

Polymerization
Quarterly, 2022
Volume 12, Number 2
Pages 14-26
ISSN: 2252-0449

A Review on 3D Bioprinting Techniques and Bioinks

Negar Farzanehfar, Mehdi Sheikhi, and Fatemeh Rafiemanzelat*

Polymer Chemistry Research Lab, Department of Chemistry,
University of Isfahan, Postal Code 81746-73441, Isfahan, Iran

Received: 31 March 2021, Accepted: 14 July 2021

Abstract

With the exciting advancement in medical knowledge, the production or replacement of tissue or organs has the gold standard in the treatment of some diseases and lesions. Bioprinting technology is a breakthrough in this field. In line with the evolution of this technology, the development of advanced printers and new biomaterials are the factors affecting achievement of recent advances, which is partially due to the reproducibility and scaffold regeneration with the intended architecture. In this paper, the basic definitions of the three-dimensional (3D) bioprinting technology and the main elements associated with this technology are reviewed. This review aims are to focus on different technologies developed for the printing of biological species. A brief description of complicated nozzle geometry is followed by introducing common bioinks and the requirements for ideal biomaterials, especially hydrogels as novel candidates and their preparation aspects. Architectural, mechanical and biological properties of a scaffold are the most essential characteristics of a printed structure which are affected by the internal structure and the hydrogel precursor. Since innovation in biomaterials is key to the success of bioprinting, hydrogel preparation methods are fully discussed in terms of network formation. By incorporating proper instrumental parameters and tailoring hydrogel precursors, many benefits can be imparted to the final scaffold, providing design elements for next-generation bioinks.

Key Words

3D printing,
bioinks,
bioprinting,
hydrogel,
tissue engineering

(*) To whom correspondence should be addressed.
E-mail: frafiemanzelat@chem.ui.ac.ir

مروری بر فن ها و زیست جوهرهای زیست چاپگرهای سه بعدی

نگار فرزانه فر، مهدی شیخی، فاطمه رفیع منزلت*

اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده شیمی، گروه شیمی آلی و پلیمر، کد پستی ۸۱۷۴۶-۷۳۴۴۱

دریافت: ۱۴۰۰/۱/۳۱، پذیرش: ۱۴۰۰/۴/۲۳

با پیشرفت شگفت انگیز دانش پزشکی، تولید یا جایگزینی بافت یا اندام روش طلایی در درمان برخی بیماری ها و ضایعات به شمار می رود. فناوری زیست چاپ، تحولی در این زمینه ایجاد کرده است. در راستای تکامل این فناوری، توسعه چاپگرهای پیشرفته و زیست مواد نوین، عامل اثرگذاری بر دستیابی به پیشرفت های اخیر است که بخشی از آن مرهون تکرارپذیری و بازساخت داربست با معماری مدنظر است. در این مقاله، تعریف های اساسی فناوری زیست چاپ سه بعدی ارائه شده و عناصر دخیل در موفقیت این فرایند از نقطه نظر دستگاه وری و زیست مواد استفاده شده بررسی می شود. در این راستا، ابتدا زیست چاپگرهای توسعه یافته و سپس، اهمیت هندسه افشانک و ویژگی های اساسی زیست مواد ایده آل، به ویژه هیدروژل ها، مرور شده است. ویژگی های معماری، مکانیکی و زیستی یک داربست، ضروری ترین ویژگی یک سازه چاپ شده بوده و متأثر از ساختار داخلی و جوهر به کار رفته است. با توجه به اهمیت زیاد جوهر در فرایند چاپ، روش های تهیه هیدروژل از دید تشکیل شبکه و اهمیت آن ها در زمینه طراحی زیست مواد کارا تر بررسی شده است. بدیهی است، با آشنایی با عوامل دستگاهی مناسب و پلیمرهایی با خواص ویژه می توان چشم انداز جالبی را در طراحی داربست های زیستی داشت.

چکیده



نگار فرزانه فر



مهدی شیخی



فاطمه رفیع منزلت

واژگان کلیدی

چاپ سه بعدی،
زیست جوهر،
زیست چاپ،
هیدروژل،
مهندسی بافت

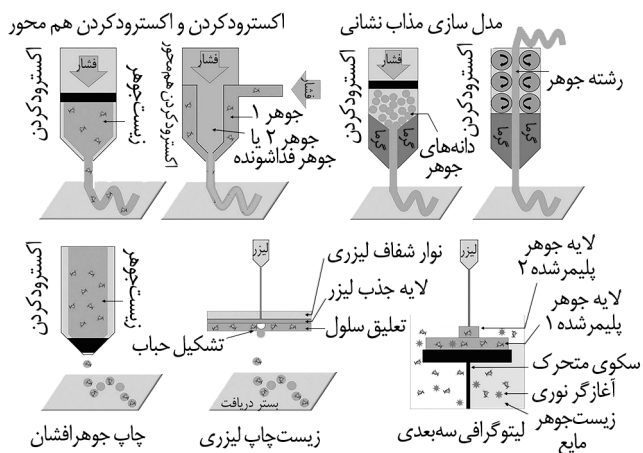
* مسئول مکاتبات، پیام نگار:

frafiemanzelat@chem.ui.ac.ir

مروری بر فن‌ها و زیست‌جوهرهای زیست‌چاگرهای ...

فصلنامه علمی، سال دوازدهم، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۱

از دید سخت‌افزاری، روش‌های مختلفی برای فرایند چاپ وجود دارد که تفاوت آن‌ها در سامانه توزیع جوهر است (شکل ۱). سامانه‌های توزیع به‌مرور تکامل یافته‌اند. امروزه، روش‌های



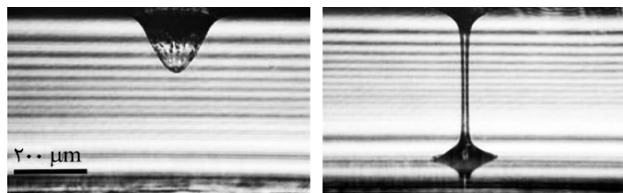
شکل ۱- سازوکار روش‌های متداول چاب سه بعدی [۲].

مختلف بدین منظور وجود دارند که هر روش مستلزم جوهرهایی با خواص مکانیکی و فیزیکی متناسب با آن است. مهم‌ترین ویژگی‌ها در جدول ۱ خلاصه شده است [۵]. از میان روش‌های استفاده‌شده برای چاپ، روش لیتوگرافی سه‌بعدی و مدل‌سازی مذاب‌نشانی با وجود استفاده در صنایع مختلف، به دلیل تابش‌دهی با پرتوهای مخرب، استفاده از حلال و اعمال دمای زیاد، روش‌های مناسبی برای چاپ سازه‌های سلولی به‌شمار نمی‌روند. در این میان، چاپ‌های جوهرافشان، اکسترودی و لیزری سه فناوری اصلی زیست‌چاپ محسوب می‌شوند. این روش‌ها، قابلیت شکل‌دهی سازه‌های زیستی با چگالی زیاد سلول را دارند و هر یک دارای نقاط قوت و ضعف ویژه‌ای هستند. انتخاب روش مناسب براساس گرانروی، توان تفکیک، سرعت ژل‌شدن، تعداد لایه‌های مدنظر، زنده‌مانی سلول‌ها و سایر موارد انجام می‌گیرد (جدول ۲) [۹]. در ادامه این سه روش بحث می‌شوند.

نمایی از این فرایند در شکل ۱ نشان داده شده است. در این روش، در ابتدا سلول‌ها تریپسین دار و گریز از مرکز شده و سپس در محیط (برای مثال، ماتریژل) به حالت تعلیق درمی‌آیند. این مخلوط روی ورقه شیشه‌ای حاوی پوشش جاذب نور لیزر پخش می‌شود که معمولاً از جنس طلا یا تیتانیوم است. لایه دریافت‌کننده به موازات لایه اول و در فاصله چند میکرون تا چند میلی‌متر پایین‌تر از لایه اول قرار می‌گیرد. پالس‌های لیزر به لایه جذب‌کننده می‌تابد و به‌طور موضعی در کانون لیزر تبخیر انجام می‌گیرد. پس از ایجاد فشار زیادی از گاز در اثر تبخیر، محتویات سلولی به سمت لایه دریافت‌کننده سوق داده می‌شوند [۳]. با دآور می‌شود، زیست مواد

جدول ۱- مقایسه قیمت، سرعت، قدرت تفکیک و خواص مورد نیاز جوهرها برای هر روش [۳، ۴].

روش چاپ	حالت‌های پردازش	خواص مکانیکی	مواد استفاده شده به عنوان جوهر	خواص لازم برای در جوهر	سرعت چاپ	هزینه	قدرت تفکیک
زیست چاپ جوهرافشان	مکانیکی و گرمایی	ضعیف	پلیمرهای پخت پذیر نوری و با قابلیت ژل شدن گرمایی	ژل شدن سریع	سریع	ارزان	زیاد
زیست چاپ لیزری	نوری	قوی	پودرهایی مانند آلومید، پلی آمید، پلی آمید پر شده با ذرات شیشه و پلی یورتان لاستیک مانند	کشش سطحی کم	متوسط	گران	متوسط تا زیاد
زیست چاپ اکسترودی	مکانیکی، گرمایی و شیمیایی	ضعیف	رزین‌ها و محلول‌های پلیمری پخت پذیر	تنش برشی کم و حفظ شکل پس از خروج	کند	متوسط	متوسط
مدل سازی مذاب نشانی	مکانیکی	خوب	پلیمرهای گرمانرم مانند پلی لاکتیک اسید، آکریلونیتریل بوتادی ان استیرن، پلی کربنات و پلی (اتر اتر کتون)	دمای ذوب کم	سریع	ارزان	متوسط



شکل ۲- دو تصویر استروبو سکویی از روند چاپ بین دو ورقه شیشه‌ای [۱۰].

با گرانش زیاد به شکل قطره قابل انتقال نیستند و با تشکیل جریان سریع، عمل انتقال انجام می‌گیرد (شکل ۲) [۱۰]. جایگاه این روش در زیست چاپ در طراحی داربست‌های متخلخل بوده و به دلیل امکان لایه گذاری دقیق و الگودهی سلول‌ها، به پژوهش‌های بسیاری در زمینه تمایز سلول‌های بنیادی منجر شده است. زیست چاپ لیزری، همانند روش جوهرافشان نوعی روش غیرتماسی است.

جدول ۲- مقایسه روش‌های متداول زیست چاپ سه بعدی [۶-۸].

فرایند	سازگاری با سلول	سازوکار فرایند	نقاط قوت یا مزایا	محدودیت‌ها	ویژگی‌های منحصر به فرد
جوهرافشان	بله	پاشش مواد	وضوح دوبعدی مطلوب، هزینه کم و سرعت فرایند مطلوب	وضوح تقریباً مناسب و گرانش کم	مصرف مقدار کمی از مواد و سازگاری با سلول
لیزری	بله	پلیمر شدن نوری	وضوح سه بعدی زیاد	آسیب سلولی در اثر نور و نیاز به مواد نورحساس	سازگار با اکثر مواد قابل نورپلیمر شدن
اکسترودی	بله	اکسترو کردن مواد	سرعت زیاد، دامنه وسیع جوهرهای قابل استفاده و تکرارپذیری زیاد	تنها زمانی با سلول سازگار است که در دماهای فیزیولوژیکی پردازش شود.	هزینه کم دستگاه

از این رو، به اعمال فشارهای زیاد متداول در روش‌های تماسی، نیازی نیست. بنابراین، به‌عنوان روشی کارا در ایجاد الگوهای سلولی و کشت بدون داربست مورد توجه است [۱۱].

چاپ اکسترودی

زیست‌چاپ اکسترودی که نوشتن جوهری مستقیم (direct-ink-writing) نیز نامیده می‌شود، روش پرکاربردی در ساخت مواد افزایشی برپایه اکستروژن است. در این روش، فاز مایع از افشانک‌های کوچک با سرعت جریان واپایش شده، توزیع می‌شود و لایه به لایه در امتداد الگوهای تعریف شده رسوب می‌کند. جوهر استفاده شده در این روش به وسیله نیروی مکانیکی (پیچ یا پیستون) یا به صورت بادی (از طریق گاز یا هوای تحت فشار) توزیع می‌شود. استفاده از روش‌های پیستونی و پیچ، واپایش بیشتر مقدار جریان مواد را امکان‌پذیر می‌سازد. از سوی دیگر، افزایش فشار اعمالی ممکن است اثر منفی بر زنده‌مانی سلول داشته باشد [۱۲]. افزون بر فشار پیستون، هندسه افشانک نیز عامل دیگری است که بر فشار اعمال شده بر ماده اثرگذار است. افشانک‌های استوانه‌ای بلندتر، تنش برشی بیشتری نسبت به افشانک‌های مخروطی اعمال می‌کنند، اما قدرت تفکیک بهتری را می‌توانند داشته باشند [۱۳].

زیست‌جوهرهای نوشتن مستقیم، شامل رزین‌ها یا محلول‌های آبی یا آلی (حلالی با دمای جوش کم مانند دی‌کلرومتان یا تتراهیدروفوران) هستند که پس از اکستروژن به سرعت تبخیر می‌شوند. پس از آن، ماتریس پلیمری جامد باقی می‌ماند که ساختار خود را حفظ کرده است [۱۴]. از این روش می‌توان برای چاپ پیش‌مواد با دامنه غلظت و گرانش محدود و لفاف پیچی طیف وسیعی از سلول‌ها استفاده کرد. افزون بر این، زیست‌چاپ اکسترودی از لحاظ دستگاه‌وری دارای پیکربندی‌های مختلف است و می‌تواند به‌طور هم‌محور و متشکل از چند ماده باشد که برای انواع مختلف کاربردهای مورد نیاز قابل تعمیم است. در نتیجه پژوهشگران قادرند، ساختارهای بافتی را با خاصیت مکانیکی مورد نیاز طراحی کنند [۱۲].

چاپ جوهرافشان

در این روش، قطره‌های مواد به‌دنبال فشار حاصل از تشکیل و فروریزی میکروحباب‌ها در افشانک از کارتریج خارج می‌شوند. خروج حباب‌ها می‌تواند از طریق محرک گرمایی، پیزوالکتریک یا محرک الکترومغناطیسی انجام شود. باور بر این است که جوهرافشانی گرمایی، زیست‌سازگاری بهتری دارد. دلیل آن این

است که بسامدهای استفاده شده در روش‌های پیزوالکتریک و الکترومغناطیسی قابلیت زوال غشای سلول را با تلاطم آن دارند [۱۴]. چاپگرهای جوهرافشان براساس سازوکار تولید قطره‌ها به دو گروه چاپ جوهرافشان پیوسته و چاپ جوهرافشان قطره‌ای تقسیم می‌شوند. در چاپ جوهرافشان پیوسته، جریان پیوسته سیال از افشانک وجود دارد با درهم‌شکستن آن، قطره‌ها با قطر حدود $100 \mu m$ تولید می‌شوند و جوهر استفاده نشده، قابل بازیافت است. در چاپ جوهرافشان قطره‌ای، قطره‌ها در صورت لزوم جداگانه (با قطر $25 \mu m$ تا $50 \mu m$) تولید می‌شوند [۱۴]. چاپگر، ماده مدنظر را در الگویی تعریف شده قرار می‌دهد و جوهر از طریق فیزیکی یا شیمیایی (نور UV) شبکه‌ای می‌شود. ایجاد قطره به‌روش گرمایی به کمک محفظه سیال و افشانک‌های منفرد یا چندگانه انجام می‌گیرد. در محفظه زیست‌جوهر، گرما ایجاد و باعث تولید پالس‌های فشار می‌شود. اگرچه این روش نسبت به سایر روش‌ها به دلیل خاصیت پیچیدگی فرایند گران‌تر است، اما در کل فناوری‌های جوهرافشان از لحاظ کارایی عملکرد بهتری دارند و می‌توان افزون بر مواد غیرزنده، قطره‌های حاوی سلول‌های محصورشده را با دقت ابعادی زیادی چاپ کرد [۹].

هندسه افشانک در چاپ سه بعدی

قطر پیش‌فرض افشانک برای بیشتر چاپگرهای امروزی 0.4 mm بوده و بسته به کاربری چاپگر، افشانک قابل تعویض است. افزون بر قطر افشانک که می‌تواند بر سرعت و کیفیت اثر بگذارد، نکته حائز اهمیت، ارتباط میان ارتفاع لایه و قطر افشانک است که در حالت کلی ارتفاع لایه نباید بیش از 80% قطر افشانک باشد. در صورتی که از افشانک استاندارد 0.4 mm استفاده شود، حداکثر ارتفاع لایه باید 0.32 mm باشد. با این حال، با یک افشانک 0.6 mm ، می‌توان ارتفاع لایه‌ای تا 0.48 mm را به دست آورد. نکته دیگر، هندسه افشانک است که در کنار افشانک‌های تک‌جهتی، انواع با هندسه ویژه نیز برای طراحی‌های خاص توسعه یافته‌اند که در ادامه به دو مورد از مهم‌ترین آن‌ها پرداخته می‌شود.

سامانه چندسری

با تکامل چاپگرهای سه‌بعدی، امروزه سامانه‌های چندسری با هدف طراحی ساختارهای ناهمگن و متشکل از چند نوع جوهر توسعه یافته است. معماری سازه‌های ناهمگن شامل چاپ متوالی مواد مجزاست که به‌طور متوالی با استفاده از چند افشانک انجام می‌شود. سلول‌ها با پیش‌ماده مدنظر آمیخته می‌شوند و می‌توان

جدول ۳- کاربرد روش های مختلف چاپ سه بعدی در مهندسی بافت و پزشکی بازساختی [۳].

روش چاپ	جزئیات	کاربرد پزشکی
اکسترودی	اکستروژن کردن های بادی، پیستونی و ماردانی	پوست، استخوان (غضروف)، عصب، عضله (تاندون)، بافت چربی، رگ (عروق خون)، اندام سا (organoid)، پژوهش های دارویی، چاپ های مجدد چند ماده و هم محور
مبتنی بر قطره	زیست چاپ جوهرافشان، پرتاب الکترو هیدرودینامیک و چاپ لیزری	پوست، استخوان (غضروف)، عصب، رگ خون (عروق جدید)، اندام سا و پژوهش های دارویی (مدل تومور)
مبتنی بر پخت نوری	لیتوگرافی سه بعدی و پردازش نور رقمی	غضروف، عصب، نخاع، رگ (عروق خون)، اندام سا و کاربردهای بالینی

با روش های دوبعدی موجود، حائز اهمیت است. دلیل آن، امکان بارگیری و تثبیت سلول های مختلف در مواضع فضایی مختلف است [۲]. استفاده از زیست چاپ برای ساخت استخوان سنتزی، غضروف، کبد، پوست و همچنین در مطالعات مربوط به رشد تومور، شبیه سازی شبکه های عروقی و تمایز سلول های بنیادی گزارش شده است. در جدول ۳، انواعی از زیست چاپ به همراه روش فرایند ارائه شده است.

مراحل زیست چاپ و اعضای بدن شامل سه مرحله کلی پیش پردازش، چاپ و پس پردازش است. در مرحله پیش پردازش، ساختار دقیق عضو مدنظر با تصویربرداری میکروسکوپی و MRI، طراحی شده و سپس این اطلاعات به عنوان نشانی های هر جزء سلولی برای ساخت بافت یا اندام شناخته می شود. روش های مختلفی برای به دست آوردن اطلاعات درباره آناتومی، ساختار بافت شناسی، ترکیب و توپولوژی اندام های بدن مانند تصویربرداری بالینی، بخش بافت شناسی، مدل سازی ریاضی و شبیه سازی رایانه ای وجود دارند. در مرحله پس پردازش، سازه چاپ شده به منظور ایجاد بافت های عملکردی و ساختارهای زیستی در شرایط آزمایشگاهی، نیاز به زنده مانی توده سلول، رشد و القای عملکرد (تمایز) دارد. در این مرحله با قرارگیری نمونه در زیست واکنشگاه، نیازهای اساسی سلول که شامل اکسیژن، pH، رطوبت، دما، مواد مغذی و فشار اسمزی است، باید در حد مناسب حفظ شود (شکل ۳).

زیست جوهرها

زیست جوهرها به عنوان مواد مایع پلیمری سرشار از سلول شناخته می شوند که ممکن است دارای اجزای ماتریس برون سلولی یا عامل های رشد و عناصر ضروری برای سلول نیز باشند (شکل ۴). برخی از داربست های چاپ شده از دو یا چند جوهر متفاوت

جوهرهای مختلف را هم زمان چاپ کرد [۱۵]. عیب اصلی این روش، محدودیت آن در استفاده از یک جوهر در آن واحد است که افزون بر کاهش سرعت فرایند، استفاده از آن را در طراحی سازه های چند ماده غیرممکن می سازد. افزون بر این، تعویض سری های مختلف به توقف جریان جوهر، ترازبندی دقیق افشانک ها و شروع مجدد خروج جوهر نیازمند است [۱۶].

سامانه سوزن هسته-پوسته

چاپ سه بعدی با استفاده از سوزن های هم محور برای ایجاد سازه هایی برپایه رشته های هسته-پوسته ای، ناهمگن و توخالی گزارش شده است [۱۷]. با زیست چاپ هسته-پوسته ای، می توان خواص مکانیکی مواد خالص را تا حد زیادی تغییر داد. به عنوان مثال، جوهرهای ترکیبی هسته-پوسته ای پلی اتیلن گلیکول دی آکریلات-آلژینات (اولی به عنوان پوسته و آلژینات به عنوان هسته) در مقایسه با آلژینات خالص، مقاومت و مدول کششی بیشتری را نشان می دهد. همچنین مشاهده شده است، سازه های چاپ شده به وسیله زیست جوهرهای هسته-پوسته به آسان سازی فرایند ترمیم شکل (پس از تغییر شکل) منجر می شوند [۱۸]. افزون بر این، یک هیدروژل برپایه ماتریس برون سلولی بارگیری شده با سلول می تواند به عنوان هسته چاپ شود، در حالی که پوسته از هیدروژل مملو از سلول محافظت می کند [۱۷].

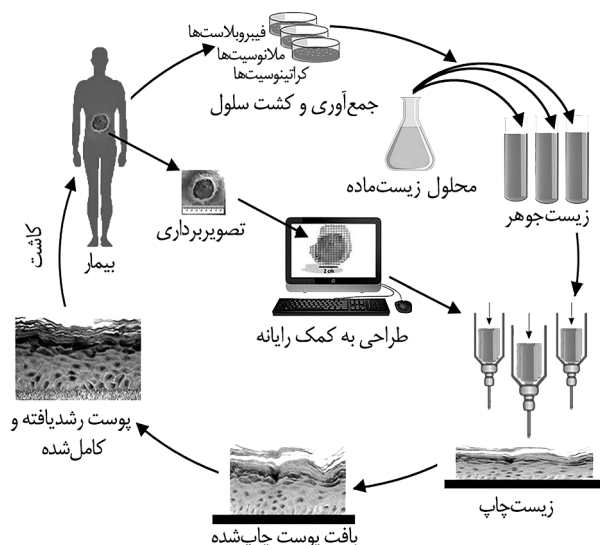
زیست چاپ، جوهرهای متداول و ویژگی های لازم برای چاپ

فناوری زیست چاپ، روشی برای شکل دهی زیست مواد از طریق رسوب دقیق و واپایش شده است که چاپ سه بعدی داربست را به روشی از پیش تعریف شده، قابل تنظیم و تکرارپذیر فراهم می کند. این فناوری به دلیل امکان کشت سه بعدی سلول در مقایسه

۲- ساختارهای ناهمگن که حاصل چاپ لایه‌های مختلف از جوهرهای متفاوت با ترکیبات مختلف است.

۳- ساختارهای پیچیده‌ای که در آن‌ها ذرات مختلف مانند نانوحامل‌های دارویی، نانوذرات یا مواد شیمیایی در زیست‌جوهرها گنجانده شده است [۱۹].

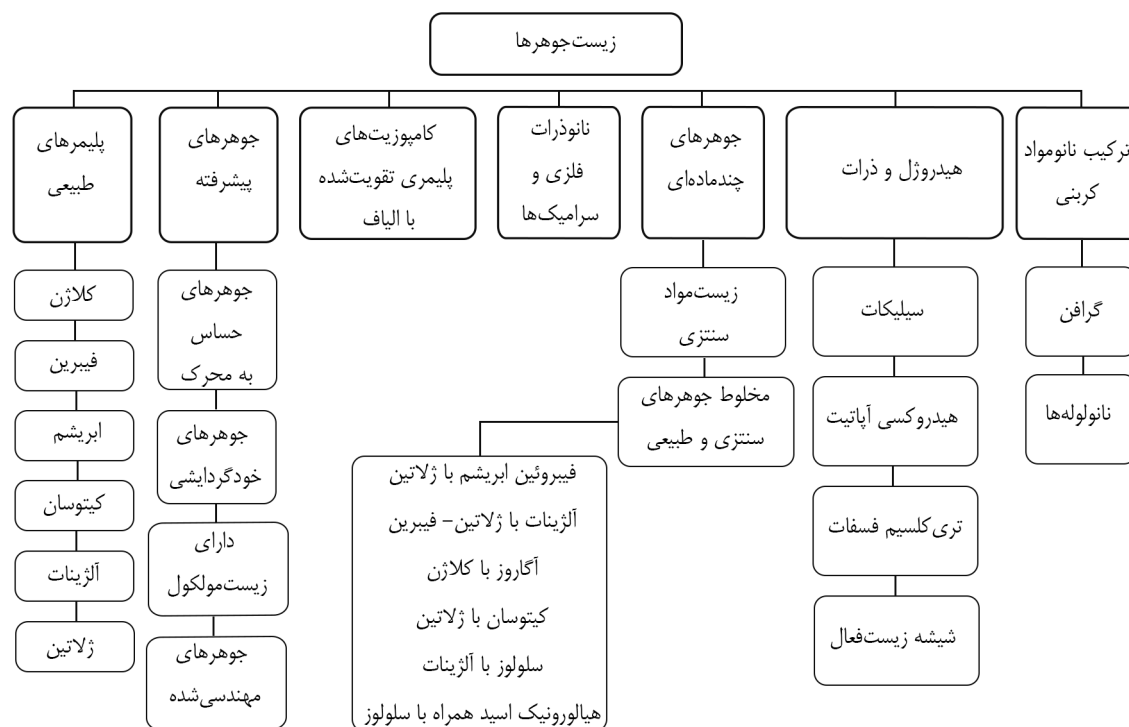
تاکنون مواد مختلفی به عنوان زیست‌ماده در فرایند زیست‌چاپ استفاده شده است (شکل ۴). زیست‌جوهرهای متداولی که در زیست‌چاپ استفاده می‌شوند، شامل پلیمرهای آب‌دوست سنتزی و طبیعی، اجزای ماتریس برون‌سلولی، ریزحامل‌ها، کره‌وارهای بافتی و رشته‌ها، توده‌های سلولی یا برخی از پیوندهای زیستی پیشرفته مانند زیست‌جوهرهای چندماده‌ای، شبکه‌های درهم‌نفوذی، نانوکامپوزیتی و ابرمولکولی هستند. در این میان، پلیمرهای آب‌دوست به دلیل قابلیت تشکیل هیدروژل‌های مشابه با بافت طبیعی، از اهمیت زیادی برخوردار هستند. تاکنون گستره وسیعی از پلیمرها برای فراهم کردن ویژگی‌های رئولوژیکی، مکانیکی، عملکردی و زیست‌سازگاری مطلوب به‌وسیله جوهر و سازه چاپ‌شده استفاده شده‌اند (شکل ۵). در توسعه زیست‌جوهرها، هنوز بحث استفاده از پلیمرهای سنتزی یا طبیعی به‌عنوان زیست‌جوهر وجود دارد. هیدروژل‌های طبیعی دارای مزایای بسیاری از جمله گرانشی، تولید ژل، زیست‌سازگاری و



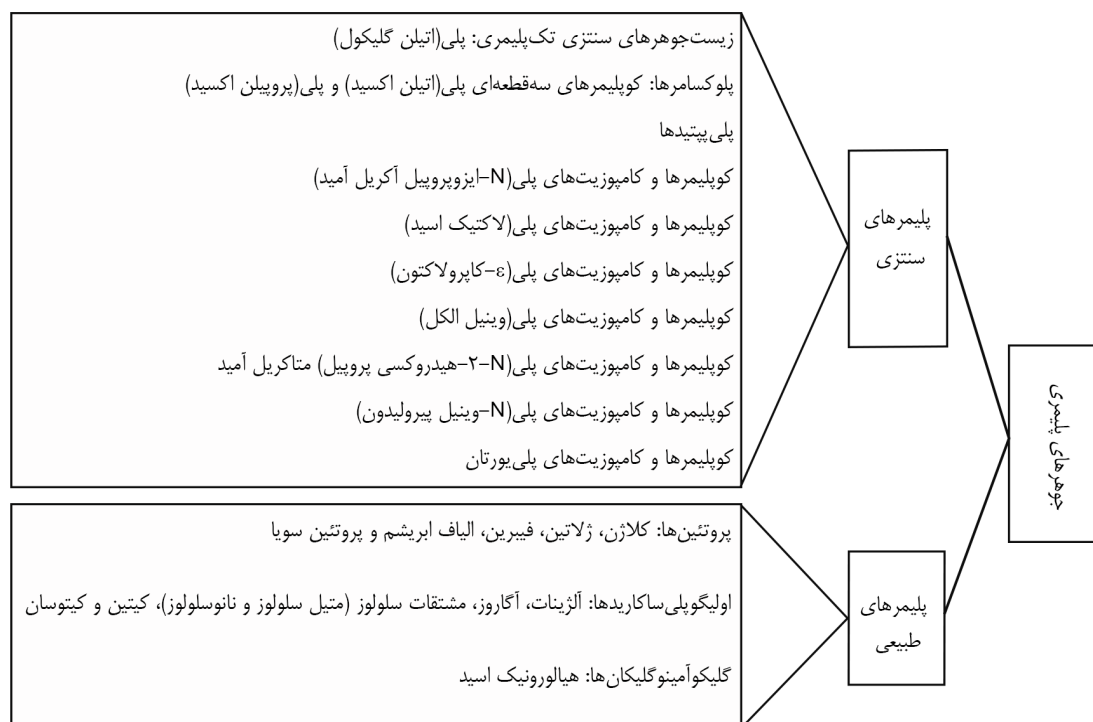
شکل ۳- خلاصه‌ای از مراحل زیست‌چاپ یک اندام (پوست) [۲۰].

تشکیل می‌شوند که حداقل یکی از آن‌ها دارای ماهیت زیستی و سلول است. این ساختارها را می‌توان به سه دسته طبقه‌بندی کرد:

۱- ساختارهای کامپوزیتی متشکل از لایه‌های متناوب زیست‌جوهر و پلاستیک (به‌عنوان مثال مواد پلیمری خشک) که دومی ستون اصلی سفت و سخت است و موجب استحکام داربست می‌شود.



شکل ۴- انواع زیست‌جوهرها [۳، ۲۵].



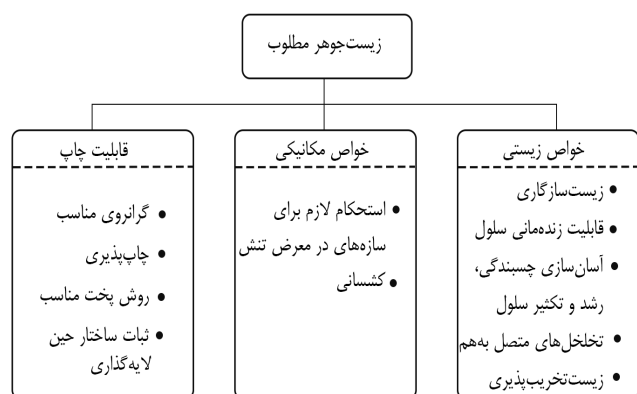
شکل ۵- انواع جوهرها برپایه پلیمرهای آب دوست [۱۴].

فراهم کردن بستری برای کشت سلول هستند [۲۱].

افزایش غلظت فراتر از محدوده غلظت بهینه جوهر، می‌تواند با جلوگیری از مهاجرت و گسترده‌گی سلول، بر زنده‌مانی آن اثر نامطلوب داشته باشد [۲۴].

ویژگی‌های زیست‌جوهر

به‌طور کلی، زیست‌مواد استفاده‌شده در این فرایند باید دارای چاپ‌پذیری، واپایش‌پذیری شکل، پایداری و یک‌پارچگی مکانیکی زیاد، زیست‌سازگاری، حل‌ناپذیری در محیط کشت، غیرسمی بودن و عدم تحریک دستگاه ایمنی، آسان‌سازی ارتقای چسبندگی سلول، سینتیک تخریب مناسب و عاری از محصولات فرعی حاصل از تخریب داربست باشند. برای ایجاد یک زیست‌ماده چاپ‌پذیر مناسب، باید تعادل بین تمام این پارامترها برقرار شود (شکل ۶) [۱۴، ۲۲]. ویژگی‌های مورد نیاز برای یک زیست‌جوهر به نوع چاپ و بافت هدف بستگی دارد. چاپ به روش جوهرافشان برای جلوگیری از گرفتگی افشانک و آسیب گرمایی به ترتیب به گرانبوی و رسانندگی گرمایی کم نیازمند است. همچنین، زیست‌چاپ اکستروودی می‌تواند گرانبوی بسیار بیشتری را تحمل کند، اما سایر ویژگی‌ها مانند رقیق شدن برشی با افزایش پتانسیل آسیب مکانیکی به سلول‌ها، اهمیت بیشتری می‌یابد [۲۳]. غلظت پلیمر در یک زیست‌جوهر، یکی دیگر از موارد مهم است. باید تعادل مناسبی میان گرانبوی و مدول سازه برقرار باشد تا انجام فرایند بدون اثر منفی بر زنده‌مانی و مهاجرت سلول عملی باشد.



شکل ۶- ویژگی‌های اساسی زیست‌جوهر [۱۳].

عملکردی برای تولید سازه‌های بافتی را ندارد. استفاده از جزء دوم مانند پلی‌اتیلن گلیکول، امکان واپایش از طریق تغییر وزن مولکولی و پیوند مستقیم خواص فیزیکی لازم برای سازه را فراهم می‌کند. با این حال، این نوع پلیمرهای سنتزی فاقد ویژگی‌های زیستی برای چسبندگی، تکثیر و گسترش سلول هستند. از سوی دیگر، استفاده از زیست‌مواد طبیعی و سازگار با سلول، مانند ژلاتین و فیبرین، به دلیل خواص مکانیکی ضعیف با محدودیت مواجه است. در نتیجه، ترکیب پلیمرهای سنتزی و طبیعی راهبردی بوده که مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است [۲۷].

جوهر بر پایه پیش‌سازهای هیدروژل

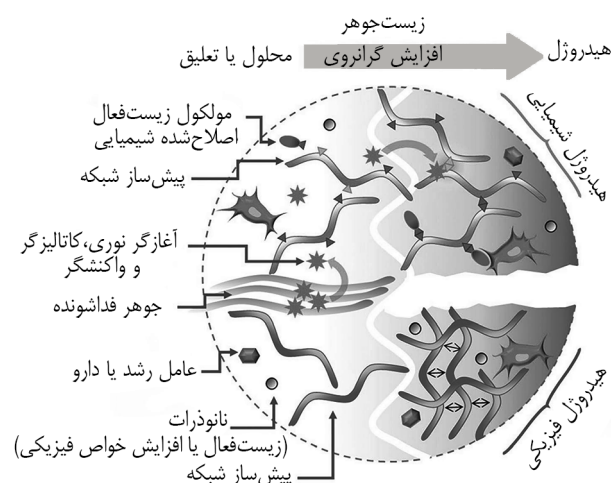
یکی از مهم‌ترین زیست‌مواد هیدروژل‌ها هستند، زیرا حاوی مقادیر زیادی مولکول‌های آب بوده و از ویژگی‌های تورم خوبی برخوردار هستند [۲۸]. هیدروژل‌ها از ویژگی‌های جذاب بی‌شماری برای استفاده به عنوان داربست برخوردار هستند. برخی از این زیست‌مواد در اشکال اصلاح‌شده آن‌ها نورحساس بوده و قابلیت برقراری اتصالات عرضی را دارند. تاکنون مقالات مروری متعددی در زمینه کاربرد هیدروژل‌ها در زیست‌چاپ منتشر شده است [۲۹]. بسته به ماهیت پیش‌سازهای شبکه، زیست‌جوهر می‌تواند به یک هیدروژل فیزیکی یا شیمیایی تبدیل شود (شکل ۷). در یک هیدروژل شیمیایی، ژل شدن با ایجاد پیوندهای کووالانسی بین گروه‌های عاملی موجود در پلیمرها و به کمک عامل شبکه‌ساز انجام می‌گیرد. در حالی که عامل ایجاد اتصال در ژل‌های فیزیکی، برهم‌کنش‌های ثانویه است. در حالت

ایده‌آل، فرایند ژل شدن باید سریع بوده و همچنین برای سلول‌ها غیرسمی باشد. فرایندهای ژل شدن فیزیکی یا شیمیایی می‌توانند برگشت پذیر یا برگشت ناپذیر باشند. در تمام موارد، پارامترهای فیزیکی و شیمیایی مانند دما و غلظت پیش‌سازها عوامل اثرگذاری بر سینتیک ژل، شکل ظاهری و خواص نهایی داربست هستند [۲۴]. هیدروژل‌ها افزون بر کاربرد در جوهر، به عنوان پایه رشته با هدف بهبود چاپ پذیری جوهرهایی با گرانش و سرعت پخت کم مانند کلاژن نوع I نیز استفاده می‌شوند. قابلیت گسست پیوندهای عرضی هیدروژل با اعمال تنش حاصل از تثبیت رشته و همچنین امکان حذف آن بدون تخریب سازه چاپ‌شده، از مهم‌ترین ویژگی‌های هیدروژل پایه است [۳۰].

شبکه‌ای شدن فیزیکی

محرك‌های ژل شدن فیزیکی را می‌توان به برهم‌کنش‌های ضعیف میان مولکولی و درون مولکولی تقسیم کرد. این هیدروژل‌ها برگشت پذیر بوده (با دما، فشار یا سایر محرك‌ها) اما قدرت پیوند آن‌ها برای عدم حل شدن ساختار در یک محیط آبی کافی است. هیدروژل‌های دارای برهم‌کنش‌های فیزیکی، از پلی ساکارید طبیعی، پلی (وینیل الکل)، پلی (اتیلن گلیکول)، پلی (N-ایزوپروپیل آکریل آمید)، پلی (آکرلیک اسید) و پلی (وینیل ایمیدازول) حاصل می‌شوند که با ترکیبات مختلف می‌توان آن‌ها را در فرایند زیست‌چاپ استفاده کرد. در هیدروژل‌های فیزیکی، لزومی به استفاده از واکنشگرهای شیمیایی اضافی (آغازگر نوری و عامل اتصال‌دهنده) به جز یون‌ها در ژل شدن یونی، نیست. ژل شدن، سریع و زیست‌سازگار است که این عوامل موجب تمرکز پژوهش‌ها در زمینه بهره‌گیری از هیدروژل‌های فیزیکی در زیست‌چاپ شده است [۸]. برهم‌کنش‌های ابرمولکولی از کاربردی‌ترین برهم‌کنش‌ها در طراحی ژل‌های فیزیکی است که با توجه به راهبرد و هدف مدنظر از انواع مختلف این برهم‌کنش‌ها می‌توان بهره برد. در این زمینه می‌توان به اصلاح پلیمر کیتوسان با پلی (اتیلن گلیکول) و شبکه‌ای کردن آن با ترکیبات حلقوی اشاره کرد. پلی روتاکسان حاصل، دارای تنش تسلیم تحمل پذیر برای سلول است و برحسب غلظت شبکه ثانویه، محدوده وسیعی از خواص مکانیکی دسترس پذیر می‌شود [۳۱].

نقطه ضعف هیدروژل‌های فیزیکی در مقایسه با هیدروژل‌های شیمیایی، سرعت تخریب بیشتر آن‌هاست. همچنین، خواص مکانیکی ضعیفی دارند. این بدان معنی است که نمی‌توان از آن‌ها برای داربست‌های طولانی مدت استفاده کرد. با این حال،



شکل ۷- تبدیل زیست‌جوهرها با پیوندهای فیزیکی یا شیمیایی به هیدروژل‌ها [۴].

این هیدروژل‌ها پس از چاپ دارای خواصی نوینی از قبیل خواص خودترمیمی، اعمال تنش برشی کم به سلول، سازگاری با فناوری‌های مختلف چاپ سه بعدی (به جز لیتوگرافی سه بعدی که نیازمند ایجاد اتصال عرضی با نور است) هستند [۸]. برقراری پیوند از طریق برهم‌کنش‌های هیدروژنی و اندروالسی، می‌تواند تعلیق را به اندازه کافی گرانبه کند که برای فرایند چاپ مناسب باشد. زمانی که تشخیص یک توالی خاص در پیکره پلیمر میسر باشد، خودآرایی نامیده می‌شود. اما هنگامی که فقط آرایش یافتن با برقراری اتصالات ضعیف و بدون ویژگی باشد، تجمع رخ می‌دهد. از زیست‌جوهرهای فیزیکی متداول می‌توان به کلاژن، هیالورونیک اسید و ژلاتین اشاره کرد [۳۲].

ژل شدن یونی با مخلوط شدن یک کاتیون به وسیله چند بخش آنیونی موجود در دو یا چند زنجیر پلیمر آغاز می‌شود. برای مثال، می‌توان به برقراری اتصال میان کاتیون‌های دوظرفیتی Ca^{2+} با حداقل دو واحد اولیگوساکارید اشاره کرد. در مرحله اول، کاتیون‌ها را می‌توان پیش از چاپ در زیست‌جوهر حل کرد، در نتیجه گرانبه‌ی پیش‌ماده را افزایش داد. لازم به ذکر است، به منظور افزایش گرانبه‌ی، می‌توان آن‌ها را با یک جوهر فداشونده مخلوط کرد. با تماس بین دو لایه جوهر، کاتیون‌ها به زیست‌جوهر حاوی پیش‌سازهای شبکه نفوذ می‌کنند و پیوند تشکیل می‌شود. همچنین، زیست‌جوهر پیش‌ساز شبکه می‌تواند به طور مستقیم در یک مخزن چاپ شده یا روی کاغذ زیستی حاوی کاتیون‌ها رسوب کند که پس از تماس، زیست‌جوهر ژل می‌شود. شایان ذکر است، مخازن بیشتر برای چاپ اکسترودی یا جوهرافشان و کاغذ زیستی برای چاپ لیزری مناسب هستند. سرانجام، وقتی داربست چاپ شده بتواند یک پارچگی را به اندازه کافی و طولانی حفظ کند، می‌تواند برای چند دقیقه در کاتیون‌ها غوطه‌ور شود تا پیوندهای بیشتری برقرار شوند.

ژل شدن شیمیایی

اتصال کووالانسی پیش‌سازهای شبکه، فرایند برگشت‌ناپذیری است. در نتیجه، سازه حاصل قابلیت بازگشت به حالت محلول را نخواهد داشت. با این حال، امکان تنظیم سرعت تخریب آن با عوامل خارجی از قبیل pH، آنزیم‌ها، UV و سایر موارد میسر است. غلظت آستانه پیش‌ماده برای برقراری اتصالات عرضی شیمیایی نیاز است. یادآور می‌شود، با افزایش غلظت، اجزای ساختاری و بهینه‌سازی نرخ سلول-پلیمر، افزون بر خواص مکانیکی، از آنجا که سلول‌ها منبع پروتئازهای بازسازی ماتریس هستند، سرعت تخریب

هیدروژل نیز واپایش پذیر است. ساختار اغلب پلیمرها به گونه‌ای است که باید پیش از تهیه زیست‌جوهر از نظر شیمیایی اصلاح شوند تا گروه‌های واکنش‌دهنده مناسب را برای تشکیل ژل دائمی دارا باشند.

از سوی دیگر، باید توجه ویژه‌ای نیز به زیست‌سازگاری واکنش تشکیل شبکه داشت. به عبارتی، افزون بر اینکه تمام واکنش‌دهنده‌ها، کاتالیزورها، حلال‌ها و محصولات باید غیرسمی باشند، شرایط واکنش مانند دما و pH نیز ممکن است به چاپگرهای ویژه، برای مثال یک سامانه گرمایشی و یک لامپ UV برای پخت نیاز داشته باشند. در این صورت، به زیست‌سازگاری آن‌ها نیز باید توجه شود [۸]. ترکیبی از ژل شدن فیزیکی و شیمیایی، راهکار مهمی برای واپایش چاپ پذیری و خواص مکانیکی قطعه است. برای مثال، در جوهر متشکل از ژلاتین متاکریلات-آلژینات، ترکیبی از شبکه‌های کووالانسی و یونی به عنوان راهبردی برای تعدیل خواص جوهر و القای خواص مکانیکی ناهمسان‌گرد در قطعه استفاده شده است. غلظت پلیمر و نسبت اجزاء، تعیین‌کننده خواص رئولوژیکی، مدول نمونه، مقدار تورم و سیستیک تخریب آن است [۳۳]. متیل سلولوز نیز مثال دیگری است که در کاربردهای زیستی بسیار مورد توجه بوده و برای ایجاد خواص مکانیکی لازم، نیازمند تلفیقی از اتصالات برگشت‌پذیر و برگشت‌ناپذیر است. اصلاح مولکول‌های متیل سلولوز با گروه‌های حساس به تیرامین و همچنین ایجاد گروه‌های آب‌گریز حساس به دما روی پیکره پلیمر، جوهری را حاصل می‌کند که افزون بر بهبود خواص مکانیکی، به دلیل شبکه‌ای شدن جزئی پیش از فرایند تزریق، قدرت تفکیک مطلوبی را نشان می‌دهد [۳۴].

اصلاح شیمیایی پیش‌سازها

به طور معمول، اتصال عرضی شیمیایی نیاز به اصلاح اولیه پیش‌سازهای شبکه دارد، خواه مولکول‌های زیستی یا پلیمرهای سنتزی باشند. متداول‌ترین اصلاح شیمیایی پیش‌سازهای شبکه، ایجاد گروه‌های وینیلی است. مونومرهای برپایه آکریلات و متاکریلات، مهم‌ترین گروه حامل عامل وینیلی هستند. دومین روش برای عامل‌دارکردن پلیمرها، وارد کردن گروه‌های تیول در ساختار است که می‌تواند در افزایش کلیک یا در تشکیل پل‌های دی‌سولفید ایفای نقش کند.

اتصال عرضی با نور

اتصال عرضی را می‌توان با تابش پرتو فرابنفش یا نور مرئی

عملکرد سلول را حفظ می‌کند [۲۸]. به طور معمول در این ساختارها، پلیمر سنتزی دارای ماهیت سخت است و اتصالات عرضی آن از طریق برقراری پیوندهای کووالانسی انجام می‌گیرد. شبکه دوم دارای مدول کم بوده و از طریق برهم‌کنش‌های ثانویه، مانند پیوندهای هیدروژنی، برهم‌کنش‌های یونی و کوئوردینانسی تشکیل می‌شود. ساختار نهایی و ویژگی‌های این نوع از ساختارها را می‌توان با تغییر شبکه اول به همراه شبکه دوم تنظیم کرد [۱۹].

معایب و مزایای چاپ سه‌بعدی

ظهور فناوری چاپ سه‌بعدی ضمن کاهش هزینه‌ها، سرعت تولید را افزایش داده و مصرف‌کنندگان، گستره انتخاب وسیع‌تری در محصول نهایی دارند. این موضوع، موجب انعطاف‌پذیری روند تولید و واپایش بیشتر کیفیت محصول می‌شود. با این حال، اگرچه روش‌های مختلف چاپ سه‌بعدی پیشرفت چشمگیری در مهندسی بافت و پزشکی بازساختی ایجاد کرده‌اند، اما دارای نقاط ضعف زیادی نیز هستند. یکی از بزرگ‌ترین چالش‌های روش‌های تولید مواد افزودنی، سرعت چاپ است. محدودیت درخور توجه دیگر، نیاز به تشکیل شبکه عروقی قابل قبول و بسیار کارا در نمونه زیستی بوده که لازمه بقا و موفقیت‌آمیز بودن تشکیل بافت است. تخلخل و امکان تبادل مواد غذایی و ضایعات سلول‌ها نیز می‌توانند محدودیت بسیار مؤثری را در نمونه سبب شوند. به طور خلاصه، در تمام فناوری‌های یادشده، قدرت تفکیک، عروق، خونریاری (perfusion)، هزینه و دقت در انتخاب زیست‌جوهرهای ایده‌آل پیش از اینکه بتوانند به طور درخور توجهی در مهندسی زیستی کمک کنند، نیاز به تغییرات اساسی دارند [۸].

نتیجه‌گیری و چشم‌انداز

پس از موفقیت‌آمیز بودن زیست‌چاپ سلولی در سال ۲۰۰۳، تاکنون ۲۶ موفقیت بزرگ در این زمینه حاصل شده است. امروزه در حالی که ساخت بسیاری از اندام‌ها به وسیله زیست‌چاپ، مطالعات میدانی را سپری می‌کند، اما سطح پیچیدگی‌های موجود برای رسیدن به سمت جایگزینی اعضا، قابل درک نیست که دلیل آن عدم وجود دانش بنیادی کافی از رفتارها و پیچیدگی‌های زیست‌شیمیایی در یک محیط زیستی طبیعی است. با این حال، زیست‌چاپ می‌تواند بستری فناورانه برای ترکیب شبکه‌های لنفاوی، عروقی و عصبی را در یک سامانه واحد در اختیار قرار دهد. در این میان، زیست‌مواد و

در مجاورت آغازگر نوری آغاز کرد. البته تابش پرتو فرابنفش، اصلی اساسی در چاپگرهای لیتوگرافی سه‌بعدی است، اما اغلب زیست‌چاپگرهای اکسترودی و جوهرافشان نیز مجهز به تابش دهی UV هستند. ژل شدن کاتالیزشده با نور بسیار سریع بوده (چند ثانیه) و جوهر حاوی سلول‌ها را می‌توان درست پس از خروج از سری چاپ، ژل کرد. ایجاد سازه با دقت ابعادی مطلوب به دو عامل سرعت ژل شدن و گرانیوی جوهر بستگی دارد. اشکال اصلی در این روش، وجود آغازگرهای نوری و امکان سمیت آن‌هاست و تنها تعداد کمی از آن‌ها را می‌توان در غلظت کم و واپایش شده در محیط آبی استفاده کرد. برحسب توان تابش و مدت زمان آن، مرگ سلولی و تغییر ماهیت سلول نیز امری اجتناب‌ناپذیر است. برای انجام واکنش پلیمرشدن، راه‌کارهای مختلفی پیشنهاد شده است. در حالت کلی، آغازگر نوری در زیست‌جوهر یا جوهر فداشونده حل شده و پخت UV در حین چاپ یا پس از آن انجام می‌شود. دو سازوکار اصلی، اتصال عرضی نوری، پلیمرشدن نوری با رشد زنجیر و پلیمرشدن رشد مرحله‌ای با استفاده از دو واکنش‌دهنده، یک آلکن و یک تیول است [۸].

استفاده از اتصال‌دهنده عرضی

برخی از هیدروژل‌ها با استفاده از یک اتصال‌دهنده از طریق برقراری برهم‌کنش‌های کووالانسی بین دو زنجیر پلیمر قابل سنتز هستند. اتصال‌دهنده‌های متعددی، مانند اپی‌کلریدرین، گلو تارآلدئید و پلی‌آلدئیدها برای تهیه پلیمرهای مختلف طبیعی و سنتزی شبکه‌ای استفاده شده است. در مقایسه با پیوندهای پویا که به طور گسترده استفاده می‌شوند، این پیوندهای کووالانسی به دلیل ماهیت مستحکم و برگشت‌ناپذیر آن‌ها در شرایط محیطی و وجود ترشحات سلولی پایدارند. در نتیجه، هیدروژل‌ها دارای خواص مکانیکی مطلوب‌تر و مقاومت بیشتری خواهند بود. عیب اصلی این نوع پیوندها، امکان ژل شدن ناخواسته در مخزن و گرفتگی افشانک است [۱۹].

هیدروژل‌های مبتنی بر شبکه‌های درهم‌تنیده

در حالی که هیدروژل‌های طبیعی سازگاری بهتری با سلول دارند، هیدروژل‌های سنتزی قابلیت پردازش بهتری را مانند چاپ‌پذیری و حفظ شکل نشان می‌دهند. به منظور تلفیق این دو مزیت، هیبریدهای هیدروژل طبیعی و سنتزی توسعه یافته‌اند. در این ساختارها، جزء سنتزی خواص مکانیکی نمونه را افزایش می‌دهد و بخش طبیعی با ارائه محیطی مشابه ماتریس برون‌سلولی، زنده‌مانی، چسبندگی و

یادشده، نیاز به بسترهایی با ویژگی‌های هوشمند خواهد بود که علم پلیمر نقش تعیین‌کننده‌ای در این مسیر، به‌ویژه در بحث زیست‌کاوی مکانیکی بسترهای چاپ‌شده ایفا می‌کند.

به‌ویژه هیدروژل‌های طبیعی، قابلیت تعدیل پاسخ ایمنی ذاتی را دارند و بی‌شک مناسب‌ترین گزینه برای زیست‌چاپ به‌شمار می‌روند. بدیهی است، با افزایش دانش درباره پیچیدگی‌های

مراجع

- Lee J.Y., An J., and Chua C.K., Fundamentals and Applications of 3D Printing for Novel Materials, *Appl. Mater. Today*, **7**, 120-133, 2017.
- Valot L., Martinez J., Mehdi A., and Subra G., Chemical Insights into Bioinks for 3D Printing, *Chem. Soc. Rev.*, **48**, 4049-4086, 2019.
- Hospodiuk M., Dey M., Sosnoski D., and Ozbolat I.T., The Bioink: A Comprehensive Review on Bioprintable Materials, *Biotechnol. Adv.*, **35**, 217-239, 2017.
- Tetsuka H. and Shin S.R., Materials and Technical Innovations in 3D Printing in Biomedical Applications, *J. Mater. Chem. B*, **8**, 2930-2950, 2020.
- Ozbolat I.T., Moncal K.K., and Gudapati H., Evaluation of Bioprinter Technologies, *Addit. Manuf.*, **13**, 179-200, 2017.
- Xu J., Zheng S., Hu X., Li L., Li W., Parungao R., and Song K., Advances in the Research of Bioinks Based on Natural Collagen, Polysaccharide and Their Derivatives for Skin 3D Bioprinting, *Polymers*, **12**, 1237, 2020.
- Parak A., Pradeep P., du Toit L.C., Kumar P., Choonara Y.E., and Pillay V., Functionalizing Bioinks for 3D Bioprinting Applications, *Drug Discov. Today*, **24**, 198-205, 2019.
- Akkineni A.R., Ahlfeld T., Lode A., and Gelinsky M., A Versatile Method for Combining Different Biopolymers in a Core/Shell Fashion by 3D Plotting to Achieve Mechanically Robust Constructs, *Biofabrication*, **8**, 045001, 2016.
- Buwald S.J., Boere M., Dijkstra P.J., Feijen J., Vermonden T., and Hennink W.E., Hydrogels in a Historical Perspective: From Simple Networks to Smart Materials, *J. Control. Release*, **190**, 254-273, 2014.
- Koch L., Gruene M., Unger C., and Chichkov B., Laser Assisted Cell Printing, *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **14**, 91-97, 2013.
- Jian H., Wang M., Wang S., Wang A., and Bai S., 3D Bioprinting for Cell Culture and Tissue Fabrication, *Bio-Des. Manufact.*, **1**, 45-61, 2018.
- Chimene D., Lennox K.K., Kaunas R.R., and Gaharwar A.K., Advanced Bioinks for 3D Printing: A Materials Science Perspective, *Ann. Biomed. Eng.*, **44**, 2090-2102, 2016.
- Bedell M.L., Navara A.M., Du Y., Zhang S., and Mikos A.G., Polymeric Systems for Bioprinting, *Chem. Rev.*, **120**, 10744-10792, 2020.
- Guvendiren M., Molde J., Soares R.M.D., and Kohn J., Designing Biomaterials for 3D Printing, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, **2**, 1679-1693, 2016.
- Zhang A.P., Qu X., Soman P., Hribar K.C., Lee J.W., and Chen S.H., Rapid Fabrication of Complex 3D Extracellular Microenvironments by Dynamic Optical Projection Stereolithography, *Adv. Mater.*, **24**, 4266-4270, 2012.
- Zhang Z., Jin Y., Yin J., Xu C., Xiong R., Christensen K., and Huang Y., Evaluation of Bioink Printability for Bioprinting Applications, *Appl. Phys. Rev.*, **5**, 041304, 2018.
- Gu Z., Fu J., Lin H., and He Y., Development of 3D Bioprinting: From Printing Methods to Biomedical Applications, *Asian J. Pharm. Sci.*, **15**, 529-557, 2019.
- Rupp H. and Binder W.H., 3D Printing of Core-Shell Capsule Composites for Post-Reactive and Damage Sensing Applications, *Adv. Mater. Technol.*, **5**, 2000509, 2020.
- Whitford W.G. and Hoying J.B., A Bioink by any Other Name: Terms, Concepts and Constructions Related to 3D Bioprinting, *Future Sci.*, **2**, 2016.
- Augustine R., Skin Bioprinting: A Novel Approach for Creating Artificial Skin from Synthetic and Natural Building Blocks, *Prog. Biomater.*, **7**, 77-92, 2018.
- Shahrubudin N., Lee T.C., and Ramlan R., An Overview on 3D Printing Technology: Technological, Materials, and Applications, *Procedia Manuf.*, **35**, 1286-1296, 2019.
- Carrow J.K., Kerativitayanan P., Jaiswal M.K., Lokhande G., and Gaharwar A.K., Polymers for Bioprinting, In *Essentials of 3D Biofabrication and Translation*, Academic, Chap. 13, 229-248, 2015.
- Akhtar M.F., Hanif M., and Ranjha N.M., Methods of Synthesis of Hydrogels: A Review, *Saudi Pharm. J.*, **24**, 554-559, 2016.
- Gungor-Ozkerim P.S., Inci I., Zhang Y.S., Khademhosseini A., and Dokmeci M.R., Bioinks for 3D Bioprinting: An Overview, *Biomater. Sci.*, **6**, 915-946, 2018.
- Gurkan U.A., Assal R.E., Yildiz R., and Sung Y., Engineering Anisotropic Biomimetic Fibrocartilage Microenvironment by Bioprinting Mesenchymal Stem Cells in Nanoliter Gel Droplets, *Mol. Pharm.*, **11**, 2151-2159, 2014.

26. Donderwinkel I., Van Heest J.C., and Cameron N.R., Bio-Inks for 3D Bioprinting: Recent Advances and Future Prospects, *Polym. Chem.*, **8**, 4451-4471, 2017.
27. Fedorovich N.E., DeWijn J.R., Verbout A.J., Alblas J., and Dhert W.J., Three-Dimensional Fiber Deposition of Cell-Laden, Viable, Patterned Constructs for Bone Tissue Printing, *Tissue Eng.*, **14**, 127-133, 2008.
28. Ngo T.D., Kashani A., Imbalzano G., Nguyen K.T.Q., and Hui D., Additive Manufacturing (3D Printing): A Review of Materials, Methods, Applications and Challenges, *Compos. B: Eng.*, **143**, 172-196, 2018.
29. Mota C., Camarero-Espinosa S., Baker M.B., Wieringa P., and Moroni L., Bioprinting: From Tissue and Organ Development to In Vitro Models, *Chem. Rev.*, **120**, 10547-10607, 2020.
30. Tan E.Y., Suntornnond R., and Yeong W.Y., High-Resolution Novel Indirect Bioprinting of Low-Viscosity Cell-Laden Hydrogels via Model-Support Bioink Interaction, *3D Print Addit. Manuf.*, **8**, 69-78, 2021.
31. Hu T., Cui X., Zhu M., Wu M., Tian Y., Yao B., and Fu X., 3D-Printable Supramolecular Hydrogels with Shear-Thinning Property: Fabricating Strength Tunable Bioink via Dual Crosslinking, *Bioact. Mater.*, **5**, 808-818, 2020.
32. Hoch E., Hirth T., Tovar G.E., 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.
33. Aldana A.A., Valente F., Dilley R., and Doyle B., Development of 3D Bioprinted Gelma-Alginate Hydrogels with Tunable Mechanical Properties, *Bioprinting*, **21**, e00105, 2021.
34. Shin J.Y., Yeo Y.H., Jeong J.E., Park S.A., and Park W.H., Dual-Crosslinked Methylcellulose Hydrogels for 3D Bioprinting Applications, *Carbohydr. Polym.*, **238**, 116192, 2020.