از آن اسپری کند. گرچه جوهرزیستی حاوی سلول در این پژوهش وجود نداشت اما به خاطر خصوصیات ایمنی و قابلیت انعطاف این دستگاه قابل حمل، محققان میتوانند شروع به اضافه کردن داروها، فاکتورهای رشد، فاکتورهای انعقادی یا دیگر مواد به محلول PLGA کنند که این محلول به عنوان پانسمان زخم یا ترمیم کننده پوست اعمال میشود.

در 2013 Michael و همکارانش از این خاصیت که LIFT میتواند بطور دقیقی انواع سلولی را در فیبروبلاست ها و کراتینوسیت های بیوپرینت شده بر روی ماتریس پایدارکننده (Matriderm) قرار دهد استفاده کردند تا جایگزینی برای پوست بوجود آورند که بعدها بر روی موش ها مورد آزمایش قرار گرفت. 11 روز پس از بیوپرینت شدن گرفت به خوبی به بافت پوستی اطراف زخم چسبید و تکثیر و رشد سلول ها در گرفت مشاهده شد (شکل 13A). اثر مثبت تکنولوژی LAB در درمان سوختگی های پوستی تایید شد.

4.3.2. استخوان/غضروف

در 2007 De Coppi و همکارانش با استفاده از بیوپرینترهای جوهرافشان ساختارهای استخوانی شکلی ساختند و پس از کشت *in vivo* آن ها را در موش ها قرار دادند. بافت به شدت معدنی شده با چگالی مشابه به بافت استخوان مشاهده شد.

در 2010 Keriquel و همکارانش آزمایش ترمیم کالوارا (calvaria) موش را به راه انداختند. این محققان نانوهیدروکسی آپاتیت (nHA) را برای بیوپرینت *in situ* بکار گرفتند و نقایص با اندازه بحران استخوان با قطر حدود 3mm را پر کردند. نتایج اولیه نشان داد که بیوپرینت *in vivo* برای ترمیم استخوان شدنی است.

در 2012 Cui و همکارانش یک پرینتر جوهرافشان حرارتی HP Deskjet 500 بهینه سازی شده را بکار گرفتند که با پلیمریزاسیون همزمان بتواند پلی (اتیلن گلاکول) دی متیل آکریلات (PEGDMA) را با کندروسیت های انسان برای ترمیم نقایص در شاخه های استئوکندرال در حالت لایه به لایه پرینت کند.

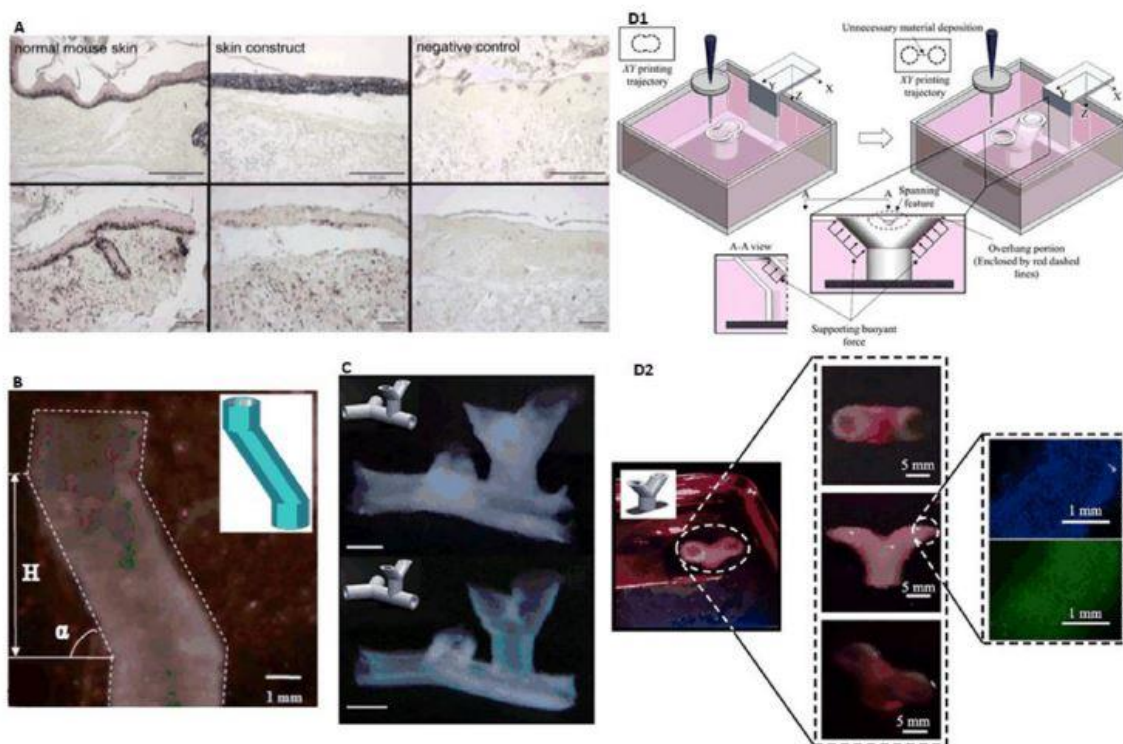
در 2012 Xu و همکارانش سیستم هیبریدی پرینت جوهر افشان/الکتروچرخشی را برای تولید ساختار 5 لایه با ضخامت 1mm و پرینت توسط دو نازل متناوب (الکتروچرخشی فیبرهای PCL درحالیکه پرینت جوهرافشانی کندروسیت های الاستیک خرگوش معلق در یک هیدروژل فیبرین-کلاژن) را طراحی کردند. این پژوهش نشان داد که ساختارهای تولید شده تشکیل بافت هایی غضروف مانند را هم در *in vivo* و هم در *in vivo* دادند و داربست های هیبریدی خواص مکانیکی بهتری را ایجاد میکرد.

در 2015 ساختار گوش انسان توسط Markstedt و همکارانش بیوپرینت شد و این کار بر پایه تکنولوژی فواره (جت) الکترومغناطیسی با دریچه های میکرو صورت گرفت. محققان سلولز نانوفیبریل شده (NFC) و آلژینات حامل کندروسیت های حفره بینی انسان (hNC) را به عنوان جوهرزیستی در نظر گرفتند. توانایی این متد نیز برای پرینت ساختارهای پیچیده ثابت شد.

4.3.3. عصب

در سال 2006 Eagles و همکارانش نشان دادند که EHDJ میتواند در مقیاس میکرون نرون ها را بدون اغتشاش در کار دیگر نرون ها و سلول ها رسوب کند و سلول ها زنده بمانند.

در سال 2014 Lorber امکان پذیری بیوپرینت جوهرافشانی پیزوالکتریک سلول های گانگلیون رتینال موش بالغ (RGC) و سلول های گلیال بررسی شد. آزمایشات نشان داد که این متد پرینت تاثیر معناداری بر زنده ماندن سلول های RGC/گلیال و رشد پی اماس (نوریت) RGC نداشت و سلول های گلیال خواص رشدی خود را پس از پرینت حفظ کردند.



شکل 13. (A) شبیه سازی مرحله رشد سلولی سلول های پوست توسط LIFT، (B) پرینت جوهرافشانی ساختارهای تیوبی زیگ زاگ، (C) پرینت جوهرافشانی عمودی و افقی شاخه های ساختارهای عروقی، (D) ساختارهای تیوبی سلول دار Y-شکل با استفاده از تکنیک MAPLE-DW

4.3.4 عروق خونی و عروق سازی

در 2006 Boland و همکارانش نشان دادند که لایه های زیادی از سلول ها و هیدروژل ها را میتوان برای تولید ساختارهای دلخواه توسط بیوپرینترهای جوهرافشان حرارتی بکار برد. Cui و Boland این متد را در 2009 بیشتر توسعه دادند و از سلول های اندوتلیال میکرو عروقی انسان (HMVEC) و فیبرین به عنوان جوهرزیستی استفاده کردند تا ساختارهای میکرو عروقی را بسازند. کانال های فیبرین با سایز میکرون با دقت توسط این بیوپرینتر ساخته شد که در این حین سلول ها خود را داخل کانال ها قرار دادند و بر لایه داخلی آن ها رشد کردند. این متد ارزش پرینترهای جوهرافشان حرارتی را برای پرینت همزمان داربست و سلول ثابت کرد.

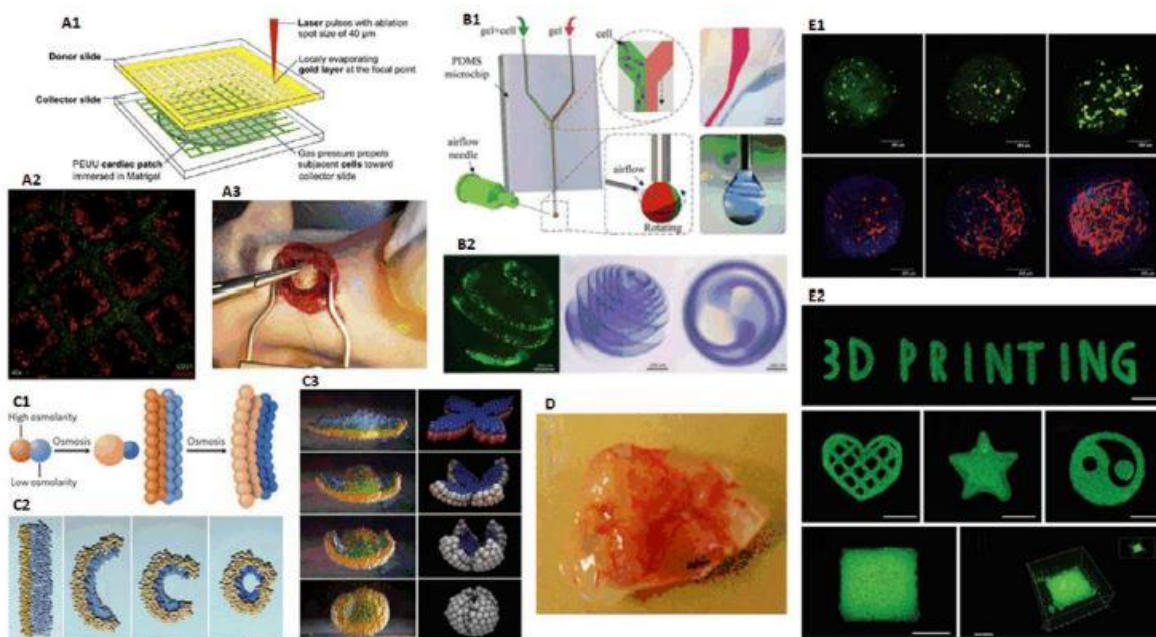
در 2012 با استفاده از بیوپرینتر جوهرافشان پیژوالکتریک Xu و همکارانش تیوب های زیگ زاگ فیبروبلاست داری را در محلول سدیم کلراید بدون استفاده از داربست ساهتند (شکل 13B). محلول کلسیم کلراید به عنوان اتصال عرضی کننده و ماده ساپورت و فراهم آوردن شناوری استفاده شد.

در 2015 Christensen با استفاده از همین دستگاه و جوهر زیستی حاوی سدیم آلژینات و فیبروبلاست های موش توانست عروق خونی همراه با شاخه های عمودی و افقی را بصورت موفقیت آمیزی پرینت کند (شکل 13C).

در 2010 Wu و Ringeisen از تکنولوژی BioLP استفاده کردند. با استفاده از HUVEC و HUVMC برای ساخت ساختارهای شاخه/ساقه اقدام کردند. این پژوهش اثر کشت مشترک ساختارها را روی رشد سلولی و عملکردی شدن آن ها بررسی میکند که از آن برای فهم احتمال

شکلگیری و رشد لومن و شبکه لومن توسط BioLP مشخص میشود. در Pirlo 2011 و همکارانش پایداری شاخه ها را با پرینت یک لایه دیگر HUVSMC روی لایه HUVEC افزایش داد.

در Xiong 2015 و همکارانش محلول آلزینات فیبروبلاست موش دار را به عنوان جوهرزیستی در بیوپرینت تیوب های فیبروبلاست صاف و Y شکل توسط روش MAPLE-DW (شکل 13D) استفاده کردند. 24 ساعت پس از پرینت فعالیت زیستی سلول ها در هر دو ساختار بالای 60% بود.



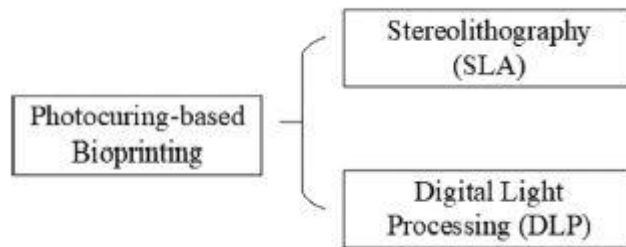
شکل 14. (A) نصب پیچ های عروقی ساخته شده توسط LIFT در موش ها، (B) ساخت میکرو کره های EHDJ با ساختارهای پیچیده، (C) شبکه های خود خم شونده جوهر شبیه سازی ساختار بافت عروق دار شده، (D) پرینت جوهرافشانی ساختار بافت عروق دار شده، (E) تولید الگوها و میکرو کره های سلول دار

4.3.5 تحقیقات دارویی/مدل سازی تومور

در Durmus 2013 و همکارانش متد مخصوصی برپایه قطره افشانی را توسعه دادند: شبکه های میمیک شده بافت از قطره هایی که توسط لیپیدهای دولایه جدا شده اند و میتوان آن ها را با غشای پروتئینی عملکردی میکنند که بصورت فوری میتواند خم شود و جریان های الکتریکی را در مسیر های از پیش مشخص کرده هدایت کند. قطرات خود خم شونده و واکنش دهنده با محرک در این راه میتوانند بیشتر همراه با میکروسیال ها برای گیر انداختن، ایزوله کردن و رهایش سلول ها بصورت محلی برای کاربردهای تشخیصی (سلول های در حرکت تومور برای تشخیص سرطان یا سلول های CD4 برای بررسی HIV) اعمال شوند (شکل 14C).

در Xie 2018 و همکارانش متدی را برای تولید میکرو کره ها در تعداد بالا بنا بر EHDJ پیشنهاد کرد که سه کاربرد کلی داشت:

- کپسوله سازی سلولی: BMSC ها توانایی پخش شدن در میکروکره ها را پس از طی کردن فرایند پرینت الکترو را حفظ کردند.
- رهایش کنترل شده دارو: میکرو کره ها حاوی دکستران و آلبومین سرمی گاوی (BSA) اثر رهایش کنترل شده خوبی را نشان دادند.
- بیوپرینت سه بعدی: با استفاده از میکروکره (ریزکره) های حاوی سلول به عنوان واحد های تشکیل دهنده، ساختارهای سه بعدی را میتوان بصورت مستقیم با کنترل کردن حرکت نازل پرینت کرد (شکل 14E).



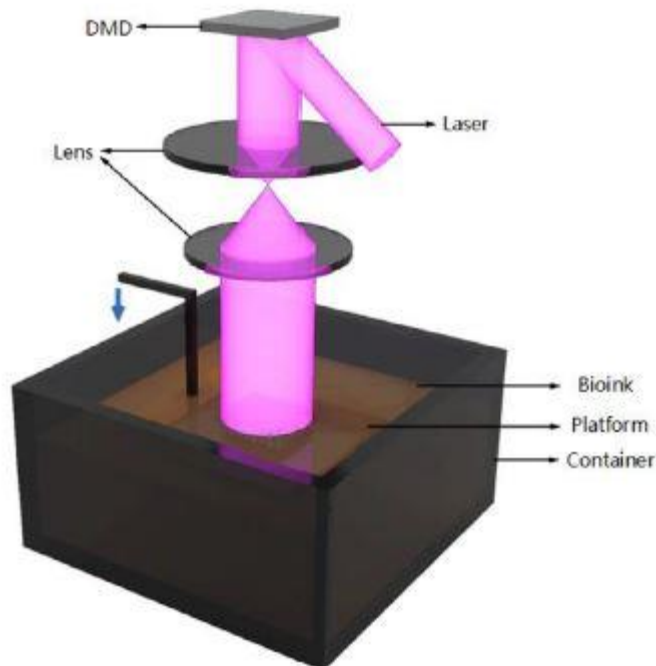
شکل 15. دسته بندی بیوپرینت برپایه فتوکور

5. بیوپرینت برپایه فتوکور

روشی است که بصورت مستقیم از خواص فتوپلیمریزاسیون پلیمرهای حساس به نور تحت تابش های ویژه استفاده میکند. در مقایسه با دیگر روش های بیوپرینت کردن معمولاً رزولوشن بالاتر و سرعت پرینت بیشتری دارد. همچنین مزیت های دیگری نیز دارد مثل نبود اثر تنش های برشی بر فعالیت زیستی سلول.

5.1 اصول

رایج ترین کاربرد این متد تولید داربست های بدون سلول است که پس از پرینت رویشان سلول کاشته شود. گرچه که امروزه بیوپرینت برپایه فتوکور سلول دار نیز گزارش شده است. بنابر مدل های مختلف اسکن نوری، بیوپرینت فتوکور را میتوان در دسته های استریولیتوگرافی (SLA) و پردازش نوری دیجیتال (DLP) تقسیم بندی کرد (شکل 15).



شکل 16. اساس بیوپرینت برپایه DLP

5.1.1 استریولیتروگرافی

SLA اولین تکنولوژی تجاری شده پرنیت سه بعدی است. Charles W. Hull در 1984 با اسکن ماده ای حساس به نور توسط نور فرابنفش ساختارهایی سه بعدی را ایجاد کرد. در بخش بیوپرنیت کردن SLA معمولاً برای پرنیت دقیق داربست های بافتی با هندسه قابل کنترل و ساختاری متخلخل، به خاطر رزولوشن بالای آن، بکار گرفته میشود. در 2004 تیم Boland از دانشگاه Clemson پرنیت SLA همراه با سلول را با پرنیت SLA تجاری بکار برد. بعد از آن گروه های تحقیقاتی بیشتر توانستند این تکنولوژی را بهینه سازی کنند و سبب دستاوردهای بیشتری در این زمینه شد. در حال حاضر از این تکنولوژی بیشتر برای ساخت داربست ها استفاده میشود تا پرنیت همراه با سلول.

برای یک بیوپرنیت استاندارد SLA جوهر زیستی در یک مخزن قرار میگیرد و یک پلتفرم که بالا و پایین میرود، در هنگام پرنیت لایه اولیه پلتفرم به سطح محلول جوهرزیستی بالا می آید و مایع در معرض لیزر UV جامد میشود. در تئوری انرژی لیزر است که سبب تشکیل پیوندهای کووالانسی بین زنجیره های پلیمری نزدیک به هم در محلول جوهرزیستی میشود. برای هر لایه اسکن لیزری الگویی دوبعدی دارد. به جای تمرکز مستقیم بر محلول جوهرزیستی، لیزر از یک آینه بازتاب میشود تا با حرکت در راستای X و Y به نقطه دلخواه برسد. با غوطه ور سازی پلتفرم در مایع و حرکت بالا/پایین آن به اندازه ی ارتفاع لایه، محلول جدید پخته شده جوهرزیستی بصورت مناسبی به لایه قبلی میچسبد. این فرایند تا زمانی که ساختار نهایی سه بعدی کامل شود ادامه می یابد. در بیشتر اوقات اضافه جوهرزیستی باید تمییز شده و فتوکور پس از پرنیت نیز مورد نیاز است. عواملی همانند قدرت لیزر، سرعت اسکن، زمان اکسپوزر (در معرض نور نور لیزر قرار گرفتن)، اندازه نقطه لیزر، طول موج لیزر و ... بر دقت SLA تاثیرگذارند.

5.1.2 پردازش نور دیجیتال (DLP)

DLP در ابتدا یک لایه کامل را به جای نقطه به نقطه جامد می سازد. شکل 16 یک بیوپرنیت DLP پایین به بالا معمولی را نشان میدهد که به این معناست که ابتدا لایه پایینی پرنیت شده و هر لایه جدید روی لایه زیرین قرار میگیرد. از سه جزء تشکیل شده است:

- یک مخزن شامل جوهرزیستی همانند هیدروژل فتوکور (حساس به نور) شدنی یا رزین حساس به نور که در معرض نور لیزر با طول موجی مشخص (معمولاً UV) جامد میشود، آغازگر نوری، سلول ها و ...
- پلتفرم قابل حرکت به بالا و پایین که بتواند تا ارتفاعی مشخص بالا یا پایین رود (به ضخامت یک لایه) وقتی که یک لایه در معرض نور بودنش تمام میشود و میتوان روی آن پرنیت لایه های بعدی را انجام داد.
- یک سیستم تصویر برداری بالای مخزن



شکل 17. بیوپرینتر DLP مدل EFL-BP8600

دلیل فتوکور کردن یک لایه کامل در حین فرایند پرینت استفاده از یک ماسک دینامیک است. بطور ساده ماسک الگوی طراحی دارد که نور عبور کرده و الگوی طراحی را به لایه گیرنده انتقال می‌دهد. نرم افزار لایه بندی برای برش دادن طرح دیجیتال سه بعدی به ضخامت های مشخص استفاده میشود. هر لایه به یک فایل bitmap تبدیل شده و در نهایت بصورت ورودی نقاب دینامیک وارد میشود. بنا بر نمودار نمایش داده شده در نقاب دینامیک هر لایه در معرض قرار میگیرد تا سطح جوهرزیستی جامدسازی شود. از نمایشگر کریستال مایع (LCD)، مدولاتور نور فضایی (SLM)، دستگاه میکروآئینه دیجیتال (DMD) و ... به عنوان نقاب دینامیک در پرینت DLP استفاده شده است. در 1997 از LCD برای این منظور استفاده شد اما نقایصی همچون سرعت تبادل پایین (حدود 20ms)، اندازه پیکسل بزرگ (رزولوشن پایین)، نرخ پرشدگی پایین، چگالی اپتیکال پایین عضو انکساری (off mode) و جذب نور بالا (on mode) داشت. این نقایص بر عملکرد و رزولوشن محصول تاثیر منفی میگذاشتند. DMD عملکرد و رزولوشن بهتری به عنوان نقاب دینامیک عرضه میکند. ضریب پرکردن نوری DMD در مقایسه با LCD 85٪ به 64٪ است و در انتقال نوری 71٪ به 21٪ است. پس واضح است که در مقایسه با بیوپرینت برپایه اکستروژن و جوهرافشانی (یا SLA)، DLP در سرعت پرینت برتری دارد. زیرا هرچقدر هم ساختار پیچیده باشد زمان پرینت هر لایه افزایش نخواهد یافت. همچنین به خاطر تولید ساختارهای سه بعدی به شیوه ای روان تر، محصول نهایی از نظر ساختاری یکپارچگی و خواص مکانیکی بهتری دارد.

5.2. بیوپرینترها

بیشتر پرینترهای برپایه فتوکور تجاری (SLA یا DLP) را میتوان با استفاده از ترکیب رزین های زیست سازگار برای جوهرزیستی به بیوپرینترها تبدیل کرد و این کار در بیشتر پژوهش های جهانی نیز انجام میشود. تیم پژوهشی پروفیسور Shaochen Chen از دانشگاه سن دیگو کالیفرنیا از سیستم استریولیتروگرافی انعکاسی نوری دینامیک (DOPSL) در تحقیقاتشان استفاده کرده اند و به خاطر دامنه وسیع کاربرد این سیستم حین کار با تکنولوژی DLP بهتر است به عنوان یک گزینه مناسب در نظر گرفته شود.

5.3 کاربردها

5.3.1 غضروف

در Zhu 2018 و همکارانش تکنولوژی جدیدی را برای ساخت بافت غضروف سلول دار بر پایه استریولیتوگرافی گزارش کرد. این محققان از جوهرزیستی شامل MSCها (که میتواند بصورت کندروسیت باشد)، PEGDA-GeIMA (که رزولوشن و خواص مکانیکی را به طرز قابل توجهی بهبود میبخشید)، آغازگر نوری و نانوکره های تعبیه شده فاکتور بتا 1 رشد ($TGF-\beta 1$) همراه با تکنیک الکترو-اسپری هسته-پوسته ای استفاده کردند. آزمایشات نشان داد که سلول ها و ریزکره ها بصورت متقارنی در ساختارهای بیوپرینت شده غضروفی توزیع شده بودند و معماری ساختارها نیز مناسب بود. همچنین $TGF-\beta 1$ تعبیه شده در نانوکره ها نیز تا 21 روز رهایش خود را حفظ کرد و باعث رشد غضروفی MSC ها شد. این پژوهش استراتژی مناسبی را برای بازسازی غضروفی با اعمال بیوپرینت برپایه فتوکور پیشنهاد داد.

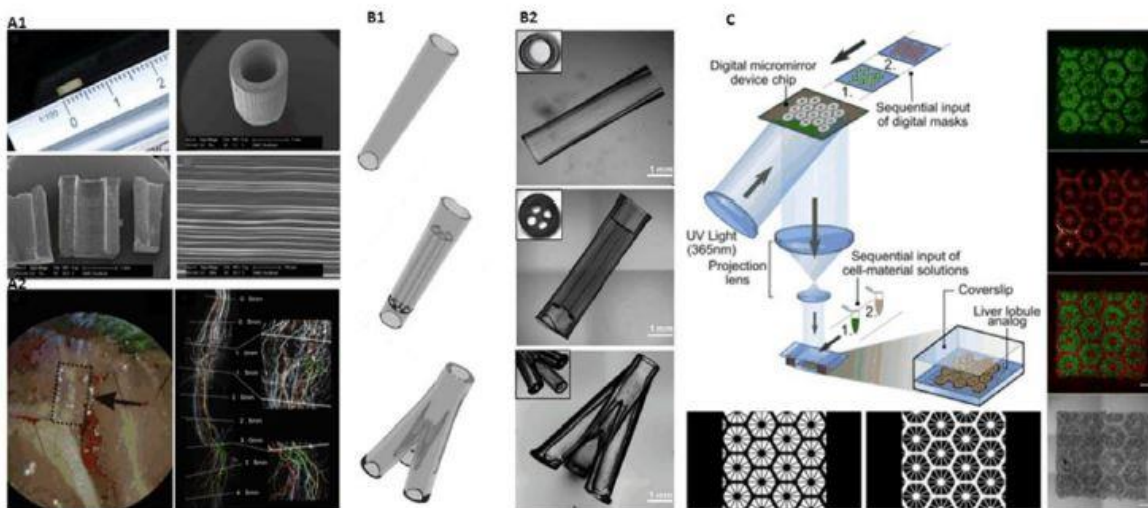
5.3.2 عصب

در Pateman 2015 و همکارانش دستگاهی برپایه μSLA را با رزولوشن 50mm برای ساخت مجراهای هدایت کننده عصب (NGCها) طراحی کردند که برای ترمیم عصب محیطی قابل استفاده بود. این محققان از رزین PEG برای تولید NGCها با ابعاد 1mm قطر داخلی، طول 5mm و ضخامت دیواره 250mm استفاده کردند. آزمایشات *in vivo* بر روی موش ها انجام گرفت تا کارایی آن محک زده شود (شکل 18A). با اینکه PEG برای اتصالات سلولی بطور عادی مفید نبود اما مشاهده شد که شکل قابل فتوکور PEG در اینجا برای رشد عصبی و رشد آزمایشی *in vitro* مناسب بود.

در سال Zhu 2018 و همکارانش پلتفرم پرینت سه بعدی پیوسته سریعی را برپایه تکنولوژی فتوکور بکار گرفتند تا NGC بسازند (شکل 18B). نصب *in vivo* این NGCها با میکروکانال ها به درون عصب سیاتیک موش ها هدایت جهتی موثری را برای عصب های سیاتیک در حال بازسازی نشان داد چراکه عصب ها به سمت میکروکانال ها شاخه میزدند و به سر دیستال ناحیه جراحات حرکت میکردند. بررسی رنگ زدگی (staining) هیستولوژیک و immuno-staining بازسازی جهت دار عصب و رفتار شاخه زنی طولی را تایید کرد.

5.3.3 نخاع

در Koffler 2019 و همکارانش از متد پرینت انعکاسی پیوسته مقیاس میکرو (μCPP) برای تولید ایمپلنت های پیچیده سیستم اعصاب مرکزی (CNS) استفاده کردند تا رشد عصب و ترمیم اتصالات عصبی نخاعی را در نواحی آسیب دیده بهبود بخشند. ساختارهای بیوپرینت شده در ناحیه جراحات شدید نخاع موش ها نصب شدند. پس از چندین ماه بازسازی کامل بافت نخاعی مشاهده شد و عملکرد حرکتی اندام های عقبی موش پیشرفت قابل توجهی داشت. آکسون ها پراکنده رشد میکنند و در هر جهتی بازسازی میشوند. پس محققان داربست های سه بعدی مخصوصی که شامل تعداد زیادی حفرات 200 میکرونی بود پرینت کردند که آکسون های بازسازی شده را به سمت سر انتهایی جراحات نخاعی هم جهت کردند که باعث مستقیم شدن رشد سلول های بنیادی عصبی و آکسون ها به حالتی خطی-موازی شد. این متد رزولوشن پرینت $1\mu m$ را داشت و برای پرینت داربستی 2mm تنها 1.6 ثانیه زمان لازم بود که در مقایسه با روش های بیوپرینت دیگر هزاران برابر سریع تر است. داربست ها از هیدروژل PEGDA-GeIMA ساخته شدند که استحکام مکانیکی قابل توجهی دارد و احتمال اینکه در آزمایشات حیوانی به کانال ها و هسته جامد آسیب وارد نشود به حداقل رسید. برای زیست سازگاری لایه های سلولی فعال و بافت های گرانولی اطراف داربست PEGDA-GeIMA تشکیل شدند که به میزان قابل توجهی ضعیف شدند. همچنین واکنش آستریوسیت در ناحیه جراحات نیز قابل بازسازی بود تا آستریوسیت های میزبان با محور رشد فاسیکل های آکسونی میزبان هم جهت شوند. این روش عکس العمل التهابی نصب داربست ها را حل کرد. این متد برای جراحات نخاعی در مقیاس انسانی نیز قابل استفاده است و روشی دقیق را برای بازسازی سیستم اعصاب مرکزی فراهم میکند.



شکل 18. (A) NGC ها ساخته شده توسط μ SLA و آزمایشات روی موش ها، (B) NGC های ساخته شده توسط DLP، (C) ساختار کبد برپایه هیدروژل

5.3.4 عروق خونی/عروق سازی

در 2017 Zhu و همکارانش از متد بیوپرینت سرعتی به نام بیوپرینت نوری پیوسته مقیاس میکرو (μ COB) برای ایجاد بافت های از پیش عروق سازی شده استفاده کردند. انواع متفاوتی از سلول ها که ترکیب طبیعی سلول های عروقی را میمیک (کپی) میکردند بصورت مستقیم درون هیدروژن هایی با توزیع کنترل شده ای کپسوله شدند و بدون اینکه نیازی برای مواد قربانی یا پرفیوژن باشد این کار انجام شد. آزمایشات *in vitro* نشان دادند که سلول های اندوتلیال بصورت آنی ساختارهای مشابه لومن را تشکیل دادند. نصب *in vivo* شکل گیری رشدی شبکه اندوتلیال را در بافت از قبل عروق سازی شده نشان داد. در حالیکه شبکه اندوتلیال بیوپرینت شده با عروق خونی فعال شامل گلبول های قرمز خونی با جریان خونی میزبان حالت پیوند آناستوموز (Anastomosis) داشت. همانگونه که در قبل به آن اشاره کردیم تنها با حل مشکل عروق سازی در بافت ها میتوان به پرینت بافت ها و ارگان ها دست یافت.

5.3.5 کاربردهای کلینیکی

در 2014 Gou دستگاه سم زدای (Detoxification Device) سه بعدی مشابه-کبدی را که توسط هیدروژل ها با نانوذرات فعال پلی دی استیلن ساخته شده بود به نمایش گذاشت. نانوذرات قادر به جذب، اسیر کردن و حس کردن سموم بودند که بعدها با تشکیل میکروساختارهای کبد توسعه یافت. این پژوهش توانست مفهوم سم زدایی به کمک ساختارهای نانوکامپوزیت پرینت سه بعدی شده در هیدروژل را ارائه کند و ممکن است در آینده به کاربردهای بیشتری در بخش کلینیکال منجر شود.

6. مقایسه بین روش های بیوپرینت کردن

بیوپرینت برپایه اکستروژن رایج ترین متد بیوپرینت در حال حاضر است. بیوپرینت های گرید صنعتی معمولاً گران تر هستند اما رزولوشن، سرعت، کنترل بر فضا و انعطاف پذیری بهتری در مواد دارند. برای بیوپرینت برپایه اکستروژن محققان معمولاً از خواصی همانند اتصالات عرضی حساس به دما، باریک شدگی برشی و ... استفاده میکنند. به عنوان مثال برخی بیومتریال ها در دمای اتاق جاری میشوند اما در دمای حدود 0C جامد میشوند که بدان معناست میتوانند در دمای اتاق از نازل اکستروژن شوند و در دماهای پایین به شکل ساختارهای دلخواه جامد شوند. خاصیت باریک شدگی برشی سیال غیرنیوتونی نیز بدان معناست که با افزایش تنش برشی ویسکوزیته کاهش پیدا میکند و اکستروژن بیومتریال راحت و روان خواهد بود. بهترین مزیت تکنولوژی اکستروژنی قابلیت پرینت (printability) محدوده وسیعی از مواد زیست سازگار (همانند توده های سلولی، هیدروژل های حاوی سلول، میکرو حامل ها، اجزای ماتریس بدون سلول شده و ...) با خواص سیالاتی متفاوتی را دارند. موادی با ویسکوزیته بین 30 تا 10^7 mPa/s با بیوپرینترهای اکستروژنی سازگار هستند. هرچه مواد ویسکوزیته بیشتری داشته باشد ساپورت ساختاری برای ساختار پرینت شده فراهم میشود و هرچه ماده ویسکوزیته کمتری داشته باشد محیط مناسب تری برای فعالیت زیستی و عملکرد سلول ایجاد میشود. محدوده وسیعی از ویسکوزیته ها در تکنولوژی اکستروژنی وجود دارد و بدین معناست که این متد بیوپرینت کردن میتواند از جوهر زیستی های با چگالی سلولی بالا استفاده کند. رسیدن به چگالی سلولی فیزیولوژیکی در بافت های مصنوعی هدف بزرگی برای بیوپرینت کردن بوده است. علاوه بر آن راه اندازی و ستاپ بیوپرینترهای برپایه اکستروژن بسیار ساده است. نقشه های تجاری یا پرینترهای سه بعدی دستکاپ به راحتی میتوانند تبدیل به بیوپرینترهای برپایه اکستروژن شوند و قیمت آن به نسبت کمتر است.

اما این متد نکات منفی ای هم دارد. دقت این تکنولوژی بصورت کلی تا $100 \mu\text{m}$ محدود شده است که به نسبت دیگر روش های بیولوژیکی کمتر است. انتخاب جوهر زیستی نیز باید برخی شرایط خاص را داشته باشد مثلاً باید ژله ای باشد، حساس به گرما باشد و خواص باریک شدگی برشی داشته باشد. همچنین به خاطر نیروی برشی غیرقابل اجتناب حین فرایند اکستروژن که بر نرخ زنده ماندن سلول ها تأثیر میگذارد فعالیت زیستی سلولی این پرینت برپایه اکستروژن پایین تر از جوهرافشانی است و وقتی تراکم سلولی بالا باشد این موضوع بسیار مهم است. با توجه به فشار و قطر سوزن نازل فعالیت سلولی بیوپرینت اکستروژنی بین 40٪ تا 86٪ بود.

در حال حاضر رایج ترین بیوپرینت برپایه قطره افشانی، بیوپرینت جوهرافشان DOD و بیوپرینت به کمک لیزر بوده است. از آنجاییکه پرینترهای جوهرافشانی تجاری قیمت مناسبی دارند و به سادگی قابل تبدیل به دستگاه های بیوپرینت هستند، بیوپرینت جوهرافشان کم هزینه ترین تکنولوژی بیوپرینت کردن است. اما با قیمت کمتر، دقت و سرعت بالا و سازگاری با بسیاری از مواد را انتظار داشته باشید. بیوپرینترهای جوهرافشان را میتوان بصورت چندنازله نیز بکار برد تا به نیاز پرینت سلول های مختلف، مواد بیولوژیکی یا فاکتورهای رشد بصورت همزمان پاسخ داده شود. این مهم باعث افزایش سرعت پرینت میشود و در عملکرد ساختار نهایی تأثیر مثبتی دارد.

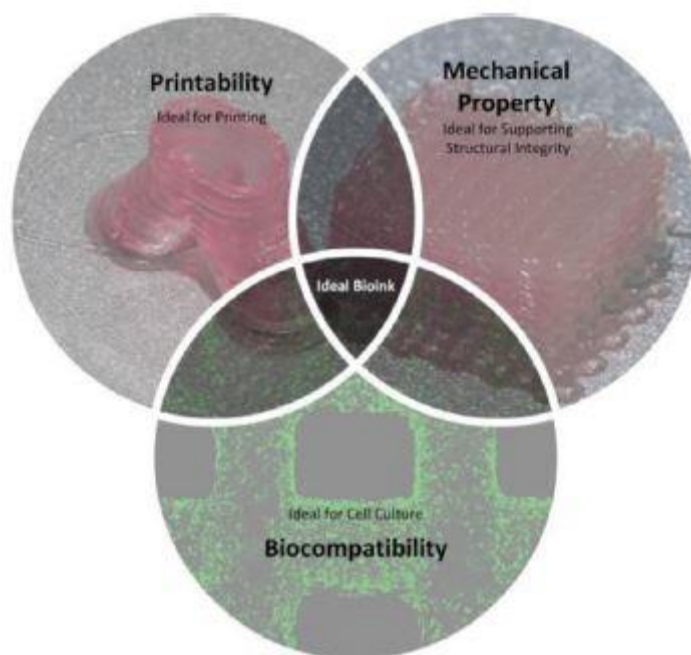
محدودیت ویسکوزیته جوهر زیستی در بیوپرینت جوهرافشانی محدوده بیومتریال های مناسب را کوچک میکند. به خاطر فشار رانشی کم بیوپرینت جوهرافشانی قادر به پرینت مواد با ویسکوزیته بالا یا سلول هایی با غلظت بالا نیست. مواد با ویسکوزیته پایین نیز استحکام ساختاری را کاهش میدهند و باعث نتایج نامطلوب در کشت *in vitro* و عملیات نصب میشود. در حال حاضر بدست آوردن تراکم بالای سلولی فیزیولوژیکی با بیوپرینت جوهرافشانی سخت است. برای جلوگیری از بسته شدن گرفتگی نازل و کاهش تنش برشی، این تکنولوژی را با غلظت سلولی کم بکار میبرند (کمتر از 10 million cells/ml) تا شکلگیری قطرات آسان تر شود. همچنین احتمال وارد شدن آسیب مکانیکی یا حرارتی به سلول ها حین فرایند جوهرافشانی وجود دارد. این نقایص کاربردهای وسیع تکنولوژی جوهرافشانی را محدود میکنند.

بیوپرینت به کمک لیزر نیز مزیت هایی نسبت به دیگر متدها دارد. به خاطر حالت پرینت بدون نازلش مشخص گرفتگی نازل ها در دو متد قبلی اینجا وجود ندارد. همچنین از تماس مستقیم جوهر زیستی و دستگاه اجتناب میشود و این تولید بدون تماس باعث تولید بدون رسیدن آسیب به سلول ها میشود. بیومتریال ها با ویسکوزیته بالاتر ($1-300 \text{ mPa/s}$) را با این متد میتوان بیوپرینت کرد که محدوده بزرگتری نسبت به متد

جوهرافشانی دارد. تحت اثر لیزر با نرخ تکرار پالس تا 5000Hz این دستگاه تا تراکم سلولی (احتمالا غلط تایپی وجود دارد) 108/ml و سرعت 1600 mm/s و دقت اینکه هر قطره تنها شامل یک سلول باشد را میتواند پرینت کند.

با همه این برتری ها این متد نقاط ضعف بزرگی نیز دارد. اول اینکه قیمت این مدل بیوپرینترها نسبتا بالاست و در بخش تجاری تعداد این دستگاه ها محدود است. مواد هیدروژلی مناسب برای بیوپرینت به کمک لیزر فراوان نیست. دوم همانگونه که در اصول LIFT توضیح داده شد، اینکه جوهرزیستی را روی لایه جاذب لیزر در ساختار نوار مانند روکش کنیم بسیار زمان بر است و این کار مخصوصا در هنگام پرینت چندین نوع سلول/متریال بسیار دشوار خواهد بود. همچنین اگر دستگاه پرینت حاوی لایه جاذب لیزر فلزی باشد احتمال اینکه پسماندهای فلزی بر اثر تبخیر لایه روی ساختار بیوپرینت شده نهایی ایجاد شود وجود دارد.

هیدروژل هایی با استحکام مکانیکی پایین و ظریف بودن سول ها در بیوپرینت کردن حاوی سلول باید لحاظ شود. معمولا در روش اکستروژن فیلامنت هایی با قطرهایی بیش از 100μm تولید میکند که سبب صحت (accuracy) کمتر ساختارهای سه بعدی و تکرارپذیری نامطمئن میشود. در مقایسه با آن روشی برپایه انعکاس سطحی است که رزولوشن بالاتری دارد. جوهرزیستی مایع پخته نشده میتواند ساپورتی مناسب را برای ساختارهای پرینت شده فراهم کند و از دفرمه شدن و شکست هیدروژل حین فرایند پرینت جلوگیری کند. همچنین هیچگونه اغتشاشی از گرفتگی نازل و تنش برشی که بر فعالیت زیستی سلول ها تاثیر بگذارد وجود ندارد. به نظر ما بیوپرینت برپایه فتوکور نقشی مهم را در بیوپرینت حاوی سلول بازی خواهد کرد و در آینده جایگزین روش بیوپرینت برپایه اکستروژن خواهد شد.



شکل 19. ارزیابی عملکرد جوهرهای زیستی

7. جوهرزیستی

توسعه جوهرزیستی های مناسب همیشه یکی از مهمترین جنبه های بیوپرینت سه بعدی بوده است. خواص گسترده بافت های مختلف بین مواد خارج سلولی و در کمپارتمان های سلولی وجود دارد. همچنین ساختارهای آنیزوتروپ داخل هر بافت سبب میشوند که ساخت یک جوهرزیستی جامع برای استفاده کلی دست نیافتنی باشد. همچنین دانش کلی ما از بافت ها و ارگان ها همچنان بسیار محدود است. پس برای توسعه جوهرزیستی تحقیقات بیشتری مورد نیاز است.

عملکرد جوهرزیستی را با عوامل مشخصی می‌سنجند: قابلیت پرینت‌شدگی، زیست‌سازگاری و خواص مکانیکی. قابلیت پرینت‌شدگی سنجشی برای شکل‌پذیری جوهرزیستی در جایی است که ویسکوزیته ماده قابل تنظیم، تبدیل سریع از حالت سل به ژل و تعداد زیادی از پارامترهای پرینت مورد نیاز است. زیست‌سازگاری سنجش توانایی تقلید زیستی (biomimic) است و نیازمند این است که جوهر زیستی تا حد امکان مشابه ریزمحیط سلول‌های پرینت‌شده در بدن و جایی باشد که سلول‌ها رشد، تکثیر، حرکت و در نهایت با یکدیگر ارتباط برقرار میکنند. خواص مکانیکی نیازمند جوهرزیستی ژل مانند است تا به قدری محکم باشد تا بتواند کشت مورد نظر و فرایند نصب را ساپورت کند. ساختارهای بیوپرینت شده معمولاً باید بصورت *in vitro* کشت شوند و پرفیوژن مواد مغذی و تخریب ممکن است اتفاق بیافتند و نیازمند استحکام بالایی برای ساپورت باشد. خواص مکانیکی ناکافی ممکن است سبب شکست ایمپلنت شوند.

بدین خاطر انتخاب جوهرزیستی متشکل از قابلیت پرینت‌شدگی، زیست‌سازگاری و خواص مکانیکی (شکل 19) است. طراحی منطقی جوهرزیستی با در نظر گرفتن فرایند پرینت، رشد سلول و تکثیر و ملزومات یکپارچگی ساختاری امکان‌پذیر است و بنا بر نوع سلول‌ها و رزولوشن پرینت قابل تنظیم است. گرچه این الزامات جوهرهای زیستی در مکانیزم با هم تضاد ایجاد میکنند. به عنوان مثال با ویسکوزیته بیشتر قابلیت پرینت‌شدگی بهتری داریم اما زیست‌سازگاری پایین‌تری داریم. پس در بیوپرینت مرحله‌ای حیاتی انتخاب جوهرزیستی مناسب نیازهای خاص هدف است.

ECM اساساً از سه دسته مواد تشکیل شده است: پروتئین‌های ساختاری (کلاژن، الاستین و ...)، پروتئین‌های خاص (مثل فیبرین) و پروتئوگلیکن‌ها. یک جوهرزیستی مناسب باید به ECM نزدیک شود و برای تطبیق‌پذیری برای انواع سلول‌ها تنظیم شود. در اصل برای اضافه کردن موادی که سلول‌ها برای رشدشان در بدن نیاز دارند باید این کار انجام شود. به عنوان مثال در هنگام بیوپرینت کندروسیت‌ها اضافه کردن هیدروکسی‌آپاتیت، که جزء اصلی غضروف است، میتواند فرایند کشت و عملکردی ساختن در آینده را آسان‌تر کند.

جوهرهای زیستی معمول بکار رفته در بیوپرینت شامل هیدروژل‌ها، اجزای ماتریس سلول‌زدا شده، میکرو حامل‌ها، کره‌ها و نوارهای بافتی، گلوله‌های سلولی و برخی جوهرهای زیستی پیشرفته شامل چندین ماده، شبکه‌های درهم تنیده، نانوکامپوزیت‌ها و ... میشوند. هیدروژل‌ها به خاطر ظرفیت خارق‌العاده‌شان برای ایجاد ریزمحیطی برای چسبندگی سلولی، رشد و تکثیر سلول‌ها جزء بیومتریال‌های مناسب برای جوهرهای زیستی به شمار می‌روند. هیدروژل‌های طبیعی/مصنوعی شامل آلژینات، فیبرینوژن، ژلاتین، کلاژن، فیبروین ابریشم، چیتوسان (کیتوسان)، آگارز، پلورونیک، هیدروکسی‌آپاتیت، PEO، PEG، GeIMA و ... هستند که کاربردهای بیشماری در بیوپرینت کردن دارند. این‌ها یا حساسیت یونی دارند، یا حساسیت نوری دارند، یا حساسیت حرارتی دارند، یا حساسیت آنزیمی دارند و یا حساسیت به pH دارند که به راحتی بتوان آن‌ها را قبل، حین و بعد بیوپرینت کردن به صورت ژل درآورد تا ساختارهای دلخواه ساخته شوند.

آلژینات در حال حاضر رایج‌ترین جوهرزیستی است که شکل‌پذیری مناسب و خواص مکانیکی با اتصالات عرضی یونی ساده دارد. بزرگترین نقطه ضعف آلژینات این است که ساختار شیمیایی آن برای چسبندگی سلولی مناسب نیست که باعث زیست‌سازگاری پایین میشود. بدین خاطر ترکیبی از پلیمرهای طبیعی همانند ژلاتین، GeIMA، کلاژن، فیبرینوژن و ... با آلژینات متدی بسیار معروف است. جوهرزیستی برپایه کلاژن زیست‌سازگاری بیشتری دارد اما سرعت شکلگیری آن پایین است و خواص مکانیکی ضعیفی دارد و بدین خاطر نیازمند ترکیب با دیگر مواد است. بین این مواد GeIMA توجه زیادی را در سال‌های اخیر به خود جلب کرده است زیرا زیست‌سازگاری عالی و خواص مکانیکی خوبی دارد.

HA که به نام هیالورونان نیز معروف است را میتوان برای ساخت جوهری زیستی با قابلیت پرینت‌شدی مناسب برای سلول‌ها در بیوپرینت ژلاتین بهینه‌سازی کرد. خصوصیات قابل تنظیم و خواص مکانیکی هیدروژل‌های برپایه HA آن‌ها را انتخابی مناسب میکنند. فیبرین یکی از هیدروژل‌های شکل‌گرفته توسط واکنش آنزیمی بین ترومبین و فیبرینوژن است که در زمینه ترمیم زخم‌ها و تولید گرفت‌های پوستی نیز اعمال میشود. کیتوسان که پلی‌ساکاریدی خطی است که از استیل‌زدایی کیتین بدست می‌آید و در بازسازی غضروف، دستگاه‌های هموستاتیک و آنتی‌باکتریال، ساخت داربست‌های اسفنجی، تولید پانسمان زخم و ... بکار می‌روند. همچنین برخی جوهرهای زیستی نقش ساپورت مواد یا جزء قربانی شونده دارند از قبیل: آگارز، پلورونیک یا ژلاتین. در کل پژوهش‌ها روی جوهرهای زیستی یا بیوپرینت سه بعدی به شدت پیشرفت داشته

است و ترکیبات جدید یا جوهرهای زیستی بهینه سازی شده که زیست سازگاری و خواص مکانیکی بهتری داشته باشند روز به روز معرفی میشوند.

8. چشم انداز و جمع بندی

تکنولوژی بیوپرینت کردن در سال های اخیر پیشرفت های چشمگیری داشته است اما همچنان محدودیت های خاصی مربوط به تکنیک های آن، منابع سلولی، انتخاب بیومتریال و ... همچنان وجود دارند و باید در پژوهش های بعدی برطرف شوند.

تکنولوژی های پرینت سه بعدی همچنان جای رشد دارند. بافت ها و ارگان ها ساختارهای منظمی دارند که هر کدام اندازه، سختی و سلول های خاص خود را دارند. مثلاً عروق خونی مقیاسی بین مویرگ های $20\mu\text{m}$ تا شریان های 2.5cm دارند که معمولاً شامل سه لایه ساختار سلولی حاوی انواع سلول ها (فیبروبلاست ها، سلول های عضله صاف و اندوتلیال برای هر لایه) با عملکردهای سلولی متفاوت هستند. پیچیدگی بافت ها و ارگان ها موجب سختی بیشتری در بیوپرینت دقیقشان میشود. از نقاط ضعف متدها و تکنولوژی های موجود دقت پایین شان در مقایسه با بافت ها و ارگان های طبیعی بدن است. یکی دیگر از نقاط ضعف تکنیک های بیوپرینت سرعت پایین پرینت ساختارهای پیچیده در مقیاس بزرگ تر است مخصوصاً تولید چند ماده ای مد نظر باشد. DLP مدتی برپایه انعکاس سطح است که رزولوشن و سرعت بالایی نسبت به دیگر روش های بیوپرینت دارد. همچنین مدل های بافت *in vitro* که کاربرد کلیدی بیوپرینت سه بعدی است باید نه تنها در اندازه بلکه در خواص مکانیکی و بیولوژیکی استانداردسازی شوند. DLP یکپارچگی و قابلیت تکرار عالی نسبت به دیگر متدها دارد. هرچند نمیتواند به تطبیق پذیری بیوپرینت برپایه اکستروژن است برسد اما DLP باز هم تکنولوژی امیدوارکننده ای در زمینه مدل سازی *in vitro* در آینده نزدیک است.

توسعه و کاربرد جوهرهای زیستی نقطه کلیدی بیوپرینت است. بعید است تنها یک جوهرزیستی بتواند جوابگوی تمامی شرایط های *in vivo* باشد پس بیوپرینت کردن به سمت چندماده ای بودن میرود. قابلیت پرینت شدگی، زیست سازگاری و خواص مکانیکی معیارهای سنجش جوهرهای زیستی است.

عروق سازی پایه و اساس ساختارهای زنده بیوپرینت شده است. همانند چالش در زمینه مهندسی بافت و پزشکی ترمیمی اینکه عروق های کافی در ساختارهای تولید شده وجود داشته باشند عامل کلیدی در بیوپرینت سه بعدی است. ساخت موثر شبکه های عروقی چندمقیاسه و بهبود خاصیت عروق سازی توسط تحریکات شیمیایی و مکانیکی پایه و اساس تولید بافت های زنده است. با اینکه روش های متعددی برای تولید شبکه های عروقی وجود دارد اما هر کدام محدودیت های خاص خود را دارند. متد جوهرافشانی و LAB رزولوشن پرینت بالایی دارند اما تولید شبکه های عروقی پیچیده در آن ها دشوار است. بیوپرینت برپایه اکستروژن روی یک لایه قربانی تیاژمند حالت دهی ثانویه است که فرایندی پیچیده به حساب می آید. به نظر ما بیوپرینت هم محوره امکان استفاده از کانال های سیال چند مقیاسه را میدهد و همچنین ظرفیت کشت تزریقی را دارد که راهی خوب برای حل مشکل عروق سازی در بافت ها است.

بدست آوردن قابلیت عملکردی شدن (functionalization) هدف نهایی در بیوپرینت سه بعدی است. در حال حاضر بیشتر محققان بر روی پرینترها و مکانیزم آن ها تمرکز دارند. عملکرد سازی عامل هسته ای در رسیدن به کاربردهای اصلی است. جوهرزیستی برای رسیدن به این هدف باید زیست سازگاری و خواص مکانیکی خوبی داشته باشد تا به الزامات پرفیوژن مواد مغذی پاسخ دهد. همچنین ساخت ریزمحیط هایی که کپی سناریوهای *in vivo* هستند و محرک های شیمیایی و مکانیکی، همانند کشت پرفیوژن و فاکتورهای رشدی، در آن ها وجود دارد نیز برای عملکردسازی ساختارهای بیوپرینت شده حیاتی است.

علاوه بر چالش های مربوط به تکنیک های بیوپرینت کردن، جوهرهای زیستی، عروق سازی و عملکردسازی که به آن ها اشاره شده است مشکلات دیگری از قبیل منابع سلولی، ساخت بیوریکتور و برخی مشکلات اخلاقی (ethical) نیز وجود دارند که نیازمند توجه مشخص هستند. در کل تا پیوند کامل بافت های تولید شده همانند غضروف و یا پوست به بافت های آسیب دیده راه زیادی مانده است.

در این متن تکامل، پروسه، دسته بندی، بیوپرینترهای معمول، جوهرهای زیستی و تحقیق های مربوط به بیوپرینت سه بعدی، مزیت ها و نقاط ضعفشان بررسی شد. چالش های زیادی همچنان در این زمینه باقی مانده اند اما پیشرفت ها هایی خوبی در این زمینه در طی سال های اخیر ایجاد شده اند.

ساخت پوست، استخوان، غضروف، عروق و ... با استفاده از تکنولوژی های بیوپرینت سه بعدی ممکن است. انتظار میرود که بیوپرینت سه بعدی به رشد خود ادامه دهد و راه خود را به سوی تحقق کاربردهای احتمالی طی کند.

- [1] He Y ,Gao Q ,Liu A ,Sun M ,Fu J . 3D bioprinting: from structure to function. J Zhejiang Univ (Eng Sci) 2019;53(3):1–12 .
- [2] Dong H ,Fang Y ,Wang D ,Zhang H ,Lei L ,Luo Y . Current situation and thinking of organ donation at home and abroad. J Nurs 2017;24(11):23–6 .
- [3] Mironov V ,Boland T ,Trusk T ,Forgacs G ,Markwald RR . Organ printing: computer-aided jet-based 3D tissue engineering. Trends Biotechnol 2003;21(4):157–61 .
- [4] Boland T ,Mironov V ,Gutowska A ,Roth EA ,Markwald RR . Cell and organ printing 2: fusion of cell aggregates in three-dimensional gels. Anat Rec Part A 2003;272(2):497–502 .
- [5] Mironov V . Printing technology to produce living tissue. Exp Opin Biol Ther 2003;3(5):701–4 .
- [6] Klebe RJ . Cytoscribing: a method for micropositioning cells and the construction of two-and three-dimensional synthetic tissues. Exp Cell Res 1988;179(2):362–73 .
- [7] Foty RA ,Pfleger CM ,Forgacs G ,Steinberg MS . Surface tensions of embryonic tissues predict their mutual envelopment behavior. Development 1996;122(5):1611–20 .
- [8] Odde DJ ,Renn MJ . Laser-guided direct writing for applications in biotechnology. Trends Biotechnol 1999;17(10):385–9 .
- [9] Karzyński K ,Kosowska K ,Ambroziewicz F ,Berman A ,Cichoń J ,Klak M ,et al. Use of 3D bioprinting in biomedical engineering for clinical application. Med Stud 2018;34(1):93–7 .
- [10] Landers R ,Hubner U ,Schmelzeisen R ,Mulhaupt R . Rapid prototyping of scaffolds derived from thermoreversible hydrogels and tailored for applications in tissue engineering. Biomaterials 2002;23(23):4437–47 .
- [11] Wilson WC Jr ,Boland T . Cell and organ printing 1: protein and cell printers. Anat Rec Part A 2003;272(2):491–6 .
- [12] Dhariwala B ,Hunt E ,Boland T . Rapid prototyping of tissue-engineering constructs, using photopolymerizable hydrogels and stereolithography. Tissue Eng 2004;10(9–10):1316–22 .
- [13] Jayasinghe SN ,Qureshi AN ,Eagles PAM . Electrohydrodynamic jet processing: an advanced electric-field-driven jetting phenomenon for processing living cells. Small 2006;2(2):216–9 .
- [14] Norotte C ,Marga FS ,Niklason LE ,Forgacs G . Scaffold-free vascular tissue engineering using bioprinting. Biomaterials 2009;30(30):5910–7 .
- [15] Skardal A ,Mack D ,Kapetanovic E ,Atala A ,Jackson JD ,Yoo J ,et al. Bioprinted amniotic fluid-derived stem cells accelerate healing of large skin wounds. Stem Cell Transl Med 2012;1(11):792–802 .
- [16] Duan B . State-of-the-art review of 3D bioprinting for cardiovascular tissue engineering. Ann Biomed Eng 2017;45(1):195–209 .
- [17] Dababneh AB ,Ozbolat IT . Bioprinting technology: a current state-of-the-art review. J Manuf Sci Eng 2014; 136(6) .
- [18] Gao Q ,He Y ,Fu JZ ,Liu A ,Ma L . Coaxial nozzle-assisted 3D bioprinting with built-in microchannels for nutrients delivery. Biomaterials 2015;61:203–15 .
- [19] Pyo SH ,Wang P ,Hwang HH ,Zhu W ,Warner J ,Chen S . Continuous optical 3D printing of green aliphatic polyurethanes. ACS Appl Mater Interfaces 2017;9(1):836–44 .
- [20] Kang HW ,Lee SJ ,Ko IK ,Kengla C ,Yoo JJ ,Atala A . A 3D bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity. Nat Biotechnol 2016;34(3):312–9 .
- [21] Noor N ,Shapira A ,Edri R ,Gal I ,Wertheim L ,Dvir T . 3D printing of personalized thick and perfusable cardiac patches and hearts. Adv Sci 2019;6(11):1900344 .
- [22] Lee A ,Hudson A ,Shiwariski D ,Tashman J ,Hinton T ,Yerneni S ,et al. 3D bioprinting of collagen to rebuild components of the human heart. Science 2019;365(6452):482–7 .
- [23] Shao L ,Gao Q ,Zhao H ,Xie C ,Fu J ,Liu Z ,et al. Fiber-based mini tissue with morphology-controllable gelma microfibers. Small 2018;14(44):e1802187 .
- [24] Nie J ,Gao Q ,Wang Y ,Zeng J ,Zhao H ,Sun Y ,et al. Vessel-on-a-chip with hydrogel-based microfluidics. Small 2018;14(45):e1802368 .
- [25] Gao G ,Lee JH ,Jang J ,Lee DH ,Kong J-S ,Kim BS ,et al. Tissue engineered bio-blood-vessels constructed using a tissue-specific bioink and 3D coaxial cell printing technique: a novel therapy for ischemic disease. Adv Funct Mater 2017;27(33):1700798 .
- [26] Gaebel R ,Ma N ,Liu J ,Guan J ,Koch L ,Klopsch C ,et al. Patterning human stem cells and endothelial cells with laser printing for cardiac regeneration. Biomaterials 2011;32(35):9218–30 .
- [27] Ozbolat IT ,Hospodiuk M . Current advances and future perspectives in extrusion-based bioprinting. Biomaterials 2016;76:321–43 .

- [28] Colosi C ,Shin SR ,Manoharan V ,Massa S ,Costantini M ,Barbetta A ,et al. Microfluidic bioprinting of heterogeneous 3D tissue constructs using low-viscosity bioink. *Adv Mater* 2016;28(4):677–84 .
- [29] Trachtenberg JE ,Placone JK ,Smith BT ,Piard CM ,Santoro M ,Scott DW ,et al. Extrusion-based 3D printing of poly(propylene fumarate) in a full-factorial design. *ACS Biomater Sci Eng* 2016;2(10):1771–80 .
- [30] Faulkner-Jones A ,Fyfe C ,Cornelissen DJ ,Gardner J ,King J ,Courtney A ,et al. Bioprinting of human pluripotent stem cells and their directed differentiation into hepatocyte-like cells for the generation of mini-livers in 3D. *Biofabrication* 2015;7(4):044102 .
- [31] Visser J ,Peters B ,Burger TJ ,Boomstra J ,Dhert WJ ,Melchels FP ,et al. Biofabrication of multi-material anatomically shaped tissue constructs. *Biofabrication* 2013;5(3):035007 .
- [32] Ovsianikov A ,Yoo J ,Mironov V . 3D printing and biofabrication. Springer International Publishing; 2018 .
- [33] Chua CK ,Leong KF . 3D printing and additive manufacturing: Principles and applications: The 5th edition of rapid prototyping: Principles and applications. World Scientific Publishing Co.; 2017 .
- [34] Sheshadri P ,Shirwaiker RA . Characterization of material–process–structure interactions in the 3D bioplotting of polycaprolactone. *3D Print Addit Manuf* 2015;2(1):20–31 .
- [35] Chua CK ,Yeong WY . Bioprinting: principles and applications. World Scientific Publishing Company; 2014 .
- [36] Ozbolat IT ,Moncal KK ,Gudapati H . Evaluation of bioprinter technologies. *Addit Manuf* 2017;13:179–200 .
- [37] Lee W ,Debasitis JC ,Lee VK ,Lee JH ,Fischer K ,Edminster K ,et al. Multi-layered culture of human skin fibroblasts and keratinocytes through three-dimensional freeform fabrication. *Biomaterials* 2009;30(8):1587–95 .
- [38] Lee V ,Singh G ,Trasatti JP ,Bjornsson C ,Xu X ,Tran TN ,et al. Design and fabrication of human skin by three-dimensional bioprinting. *Tissue Eng Part C- Methods* 2014;20(6):473–84 .
- [39] Kim G ,Ahn S ,Yoon H ,Kim Y ,Chun W . A cryogenic direct-plotting system for fabrication of 3D collagen scaffolds for tissue engineering. *J Mater Chem* 2009;19(46):8817–23 .
- [40] Kim G ,Ahn S ,Kim Y ,Cho Y ,Chun W . Coaxial structured collagen–alginate scaffolds: fabrication, physical properties, and biomedical application for skin tissue regeneration. *J Mater Chem* 2011;21(17):6165–72 .
- [41] Leng L ,McAllister A ,Zhang B ,Radisic M ,Gunther A . Mosaic hydrogels: one-step formation of multiscale soft materials. *Adv Mater* 2012;24(27):3650–8 .
- [42] Leng L ,Amini-Nik S ,Ba Q ,Jeschke M ,Günther A . Skin printer: microfluidic approach for skin regeneration and wound dressing. In: *Proceedings of the 2013 international conference on miniaturized systems for chemistry and life sciences, MicroTAS*, 17; 2013. p. 1833–5 .
- [43] Hakimi N ,Cheng R ,Leng L ,Sotoudehfar M ,Ba PQ ,Bakhtyar N ,et al. Handheld skin printer: in situ formation of planar biomaterials and tissues. *Lab Chip* 2018;18(10):1440–51 .
- [44] Yao Q ,Wei B ,Guo Y ,Jin C ,Du X ,Yan C ,et al. Design, construction and mechanical testing of digital 3D anatomical data-based pcl-ha bone tissue engineering scaffold. *J Mater Sci Mater Med* 2015;26(1):5360 .
- [45] Pati F ,Song TH ,Rijal G ,Jang J ,Kim SW ,Cho DW . Ornamenting 3D printed scaffolds with cell-laid extracellular matrix for bone tissue regeneration. *Biomaterials* 2015;37:230–41 .
- [46] Daly AC ,Cunniffe GM ,Sathy BN ,Jeon O ,Alsberg E ,Kelly DJ . 3D bioprinting of developmentally inspired templates for whole bone organ engineering. *Adv Healthc Mater* 2016;5(18):2353–62 .
- [47] Kesti M ,Eberhardt C ,Pagliccia G ,Kenkel D ,Grande D ,Boss A ,et al. Bioprinting complex cartilaginous structures with clinically compliant biomaterials. *Adv Funct Mater* 2015;25(48):7406–17 .
- [48] Kundu J ,Shim JH ,Jang J ,Kim SW ,Cho DW . An additive manufacturing-based pcl-alginate-chondrocyte bioprinted scaffold for cartilage tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med* 2015;9(11):1286–97 .
- [49] Lee JS ,Hong JM ,Jung JW ,Shim JH ,Oh JH ,Cho DW . 3D printing of composite tissue with complex shape applied to ear regeneration. *Biofabrication* 2014;6(2):024103 .
- [50] Owens CM ,Marga F ,Forgacs G ,Heesch CM . Biofabrication and testing of a fully cellular nerve graft. *Biofabrication* 2013;5(4):045007 .
- [51] Merceron TK ,Burt M ,Seol YJ ,Kang HW ,Lee SJ ,Yoo JJ ,et al. A 3D bioprinted complex structure for engineering the muscle-tendon unit. *Biofabrication* 2015;7(3):035003 .
- [52] Pati F ,Ha DH ,Jang J ,Han HH ,Rhie JW ,Cho DW . Biomimetic 3D tissue printing for soft tissue regeneration. *Biomaterials* 2015;62:164–75 .

- [53] Skardal A ,Zhang J ,Prestwich GD . Bioprinting vessel-like constructs using hyaluronan hydrogels crosslinked with tetrahedral polyethylene glycol tetracrylates. *Biomaterials* 2010;31(24):6173–81 .
- [54] Hinton TJ ,Jallerat Q ,Palchesko RN ,Park JH ,Grodzicki MS ,Shue HJ ,et al.Three-dimensional printing of complex biological structures by freeform reversible embedding of suspended hydrogels. *Sci Adv* 2015;1(9):e1500758 .
- [55] Billiet T ,Gevaert E ,De Schryver T ,Cornelissen M ,Dubruel P . The 3D printing of gelatin methacrylamide cell-laden tissue-engineered constructs with high cell viability. *Biomaterials* 2014;35(1):49–62 .
- [56] Lee JW ,Choi YJ ,Yong WJ ,Pati F ,Shim JH ,Kang KS ,et al.Development of a 3D cell printed construct considering angiogenesis for liver tissue engineering. *Biofabrication* 2016;8(1):015007 .
- [57] Horvath L ,Umehara Y ,Jud C ,Blank F ,Petri-Fink A ,Rothen-Rutishauser B . Engineering an *in vitro* air-blood barrier by 3D bioprinting. *Sci Rep* 2015;5:7974 .
- [58] Duan B ,Hockaday LA ,Kang KH ,Butcher JT . 3D bioprinting of heterogeneous aortic valve conduits with alginate/gelatin hydrogels. *J Biomed Mater Res A* 2013;101(5):1255–64 .
- [59] Chang R ,Nam J ,Sun W . Direct cell writing of 3D microorgan for *in vitro* pharmacokinetic model. *Tissue Eng Part C-Methods* 2008;14(2):157–66 .
- [60] Chang R ,Emami K ,Wu H ,Sun W . Biofabrication of a three-dimensional liver micro-organ as an *in vitro* drug metabolism model. *Biofabrication* 2010;2(4):045004 .
- [61] Snyder JE ,Hamid Q ,Wang C ,Chang R ,Emami K ,Wu H ,et al.Bioprinting cell-laden matrigel for radioprotection study of liver by pro-drug conversion in a dual-tissue microfluidic chip. *Biofabrication* 2011;3(3):034112 .
- [62] Levato R ,Visser J ,Planell JA ,Engel E ,Malda J ,Mateos-Timoneda MA . Biofabrication of tissue constructs by 3D bioprinting of cell-laden microcarriers. *Biofabrication* 2014;6(3):035020 .
- [63] Ying GL ,Jiang N ,Maharjan S ,Yin YX ,Chai RR ,Cao X ,et al.Aqueous two-phase emulsion bioink-enabled 3D bioprinting of porous hydrogels. *Adv Mater* 2018;30(50):e1805460 .
- [64] Gao Q ,Niu X ,Shao L ,Zhou L ,Lin Z ,Sun A ,et al.3D printing of complex gelma-based scaffolds with nanoclay. *Biofabrication* 2019;11(3):035006 .
- [65] Gao Q ,Liu Z ,Lin Z ,Qiu J ,Liu Y ,Liu A ,et al.3D bioprinting of vessel-like structures with multilevel fluidic channels. *ACS Biomater Sci Eng* 2017;3(3):399–408 .
- [66] Jia W ,Gungor-Ozkerim PS ,Zhang YS ,Yue K ,Zhu K ,Liu W ,et al.Direct 3D bioprinting of perfusable vascular constructs using a blend bioink. *Biomaterials* 2016;106:58–68 .
- [67] Akkineni AR ,Ahlfeld T ,Lode A ,Gelinsky M . A versatile method for combining different biopolymers in a core/shell fashion by 3D plotting to achieve mechanically robust constructs. *Biofabrication* 2016;8(4):045001 .
- [68] Zhang YS ,Arneri A ,Bersini S ,Shin SR ,Zhu K ,Goli-Malekabadi Z ,et al.Bioprinting 3D microfibrinous scaffolds for engineering endothelialized myocardium and heart-on-a-chip. *Biomaterials* 2016;110:45–59 .
- [69] Pi Q ,Maharjan S ,Yan X ,Liu X ,Singh B ,van Genderen AM ,et al.Digitally tunable microfluidic bioprinting of multilayered cannular tissues. *Adv Mater* 2018;30(43):e1706913 .
- [70] Tuan RS ,Boland G ,Tuli R . Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res Ther* 2003;5(1):32–45 .
- [71] Ozbolat IT . 3D bioprinting: fundamentals, principles and applications. Elsevier; 2016 .
- [72] Saunders RE ,Derby B . Inkjet printing biomaterials for tissue engineering: bioprinting. *Int Mater Rev* 2014;59(8):430–48 .
- [73] Cui XF ,Dean D ,Ruggeri ZM ,Boland T . Cell damage evaluation of thermal inkjet printed Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng* 2010;106(6):963–9 .
- [74] Murphy SV ,Atala A . 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat Biotechnol* 2014;32(8):773–85 .
- [75] Nishiyama Y ,Nakamura M ,Henmi C ,Yamaguchi K ,Mochizuki S ,Nakagawa H ,et al.Development of a three-dimensional bioprinter: construction of cell supporting structures using hydrogel and state-of-the-art inkjet technology. *J Biomech Eng* 2009;131(3):035001 .
- [76] Kamisuki S ,Hagata T ,Tezuka C ,Nose Y ,Fujii M ,Atobe M . A low power, small, electrostatically driven driven commercial inkjet head. In: *Proceedings of the eleventh annual international workshop on micro electro mechanical systems, MEMS 98, IEEE*; 1998 .
- [77] Reis N ,Ainsley C ,Derby B . Ink-jet delivery of particle suspensions by piezoelectric droplet ejectors. *J Appl Phys* 2005;97(9):094903 .
- [78] Seerden KAM ,Reis N ,Evans JRG ,Grant PS ,Halloran JW ,Derby B . Ink-jet printing of wax-based alumina suspensions. *J Am Ceram Soc* 2001;84(11):2514–20 .

- [79] Saunders RE ,Gough JE ,Derby B . Delivery of human fibroblast cells by piezoelectric drop-on-demand inkjet printing. *Biomaterials* 2008;29(2):193–203
- [80] Zhang LG ,Fisher JP ,Leong KW . 3D bioprinting and nanotechnology in tissue engineering and regenerative medicine. Academic Press; 2015 .
- [81] Onses MS ,Sutanto E ,Ferreira PM ,Alleyne AG ,Rogers JA . Mechanisms, capabilities, and applications of high-resolution electrohydrodynamic jet printing. *Small* 2015;11(34):4237–66 .
- [82] Gasperini L ,Maniglio D ,Motta A ,Migliaresi C . An electrohydrodynamic bioprinter for alginate hydrogels containing living cells. *Tissue Eng Part C-Methods* 2015;21(2):123–32 .
- [83] Poellmann MJ ,Barton KL ,Mishra S ,Johnson AJW . Patterned hydrogel substrates for cell culture with electrohydrodynamic jet printing. *Macromol Biosci* 2011;11(9):1164–8 .
- [84] Sutanto E ,Shigeta K ,Kim YK ,Graf PG ,Hoelzle DJ ,Barton KL ,et al.A multimaterial electrohydrodynamic jet (e-jet) printing system. *J Micromech Microeng* 2012;22(4) .
- [85] Hayati I ,Bailey AI ,Tadros TF . Mechanism of stable jet formation in electrohydrodynamic atomization. *Nature* 1986;319(6048):41–3 .
- [86] Workman VL ,Tezera LB ,Elkington PT ,Jayasinghe SN . Controlled generation of microspheres incorporating extracellular matrix fibrils for three-dimensional cell culture. *Adv Funct Mater* 2014;24(18):2648–57 .
- [87] Gasperini L ,Maniglio D ,Migliaresi C . Microencapsulation of cells in alginate through an electrohydrodynamic process. *J Bioact Compat Polym* 2013;28(5):413–25 .
- [88] Gudapati H ,Dey M ,Ozbolat I . A comprehensive review on droplet-based bioprinting: past, present and future. *Biomaterials* 2016;10220–42 .
- [89] Odde DJ ,Renn MJ . Laser-guided direct writing of living cells. *Biotechnol Bioeng* 2000;67(3):312–18 .
- [90] Nahmias Y ,Schwartz RE ,Verfaillie CM ,Odde DJ . Laser-guided direct writing for three-dimensional tissue engineering. *Biotechnol Bioeng* 2005;92(2):129–36 .
- [91] Breckenfeld E ,Kim H ,Auyeung RCY ,Pique A . Laser-induced forward transfer of ag nanopaste. *JOVE-J Vis Exp* 2016(109):e53728 .
- [92] Skardal A ,Atala A . Biomaterials for integration with 3-D bioprinting. *Ann Biomed Eng* 2015;43(3):730–46 .
- [93] Chrisey DB . Materials processing: the power of direct writing. *Science* 2000;289(5481):879–81 .
- [94] Colina M ,Serra P ,Fernandez-Pradas JM ,Sevilla L ,Morenza JL . DNA deposition through laser induced forward transfer. *Biosens Bioelectron* 2005;20(8):1638–42 .
- [95] Dinca V ,Kasotakis E ,Catherine J ,Mourka A ,Ranella A ,Ovsianikov A ,et al.Directed three-dimensional patterning of self-assembled peptide fibrils. *Nano Lett* 2008;8(2):538–43 .
- [96] Ringeisen BR ,Kim H ,Barron JA ,Krizman DB ,Chrisey DB ,Jackman S ,et al.Laser printing of pluripotent embryonal carcinoma cells. *Tissue Eng* 2004;10(3–4):483–91 .
- [97] Hopp B ,Smausz T ,Kresz N ,Barna N ,Bor Z ,Kolozsvari L ,et al.Survival and proliferative ability of various living cell types after laser-induced forward transfer. *Tissue Eng* 2005;11(11–12):1817–23 .
- [98] Barron JA ,Wu P ,Ladouceur HD ,Ringeisen BR . Biological laser printing: a novel technique for creating heterogeneous 3-dimensional cell patterns. *Biomed Microdevices* 2004;6(2):139–47 .
- [99] Wu PK ,Ringeisen BR ,Callahan J ,Brooks M ,Bubb DM ,Wu HD ,et al.The deposition, structure, pattern deposition, and activity of biomaterial thin-films by matrix-assisted pulsed-laser evaporation (maple) and maple direct write. *Thin Solid Films* 2001;398:607–14 .
- [100] Serra P ,Fernandez-Pradas JM ,Colina M ,Duocastella M ,Dominguez J ,Morenza JL . Laser-induced forward transfer: a direct-writing technique for biosensors preparation. *J Laser Micro/Nanoeng* 2006;1(3):236–42 .
- [101] Barron JA ,Ringeisen BR ,Kim HS ,Spargo BJ ,Chrisey DB . Application of laser printing to mammalian cells. *Thin Solid Films* 2004;453:383–7 .
- [102] Barron JA ,Krizman DB ,Ringeisen BR . Laser printing of single cells: statistical analysis, cell viability, and stress. *Ann Biomed Eng* 2005;33(2):121–30 .
- [103] Guillemot F ,Souquet A ,Catros S ,Guillotin B . Laser-assisted cell printing: principle, physical parameters *versus* cell fate and perspectives in tissue engineering. *Nanomedicine* 2010;5(3):507–15 .
- [104] Guillemot F ,Souquet A ,Catros S ,Guillotin B ,Lopez J ,Faucon M ,et al.High-throughput laser printing of cells and biomaterials for tissue engineering. *Acta Biomater* 2010;6(7):2494–500 .
- [105] Koch L ,Gruene M ,Unger C ,Chichkov B . Laser assisted cell printing. *Curr Pharm Biotechnol* 2013;14(1):91–7 .

- [106] Barron JA ,Spargo BJ ,Ringeisen BR . Biological laser printing of three dimensional cellular structures. *Appl Phys A-Mater* 2004;79(4–6):1027–30 .
- [107] Keriquel V ,Guillemot F ,Arnault I ,Guillotin B ,Miraux S ,Amedee J ,et al. *In vivo* bioprinting for computer- and robotic-assisted medical intervention: preliminary study in mice. *Biofabrication* 2010;2(1):014101 .
- [108] Choi WS ,Ha D ,Park S ,Kim T . Synthetic multicellular cell-to-cell communication in inkjet printed bacterial cell systems. *Biomaterials* 2011;32(10):2500–7 .
- [109] Ferris CJ ,Gilmore KJ ,Beirne S ,McCallum D ,Wallace GG ,in het Panhuis M . Bio-ink for on-demand printing of living cells. *Biomater Sci* 2013;1(2):224–30 .
- [110] Yanagi Y ,Nakayama K ,Taguchi T ,Enosawa S ,Tamura T ,Yoshimaru K ,et al. *In vivo* and *ex vivo* methods of growing a liver bud through tissue connection. *Sci Rep* 2017;7(1): 14085 .
- [111] Sofokleous P ,Stride E ,Bonfield W ,Edirisinghe M . Design, construction and performance of a portable handheld electrohydrodynamic multi-needle spray gun for biomedical applications. *Mat Sci Eng C* 2013;33(1):213–23 .
- [112] Koch L ,Kuhn S ,Sorg H ,Gruene M ,Schlie S ,Gaebel R ,et al. Laser printing of skin cells and human stem cells. *Tissue Eng Part C-Methods* 2010;16(5):847–54 .
- [113] Koch L ,Deiwick A ,Schlie S ,Michael S ,Gruene M ,Coger V ,et al. Skin tissue generation by laser cell printing. *Biotechnol Bioeng* 2012;109(7):1855–63 .
- [114] Michael S ,Sorg H ,Peck CT ,Koch L ,Deiwick A ,Chichkov B ,et al. Tissue engineered skin substitutes created by laser-assisted bioprinting form skin-like structures in the dorsal skin fold chamber in mice. *PLoS One* 2013;8(3):e57741 .
- [115] De Coppi P ,Bartsch G Jr ,Siddiqui MM ,Xu T ,Santos CC ,Perin L ,et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol* 2007;25(1):100–6 .
- [116] Cui X ,Breitenkamp K ,Finn MG ,Lotz M ,D’Lima DD . Direct human cartilage repair using three-dimensional bioprinting technology. *Tissue Eng Part A* 2012;18(11–12):1304–12 .
- [117] Xu T ,Binder KW ,Albanna MZ ,Dice D ,Zhao W ,Yoo JJ ,et al. Hybrid printing of mechanically and biologically improved constructs for cartilage tissue engineering applications. *Biofabrication* 2013;5(1):015001 .
- [118] Markstedt K ,Mantas A ,Tournier I ,Martinez Avila H ,Hagg D ,Gatenholm P . 3D bioprinting human chondrocytes with nanocellulose-alginate bioink for cartilage tissue engineering applications. *Biomacromolecules* 2015;16(5):1489–96 .
- [119] Eagles PA ,Qureshi AN ,Jayasinghe SN . Electrohydrodynamic jetting of mouse neuronal cells. *Biochem J* 2006;394(2):375–8 .
- [120] Lorber B ,Hsiao WK ,Hutchings IM ,Martin KR . Adult rat retinal ganglion cells and glia can be printed by piezoelectric inkjet printing. *Biofabrication* 2014;6(1):015001 .
- [121] Boland T ,Tao X ,Damon BJ ,Manley B ,Kesari P ,Jalota S ,et al. Drop-on-demand printing of cells and materials for designer tissue constructs. *Mat Sci Eng C* 2007;27(3):372–6 .
- [122] Cui X ,Boland T . Human microvasculature fabrication using thermal inkjet printing technology. *Biomaterials* 2009;30(31):6221–7 .
- [123] Xu C ,Chai W ,Huang Y ,Markwald RR . Scaffold-free inkjet printing of three-dimensional zigzag cellular tubes. *Biotechnol Bioeng* 2012;109(12):3152–60 .
- [124] Xu C ,Zhang Z ,Christensen K ,Huang Y ,Fu J ,Markwald RR . Freeform vertical and horizontal fabrication of alginate-based vascular-like tubular constructs using inkjetting. *J Manuf Sci Eng* 2014;136(6):061020 .
- [125] Christensen K ,Xu C ,Chai W ,Zhang Z ,Fu J ,Huang Y . Freeform inkjet printing of cellular structures with bifurcations. *Biotechnol Bioeng* 2015;112(5):1047–55 .
- [126] Wu PK ,Ringeisen BR . Development of human umbilical vein endothelial cell (huvec) and human umbilical vein smooth muscle cell (huvsmc) branch/stem structures on hydrogel layers via biological laser printing (biolp). *Biofabrication* 2010;2(1):014111 .
- [127] Pirlo RK ,Wu P ,Liu J ,Ringeisen B . Plga/hydrogel biopapers as a stackable substrate for printing huvec networks via biolp. *Biotechnol Bioeng* 2012;109(1):262–73 .
- [128] Xiong R ,Zhang Z ,Chai W ,Huang Y ,Chrissey DB . Freeform drop-on-demand laser printing of 3D alginate and cellular constructs. *Biofabrication* 2015;7(4):045011 .
- [129] Xu T ,Zhao W ,Zhu JM ,Albanna MZ ,Yoo JJ ,Atala A . Complex heterogeneous tissue constructs containing multiple cell types prepared by inkjet printing technology. *Biomaterials* 2013;34(1):130–9 .

- [130] Zhao H ,Chen Y ,Shao L ,Xie M ,Nie J ,Qiu J ,et al. Airflow-assisted 3D bioprinting of human heterogeneous microspheroidal organoids with microfluidic nozzle. *Small* 2018;14(39):e1802630 .
- [131] Durmus NG ,Tasoglu S ,Demirci U . Functional droplet networks. *Nat Mater* 2013;12(6):478–9 .
- [132] Xie M ,Gao Q ,Zhao H ,Nie J ,Fu Z ,Wang H ,et al. Electro-assisted bioprinting of low-concentration gelma microdroplets. *Small* 2019;15(4):e1804216 .
- [133] Billiet T ,Vandenhoute M ,Schelfhout J ,Van Vlierberghe S ,Dubruel P . A review of trends and limitations in hydrogel-rapid prototyping for tissue engineering. *Biomaterials* 2012;33(26):6020–41 .
- [134] Melchels FP ,Feijen J ,Grijpma DW . A review on stereolithography and its applications in biomedical engineering. *Biomaterials* 2010;31(24):6121–30 .
- [135] Lu Y ,Chen S . Projection printing of 3-dimensional tissue scaffolds. In: Liebschner MAK, editor. *Computer-aided tissue engineering*. New York: Humana Press; 2012. p. 289–302 .
- [136] Zhu W ,Cui H ,Boualame B ,Masood F ,Flynn E ,Rao RD ,et al. 3D bioprinting mesenchymal stem cell-laden construct with core-shell nanospheres for cartilage tissue engineering. *Nanotechnology* 2018;29(18): 185101 .
- [137] Pateman CJ ,Harding AJ ,Glen A ,Taylor CS ,Christmas CR ,Robinson PP ,et al. Nerve guides manufactured from photocurable polymers to aid peripheral nerve repair. *Biomaterials* 2015;49:77–89 .
- [138] Zhu W ,Tringale KR ,Woller SA ,You S ,Johnson S ,Shen H ,et al. Rapid continuous 3D printing of customizable peripheral nerve guidance conduits. *Mater Today* 2018;21(9):951–9 .
- [139] Koffler J ,Zhu W ,Qu X ,Platoshyn O ,Dulin JN ,Brock J ,et al. Biomimetic 3D-printed scaffolds for spinal cord injury repair. *Nat Med* 2019;25(2):263–9 .
- [140] Zhu W ,Qu X ,Zhu J ,Ma X ,Patel S ,Liu J ,et al. Direct 3D bioprinting of prevascularized tissue constructs with complex microarchitecture. *Biomaterials* 2017;124:106–15 .
- [141] Ma X ,Qu X ,Zhu W ,Li YS ,Yuan S ,Zhang H ,et al. Deterministically patterned biomimetic human ipsc-derived hepatic model via rapid 3D bioprinting. *Proc Nat Acad Sci* 2016;113(8):2206–11 .
- [142] Gou M ,Qu X ,Zhu W ,Xiang M ,Yang J ,Zhang K ,et al. Bio-inspired detoxification using 3D-printed hydrogel nanocomposites. *Nat Commun* 2014;5:3774 .
- [143] Jones N . Science in three dimensions: the print revolution. *Nature* 2012;487(7405):22–3 .
- [144] Chang CC ,Boland ED ,Williams SK ,Hoying JB . Direct-write bioprinting three-dimensional biohybrid systems for future regenerative therapies. *J Biomed Mater Res B* 2011;98(1):160–70 .
- [145] Smith CM ,Stone AL ,Parkhill RL ,Stewart RL ,Simpkins MW ,Kachurin AM ,et al. Three-dimensional bioassembly tool for generating viable tissue-engineered constructs. *Tissue Eng* 2004;10(9–10):1566–76 .
- [146] Chang R ,Nam J ,Sun W . Effects of dispensing pressure and nozzle diameter on cell survival from solid freeform fabrication-based direct cell writing. *Tissue Eng Part A* 2008;14(1):41–8 .
- [147] Gruene M ,Deiwick A ,Koch L ,Schlie S ,Unger C ,Hofmann N ,et al. Laser printing of stem cells for biofabrication of scaffold-free autologous grafts. *Tissue Eng Part C-Me* 2011;17(1):79–87 .
- [148] Guillotin B ,Souquet A ,Catros S ,Duocastella M ,Pippenger B ,Bellance S ,et al. Laser assisted bioprinting of engineered tissue with high cell density and microscale organization. *Biomaterials* 2010;31(28):7250–6 .
- [149] Gao G ,Huang Y ,Schilling AF ,Hubbell K ,Cui X . Organ bioprinting: are we there yet? *Adv Healthc Mater* 2018;7(1):1701018 .
- [150] Hospodiuk M ,Dey M ,Sosnoski D ,Ozolat IT . The bioink: a comprehensive review on bioprintable materials. *Biotechnol Adv* 2017;35(2):217–39 .
- [151] Zhang Z ,Jin Y ,Yin J ,Xu C ,Xiong R ,Christensen K ,et al. Evaluation of bioink printability for bioprinting applications. *Appl Phys Rev* 2018;5(4):041304 .
- [152] Heinrich MA ,Liu W ,Jimenez A ,Yang J ,Akpek A ,Liu X ,et al. 3D bioprinting: from benches to translational applications. *Small* 2019;15(23):e1805510 .
- [153] Pan T ,Song W ,Cao X ,Wang Y . 3D bioplotting of gelatin/alginate scaffolds for tissue engineering: influence of crosslinking degree and pore architecture on physicochemical properties. *J Mater Sci Technol* 2016;32(9):889–900 .
- [154] Gao T ,Gillispie GJ ,Copus JS ,Pr AK ,Seol YJ ,Atala A ,et al. Optimization of gelatin-alginate composite bioink printability using rheological parameters: a systematic approach. *Biofabrication* 2018;10(3):034106 .
- [155] Yang X ,Lu Z ,Wu H ,Li W ,Zheng L ,Zhao J . Collagen-alginate as bioink for three-dimensional (3D) cell printing based cartilage tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2018;83:195–201 .

- [156] Yue K ,Trujillo-de Santiago G ,Alvarez MM ,Tamayol A ,Annabi N ,Khademhosseini A . Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (gelma) hydrogels. *Biomaterials* 2015;73:254–71 .
- [157] Ouyang L ,Highley CB ,Rodell CB ,Sun W ,Burdick JA . 3D printing of shear-thinning hyaluronic acid hydrogels with secondary cross-linking. *ACS Biomater Sci Eng* 2016;2(10):1743–51 .
- [158] Law N ,Doney B ,Glover H ,Qin Y ,Aman ZM ,Sercombe TB ,et al.Characterisation of hyaluronic acid methylcellulose hydrogels for 3D bioprinting. *J Mech Behav Biomed Mater* 2018;77:389–99 .
- [159] Yanez M ,Rincon J ,Dones A ,De Maria C ,Gonzales R ,Boland T . *In vivo* assessment of printed microvasculature in a bilayer skin graft to treat full-thickness wounds. *Tissue Eng Part A* 2015;21(1–2):224–33 .
- [160] Croisier F ,Jérôme C . Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *Eur Polym J* 2013;49(4):780–92 .
- [161] Lee W ,Lee V ,Polio S ,Keegan P ,Lee JH ,Fischer K ,et al.On-demand three-dimensional freeform fabrication of multi-layered hydrogel scaffold with fluidic channels. *Biotechnol Bioeng* 2010;105(6):1178–86 .
- [162] Miri AK ,Nieto D ,Iglesias L ,Goodarzi Hosseinabadi H ,Maharjan S ,Ruiz-Esparza GU ,et al.Microfluidics-enabled multimaterial maskless stereolithographic bioprinting. *Adv Mater* 2018;30(27):1800242 .