

Microfabrication of "GelMA" Hydrogels: A Review

Kaveh Rahimi Mamaghani, Seyed Morteza Naghib*

Nanobioengineering Division, Nanotechnology Department, School of New Technologies, Iran University of Science and Technology (IUST), Tehran, Iran

Received: 4 January 2017, Accepted: 28 April 2017

Abstract

In recent decades, the "GelMA" hydrogels as one of the biocompatible and biodegradable biomaterials are introduced in various applications of biomedical engineering. GelMA results from direct reaction of gelatin and methacrylic anhydride which has specific biological and physical properties making it suitable for the design and engineering of scaffolds, creating micro or nanoscale polymer nanocomposites, cell signaling, designing drug delivery systems, biosensors, and gene transfer or other biomedical engineering applications. GelMA forms cross-linked hydrogel by exposure to ultra-violet radiation. Various techniques could be applied in designing and manufacturing of GelMA in micro size, such as photopatterning, micromolding, self-assembly phenomenon, microfluidic, bioprinting, fibers and fabrics weaving. Three-dimensional structures and scaffolds based on GelMA hydrogel could be designed to mimic the structure of the natural tissue, used in tissue engineering and regeneration medicine. However, in this case, there are some challenges such as different length scales, making copies of capillary hollow microcapillaries, angiogenic production in micro size scale and limitations in oxygen-carrying through centimeter dimension, need to be investigated further. Using the combined methods of fabrication and exact investigations on the effect of process parameters and introduction of new additives could be the part of the solution. GelMA capabilities for use in various manufacturing methods, besides, its physical flexibility, mechanical and biological properties are promising for future biomedical applications and producing self-assembled organs with different types of cells.

Key Words

microfabrication,
biocompatible polymers,
GelMA,
hydrogel,
photo-crosslinking

(*) To whom correspondence should be addressed.
E-mail: naghib@iust.ac.ir

بسیار

فصلنامه علمی-ترویجی

سال هفتم، شماره ۳

صفحه ۶۲-۵۰، ۱۳۹۶

ISSN: 2252-0449

مروری بر روش‌های میکروساخت هیدروژل‌های ژلما

کاوه رحیمی ممقانی، سید مرتضی نقیب*

تهران، دانشگاه علم و صنعت ایران، دانشکده فناوری‌های نوین، بخش نانویست مواد، گروه نانوفناوری

دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۱۵، پذیرش: ۱۳۹۶/۲/۳

در دهه اخیر، هیدروژل‌ها به عنوان یکی از هیدروژل‌های زیست‌سازگار و زیست‌تخریب‌پذیر مطرح در کاربردهای مختلف مهندسی پزشکی معرفی شده است. ژلما زیست‌پلیمری است که از واکنش مستقیم ژلاتین و متاکریلیک انیدرید به دست می‌آید. این پلیمر، به دلیل خواص زیستی و فیزیکی مناسب در طراحی و مهندسی داربست‌ها، ایجاد میکرو یا نانوکامپوزیت‌های پلیمری، طراحی سامانه‌های دارورسانی، سیگنال‌دهی سلولی، زیست‌حسگرها، انتقال ژن و کاربردهای مختلف مهندسی پزشکی مطرح شده است. ژلما در اثر تابش فرابنفش شبکه‌ای شده و هیدروژل می‌شود. فنون مختلفی در طراحی و ساخت آن همچون الگودار کردن نوری، میکرو قالب‌گیری، پدیده خودگردایش، میکروسایالی، زیست‌چاپ، بافندگی الیاف و پارچه می‌تواند به کار رود. ساختارهای سه‌بعدی و داربست‌ها بر اساس هیدروژل ژلما، می‌توانند برای تقلید ساختار بافت‌های طبیعی طراحی و در مهندسی بافت و بازتولید دارو استفاده شوند. هرچند چالش‌هایی همچون مقیاس‌های طولی متفاوت، نسخه‌برداری از میکرومویرگ‌های توخالی، رگ‌زایی در مقیاس میکرو و محدودیت حمل اکسیژن در گستره ابعادی سانتی‌متر وجود دارد که نیاز به بررسی بیشتر دارد. استفاده از روش‌های ترکیبی ساخت و بررسی‌های دقیق اثر پارامترهای سامانه یا وارد کردن مواد افزودنی جدید قسمتی از راه‌حل به نظر می‌رسد. قابلیت‌های ژلما در روش‌های گوناگون ساخت در کنار خواص فیزیکی، مکانیکی و زیستی انعطاف‌پذیر، آن را برای کاربردهای آینده زیست‌پزشکی و تولید اندام‌های خودگردایشی با انواع مختلف سلول‌ها مناسب می‌سازد.

چکیده



کاوه رحیمی ممقانی



سید مرتضی نقیب

واژگان کلیدی

میکروساخت،
پلیمرهای زیست‌سازگار،
ژلما،
هیدروژل،
شبکه‌ای شدن نوری

* مسئول مکاتبات، پیام‌نگار:

naghib@iust.ac.ir

مقدمه

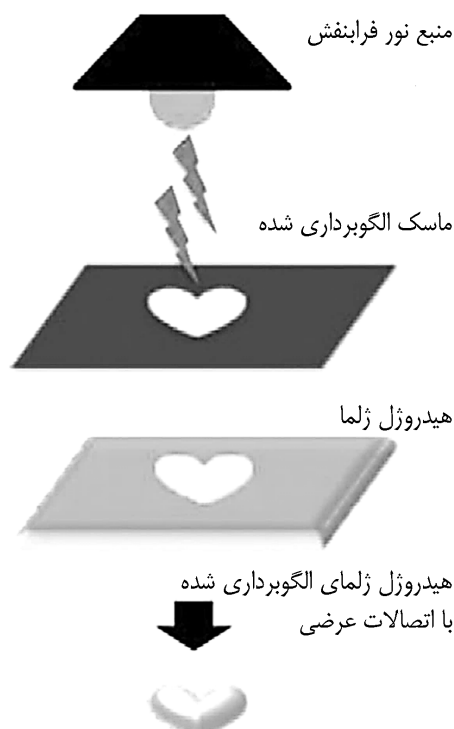
نخستین بار در سال ۲۰۰۰ میلادی زیست پلیمر ژلما (GelMA) [۱] از واکنش مستقیم ژلاتین و متاکریلیک انیدرید (MA) سنتز شد. ژلما در مجاورت آغازگر نوری و تابش فرابنفش با پلیمر شدن رادیکالی تشکیل هیدروژلی با اتصالات عرضی کووالانسی می دهد.

در دهه اخیر، هیدروژل های ژلما با توجه به خواص فیزیکی و شیمیایی ویژه آنها در کاربردهای مختلف مهندسی پزشکی استفاده شده اند. نمونه ای از کاربردها و ترکیبات افزوده شده به هیدروژل ژلما برای اهداف خاص در جدول ۱ خلاصه شده است [۲-۸]. همان طور که در این جدول دیده می شود، زیست سازگاری عالی

جدول ۱- نمونه ای از کاربردهای پزشکی هیدروژل ژلما در ترکیب با سایر مواد [۲-۸].

دسته	ترکیبات افزودنی	هدف	کاربردهای پزشکی
ترکیبات کربن	نانولوله های کربنی	تقویت هیدروژل ژلما و تنظیم خواص الکتریکی و مکانیکی	رشد سلول های فیبروبلاست و بنیادی مزانشیمی انسان، ساخت نانوزیست-حسگرها
	اکسید گرافن	تقویت ژلما بدون اثر بر سختی و امکان کنترل انتقال ژن، افزایش سیگنال سلولی	ساخت حسگر زیستی با هیبرید کردن DNA، کشت سلول های فیبروبلاست و بنیادی با امکان ردیابی
غیر آلی	هیدروکسی آپاتیت	افزایش جذب سلولی و تسریع ترمیم	افزایش روند ادغام کاشتنه در استخوان
	مواد معدنی	ترویج اتصالات و القای تمایز استخوانی	امکان کشت سلول های بنیادی پرتوان محرک انسانی
	نانوذرات طلا	ترویج رشد سلولی، امکان ردیابی و رهایش هوشمند دارو	کشت سلول های بنیادی مشتق از بافت چربی، ساخت پروفیل با مهندسی دقیق گرا دیان رهایش
	هیدروژل سیلیکا	محافظت از سلول های کشت شده در هیدروژل ژلما	کشت جمعیت جانبی قلب
	متاکریلات صمغ ژلان	تقویت هیدروژل ژلما	کشت انواع سلول های فیبروبلاست
پلیمرهای زیستی	هیالورونیک اسید و سولفات کندرویتین متاکریلات	بهبود خواص غضروفی و مکانیکی	کشت سلول های غضروفی انسان
	متاکریلات هیالورونیک اسید	تنظیم خواص فیزیکی	کشت سلول های بند ناف انسان
	متاکریلات گلیسیدیل دکستران یا ابریشم فیبرون	تنظیم خواص مکانیکی	کشت فیبروبلاست های NIH-3T3
	هیالورونیک اسید و پلی اتیلن گلیکول	تنظیم واکنش سلولی برای غضروف	کشت سلول های بنیادی پالپ دندان
پلیمرهای سنتزی	متاکریلات و لیزین عامل دار شده دکستران	تقلید ساختار و عملکرد فضای برون سلولی	کشت سلول های عضله صاف عروق ناف انسان
	پلی اتیلن گلیکول	تنظیم خواص مکانیکی و زیستی، ساخت میکرو محیط های مختلف، تاخیر در تخریب	کشت فیبروبلاست های NIH-3T3 و سلول های اندوتلیال و شبه جنین موش، امکان مهندسی رهایش دارو
	پلی لاکتید اتیلن اکسید فومارات	افزایش خواص مکانیکی و تخریب	کشت سلول های استخوان ساز (osteoblast) انسان
	پلی آکریل آمید	تقویت هیدروژل ژلما	رهایش کنترل شده آنتی بیوتیک، کشت سلول های فیبروبلاست L-929

درون هیدروژل پرسلول، با تزریق سلول‌های بند ناف انسان برای ایجاد ساختار شبکه‌ای میکروعروق به عنوان محیط کشت ثانویه امکان‌پذیر است [۲]. هم‌ترازی هیدروژل‌های ژلما تولید شده با الگوی نوری با میکروساختارهای مستطیلی در مقایسه با سلول‌های کپسولی شده در هیدروژل‌های ژلما بدون الگو، در راستای محور طولی افزایش نشان می‌دهند. البته برای میکروساختارهای با عرض کوچک‌تر این اثر شدیدتر است. چند رده سلولی دیگر نیز همچون سلول‌های بند ناف انسان، مایوبلاست جوندگان (rodent myoblasts, C2C12) و جمعیت جانبی قلبی جوندگان (rodent cardiac side population, CSP) رفتارهای کشیدگی و چینش مشابهی را در الگوهای هیدروژل ژلما نشان داده‌اند [۳]. میکروساختارهای ژلما مستطیلی پرسلول بعد از تورم اولیه افزایش عرض بروز می‌دهند که ناشی از تکثیر سلول در حاشیه مرزهای بیرونی ساختار سازه است. همچنین، شکاف بین ساختارهای پرسلول مجاور می‌تواند به طور پیش‌رونده با تکثیر سلول‌های هم‌تراز شده پر شود. در نتیجه، طراحی درست فاصله بین میکروساختارهای مجاور، میکروساختارهای خودگردایشی را در تمام سطوح الگوگذاری شده قابل دستیابی می‌سازد. از این رو، با به‌کارگیری این راهبرد امکان ساخت ساختارهای بافتی با هم‌ترازی بیشتر را میسر کرده است.



شکل ۱- نمایی از الگوبرداری نوری از ژلما با استفاده از ماسک نوری پیش‌الگو [۲].

هیدروژل‌های ژلما، آن‌ها را برای ماتریس‌های کشت سلولی، که باید مقلد فضای برون‌سلولی طبیعی بوده و خاصیت تخریب سریع و زیست‌فعال داشته باشند و نیز سایر کاربردهای مهندسی پزشکی همچون دارورسانی و حسگرهای زیستی، مناسب ساخته است. اگر چه از نیازهای اصلی برای ساخت ساختارهای بافتی مشابه بافت‌های زنده طبیعی در مهندسی بافت، تولید اندام ساخته شده از انواع مختلف سلول‌ها به منظور همانندسازی معماری‌های پیچیده بافت‌های هدف در محیط برون‌تنی است. اخیراً، چند فن پیشرفته میکروساخت برای کنترل میکروساختارهای سه‌بعدی هیدروژل‌های ژلما کشف شده است که می‌توانند برای تنظیم برهم‌کنش‌های سلول با ماده و بررسی رفتارهای سلولی به‌کار برده شوند. هیدروژل‌های ژلما میکرومهندسی شده برای کاربردهای مختلف مهندسی بافت و دارورسانی با به‌کارگیری چند فن متفاوت در ابعاد میکرو تولید شده‌اند که در ادامه بررسی می‌شوند. با توجه به جدید بودن ژلما، امید است تا شاهد گسترش و کاربرد آن در عرصه صنعت باشیم. ناگفته نماند، هم‌اکنون به طور محدود چسب‌های زخم از ترکیبات ژلاتین و ژلما برای سرعت‌دهی به ترمیم زخم تولید شده‌اند.

فنون میکروساخت

هیدروژل‌های ژلما الگو‌دار شده نوری

الگوی نوری به‌طور ساده به معنی مجموعه‌ای از فنون است که در آن هر شکل از نور برای چاپ و ایجاد الگوی مدنظر در داخل مواد به‌کار گرفته می‌شود. با توجه به قابلیت شبکه‌ای شدن نوری ژلما، فکر به‌کارگیری فنون الگوهای نوری برای ایجاد توپوگرافی ویژه یا مهندسی معماری سه‌بعدی داربست‌ها بر پایه ژلما، روش راحتی برای ایجاد داربست‌های میکروالگو‌برداری شده از ژلماست. پرتوهای نوری فقط از مناطق شفاف ماسک‌های تصویر عبور کرده و موجب ایجاد اتصالات عرضی شیمیایی در محلول ژلما زیری می‌شوند. در واقع این تحریک نوری موجب نسخه‌برداری از هیدروژل بر اساس الگوهای ماسک نوری می‌شود. این موضوع در شکل ۱ نشان داده شده است.

سلول‌های فیروپلاست 3T3 کپسولی شده درون این میکروژل‌ها، زیست‌پذیری مشابهی (۹۲٪-۷۵٪) نشان دادند، اما شکل‌شناسی کشیده‌تری نسبت به هیدروژل‌های ژلما توده داشتند. همچنین، سلول‌های بند ناف انسان (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) که در الگویی با زمینه پوشش‌یافته با زنجیرهای هیدروژل ژلما یا پلی‌اتیلن گلیکول کشت داده شده بودند، با سطوح ژلما اتصال گزینشی یافتند. شکل‌گیری میکروکانال

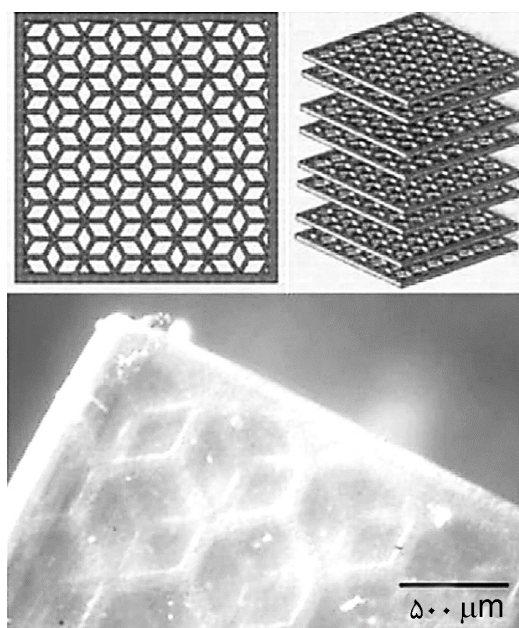
مزایای این روش، سرعت و استحکام قطعات است، ولی هزینه ساخت آن زیاد است. می‌توان به داربست‌های ژلما با خواص مکانیکی قابل تنظیم (در محدوده ۸۰۰ Pa تا ۱ kPa) دست پیدا کرد که وابسته به میکروساختار سه‌بعدی طراحی شده‌اند. طی یک هفته، ساختار ارتباطی تخلخل‌ها در داربست‌های ژلما که از چسبندگی و تکثیر سلول‌ها پشتیبانی می‌کرد، به هم رسیدن سلول‌ها را نشان داد [۵]. در کاربردهای مهندسی بافت غضروف نشان داده شده است، ساختارهای میکروالگوی ژلما امکان شکل‌گیری بافت شبیه غضروف را با استفاده از هدایت هم‌ترازی سلولی درون دسته کلاف‌های کلژن زیست‌مقلد، در مدل محیط آزمایشگاهی مشابه بدن انسان را میسر می‌سازند.

پلیمرشدن دوفوتونی که بر اساس جذب دو فوتون است، روش جایگزینی برای نوشتن مستقیم میکروالگوها درون هیدروژل با منبع لیزر فموتوانیه است [۶]. این فن، تحریک موضعی مولکول‌های آغازگر نوری و در نتیجه واکنش پلیمرشدن موضعی را، که به وضوح در معرض نور کنترل می‌شود، امکان‌پذیر می‌سازد. همچنین، لیزر می‌تواند روی هر قسمت از ماده شفاف حساس به نور متمرکز شود، که در این صورت نیازی به استفاده از پوشینه‌های نوری یا مواد محافظ نیست و ساخت با رویکرد لایه‌به‌لایه نیز محدود نمی‌شود. پتانسیل آسیب سلولی حاصل از ساخت پلیمرشدن دوفوتونی با کپسولی‌کردن سلول‌های رشد بدخیم استخوانی (osteosarcoma, MG63) درون ساختارهای ساخته‌شده مطالعه شد [۶]. سمیت سلولی در ارتباط با انواع رادیکال‌های تولید شده در طول پلیمرشدن نوری اولیه است. محدودیت اصلی این فن در ساخت هیدروژل‌های پرسلول، سرعت تقریباً کم سامانه آن‌ها در مقایسه با سایر روش‌های الگوی نوری است. با توجه به ماهیت موضعی واکنش پلیمرشدن، ممکن است ساعت‌ها زمان برای ایجاد ساختار ساده لازم باشد. بنابراین، پلیمرشدن دو فوتونی برای کاربردهای خاص به ابعاد بزرگ محدود می‌شود.

اخیراً گزارش شده است، هیدروژل‌های ژلمای تولید شده با روش الگوبرداری نوری دو مرحله‌ای می‌توانند به عنوان محیط سه‌بعدی برای کشت سلول‌های سرطانی باشند [۷]. هیدروژل یک‌پارچه ژلما می‌تواند در توسعه مدل‌های توموری سه‌بعدی با معماری مناسب و سفتی موزون به خوبی تعریف و ساخته شود. مشتقات پلیمرهای زیستی پلیمرشونده با نور، همچون ژلما می‌توانند عملاً به آسانی با تمام روش‌های شناخته‌شده الگوبرداری نوری ترکیب شوند.

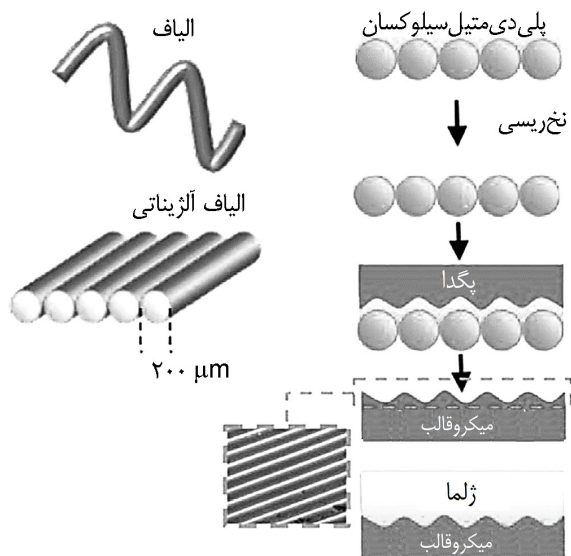
خانواده‌ای از هیدروژل‌های ترکیبی ژلما-پلی‌آکریل‌آمید به عنوان زمینه‌ای برای رهایش کنترل‌شده داروی سدیم مونوهیدرات نافسیلین،

سامانه الگوبرداری نوری دو مرحله‌ای برای ساخت فضایی میکروژل‌های سه‌بعدی بر پایه ژلما و تسخیر تک‌یاخته عصبی در سایت میکروساختار طراحی شد. در مرحله اول، هیدروژل‌های ژلما به شکل‌های حلقه شکاف‌دار با به‌کارگیری پوشانه نوری و انتقال به لامل شیشه‌ای پوشش یافته ۳-تری‌متوکسیلیل پروپیل متاکریلات (TMSPMA) آماده سازی شدند. سپس، هیدروژل‌های میکروالگوبرداری شده درون محلول‌های ژلمای پرسلول غوطه‌ور شده و برای تکمیل ساختار حلقه‌ای، دست‌خوش پلیمرشدن نوری ثانویه شدند. در این مکان، سلول‌های منحصر به فرد می‌توانند در فضا‌های شکاف با بازده متوسط کپسولی شوند. مشخص شده است، یک یاخته عصبی می‌تواند پس از کشت درون هیدروژل‌های مهندسی شده ژلما گسترش یابد. این یافته، ابزاری کاربردی را برای مطالعه و توسعه آکسون‌ها معرفی کرد [۴]. سامانه‌های چاپ دستگاه طرح میکروآینه، برای تولید میکروژل‌هایی با ساختار سه بعدی، با رویکرد پلیمرشدن نوری لایه به لایه، توسعه یافته‌اند. استفاده از سامانه سفارشی طراحی شده با لیتوگرافی سه‌بعدی، برای ساخت هیدروژل‌های ژلما با میکرومعماری قابل تنظیم، گزارش شده است (شکل ۲) [۵]. لیتوگرافی سه‌بعدی نوعی روش ساخت افزایشی است که در آن با استفاده از پلیمر مایع حساس به نور و لیزر فرابنفش، ساختار مد نظر لایه به لایه ساخته می‌شود. این پلیمر مایع، زیر تابش نور فرابنفش از مایع به جامد تبدیل می‌شود. از



شکل ۲- لایه‌های انباشته شده از الگوهای هیدروژل ژلما که با استفاده از سامانه لیتوگرافی سه‌بعدی طرح میکروآینه ساخته شده است [۵].

روی سطح پلی‌دی‌متیل‌سیلوکسان تغذیه شده و با اعمال پی‌درپی محلول‌های دو پلیمر اولیه و نور فرابنفش، در راستای پوشینه نوری همراه می‌شوند. پوشینه نوری به‌ویژه برای کشت سلول‌های جنینی در سطوح مشترک دو هیدروژل متفاوت طراحی شده است، بنابراین در معرض محیط متقارن قرار می‌گیرد. براساس زیست‌تخریب‌پذیری هیدروژل‌های ژلما، سلول‌های جنینی ترجیحاً درون قسمت‌های هیدروژل ژلما جوانه و رشد پیدا می‌کنند که موجب تحریک قطبیت در مراحل اولیه می‌شود. این موضوع رویکردی را برای تنظیم رفتارهای سلول‌های بنیادی به منظور بازآفرینی کاربردهای مهندسی بافت پیشنهاد می‌دهد. با به کارگیری فنون قالب‌گیری پلی‌دی‌متیل‌سیلوکسان و شبکه‌ای کردن با نور فرابنفش، سطح زمینه ژلمای میکروشیاردار را می‌توان ساخت [۱۱]. سلول‌های مایوبلاست C2C12 موش درون میکروکانال‌های هیدروژل‌های شیاردار ژلما تزریق شده و در میکرومحیط سه‌بعدی کشت شدند. در هر دوی سلول و مایوتیوب (لوله ماهیچه) توازن مشاهده شد که ناشی از محدودیت هندسی میکروکانال‌ها، بدون هیچ هم‌ترازی در هیدروژل‌های ژلمای بی‌الگو بود که به عنوان کنترل کننده به کار رفته بودند. شبیه‌سازی الکتریکی به منظور تنظیم ثانویه مایوتیوب به کار گرفته شد که موجب آسان‌سازی در ساختار انقباض بافت ماهیچه شد. نوعی حسگر زیستی گلوکوز غیرتهاجمی برای کشت بافت ماهیچه‌ای، با به کارگیری فیلم نازکی از طلا نانومتخلخل، طراحی و ساخته شده است [۱۲]. با اندازه‌گیری جذب گلوکوز در بافت ماهیچه‌ای اسکلتی مهندسی شده با و بدون



شکل ۳- نمایی از فن میکروقالب‌گیری الیاف کمکی برای تولید سطوح میکروشیاردار موازی به عنوان الگوی برای میکروالگوی ژلما به کار گرفته شده است [۱۳].

به کار گرفته شده است [۸]. امکان تنظیم و مهندسی رهایش آنتی‌بیوتیک با تغییر ترکیب هیدروژل ترکیبی میسر شده است. درحالی که هیدروژل ژلمای خالص تنها ۵۰ درصد از آنتی‌بیوتیک را در ۱۰ h رهایش می‌کند، ژل ترکیبی ژلما-پلی‌آکریل‌امید (با نسبت ۱:۱/۶)، ۹۵ درصد از آن را در همان دوره از زمان آزاد ساخت. در پژوهشی دیگر، برای رهایش کنترل شده، قطره‌های دارو درون هیدروژل پرژلما متشکل از آلزینات متاکریلاتی اکسایشی دارای سلول‌های بنیادی مزانشیمی (mesenchymal stem cells, MSCs) پراکنده شد [۹]. این کار یعنی رساندن مولکول پایدار به سلول‌های حبس شده برای کاربردهای مختلف پزشکی، مانند شبیه‌سازی سامانه ایمنی بدن و کاربردهای درمانی سلول‌های بنیادی به سایر پژوهشگران پیشنهاد می‌شود.

هیدروژل‌های ژلمای میکروقالب‌گیری شده

میکروقالب‌گیری، رویکردی موثر و هزینه‌بر برای بازتولید و ساخت الگوهای هیدروژل با سطوح مسطح و غیرمسطح است. شکل و ظاهر اندازه‌های حاصل از میکروالگو روی هیدروژل‌ها با قالب‌ها می‌تواند تا اندازه‌های زیر $1 \mu\text{m}$ برسد. عموماً، قالب‌ها می‌توانند از مواد مختلف همچون فلز و پلاستیک‌ها ساخته شوند. الاستومرهای پلی‌دی‌متیل‌سیلوکسان به‌طور گسترده برای قالب‌گیری نسخه‌برداری به کار گرفته می‌شوند که به علت استحکام مکانیکی، خاصیت شفافیت نوری و زیست‌سازگاری قابل تنظیم این مواد است. خواص سطحی قالب‌های پلی‌دی‌متیل‌سیلوکسان می‌تواند با تغییر در میزان خیس‌شدگی مایعات مختلف و امکان جداسازی آسان هیدروژل‌های ساخته شده، بهینه شوند. وقتی که محلول‌های پلیمر اولیه در تماس با قالب میکروالگوگذاری شده قرار می‌گیرند، سازوکارهای شبکه‌ای شدن متفاوتی می‌تواند برای شکل‌گیری الگوهای داخل ژل به کار رود. به منظور ساخت ساختارهای الگویی ژلما، ایجاد اتصالات عرضی با نور هنوز پلیمری اولیه به هیدروژل است. در بسیاری از پژوهش‌ها، این روش در ترکیب با فن میکروقالب‌سازی به کار گرفته شده است. فن الگوی نوری و میکروقالب برای تولید فضایی هیدروژل‌های هیبریدی سه‌بعدی منظم، بر اساس مشتقات پگ و ژلما به کار گرفته شده است. سلول‌های جنینی (embryoid bodies, EBs) درون ساختارهای مهندسی شده کپسولی و برهم‌کنش آن‌ها با ترکیبات مختلف هیدروژل مطالعه شده‌اند [۱۰]. بدین منظور، سلول‌های جنینی موش ابتدا در داخل میکروآب‌ده‌ها (microwells)

شبیه‌سازی الکتریکی مشخص شد، بافت با شبیه‌سازی الکتریکی، حداقل ۱۰ درصد گلوکوز بیشتری را در مقایسه با بافت‌های عادی بدون شبیه‌سازی الکتریکی مصرف می‌کنند.

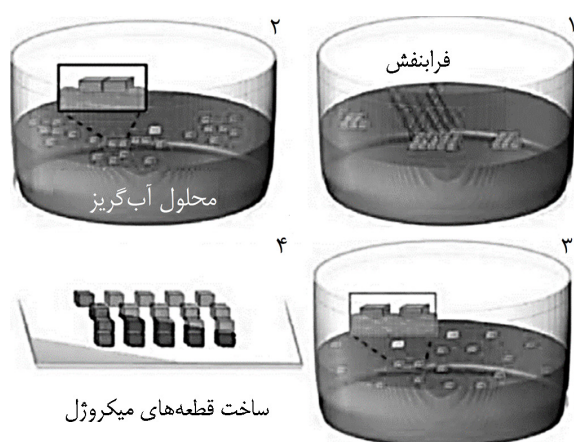
هیدروژل‌های ژلمای شیاردار با الگوهای سطحی پیچیده‌تر همچون الگوهای مارپیچی و موجی‌شکل با به کارگیری فنون قالب‌سازی به همراه الیاف (قالب‌سازی الیافی) مطابق شکل ۳ ساخته شدند [۱۳]. رشته‌های نایلون درون سطح مورد آزمایش یا سیلندره‌های مارپیچی با پوشش‌دهی صفحه‌ای یا لوله‌ای سطح آماده‌سازی شدند. محلول‌های پلیمری اولیه پلی‌دی‌متیل‌سیلوکسان روی الگوهای الیافی در تولید قالب‌های نسخه‌برداری شده پوشش‌یافته و بهبود پیدا کردند. قالب‌های پلی‌دی‌متیل‌سیلوکسان با شکل سطحی واحد در قالب الگوی هیدروژل ژلما برای انتقال الگوهای منحنی پیچیده به سطح هیدروژل‌های حاصل استفاده شدند (حدود ۳۰ درصد بیشتر از مایوتیوب‌های هم‌تراز در هشت روز). مایوبلاست‌های کشت شده C2C12 روی این هیدروژل‌های ژلمای الگوشده با شیارهای سینوسی، تنظیم سلولی بهتری را در مقایسه با مایوبلاست‌های کشت شده روی هیدروژل الگوشده با سلسه کانال معمولی داشتند. این نتیجه پتانسیل استفاده از هیدروژل‌های ژلمای شیاردار با الگوهای پیچیده را برای دستیابی به تنظیم‌سلولی در محیط آزمایشگاهی تقویت می‌کند. استفاده از هیدروژل ژلمای میکروکال‌گیری شده با الگوهای سلسه کانال برای کشت سلول‌های قلبی در محیط آزمایشگاهی، افزایش تنظیم سلولی و فعالیت‌های انقباضی سلول‌های قلب در هیدروژل‌های ژلمای میکروالگوبرداری‌شده در مقایسه با بدون الگو نشان داد. پس از ۷۲ h کشت، ۴۲ درصد از سلول‌ها در ژلمای میکروالگوبرداری‌شده (در مقابل ۲۳ درصد در ژلمای بدون الگو) زنده بودند [۱۴]. میکروکال‌سازی به منظور مهندسی ساختارهای رگ‌مانند با سایر فنون ساخت ترکیب شده است. مثلاً دسته‌های ژلما با سوراخ سیلندری، با قالب‌گیری هیدروژل ژلما در اطراف یک میله طلا تولید شدند [۱۵].

سطح میله با لایه‌ای از سلول پوشیده می‌شود. لایه سلولی از میله‌ها رها شده و درون سطح ژلما با اعمال ولتاژ ۱ V در انتهای میله‌ها چاپ می‌شود. با حذف میله‌ها از دسته ژلما، ساختار رگ‌مانند باقی می‌ماند. تکثیر سلولی در دیواره‌های رگ با غوطه‌وری پیوسته در محیط کشت میسر است. از وجوه مهم در فناوری میکروکال‌ب، قابلیت ایجاد هیدروژل‌های میکروساختی با ساختارهای سه‌بعدی پیچیده و وضوح زیاد است. استفاده از ترکیب قالب‌ها و اتصالات عرضی نوری، راهبرد قدرتمندی برای مهندسی میکروساختارهای

پیچیده و با کیفیت زیاد از ژلماست.

هیدروژل‌های ژلمای خودگردایش

خودگردایش برای ایجاد وجوه میکروساختاری برپایه داربست‌ها در ژلما به‌کار گرفته شده است. برای مثال، خودگردایش در هیدروژل‌های ژلمای پرسلول با هندسه‌های متفاوت در ابعاد میکرومتری با جاسازی مکعب‌های ژلما در داخل سطح مایع با چگالی آب‌گریزی زیاد مشاهده شده است. شکل‌گیری انبوه پیچیده‌ای از میکروژل‌ها به علت تنش سطحی است که انرژی آزاد سامانه را کاهش می‌دهد. این موضوع در شکل ۴ نشان داده شده است [۱۶]. این تراکم می‌تواند در نتیجه مرحله اتصال عرضی ثانویه حاصل از نور فرابنفش باشد. کنترل دقیق سامانه خودگردایش می‌تواند با عامل‌دارکردن سطح دسته‌های هیدروژل پرسلول به دست آید. مثلاً مکعب‌های عامل‌دار شده، به DNA مکمل دراز خود، به طور ترجیحی متصل می‌شوند. در نتیجه، انبوهه‌سازی موضعی و میکرومعماری‌ها می‌توانند با به‌کارگیری دسته‌های هیدروژل پرسلول با رشته‌های مکمل DNA هدایت شوند. راهبرد جایگزینی برای استفاده از مزایای پدیده خودگردایش در کاربردهای مهندسی بافت، استفاده از نیروی مغناطیسی یا تنظیم مغناطیسی است. به‌عنوان مثال، هیدروژل مغناطیسی ژلما و PEG را با به کارگیری اتاق‌مانندی با خطوط میله‌ای منظم مغناطیسی، هم‌راستا کرده و ساخته‌اند [۱۷]. ساختارهای سه‌بعدی پیچیده تشکیل شده از این میکروژل مغناطیسی می‌توانند با این راهبرد ساده گردایش شوند. غوطه‌وری مرتب میله‌های مغناطیسی در سه تعلیق متفاوت میکروژل مغناطیسی، موجب ایجاد ساختارهای تشکیل شده از سه لایه پی‌درپی از هیدروژل‌های پرسلول می‌شود. اخیراً نشان داده



شکل ۴- نمایی از خودگردایش میکروژل‌های ساخته شده با الگوبرداری نوری [۱۶].

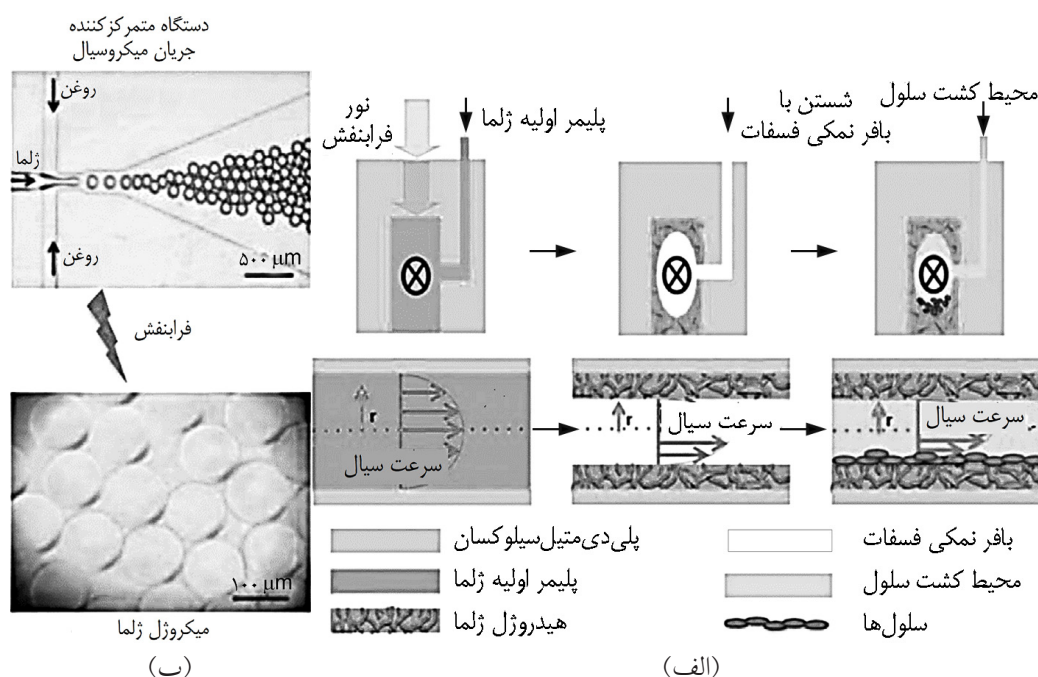
شبه‌ای شده با نور در مقیاس سانتی‌متر گزارش شده است [۱۹]. رشته‌ای از محلول پلیمر اولیه به قالبی با نوار آب‌گریز ایجاد می‌شود، که با افزودن یک قطره از محلول دارای ماده هدف به انتهای رشته همراه است. جریان مویرگ، نفوذ مولکول‌ها، نانوذرات و حتی سلول‌های داخل رشته را تحریک می‌کند، که البته با چند پارامتر همچون هندسه ابعادی رشته، گرانیوی جریان و تنش سطحی کنترل می‌شود. گرادیان گسترش سلولی، با کنترل گرادیان غلظت ژلما در طول رشته هیدروژل شبکه‌ای شده با نور، به دست می‌آید. با این فن هیدروژل‌های ژلما با لایه‌های گرادیان مختلف با استفاده از تکرار پی‌درپی روش و سامانه لایه‌به‌لایه تولید می‌شود. آرایش سه‌بعدی فیروبل‌های NIH 3T3 به دست آمد که با اعمال گرادیان نیروهای فشاری روی هیدروژل‌های ژلمای پرسلول با گرادیان ارتفاع درون دستگاه میکروسیال طراحی شده است [۲۰]. غشا با هیدروژل‌های پرسلول الگوی دایره‌ای هم‌مرکز پوشیده شد که دارای شیب کرنش بوده و بیشینه مقدار آن در مراکز دایره‌هاست. سلول‌های کپسول شده روند چینی را نشان می‌دهند که در ارتباط با کرنش اعمالی روی هیدروژل‌هاست. این سامانه، پلتفرم آسانی را برای بررسی رفتارهای سلولی (زیست‌سازگاری، تکثیر و چینی) زیر گرادیان کرنش فشاری خارجی تامین می‌کند. اخیراً فنی برای پوشش‌دهی دستگاه‌های میکروسیال با هیدروژل‌های قابل شبکه شدن با نور (همانند ژلما) مطرح شده

شده است، ساختارهای هیدروژل پرسلول (همچون هیدروژل‌های ژلما) می‌تواند با به کارگیری راهبرد مغناطیس شناور، با الگوهای غیرتماسی گردایش شوند [۱۸].

به عنوان سامانه خودبه‌خود تحریک شده با ترمودینامیک، خودگردایش رویکرد پایین به بالای مفیدی برای رسیدن به معماری‌های سه‌بعدی پیچیده از تجمع کنترل‌شده واحدهای سازنده یا دسته‌های تشکیل دهنده است. اگرچه مطالعه میکروژل‌های خودگردایش نسبت به ساختارهای منظم در مراحل اولیه قرار دارد و کنترل دقیق بر سامانه خودگردایش به منظور تقلید ساختارهای ظریف بافت طبیعی هنوز چالش مهمی است. معرفی رشته‌های مکمل DNA مرحله مهمی در راستای این هدف بود. طراحی و درک سامانه‌های میکروژل خودگردایش جدید، نشانه‌ها و ابزارهای مفیدی برای توسعه‌های بعدی در برنامه‌های مهندسی بافت است.

هیدروژل‌های ژلما در میکروسیال

میکروسیال به زمینه وسیعی از پژوهش‌های چندنظامی مرتبط است که روی سامانه‌های طراحی شده برای جریان سیال‌های با حجم کوچک تمرکز دارد. در مهندسی بافت، ابزارهای میکروسیال‌ها برای ساخت میکروژل‌هایی با شکل‌های متفاوت، پلتفرم‌های عضو روی یک تراشه و هیدروژل‌های شامل گرادیان یا شیب به کاررفته است. فن ساده‌ای برای تولید گرادیان‌های غلظتی در هیدروژل‌های



شکل ۵- (الف) نمایی از روش پوشش‌دهی میکروکانال با هیدروژل ژلما در میکروسیال‌های میکروساختی هیدروژل ژلما و (ب) ساخت میکروهیدروژل‌های کروی از ژلما با استفاده از دستگاه میکروسیال جریان متمرکز [۲۲].

13±83 و 73±2 درصد در یک و سه روز) درون هیدروژل‌های ژلما مشاهده شد. همچنین، سایر افزودنی‌ها همچون هیالورونیک اسید، که روی گرانشی محلول ژلما به منظور آسان‌سازی روش چاپ اثرگذار بوده، مطالعه شده‌اند [۲۳]. به‌کارگیری شیمیایی ژلما در ابعاد مناسب در فن چاپ جوهرافشان پیزوالکتریک مطالعه شده است. ژلما طی واکنش ثانویه با استیل‌دارکردن (واکنش یک گروه استیل با یک ترکیب شیمیایی)، به منظور تنظیم گرانشی محلول و خواص فیزیکی و نیز قابلیت سامانه‌شدن بهبود داده شده است. آرایه نقطه‌ای پرسلول، در جایی شکل می‌گیرد که غضروف خوک کپسولی شده و زیست‌سازگاری زیادی را درون هیدروژل نشان می‌دهد [۲۴]. محلول‌های ژلما با بازه غلظتی (۷ تا ۱۵ درصد) می‌توانند با سلول‌ها مخلوط شوند و توسط چاپگرزیستی بهبودیافته اکستروود و در داخل یک سامانه رباتیک X-Z مانت شوند. در نهایت، برای ساخت سیلندرهای پرسلول غلظت‌های متفاوت سلول به کار گرفته شد [۲۵]. این موارد در شکل ۶ نشان داده شده است. کلید بهینه‌سازی شامل افزودن لامپ فرابنفش راهنماست، که می‌تواند سامانه شبکه‌ای کردن با نور را در تعلیق پلیمر و سلول درون لوله باریک شیشه‌ای راه‌اندازی کند. میکروتعلیق فلزی شکل‌گیری خودکار سیلندرهای پرسلول ژلما را امکان‌پذیر می‌کند. حرکت هماهنگ با موتور در راستاهای X-Y-Z امکان چاپ دقیق و منظم سیلندرهای پرسلول را درون الیاف به وجود آورده است.

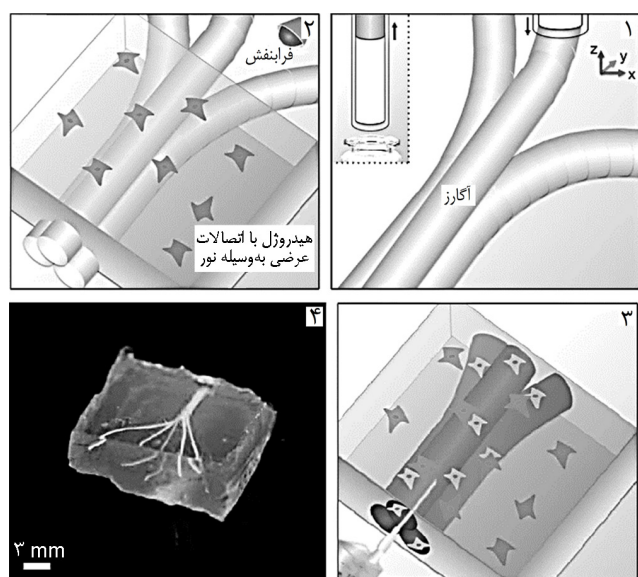
چاپ‌زیستی چه به تنهایی، چه در ترکیب با سایر فنون، افزودنی مهمی به جعبه ابزار مهندسی داربست است. چاپ‌زیستی و

است. برای تولید پلتفرم قلب روی تراشه، دستگاه‌های پوشش‌دهی شده‌ای استفاده شدند که برای کاربردهای غربالگری دارو می‌تواند به‌کارگرفته شود [۲۱]. محلول پلیمر اولیه ژلما در طول میکروکانال‌های سیلندری با سرعت ثابتی (بین ۰ تا ۲۰ mL/min) تزریق شد. در حالی که در معرض نورفرابنفش برای برقراری اتصالات عرضی قرار داشت. نمایی از این سامانه در شکل ۵-الف نشان داده شده است. ضخامت پوشش ژلما می‌تواند با تغییر در مقدار سرعت تزریق جریان، شدت نور فرابنفش و غلظت محلول پلیمر اولیه ژلما تنظیم شود (شکل ۵-ب). در ضمن، پلیمر ژلما و سلول‌ها می‌توانند به منظور ساخت میکروکانال‌های پوشش یافته با هیدروژل ژلمای پرسلول مخلوط شوند [۲۲].

ترکیب هیدروژل‌های ژلما درون دستگاه‌های میکروجران امکان مطالعه برهم‌کنش‌های سلول با موادزیستی در محیط‌های تعریف شده را مهیا می‌سازد. جریان مداوم در داخل دستگاه‌ها، می‌تواند سلولی با شرایط مشابه با بافت طبیعی را ایجاد کند (همچون اکسیژن و تامین مواد مغذی، سطح تنش برشی معین، در معرض انگیزه معین کنترل شده قرار گرفتن). همچنین، هیدروژل‌های ژلما همچون مواد عالی مقلد فضای خارج سلولی برای سلول‌های حبس شده به‌کار گرفته می‌شوند. به راحتی قابل پیش‌بینی است که هیدروژل‌های ژلما به زودی جایگاه مناسبی در کاربردهای میکروسیال همچون مسائل مربوط به حسگرهای زیستی و غربالگری دارو، پیدا خواهند کرد.

هیدروژل‌های ژلمای زیست‌چاپی

زیست‌چاپگرها از مفهوم تولید افزودنی مشتق شده‌اند که در آن، معماری سه‌بعدی می‌تواند با طراحی اولیه و رسوب ثانویه لایه‌های جوهرزیستی، همچون سامانه چاپ سه‌بعدی منظم ساخته شود. هدف زیست‌چاپ به طور دقیق توزیع سلول‌ها، هیدروژل‌ها یا مواد پرسلولی برای دستیابی به ساختارهای سه‌بعدی کنترل شده فضایی و تقلید ساختار بافت هدف است. پایداری سلولی و زیست‌پذیری باید در طول سامانه چاپ، با طراحی دقیق مواد زیست‌سازگار، روش‌های شبکه‌ای شدن و پارامترهای بهینه زیست‌چاپ، بدون تغییر باقی بماند. ساختار پرسلولی مونتاژ شده، محیطی مشابه بافت، برای سلول‌ها، به منظور تکثیر و در نهایت بلوغ درون بافت را ایجاد می‌کند. فناوری‌های زیست‌چاپ برای تولید ساختار سه‌بعدی بر پایه ژلما با معماری کنترل‌شده در کاربردهای مختلف مهندسی بافت به‌کار گرفته شده‌اند. محلول‌های ژلمای مخلوط شده با سلول‌های غضروف درون ساختارهای شبکه‌ای چندلایه‌ای چاپ شده‌اند که در آن‌ها زیست‌سازگاری زیاد سلول‌ها (به ترتیب



شکل ۶- نمایی از روش زیست‌چاپ برای ساخت میکروکانال‌ها درون هیدروژل ژلما با استفاده از قالب آگاروز [۲۶].

پرسلولی باشد که عملکرد بافت طبیعی را تقلید می‌کنند. در نهایت، این ساختارها به ساخت و تولید مستقیم بافت سنتزی کامل در محیط آزمایشگاهی سوق یابد که برای پیوند اعضا مناسب است. زیست‌سازگاری عالی، تخریب‌پذیری و سامانه‌پذیری هیدروژل‌های ژلما نقش مهمی به عنوان مواد زیستی قابل چاپ در فناوری‌های چاپ‌زیستی سه‌بعدی بازی خواهد کرد.

هیدروژل‌های ژلمای الیافی و پارچه‌ای

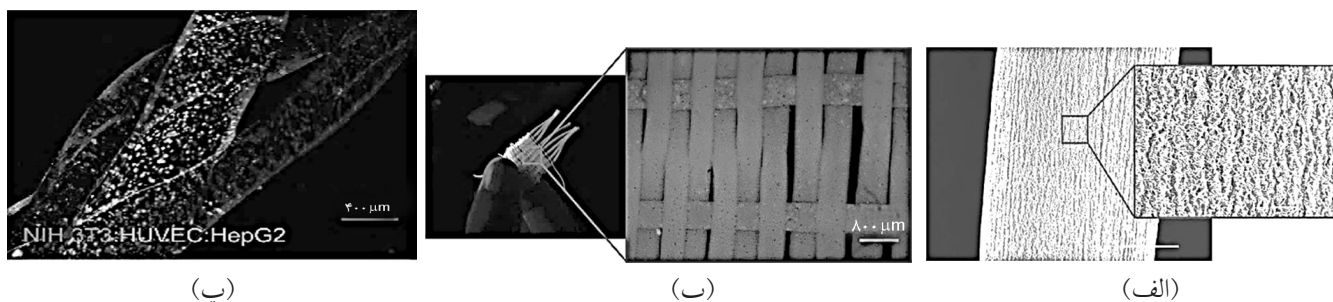
فنون بافتن در اصل به منظور تولید لباس و بافته‌های تزئینی هستند، هرچند می‌توانند برای تولید ساختارهای پیچیده با خواص مکانیکی تنظیم‌شدنی به همراه کنترل دقیق الگوها به کار برده شوند. اخیراً، این فنون به طور گسترده در مهندسی طراحی داربست‌های بافت‌ها با خواص مکانیکی زیست‌تقلیدی به کار گرفته شده‌اند [۲۹]. این تلاش‌ها برای شبیه‌سازی شکل‌شناسی بعضی از بافت‌ها همچون زردپی، رباط و ماهیچه با بافته‌های تولید شده است. در ضمن، قابلیت زیاد فناوری بافت (مهندسی نساجی) در مهندسی بافت می‌تواند با ساخت الیاف پرسلول به کار گرفته شود. هیدروژل‌ها در کاربردهای عمومی و ژلما در کاربردهای خاص بهترین حامل‌های سلول هستند. هر چند کارهای تجربی کمی در باره تولید الیاف و بافت‌های ژلما وجود دارد. ساخت الیاف یا الیاف ژلما کم‌اهمیت نیست و همچون سامانه شبکه‌ای شدن خیلی سریع انجام نمی‌پذیرد. از این رو، نیازمند تکمیل سامانه‌های در معرض نور فرابنفش با سامانه‌های ریسندگی الیاف است که ایجاد چالش جدیدی در سامانه می‌کند. افزون بر این، خواص مکانیکی ژلما چندان مورد علاقه کاربری بافتن و نساجی نیست.

الیاف ژلما را می‌توان با استفاده از تزریق محلول پلیمر اولیه به درون محلول سرد و جامد شدن اولیه الیاف و در ادامه شبکه‌ای

قالب‌گیری سه‌بعدی، عنصر کلیدی برای تقلید نزدیک از معماری‌های کارا و پیچیده بافت است که می‌تواند برای طراحی هیدروژل‌های پرسلول با میکروکانال‌های سیلندری جاسازی شده استفاده شود و به صورت رگی در نظر گرفته می‌شود. آگاروز، پلی‌ساکاریدی طبیعی، به شکل سیلندر چاپ‌زیستی شده که به عنوان قالب قربانی برای شکل‌گیری هیدروژل‌های رگ‌مانند پرسلول ژلما به کار گرفته شده است (شکل ۶) [۲۶]. قسمت‌های قربانی آگاروز می‌تواند به راحتی از ماتریس ژلما با کشیدن ریسمان آگاروز حذف شود. در نتیجه، موجب تشکیل داربست چاپ‌زیستی شده ژلما با سوراخ داخلی (رگ‌مانند) می‌شود [۲۷]. چند جوهر متفاوت، که با سامانه چاپ مطابقت دارد، به منظور تولید ساختار پیچیده از چند نوع سلول طراحی شده است. یک کوپلیمر سه‌دسته‌ای پلی‌اتیلن‌گلیکول و پلی‌پروپیلن‌اکسید (Pluronic F127)، برای چاپ رشته‌های فراری استفاده شد که می‌تواند به راحتی برای ایجاد ساختارهای شبکه‌ای رگ‌مانند توخالی با اجازه دادن به سلول برای غوطه‌وری در آن و تشکیل رگ‌ها، به کار برده شود [۲۷].

روش‌هایی برای دستیابی به کنترل دقیق رهایش دارو با به‌کارگیری هیدروژل ژلما بیان شده است. برای مثال، فنون دی‌الکتروفورز برای مهندسی دقیق گرادیان غلظت سه‌بعدی میکرو و نانوذرات دارویی (یا سایر ترکیبات غیردارویی) جاسازی شده در هیدروژل ژلما به کار برده شده است [۲۸]. گرادیان غلظتی نانوذرات و میزان اتصالات عرضی هیدروژل، امکان ارائه نیم‌رخ رهایش برنامه‌ریزی شده سفارشی را میسر کرده است.

زیست‌چاپ، امکان ساخت سامانه دقیق و مناسبی از مواد زیستی با سلول‌ها را برای ایجاد توزیع فضایی کنترل شده سه‌بعدی میسر می‌سازد. هدف، حفاظت از زیست‌پذیری و عملکرد سلول است. زیست‌چاپ می‌تواند راه‌حلی برای ساخت ساختارهای پیچیده



شکل ۷- (الف) اعمال فنون زیست‌نساجی برای مونتاژ میکروساختارهای ترکیبی آلزینات و الیاف ژلما و تصویر میکروسکوپ الکترونی پوششی از الیاف ساخته شده، (ب) تصویر و ریزنگار از پارچه معمولی بافته شده با فنون زیست‌نساجی و (پ) ساختار بافته از فیبروبلاست‌ها و سلول‌های کبدی به عنوان مدل کبد [۲].

شدن شیمیایی با استفاده از تابش نور فرابنفش، تولید کرد [۳۰]. قابل ذکر است، توزیع سریع ژلما در داخل محلول سرد، به شدت روی کنترل‌پذیری سامانه اثرگذار است. قالب‌های فداشونده آلژینات برای مهندسی الیاف ژلما نیز به کار رفته است. در این رویکرد، پلیمرهای اولیه ژلما با آلژینات مخلوط شده و سپس درون محلول کلسیم کلرید هم‌زده می‌شوند. ایجاد اتصالات عرضی با آلژینات، پلیمر اولیه ژلما را به طور فیزیکی به دام می‌اندازد. سپس، الیاف در معرض نور فرابنفش با ژلما شبکه‌ای می‌شوند و آلژینات با استفاده از جاذب کلسیم حذف می‌شود. این موارد در شکل‌های ۷ الف تا پ نشان داده شده است [۲۹، ۲].

نتیجه‌گیری

ژلما پلیمری زیستی، حاصل واکنش مستقیم ژلاتین با متاکریلیک انیدرید، با قابلیت شبکه‌ای شدن نوری است. به کمک این ژل، ساخت میکروساختارهای پرسلولی مهندسی شده با معماری سه‌بعدی تعریف شده و توپولوژی با چارچوبی از فنون میکروساخت متفاوت، همچون الگوبرداری نوری، میکرو قالب‌گیری و زیست‌چاپ

امکان‌پذیر شده است. ساختارهای سه‌بعدی پرسلولی براساس هیدروژل ژلما می‌توانند برای تقلید ساختار بافت‌های طبیعی طراحی شوند که اجازه کاربری آن‌ها را در مهندسی بافت و بازتولید دارو می‌دهد. در آینده نزدیک، فنون میکروساخت نوین، گسترش زنجیری وسیعی در کاربرد ژلما به عنوان داربست، نانوحامل، داروسازی هوشمند و نانوزیست‌حسگرها ایجاد خواهند کرد. هنوز چالش‌هایی در ارتباط با مقیاس‌های طولی در مهندسی بافت باقی مانده است. نسخه‌برداری از میکرومویرگ‌های توخالی باید به‌طور کامل بررسی شود. رویکردهای مهندسی برای تولید رگ‌هایی از مواد در اندازه میکرو نیاز به بهبود دارد. به نظر می‌رسد، استفاده ترکیبی از الیاف فداشونده و میکروسیال‌ها (یا میکروچاپ‌ها) قسمتی از راه‌حل است. از سوی دیگر، اندازه‌های ساخت اندام‌های عملکردی و بافت‌های سه‌بعدی پیچیده برای غلبه بر محدودیت‌های حمل اکسیژن در گستره ابعادی سانتی‌متر است. اینجا شاید پدیده خودگردایش راه‌حل کلیدی برای غلبه بر مشکل باشد. در کل، زیست‌مواد بر پایه ژلما برای بسیاری از کاربردهای پزشکی از جمله مهندسی بافت، داروسازی و زیست‌حسگرها می‌توانند نامزد مناسبی باشند که البته نیاز به گسترش و صنعتی‌سازی دارد.

مراجع

1. Bulcke A.I.V.D., Bogdanov B., Rooze N.D., Schacht E.H., Cornelissen M., and Berghmans H., Structural and Rheological Properties of Methacrylamide Modified Gelatin Hydrogels, *Biomacromolecules*, **1**, 31-38, 2000.
2. Yue K., Santiago G.T., Alvarez M.M., Tamayol A., Annabi N., and Khademhosseini A., Synthesis, Properties and Biomedical Applications of Gelatin Methacryloyl (GelMA) Hydrogels, *Biomaterials*, **73**, 254-271, 2015.
3. Aubin H., Nichol J.W., Hutson C.B., Bae H., Sieminski A.L., Cropek D.M., Akhyarie P., and Khademhosseini A., Directed 3D Cell Alignment and Elongation in Microengineered Hydrogels, *Biomaterials*, **31**, 6941-6951, 2010.
4. Fan Y., Xu F., Huang G., Lu T.J., and Xing W., Single Neuron Capture and Axonal Development in Three-Dimensional Microscale Hydrogels, *Lab. Chip*, **12**, 4724-4731, 2012.
5. Gauvin R., Chen Y.-C., Lee J.W., Soman P., Zorlutuna P., Nichol J.W., Bae H., Chen S., and Khademhosseini A., Microfabrication of Complex Porous Tissue Engineering Scaffolds Using 3D Projection Stereolithography, *Biomaterials*, **33**, 3824-3834, 2012.
6. Ovsianikov A., Deiwick A., Vlierberghe S.V., Dubrue P., Moeller L., Draeger G., and Chichkov B., Laser Fabrication of Three-dimensional CAD Scaffolds from Photosensitive Gelatin for Applications in Tissue Engineering, *Biomacromolecules*, **12**, 851-858, 2011.
7. Peela N., Sam F.S., Christenson W., Truong D., Watson A.W., Mouneimne G., Ros R., and Nikkhah M., A Three Dimensional Micropatterned Tumor Model for Breast Cancer Cell Migration Studies, *Biomaterials*, **81**, 72-78, 2016.
8. Serafim A., Tucureanu C., Petre D.G., Dragusin D.M., Salaganeanu A., Vlierberghe S.V., Dubrue P., and Stancu I.C., One-Pot Synthesis of Superabsorbent Hybrid Hydrogels Based on Methacrylamide Gelatin and Polyacrylamide. Effortless Control of Hydrogel Properties Through Composition Design, *New J. Chem.*, **38**, 3112-3126, 2014.
9. Jeon O., Wolfson W., and Alsberg E., In-Situ Formation of

- Growth-Factor-Loaded Coacervate Microparticle-Embedded Hydrogels for Directing Encapsulated Stem Cell Fate, *Adv. Mater.*, **27**, 2216-2223, 2015.
10. Qi H., Du Y., Wang L., Kaji H., Bae H., and Khademhosseini A., Patterned Differentiation of Individual Embryoid Bodies in Spatially Organized 3D Hybrid Microgels, *Adv. Mater.*, **22**, 5276-5281, 2010.
11. Hosseini V., Ahadian S., Ostrovidov S., Camci-Unal G., Chen S., Kaji H., Ramalingam M., and Khademhosseini A., Engineered Contractile Skeletal Muscle Tissue on a Microgrooved Methacrylated Gelatin Substrate, *Tissue Eng., Part. A.*, **18**, 2453-2465, 2012.
12. Obregon R., Ahadian S., Ramon-Azcon J., Chen L., Fujita T., Shiku H., Chen M., and Matsue T., Non-Invasive Measurement of Glucose Uptake of Skeletal Muscle Tissue Models Using a Glucose Nanobiosensor, *Biosens. Bioelectron.*, **50**, 194-201, 2013.
13. Hosseini V., Kollmannsberger P., Ahadian S., Ostrovidov S., Kaji H., Vogel V., and Khademhosseini A., Fiber-Assisted Molding (FAM) of Surfaces with Tunable Curvature to Guide Cell Alignment and Complex Tissue Architecture, *Small*, **10**, 4851-4857, 2014.
14. Annabi N., Tsang K., Mithieux S.M., Nikkhah M., Ameri A., Khademhosseini A., and Weiss A.S., Highly Elastic Micropatterned Hydrogel for Engineering Functional Cardiac Tissue, *Adv. Funct. Mater.*, **23**, 4950-4959, 2013.
15. Sadr N., Zhu M., Osaki T., Kakegawa T., Yang Y., Moretti M., Fukuda J., and Khademhosseini A., SAM-Based Cell Transfer to Photopatterned Hydrogels for Microengineering Vascular-Like Structure, *Biomaterials*, **32**, 479-490, 2011.
16. Zamanian B., Masaeli M., Nichol J.W., Khabiry M., Hancock M.J., Bae H., and Khademhosseini A., Interface-Directed Self-Assembly of Cell-Laden Microgels, *Small*, **6**, 937-944, 2010.
17. Xu F., Wu C.A.M., Rengarajan V., Finley T.D., Keles H.O., Sung Y., Li B., Gurkan U.A., and Demirci U., Three-Dimensional Magnetic Assembly of Microscale Hydrogels, *Adv. Mater.*, **23**, 4254-4260, 2011.
18. Tasoglu S., Yu C.H., Liaudanskaya V., Guven S., Migliaresi C., and Demirci U., Magnetic Levitational Assembly for Living Material Fabrication, *Adv. Healthc. Mater.*, **4**, 1469-1476, 2015.
19. Hancock M.J., Piraino F., Camci-Unal G., Rasponi M., and Khademhosseini A., Anisotropic Material Synthesis by Capillary Flow in a Fluid Stripe, *Biomaterials*, **32**, 6493-6504, 2011.
20. Hsieh H.Y., Camci-Unal G., Huang T.W., Liao R., Chen T.J., Paul A., Tseng F.G., and Khademhosseini A., Gradient Static-Strain Stimulation in a Microfluidic Chip for 3D Cellular Alignment, *Lab. Chip.*, **14**, 482-493, 2014.
21. Annabi N., Selimovic S., Cox J.P.A., Ribas J., Bakooshli M.A., Heintze D., Weiss A.S., Crokek D., and Khademhosseini A., Hydrogel-Coated Microfluidic Channels for Cardiomyocyte Culture, *Lab. Chip.*, **13**, 3569-3577, 2013.
22. Cha C., Oh J., Kim K., Qiu Y., Joh M., Shin S.R., Wang X., Camci-Unal G., Wan K.T., Liao R., and Khademhosseini A., Microfluidics-Assisted Fabrication of Gelatin-Silica Core-Shell Microgels for Injectable Tissue Constructs, *Biomacromolecules*, **15**, 283-290, 2014.
23. Schuurman W., Levett P.A., Pot M.W., Weeren P.R.V., Dhert W.J.A., Huttmacher D.W., Melchels F.P., Klein T.J., and Malda J., Gelatin-Methacrylamide Hydrogels as Potential Biomaterials for Fabrication of Tissue-Engineered Cartilage Constructs, *Macromol. Biosci.*, **13**, 551-561, 2013.
24. Hoch E., Hirth T., Tovar G.E.M., and Borchers K., Chemical Tailoring of Gelatin to Adjust its Chemical and Physical Properties for Functional Bioprinting, *J. Mater. Chem. B.*, **1**, 5675-5685, 2013.
25. Bertassoni L.E., Cardoso J.C., Manoharan V., Cristino A.L., Bhise N.S., Araujo W.A., Zorlutuna P., Vrana N.E., Ghaemmaghami A.M., Dokmeci M.R., and Khademhosseini A., Direct-Write Bioprinting of Cell-Laden Methacrylated Gelatin Hydrogels, *Biofabrication*, **6**, 24105-24116, 2014.
26. Bertassoni L.E., Ceconi M., Manoharan V., Nikkhah M., Hjortnaes J., Cristino A.L., Barabaschi G., Demarchi D., Dokmeci M.R., Yang Y., and Khademhosseini A., Hydrogel Bioprinted Microchannel Networks for Vascularization of Tissue Engineering Constructs, *Lab. Chip.*, **14**, 2202-2211, 2014.
27. Kolesky D.B., Truby R.L., Gladman A.S., Busbee T.A., Homan K.A., and Lewis J.A., 3D Bioprinting of Vascularized, Heterogeneous Cell-Laden Tissue Constructs, *Adv. Mater.*, **26**, 3124-3130, 2014.
28. Ahadian S., Ramón-Azcón J., Estili M., Obregón R., Shiku H., and Matsue T., Facile and Rapid Generation of 3D Chemical Gradients within Hydrogels for High-Throughput Drug Screening Applications, *Biosens. Bioelectron.*, **59**, 166-173, 2014.

29. Chung B.G., Lee K.H., Khademhosseini A., and Lee S.H., Microfluidic Fabrication of Microengineered Hydrogels and Their Application in Tissue Engineering, *Lab. Chip.*, **12**, 45-59, 2012.
30. Shi X., Ostrovidov S., Zhao Y., Liang X., Kasuya M., Kurihara K., Nakajima K., Bae H., Wu H., and Khademhosseini A., Microfluidic Spinning of Cell-Responsive Grooved Microfibers, *Adv. Funct. Mater.*, **25**, 2250-2259, 2015.