

## چاپ زیستی سه بعدی و جوهرهای زیستی طبیعی مورد استفاده: مفاهیم و کاربردها

امیرحسین جلالی کندلوس<sup>۱</sup>، سعید باستانی<sup>۲</sup>، شهره مشایخان<sup>۳</sup>

۱- دانشجوی دکترا، گروه پژوهشی علوم و فناوری چاپ، پژوهشگاه رنگ، تهران، ایران، صندوق پستی: ۶۵۴-۱۶۷۶۵.

۲- دانشیار، گروه پژوهشی علوم و فناوری چاپ، پژوهشگاه رنگ، تهران، ایران، صندوق پستی: ۶۵۴-۱۶۷۶۵.

۳- استادیار، دانشکده مهندسی شیمی و نفت، دانشگاه صنعتی شریف، تهران، ایران، صندوق پستی: ۱۶۳۹-۱۱۱۵۵.

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۸/۱۴ تاریخ بازبینی نهایی: ۹۹/۰۹/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۹/۳۰ در دسترس به صورت الکترونیک: ۹۹/۱۲/۱۸

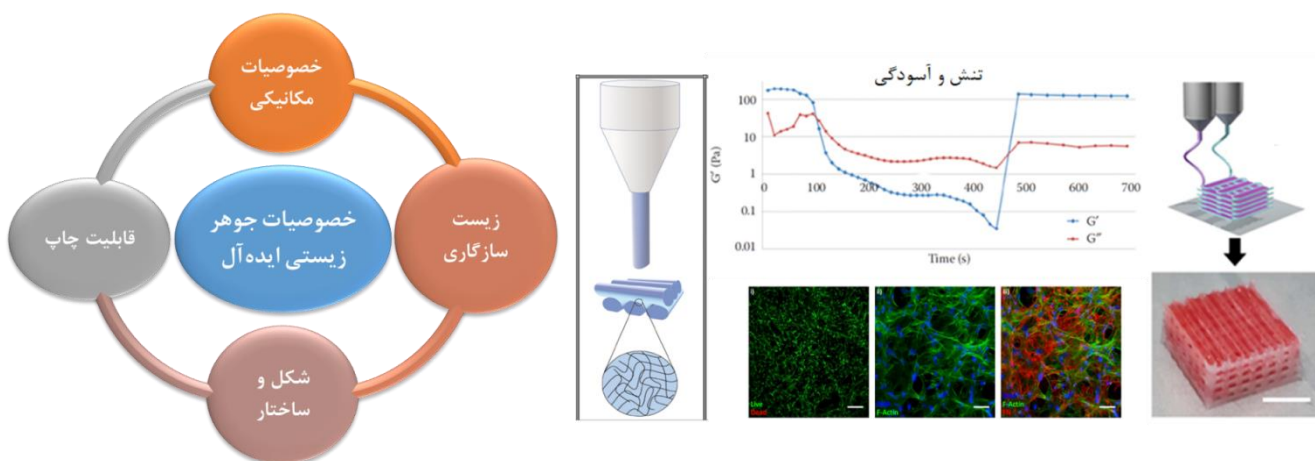
### چکیده

در حال حاضر، چاپ زیستی سه بعدی به عنوان یک روش ساخت افزایشی برای تولید سازه‌های سه بعدی با هندسه دلخواه، به طور گسترده در کاربردهای مهندسی بافت و غربالگری دارو به کار گرفته می‌شود. چاپ زیستی سه بعدی ساخت بافت‌های زنده را با استفاده از چاپ تجمعات سلولی و یا سلول‌های گنجانده شده در زیست مواد ممکن می‌سازد که به تمامی آن‌ها جوهر زیستی گفته می‌شود. مطالعات روی تهیه جوهرهای زیستی نوین با قابلیت چاپ مناسب، زیست‌سازگاری بالا و خواص مکانیکی مشابه بافت هدف پیش‌شرطی اساسی به منظور پیشبرد کاربرد چاپ زیستی در طب ترمیمی است. تنها دسته‌ای از مواد که توانایی فراهم کردن محیطی مشابه بدن انسان را داشته و سلول‌ها توانایی زنده ماندن حین فرآیند گنجانده شدن درون آن‌ها دارند، هیدروژل‌ها هستند. از میان دو دسته‌ی هیدروژل‌های طبیعی و سنتزی بکارگرفته شده به عنوان جوهرهای زیستی، مواد طبیعی به دلیل زیست‌سازگاری بهتر، خطر رد ایمنی کمتر، مشابهت بیشتر به بافت‌های بدن و همچنین امکان اصلاح در آزمایشگاه و ترکیب با سایر مواد به منظور بهینه‌سازی خواص، کاربرد بسیار گسترده‌تری را نسبت به جوهرهای زیستی سنتزی پیدا کرده‌اند. در این مقاله، ابتدا مروری بر فناوری چاپ زیستی سه بعدی و انواع روش‌های تهیه، اعمال و کاربرد آن ارائه شده است. سپس، زیست‌مواد بکار رفته به عنوان جوهرهای زیستی و سازوکارهای شبکه‌ای شدن آن‌ها بررسی می‌شود. در انتها نیز خلاصه‌ای از مطالعات صورت گرفته روی برخی از پرکاربردترین جوهرهای زیستی طبیعی (شامل: کلاژن، ژلاتین، ابریشم، آلژینات، اسید هیالورونیک، کیتوسان و بستر خارج سلولی) گزارش شده است. نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که بازساخت اعضای بدن با استفاده از چاپ زیستی نیازمند قرارگیری دقیق سلول‌های مشخص، مواد و عوامل زیست‌فعال به منظور القای تشکیل بافت عملکردی است. برآوردن این نیازها برای بافت‌های پیچیده‌تر، لزوم تهیه جوهرهای زیستی مختص بافت با خواص زیستی و مکانیکی قابل تنظیم را پررنگ‌تر می‌کند.

### واژه‌های کلیدی

چاپ زیستی سه بعدی، جوهرهای زیستی، هیدروژل‌های طبیعی، پلیمریزاسیون نوری، مهندسی بافت.

### چکیده تصویری





## 3D Bioprinting and Natural Bioinks: Principles and Applications

Amirhossein Jalali Kandeloo<sup>1</sup>, Saeed Bastani\*<sup>1</sup>, Shohreh Mashayekhan<sup>2</sup>

1- Department of Printing Science and Technology, Institute for Color and Technology, P. O. Box:167654654, Tehran, Iran.

2- Department of Chemical & Petroleum Engineering, Sharif University of Technology, P. O. Box: 11155-1639, Tehran, Iran.

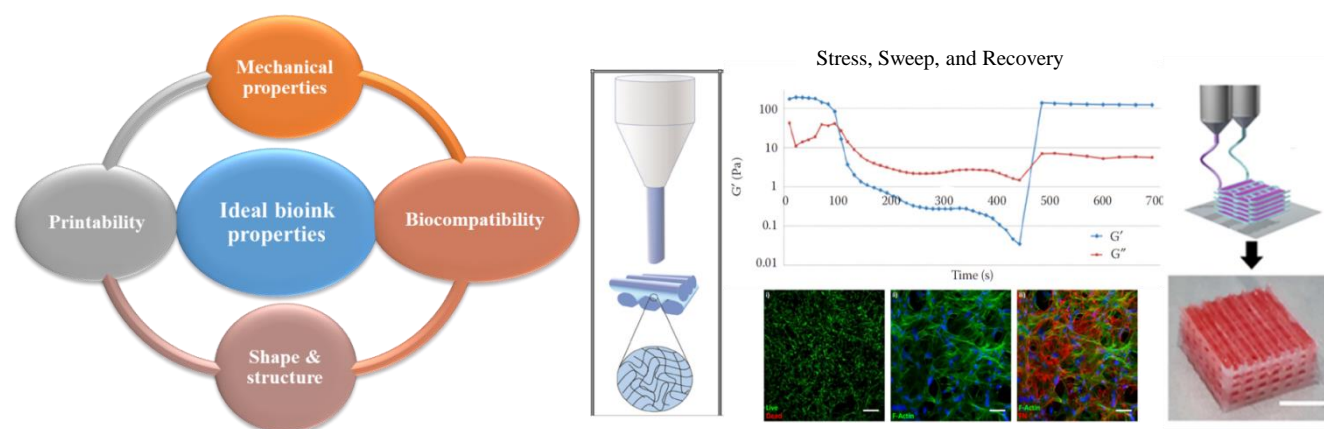
### Abstract

Currently, 3D bioprinting as an additive manufacturing technique for building 3D constructs with desired geometries is broadly employed in tissue engineering and drug screening applications. Bioprinting enables the fabrication of living tissues using cell aggregates or cells encapsulated in biomaterials—all of which can be referred to as bioink. Research on novel bioinks with appropriate printability, biocompatibility, and mechanical properties akin to the target tissue is an essential prerequisite toward advancing 3D bioprinting applications in regenerative medicine. The only class of materials capable of providing an environment similar to the human body and maintaining cell viability during encapsulation is hydrogels. Among the two categories of natural and synthetic hydrogels employed as bioinks, natural materials are much more widely used than synthetic ones due to their better biocompatibility, lower risk of immune rejection, more similarity to native tissues, and the possibility of laboratory modification and combination with other materials to obtain optimal properties. In this article, first, a review of 3D bioprinting technology and its defined modalities is presented. Next, bioink biomaterials and their cross-linking mechanism are discussed. Finally, a summary of studies on some of the most widely used natural bioinks (including collagen, gelatin, silk, alginate, hyaluronic acid, chitosan and extracellular matrix) is reported. Research results indicate that recreating organs using 3D bioprinting necessitates precise placement of specific cells, materials, and bioactive factors to induce functional tissue formation. Attempting to meet these requirements for more complex tissues highlights the need for more tissue-specific, biologically and mechanically tunable bioinks.

### Keywords

3D bioprinting, Bioink, Natural hydrogels, Photo-polymerization, Tissue engineering.

### Graphical abstract



۱- مقدمه

چاپ سه‌بعدی به عنوان یک فناوری نوظهور قابلیت ایجاد هرگونه جسم سه‌بعدی را با هر نوع پیچیدگی فراهم کرده است. چاپ سه‌بعدی یا ساخت افزایشی به فرآیند تولید قطعات سه‌بعدی از فایل دیجیتال آن گفته می‌شود که مخالف با ساخت کاهشی که در آن با برداشتن یا ایجاد حفره قطعه نهایی شکل می‌گیرد، می‌باشد [۱]. در نتیجه، ساخت افزایشی امکان چاپ سه‌بعدی اشکال پیچیده‌تر و با استفاده از مواد و زمان ساخت کمتر نسبت به روش‌های تولید سنتی را فراهم می‌کند. اولین چاپگر سه‌بعدی در سال ۱۹۸۷ توسط چارلز هالز<sup>۱</sup> بنیان‌گذار شرکت 3D Systems توسعه داده شد [۲]. این چاپگرهای سه‌بعدی اولین بار به صورت عمده برای نمونه‌سازی سریع مورد استفاده قرار گرفتند و امروزه عمدتاً به طور مستقیم برای تولید سه‌بعدی قطعات محصولات و بالا بردن سرعت چرخه تولید مورد استفاده قرار می‌گیرند. دستگاه به کار گرفته شده توسط چارلز هالز برپایه فناوری استریولیتوگرافی<sup>۲</sup> بود که از مواد قابل شبکه‌ای شدن در معرض امواج الکترومغناطیسی ناحیه فرابنفش و/یا مرئی استفاده می‌کند. به‌دنبال این اختراع، چاپگرهای دیگری با اصول طراحی مختلف و استفاده از مواد گوناگون طراحی شدند [۳-۵].

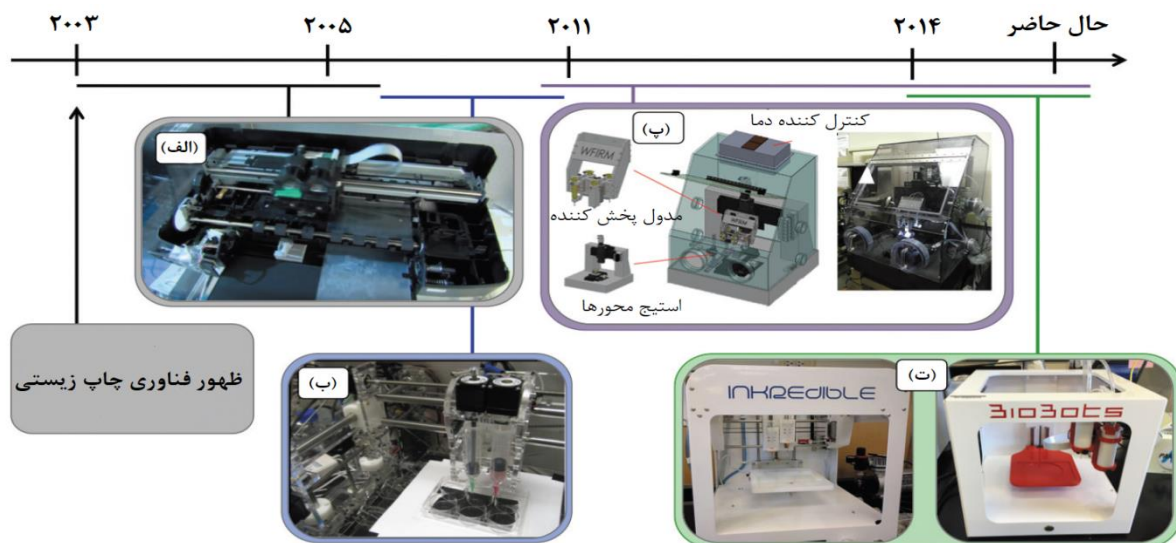
علاوه بر کاربردهای مهندسی، کاربرد پزشکی این روش سبب گسترش استفاده آن در جراحی‌های ایمپلنت و طب ترمیمی شده که پیشرفت آن در آینده را تضمین می‌کند [۶]. روش سیتواسکرایبینگ<sup>۳</sup> (یک روش چاپ کامپیوتری سلول‌ها در مکان مشخص) کالب<sup>۴</sup> در سال ۱۹۸۸ با استفاده از

یک چاپگر جوهر افشان، ظهور فناوری چاپ برای حوزه پزشکی قلمداد شده که به عنوان "چاپ زیستی" از آن یاد می‌شود [۷]. در این روش می‌توان به طور موثری با استفاده از انواع طبقه‌بندی‌های مواد شامل فلزات، سرامیک‌ها و از همه مهم‌تر پلیمرها به منظور شبیه‌سازی خصوصیات آناتومیک و مکانیکی اعضا و بافت‌های طبیعی استفاده کرد [۸].

۲- چاپ زیستی سه‌بعدی

چاپ زیستی به عنوان ابزاری توانمند در طب ترمیمی برای کاربردهای گوناگون ظاهر شده است. چاپ زیستی که تنها حدود دو دهه از ظهور آن می‌گذرد یک روش ساخت زیستی افزایشی کنترل شده توسط کامپیوتر است که توانایی ساخت یا الگودهی ساختارهای شبه عضو یا بافت زنده در سه بعد را دارد [۹]. چاپگرهای زیستی توانایی چاپ تجمعات سلولی، سلول‌های گنجانده شده در هیدروژل یا سایر سیالات ویسکوز، یا ریزحامل‌های حاوی سلول را دارند که به تمامی آن‌ها جوهر زیستی گفته می‌شود. این چاپگرها همچنین توانایی چاپ پلیمرهای بدون سلول را دارند که به عنوان پشتیبان مکانیکی به کار می‌روند [۱۰]. به عنوان یکی از روش‌های ساخت زیستی، چاپ زیستی دارای مزایایی چون بهره‌وری بالا، منحصر به فرد بودن، کنترل دقیق روی داربست و سلول‌ها و تکرارپذیری می‌باشد. چاپ زیستی، در حال حاضر به طور گسترده برای ساخت بافت‌های عملکردی مانند عروق، عضله، غضروف و استخوان استفاده می‌شود. چاپ زیستی سه‌بعدی یک ابزار قدرتمند در طراحی و قرار دادن دقیق سلول‌های زنده، اسید نوکلئیک، ذرات دارویی، پروتئین‌ها و عوامل رشد، برای بررسی‌های آناتومی، زیست‌شناسی و فیزیولوژی بافت است [۱۱]. در گذر زمان، چاپگرهای زیستی به طرز قابل توجهی تکامل یافته‌اند (شکل ۱).

- 1 Charles Hulls
- 2 Stereolithography
- 3 Cytoscribing
- 4 Kleb



شکل ۱- روند تکاملی و مثال‌هایی از خط‌مشی‌های ساخت‌افزایی چاپگرهای زیستی، (الف) یک چاپگر جوهر افشان تجاری شرکت HP بهبودیافته برای چاپ سلول‌ها، (ب) یک چاپگر سه‌بعدی "DIY" منبع باز Fab@Home بکارگرفته شده برای فرآیندهای چاپ زیستی، (پ) یک چاپگر زیستی سه‌بعدی سفارشی ساخته شده با چندین نازل برای چاپ هیدروژل‌ها و پلیمرهای ذوب-پخت، (ت) مثال‌هایی از برخی از چاپگرهای زیستی تجاری و نسبتاً جدید موجود که برای اغلب آزمایشگاه‌های تحقیقاتی

مهندسی پزشکی به دلیل هزینه مناسب قابل تهیه هستند [۱۱].

فراهم کنند.

بر خلاف روش‌های معمول مهندسی بافت، کشت دستی سلولی یا پاشش سلول‌ها، چاپ زیستی بدلیل بهره‌وری بالا، کنترل دقیق روی داربست‌ها و سلول‌ها و تکرارپذیری بالا به عنوان ابزاری مناسب در مهندسی بافت و سامانه‌های حمل دارو شناخته شده است. این کنترل دقیق بر فرآیند چاپ است که امکان همانندسازی خصوصیات ساختاری ذاتی، خواص مکانیکی و عملکرد بافت مورد نظر را فراهم می‌کند [۱۱].

## ۲-۲-۱ انواع روش‌های چاپ زیستی

چاپگرهای زیستی بر اساس روش‌های مختلفی عمل می‌کنند که شامل: چاپ زیستی جوهر افشان<sup>۱</sup>، چاپ زیستی مبتنی بر اکستروژن<sup>۲</sup>، چاپ زیستی بر پایه استریولیتوگرافی<sup>۳</sup> (SLA) و چاپ زیستی به کمک لیزر<sup>۴</sup> (LIFT) هستند [۱۱].

## ۲-۲-۲ چاپ زیستی جوهرافشان

چاپگرهای زیستی جوهرافشان، که به عنوان چاپگر زیستی قطره‌ای شناخته می‌شوند، از نیروی حرارتی یا آکوستیک<sup>۵</sup> استفاده می‌کنند تا قطره‌ی مایع را بر روی یک بستر بریزند و ساختارهای لایه ای را ایجاد کنند (شکل ۲-الف). در یک چاپگر جوهر افشان حرارتی، با ایجاد گرما جوهر تبخیر شده و حباب ایجاد می‌کند.

چاپگرهای اولیه اغلب از نوع جوهرافشان بوده، به صورت سفارشی ساخته شده و بسیار گران بودند [۱۲]. اما در طول زمان رویکردهای چاپ تقسیم‌بندی شده و هزینه تهیه چاپگرها نیز به طور قابل توجهی کاهش یافته است.

## ۲-۱-۱ نیاز روز افزون به چاپ زیستی

در حال حاضر کمبود گسترده‌ای از اهداکنندگان عضو برای ایمپلنت در بیماران وجود دارد [۱۳]. به عنوان مثال، در سال ۲۰۱۹ بیش از ۱۱۲۰۰۰ بیمار در فهرست انتظار برای دریافت عضو وجود داشتند، ولی بدلیل کمبود اهدا کنندگان تنها حدود ۴۰۰۰۰ پیوند عضو در سال ۲۰۱۹ انجام شد. اکنون، هر روز حدود ۲۰ نفر در لیست انتظار برای پیوند عضو جان خود را از دست می‌دهند [۱۴]. امروزه، بیشتر پیوندها میزان موفقیت بالایی دارند. پیوندهای کلیه، پانکراس، کبد، روده و قلب بیش از ۸۰٪ میزان بقای یک ساله و بیش از ۷۰٪ میزان بقای ۵ ساله (به استثنای روده) را از خود نشان می‌دهند [۱۵]. این آمار بیانگر تقاضا برای افزایش منابع تهیه عضو و همچنین نشان‌دهنده موثر و مفید بودن روش درمانی پیوند عضو است. علاوه بر این، اگرچه آزمایش‌های پیش بالینی کاندیدهای دارویی روی حیوانات به خوبی تثبیت شده، اما نتایج حاصل از آزمایش روی حیوانات همیشه مشابه انسان‌ها نیست. علاوه بر این، این آزمون‌ها ممکن است سبب آسیب به حیوانات شوند [۱۶]. بافت‌های سه‌بعدی انسانی، و نه حیوانی، از نظر منطقی مناسب‌ترین مدل‌ها به منظور غربالگری داروهای مورد استفاده برای انسان‌ها و بررسی بیماری‌های انسانی هستند. بافت‌ها و اندام‌های تهیه شده با چاپ زیستی می‌توانند به عنوان بافت‌های قابل پیوند، نیاز بیماران در لیست دریافت عضو را برطرف کرده و بافت‌های قابل آزمایش برای تحقیق و توسعه

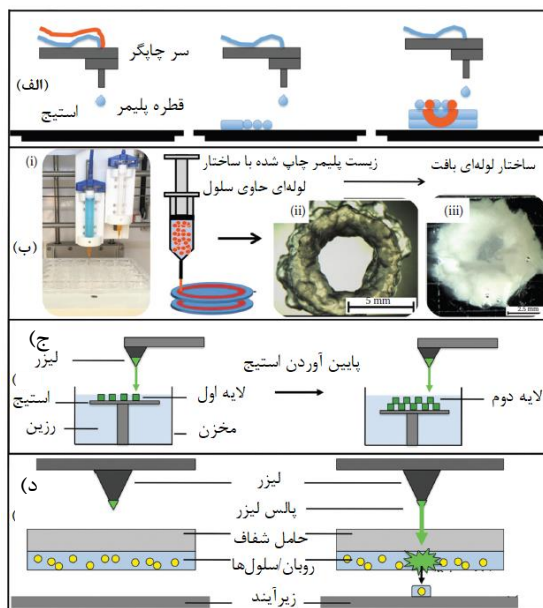
<sup>1</sup> Inkjet

<sup>2</sup> Extrusion

<sup>3</sup> Stereolithography

<sup>4</sup> Laser-induced forward transfer (LIFT)

<sup>5</sup> Acoustic



شکل ۲- طرح‌واره روش‌های مختلف چاپ زیستی از دیدگاه سخت‌افزاری. طرح‌واره (الف) چاپ زیستی جوهرافشان، (ب) چاپ زیستی مبتنی بر اکستروژن (i) یک چاپگر زیستی اکستروژنی؛ ii- یک سازه لوله‌ای فورا پس از چاپ؛ ii- در گذر زمان سازه لوله‌ای توسط سلول‌ها به بافت زنده تبدیل شده است. (ج) استریولیتوگرافی و

(د) چاپ زیستی لیزری [۱۱].

هیدروژل‌ها، بسترهای خارج سلولی<sup>۱</sup> (ECM) و دانه‌های سلولی نیز می‌توانند به عنوان جوهرهای زیستی مورد استفاده قرار گیرند. ضعف این چاپگر محدودیت جوهرهای زیستی با خواص زیست سازگاری مناسب و امکان چاپ و حفظ شکل در ساخت سازه‌های بزرگ است. از میان روش‌های گوناگون، چاپ زیستی مبتنی بر اکستروژن بدلیل امکان چاپ سازه‌های بزرگ سه‌بعدی با تراکم سلولی بالا و سرعت بالای چاپ به پرکاربردترین چاپگر زیستی در مهندسی بافت تبدیل شده است [۲۲، ۱۱].

### ۲-۳-۲- چاپ زیستی بر پایه استریولیتوگرافی (SLA)

استریولیتوگرافی روشی برای ساخت شکل آزاد جامدات است که در آن از یک مخزن حاوی محلول پلیمری با قابلیت شبکه‌ای شدن توسط نور یا رزین، یک لیزر با کنترل محورهای XYZ و یک استیج با کنترل محور Z برای چاپ سازه در یک فرآیند لایه با لایه بکار گرفته می‌شود (شکل ۲-۳). فرآیند ساخت در سطح مخزن رخ داده و استیج مرحله به مرحله پایین‌تر آورده می‌شود که به لایه‌ها اجازه پلیمری شدن روی یکدیگر را داده و در نتیجه سازه‌های سه‌بعدی در یک روش پایین به بالا تهیه می‌شوند [۲۳]. البته یک روش بالا به پایین استریولیتوگرافی نیز وجود دارد که چندان بکار گرفته نمی‌شود. هیدروژل‌های حساس به نور حاوی سلول، مانند اسیدهیالورونیک متاکریله، کلاژن متاکریله، کیتوزان متاکریله و دی‌آکریلات‌ها نیز می‌توانند با استفاده از این دستگاه‌ها در یک شیوه لایه‌ای چاپ شوند. مزیت چاپ زیستی بر پایه استریولیتوگرافی، سرعت و دقت بالا در ساخت است و اشکال آن هم هزینه‌های بالای دستگاه‌ها و سمیت نورها، آغازگرهای نوری است [۲۴].

### ۲-۴-۲- چاپ زیستی به کمک لیزر (LIFT)

چاپگرهای زیستی لیزری بر اساس پالس لیزر و روبان حاوی ماده قابل چاپ یا جوهر زیستی کار می‌کنند. بدین صورت که با استفاده از لیزر، پالس‌هایی را در بازه‌های زمانی مشخص به یک زیرآیند شفاف پشتیبان روبان مانند طلا یا پلاتین زده و با جذب انرژی توسط زیرآیند و انتقال آن به روبان، حبایی با فشار بالا تولید شده که قطره‌ای از جوهر زیستی را روی استیج تولید می‌کند (شکل ۲-۴). این چاپگر می‌تواند سازه‌های سه‌بعدی سلولی را با طیف وسیعی از گرانیوی (۱ تا ۳۰۰ میلی پواز بر ثانیه) از پلیمرها، با وضوح بالا تولید کند. مزیت اصلی چاپگر زیستی لیزری جلوگیری از مسدود شدن نازل با سلول‌ها و یا مواد زیستی پلیمری بوده و ضعف آن هم، گران بودن آن است [۲۵]. مقایسه انواع روش‌های چاپ زیستی در جدول ۱ آمده است.

### ۲-۳-۳- گام‌های فرآیند چاپ زیستی

همانند فرآیند چاپ سه‌بعدی، چاپ زیستی نیز مراحل گوناگونی دارد. به طور کلی، سه گام اصلی در فرآیند چاپ زیستی سه‌بعدی وجود دارند که به ترتیب: پیش فرآیند (تولید مدل سه‌بعدی، آماده‌سازی جوهر زیستی و غیره)، چاپ زیستی سه‌بعدی و پس‌فرآیند (استفاده از راکتور زیستی برای بلوغ بافت

با انبساط حباب، مقداری از جوهر از نازل روی کاغذ در اثر فشار ناشی از حباب ریخته می‌شود [۱۸، ۱۷] در چاپ جوهرافشان، با تنظیم خواص رئولوژیکی جوهر چاپ می‌توان نحوه تشکیل قطره را کنترل نمود [۱۹]. جوهرهای زیستی ساخته شده از سلول‌ها، مواد داربستی و عوامل رشد، می‌توانند به دقت از طریق کنترل اندازه‌ی قطرات و میزان رسوب، ذخیره شوند. در چاپگرهای زیستی جوهرافشان پیژوالکتریک، قطرات جوهر زیستی از طریق امواج آکوستیک ایجاد شده توسط بلور پیژوالکتریک داخل سر چاپگر تولید می‌شوند. مزایای استفاده از چاپگرهای زیستی جوهرافشان در چاپ زیستی سه‌بعدی اندام، سرعت پاسخ سریع، دقت شکل‌گیری و راندمان بالا است. اگرچه چاپ زیستی جوهر افشان پیژوالکتریک مزایایی را نسبت به روش حرارتی مانند: تنظیم دقیق‌تر اندازه قطرات و زنده‌مانی بالاتر سلولی (۹۰-۸۰٪) را دارد، هر دوی این روش‌ها از محدودیت‌های مربوط به جوهر زیستی رنج می‌برند [۲۰]. بزرگترین محدودیت چاپگرهای زیستی جوهرافشان گرانیوی جوهر زیستی در حین فرآیند چاپ است. به منظور تشکیل قطره‌ی کوچک، جوهر زیستی باید درون کارتریج مایع (گرانیوی پایین) باشد و به محض خروج از سر چاپگر جامد شود. این تبدیل شدن از مایع به جامد با القای اتصالات عرضی و یا ژل شدن جوهر زیستی به صورت شیمیایی، آنزیمی، فیزیکی و یا سایر روش‌ها اتفاق می‌افتد. این موضوع به شدت ارتفاع سازه را محدود می‌کند و تنها غلظت‌های پایین جوهرهای زیستی پلیمری با تراکم سلولی کم می‌توانند از گرفتگی نازل‌ها جلوگیری کرده و تنش برشی بر روی سلول را کاهش دهند. یکی دیگر از اشکالات واضح چاپگر زیستی جوهرافشان در چاپ سه‌بعدی اندام، خواص مکانیکی ضعیف سازه‌های سه‌بعدی است. با توجه به این اشکالات، چاپگر زیستی سه‌بعدی جوهرافشان برای چاپ اندام‌ها هنوز در حال تکامل است، در حالی که چاپگر زیستی اکستروژنی برای مطالعات متعددی مورد استفاده قرار گرفته است [۲۱].

### ۲-۲-۲- چاپ زیستی مبتنی بر اکستروژن

چاپگرهای زیستی اکستروژنی معمولاً شامل یک سیستم اکستروژن خودکار سه‌محوره مجهز به یک نازل (یا سر) هستند (شکل ۲ (ب)). در حال حاضر، این تنها فناوری موجود می‌باشد که می‌تواند ساختارهای بزرگ سلولی را که حاوی هر دو محیط میکرو و ماکرو فیزیولوژیکی هستند به شیوه‌ای قابل کنترل تولید کند. بافت‌های اندام‌های ناهمگن می‌توانند با استفاده از یک چاپگر زیستی سه‌بعدی تک نازل با سلول‌های بنیادی یا عوامل رشد ناهمگن یا یک چاپگر زیستی چند نازل با انواع سلول تولید شوند. برای چاپگرهای زیستی سه‌بعدی، چاپگر سه‌بعدی قدرتمند و پلیمرهای زیست سازگار، دو عامل اصلی هستند که روی ساختار نهایی سه‌بعدی تاثیر می‌گذارند. استفاده از جوهرهای روان شونده با برش می‌تواند برای افزایش زنده‌مانی سلول‌ها و بهبود وضوح سازه‌های سه‌بعدی مفید باشد. در کنار محلول‌های پلیمری یا

<sup>1</sup> Extracellular Matrix (ECM)

جدول ۱- مقایسه انواع روش‌های چاپ زیستی [۲۵، ۲۴، ۲۲، ۲۱].

روش	مزایا	معایب
جوهر افشان	دقت بالای چاپ ( $\mu m \sim 20$ )؛ بارگذاری آسان نمونه؛ زنده‌مانی سلولی قابل قبول ( $< 70\%$ )، سرعت و بازده بالا	گرانروی پایین؛ تراکم سلولی پایین؛ ارتفاع کم سازه ( $> 10 \mu m$ )، تنش بالا روی سلول‌ها؛ خواص مکانیکی ضعیف؛ عدم توانایی ساخت سازه‌های بزرگ و پیچیده
مبتنی بر اکستروژن	تراکم سلولی بالا؛ سرعت نسبتاً بالا؛ امکان چاپ سازه‌های پیچیده و بزرگ سه‌بعدی؛ زنده‌مانی بالای سلولی ( $< 98\%$ )؛ هزینه نسبتاً ارزان	وابسته به گرانروی هیدروژل و دما؛ تهیه جوهر زیستی مناسب
بر پایه استریولیتوگرافی	سرعت و دقت بالا در ساخت	هزینه بالای دستگاه؛ سمیت نورها و آغازگرهای نوری؛ نیاز به فرآیندهای پس از پخت به منظور حذف رزین مایع؛ رسوب سلولی ضعیف
به کمک لیزر	دقت نسبتاً بالای چاپ ( $\sim 40 \mu m$ )؛ محدوده وسیع گرانروی قابل چاپ؛ زنده‌مانی بالای سلولی ( $< 90\%$ )	هزینه بالای دستگاه، بازده پایین، مشکل بودن گنجاندن مواد زیست‌فعال مختلف، رسوب سلولی ضعیف و ناهمگن بودن

#### ۲-۴-۱- زیست‌مواد

زیست‌مواد مورد استفاده در چاپ زیستی سه‌بعدی به دو گروه تقسیم می‌شوند: ۱- گروه اول پلیمرهای ذوب-پخت هستند که داربست‌هایی با استحکام مکانیکی بالا را نتیجه می‌دهند. ۲- دسته دوم بایومواد نرم و انعطاف‌پذیر نظیر هیدروژل‌ها هستند، که محتوای آب بالایی دارند و سلول‌ها در آنها، بر خلاف گروه اول، توانایی زنده‌مانی دارند [۱۱].

هیدروژل‌های مورد استفاده در جوهرهای زیستی به دو گروه تقسیم می‌شوند: ۱- هیدروژل‌های سنتزی، که متشکل از پلیمرهای سنتز شده در آزمایشگاه هستند ۲- هیدروژل‌های طبیعی که متشکل از پلیمرها، اغلب پلی‌ساکاریدها هستند، ولی می‌توانند از پپتیدها یا پروتئین‌های خالص‌سازی شده از منابع طبیعی نیز باشند، که اغلب در آزمایشگاه، اصلاحاتی روی آن‌ها انجام می‌گیرد. نمونه‌های معمول هیدروژل‌های سنتزی شامل هیدروژل‌ها بر پایه پلی‌اتیلن گلاکول (PEG) مانند: پلی‌اتیلن گلاکول دی‌اکریلات<sup>۲</sup> (PEGDA)، و ژل‌های بر پایه پلی‌اکریل آمید می‌باشد. مثال‌هایی از هیدروژل‌های طبیعی، شامل کلاژن، اسید هیالورونیک اسید، ژلاتین، آلژینات، ابریشم، پکتین و فیبرین است. به طور کلی، مواد مصنوعی اجازه کنترل دقیق روی وزن مولکولی و توزیع آن، و همچنین شیمی اتصالات عرضی را می‌دهند که کنترل دقیق خواص مکانیکی مانند مدول الاستیک و سینتیک تخریب را نتیجه می‌دهد. در مقابل، استفاده از مواد مشتق‌شده طبیعی می‌تواند برای داشتن خواص فیزیکی خاص دشوار باشد، اما اغلب این مواد دارای ویژگی‌های زیست‌فعال ذاتی از طریق توالی زیستی پپتید و محرک‌های پیوند سلول هستند که سلول‌ها با آن‌ها تعامل دارند و در نتیجه یکپارچگی بافت و زیست‌سازگاری را بهبود می‌بخشد [۱۱].

فلوچارت ارائه شده توسط مورفی<sup>۱</sup> و همکارانش [۸] در مورد بیشتر فرآیندهای چاپ زیستی صادق است (شکل ۳).

#### ۲-۴-۲- اجزای ضروری در چاپ زیستی

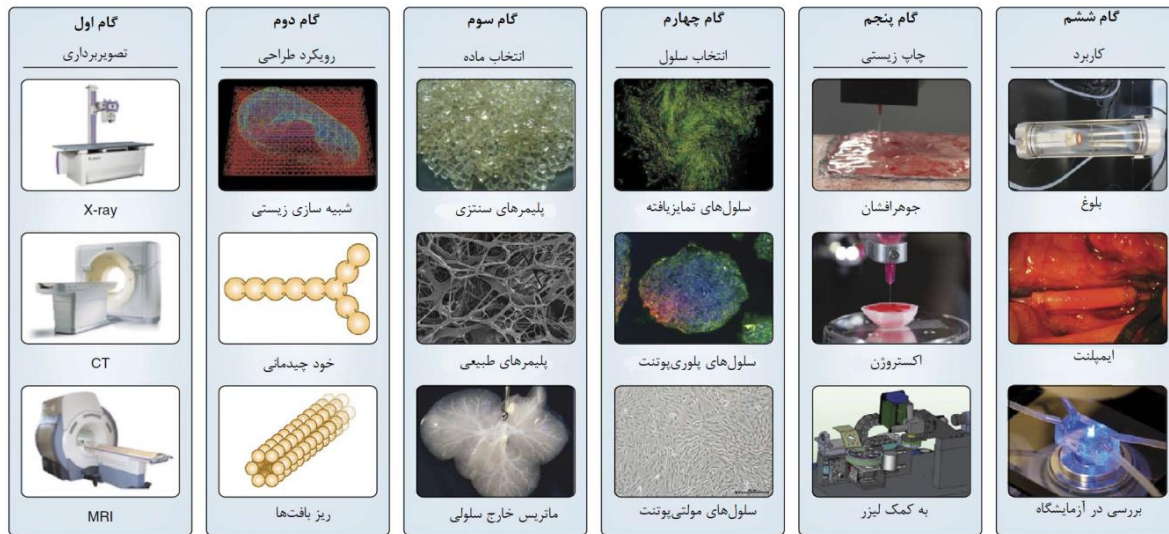
اولین جزء مهم در چاپ زیستی، اجزای سلولی بوده که قسمت زنده سازه را تشکیل می‌دهند. اغلب به منظور تهیه بافت‌های عملکردی، استفاده از چند نوع سلول در ارتباط با هم مورد نیاز هستند. منابع سلولی مورد استفاده به خطوط سلولی، سلول‌های اولیه و سلول‌های بنیادی و مشتقات آن‌ها دسته‌بندی می‌شوند که خارج از محدوده بررسی مقاله حاضر می‌باشند. دومین جزء مهم استفاده از زیست‌مواد پشتیبان (معمولاً به شکل پلیمرها و پروتئین‌ها) می‌باشد که (۱) رسوب مواد را با روش‌های مکانیکی تسهیل می‌کنند و (۲) برای سلول‌ها به عنوان پشتیبان عمل کرده و از آن‌ها در حین و پس از فرآیند ساخت سازه بافتی محافظت می‌کنند. این مواد می‌توانند محیط فیزیکی را برای اقامت سلول‌ها تامین کرده و سیگنال‌های بیوشیمیایی برای عملکرد سلول‌های مشابه درون بدن را فراهم کنند. سومین جزء نیز خود دستگاه چاپ زیستی و روشی است که با آن سازه ساخته می‌شود. نحوه جمع‌بندی این متغیرها بزرگترین نقش را در چاپ زیستی موفقیت آمیز ایفا می‌کند. از همه مهم‌تر، زیست ماده جوهر زیستی به عنوان یک پل ضروری بین سلول‌ها و سخت‌افزار عمل می‌کند. متأسفانه، از زمان ظهور چاپ زیستی توجه کمتری نسبت به تهیه زیست‌مواد مختص به روش چاپ زیستی و خصوصیات شیمیایی و موادی برای چاپ زیستی موفقیت آمیز شده است [۱۱]. از آنجایی که پلت‌فرم‌های سخت‌افزاری در جزئیات در بخش ۲-۲ بررسی شد، در ادامه به بررسی زیست‌مواد مورد استفاده در چاپ زیستی به صورت دقیق‌تر پرداخته می‌شود.

<sup>2</sup> Polyethylene glycol diacrylate (PEGDA)

<sup>1</sup> Murphy

### ۳- جوهرهای زیستی

چاپ زیستی به فرآیند الگودهی زیست مواد حاوی سلول (جوهرهای زیستی) در سه بعد گفته می‌شود.



شکل ۳- یک فرآیند معمول چاپ زیستی سه‌بعدی بافت از شش گام تشکیل شده که به ترتیب: تصویربرداری، رویکرد طراحی، انتخاب مواد، انتخاب سلول، چاپ زیستی و کاربرد بافت حاصل هستند [۸].

زنده مانی سلول‌ها در غلظت‌های کم پلیمر مشاهده می‌شود. پیشرفت چاپ زیستی سه‌بعدی به دلیل فقدان جوهرهای زیستی مناسب که قابلیت چاپ، توانایی بالای حفظ شکل و استحکام مکانیکی کافی را دارند، در تنگنا قرار گرفته است. به منظور برطرف کردن این مسئله، جوهرهای زیستی بر پایه کامپوزیت‌های هیدروژل که به سرعت ژل می‌شوند و خاصیت روان شونده با برش از خود نشان می‌دهند، طراحی شده‌اند [۲۸]. جوهرهای زیستی روان شونده با جریان و همچنین تیکسوتروپ نامزدهای مناسبی برای چاپ سه‌بعدی به دلیل رفتار غیرنیوتونی و خواص آسودگی تنش<sup>۱</sup> می‌باشند [۲۹، ۳۰]. شکل ۵ (الف- پ) دو آزمون رئولوژیکی را برای تیکسوتروپی نشان می‌دهند: ۱. لوپ هیستریسیس و ۲. آزمون آسودگی تنش [۱۱]. برای تهیه یک هیدروژل روان شونده با جریان، یک ماده می‌تواند به گونه‌ای طراحی شود که حاوی عاملیت‌هایی با قابلیت تشکیل شبکه‌های فیزیکی مانند پیوند هیدروژنی، شیمی میزبان- میهمان، برهم‌کنش‌های آبگریز و یا ترکیبی از برهم‌کنش‌های فیزیکی در یک سیستم باشد و یا به طور مستقیم با نانومواد پیوند برقرار کند [۳۱-۳۳]. خصوصیات ایده‌آل یک هیدروژل برای چاپ زیستی در شکل ۶ آمده است [۳۴]. به منظور پیشبرد چاپ زیستی، نیازی فوری به توسعه جوهرهای زیستی جدید با قابلیت تنظیم خواص و رویکردهای چاپ زیستی نوین برای بهینه‌سازی قابلیت چاپ جوهر زیستی و زنده‌مانی سلولی و عملکرد وجود دارد.

### ۳-۲- شبکه‌ای شدن جوهرهای زیستی

هیدروژل‌ها تنها دسته‌ای از مواد هستند که سلول‌ها توانایی زنده ماندن درون آن‌ها را حین فرآیند گنجانده شدن دارند. طبق تعریف، هیدروژل‌ها مواد پلیمری با محتوای آب بسیار بالا (وزنی  $>90\%$  آب) هستند که اجازه نفوذ کافی مواد مغذی و زائد به منظور حفظ زنده‌مانی سلول‌های گنجانده شده را می‌دهند. هیدروژل‌ها یکپارچگی ساختاری خود را از طریق تشکیل شبکه‌های فیزیکی و شیمیایی بین زنجیرهای پلیمری حفظ می‌کنند [۲۶]. از میان مواد موجود، هیدروژل‌ها بیشترین شباهت را به بستر خارج سلولی ذاتی بدن انسان دارند. در این بخش به بررسی، وضعیت فعلی پیشرفت جوهرهای زیستی با تمرکز بر جوهرهای زیستی طبیعی پرداخته می‌شود. اگرچه در این بخش به طور مختصر به کاربرد جوهرهای زیستی در انواع روش‌های چاپ زیستی پرداخته می‌شود، اما تمرکز اصلی بر روش‌های چاپ مبتنی بر اکستروژن جوهرهای زیستی و فرمول‌بندی آن‌ها به دلیل بیشترین میزان تنوع و کاربرد این روش چاپ زیستی در مهندسی بافت است.

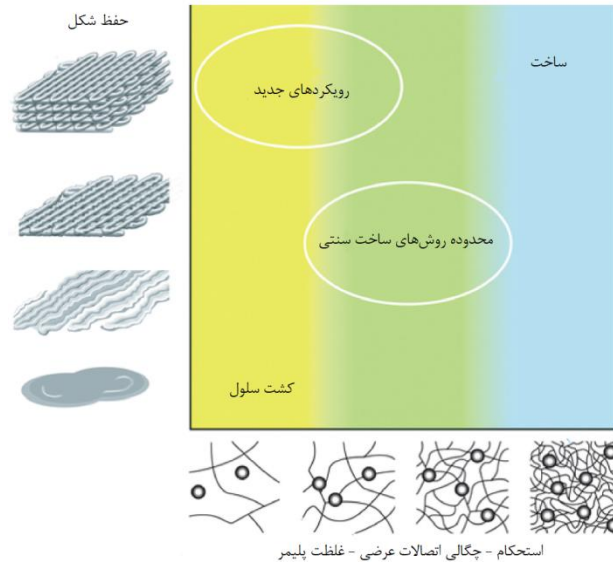
### ۳-۱- نیاز به جوهرهای زیستی با قابلیت تنظیم خواص

تا به امروز، تنها یک پالت محدود از جوهرهای زیستی قابل چاپ که ارائه کننده تنوع زیستی، شیمیایی و مکانیکی مشابه بافت‌های بدن هستند وجود دارد. علاوه بر این، توانایی محدودی برای تنظیم خصوصیات جوهر زیستی بدون تحت تاثیر قرار دادن قابلیت چاپ وجود دارد. یکی از مهم‌ترین عللی که دستیابی به جوهرهای زیستی با خواص قابل تنظیم را دشوار می‌کند، تقابل میان خصوصیات رئولوژیکی، مکانیکی و قابلیت چاپ با زنده‌مانی، گسترش و تمایز سلولی درون جوهر است (شکل ۴) [۲۷]. به عنوان مثال، جوهرهایی که غلظت پلیمر بالایی دارند بهترین قابلیت چاپ سه‌بعدی را از خود نشان می‌دهند، در حالی که بیشترین

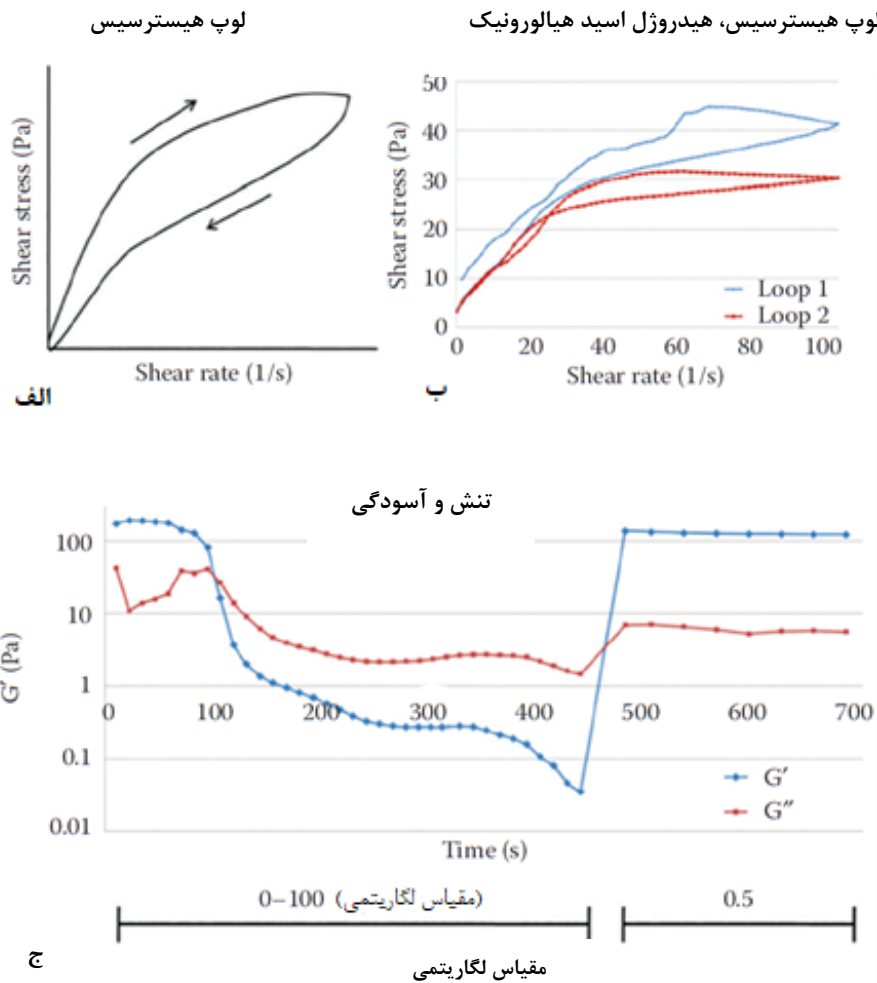
<sup>1</sup> Stress relaxation

واکنش‌های شبکه‌ای شدن مورد استفاده برای جوهرهای زیستی را در نظر داشت.

شبکه‌ای شدن، مرحله‌ای است که محلول پلیمری را به هیدروژل تبدیل می‌کند. شبکه‌ای شدن ممکن است قبل، در طول و یا بعد از فرآیند چاپ ۳ بعدی اتفاق بیفتد. به دلیل حضور سلول‌ها، باید زیست سازگاری



شکل ۴- روش ساخت افزایشی معمولاً از موادی با استحکام، چگالی اتصالات عرضی و غلظت بالای پلیمر جهت حفظ شکل سازه چاپی استفاده می‌کند؛ هرچند، این موضوع اغلب به قیمت از بین رفتن زنده‌مانی سلولی و عملکرد تمام می‌شود [۲۷].





شکل ۵- تنظیم خصوصیات رئولوژیکی به منظور تولید جوهرهای زیستی مناسبتر برای چاپ. تیکستروپی مانند روان شوندگی با برش، می تواند سازگاری جوهرهای زیستی با چاپگرها را بهبود بخشد. (الف و ب) لوبهای هیستریسیس تیکستروتوب- تئوری و تجربی حاصل از آزمون رئولوژیکی برای هیدروژل بر پایه اسید هیالورونیک. (ج) تنش و آسودگی رئولوژیکی بیانگر ویژگی تیکستروپی در این هیدروژل [۱۱].



شکل ۶- خصوصیات ایده آل یک هیدروژل برای چاپ زیستی [۳۴].

سازه های هیدروژل حاوی سلول با دقت بالا را می دهد (معادله ۱) [۳۷].

$$SR = \frac{\text{Printed Fiber Diameter}}{\text{Needle Diameter}} \quad (1)$$

با کنترل مشخصه های دستگاهی از قبیل: فشار، دما، سرعت چاپ، سرعت خوراک دهی، فاصله سر نازل از زیرآیند چاپ، قطر نازل و ویژگی های هیدروژل نظیر: گرانروی، تیکستروپی و سازوکارهای شبکه ای شدن سریع، می توان بازه ی گسترده ای از قطر فیلامنت ایجاد کرد. هدف از ارائه ضریب پخش این است که نشان دهد قطر فیلامنت ایجاد شده چقدر به قطر نازل نزدیک است و در نتیجه بهینه مشخصه های دستگاهی و رئولوژیکی برای هیدروژل مورد نظر در چه شرایطی است. بدین صورت که در این حالت تلاش می شود تا با کنترل تمامی پارامترهای دستگاهی و ویژگی های هیدروژل و استفاده از سازوکارهای مختلف شبکه ای شدن به محض خروج فیلامنت از نازل، قطر فیلامنت چاپی را به قطر نازل استفاده شده نزدیک کرد تا بتوان به سازه هایی با دقت بالا و زندهمانی سلولی مناسب دست یافت. هر چند مشخصه های دیگری نیز در پژوهش های مختلف به عنوان معیاری برای قابلیت چاپ یک جوهر زیستی ارائه شده اند [۳۸].

### ۳-۲-۱- شبکه ای شدن با نور

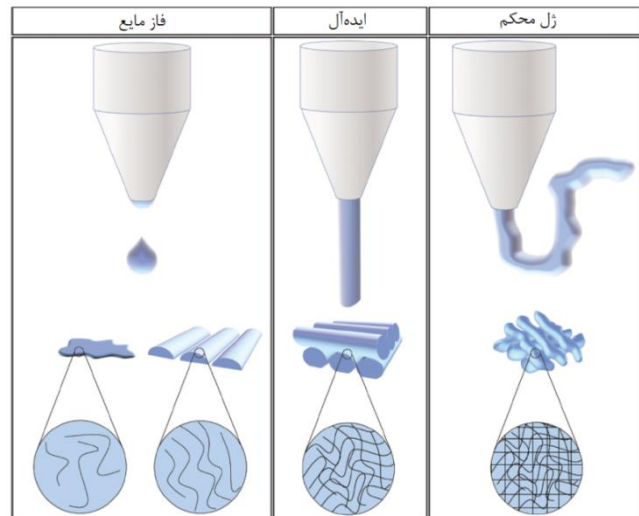
پلیمریزاسیون نوری نوع خاصی از اتصالات عرضی شیمیایی است که توسط نور فعال می شود [۳۹]. به طور معمول در این روش پلیمرهای سنتزی مورد استفاده قرار می گیرند اما، پلیمرهای طبیعی نیز می توانند با گروه های اکریلات یا سایر گروه های عامل دار شده و قابلیت پلیمریزاسیون نوری را پیدا کنند [۴۰، ۴۱]. هیدروژل هایی که قابلیت شبکه ای شدن با نور را دارند، در سالهای اخیر توجه زیادی را برای چاپ زیستی سه بعدی

به طور کلی، شبکه ای شدن می تواند به صورت فیزیکی یا شیمیایی باشد. اتصالات عرضی فیزیکی بوسیله پیوند یونی، پیوند هیدروژنی، نیروهای آبریز و گره خوردگی های مولکولی شکل می گیرند. اتصالات عرضی فیزیکی قابل بازگشت هستند. اگر چه این بازگشت پذیری اجازه می دهد که جوهر زیستی به صورت شبکه ای چاپ شود، می تواند برای کاربرد نهایی آن مشکل ساز باشد. به عنوان مثال، اتصالات عرضی یونی در معرض انحلال در محیط کشت یا در شرایط داخل بدن هستند که در آن غلظت کاتیون های دو ظرفیتی موضعی می توانند کلسیم را از ژل خارج کنند. از طرف دیگر، اتصالات عرضی شیمیایی با پیوند کووالانسی بین زنجیره های پلیمری شکل می گیرند. پیوندهای عرضی شیمیایی دائم هستند، بنابراین جوهرهای زیستی کاملاً شبکه ای شده قابل چاپ نیستند چون برای خارج شدن از قطر کم نازل بسیار محکم هستند. هنگام کار با هیدروژل ها که فرآیند تشکیل ژل آن ها وابسته به زمان است، چاپ با روش های اکستروژن می تواند مشکل باشد. اشتباه زمانی در فرآیند لایه نشانی می تواند منجر به ساختاری شود که پس از چاپ فرو می پاشد زیرا فرآیند شبکه ای شدن به اندازه کافی سریع نبوده و یا برعکس، گرفتگی سر سرنگ چاپگر را به عنوان نتیجه ای از پلیمری شدن سریع قبل از لایه نشانی را نتیجه می دهد [۱۱]. برای غلبه بر این چالش ها، برخی از محققان جوهرهای با چگالی شبکه ای کم را چاپ کرده و سپس ویژگی های مکانیکی را پس از چاپ با یک گام شبکه ای شدن ثانویه افزایش می دهند [۳۶، ۳۵].

با پیشرفت چاپ زیستی اکستروژنی، قابلیت چاپ نیز به مرور تعریف کمی تری پیدا کرده است. شکل ۷ یک تعریف کیفی از قابلیت چاپ را نشان می دهد [۱۱]. ضریب پخش یکی از معیارهای مناسب به منظور بررسی قابلیت چاپ می باشد که مقادیر کوچک آن اجازه ساخت

می تواند مستقیماً پس از خروج از نازل و یا در یک روش لایه به لایه، در معرض پرتو فرابنفش قرار گیرد و یک ساختار خود-پشتیبان را ایجاد کند. با این حال، این استراتژی منجر به در معرض قرار گرفتن فزاینده پرتو فرابنفش در لایه‌های اولیه چاپی می‌شود که ممکن است بر زنده مانی سلول‌ها تاثیر بگذارد. به علاوه، ماهیت سمی شروع‌کننده نوری مسئله نگران‌کننده دیگری در بکارگیری پلیمری شدن نوری در جوهرهای زیستی است. با این حال، بیلیت<sup>۲</sup> و همکاران<sup>۳</sup> [۴۴] نشان دادند که برخی شروع‌کننده‌های خاص زیست سازگارتر هستند. به عنوان مثال، VA-086 منجر به زنده مانی بیشتر سلول‌ها در مقایسه با شروع‌کننده سنتی ایرگاور<sup>۳</sup> ۲۹۵۹ شد. مهم‌ترین شروع‌کننده‌های نوری مورد استفاده در مهندسی بافت و طول موج ماکسیمم جذب آن‌ها در شکل ۸ نشان داده شده است [۴۵]. لازم به ذکر است که جوهرهای زیستی می‌توانند ترکیبی از شبکه‌ای شدن فیزیکی و شیمیایی را داشته باشند. مطالعات بسیاری روی روش‌های نوین شبکه‌ای شدن شیمیایی و پلیمری شدن نوری به منظور تسهیل کنترل فضایی و موقتی بر روی خواص جوهرهای زیستی که می‌توانند حاوی سلول‌های گنجانده شده برای چاپ ساختارهای سه‌بعدی باشد، به کار گرفته شده‌اند [۴۶، ۴۷]. به عنوان مثال، پیرا<sup>۴</sup> و همکارانش [۳۶] یک هیدروژل تک جزئی (با غلظت کم پلیمر: ۱/۵ درصد وزنی) با چگالی لیگاند‌های چسبندگی سلول کنترل شده، خواص مکانیکی و رفتار رئولوژیکی قابل تنظیم را برای چاپ بر پایه اکستروژن تهیه کرده و به منظور ایجاد ساختارهای سه‌بعدی پوستی مورد استفاده قرار دادند. آن‌ها در پژوهش خود پلیمر پکتین را با متاکریلات اصلاح کرده و از دو سازوکار شبکه‌ای شدن یونی با یون کلسیم و نوری با تابش فرابنفش برای تشکیل هیدروژل استفاده کردند (شکل ۹). از میان شروع‌کننده‌های نوری موجود، آن‌هایی که توانایی فعال شدن با نور مرئی را دارند، بدلیل امکان آسیب پرتو فرابنفش به سلول‌ها و بافت‌ها ارجح‌تر هستند.

به خود جلب کرده‌اند زیرا این مواد، پلیمریزاسیون سریعی را تحت شرایط سازگار با سلول دارند و کنترل زمانی- مکانی استثنایی را در فرآیند ژل شدن فراهم می‌کنند. همچنین می‌توان پلیمری شدن نوری را در حین چاپ زیستی انجام داد تا تشکیل هیدروژل به صورت آنی و با معماری دقیق و پایداری ساختاری را نتیجه دهد.



شکل ۷- مفهوم کیفی قابلیت چاپ. جوهرهای چاپی ایده‌آل در رشته‌های خطی چاپ شده، می‌توانند هندسه مشخص را حفظ کنند. ولی جوهرهای زیستی غیرایده‌آل یا بسیار نرم و یا بسیار سفت هستند، قابلیت حفظ شکل نداشته و یا تنش زیادی را روی سلول‌های گنجانده شده وارد می‌آورند [۱۱].

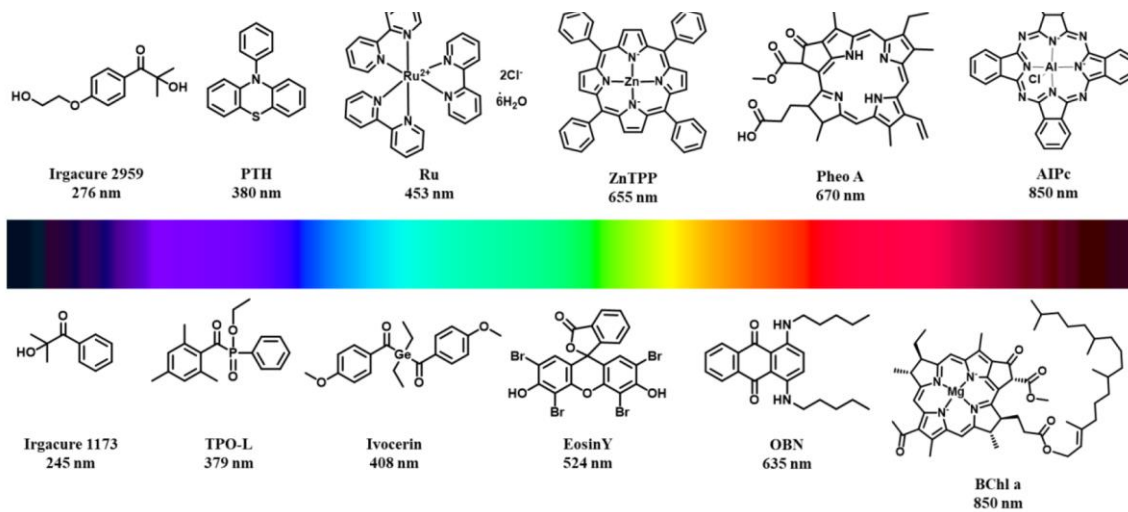
در مواجهه با پرتو فرابنفش، چه با و چه بدون شروع‌کننده نوری، فرآیند پلیمریزاسیون رادیکال آزاد سریع اکریلات‌ها انجام خواهد شد [۴۲]. تسانگ<sup>۱</sup> و همکارانش [۴۳] از این روش را برای ساخت سازه‌های ۳ بعدی lobule-مانند با استفاده از پلی‌اتیلن گلیکول دی‌اکریلات بکار بردند. پلیمریزاسیون نوری توسط اشعه فرابنفش یک سازوکار تثبیت ثانویه برای سیستم‌های سه‌بعدی مبتنی بر اکستروژن است، چرا که یک ماده

<sup>2</sup> Billiet

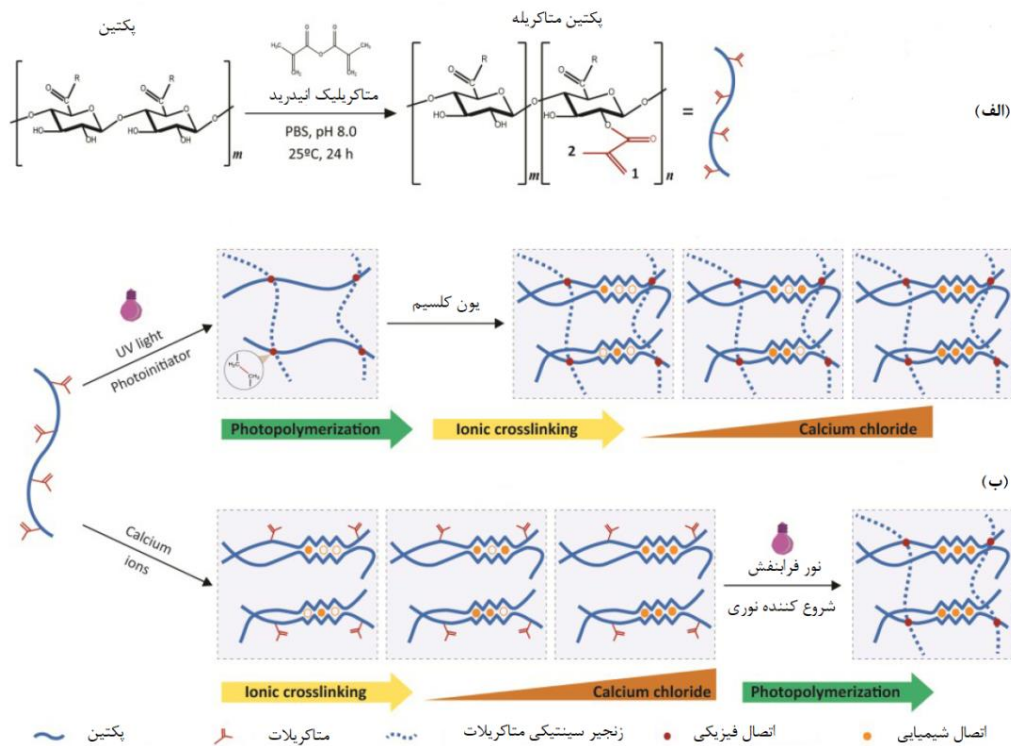
<sup>3</sup> Irgacure 2959

<sup>4</sup> Pereira

<sup>1</sup> Tsang



شکل ۸- مهم‌ترین شروع‌کننده‌های نوری موجود و طول موج بیشینه جذب آن‌ها [۴۵].



شکل ۹- اصلاح شیمیایی پکتین و روش‌های آماده‌سازی هیدروژل‌های به دو روش شبکه‌ای شده. (الف) اصلاح پکتین با گروه‌های متاکریلات. (ب) تنوع سازوکارهای شبکه‌ای شدن تشکیل هیدروژل پکتین متاکریله [۳۶].

همکارانش [۴۸] شرایط غیرسمی برای گنجاندن سلول‌های بنیادی مزانشیمی<sup>۳</sup> (MSCs) درون داربست‌های PEGDA با استفاده از سیستم شروع کننده‌های نوری متشکل از اتوزین Y، تری‌اتانول‌آمین و ۱-وینیل-۲-پیرولیدون فراهم کردند. این سیستم شروع کننده داربست‌های هیدروژلی با زنده‌مانی بالاتر سلول‌های MSCs و شبکه‌ی محکم‌تر در یک سوم زمان پلیمرشدن نوری با نور فرابنفش با ایرکیور ۲۹۵۹ ایجاد کرد.

سامانه‌های شروع کننده نور مرئی اتوزین Y، تری‌اتانول‌آمین و ۱-وینیل-۲-پیرولیدون (اتوزین Y به عنوان شروع کننده، تری‌اتانول‌آمین به عنوان شروع کننده کمکی و ۱-وینیل-۲-پیرولیدون به عنوان افزایش دهنده سرعت فرآیند ژل شدن) با تشکیل کمپلکس با اتوزین Y در حالت پایه) و Ru(II)bpy<sub>3</sub><sup>2+</sup>/SPS<sup>۱</sup> به میزان گسترده در مهندسی بافت برای پلیمریزاسیون نوری هیدروژل‌ها به کار گرفته شده‌اند [۴۸-۵۰]. باهنی<sup>۲</sup> و

<sup>۱</sup> Sodium Ammonium Persulfate (SPS)

<sup>۲</sup> Bahney

<sup>۳</sup> Mesenchymal stem cells (MSCs)

## ۳-۳- جوهرهای زیستی طبیعی

همانگونه که اشاره شد، جوهرهای زیستی به دو دسته طبیعی و سنتزی تقسیم می‌شوند. جوهرهای زیستی طبیعی، یا جوهرهای زیستی ساخته شده از پلیمرهای طبیعی، به طور گسترده‌ای در کاربردهای مهندسی بافت بکار گرفته شده‌اند. در مقایسه با جوهرهای زیستی سنتزی، اغلب جوهرهای زیستی طبیعی ذاتاً دارای محرک‌های زیست فعال جهت چسبندگی سلولی، سیگنال‌دهی و زیست‌تخریب‌پذیری هستند. با این حال، جوهرهای زیستی طبیعی معایبی نیز دارند که به طور عمده مربوط به نحوه تولید پلیمرهای طبیعی است

به ویژه، از آنجایی که آن‌ها از منابع طبیعی استخراج می‌شوند، تکرارپذیری ضعیفی دارند. علاوه بر این پلیمرهای طبیعی ممکن است هنگامی که در بدن جایگزاری می‌شوند، سبب تحریک پاسخ ایمنی بدن به دلیل تفاوت منبع پلیمری گونه مورد نظر با انسان و یا عفونت شوند. سرانجام، در سیستم‌های پلیمری طبیعی، اغلب قابلیت تنظیم خواص مکانیکی یا تخریب‌پذیری محدود می‌باشد. انتخاب هیدروژل‌ها برای جوهرهای زیستی باید با نوع بافت بازسازی شده مطابقت داشته باشد. به عنوان مثال، هیدروژل‌های با قابلیت تخریب زیستی محدود یا آهسته و خواص مکانیکی بالاتر مانند آلژینات، آگروز و متیل سلولز اغلب برای بافت غضروف بکار می‌روند [۵۳-۵۱]. در حالی که هیدروژل‌های فعال زیستی مانند ژلاتین، کلاژن، فیبرین و پپتید با توانایی پشتیبانی از چسبندگی سلولی معمولاً برای بافت‌های قلبی عروقی بکار گرفته می‌شوند [۵۶-۵۴]. بررسی دقیق‌تر جوهرهای زیستی سنتزی از حوزه بررسی این مقاله خارج بوده و در این بخش به بررسی جوهرهای زیستی طبیعی (که به عنوان جوهرهای زیستی کاربرد بسیار گسترده‌تری داشته و پژوهش‌های اخیر عمدتاً بر استفاده از آن‌ها متمرکز شده است) از نظر ساختار شیمیایی، خواص، فرمول‌بندی، تهیه و کاربرد پرداخته می‌شود.

## ۳-۳-۱- پروتئین‌ها

## ۳-۳-۱-۱- کلاژن

کلاژن فراوان‌ترین پروتئین در بدن انسان است و به همین دلیل پرکاربردترین پلیمر طبیعی در مهندسی بافت به شمار می‌رود. کلاژن دارای محل‌های چسبندگی سلول (RGD) بوده و توسط متالوپروتئازهای بستر سلولی قابل تخریب است. مولکول کلاژن از سه زنجیره پلی‌پپتیدی تشکیل شده است به دور یکدیگر پیچیده شده‌اند تا یک مارپیچ سه گانه را تشکیل دهند که توسط پیوندهای کووالانسی در کنار یکدیگر نگه‌داشته شده است. مولکول‌های کلاژن با خود چیدمانی فیبرهای کلاژن را تشکیل می‌دهند. کلاژن با هضم جزئی توسط اسید و / یا آنزیم‌ها محلول می‌شود. وقتی این محلول کلاژن خنثی شود و گرما ببیند (۲۰ الی ۳۷ درجه سانتیگراد)، مونومرها و الیگومرهای کلاژن با خودچیدمانی، هیدروژلی با اتصالات عرضی فیزیکی را تشکیل می‌دهند. بدلیل این که کلاژن در شرایط فیزیولوژیکی ژل‌های شبکه‌ای شده فیزیکی را تشکیل می‌دهد، می‌توان از آن مستقیماً به عنوان جوهر زیستی برای گنجاندن

سلول‌ها استفاده کرد. اتلوکلاژن<sup>۱</sup>، یک شکل محلول در آب از کلاژن است که توسط اصلاح پروتئاز تولید می‌شود و تقریباً تمام خصوصیات کلاژن را حفظ می‌کند. متأسفانه، یکی از محدودیت‌های شدید جوهرهای زیستی کلاژن و اتلوکلاژن، استحکام مکانیکی ضعیف آن‌ها است. جوهرهای کلاژن با کسر وزنی بالا می‌توانند خواص مکانیکی بهبودیافته را از خود نشان دهند؛ ولی این جوهرها بدلیل وجود شبکه‌های متراکم پلیمری که مانع نفوذ مواد مغذی / زاید و محدود کردن گسترش و مهاجرت سلول‌ها می‌شوند، برای زنده مانی و رشد سلول‌ها مناسب نیستند [۱۱]. می‌توان از طریق اصلاح کلاژن با عوامل شبکه‌ای کننده شیمیایی مانند: کربودی‌ایمید و گلو تار آل‌دئید استحکام این هیدروژل‌ها را افزایش داد. اما همانطور که قبلاً ذکر شد این مواد شبکه‌ای کننده شیمیایی بوده و می‌توانند سمی باشند. علاوه بر این‌ها، به دلیل حساسیت مولکول‌های کلاژن به دمای چاپ، چاپ سنتی این زیست‌پلیمر بسیار دشوار است. با وجود این خواص مکانیکی نامطلوب و شرایط سخت چاپ، کلاژن با استفاده از رویکردهای مختلف، بطور سه‌بعدی چاپ شده است [۵۷]. ادونسد بیوماتریکس<sup>۲</sup> اولین شرکتی است که توانست ساخت جوهرهای زیستی از کلاژن نوع ۱ خالص را تجاری‌سازی کند. اتصال دهنده‌های شیمیایی زیست‌سازگارتر، مانند: اسید تانیک، گنیپین<sup>۳</sup> یا ویتامین B2 به منظور دستیابی همزمان به یکپارچگی ساختاری و زنده مانی سلولی بکار گرفته شده‌اند [۶۰-۵۸]. هینتون<sup>۴</sup> و همکارانش [۶۱] زنده مانی بالای سلول‌ها را در هنگام چاپ کلاژن و جوهرهای چند جزئی حاوی کلاژن را در حمام پشتیبان میکروذرات ژلاتین نشان دادند.

## ۳-۳-۱-۲- ژلاتین

ژلاتین از طریق آبکافت جزئی کلاژن بدست می‌آید. ژلاتین بسیاری از ویژگی‌های کلاژن از جمله موقعیت‌های چسبندگی سلول‌ها (RGD)، محل‌های تخریب سلولی و توانایی ایجاد مارپیچ‌های سه‌گانه را دارا است. با این حال، ژلاتین قادر به ایجاد فیبرهای طولانی نیست. ژلاتین می‌تواند به راحتی در آب گرم یا بافر بدون نیاز به اسید یا آنزیم‌ها حل شود. به طور خلاصه، ژلاتین بسیاری از خواص زیستی کلاژن را حفظ می‌کند، اما استفاده از آن ساده تر است. از آنجایی که ژلاتین در دمای فیزیولوژیکی محلول است، شبکه‌ای شدن شیمیایی برای کشت سلولی و مطالعات داخل بدن ضروری است. ژلاتین به‌طور گسترده‌ای در مهندسی بافت به کار برده می‌شود. ساختار داربست ژلاتینی به وسیله‌ی اتصالات عرضی که بین مواد تشکیل دهنده‌ی ژل در یک دمای پایین برقرار می‌شود، تثبیت می‌شود. اما در دمای فیزیولوژیکی، گرانشی ژلاتین به‌طور قابل ملاحظه‌ای پایین است [۶۲].

ماتریک‌ریلاته کردن ژلاتین یک روش رایج برای ساخت داربست ژلاتینی با

<sup>1</sup> Atelocollagen

<sup>2</sup> Advanced biomatrix

<sup>3</sup> Genipin

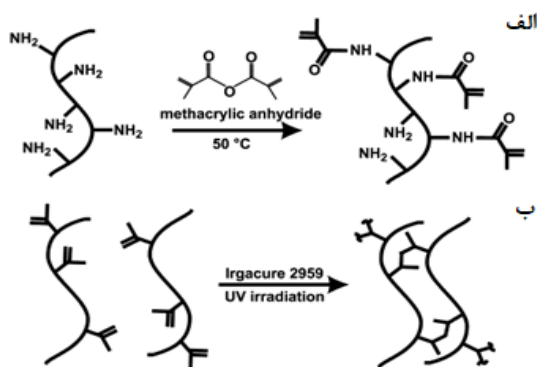
<sup>4</sup> Hinton

سایر محرک‌های پیوند سلولی مانند پلی‌آرژینین را در خود دارد که مطابق با تحقیقات انجام شده، توانایی برهم‌کنش با ایزوفرم‌های اینتگرین موجود در کاردیومیوسیت‌ها را داشته که سبب چسبندگی و رشد سریع‌تر این سلول‌ها می‌شود [۷۳]. خصوصیت قابل توجه دیگر این پروتئین ابریشم غیرتوت، نسبت نواحی بی‌شکل به نواحی بتا- بلوری در ساختار دوم آن است [۷۴]. حضور این نواحی بی‌شکل در آرایش فشرده بتا-تانوبلورها، سبب خصوصیات الاستیک عالی و تنش تسلیم بالای این نوع سیلک فیبروین در مقایسه با سیلک فیبروین معمول توت (*Bombix mori*) شده است [۷۵]. ولی خواص رئولوژیکی و انحلال پایین (کمتر از ۶٪ حجمی) سیلک فیبروین چاپ آن را دشوار کرده و نیاز به بکارگیری سایر زیست مواد به همراه آن برای بهبود خواص چاپ‌پذیری و زیست‌فعالی این پروتئین است [۷۶]. ابریشم به راحتی در حضور هورس‌ادیش پروکسیداز<sup>۹</sup> و آب اکسیژنه به صورت آنزیمی شبکه‌ای می‌شود.

### ۳-۳-۲- پلی ساکاریدها

#### ۳-۳-۲-۱- آلزینات

آلزینات یک زیست پلیمر طبیعی است که از دیواره‌ی سلول‌های جلبک دریایی قهوه‌ای یا باکتری استخراج می‌شود که به‌طور گسترده‌ای به عنوان یک ماده‌ی زیستی از آن استفاده می‌شود. آلزینات یک پلی ساکارید آنیونی خطی آگریز از مونومرهای اسید دی-مانورونیک<sup>۱۱</sup> (M) و اسید ال-گلورونیک<sup>۱۲</sup> (G) است (شکل ۱۱) [۷۷]. ترتیب مونومرهای M و G درون پلی ساکارید (MMM، GGG یا GMG) به منبعی که از آن جدا شده است، بستگی دارد. طول زنجیر و درصد هر یک از واحدهای تکرار شونده بر خصوصیات آلزینات تاثیرگذار است. محتوی بالای MA سبب القای انعطاف‌پذیری (بدلیل تشکیل شکل فضایی خطی) زنجیر شده در حالی که محتوی بالای GA به ژل شدن کمک می‌کند (که خود سبب القای سختی در ساختار می‌شود).



شکل ۱۰- سنتز ژلاتین متاکریله. (الف) ماکرومرهای ژلاتین آمین‌دار با متاکریلیک انیدرید واکنش داده تا گروه‌های عاملی متاکریلاتی را ایجاد کنند. (ب) به منظور تشکیل شبکه، ژلاتین متاکریله در حضور شروع‌کننده نوری تحت تابش فرابنفش پخت شد [۶۴].

قابلیت چاپ و ثبات شکلی در دمای فیزیولوژیکی است [۶۳]. رایج‌ترین شکل از ژلاتین عامل دار، ژلاتین متاکریلات<sup>۱</sup> (GelMA) است که می‌تواند توسط نور پلیمریزه شود. شکل ۱۰ واکنش سنتز GelMA و شبکه‌ای شدن آن با پرتو فرابنفش را نشان می‌دهد [۶۴]. کولسکی<sup>۲</sup> و همکارانش [۶۵] زنده‌مانی خوب سلول‌ها را هنگام چاپ همزمان جوهر GelMA شبکه‌ای شده با نور و جوهرهای فداشونده پلورونیک به عنوان پشتیبان نشان دادند. خادم حسینی<sup>۳</sup> و همکارانش در نمونه‌های متعددی توانایی چاپ GelMA به تنهایی یا در ترکیب با آلزینات، با استفاده از نازل‌های معمول یا کوآکسیال را نشان دادند [۶۶، ۶۷]. لیو<sup>۴</sup> و همکارانش [۶۸] هیدروژل‌های کامپوزیتی آلزینات-GelMA محتوی لیاژ<sup>۱</sup> آلزینات (آنزیمی که توانایی تخریب آلزینات را دارد) را چاپ کردند. در حین چاپ، ساختار شکل توسط شبکه‌ای شدن فیزیکی سریع آلزینات و درصد وزنی بالای پلیمر حفظ شد. در حالی که در گذر زمان، تخریب در حضور آنزیم سبب حذف ماتریکس آلزینات شد و تنها GelMA باقی ماند و در نتیجه گسترش و تکثیر سلولی افزایش یافت که به معنی بهبود زیست‌فعالی<sup>۱</sup> داربست بود. جوهرهای ژلاتین اکریلات سینتیک واکنش بهتری نسبت به GelMA دارند، استحام مکانیکی بیشتری داشته و قابلیت زنده‌مانی سلول بالاتری دارند [۶۹]. تیول دار کردن ژلاتین نیز جوهرهای زیستی را نتیجه می‌دهد که می‌توانند به روش سلول-دوستانه‌تر، به طور شیمیایی با استفاده از اکریلات‌ها، آلکین‌ها، مالمییدها و یا وینیل سولفون‌ها شبکه‌ای شوند. برای نمونه، اسکاردا<sup>۵</sup> و همکارانش [۴۷] از دو واکنش متمایز تیول-اکریلات و تیول-آلکین فعال با تابش فرابنفش استفاده کردند تا یک ساختار نهایی با استحکام قابل تنظیم ایجاد کنند.

### ۳-۳-۱-۳- ابریشم

فیبر پروتئینی ابریشم به طور عمده از فیبروین تشکیل شده و توسط لارو حشرات خاصی برای شکل گیری پيله تولید می‌شود. از میان زیست مواد طبیعی، ابریشم بدلیل استحکام مکانیکی، زیست تخریب پذیری و خطر رد پاسخ ایمنی پایین جایگاه ویژه‌ای را در مهندسی بافت پیدا کرده است [۷۰]. علاوه براین، مشاهدات حاکی از توانایی این پروتئین در تسریع فرآیند ترمیم زخم است [۷۱، ۷۲]. ادمان<sup>۶</sup> و همکاران [۶] با استفاده از جوهر زیستی برپایه ابریشم-ژلاتین ساخت مدل سه‌بعدی پوست با ضخامت کامل را به وسیله چاپ زیستی بر پایه سلول‌های انسانی فیبروبلاست و کراتینوسیت گزارش کردند که از لحاظ ساختاری، مکانیکی و بیوشیمیایی تقریباً مشابه پوست انسان است.

در مقایسه با ابریشم توت<sup>۷</sup> که رشد سلولی در آن محدود است، ابریشم غیر توت<sup>۸</sup>، توالی ذاتی آرژینیل گلیسیدیل اسپارتیک اسید<sup>۹</sup> (RGD) و سایر

<sup>1</sup> Methacrylated gelatin (GelMA)

<sup>2</sup> Kolesky

<sup>3</sup> Khademhosseini

<sup>4</sup> Liu

<sup>5</sup> Skardal

<sup>6</sup> Admane

<sup>7</sup> Mulberry

<sup>8</sup> Non-mulberry

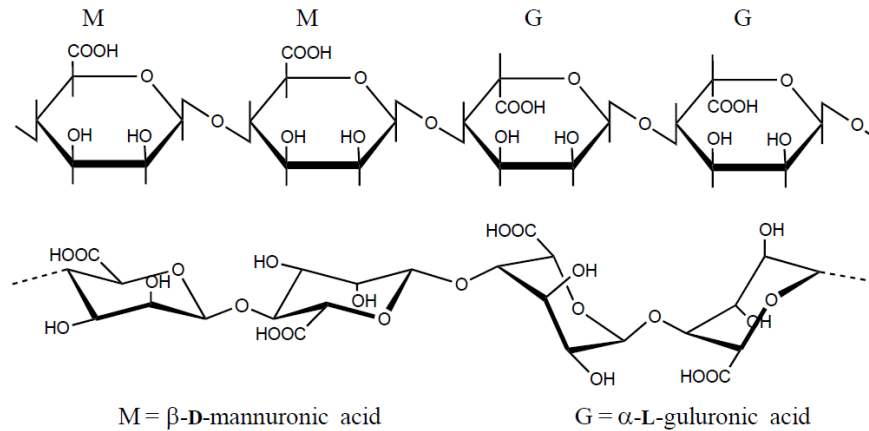
<sup>9</sup> Arginylglycylaspartic acid

<sup>10</sup> Horseradish peroxidase

<sup>11</sup> D-mannuronic

<sup>12</sup> L-gluronic





شکل (۱) - ساختار آلزینات با سگمنت‌های ...MMGG... [۸۲]

مخلوط شوند تا قابلیت چاپ و خواص مناسب‌تری را بدست بیاورند [۵۲]. جدول برخی از پژوهش‌هایی که از آلزینات در چاپ زیستی سه‌بعدی استفاده کردند به همراه مشاهدات بدست آمده پس از تغییر مشخصه‌ها قبل/در حین/ بعد از فرآیند چاپ در جدول ۲ آمده است [۲].

### ۳-۲-۳-۲- اسید هیالورونیک<sup>۲</sup> (HA)

اسید هیالورونیک (HA) یک پلی ساکارید خطی است که از واحدهای دی ساکارید تکرار شونده اسید بتا-دی-گلورونیک و ان-استیل-بی-دی-گلوکزآمین<sup>۳</sup> تشکیل شده است. HA تقریباً در بافت و مایع تمامی پستانداران یافت می‌شود. هیدروژل‌های HA می‌توانند به صورت کووالانسی با مشتقات هیدرازید، اپوکسیدهای چندعاملی، کربودیمییدها، خود چیدمانی و واکنش‌های استری شدن شبکه‌ای شوند [۹۳]. HA حاوی گروه‌های عملکردی هیدروکسیل و استامید است، که می‌تواند به منظور ایجاد اتصال عرضی یا اصلاح شیمیایی برای شبکه‌ای شدن توسط روش‌های جایگزین و یا قرار دادن مولکول‌های زیست‌فعال در ساختار آن بکار گرفته شود [۹۴]. HA متاکریلاته با قابلیت شبکه‌ای شدن با نور به عنوان عامل تثبیت کننده در جوهرهای ژلاتین یا سایر جوهرهای چند جزئی گنجانده شده است [۹۵]. HA به شدت هیدراته است و بنابراین معمولاً به جوهرها برای افزایش گرانشی به منظور بهبود قابلیت چاپ اضافه می‌شود. برای مثال، کانگ<sup>۴</sup> و همکارانش [۹۶] با الهام از این موضوع، یک جوهر چند جزئی بر پایه ژلاتین، فیبرینون، گلیسرول و HA با قابلیت چاپ مناسب تهیه کرده و به منظور بازساخت عضله اسکلتی بکار گرفتند. در پژوهشی، اسید هیالورونیک اصلاح شده با تیول (HA-SH) با پلی (گلیسیدول)‌های اصلاح شده با آلایل (P (AGE-co-G)) از طریق سازوکار جفت شدن تیول-ان القا شده توسط پرتو فرابنفش شبکه‌ای شد. با افزودن HA اصلاح نشده اضافی، استیچلر<sup>۵</sup> و همکارانش

محتوی G، بیشتر آلزینات‌های حاصل از جلبک بین ۳۰٪ تا ۷۰٪ است [۷۸]. آلزینات زیست سازگار بوده، حلالیت خوبی داشته، از تخلخل مناسبی برخوردار بوده (این موضوع به نفوذ مواد مغذی از درون حفره‌ها کمک می‌کند)، در درون بدن یا محیط آزمایشگاهی (محدودیت محیط برای رشد سلولی) تخریب پذیر بوده، گرانشی آن به آسانی با غلظت قابل تنظیم بوده و رفتار نرم شونده با برش از خود نشان می‌دهد که این مزایا سبب کاربرد گسترده این زیست‌ماده در کاربردهای زیستی (ترمیم زخم، مهندسی بافت، رهایش دارو و پروتئین، ایمپلنت‌ها، تحقیقات درباره مفاهیم پایه بدن و بیماری‌ها و سایر کاربردها (غشاهای جذب جیوه و غیره) شده است [۷۷، ۷۰-۸۱، ۲].

علی‌رغم تمام ویژگی‌های مفید ذکر شده، آلزینات‌ها پایداری مکانیکی (مدول، استحکام و غیره)، پایداری زیستی (چسبندگی سلولی) نبود آن می‌تواند مانع از تکثیر سلول‌ها شود و زیست تخریب پذیری کافی را بدلیل نبود مولکول‌های آرژینیل گلیسیدیل اسپارتیک اسید (RGD) (مسئول چسبندگی سلولی) در ساختار خود ندارند [۸۳]. به منظور رفع این مشکلات، زنجیرهای بلند آلزینات با یون‌های دو ظرفیتی کلسیم ( $Ca^{+2}$ )، باریم ( $Ba^{+2}$ )، منیزیم ( $Mg^{+2}$ ) و استرانسیم ( $Sr^{+2}$ ) شبکه‌ای می‌شوند که سبب تقویت ژل شدن آلزینات و به طبع آن گنجاندن سلول‌ها می‌شود [۲]. از میان یون‌های دو ظرفیتی اشاره شده،  $Ca^{+2}$  بدلیل سمی نبودن بیش از همه به منظور شبکه‌ای کردن آلزینات به کار گرفته می‌شود. علاوه بر این، به منظور بهبود سرعت تخریب پذیری آلزینات می‌توان این ترکیب را اکسید کرده و با ایجاد گروه‌های آلدهید در ساختار آن سرعت تخریب پذیری را افزایش داد [۷۷]. علاوه بر این، آلزینات، می‌تواند به آسانی با پپتیدهای چسبنده (RGD) [۸۴] یا عوامل رشد<sup>۱</sup> [۸۵]، عامل دار شود تا خصوصیات زیستی این زیست ماده بهبود یابد که این موضوع علاوه بر بهبود زنده‌مانی سلول‌های گنجانده شده، برای تحریک و سرعت بخشیدن به فرآیند ترمیم زخم نیز مفید است [۸۵]. به علاوه، جوهرهای زیستی بر پایه آلزینات می‌توانند با سایر مواد

<sup>2</sup> Hyaluronic acid (HA)

<sup>3</sup> N-acetyl-b-D-glucosamine

<sup>4</sup> Kang

<sup>5</sup> Stichler

<sup>1</sup> Growth factors

[۹۷]، گرانروی جوهر زیستی را بدون کاهش زنده‌مانی سلول‌های کندروسیت افزایش دادند. اما حتی با این افزایش گرانروی، هنوز هم یک چارچوب پلی(کاپرولاکتون)<sup>۱</sup> (PCL) به منظور دستیابی به شکل مطلوب با این جوهر زیستی (HA-SH / P (AGE-co-G) نیاز بود.

### ۳-۲-۳-۳- کیتوسان و کیتین

کیتوسان و کیتین کوپلیمرهای پلی ساکارید مشتق‌شده از صدف، از آرایش تصادفی یا بلوکی مونومرهای ان-استیل-گلوکزآمین و ان-گلوکزآمین تشکیل شده‌اند [۹۸]. کیتین در بیشتر حلال‌های معمول نامحلول بوده و بنابراین، معمولاً در فرآیند دی‌استیلاسیون به کیتوسان تبدیل شده تا انحلال آن بهبود یابد. کیتوسان توسط آنزیم‌های موجود در پستانداران (مانند: لیزوزیم) قابل تخریب است و از نظر ساختاری شبیه به گلیکوزآمینوگلیکان‌های پستانداران است.

کیتوسان در اسیدهای رقیق قابل حل بوده و در pH خنثی ژل می‌شود. گو<sup>۲</sup> و همکارانش [۹۹] یک جوهر زیستی چند جزئی متشکل از آلژینات، کربوکسی متیل کیتوسان و آگارز برای چاپ زیستی سلول‌های بنیادی عصبی انسان بکار گرفتند. مهم‌تر از همه، توزیع همگن سلول‌ها در طول فرآیند چاپ جوهر حفظ شد. آگارز گرانروی جوهر زیستی را افزایش داده و آن را برای چاپ سه‌بعدی مناسب کرد. مولفه آلژینات برای شبکه‌ای کردن یونی پس از چاپ اهمیت داشت و کیتوسان زنده‌مانی سلول‌ها را بهبود بخشید. نسبت آلژینات: آگارز: کیتوسان برای تنظیم ویژگی‌های مکانیکی بیوانک و بررسی چگونگی تاثیر استحکام روی رفتار سلول‌های بنیادی عصبی قابل دستکاری بود.

<sup>2</sup>Gu

### <sup>1</sup> Poly(caprolactone) (PCL)

جدول ۲- پژوهش‌هایی که از آلژینات در چاپ زیستی سه‌بعدی استفاده کردند به همراه مشاهدات بدست آمده پس از تغییر پارامترها قبل/در حین/بعد از فرآیند چاپ.

مراجع	نتایج	پارامترها	سلول‌ها	مواد
[۳۷]	آلژینات با وزن مولکولی بالا = ۲۵:۹ (عامل ایجاد اتصال عرضی : آلژینات) برای گرانروی و حداقل ضریب پخش بهینه است. خصوصیات مکانیکی تقویت شده، برای ۲۱ روز هیچ تخریبی گزارش نشد. آلژینات با وزن مولکولی پایین = ۴:۳ برای ضریب پخش حداقل بهینه است، برای نسبت بیشتر ← غیرقابل چاپ، تخریب سریع میزان عامل شبکه‌ای کننده برای آلژینات با وزن مولکولی پایین > آلژینات با وزن مولکولی بالا	وزن مولکولی آلژینات	سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان	آلژینات
[۵۱]	اکسیداسیون α (گرانروی) - ۱ α زنده‌مانی سلول، تکثیر، تخریب‌پذیری گرانروی بالا در ۳۰۰ mm <sup>2</sup> /s ← سلول‌ها به صورت همگن پخش شدند. افزایش هم‌زمان درجه اکسیداسیون و غلظت ← بهبود قابلیت چاپ، زنده‌مانی سلولی، وضوح چاپ در مقایسه با آلژینات تنها، افزودن ژلاتین سبب بهبود قابلیت چاپ و زنده‌مانی سلولی شد.	غلظت و درجه اکسیدشدن	سلول‌های بنیادی مشتق شده از چربی انسان	اکسید آلژینات
[۸۶]	غلظت آلژینات α گرانروی فاصله بین سطح و نازل α عرض خطوط α (سرعت نفوذ هیدروژل) - ۱ غلظت ژلاتین α G', گرانروی α - 1(tanδ) α یک‌پارچگی ساختار	غلظت و عرض خط	فیبروبلاست L929 موش	آلژینات-ژلاتین
[۸۷]	۰/۴۵ ≤ tanδ ≤ ۰/۲۵ برای چاپ روان، یک‌پارچگی ساختار گرانروی α مرگ سلول، استحکام	غلظت	-	آلژینات-ژلاتین
[۳۵]	فاصله‌ی بین دهانه و CaCl <sub>2</sub> باید بهینه باشد. اگر خیلی نزدیک باشد CaCl <sub>2</sub> ، یکنواختی و پیوستگی جریان را برهم می‌زند. BaCl <sub>2</sub> پس از CaCl <sub>2</sub> ساختار را پایدار می‌کند و مانع از تخریب زودهنگام می‌شود.	عامل ایجاد اتصال عرضی (CaCl <sub>2</sub> و BaCl <sub>2</sub> )	سلول‌های U87-MG (سلول‌های توموری مغز)	آلژینات
[۸۸]	در ۱۰ wt% CaCl <sub>2</sub> = اتصال عرضی کم و با گذشت زمان تغییری ایجاد نشد. برعکس برای ۱۰ wt% = تغییر قابل توجهی با گذشت زمان داشت.	غلظت عامل ایجاد اتصال عرضی	سلول‌های MC3T3-E1	آلژینات
[۸۹]	قدرت کششی، گرانروی، تحمل تنش فشاری با اضافه کردن HNT افزایش یافت، شستن متیل سلولز از داربست سبب چسبندگی سلولی شد که به PDVF نیز مربوط بود.	ترکیب	کندروسیت‌های انسانی	آلژینات متیل سلولز- PVDF-HNT
[۹۰]	ژل شدن کم = توزیع نامناسب (ساختار قطره‌ای) ژل شدن مناسب = جریان روان	ژل شدن و زمان	سلول‌های بنیادی جنینی موش	آلژینات-ژلاتین



[۹۱]	<p>ژل شدن زیاد = شکست، کاهش زنده ماندن سلول‌ها                  بهینه ژل شدن در غلظت ژلاتین (۷/۵٪)، زمان ژل شدن (&gt; ۱۰ دقیقه) و دمای ۲۵، ۲۷/۵ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد اتفاق می‌افتد.                  برای غلظت بالای آلژینات و ژلاتین (۹ و آلژینات و ۱۰/۸٪ ژلاتین) ← P اکستروژن خیلی زیاد (به دلیل گرانشی-غیرقابل چاپ) ← تنش برشی ← مرگ سلول‌ها                  قطر داخلی سوزن، کاهش یابد ← شعاع رشته‌ها کاهش می‌یابد ← زمان و دقت چاپ افزایش می‌یابد.</p>	<p>شرایط تنظیم چاپ</p>	<p>سلول‌های بنیادی مزانشیمی</p>	<p>آلژینات-ژلاتین</p>
[۹۲]	<p>استحکام بین لایه‌ای با غلظت TSC بهبود یافت ← چسبندگی بین سلولی افزایش یافت، ارتفاع چاپ به ۳/۳ cm یا ۱۵۰ لایه افزایش یافت</p>	<p>اتصالات میانی</p>	<p>سلول‌های L929</p>	<p>آلژینات-متیل سلولز</p>

### ۳-۳-۳-۳- سایر جوهرهای زیستی طبیعی

#### ۳-۳-۳-۱- بستر خارج سلولی سلول‌زدایی شده<sup>۱</sup> (dECM)

توانایی چاپ و الگودهی تمامی موادی که یک بافت را می‌سازند (سلول و مواد بستر) در سه بعد به منظور ساخت سازه‌هایی شبیه به بافت بدن انسان یکی از نویدهای هیجان‌انگیز چاپ زیستی است. هرچند، اغلب مواد ماتریسی استفاده شده برای چاپ زیستی نمی‌توانند پیچیدگی بستر خارج سلولی (ECM) طبیعی را از خود نشان دهند و بنابراین، توانایی ساخت دوباره ساختارهای ذاتی سلولی و عملکرد آن‌ها را ندارند. به تازگی داربست‌های تهیه شده از بافت‌های زنده، به عنوان بستر رشد و تکثیر سلول‌های بنیادی مورد توجه رشته پزشکی ترمیمی و مهندسی بافت قرار گرفته‌اند، از آنجایی که هیچ ماده طبیعی یا سنتزی نمی‌تواند تمامی خصوصیات ECM طبیعی را شبیه‌سازی کند [۱۰۰]. ECM از مولکول‌های ساختاری و عملکردی متعددی تشکیل شده است که توسط سلول‌های متعلق به آن بافت در آن گنجانده شده‌اند و بنابراین سازماندهی سه‌بعدی و ترکیب بیوشیمیایی ECM برای هر بافت متمایز است. هیدروژل‌های متعددی از اجزای تشکیل‌دهنده ECM مشتق شده‌اند (مانند: کلاژن، اسید هیالورونیک، الاستین یا ترکیبات پیچیده پروتئین‌های ECM مثل: ماتریژل). بر خلاف هیدروژل‌های متشکل از هر یک از اجزای ECM به صورت منفرد، هیدروژل‌های ECM تمامی پیچیدگی بافت ذاتی را در خود گنجانده‌اند و بر خلاف ماتریژل، از یک منبع پروتئینی حاصل از یک رده سلولی توموری تشکیل نشده‌اند [۱۰۱]. ECM یک شبکه پیچیده از ترکیبات متفاوتی از کلاژن‌ها، الاستین، لانینین، فیبرونکتین، پروتوگلیکان‌ها و بسیاری دیگر از گلیکوپروتئین‌ها شامل آنزیم‌های پروتئولیتیک که مسبب تخریب و مدل کردن دوباره ECM هستند است. ECM نقش مهمی را در تحریک تکثیر و تمایز سلولی، هدایت مهاجرت سلولی و تنظیم پاسخ‌های سلولی ایفا می‌کند [۱۰۲]. علاوه بر این‌ها، ECM هر بافت از نظر ترکیب و توپولوژی منحصر به فرد است که از طریق برهمکنش‌های پویا و رفت و برگشتی بین سلول‌های مقیم و محیط در مقیاس کوچک<sup>۲</sup> تولید می‌شود [۱۰۳]. مطالعات روی سلول‌ها و ECM‌های ایزوله شده از بافت‌ها بر اهمیت اختصاصی بودن بافت برای حفظ عملکردهای سلولی و فنوتایپ تاکید دارند [۱۰۴، ۱۰۰]. بدین دلایل، ECM‌های مشتق

شده طبیعی با مواد مهمی به عنوان جایگزین بافت‌های آسیب دیده تلقی می‌شوند. اگرچه سلول‌زدایی بافت اولین بار در سال ۱۹۷۳ به عنوان روشی برای نگهداری بافت به عنوان لایه حفاظتی برای بیماران دارای سوختگی بکار گرفته شد [۱۰۵]، اولین گزارش مبنی بر تولید ECM توسط سلول‌زدایی یک بافت برای استفاده مجدد به عنوان یک داربست زیستی برای ترمیم بافت، استفاده از لایه زیرپوستی روده کوچک<sup>۳</sup> (SIS) برای کاربردهای عروقی بود [۱۰۶]. این مطالعات اولیه سلول‌ها را از بافت حذف می‌کردند ولی پروتئین‌های عملکردی و ساختاری ECM مانند: گلیکوزامینوگلیکان‌ها<sup>۴</sup> (GAGs)، پروتوگلیکان‌ها و عوامل رشد را حفظ می‌کردند [۱۰۷]. زمانی که فرآیند سلول‌زدایی به روش مناسبی انجام شود، dECM حاصل از این روش‌ها پیچیدگی بیوشیمیایی، نانوساختار و خصوصیات زیست‌القای بستر ذاتی را حفظ کرده و فرآیند تولید بافت عملکردی را درون بدن بهبود می‌دهند [۱۰۸]. مواد حاصل از ECM مورد تایید سازمان غذا و دارو هستند و می‌توانند به راحتی نگهداری شده و به صورت مستقیم بکار گرفته شوند. این مواد تا کنون در میلیون‌ها بیمار بکار گرفته شده‌اند و به صورت گسترده در هر دو شکل پودر و ورقه‌های دو بعدی مشخصه‌یابی شده‌اند [۱۰۸]. کشف این موضوع که داربست‌های زیستی ECM توانایی تبدیل شدن به هیدروژل و انحلال در آب را دارند سبب گسترش کاربرد آن‌ها در آزمایشگاه و داخل بدن شده است [۱۰۷]. مطالعات متعددی نشان داده است که در میان زیست مواد مورد استفاده، بستر خارج سلولی سلول‌زدایی شده محیطی را مشابه محیط سلول‌های زنده فراهم می‌کند [۱۱۱-۱۰۹].

پس از هضم dECM، محصول معمولاً در دمای پایین (حدود ۴ درجه سانتی‌گراد) تا زمان استفاده نگهداری می‌شود. شبیه به هیدروژل‌های کلاژن، هنگامی که هضم dECM از نظر pH خنثی شود، در دمای اتاق هنگامی که فیبریل‌های کلاژن شروع به بازآرایی می‌کنند، شروع به ژل شدن می‌کند. این فرآیند در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تا حدودی تسریع می‌شود، اما این سینتیک ژل شدن برای فرآیند چاپ سه‌بعدی ایده‌آل نیست که بنابراین سبب ایجاد راه‌حل‌های خلاقانه برای حل این موضوع شده است [۱۱]. آتیتاسالا<sup>۵</sup> و همکارانش [۱۱۲] نشان دادند هیدروژل‌های کامپوزیتی تشکیل شده از آلژینات و هیدروژل مشتق شده از دنتین زنده مانی بالای سلول‌های

<sup>3</sup> Small Intestine Submucosa (SIS)

<sup>4</sup> Glycosaminoglycans (GAGs)

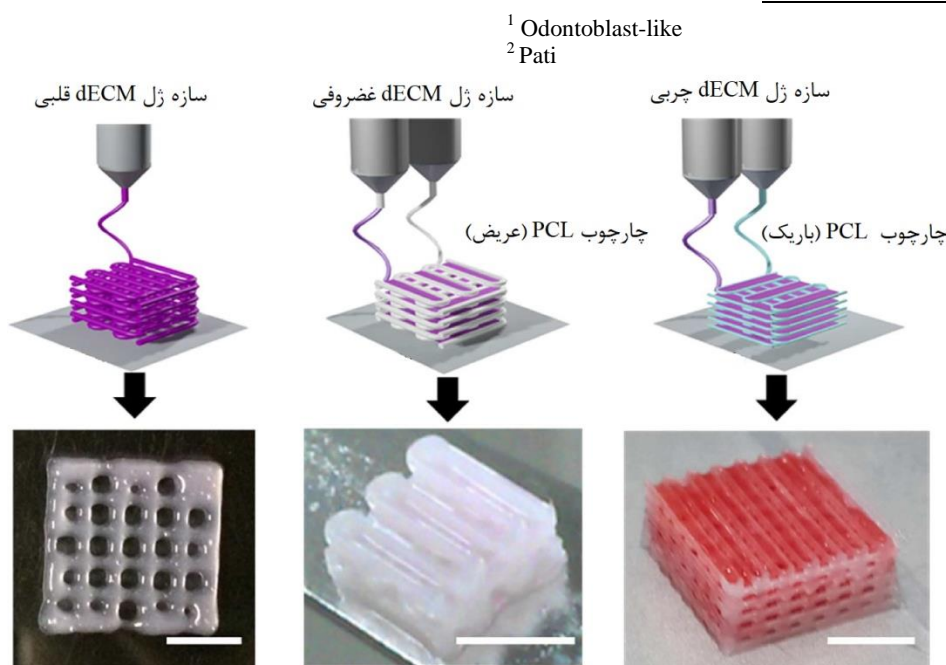
<sup>5</sup> Athitasala

<sup>1</sup> Decellularized Extracellular Matrix (dECM)

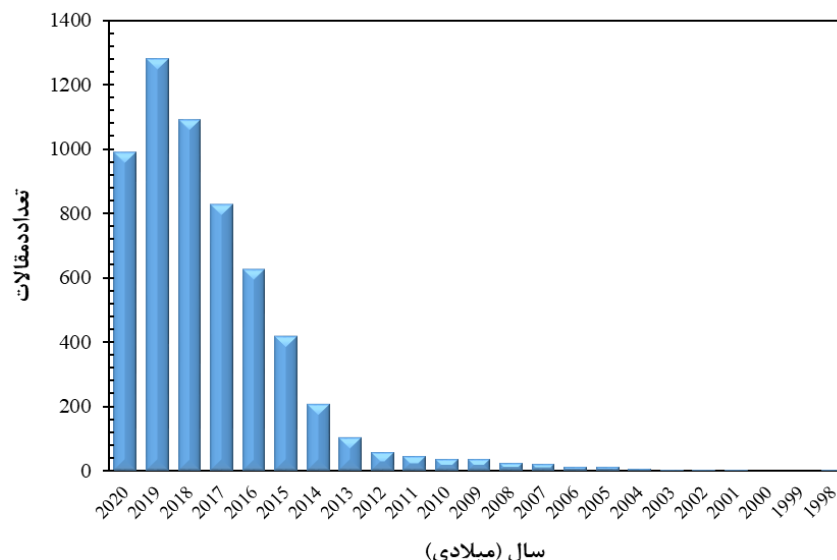
<sup>2</sup> Microenvironment

یک سیستم چند نازلی تولید شد (شکل ۱۲). از مشکلات استفاده از یک سازه پشتیبان سنتزی ترموپلاست به همراه dECM می‌توان به سرعت زیست تخریب پذیری متفاوت، تغییر محیط سلول‌ها در مرز PCL-dECM و ناهمخوانی خواص مکانیکی بافت هدف اشاره کرد [۱۱۳، ۱۰۹]. مشکلات مربوط به چاپ هیدروژل‌های dECM راه حل‌های ذکر شده را نتیجه داده است. توسعه جوهرهای زیستی dECM خود پشتیبان که زیست‌فعالی ذاتی خود را حفظ کنند تکلیفی مهم در آینده است که دستیابی به آن موفقیتی بزرگ خواهد بود. طی سالیان گذشته پیشرفت‌های چشمگیری در زمینه ساخت جوهرهای زیستی و چاپ سه‌بعدی صورت گرفته است. نتایج حاصل از بررسی آماری در پایگاه اطلاعاتی اسکوپوس نشان می‌دهد که تعداد مقالات چاپ شده در این زمینه در ۲۰ سال اخیر (از آغاز فرآیند چاپ زیستی ۳ بعدی در حدود ۲ دهه گذشته) به طرز چشمگیری افزایش یافته است (شکل ۱۳) و محققان، انواع جوهرهای در حال توسعه را به منظور ساخت بافت‌های پیچیده با استفاده از این فناوری‌های جدید بکار گرفته‌اند.

شبه - ادونتوبلاست<sup>۱</sup> (OD21s) را پس از حداقل ۵ روز از چاپ نتیجه می‌دهند. علاوه بر این، آن‌ها نسبت بهینه آلزینات : دنتین که بهترین کیفیت چاپ و تمایز سلولی را نشان داد، مشخص کردند (بالاترین بیان ALP و RUNX2). ولی هیچکدام از این روش‌ها، تشکیل ساختارهای بزرگ خود - پشتیبان توسط جوهر هیدروژل به تنهایی را نشان نداده است. پاتی<sup>۲</sup> و همکارانش [۱۰۹] روشی را برای چاپ سازه‌های دارای سلول به‌وسیله جوهر زیستی بر پایه dECM توسعه دادند که توانایی فراهم کردن یک محیط مساعد در مقیاس کوچک برای رشد سازه‌های سه‌بعدی بافت را دارد. آن‌ها تنوع و انعطاف‌پذیری بالای این روش برای چاپ توسط جوهرهای زیستی بر پایه dECM منحصر به بافت مورد نظر شامل چربی، غضروف و قلب را نشان دادند که توانایی فراهم کردن سیگنال‌های حیاتی برای گرافت سلول‌ها، زنده‌مانی و عملکرد بلندمدت آن‌ها را دارد. در این تحقیق سازه‌های ۳ بعدی متخلخل dECM به همراه چارچوب پلی(کاپرولاکتون) (PCL) با استفاده از



شکل ۱۲ - فرآیند چاپ سازه‌های بافت مشخص با استفاده از جوهر زیستی بر پایه‌ی dECM [۱۰۹].



شکل ۱۳- استخراج آماری مقالات چاپ شده در زمینه چاپ زیستی ۳ بعدی از سال ۱۹۹۸ تا ۲۰۲۰ [۱۱۴].

بافت‌های جایگزین واقعی برای اعضای آسیب دیده یا بیمار تحقق یابد و به بیماران بی‌شماری کمک رسانی کند. تهیه جوهرهای زیستی با قابلیت تنظیم خصوصیات رئولوژیکی، مکانیکی و زیستی گامی مهم در راستای تحقق این آرمان به شمار می‌رود.

#### ۵- تقدیر و تشکر

از پژوهشگاه رنگ جهت فراهم نمودن مراجعی که در راستای نگارش این مقاله به کار گرفته شده‌اند، کمال تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

#### ۴- نتیجه‌گیری

چاپ زیستی سه‌بعدی یک فناوری نوظهور جهت ساخت سازه‌های بافتی عملکردی برای جایگزینی بافت‌های آسیب دیده بیمار است. ساخت مجدد اعضای بدن با استفاده از چاپ سه‌بعدی برای پیوند عضو، نیازمند جایگذاری دقیق سلول‌های اختصاصی، مواد و عوامل زیست‌فعال به منظور القای تشکیل و ترمیم بافت عملکردی است. شبیه‌سازی پیچیدگی ذاتی بافت‌ها، لزوم تهیه جوهرهای زیستی مختص بافت هدف با خواص زیستی و مکانیکی قابل تنظیم را بیش از پیش نشان می‌دهد. در صورتی که فناوری‌های چاپ زیستی سه‌بعدی و فرمول‌بندی‌های جوهر زیستی با سرعت سال‌های اخیر به موفقیت خود ادامه دهند، شاید دستیابی به

#### ۸- مراجع

1. T. D. Ngo, A. Kashani, G. Imbalzano, K. T. Q. Nguyen, D. Hui, "Additive manufacturing (3D printing): A review of materials, methods, applications and challenges", *Compos. Part B Eng.* 143, 172–196, **2018**.
2. P. Rastogi, B. Kandasubramanian, "Review of alginate-based hydrogel bioprinting for application in tissue engineering, *Biofabrication*". 11, Doi: 10.1088/1758-5090/ab331e, **2019**.
3. R. Yadav, R. Goud, A. Dutta, X. Wang, M. Naebe, B. Kandasubramanian, "Biomimicking of Hierarchical Molluscan Shell Structure Via Layer by Layer 3D Printing", *Ind. Eng. Chem. Res.* 57, 10832–10840, **2018**.
4. D. Sandeep, "Comparison and analysis of different 3d printing techniques", *Int. J. Latest Trends Eng. Technol.* 8, 264-272, **2017**.
5. S. Gharde, A. Surendren, J.M. Korde, S. Saini, N. Deoray, R. Goud, S. Nimje, B. Kandasubramanian, "Recent advances in additive manufacturing of bio-inspired materials, in: *Biofabrication, Springer International Publishing*", 35–68, **2019**.
6. P. Admane, A.C. Gupta, P. Jois, S. Roy, C. Chandrasekharan Lakshmanan, G. Kalsi, B. Bandyopadhyay, S. Ghosh, "Direct 3D bioprinted full-thickness skin constructs recapitulate regulatory signaling pathways and physiology of human skin", *Bioprint.* 15, Doi: 10.1016/j.bprint.2019.e00051, **2019**.
7. R.J. Klebe, "Cytoscribing: A method for micropositioning cells and the construction of two- and three-dimensional synthetic tissues", *Exp. Cell Res.* 179, 362–373, **1988**.
8. S. V. Murphy, A. Atala, "3D bioprinting of tissues and organs", *Nat. Biotechnol.* 32, 773–785, **2014**.
9. T. Boland, V. Mironov, A. Gutowska, E.A. Roth, R.R. Markwald, "Cell and organ printing 2: Fusion of cell aggregates in three-dimensional gels", *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* 272, 497–502, **2003**.
10. N. E. Fedorovich, J. Alblas, J. R. De Wijn, W. E. Hennink, A. B. J. Verboom, W. J. A. Dhert, "Hydrogels as extracellular matrices for skeletal tissue engineering: State-of-the-art and novel application in organ printing", *Tissue Eng.* 13, 1905–1925, **2007**.
11. A. Khademhosseini, G. Camci-Unal, "3D Bioprinting in Regenerative Engineering: Principles and Applications", CRC Press, **2018**.
12. K. Jakob, A. Neagu, V. Mironov, R.R. Markwald, G. Forgacs, "Engineering biological structures of prescribed shaped using self-assembling multicellular systems", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 2864–2869, **2004**.
13. W.E. Block, R. Whitehead, "Human Organ Transplantation: Economic and Legal Issues, in: *Palgrave Macmillan*", Springer International Publishing, 353–371, **2019**.

14. Organ Donation Statistics |Organ Donor, <https://www.organdonor.gov/statistics-stories/statistics.html>.
15. OPTN: Organ Procurement and Transplantation Network - OPTN, <https://optn.transplant.hrsa.gov>.
16. M. Ponec, "Skin constructs for replacement of skin tissues for in vitro testing", *Adv. Drug Deliv. Rev.* 19–30, **2002**.
17. K. W. Binder, A. J. Allen, J. J. Yoo, A. Atala, "Drop-on-demand inkjet bioprinting: A primer", *Gene Ther. Regul.* 6, 33–49, **2011**.
۱۸. آ. سلیمانی گرگانی، مروری بر انواع هدهای چاپگر جوهرافشان پیژوالکتریک، نشریه علمی مطالعات در دنیای رنگ، ۹، ۳۱–۴۲، ۲۰۱۹.
۱۹. د. عوض نژاد فرد، م. خطیب زاده، س. گرجی کندی، "کنترل تشکیل قطره در چاپ جوهرافشان با استفاده از تنظیم خواص فیزیکی مرکب چاپ و بررسی تاثیر اعداد بدون بعد در قابلیت چاپ"، نشریه علمی مطالعات در دنیای رنگ، ۸، ۲۶–۱۵، ۲۰۱۸.
20. B. Derby, "Bioprinting: inkjet printing proteins and hybrid cell-containing materials and structures", *J. Mater. Chem.* 18, 5717–5721, **2008**.
21. R.E. Saunders, B. Derby, "Inkjet printing biomaterials for tissue engineering: Bioprinting", *Int. Mater. Rev.* 59, 430–448, **2014**.
22. F. Pati, J. Jang, J.W. Lee, D. W. Cho, "Extrusion bioprinting", *Essentials 3D Biofabrication Transl*, Elsevier Inc. 123–152, **2015**.
23. R. Raman, R. Bashir, "Stereolithographic 3D bioprinting for biomedical applications", *Essentials 3D Biofabrication Transl*, Elsevier Inc. 89–121, **2015**.
24. B. Dhariwala, E. Hunt, T. Boland, "Rapid prototyping of tissue-engineering constructs, using photopolymerizable hydrogels and stereolithography", *Tissue Eng.* 10, 1316–1322, **2004**.
25. C. Mézel, A. Souquet, L. Hallo, F. Guillemot, "Bioprinting by laser-induced forward transfer for tissue engineering applications: jet formation modeling", *Biofabrication* 2, **2010**.
26. K. Y. Lee, D. J. Mooney, "Hydrogels for tissue engineering", *Chem. Rev.* 101, 1869–1879, **2001**.
27. J. Malda, J. Visser, F. P. Melchels, T. Jüngst, W. E. Hennink, W. J. A. Dhert, J. Groll, D.W. Huttmacher, "25th Anniversary Article: Engineering Hydrogels for Biofabrication", *Adv. Mater.* 25, 5011–5028, **2013**.
28. M. Hospodiuk, M. Dey, D. Sosnoski, I. T. Ozbolat, "The bioink: A comprehensive review on bioprintable materials", *Biotechnol. Adv.* 35, 217–239, **2017**.
29. D. Chimene, K.K. Lennox, R.R. Kaunas, A.K. Gaharwar, "Advanced Bioinks for 3D Printing: A Materials Science Perspective", *Ann. Biomed. Eng.* 44, 2090–2102, **2016**.
30. A.K. Gaharwar, N.A. Peppas, A. Khademhosseini, "Nanocomposite hydrogels for biomedical applications", *Biotechnol. Bioeng.* 111, 441–453, **2014**.
31. E.A. Appel, J. Del Barrio, X.J. Loh, O.A. Scherman, "Supramolecular polymeric hydrogels", *Chem. Soc. Rev.* 41, 6195–6214, **2012**.
32. Y. L. Chiu, S. C. Chen, C. J. Su, C.W. Hsiao, Y. M. Chen, H. L. Chen, H. W. Sung, "pH-triggered injectable hydrogels prepared from aqueous N-palmitoyl chitosan: In vitro characteristics and in vivo biocompatibility", *Bio Mater.* 30, 4877–4888, **2009**.
33. X. Ding, J. Janjanam, A. Tiwari, M. Thompson, "P. A. Heiden, Peptide-directed self-assembly of functionalized polymeric nanoparticles part I: Design and self-assembly of peptide-copolymer conjugates into nanoparticle fibers and 3D scaffolds", *Macromol. Biosci.* 14, 853–871, **2014**.
34. S. Vijayavenkataraman, W.F. Lu, J.Y.H. Fuh, "3D bioprinting of skin: A state-of-the-art review on modelling", materials, and processes, *Biofabrication*. 8, Doi: 10.1088/1758-5090/ 8/3/ 03 2001, **2016**.
35. A. G. Tabriz, M.A. Hermida, N.R. Leslie, W. Shu, "Three-dimensional bioprinting of complex cell laden alginate hydrogel structures", *Biofabrication*. 7, 10.1088/1758-5090/7/4/045012, **2015**.
36. R. F. Pereira, A. Sousa, C.C. Barrias, P.J. Bártolo, P.L. Granja, "A single-component hydrogel bioink for bioprinting of bioengineered 3D constructs for dermal tissue engineering", *Mater. Horizons* 5, 1100–1111, **2018**.
37. F.E. Freeman, D.J. Kelly, "Tuning alginate bioink stiffness and composition for controlled growth factor delivery and to spatially direct MSC Fate within bioprinted tissues", *Sci. Rep.* 7, 1–12, **2017**.
38. A. Schwab, R. Levato, M. D'Este, S. Piluso, D. Eglin, J. Malda, "Printability and Shape Fidelity of Bioinks in 3D Bioprinting", *Chem. Rev.* 120, 11028–11055, **2020**.
۳۹. س. عبداللهی باغبان، مروری بر الیگومرها و مونومرهای تجدیدپذیر جهت تهیه پوشش‌های تابش‌پز، نشریه علمی مطالعات در دنیای رنگ، ۸، ۵۱–۶۶، ۲۰۱۹.
40. O. Jeon, D.S. Alt, S.M. Ahmed, E. Alsberg, "The effect of oxidation on the degradation of photocrosslinkable alginate hydrogels", *Bio Mater.* 33, 3503–3514, **2012**.
41. G. Basara, X. Yue, P. Zorlutuna, "Dual crosslinked gelatin methacryloyl hydrogels for photolithography and 3D printing", *Gels* 5, DOI: 10.3390/gels5030034, **2012**.
42. T.Y. Lee, T.M. Roper, E.S. Jonsson, I. Kudyakov, K. Viswanathan, C. Nason, C.A. Guymon, C.E. Hoyle, "The kinetics of vinyl acrylate photopolymerization", *Polym.* 44, 2859–2865, **2003**.
43. V.L. Tsang, A.A. Chen, L.M. Cho, K.D. Jadin, R.L. Sah, S. DeLong, J.L. West, S.N. Bhatia, "Fabrication of 3D hepatic tissues by additive photopatterning of cellular hydrogels", *FASEB J.* 21, 790–801, **2007**.
44. T. Billiet, E. Gevaert, T. De Schryver, M. Cornelissen, P. Dubruel, "The 3D printing of gelatin methacrylamide cell-laden tissue-engineered constructs with high cell viability", *Biomater.* 35, 49–62, **2014**.
45. A. Bagheri, J. Jin, "Photopolymerization in 3D Printing", *ACS Appl. Polym. Mater.* 1, 593–611, **2007**.
46. A. Skardal, S. V. Murphy, K. Crowell, D. Mack, A. Atala, S. Soker, "A tunable hydrogel system for long-term release of cell-secreted cytokines and bioprinted in situ wound cell delivery", *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 105, 1986–2000, **2017**.
47. A. Skardal, M. Devarasetty, H. W. Kang, I. Mead, C. Bishop, T. Shupe, S. J. Lee, J. Jackson, J. Yoo, S. Soker, A. Atala, "A hydrogel bioink toolkit for mimicking native tissue biochemical and mechanical properties in bioprinted tissue constructs", *Acta Biomater.* 25, 24–34, **2015**.
48. C. S. Bahnney, T. J. Lujan, C. W. Hsu, M. Bottlang, J. L. West, B. Johnstone, "Visible light photoinitiation of mesenchymal stem cell-laden bioresponsive hydrogels", *Eur. Cells Mater.* 22, 43–55, **2011**.
49. D. Petta, A.R. Armiento, D. Grijpma, M. Alini, D. Eglin, M. D'Este, "3D bioprinting of a hyaluronan bioink through enzymatic-and visible light-crosslinking", *Biofabrication*. 10, **2018**.
50. S. Sakai, H. Ohi, T. Hotta, H. Kamei, M. Taya, "Differentiation potential of human adipose stem cells bioprinted with hyaluronic acid/gelatin-based bioink through microextrusion and visible light-initiated crosslinking", *Biopolym.* 109, DOI: 10.1002/bip.23080, **2018**.

51. J. Jia, D.J. Richards, S. Pollard, Y. Tan, J. Rodriguez, R.P. Visconti, T.C. Trusk, M.J. Yost, H. Yao, R.R. Markwald, Y. Mei, "Engineering alginate as bioink for bioprinting", *Acta Biomater.* 10, 4323–4331, **2014**.
52. K. Markstedt, A. Mantas, I. Tournier, H. Martínez Ávila, D. Hägg, P. Gatenholm, "3D bioprinting human chondrocytes with nanocellulose-alginate bioink for cartilage tissue engineering applications", *Biomacromolecules.* 16, 1489–1496, **2015**.
53. G. Gao, A.F. Schilling, K. Hubbell, T. Yonezawa, D. Truong, Y. Hong, G. Dai, X. Cui, "Improved properties of bone and cartilage tissue from 3D inkjet-bioprinted human mesenchymal stem cells by simultaneous deposition and photocrosslinking in PEG-GelMA", *Biotechnol. Lett.* 37, 2349–2355, **2015**.
54. T. Billiet, E. Gevaert, T. De Schryver, M. Cornelissen, P. Dubruel, "The 3D printing of gelatin methacrylamide cell-laden tissue-engineered constructs with high cell viability", *Biomater.* 35, 49–62 **2014**.
55. L.E. Bertassoni, J.C. Cardoso, V. Manoharan, A.L. Cristino, N.S. Bhise, W.A. Araujo, P. Zorlutuna, N.E. Vrana, A.M. Ghaemmaghami, M.R. Dokmeci, A. Khademhosseini, "Direct-write bioprinting of cell-laden methacrylated gelatin hydrogels", *Biofabrication.* 6, Doi: 10.1088/1758-5082/6/2/024105, **2014**.
56. Y. Loo, A. Lakshmanan, M. Ni, L.L. Toh, S. Wang, C.A.E. Hauser, "Peptide Bioink: Self-Assembling Nanofibrous Scaffolds for Three-Dimensional Organotypic Cultures", *Nano Lett.* 15, 6919–6925, **2015**.
57. C.F. Marques, G.S. Diogo, S. Pina, J.M. Oliveira, T.H. Silva, R.L. Reis, "Collagen-based bioinks for hard tissue engineering applications: a comprehensive review", *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 30, Doi: 10.1007/s10856-019-6234-x, **2019**.
58. M.G. Yeo, G.H. Kim, "A cell-printing approach for obtaining hASC-laden scaffolds by using a collagen/polyphenol bioink", *Biofabrication.* 9, doi: 10.1088/1758-5090/aa6997, **2017**.
59. Y.B. Kim, H. Lee, G.H. Kim, "Strategy to Achieve Highly Porous/Biocompatible Macroscale Cell Blocks, Using a Collagen/Genipin-bioink and an Optimal 3D Printing Process", *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 8, 32230–32240, **2016**.
60. N. Diamantides, L. Wang, T. Pruiksma, J. Siemiakowski, C. Dugopolski, S. Shortkroff, S. Kennedy, L.J. Bonassar, "Correlating rheological properties and printability of collagen bioinks: The effects of riboflavin photocrosslinking and pH", *Biofabrication.* 9, doi: 10.1088/1758-5090/aa780f, **2017**.
61. T.J. Hinton, Q. Jallerat, R.N. Palchesko, J.H. Park, M.S. Grodzicki, H.J. Shue, M.H. Ramadan, A.R. Hudson, A.W. Feinberg, "Three-dimensional printing of complex biological structures by freeform reversible embedding of suspended hydrogels", *Sci. Adv.* 1, Doi: 10.1126/sciadv.1500758, **2015**.
62. M. C. Echave, L. S. Burgo, J. L. Pedraz, G. Orive, "Gelatin as Biomaterial for Tissue Engineering", *Curr. Pharm. Des.* 23, Doi: 10.2174/0929867324666170511123101, **2017**.
63. E. Hoch, T. Hirth, G.E.M. Tovar, K. Borchers, "Chemical tailoring of gelatin to adjust its chemical and physical properties for functional bioprinting", *J. Mater. Chem. B.* 1, 5675–5685, **2013**.
64. J.W. Nichol, S.T. Koshy, H. Bae, C.M. Hwang, S. Yamanlar, A. Khademhosseini, Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels, *Biomater.* 31, 5536–5544, **2010**.
65. D.B. Kolesky, R.L. Truby, A.S. Gladman, T.A. Busbee, K.A. Homan, J.A. Lewis, "3D bioprinting of vascularized, heterogeneous cell-laden tissue constructs", *Adv. Mater.* 26, 3124–3130, **2014**.
66. W. Liu, Z. Zhong, N. Hu, Y. Zhou, L. Maggio, A. K. Miri, A. Fragasso, X. Jin, A. Khademhosseini, Y. S. Zhang, "Coaxial extrusion bioprinting of 3D microfibrous constructs with cell-favorable gelatin methacryloyl microenvironments", *Biofabrication.* 10, Doi: 10.1088/1758-5090/aa9d44, **2018**.
67. W. Jia, P.S. Gungor-Ozkerim, Y.S. Zhang, K. Yue, K. Zhu, W. Liu, Q. Pi, B. Byambaa, M.R. Dokmeci, S.R. Shin, A. Khademhosseini, "Direct 3D bioprinting of perfusable vascular constructs using a blend bioink", *Biomaterials.* 106, 58–68, **2016**.
68. X. Liu, Y. Zuo, J. Sun, Z. Guo, H. Fan, X. Zhang, "Degradation regulated bioactive hydrogel as the bioink with desirable moldability for microfluidic biofabrication", *Carbohydr. Polym.* 178, 8–17, **2017**.
69. T. Billiet, B. Van Gasse, E. Gevaert, M. Cornelissen, J.C. Martins, P. Dubruel, "Quantitative contrasts in the photopolymerization of acrylamide and methacrylamide-functionalized gelatin hydrogel building blocks", *Macromol. Biosci.* 13, 1531–1545, **2013**.
70. Q. Wang, G. Han, S. Yan, Q. Zhang, "3D printing of silk fibroin for biomedical applications", *Materials.* 12, 504, **2019**.
71. M. Farokhi, F. Mottaghtalab, Y. Fatahi, A. Khademhosseini, D.L. Kaplan, "Overview of Silk Fibroin Use in Wound Dressings", *Trends Biotechnol.* 36, 907–922, **2018**.
72. D. Chouhan, N. Thatikonda, L. Nilebäck, M. Widhe, M. Hedhammar, B.B. Mandal, "Recombinant Spider Silk Functionalized Silkworm Silk Matrices as Potential Bioactive Wound Dressings and Skin Grafts", *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 10, 23560–23572, **2018**.
73. S. Mehrotra, S.K. Nandi, B.B. Mandal, "Stacked silk-cell monolayers as a biomimetic three dimensional construct for cardiac tissue reconstruction", *J. Mater. Chem. B.* 5, 6325–6338, **2017**.
74. S. Mehrotra, D. Chouhan, R. Konwarh, M. Kumar, P.K. Jati, B.B. Mandal, "Comprehensive Review on Silk at Nanoscale for Regenerative Medicine and Allied Applications", *ACS Biomater. Sci. Eng.* 5, 2054–2078, **2019**.
75. C. Guo, J. Zhang, J.S. Jordan, X. Wang, R.W. Henning, J.L. Yarger, "Structural Comparison of Various Silkworm Silks: An Insight into the Structure-Property Relationship", *Biomacromolecules.* 19, 906–917, **2018**.
76. S. Mehrotra, B.A.G. de Melo, M. Hirano, W. Keung, R.A. Li, B.B. Mandal, S.R. Shin, "Nonmulberry Silk Based Ink for Fabricating Mechanically Robust Cardiac Patches and Endothelialized Myocardium-on-a-Chip Application", *Adv. Funct. Mater.* Doi: 10.1002/adfm.201907436, **2020**.
77. S. Reakasame, A.R. Boccaccini, "Oxidized Alginate-Based Hydrogels for Tissue Engineering Applications: A Review", *Biomacromolecules.* 19, 3–21, **2018**.
78. K. Mahmood Zia, M. Zuber, M. Ali, "*Algae Based Polymers, Blends, and Composites*", Elsevier, **2017**.
79. K.Y. Lee, D.J. Mooney, "Alginate: Properties and biomedical applications", *Prog. Polym. Sci.* 37, 106–126, **2012**.
80. S.D. Pasini Cabello, S. Mollá, N.A. Ochoa, J. Marchese, E. Giménez, V. Compañ, "New bio-polymeric membranes composed of alginate-carrageenan to be applied as polymer electrolyte membranes for DMFC", *J. Power Sources.* 265, 345–355, **2014**.
81. O. Gåserød, O. Smidsrød, G. Skjåk-Bræk, "Microcapsules of alginate-chitosan - I. A quantitative study of the interaction between alginate and chitosan", *Biomaterials.* 19, 1815–1825, **1998**.
82. T. Andersen, P. Auk-Emblem, M. Dornish, "3D Cell Culture in Alginate Hydrogels", *Microarrays.* 4, 133–161, **2015**.
83. W. Aljohani, M.W. Ullah, X. Zhang, G. Yang, "Bioprinting and its applications in tissue engineering and regenerative medicine", *Int. J. Biol. Macromol.* 107, 261–275, **2018**.
84. V. Vacharathit, E.A. Silva, D.J. Mooney, "Viability and functionality of cells delivered from peptide conjugated scaffolds", *Biomaterials.* 32, 3721–3728, **2011**.
85. E. Ruvinov, J. Leor, S. Cohen, "The promotion of myocardial repair by the sequential delivery of IGF-1 and HGF from an

- injectable alginate biomaterial in a model of acute myocardial infarction", *Biomaterials*. 32, 565–578, **2011**.
86. Y. He, F. Yang, H. Zhao, Q. Gao, B. Xia, J. Fu, "Research on the printability of hydrogels in 3D bioprinting", *Sci. Rep.* 6, 1–13, **2016**.
  87. T. Gao, G.J. Gillispie, J.S. Copus, A.P.R. Kumar, Y.J. Seol, A. Atala, J.J. Yoo, S.J. Lee, "Optimization of gelatin-alginate composite bioink printability using rheological parameters: A systematic approach", *Biofabrication*. 10, Doi: 10.1088/1758-5090/aacdc7, **2018**.
  88. S. Ahn, H. Lee, L. J. Bonassar, G. Kim, "Cells (MC3T3-E1)-laden alginate scaffolds fabricated by a modified solid-freeform fabrication process supplemented with an aerosol spraying", *Biomacromolecules*. 13, 2997–3003, **2012**.
  89. B. Roushangar Zineh, M.R. Shabgard, L. Roshangar, "Mechanical and biological performance of printed alginate/methylcellulose/halloysite nanotube/polyvinylidene fluoride bio-scaffolds", *Mater. Sci. Eng. C*. 92, 779–789, **2018**.
  90. L. Ouyang, R. Yao, Y. Zhao, W. Sun, "Effect of bioink properties on printability and cell viability for 3D bioplotting of embryonic stem cells", *Biofabrication*. 8, Doi: 10.1088/1758-5090/8/3/035020, **2016**.
  91. M. Di Giuseppe, N. Law, B. Webb, R. A. Macrae, L.J. Liew, T.B. Sercombe, R.J. Dilley, B.J. Doyle, "Mechanical behaviour of alginate-gelatin hydrogels for 3D bioprinting", *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 79, **2018**.
  92. H. Li, Y.J. Tan, K.F. Leong, L. Li, "3D Bioprinting of Highly Thixotropic Alginate/Methylcellulose Hydrogel with Strong Interface Bonding", *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 9, 20086–20097, **2017**.
  93. M. N. Collins, C. Birkinshaw, "Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering-A review", *Carbohydr. Polym.* 92, 1262–1279, **2013**.
  94. F. Khan, S.R. Ahmad, "Polysaccharides and Their Derivatives for Versatile Tissue Engineering Application", *Macromol. Biosci.* 13, 395–421, **2013**.
  95. M. Kesti, M. Müller, J. Becher, M. Schnabelrauch, M. D'Este, D. Eglin, M. Zenobi-Wong, "A versatile bioink for three-dimensional printing of cellular scaffolds based on thermally and photo-triggered tandem gelation", *Acta Biomater.* 11, 162–172, **2015**.
  96. H.W. Kang, S.J. Lee, I.K. Ko, C. Kengla, J.J. Yoo, A. Atala, "A 3D bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity", *Nat. Biotechnol.* 34, 312–319, **2016**.
  97. S. Stichler, T. Böck, N. Paxton, S. Bertlein, R. Levato, V. Schill, W. Smolan, J. Malda, J. Teßmar, T. Blunk, J. Groll, "Double printing of hyaluronic acid/poly(glycidol) hybrid hydrogels with poly( $\epsilon$ -caprolactone) for MSC chondrogenesis", *Biofabrication*. 9, **2017**.
  98. E. Khor, L.Y. Lim, "Implantable applications of chitin and chitosan", *Biomaterials*. 24, 2339–2349, **2003**.
  99. Q. Gu, E. Tomaskovic-Crook, R. Lozano, Y. Chen, R.M. Kapsa, Q. Zhou, G.G. Wallace, J.M. Crook, "Functional 3D Neural Mini-Tissues from Printed Gel-Based Bioink and Human Neural Stem Cells", *Adv. Healthc. Mater.* 5, 1429–1438, **2016**.
  100. T. L. Sellaro, A. Ranade, D.M. Faulk, G.P. McCabe, K. Dorko, S.F. Badylak, S.C. Strom, "Maintenance of human hepatocyte function in vitro by liver-derived extracellular matrix gels", *Tissue Eng. Part A*. 16, 1075–1082, **2010**.
  101. L.T. Saldin, M.C. Cramer, S.S. Velankar, L.J. White, S.F. Badylak, "Extracellular matrix hydrogels from decellularized tissues: Structure and function", *Acta Biomater.* 49, 1–15, **2017**.
  102. K.S. Midwood, L.V. Williams, J.E. Schwarzbauer, "Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix", *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 1031–1037, **2004**.
  103. C. Frantz, K.M. Stewart, V.M. Weaver, "The extracellular matrix at a glance", *J. Cell Sci.* 123, 4195–4200, **2010**.
  104. H.C. Ott, B. Clippinger, C. Conrad, C. Schuetz, I. Pomerantseva, L. Ikonomou, D. Kotton, J.P. Vacanti, "Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung", *Nat. Med.* 16, 927–933, **2010**.
  105. R.A. Elliott, J.G. Hoehn, "Use of commercial porcine skin for wound dressings", *Plast. Reconstr. Surg.* 52, 401–405, **1973**.
  106. G.C. Lantz, S.F. Badylak, A.C. Coffey, L.A. Geddes, W.E. Blevins, "Small intestinal submucosa as a small-diameter arterial graft in the dog", *J. Invest. Surg.* 3, 217–227, **1990**.
  107. S.L. Voytik-Harbin, A.O. Brightman, B.Z. Waisner, J.P. Robinson, C.H. Lamar, "Small intestinal submucosa: A tissue-derived extracellular matrix that promotes tissue-specific growth and differentiation of cells in vitro", *Tissue Eng.* 4, 157–174, **1998**.
  108. S.F. Badylak, D.O. Freytes, T.W. Gilbert, "Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function", *Acta Biomater.* 5, 1–13, **2009**.
  109. F. Pati, J. Jang, D.H. Ha, S. Won Kim, J.W. Rhie, J.H. Shim, D.H. Kim, D.W. Cho, "Printing three-dimensional tissue analogues with decellularized extracellular matrix bioink", *Nat. Commun.* 5, **2014**.
  110. P.S. Gungor-Ozkerim, I. Inci, Y.S. Zhang, A. Khademhosseini, M.R. Dokmeci, "Bioinks for 3D bioprinting: An overview", *Biomater. Sci.* 6, 915–946, **2018**.
  111. S. Yi, F. Ding, L. Gong, X. Gu, "Extracellular Matrix Scaffolds for Tissue Engineering and Regenerative Medicine", *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 12, 233–246, **2017**.
  112. A. Athirasala, A. Tahayeri, G. Thrivikraman, C.M. Franca, N. Monteiro, V. Tran, J. Ferracane, L.E. Bertassoni, "A dentin-derived hydrogel bioink for 3D bioprinting of cell laden scaffolds for regenerative dentistry", *Biofabrication*. 10, **2018**.
  113. K. Zhang, Q. Fu, J. Yoo, X. Chen, P. Chandra, X.M.-A. Biomaterialia, U., "3D bioprinting of urethra with PCL/PLCL blend and dual autologous cells in fibrin hydrogel: An in vitro evaluation of biomimetic mechanical property and cell growth", Elsevier, **2017**.
  114. Elsevier B.V, Welcome to Scopus Preview, Scopus. Com. **2020**. <https://www.scopus.com/home.uri%0Ahttps://www.scopus.com/> (accessed December 13, 2020).