



DOI: 10.22034/ijche.2021.289803.1120



DOR: 20.1001.1.17355400.1401.21.121.4.6

This journal is an open access journal licensed under an Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International license (CC BY-NC-ND 4.0).

Review of Using Microfluidics Technology for Fabrication of Cardiovascular Engineered Bioscaffolds

S. Khalighi¹, M. Saadatmand^{2*}

1- M. Sc. Student of Chemical Engineering, Sharif University of Technology

2- Assistant Professor of Chemical Engineering, Sharif University of Technology

Email: m.saadatmand@sharif.edu

Abstract

In the recent years, bioengineered cardiac tissues are of particular significance because of the extremely limited ability of the myocardium to self-regenerate. In this article, the recent advancements in the development of experimental in vitro platforms for next generation of the diagnostics and therapy validation are reviewed. Specially, here the present progress of the microfluidics technology application such as micro/nano fibers, micropatterning, and 3D bioprinting with sacrificial material or with microfluidic channels for the development of cardiovascular systems' biofabrication at the tissue- and organ levels is described. With all the improvements in this field, there are still difficulties in prolonged cells viability, thick tissue fabrication for higher mimicry levels, and scaffolds mechanical stability in vivo. Until now, microfluidic methods pave the way for in vitro recapitulating of cardiovascular tissue for drug testing and providing basic knowledge of organ's functions. In the future, with novel microphysiological systems, the transition from bench to bedside will be accelerated.

Received: 9 June 2021

Accepted: 31 August 2021

Page Number: 66-84

Keywords:

Microfluidics,
Cardiovascular Tissue,
Bio-Printing,
Vascular Network,
Tissue Engineering

Please Cite this Article Using:

Khalighi, S., Saadatmand, M., "Review of Using Microfluidics Technology for Fabrication of Cardiovascular Engineered Bioscaffolds", Iranian Chemical Engineering Journal, Vol. 21, No. 121, pp. 66-84, In Persian, (2022).



مروری بر استفاده از فناوری ریزسیالات در ساخت زیست‌سازه‌های مهندسی شده قلبی عروقی

صدف خلیقی^۱، مریم سعادت‌مند^{۲*}

۱- دانشجوی کارشناس ارشد مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی شریف

۲- استادیار مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی شریف

پیام نگار: m.saadatmand@sharif.edu

چکیده

در سال‌های اخیر مهندسی بافت قلب اهمیت ویژه‌ای یافته است؛ زیرا این بافت توانایی بسیار اندکی در بازسازی خود دارد. از همین رو این مقاله به مرور مطالعات اخیر در سامانه‌های آزمایشگاهی توسعه یافته برای بهبود روش‌های تشخیص و درمان بیماری‌های قلب و عروق پرداخته است. در این زمینه روش‌های ریزسیالاتی برای ساخت زیستی سامانه‌های دارای عمل‌کرد مشابه با بافت قلب و عروق مانند استفاده از رشته‌های میکرونی یا نانویی، الگوسازی در ابعاد میکرونی و پرینت زیستی سه‌بعدی با ماده فداشونده و یا همراه با کانال‌های ریزسیالاتی، نتیجه مطلوبی داشته‌اند. با وجود پیشرفت‌ها اما هم‌چنان در این زمینه چالش‌هایی وجود دارد که این پژوهش بدان‌ها پرداخته است. به‌طور کلی می‌توان گفت که تا به امروز روش‌های ریزسیالاتی راه را برای همانندسازی بافت‌های قلبی و عروقی رشد یافته در آزمایشگاه که کاربردهایی مانند سنجیدن اثر داروها و افزایش دانش نسبت به عمل‌کرد ارگان‌ها دارند، هموار کرده است. در آینده این سامانه‌های نوین میکروفیزیولوژیکی برای این بافت می‌تواند امکان‌گذار از تحقیقات آزمایشگاه به درمان‌های بیمارستانی را نیز فراهم آورد.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۱۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۰۹

شماره صفحات: ۶۶ تا ۸۴

کلیدواژه‌ها:

ریزسیالات،

بافت قلب و عروق،

پرینت زیستی،

شبکه عروقی،

مهندسی بافت

* تهران، دانشگاه صنعتی شریف، دانشکده مهندسی شیمی و نفت

استناد به مقاله:

خلیقی، ص.، سعادت‌مند، م.، "مروری بر استفاده از فناوری ریزسیالات در ساخت زیست‌سازه‌های مهندسی شده قلبی عروقی"، نشریه مهندسی شیمی ایران، سال بیست‌ویکم، شماره ۱۲۱، صص. ۸۴-۶۶، (۱۴۰۱).

۱. مقدمه

بیماری‌های قلبی و عروقی نخستین عامل مرگ و میر در دنیا هستند که در سال ۲۰۱۵ حدود ۳۱ درصد از آمار کلی مرگ در دنیا را به خود اختصاص داده‌اند [۱]. با وجود پیشرفت‌های بسیار در زمینه مهندسی تجهیزات زیست‌پزشکی و روش‌های جراحی برای درمان بیماری‌های قلبی و عروقی اما کمبود مدل آزمایشگاهی مناسب برای امتحان دارو ها و اعتباربخشی به روش‌های درمانی، توسعه روش‌های درمانی جدید با موانعی روبه‌رو شده است. هرچند آزمون‌های دارویی به‌طور جهانی در بدن موجود زنده و بیشتر در مدل‌های موشی امتحان می‌شود؛ اما فیزیولوژی قلب و عروق و جواب‌های احتمالی به دارو ها در بدن انسان می‌تواند کاملاً متفاوت باشد [۲]. این امر باعث بروز شکست‌ها در مرحله آزمون‌های بیمارستانی، افزایش هزینه برای توسعه دارو ها و افزایش خطر عوارض جانبی پیش‌بینی نشده می‌شود. برای مثال نمونه‌هایی از دارو هایی که برای درمان بیماری‌های قلبی یا حتی دیابت و یا سرطان از سازمان غذا و دارو مجوز داشتند، مشخص شد که برای قلب سمی هستند و به همین دلیل از بازار دارو جمع‌آوری شدند [۳ و ۴]. هزینه بسیار بالا و نگرانی‌های اخلاقی استفاده از حیوانات باعث شده تا احساس نیاز به مدل‌های آزمایشگاهی دقیق‌تر که بتواند فیزیولوژی طبیعی قلب و پاسخ بافت طبیعی به دارو ها را بهتر ایجاد کند، بیشتر شود [۵].

به‌طور کلی بافت‌های ایجاد شده در مهندسی بافت با هدف جایگزینی بافت‌های آسیب‌دیده و ایجاد نمونه‌های آزمایشگاهی برای آزمون زیست‌سازگاری دارو ها در سامانه‌هایی با ابعادی بزرگ‌تر از محدوده نفوذ مواد غذایی و اکسیژن در مواد (۲۰۰ میکرومتر) هستند. بنابراین نیاز به یک سامانه توزیع مواد و اکسیژن در بافت کاملاً واضح است. در طول زمان کشت بافت در آزمایشگاه، نفوذ می‌تواند از راه استفاده از راکتورهای زیستی پرفیوژن تسهیل شود؛ اما بعد از کاشتن داربست در بدن، رسیدن مواد غذایی و اکسیژن از راه شبکه عروقی امکان می‌پذیرد. به‌طور معمول شبکه عروقی موجود در بدن فرد در داربست کاشته شده نفوذ می‌کند. این فرایند روزها و هفته‌ها زمان لازم دارد و این امر به این معناست که سلول‌های میانی در داربست برای بازه زمانی چشمگیری بدون مواد غذایی مانده‌اند و با مرگ این سلول‌ها کارایی داربست از بین می‌رود [۶].

برای کاهش زمان مورد نیاز برای رگ‌زایی در بافت، محققان روش‌های اضافه‌کردن شبکه شبه‌عروقی را به داربست، پیش از کاشتن بررسی کرده‌اند. این شبکه عروقی می‌تواند به عروق اصلی بیمار متصل شود و سرعت نفوذ مواد غذایی را چندین برابر کند. به‌صورت تئوری، اگر شبکه ساخته شده در داربست پیش از کاشت به‌قدر کافی نظم یافته باشد و امکان متصل کردن این شبکه به عروق طبیعی بدن در حین جراحی در ابعاد میکرو وجود داشته باشد، نفوذ بلافاصله در داربست ممکن می‌شود [۶].

۲. ساخت زیستی سازه‌های قلبی و عروقی با تناسب فیزیولوژیکی

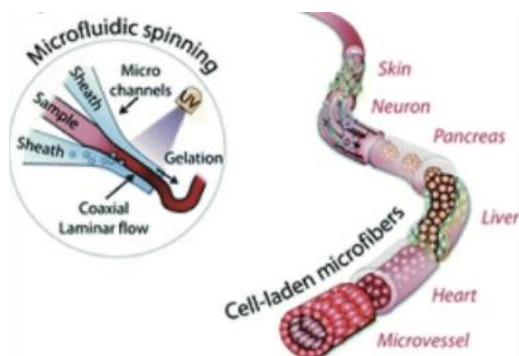
ساخت زیستی^۱ فرایندی است که به ترکیب سلول‌ها، زیست‌مواد و فاکتورهای زیست‌فعال در روش‌های ساخت پیشرفته برای ایجاد ساختارهای بافت با عمل‌کرد بهتر و پیچیدگی بیشتر از محیط‌های کشت دو و سه‌بعدی می‌پردازد. روش‌های اخیر ساخت، امکان کنترل دقیق چیدمان فضایی سلول‌ها و زیست‌مواد را فراهم می‌کنند تا داربست مورد نظر هرچه بیشتر به ساختار میکروبی طبیعی نزدیک شود. در حیطه مهندسی بافت قلب، برای کنترل هم‌راستا بودن سلول‌های قلبی در ایجاد همسان‌گردی و ایجاد شبکه عروقی که برای زنده‌مانی سلول‌ها در داربست‌های بزرگ ضروری است، از ساخت زیستی استفاده می‌شود. در ادامه به روش‌های پیشرفته برای ساخت سازه‌های پیچیده با تمرکز بر بافت قلب و عروق پرداخته می‌شود [۱].

۲-۱ روش مبتنی بر رشته‌ها

روش‌های ایجاد رشته‌ها مانند تراشه‌های ریزسیالات و برقریسی^۲، توانایی ایجاد ساختار رشته‌ای را با خواص قابل تنظیم مانند اندازه رشته، استحکام مکانیکی و کش‌سانی، شکل سطح، تخلخل و استفاده از ترکیب مواد مختلف دارند [۷-۱۲]. در مقاله مروری محمدی‌وش مطالعه کاملی از مواد و روش‌های ساخت نانوالیاف انجام شده است [۱۳]. رسیدن ریزسیالاتی^۳ فرایندی است که در آن جریان مایع از محلول پیش‌پلیمر^۴ در میکروکانال‌ها قرار می‌گیرد و

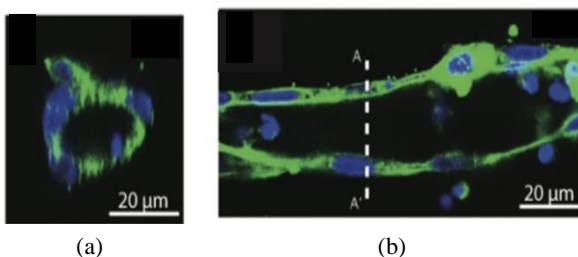
1. Biofabrication
2. Electrospinning
3. Microfluidic Spinning
4. PrePolymer Solution

فیبرین پوشینه‌دار شده است. بعد از گذشت سه روز از کشت، انقباض ناگهانی همه رشته‌ها در فرکانس ۱-۰/۵ هرتز دیده شد [۱۲]. با وجود تنوع مواد و سلول‌ها که در رسیدن ریزسیالاتی استفاده شده است، رشته‌های اکستروژده گسسته‌اند و ساختار دوبعدی و سه‌بعدی را ندارند. بنابراین در بسیاری از موارد بعد از ایجاد رشته‌ها نیاز به بافتن آن‌ها وجود دارد تا این‌که بتوانند ساختاری را مشابه ساختار طبیعی به وجود آورند [۲۱-۱۹]. به‌علاوه عمل کرد و فعالیت سلولی مثل انقباض کاردیومیوسیت‌ها به‌شدت به استحکام ماتریس وابسته است [۲۲]. بنابراین پرداختن به مواد نرم که استحکام ساختاری ندارند، کاربرد عملی چندانی برای شبیه‌سازی هرچه دقیق‌تر بافت قلب ندارند.



شکل ۱. رسیدن ریزسیالاتی برای پوشینه‌دار کردن سلول‌ها در رشته‌های هیدروژل [۱۸].

Figure 1. Microfluidic-spinning for cell encapsulation in hydrogel fibers [18].



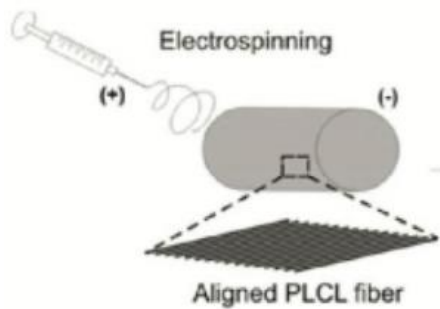
شکل ۲. ایجاد عروق خونی لوله‌ای شکل با کشت دادن سلول‌های اندوتلیال در هیدروژل کلژن نوع یک [۱۲]. (a) نمایش مقطع عرضی نشان‌دهنده با خط چین در شکل B، (b) نمایش طولی رگ ایجادشده.

Figure 2. (a) Mature blood vessel lumens can be generated by encapsulation of HUVECs in a type-I collagen fiber, (b) longitudinal view of the vessel [12].

در ادامه، پلیمری شدن یا اتصال عرضی اتفاق می‌افتد تا این‌که یک رشته جامد پیوسته حاصل شود. فرایند ایجاد پلیمر می‌تواند با استفاده از جریان‌های هم‌محور درون کانال اتفاق بیفتد یا در بیرون کانال مانند فرایندی که در ترریسی انجام می‌شود، جریان مایع خروجی وارد حمام ایجادکننده اتصال عرضی شود. نمونه‌هایی از موادی که در این روش به کار رفته‌اند شامل پلی‌لاکتیک‌کوگلیکولیک‌اسید^۱ [۱۴]، آلژینات [۱۵ و ۱۱]، ژلاتین متاکریلات^۲ [۱۶ و ۱۱]، پلی‌اتیلن‌گلیکول‌دی‌اکریلات^۳ [۱۷]، کلاژن [۱۵ و ۱۲] و فیبرین [۱۲] است. بزرگ‌ترین برتری رسیدن ریزسیالاتی رشته‌ها این است که امکان پوشینه‌دار کردن^۴ مستقیم سلول‌ها در ساختار رشته‌ها وجود دارد (شکل (۱)) [۱۸]. به‌علاوه استفاده از انواع مختلف سلول و مواد را در یک رشته یا در رشته‌های مختلف در همسایگی هم فراهم می‌آورد که این امر ایجاد ساختار مشابه بافت طبیعی با سلول‌ها و ترکیب‌های شیمیایی و مکانیکی متنوع را ممکن می‌سازد [۱۱]. در حیطه مهندسی بافت قلب، از ساختار رشته‌ای بیشتر برای شبیه‌سازی ساختار مشابه ماهیچه قلب یا ساختار عروقی قلب استفاده می‌شود. برای مثال رشته‌های پوسته - هسته^۵ حاوی سلول‌های اندوتلیال با استفاده از یک تراشه هم‌محور دوگانه ریزسیالاتی به وجود آمده‌اند [۱۲]. این تراشه با وارد کردن لوله موئین‌های شیشه‌ای با سطح مقطع دایره‌ای در یک لوله شیشه‌ای با مقطع مستطیلی در یک محفظه پلاستیکی که متصل به ورودی جریان پوششی است، ساخته شده است. مخلوطی از سلول‌ها و پروتئین‌های ماتریس خارج‌سلولی در لوله موئین‌های هسته جریان می‌یابد و در پوسته آن سدیم آلژینات جریان دارد که زنجیره‌های پلیمری آن با جریان کلسیم کلراید به‌صورت عرضی متصل می‌شوند [۱۲]. با استفاده از این روش، پوشینه‌دار کردن سلول‌های اندوتلیال بندناف انسان در رشته‌های کلاژن نوع یک، شرایط ایجاد تک‌لایه‌های سلولی در قطر داخلی رشته‌ها را فراهم می‌کند (شکل (۲)). بعد از بالغ شدن سلول‌ها، کلسیم آلژینات پوسته را می‌توان خارج کرد. این نوع از ساختار در آخر باعث شکل‌گیری یک ساختار لوله‌ای بالغ می‌شود. در همین مطالعه، سلول‌های اولیه کاردیومیوسیت موش در هیدروژل هیبریدی کلاژن نوع یک و

1. Poly(Lactic-Co-Glycolic) Acid (PLGA)
2. Gelatin Metacrylate (GelMA)
3. Poly Ethylen Glycol Diacrylate (PEGDA)
4. Encapsulation
5. Core-Shell

غیر هم‌جهت پرداختند و در نهایت با آزمایش غلظت‌های متفاوت این مواد با آزمودن زنده‌مانی سلول‌های رده *H9C2* چنین نتیجه گرفتند که داربست برق‌ریسی شده و هادی برای کاربردهای آینده مهندسی بافت قلب در آزمایشگاه می‌تواند استفاده شود [۲۷]. در مطالعه دیگری که فلائج^۷ و همکارانش با اضافه کردن پلی‌گلیسرول سبکتات به پلی‌لاکتیک‌اسید برای افزایش زیست‌سازگاری داربست انجام دادند، اندازه‌های کوچک‌تر رشته‌های برق‌ریسی شده به‌همراه اتصالات عرضی بیشتر نتایج بهتری را برای ریخت‌شناسی سلول‌های قلبی کشت‌شده روی این داربست‌ها و پاسخ‌های التهابی داربست کاشته‌شده در قلب موش به دست داد [۲۸]. به‌طور کلی با وجود تنوع مواد قابل استفاده در این روش، شرایط سخت عملیاتی و ابعاد نانویی رشته‌ها، پوشینه‌دار کردن سلول‌ها را برای مهندسی بافت قلب غیرممکن می‌کند [۲۳].



شکل ۳. برق‌ریسی روی یک صفحه جمع‌کننده سیلندری شکل برای ایجاد رشته‌های کاملاً همسوسده [۲۶].

Figure 3. Electrospinning onto a cylindrical rotating mandrel can be used to generate highly aligned fibers [26].

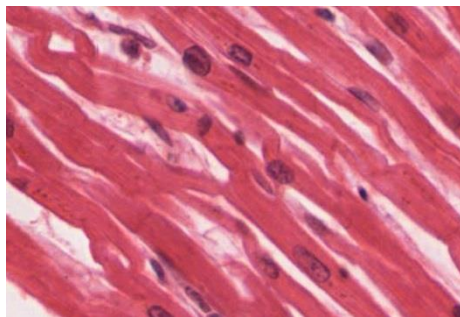
۲-۲ الگوسازی در ابعاد میکرونی

بافت طبیعی ماهیچه قلب به‌صورت سلسه‌مراتب در دسته‌هایی از رشته‌های همسوسده ماهیچه قلب و عروق خونی سازمان یافته است (شکل ۴) که باعث ایجاد بافتی با خواص وابسته به جهت می‌شود [۲۹]. یعنی برای این‌که بتوان خاصیت ناهمسان‌گردی در بافت طبیعی را به‌طور منحصربه‌فرد در آزمایشگاه ایجاد کرد، ضروری است که ویژگی‌هایی در سطح وجود داشته باشد که در نهایت نظم سلولی پیچیده را ایجاد کند [۳۰]. روش‌های متداول ایجاد این نشانه‌های سطحی به‌روش الگوسازی در ابعاد میکرونی^۸ شامل

برق‌ریسی روشی دیگری است که برای ساخت صفحاتی از رشته‌های بسیار نازک در مقیاس میکرو و نانو به کار می‌رود. در این روش از اعمال ولتاژ بالا به محلول پلیمر استفاده می‌شود که باعث ایجاد مخروط تیلور و رسیدن سریع رشته‌های خیلی نازک می‌شود. لایه‌هایی از رشته‌های روی هم قرار گرفته در طول فرایند رسیدن، صفحه‌ای نازک و متخلخل تشکیل می‌دهند. بسیاری از پلیمرها با این روش سازگارند؛ اما به‌طور کلی برای ساخت لازم است که محلول پلیمر گران‌روی مناسب داشته باشد و حلال در طول رسیدن به سرعت تبخیر شود [۲۳]. برخی از موادی که در مهندسی بافت با برق‌ریسی به کار می‌روند پلی‌کاپرولاکتون^۱، ژلاتین متاکریلات، پلی‌لاکتیک‌اسید^۲، پلی‌گلیسرول سبکتات^۳ و پلی‌لاکتیک‌کوگلاکولیک‌اسید هستند. در این روش پوشینه‌دار کردن سلول‌ها در پلیمر امکان‌پذیر نیست و بیشتر برای مطالعات دوبعدی که در آن‌ها سلول‌ها یک‌راست بر روی صفحات رشته‌ای کشت داده می‌شوند، استفاده می‌شود. رشته‌های همسو می‌توان با دستگاه برق‌ریسی با صفحه‌جمع‌کننده به وجود آورد. همسوبودن رشته‌ها را می‌توان با زیاد کردن سرعت صفحه‌جمع‌کننده افزایش داد [۲۴ و ۲۵]. این روش را سوهاییری^۴ و همکارانش برای طراحی سطحی برای تمایز و بلوغ کاردیومیوسیت‌ها به‌کار گرفتند [۲۶]. روش آن‌ها شامل برق‌ریسی رشته‌های پلی‌لاکتیک-کو-کاپرولاکتون^۵ با همسویی بالا (شکل ۳) و کشت سلول‌های فیبروبلاست روی صفحه بود. سلول‌زدایی صفحه رشته‌ای نهایی، ماتریس خارج‌سلولی حاصل از فیبروبلاست‌ها را به‌جا می‌گذارد که حاوی فیبرونکتین و کلاژن نوع یک است. این صفحه ماتریس خارج‌سلولی در تمایز سلول‌های *H9C2* کاردیومیوبلاست و حفظ ریخت‌شناسی سلول‌های کاردیومیوسیت موشی مؤثرتر از رشته‌های پوشانده شده با فیبرونکتین است. احمدی^۶ و همکارانش هم‌زمان به ایجاد ساختار متناظر با بافت قلب و فراهم کردن خاصیت الکتریکی مناسب برای سلول‌های قلبی پرداخته‌اند. آن‌ها در این پژوهش با استفاده از پلی‌یورتان، کیتوسان و نانولوله‌های کربنی با روش برق‌ریسی به ساخت داربست‌های قلبی هم‌جهت و

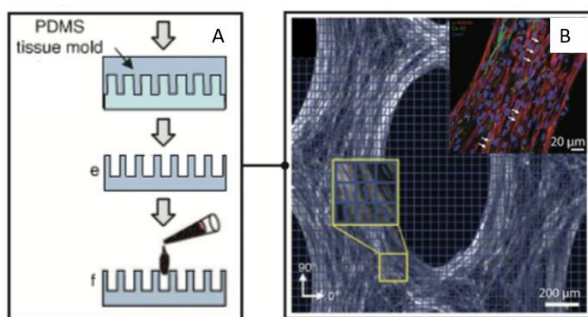
1. Poly Capro Lactone (PCL)
2. Poly Lactic Acid (PLA)
3. Poly Glycerol Sebacate (PGS)
4. Suhaeri
5. Poly(Lactic-Co-Caprolacton) (PLCL)
6. Ahmadi

7. Flaig
8. Micro-Patterning



شکل ۴. دسته‌هایی از رشته‌های همسوی ماهیچه قلب [۲۹].

Figure 4. Aligned fibers of cardiac muscle [29].



شکل ۵. (a) روش قالب‌گیری برای ایجاد ستون‌هایی با نسبت ابعاد بالا برای جهت‌دهی به سلول‌های قلبی (b) همسوس شدن سلول‌های قلبی اطراف ستون‌ها [۳۸].

Figure 5. (a) High aspect ratio PDMS pillars. (b) These pillars direct organization of cardiac cells around the PDMS pillars to generate aligned cardiac constructs [38].

ماسک نوری روشی است که برای مواد حساس به نور برای ایجاد ساختارهای شبه سه‌بعدی به کار می‌رود. در حال حاضر تعداد زیادی از زیست‌مواد هستند که در این روش به کار می‌روند. بسیاری از این مواد از دسته شیمی پلیمری شدن اکریلویل^۷، متاکریلویل^۸، شیمی کلیک تیول-ان^۹ و اضافه شدن تیول-مایکل^{۱۰} [۳۹] هستند. برای ایجاد الگوهای بیومولکولی معمولاً لازم است تا تغییراتی بر مولکول‌ها انجام شود تا گروه عاملی حساس به نور در آن‌ها ایجاد شود [۴۰]. اکثر این واکنش‌ها به آغازگر نوری نیاز دارند که در حضور نور، فعال و باعث گسترش واکنش رادیکالی می‌شود. ساختارهای حاصل از این روش به ساختارهای شبه سه‌بعدی معروف هستند؛ چرا که ارتفاع

ماسک‌نوری [۳۱ و ۳۲]، پرینت با تماس میکرونی [۳۳ و ۳۴] و قالب‌گیری میکروبی [۳۴-۳۶] است. این روش‌ها بیشتر برای افزایش همسویی سلول‌هایی که درون یا بر سطح ساختارها کشت داده شده‌اند، استفاده می‌شوند که باعث افزایش ترشح مشخصه‌های اصلی سلول‌های قلبی و بهبود نیروی انقباضی کلی بافت می‌شود. به‌عنوان مثال در یک مطالعه جدید، با روش قالب‌گیری میکروبی شیاریهایی بر سطح هیدروژل آلژینات و فیبرونکتین به وجود آوردند [۳۴] که سلول‌های کاردیومیوسیت کشت‌داده‌شده روی این شیاریها، سطح بالاتری از سارکومریک‌الفاکتینین، سلول‌های ماهیچه نرم و فیلامنت‌های اکتین را از خود نشان دادند. به‌علاوه فیلم نازک ماهیچه‌ای شکل گرفته بر سطح هیدروژل تحت میدان الکتریکی، انقباض بالایی را از خود نشان دادند. لیند^۲ و همکارانش در روشی مشابه سلول‌های بنیادی پرتوان القایی گرفته‌شده از کاردیومیوسیت‌ها را روی صفحه دارای الگوی پلی‌دی‌متیل‌سیلوکسان^۳ قرار دادند و هم‌چنین زیر این الگو، لایه‌ای را قرار دادند که بتواند فعالیت الکتریکی حاصل از انقباض سلول‌ها را ردیابی و ذخیره کند [۳۷]. استفاده از این سامانه برای بررسی اثر داروهای متفاوت بر سلول‌های همسو به کار رفته است. مقایسه نتایج حاصل از این سامانه با نتایج به‌دست‌آمده از فیلم‌های نازک ماهیچه‌ای^۴ این مسئله را نشان می‌دهد که از این سامانه می‌توان در مطالعات پیش از ورود دارو به بیمارستان استفاده کرد. قالب‌گیری میکروبی و پرینت با تماس میکروبی برای ایجاد ساختارهایی با سلول‌های همسو بسیار مفیداند؛ اما این روش‌ها دوبعدی محسوب می‌شوند و در ایجاد ساختار سه‌بعدی محدودیت دارند. بدین منظور قالب‌گیری میکروبی برای ایجاد ستون‌هایی با ارتفاع زیاد و ضخامت کم (نسبت ابعاد بالا^۵) از جنس پلی‌دی‌متیل‌سیلوکسان استفاده شد و سپس کشت سلول‌های قلبی پوشینه‌دار شده در هیدروژل فیبرین در فضای بین ستون‌ها انجام شد (شکل (۵) (a)-[۳۸]). با این روش، آن‌ها نظم سلول‌های ماهیچه‌ای اطراف ستون‌ها، همسوی بودن بالای سارکومریک‌الفاکتینین و افزایش ترشح پروتئین بین‌سلولی کانکسین^{۴۳} را مشاهده کردند (شکل (۵) (b)-[۳۸]).

6. Photomask Fabrication
 7. Acrylol
 8. Meta-Acrylolic
 9. Thiol-Ene
 10. Thiol-Micheal

1. Micro-Contact Printing
 2. Lind
 3. PolyDiMethylSilocsane (PDMS)
 4. Muscular Thin Films(MTFs)
 5. Aspect Ratio

حاصل از این روش در مقایسه با طول و عرض به‌دست‌آمده بسیار کوچک‌تر است و این امر باعث می‌شود که هیدروژل سه‌بعدی محسوب نشود. برای مثال، اوبین^۱ و همکاران خطوط موازی از هیدروژل ژلاتین متاکریلات را که حاوی سلول‌های فیبروبلاست بود با روش ماسک نوری ایجاد کردند [۴۱]. میزان بالایی از همسو بودن سلول‌ها با کاهش عرض خطوط از ۲۰۰ میکرومتر به ۵۰ میکرومتر در طول ۵ روز مشاهده شد. در مطالعه‌ای مشابه، سلول‌های کاردیومیوسیت و فیبروبلاست قلبی در ساختار ژلاتین متاکریلات با الگوهای میکروبی هم‌زمان کشت داده شدند [۴۲].

روشی مشابه برای ایجاد الگوهای بر سطح موادی که مانع چسبندگی سلولی می‌شوند به کار رفته است تا با این مواد بتوانند محیط فعالیت سلول‌ها را محدود کنند. یک مثال از این روش استفاده از کیتوسان حساس به نور روی شیشه و یا پلی‌استایرین^۲ پوشیده‌شده با پلی‌الیزین^۳ است [۴۳]. سلول‌های قلبی روی این سطح به قسمت‌های عاری از پوشش چسبیدند و در خطوطی با ضخامت کمتر از ۱۰۰ میکرومتر همسو شدند. با الگوسازی نوری می‌توان گرادیان سختی مواد را که مشابه بافت اصلی است، ساخت [۴۴] و یا گرادیان غلظت زیست‌مولکول‌ها را به وجود آورد [۴۵]. گرادیان در سختی مواد، دوروتاکسیس^۴ را که مهاجرت سلولی در راستای گرادیان سختی مواد است ایجاد می‌کند؛ درحالی که گرادیان زیست‌مولکول‌ها، کموتاکسیس^۵ را که مهاجرت سلولی در راستای اختلاف غلظت شیمیایی است ایجاد می‌کند. مطالعات آزمایشگاهی بر دوروتاکسیس می‌تواند در روشن شدن چگونگی وقوع سازوکارهای تمایز سلولی و یا ایجاد شبکه عصبی در ماهیچه [۴۶] که هر دو پارامترهای مهمی برای درک بهتر بیماری‌های قلبی و عروقی‌اند، مفید واقع شود [۴۷ و ۴۸]. برای مثال تس^۶ و همکارانش با استفاده از ماسکی که گرادیان شفافیت داشت هیدروژلی از پلی‌اکریل‌امید^۷ که با نور به‌صورت عرضی به هم متصل‌شده را به وجود آوردند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی کشت‌داده‌شده بر این هیدروژل با گرادیان سختی $1/0.6 \pm$ کیلوپاسکال بر میلی‌متر که مشابه گرادیان سختی در بین

مایوکاردیوم بیمار (فیبروز شده) و سالم است، به‌سمت نواحی با سختی بیشتر مهاجرت کردند و ریخت‌شناسی آن‌ها بیشتر مشابه ماهیچه‌های انقباضی شد [۴۹]. به‌طور کلی، الگوسازی نوری امکان کنترل دقیق بر ترتیب فضایی زیست‌مواد را ایجاد می‌کند و باعث توسعه استفاده از آن‌ها برای شبیه‌سازی هرچه بیشتر بافت طبیعی می‌شود [۳۹].

۲-۳ پرینت زیستی سه‌بعدی

هرچند روش‌هایی که در قسمت‌های پیشین از نظر گذشت، می‌توانند تا حدی برخی از پیچیدگی‌های بافت طبیعی قلب را ایجاد کنند؛ اما همچنان در ایجاد داربست‌هایی در مقیاس بزرگ با تناسب فیزیولوژیکی محدودیت‌هایی دارند. پرینت زیستی سه‌بعدی یکی از پیشرفته‌ترین روش‌های ساخت زیستی است که برای ایجاد ساختارهای پیچیده با شباهت زیستی بالا به کار می‌رود. انواع متفاوتی از روش‌های پرینت سه‌بعدی وجود دارد؛ مانند استریولیتوگرافی^۸ [۵۰ و ۵۱]، جت جوهر^۹ [۵۲]، اکستروژن^{۱۰} [۵۳]، پلیمری‌شدن دو فوتونی^{۱۱} [۵۴] و انتقال جلورونده الفاشده با لیزر^{۱۲} [۵۵]. البته معیارهای متفاوتی برای انتخاب بهترین روش برای پرینت هندسه خاص وجود دارد که در مقالات متعددی مرور کاملی بر برتری‌ها و کاستی‌های هر یک از این روش‌ها انجام گرفته است [۵۶ و ۵۷].

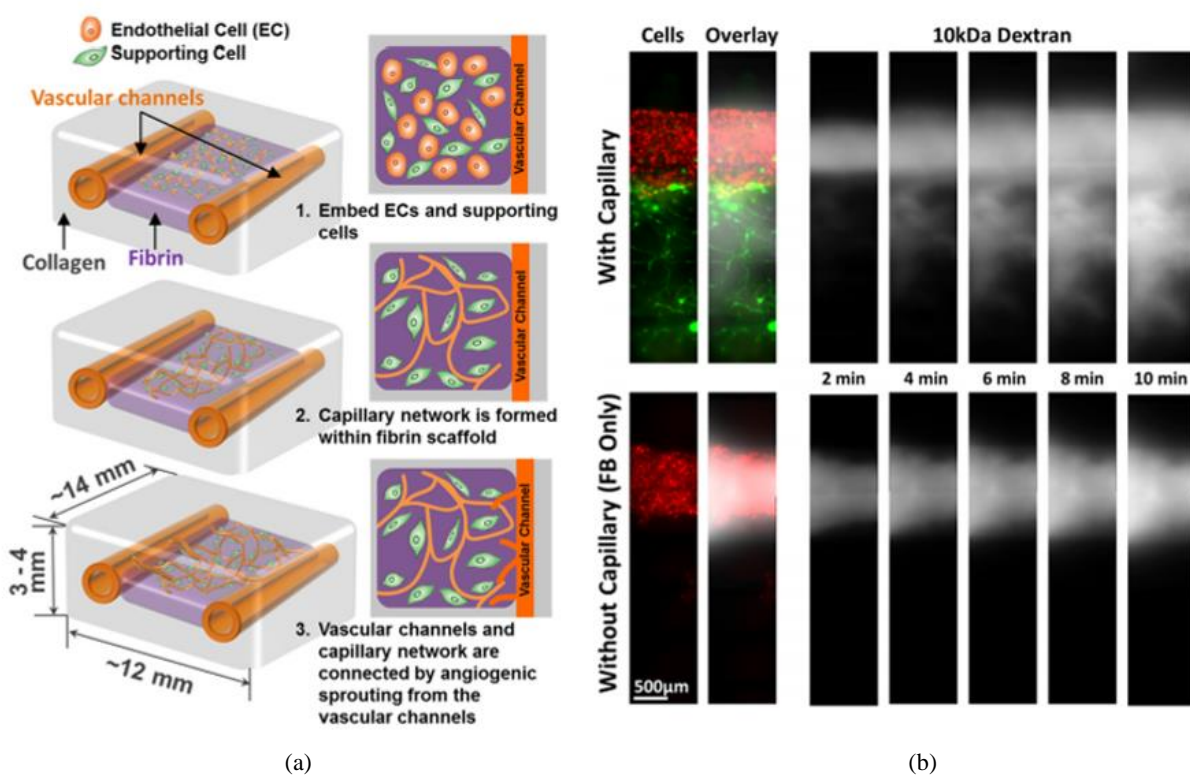
توانایی پرینترهای زیستی برای پرینت لایه‌ها در مقیاس‌های متفاوت و به‌طور مستقل، امکان ایجاد سازه‌هایی در ابعاد بزرگ و با دقت بالا در تمام جهت‌ها را ایجاد می‌کند [۵۸]. به‌علاوه در پرینت زیستی امکان استفاده از مواد متفاوت با چندین نوع سلول در یک ساختار وجود دارد. این امر باعث می‌شود که این روش بتواند خیلی دقیق‌تر، تنوع و پیچیدگی ساختاری بافت طبیعی قلب را شبیه‌سازی کند. از جمله توانایی‌های این روش امکان به‌کار بردن شبکه عروقی برای شبیه‌سازی عروق خونی در بافت است؛ برای مثال لی^{۱۳} و همکارانش با استفاده از پرینت زیستی یک شبکه از عروق ریز را که شامل کانال‌های از پیش ساخته‌شده با قطر یک میلی‌متر بود

1. Aubin
2. Polystyrene
3. Poly-L-lysine
4. Durotaxis
5. Chemotaxis
6. Tse
7. PolyAcrylAmid

8. Stereolithography
9. Inkjet
10. Extrusion
11. Two-Photon Polymerization
12. Laser-Induced Forward Transmission
13. Lee

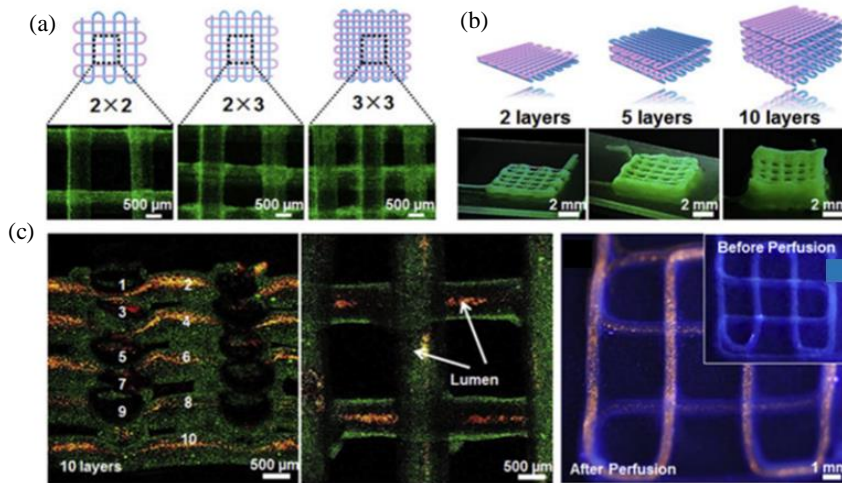
کشت‌داده شدند. عبور دادن محیط کشت مناسب برای رشد سلول‌های اندوتلیال، باعث رگ‌زایی سریع و ایجاد مویرگ‌هایی در بین دو کانال شد (شکل ۶-ا). به‌علاوه نفوذ دکستران ۱۰ کیلودالتون از شبکه عروقی نشان داد که در ساختار دارای مویرگ‌ها، نفوذ بسیار سریع‌تر از ساختار بدون مویرگ‌ها ممکن می‌شود (شکل ۶-ب). در مطالعه‌ای دیگر با استفاده از روش ریزسیالاتی، کانال قابل نفوذ پیوسته را پرینت کردند [۵۹]. سازه‌های حاوی کانال‌های نفوذپذیر پوشیده‌شده با سلول اندوتلیال، مانند آنچه در این کار ایجاد شده، برای مطالعه کینتیک داروها بر سازه‌های بزرگ قلبی و عروقی به کار می‌رود (شکل ۷).

به وجود آوردند [۵۸]. در این کار دستگاه مورد استفاده شامل یک صفحه با قابلیت کنترل حرکت در جهت هر سه محور مختصات، شیرهای کنترل برای خروجی نازل‌ها، سرنگ حاوی مواد، تنظیم‌کننده فشار و واحد تنظیم‌کننده دما بود. مواد درون سرنگ شامل سوسپانسیون سلولی، فاکتورهای رشد و مخلوطی از هیدروژل‌ها می‌تواند باشد که از راه اعمال فشار هوا مطابق با طرح داده‌شده به دستگاه، داربست را در سه بعد ایجاد کند. میزان مواد خروجی از نازل‌ها یا به‌عبارت دیگر وضوح طرح متأثر از شیرهای کنترل‌کننده نازل‌ها و فشار هواست که می‌تواند با فرکانس یک کیلوهرتز کار کند. در این روش دو کانال بزرگ به موازات هم پرینت‌شده و سلول‌های اندوتلیال در بین آن‌ها در هیدروژل فیبرین



شکل ۶. (a) پرینت کانال‌ها در دو طرف هیدروژل حاوی سلول اندوتلیال و رگ‌زایی بین این دو کانال در هیدروژل فیبرین، (b) مقایسه نفوذ دکستران ۱۰ کیلودالتون در دو حالت وجود و عدم وجود مویرگ‌ها [۵۸].

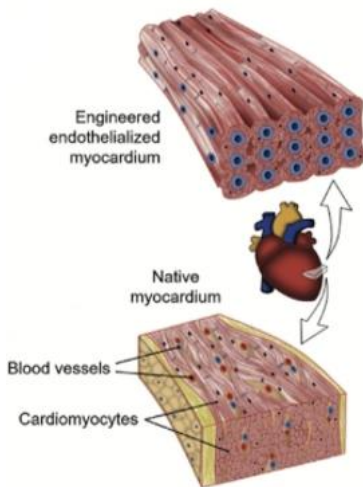
Figure 6. (a) Schematics of growth and maturation process of the multi-scale vascular system fabricated by using 3D bioprinting technology, (b) Diffusion of 10 kDa Dextran in vascular structures with and without capillary network [58].



شکل ۷. (a) کانال‌های پرینت شده در فاصله‌های متفاوت، (b) ساختار شبکه‌ای کانال‌های توخالی پرینت شده با پرینتر زیستی و نازل هم‌محور در تعداد لایه‌های متفاوت، (c) عبور جریان حاوی میکروبیدهای قرمز از داربست برای نمایش باز بودن کانال‌ها [۵۹].

Figure 7. (a) Schematics and corresponding fluorescence micrographs of the bioprinted tubular constructs with different aspect ratios of internal grids, (b) and numbers of layers. (c) Photos of perfused channels with red fluorescent microbeads inside the lumens, Fluorescence photographs before (inset) and after injection with red fluorescent microbeads into the lumen of the single, continuous bioprinted tube [59].

پرینت زیستی در حال حاضر تمام توانایی خود را برای ایجاد ساختار قلبی و عروقی با عمل کرد مناسب به نمایش نگذاشته است، هرچند برخی از مطالعات در این زمینه بسیار امیدبخش هستند؛ برای مثال در مطالعه ژانگ^۱ و همکارانش سازه‌ای از کاردیومیوسیت‌ها با سلول‌های اندوتلیال با روش پرینت زیستی به همراه روش‌های ریزسیالاتی ایجاد شد [۶۰]. آن‌ها ساختاری با رگ‌گذاری شده با اندوتلیال‌ها را برای رگ‌زایی پرینت کردند که در مرحله بعد می‌توانستند سلول‌های کاردیومیوسیت را روی آن کشت دهند (شکل ۸). سلول‌های اندوتلیال به سمت محیط المان‌های پرینت شده حرکت می‌کنند و کاردیومیوسیت‌ها به صورت همسوسه در المان قرار می‌گیرند و شکل کلی ساختار از لایه‌های الگوی شبکه‌ای به وجود آمده است. عمل کرد و زنده‌مانی طولانی مدت ساختار با قراردادن طرح در راکتور زیستی پرفیوژن به دست آمده است. آن‌ها از این سامانه به عنوان مدل ساده‌ای برای آزمون داروی ضدسرطان دوکسوروبیسین استفاده کردند. بافت قلب در مقابل نفوذ محلول داروی دوکسوروبیسین رفتاری وابسته به دوز دارو را نشان می‌دهد؛ به گونه‌ای که با افزایش غلظت دارو کاهش بیشتری در نرخ ضربان قلب دیده می‌شود. هرچند این مدل‌ها از نظر ترکیب سلولی و خواص ساختاری شبیه بافت طبیعی قلب است؛ اما موانع



شکل ۸. پرینت ساختار شبکه‌ای کانال‌های توخالی با نازل هم‌محور همراه با سلول اندوتلیال و قالب‌گیری هیدروژل حاوی سلول کاردیومیوسیت در اطراف آن در مقایسه با بافت طبیعی قلب [۶۰].

Figure 8. Bioprinting techniques can be used to generate endothelialized tissue constructs that mimic the highly vascularized myocardium [60].

۱. Zhang

۲-۴ انواع فناوری‌های پرینت زیستی سه‌بعدی برای پرینت ساختار دارای شبکه عروقی

در حالت ایده‌آل، بافت مصنوعی نه تنها باید شامل انواع سلول‌های مختص بافت باشد، بلکه باید دارای شبکه عروقی باشد تا مواد غذایی و اکسیژن از راه خون در آن به سرعت و با بازدهی بالا نفوذ کند. در عمل برای ایجاد ابعاد میکرون که در برخی بافت‌ها مانند کلیه و کبد وجود دارد و ایجاد آن‌ها با پرینتر مشکل است [۶۷]، در کنار پرینت زیستی از روش‌های دیگر نیز استفاده می‌شود [۶۸]. این روش‌ها بیشتر شامل ایجاد شبکه عروقی و مویرگ‌ها با به‌کارگیری فاکتورهای رشد و رگ‌زایی است [۶۹-۷۱].

روش‌هایی که رگ‌زایی را در داربست کاشته شده القا می‌کنند شامل ایجاد ساختارهایی حاوی فاکتورهای پیش‌انژیوژنسیس مانند $VEGF^3$ ، FGF^4 ، $PDGF^5$ و TGF^6 است و یا به‌طور هم‌زمان با داربست کاشته شده به بافت تزریق می‌شوند تا ایجاد عروق جدید را به وسیله بافت طبیعی سرعت بخشند [۷۲ و ۷۳]. در دیگر روش‌ها محققان تلاش کردند که داربست از پیش‌رگ‌زایی شده را با پوشینه دار کردن سلول‌های اندوتلیال و دیگر سلول‌ها و المان‌ها در آزمایشگاه ایجاد کنند [۷۴ و ۷۵]. هرچند استفاده از جوهرهای زیستی حاوی مواد فعال زیستی روش مستقیم‌تری محسوب می‌شود؛ اما استفاده از ساختار از پیش‌رگ‌زایی شده نتایج بهتری برای آناستوموسیس^۷ نشان داده‌اند [۷۵].

۲-۴-۱ روش استفاده از ماده فداشونده

استفاده از مواد فداشونده از متداول‌ترین روش‌ها برای ایجاد ساختارهای از پیش‌رگ‌زایی شده است. اصول کلی این روش چنین است که برای ایجاد فضاهای خالی در داربست از موادی استفاده شود که در پایان فرایند پرینت، بتوان آن‌ها را با استفاده از حلال‌های مناسب یا فعالیت سلول‌های موجود در داربست و یا تغییرات دمایی از سامانه خارج کرد.

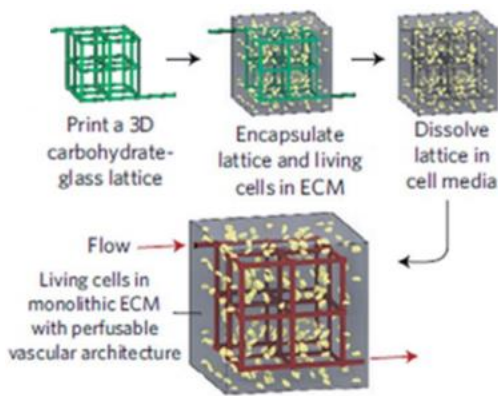
شیشه کربوهیدرات^۸ به‌عنوان ماده فداشونده زیست‌سازگار به‌وسیله میلر^۹ و همکارانش [۷۶] معرفی شد و در مطالعات دیگر نیز به‌کار

بدین ترتیب تلاش‌ها باید به سمت ایجاد ساختارهای پیچیده سه‌بعدی برود که بهتر بتواند ساختار طبیعی بافت را شبیه‌سازی کند. یکی از مشکلات گسترده در این است که مواد نرم که نفوذ و گسترش مواد غذایی و تمایز سلولی را بهتر حمایت می‌کنند، توانایی حفظ ساختار خود را ندارند. برای حل مشکل پایداری ساختار، برخی از گروه‌ها از اضافه کردن تصحیح‌کننده‌های رئولوژیکی مانند نانورشته‌های سلولز [۶۲] و یا از پرینت ساختار حمایت‌کننده هم‌زمان با پرینت هیدروژل نرم استفاده کرده‌اند. برای مثال در کار کنگ^۱ و همکارانش از پرینت المان‌های پلی‌کاپرولاکتون در کنار هیدروژل نرم استفاده شد تا ماتریس سه‌بعدی بزرگ ساختار حفظ شود [۶۳]. هرچند به گواهی نویسندگان ماده پلی‌کاپرولاکتون با رشد بافت تخریب می‌شود؛ اما نرخ تخریب این ماده بسیار پایین است [۶۴]. همچنین چون شکل ساختاری بافت بسیار وابسته به سختی ماده است [۶۵]، حضور پلی‌کاپرولاکتون می‌تواند باعث بروز پاسخ‌های سلولی ناخواسته شود، اگرچه این روش می‌تواند برای برطرف کردن محدودیت پرینت سه‌بعدی مواد نرم مفید باشد [۵۷]. به‌تازگی جانگ‌شین^۲ و همکارانش از ماتریس قلب خوک که سلول‌زدایی شده بود برای پرینت داربست قلبی استفاده کردند. در این مطالعه به دلیل مناسب نبودن خواص مکانیکی و رئولوژیکی این ماده از نانوذره لاپونیت برای تسهیل پرینت ماده و پلی‌اتیلن گلایکول دی‌اکریلات برای بهبود خواص مکانیکی ماده استفاده شد. این ترکیب زنده‌مانی بالایی را برای سلول‌های قلبی فراهم کرد [۶۶].

استراتژی‌های ساخت زیستی که ترکیب حساب‌شده‌ای از سلول‌ها و زیست‌مواد را به کار می‌برد، نوید بزرگی برای بازسازی میکروساختارهای موجود در ساختار طبیعی بافت‌هاست. با وجود برتری‌های بسیاری که در بالا ذکر شد؛ اما آزمایش‌ها تا به امروز از وجود محدودیت‌های عمده‌ای در استفاده از این ساختارها برای آزمون‌های دارویی و مدل‌کردن بیماری‌ها خبر می‌دهند. برای مثال ارزیابی‌های داروشناسی نیاز به مانیتور کردن سامانه به‌صورت پیوسته دارد تا پاسخ سلولی به محرک‌ها و داروها را بتوان بررسی کرد. همچنین میکروبافت‌های رشد داده شده در محیط‌های کشت متداول نمی‌توانند برهم‌کنش غیرهمگن دینامیک را که در بافت طبیعی رخ می‌دهد شبیه‌سازی کنند [۱].

1. Kang
 2. Jung Shin

3. Vascular Endothelial Growth Factor
 4. Fibrotic Growth Factor
 5. Platelet-derived Growth Factor
 6. Transforming Growth Factor
 7. Anastomosis
 8. Carbohydrate Glass
 9. Miller



شکل ۹. پرینت سه‌بعدی کربوهیدرات شیشه در ساختار شبکه‌ای و فرایند خارج کردن آن از داربست [۷۶].

Figure 9. The entire preparation process included utilizing an extrusion method to print the 3D sugar supporting network, embedding the sugar scaffold into a celladen hydrogel material, and dissolving the sugar to expose a hollow channel network [76].

فیزیکی آن از حالت ژل (دمای بالای 4°C) به حالت محلول (دمای زیر 4°C) امکان پرینت آسان و هم‌چنین خارج کردن ساده پس از پایان پرینت را فراهم می‌آورد [۸۰]. اخیراً با استفاده از روشی مشابه، پرینت زیستی بافت رگ‌زایی شده با ضخامت بیش از یک سانتی‌متر ممکن شده است [۸۱]. در این کار سلول‌های HUVEC^۸، HNF^۹ و سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دست آمده از مغز استخوان با هم‌دیگر کشت داده شدند. زمان کشت در این مطالعه شش هفته بوده در حالی که در مطالعات مشابه حد اکثر ۱۴ روز بوده است. کنگ^{۱۰} و همکارانش [۶۳] از یک پرینتر هماهنگ‌شده بافت-ارگان^{۱۱} برای پرینت هم‌زمان ماده سخت پلی‌کاپرولاکتون و ماده نرم هیدروژل حاوی سلول و ماده فداشونده پلورونیک‌اف ۱۲۷ استفاده کردند (شکل (۱۰)). آن‌ها توانستند استخوان، گوش، ماهیچه را پرینت کنند که در بدن حیوانات کاشته شد و نتایجی از رگ‌زایی بدون مرگ سلولی را نشان داد [۶۳].

در پژوهش دیگری، برتاسونی^{۱۲} و همکارانش [۸۲] نشان دادند که بسیاری از هیدروژل‌ها را می‌توان در قالبی از آگاروز پرینت‌شده، قالب‌گیری و با نور فرابنفش به صورت عرضی به هم متصل کرد (شکل (۱۱)). یافته جدید در این پژوهش این بود که المان‌های آگاروز به هیدروژل نمی‌چسبند و این امر خارج کردن آن‌ها را از

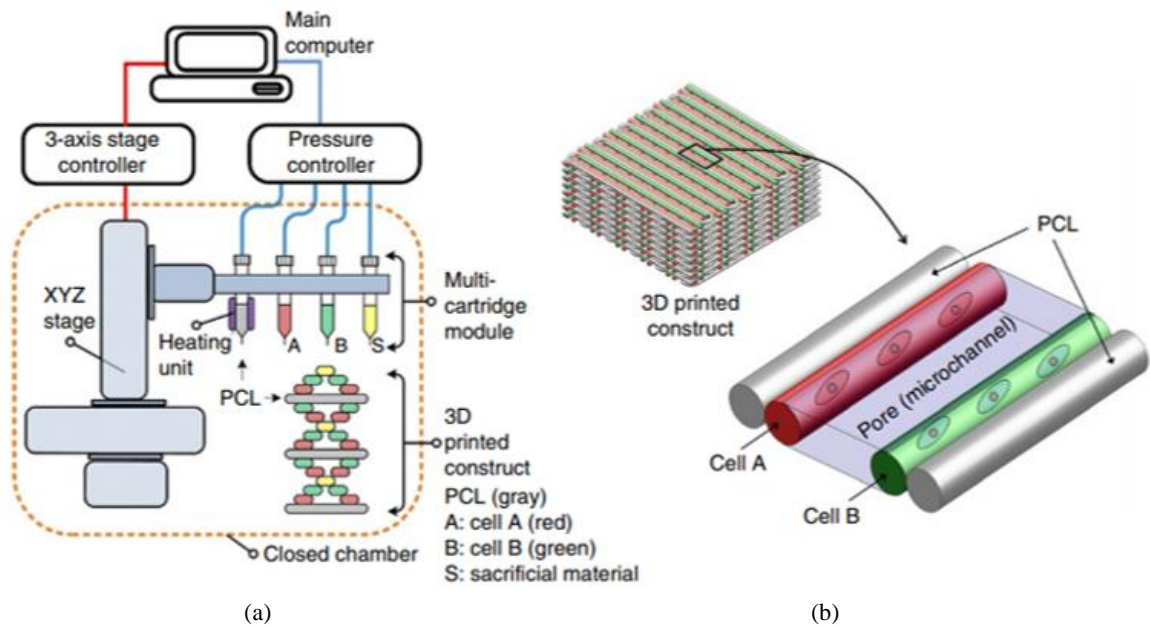
گرفته شد [۷۷]. این روش برای حل دو معضل در مهندسی بافت به کار رفت. اول داشتن ماده فداشونده‌ای که به اندازه‌ای محکم باشد که ساختار شبکه‌ای^۱ سه‌بعدی را حفظ کند و دوم ماده‌ای باشد که به وسیله سلول‌ها مصرف و از سامانه حذف شود [۷۸ و ۷۶]. برای پرینت سه‌بعدی شیشه کربوهیدرات در مهندسی بافت از روش‌های مختلف می‌توان بهره برد؛ چه از روش پرینت لایه‌به‌لایه این ماده در کنار مواد اصلی در داربست و چه از روش پرینت ساختار سه‌بعدی به صورت جداگانه که در نهایت داربست اصلی در اطراف آن قالب‌گیری می‌شود [۷۸]. پرینت سه‌بعدی کربوهیدرات شیشه فداشونده به روش حرارتی ایجاد هندسه‌ها را ممکن می‌سازد (شکل (۹)) [۷۶] که می‌توانند بدون نیاز به ساختار حمایتی، شکل خود را حفظ کنند [۷۸]. میرابلا^۲ و همکارانش [۷۷] از این روش برای پرینت پیچ‌های رگ‌زایی شده به منظور حفظ نفوذ و نجات بافت ماهیچه قلب که دچار کم‌خونی یا ایسکمی^۳ شده، استفاده کردند. طبق نتایج تحقیقات، این پیچ‌ها نه تنها به عروق بافت طبیعی متصل شدند، بلکه باعث افزایش آنژیوژنسیس در بافت آسیب‌دیده شدند [۷۷]. این مطالعه می‌تواند یک جای‌گزین مطمئن برای درمان ایسکمی در بافت سه‌بعدی باشد.

گلبر^۴ و همکارانش [۷۸] روشی را با دقت بالا طراحی کردند که در آن با استفاده مستقیم از ایزومالت‌ها^۵ هندسه مستقل و پیچیده‌ای پرینت شد. در این روش، ایزومالت به صورت مذاب از نازل، خارج و پس از آن در شرایط محیطی سخت شده است. این روش ساخت شبکه‌های مستقل از المان‌های استوانه‌ای را ممکن می‌سازد و توانایی‌های این روش را در مهندسی بافت و ریزسیالات نشان می‌دهد.

هیدروژل‌ها نیز از دیگر موادی هستند که برای افزایش رگ‌زایی در بافت استفاده می‌شوند. معمول‌ترین هیدروژل‌های مورد استفاده فیبرین، ژلاتین، آلژینات و آگاروز هستند [۷۹]. کولسکی^۶ و همکارانش [۸۰] از ژلاتین متاکریلات به عنوان شبیه‌ساز ماتریس خارج سلولی و از پلورونیک‌اف ۱۲۷^۷ برای ایجاد ساختارهای عروق استفاده کردند. پلورونیک اف ۱۲۷ جوهری است که تغییر فاز

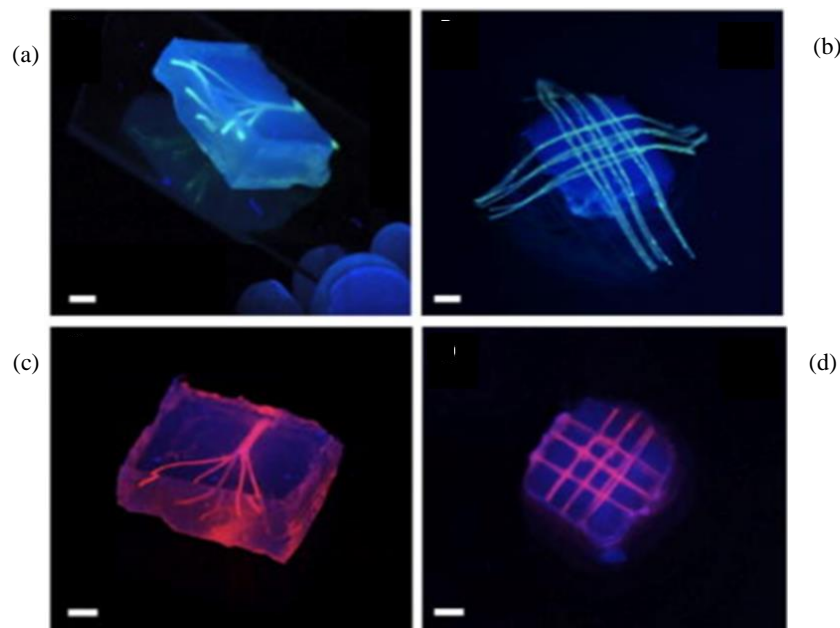
1. Lattice
2. Mirabella
3. Ischemic
4. Gelber
5. Isomalt
6. Kolesky
7. Pluronic F127

8. Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs)
9. Human Neonatal Dermal Fibroblasts (HNFs)
10. Kang
11. Integrated Tissue-Organ Printing (ITOP)
12. Bertassoni



شکل ۱۰. سامانه پرنتر هماهنگ‌شده بافت-ارگان، (a) این سامانه شامل کنترل‌کننده محورها، نازل‌ها با سامانه اعمال فشار هوا و یک محفظه بسته آکریلیکی برای کنترل دما و رطوبت، (b) شماتیک طرح پرنتر شده حاوی چند هیدروژل حاوی سلول و PCL به‌عنوان ماده حمایت‌کننده و میکروکانال‌های ناشی از خروج ماده فداشونده [۶۳].

Figure 10. ITOP system. (a) The ITOP system consists of three major units; 3-axis stage/ controller, dispensing module including multi-cartridge and pneumatic pressure controller and a closed acrylic chamber with temperature controller and humidifier. (b) Illustration of basic patterning of 3D architecture including multiple cell-laden hydrogels and supporting PCL polymer [63].



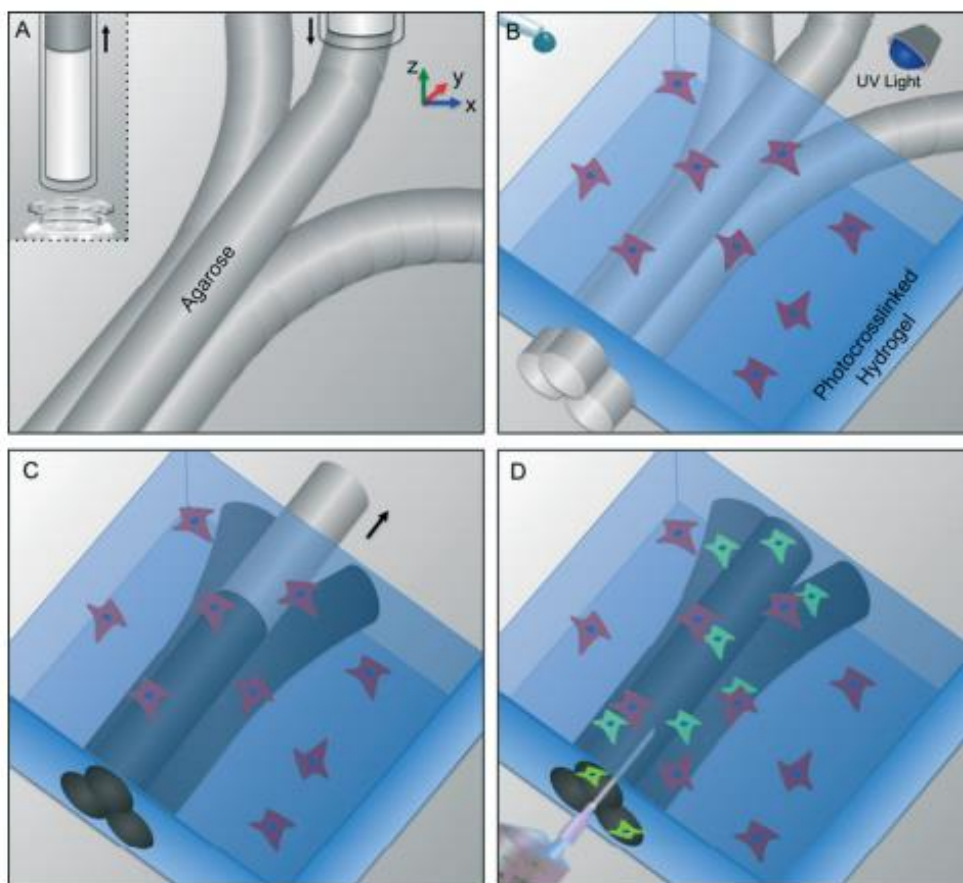
شکل ۱۱. (a) قالب شاخه‌ای سه‌بعدی در هیدروژل ژلاتین متاکریلات، (b) قالب شبکه‌ای سه‌بعدی آگاروز در هیدروژل ژلاتین متاکریلات، (c) کانال‌های شبکه‌ای توخالی بعد از نفوذ میکروبیدهای فلوروسنت، (d) کانال‌های شاخه‌ای توخالی بعد از نفوذ میکروبیدهای فلوروسنت، (خط مقیاس: ۳ میلی‌متر) [۸۲].

Figure 11. (a) Bioprinted agarose templates in branching shape and in GelMA, (b) Agarose fibers embedded in hydrogel in lattice structure, (c) the resulting network perfused with a fluorescent microbead (red) 3D branching, (d) and 3D lattice, scale bars are all 3 mm [82].

سامانه تسهیل می‌کند و در نهایت میکروکانال‌هایی را با قابلیت نفوذ مواد به‌جا می‌گذارند. این روش نیاز به حلال و یا سلول برای حل یا مصرف کردن آگاروز ندارد. پرینت زیستی المان‌ها به‌صورت جداگانه امکان به‌کاربردن اندازه‌های متفاوت از المان‌ها (۲۵۰ و ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرون) را در یک ساختار به وجود می‌آورد که در نهایت می‌شود با سلول‌های HUVEC پوشیده شود (شکل (۱۲)). از جمله مشکلاتی که در این زمینه وجود دارد این است که امکان ایجاد حلقه‌های بسته با این روش ممکن نیست و هم‌چنین هر چقدر که ابعاد سازه بزرگ می‌شود طول نفوذ نور فرابنفش باعث افزایش تفاوت در ایجاد اتصالات عرضی طرح در ارتفاعات مختلف می‌شود [۸۲]. درحالی‌که در این تحقیق از مواد و روش‌های متفاوتی استفاده شد، به‌وضوح

ارزش وجود کانال‌های خالی و قابل نفوذ در ماتریس خارج‌سلولی نشان داده شد.

قراردادن بازگشت‌پذیر ساختارهای آزاد از هیدروژل‌های معلق و یا به‌اختصار فرش^۱، از خواص بازگشت‌پذیری حرارتی هیدروژل‌ها به‌عنوان ساختار حمایتی در طول ساخت شبکه عروقی استفاده می‌کند. هیدروژل پرینت شده در حمامی از ژل حساس به دما در دمای $22 \pm 1^\circ\text{C}$ قرار می‌گیرد. مواد این حمام مانند ماده بینگام پلاستیک^۲ عمل می‌کند و مقاومت مکانیکی خیلی کمی را به نازل در حال حرکت اعمال می‌کند؛ اما استحکام کافی برای حفظ ساختار را نیز فراهم می‌آورد. مواد حمام در 37°C ذوب و خارج می‌شود. این روش نیاز به پرینت لایه به لایه را حذف و امکان ایجاد

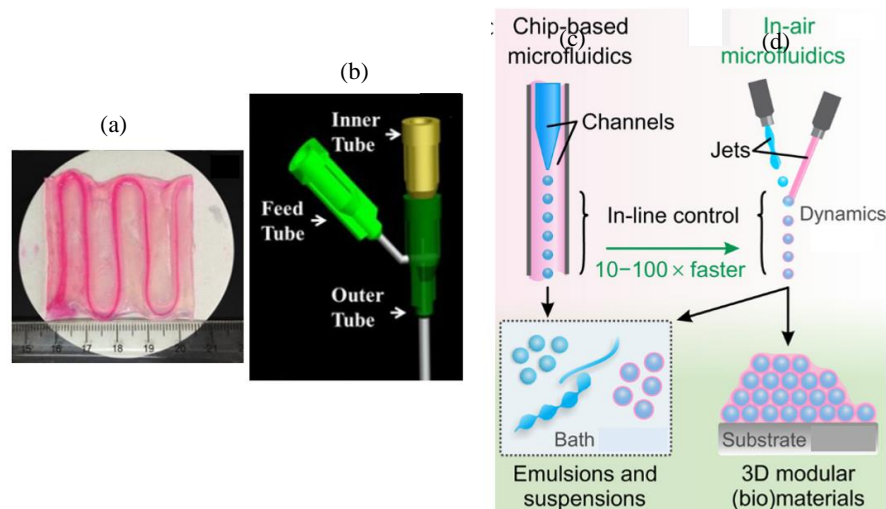


شکل ۱۲. استفاده از رشته‌های آگاروز برای ایجاد میکروکانال، (a) رشته‌های پرینت شده، (b) رشته‌های آگاروز در هیدروژل همراه با سلول، (c) جهت خارج کردن رشته‌ها، (d) کشت سلول در کانال‌ها پس از خارج کردن رشته‌ها [۸۲]. ۱

Figure 12. Preparation process of agarose bioprinting, (a) agarose template fibres, (b) casting and crosslinking of the hydrogel bulk over the template mold, (c) removal of the template, and (d) exposure of the fully perfusable microchannels and subsequent cell seeding [82].

۲-۴-۲ پرینت زیستی سه‌بعدی به‌همراه کانال‌های ریزسیالاتی به‌تازگی پرینت لوله‌های توخالی برای ایجاد ساختارهای قابل نفوذ رگ در یک مرحله مطرح شد. در این روش از یک نازل چندمحوره (نازل دوماحوره در شکل (۱۳-a)) در چندین لایه استفاده می‌شود و جوهر زیستی اصلی که معمولاً حاوی آلژینات است، از اطراف هسته و عامل اتصال‌دهندهٔ عرضی از هسته خارج می‌شود. این نحوهٔ خارج کردن مواد این امکان را به وجود می‌آورد که ساختار توخالی لوله‌ای ایجاد شود (شکل (۱۳-b)) [۸۶]. لوله‌های توخالی می‌توانند با پرینت زیستی به شکل‌های متفاوتی درآیند که قابلیت نفوذ مواد را مانند عروق طبیعی داشته باشند. به‌علاوه، با اضافه کردن اجزایی مانند ژلاتین متاکریلات می‌توان این امکان را به وجود آورد که با سلول‌های اندوتلیال ساختار را به یک رگ خونی قابل نفوذ تبدیل کرد [۵۹]. ویسر^۴ و همکارانش [۸۷] به‌تازگی روش ریزسیالات در هوا^۵ را معرفی کردند که نسبت به تراشه‌های ریزسیالاتی از بازدهی بالاتری برخوردارند. در این روش کانال‌های ریزسیالاتی با جت‌های میکرونی از مایع که در هوا به‌هم می‌پیوندند، جایگزین شدند (شکل (۱۳-c,d)). با استفاده از المان لرزان پیزوالکتریک، می‌توان قطرات با پراکندگی یکنواخت ایجاد کرد. با این روش یک شبکهٔ از پیش‌رگ‌زایی شده در یک هفته با کشت هم‌زمان سلول‌های اندوتلیال و مزانشیمی در ژل فیبرین به‌دست آمد [۸۷].

طرح‌های متنوع‌تر و ساختارهای پیچیده‌تر را ایجاد می‌کند [۶۱]. به‌تازگی سانتورنوند^۱ و همکارانش [۸۳] توانستند هیدروژلی بسازند که در دمای $30 \pm 30^\circ\text{C}$ پرینت شود که به‌نسبت کارهای دیگر با پرینت در دمای خیلی بالا 80°C [۸۲] و یا دمای خیلی پایین 28°C [۸۴] دمای مناسب‌تری دارد. در روش آن‌ها، هم هیدروژل و هم حمام در حالت ژل هستند. پلورونیک‌مونوکربوکسیلیت^۲ و ژلاتین متاکریلات با هم مخلوط شدند تا جوهر زیستی پلورونیک-ژلاتین متاکریلات را ایجاد کنند. پلورونیک‌اف ۱۲۷ به‌عنوان مادهٔ حمایتی به کار رفت. در این روش زنده‌مانی سلول‌های HUVEC تا ۱۰ روز بررسی شد [۸۳]. هینتون^۳ و همکارانش توانستند ساختار بافت‌های نرم مانند قلب جوجه و مغز انسان را در ابعاد سه سانتی‌متری با پرینت کردن آلژینات در ساختار حمایتی ذرات میکرونی ژلاتین و کلسیم‌کلراید به وجود آورند [۶۱]. از آنجایی که ژلاتین در دمای فیزیولوژیک به مایع تغییر فاز می‌دهد، ساختار نهایی به‌سادگی با قراردادن طرح در 37°C به‌دست می‌آید. چنین فناوری‌هایی امکان توسعهٔ پرینت سه‌بعدی را برای مهندسی بافت قلب و عروق افزایش می‌دهد. چنان‌که به‌تازگی محققان توانستند قلب کامل را در ابعاد قلب انسان با فناوری فرش با هیدروژل آلژینات به وجود آورند [۸۵].



شکل ۱۳. روش‌های ایجاد کانال‌های ریزسیالاتی در تودهٔ هیدروژل (a) نفوذ رنگ از کانال‌های قرار داده‌شده در تودهٔ هیدروژل، (b) نازل‌های هم‌محور (c) ریزسیالات بر روی تراشه (d) روش ریزسیالات در هوا [۸۶].

Figure 13. Methods of microfluidic channel formation in the hydrogels, (a) Color diffusion in printed vessels in the bulk of hydrogel, (b) the co-axial nozzle used for printing the structure, (c) Chip-based microfluidics enables in-line control over droplets and particles, (d) IAMF maintains the in-line control of chip-based microfluidics but relies on jet ejection and coalescence into air [86].

1. Suntornnond
 5. In Air Microfluidic

2. Pluronic monocoxylyate (Plu-MP)

3. Hinton 4. Visser

۳. نتیجه‌گیری

همان‌گونه که در این مقاله بیان شد، روش‌های ریزسیالاتی در ساخت داربست‌های قلب و عروق به‌ویژه روش پرینت زیستی سه‌بعدی، زمینه‌های نوظهور و درحال پیشرفتی هستند که به‌سمت ایجاد سازه‌های زیستی با شباهت بسیار بالا از لحاظ فیزیولوژیکی، ساختاری و عمل‌کردی برای مهندسی این بافت-پیش می‌روند. باتوجه به نتایج این بررسی می‌توان گفت که روش مبتنی بر رشته‌های میکرونی و یا استفاده از تراشه‌های ریزسیالاتی به‌طور عمده برای ایجاد الگوهای دوبعدی مناسب هستند و روش پرینت زیستی امکان ایجاد سازه سه‌بعدی را فراهم می‌آورد. انتظار می‌رود که با بهره‌گیری از ترکیب درستی از این روش‌ها در سطوح مختلف داربست بتوان در آینده هرچه بیشتر به ساختار قلب نزدیک شد. علاوه بر ظهور پیشرفت‌های چشمگیر در زمینه فناوری ریزسیالات، توسعه اصلاحات سلولی و بهبود دانش بیمارستانی این انتظار را ایجاد کرده است که مجموعه این روش‌ها ابزاری برای رسیدن به ساختاری شبیه‌سازی‌شده و با عمل‌کرد متناسب در مقیاس بدن باشد.

مراجع

- [8] Zhang, J., Zheng, T., Alarçin, E., Byambaa, B., Guan, X., Ding, J., Zhang, Y. S., Li, Z., "Porous electrospun fibers with self-sealing functionality: An enabling strategy for trapping biomacromolecules", *Small*, Vol. 13, No. 47, p. 1701949, (2017).
- [9] Zhao, X., Sun, X., Yildirimer, L., Lang, Q., Lin, Z. Y. W., Zheng, R., Zhang, Y., Cui, W., Annabi, N., Khademhosseini, A., "Cell infiltrative hydrogel fibrous scaffolds for accelerated wound healing", *Acta biomaterialia*, Vol. 49, pp. 66-77, (2017).
- [10] Masoumi, N., Larson, B. L., Annabi, N., Kharaziha, M., Zamanian, B., Shapero, K. S., Cubberley, A. T., Camci-Unal, G., Manning, K. B., Mayer Jr, J. E., "Electrospun PGS: PCL microfibers align human valvular interstitial cells and provide tunable scaffold anisotropy", *Advanced healthcare materials*, Vol. 3, No. 6, pp. 929-939, (2014).
- [11] Tamayol, A., Najafabadi, A. H., Aliakbarian, B., Arab-Tehrany, E., Akbari, M., Annabi, N., Juncker, D., Khademhosseini, A., "Hydrogel templates for rapid manufacturing of bioactive fibers and 3D constructs", *Advanced healthcare materials*, Vol. 4, No. 14, pp. 2146-2153, (2015).
- [12] Onoe, H., Okitsu, T., Itou, A., Kato-Negishi, M., Gojo, R., Kiriya, D., Sato, K., Miura, S., Iwanaga, S., Kuribayashi-Shigetomi, K., "Metre-long cell-laden microfibrils exhibit tissue morphologies and functions", *Nature materials*, Vol. 12, No. 6, p. 584, (2013).
- [13] Agbolaghi, S., Mohammadi vash, A., "A Review on Nanofiber Scaffolds by Focusing on Constituents and Procedures", *Iran Journal of Chemical Engineering*, Vol. 20, No. 115, pp. 6-16, In Persian, (2021).
- [14] Ellis, M. J., Chaudhuri, J. B., "Poly (lactic-co-glycolic acid) hollow fibre membranes for use as a tissue engineering scaffold", *Biotechnology and bioengineering*, Vol. 96, No. 1, pp. 177-187, (2007).
- [15] Leng, L., McAllister, A., Zhang, B., Radisic, M., Günther, A., "Mosaic hydrogels: one-step formation of multiscale soft materials", *Advanced materials*, Vol. 24, No. 27, pp. 3650-3658, (2012).
- [16] Shi, X., Ostrovidov, S., Zhao, Y., Liang, X., Kasuya, M., Kurihara, K., Nakajima, K., Bae, H., Wu, H., Khademhosseini, A., "Microfluidic spinning of cell-responsive grooved microfibers", *Advanced Functional Materials*, Vol. 25, No. 15, pp. 2250-2259, (2015).
- [17] Choi, C.-H., Yi, H., Hwang, S., Weitz, D. A., Lee, C.-S., "Microfluidic fabrication of complex-shaped microfibers by liquid template-aided multiphase microflow", *Lab on a Chip*, Vol. 11, No. 8, pp. 1477-1483, (2011).
- [1] Portillo-Lara, R., Spencer, A. R., Walker, B. W., Sani, E. S., Annabi, N., "Biomimetic cardiovascular platforms for in vitro disease modeling and therapeutic validation", *Biomaterials*, Vol. 198, pp. 78-94, (2019).
- [2] Kaese, S., Verheule, S., "Cardiac electrophysiology in mice: a matter of size", *Frontiers in physiology*, Vol. 3, p. 345, (2012).
- [3] Ryan, A. J., Brougham, C. M., Garcarena, C. D., Kerrigan, S. W., O'Brien, F. J., "Towards 3D in vitro models for the study of cardiovascular tissues and disease", *Drug Discovery Today*, Vol. 21, No. 9, pp. 1437-1445, (2016).
- [4] Shah, R. R., "Can pharmacogenetics help rescue drugs withdrawn from the market?", (2006).
- [5] Pinnell, J., Turner, S., Howell, S., "Cardiac muscle physiology", *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care and Pain*, Vol. 7, No. 3, pp. 85-88, (2007).
- [6] Rouwkema, J., Khademhosseini, A., "Vascularization and angiogenesis in tissue engineering: beyond creating static networks", *Trends in biotechnology*, Vol. 34, No. 9, pp. 733-745, (2016).
- [7] Akbari, M., Tamayol, A., Annabi, N., Juncker, D.,

- [18] Jun, Y., Kang, E., Chae, S., Lee, S. -H., "Microfluidic spinning of micro-and nano-scale fibers for tissue engineering", *Lab on a Chip*, Vol. 14, No. 13, pp. 2145-2160, (2014).
- [19] Akbari, M., Tamayol, A., Laforte, V., Annabi, N., Najafabadi, A. H., Khademhosseini, A., Juncker, D., "Composite living fibers for creating tissue constructs using textile techniques", *Advanced functional materials*, Vol. 24, No. 26, pp. 4060-4067, (2014).
- [20] Wu, Y., Wang, L., Guo, B., Ma, P. X., "Interwoven aligned conductive nanofiber yarn/hydrogel composite scaffolds for engineered 3D cardiac anisotropy", *Acs Nano*, Vol. 11, No. 6, pp. 5646-5659, (2017).
- [21] Tamayol, A., Akbari, M., Annabi, N., Paul, A., Khademhosseini, A., Juncker, D., "Fiber-based tissue engineering: progress, challenges, and opportunities", *Biotechnology advances*, Vol. 31, No. 5, pp. 669-687, (2013).
- [22] Shapira-Schweitzer, K., Seliktar, D., "Matrix stiffness affects spontaneous contraction of cardiomyocytes cultured within a PEGylated fibrinogen biomaterial", *Acta biomaterialia*, Vol. 3, No. 1, pp. 33-41, (2007).
- [23] Cheng, J., Jun, Y., Qin, J., Lee, S. -H., "Electrospinning versus microfluidic spinning of functional fibers for biomedical applications", *Biomaterials*, Vol. 114, pp. 121-143, (2017).
- [24] Kai, D., Prabhakaran, M. P., Jin, G., Ramakrishna, S., "Guided orientation of cardiomyocytes on electrospun aligned nanofibers for cardiac tissue engineering", *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, Vol. 98, No. 2, pp. 379-386, (2011).
- [25] Breukers, R., Gilmore, K., Kita, M., Wagner, K., Higgins, M., Moulton, S., Clark, G. M., Officer, D., Kapsa, R., Wallace, G., "Creating conductive structures for cell growth: Growth and alignment of myogenic cell types on polythiophenes", *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, Vol. 95, No. 1, pp. 256-268, (2010).
- [26] Suhaeri, M., Subbiah, R., Kim, S.-H., Kim, C. -H., Oh, S. J., Kim, S.-H., Park, K., "Novel platform of cardiomyocyte culture and coculture via fibroblast-derived matrix-coupled aligned electrospun nanofiber", *ACS applied materials & interfaces*, Vol. 9, No. 1, pp. 224-235, (2016).
- [27] Ahmadi, P., Nazeri, N., Derakhshan, M. A., Ghanbari, H., "Preparation and characterization of polyurethane/chitosan/CNT nanofibrous scaffold for cardiac tissue engineering", *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 180, pp. 590-598, (2021).
- [28] Flaig, F., Ragot, H., Simon, A., Revet, G., Kitsara, M., Kitasato, L., Hebraud, A., Agbulut, O., Schlatter, G., "Design of functional electrospun scaffolds based on poly (glycerol sebacate) elastomer and poly (lactic acid) for cardiac tissue engineering", *ACS Biomaterials Science & Engineering*, Vol. 6, No. 4, pp. 2388-2400, (2020).
- [29] Engelmayer Jr, G. C., Cheng, M., Bettinger, C. J., Borenstein, J. T., Langer, R., Freed, L. E., "Accordion-like honeycombs for tissue engineering of cardiac anisotropy", *Nature materials*, Vol. 7, No. 12, p. 1003, (2008).
- [30] Kim, H. N., Jiao, A., Hwang, N. S., Kim, M. S., Kim, D. -H., Suh, K. -Y., "Nanotopography-guided tissue engineering and regenerative medicine", *Advanced drug delivery reviews*, Vol. 65, No. 4, pp. 536-558, (2013).
- [31] Trantidou, T., Rao, C., Barrett, H., Camelliti, P., Pinto, K., Yacoub, M., Athanasiou, T., Toumazou, C., Terracciano, C., Prodromakis, T., "Selective hydrophilic modification of Parylene C films: a new approach to cell micro-patterning for synthetic biology applications", *Biofabrication*, Vol. 6, No. 2, p. 025004, (2014).
- [32] Ma, Z., Wang, J., Loskill, P., Huebsch, N., Koo, S., Svedlund, F. L., Marks, N. C., Hua, E. W., Grigoropoulos, C. P., Conklin, B. R., "Self-organizing human cardiac microchambers mediated by geometric confinement", *Nature communications*, Vol. 6, p. 7413, (2015).
- [33] Castano, A., Hortigüela, V., Lagunas, A., Cortina, C., Montserrat, N., Samitier, J., Martinez, E., "Protein patterning on hydrogels by direct microcontact printing: application to cardiac differentiation", *RSC Advances*, Vol. 4, No. 55, pp. 29120-29123, (2014).
- [34] Agarwal, A., Farouz, Y., Nesmith, A. P., Deravi, L. F., McCain, M. L., Parker, K. K., "Micropatterning alginate substrates for in vitro cardiovascular muscle on a chip", *Advanced functional materials*, Vol. 23, No. 30, pp. 3738-3746, (2013).
- [35] McCain, M. L., Agarwal, A., Nesmith, H. W., Nesmith, A. P., Parker, K. K., "Micromolded gelatin hydrogels for extended culture of engineered cardiac tissues", *Biomaterials*, Vol. 35, No. 21, pp. 5462-5471, (2014).
- [36] Annabi, N., Tsang, K., Mithieux, S. M., Nikkhah, M., Ameri, A., Khademhosseini, A., Weiss, A. S., "Highly elastic micropatterned hydrogel for engineering functional cardiac tissue", *Advanced functional materials*, Vol. 23, No. 39, pp. 4950-4959, (2013).
- [37] Lind, J. U., Yadid, M., Perkins, I., O'Connor, B. B., Eweje, F., Chantre, C. O., Hemphill, M. A., Yuan, H., Campbell, P. H., Vlassak, J. J., "Cardiac microphysiological devices with flexible thin-film sensors for higher-throughput drug screening", *Lab on a Chip*, Vol. 17, No. 21, pp. 3692-3703, (2017).

- [38] Liao, B., Christoforou, N., Leong, K. W., Bursac, N., "Pluripotent stem cell-derived cardiac tissue patch with advanced structure and function", *Biomaterials*, Vol. 32, No. 35, pp. 9180-9187, (2011).
- [39] Brown, T. E., Anseth, K. S., "Spatiotemporal hydrogel biomaterials for regenerative medicine", *Chemical Society Reviews*, Vol. 46, No. 21, pp. 6532-6552, (2017).
- [40] Lee, S. -H., Moon, J. J., West, J. L., "Three-dimensional micropatterning of bioactive hydrogels via two-photon laser scanning photolithography for guided 3D cell migration", *Biomaterials*, Vol. 29, No. 20, pp. 2962-2968, (2008).
- [41] Aubin, H., Nichol, J. W., Hutson, C. B., Bae, H., Sieminski, A. L., Crokek, D. M., Akhyari, P., Khademhosseini, A., "Directed 3D cell alignment and elongation in microengineered hydrogels", *Biomaterials*, Vol. 31, No. 27, pp. 6941-6951, (2010).
- [42] Saini, H., Navaei, A., Van Putten, A., Nikkhah, M., "3D cardiac microtissues encapsulated with the co-culture of cardiomyocytes and cardiac fibroblasts", *Advanced healthcare materials*, Vol. 4, No. 13, pp. 1961-1971, (2015).
- [43] Karp, J. M., Yeo, Y., Geng, W., Cannizarro, C., Yan, K., Kohane, D. S., Vunjak-Novakovic, G., Langer, R. S., Radisic, M., "A photolithographic method to create cellular micropatterns", *Biomaterials*, Vol. 27, No. 27, pp. 4755-4764, (2006).
- [44] Sunyer, R., Jin, A. J., Nossal, R., Sackett, D. L., "Fabrication of hydrogels with steep stiffness gradients for studying cell mechanical response", *PloS one*, Vol. 7, No. 10, p. e46107, (2012).
- [45] Tong, X., Jiang, J., Zhu, D., Yang, F., "Hydrogels with dual gradients of mechanical and biochemical cues for deciphering cell-niche interactions", *ACS Biomaterials Science & Engineering*, Vol. 2, No. 5, pp. 845-852, (2016).
- [46] Choi, Y. S., Vincent, L. G., Lee, A. R., Kretchmer, K. C., Chirasatitsin, S., Dobke, M. K., Engler, A. J., "The alignment and fusion assembly of adipose-derived stem cells on mechanically patterned matrices", *Biomaterials*, Vol. 33, No. 29, pp. 6943-6951, (2012).
- [47] Rajendran, P. S., Nakamura, K., Ajjjola, O. A., Vaseghi, M., Armour, J. A., Ardell, J. L., Shivkumar, K., "Myocardial infarction induces structural and functional remodelling of the intrinsic cardiac nervous system", *The Journal of physiology*, Vol. 594, No. 2, pp. 321-341, (2016).
- [48] Yong, K. W., Li, Y., Huang, G., Lu, T. J., Safwani, W. K. Z. W., Pingguan-Murphy, B., Xu, F., "Mechanoregulation of cardiac myofibroblast differentiation: implications for cardiac fibrosis and therapy", *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, Vol. 309, No. 4, pp. H532-H542, (2015).
- [49] Justin, R. T., Engler, A. J., "Stiffness gradients mimicking in vivo tissue variation regulate mesenchymal stem cell fate", *PloS one*, Vol. 6, No. 1, pp. e15978, (2011).
- [50] Arcaute, K., Mann, B. K., Wicker, R. B., "Stereolithography of three-dimensional bioactive poly (ethylene glycol) constructs with encapsulated cells", *Annals of biomedical engineering*, Vol. 34, No. 9, pp. 1429-1441, (2006).
- [51] Gauvin, R., Chen, Y. -C., Lee, J. W., Soman, P., Zorlutuna, P., Nichol, J. W., Bae, H., Chen, S., Khademhosseini, A., "Microfabrication of complex porous tissue engineering scaffolds using 3D projection stereolithography", *Biomaterials*, Vol. 33, No. 15, pp. 3824-3834, (2012).
- [52] Xu, T., Zhao, W., Zhu, J. -M., Albanna, M. Z., Yoo, J. J., Atala, A., "Complex heterogeneous tissue constructs containing multiple cell types prepared by inkjet printing technology", *Biomaterials*, Vol. 34, No. 1, pp. 130-139, (2013).
- [53] Ozbolat, I. T., Hospodiuk, M., "Current advances and future perspectives in extrusion-based bioprinting", *Biomaterials*, Vol. 76, pp. 321-343, (2016).
- [54] Culver, J. C., Hoffmann, J. C., Poché, R. A., Slater, J. H., West, J. L., Dickinson, M. E., "Three-dimensional biomimetic patterning in hydrogels to guide cellular organization", *Advanced materials*, Vol. 24, No. 17, pp. 2344-2348, (2012).
- [55] Ali, M., Pages, E., Ducom, A., Fontaine, A., Guillemot, F., "Controlling laser-induced jet formation for bioprinting mesenchymal stem cells with high viability and high resolution", *Biofabrication*, Vol. 6, No. 4, pp. 045001, (2014).
- [56] Murphy, S. V., Atala, A., "3D bioprinting of tissues and organs", *Nature biotechnology*, Vol. 32, No. 8, pp. 773, (2014).
- [57] Jungst, T., Smolan, W., Schacht, K., Scheibel, T., Groll, J. R., "Strategies and molecular design criteria for 3D printable hydrogels", *Chemical reviews*, Vol. 116, No. 3, pp. 1496-1539, (2015).
- [58] Lee, V. K., Lanzi, A. M., Ngo, H., Yoo, S. -S., Vincent, P. A., Dai, G., "Generation of multi-scale vascular network system within 3D hydrogel using 3D bio-printing technology", *Cellular and molecular bioengineering*, Vol. 7, No. 3, pp. 460-472, (2014).
- [59] Jia, W., Gungor-Ozkerim, P. S., Zhang, Y. S., Yue, K., Zhu, K., Liu, W., Pi, Q., Byambaa, B., Dokmeci, M. R., Shin, S. R., "Direct 3D bioprinting of perfusable vascular constructs using a blend bioink", *Biomaterials*, Vol. 106, pp. 58-68, (2016).
- [60] Zhang, Y. S., Arneri, A., Bersini, S., Shin, S. -R., Zhu, K., Goli-Malekabadi, Z., Aleman, J., Colosi, C.,

- Busignani, F., Dell'Erba, V., "Bioprinting 3D microfibrinous scaffolds for engineering endothelialized myocardium and heart-on-a-chip", *Biomaterials*, Vol. 110, pp. 45-59, (2016).
- [61] Hinton, T. J., Jallerat, Q., Palchesko, R. N., Park, J. H., Grodzicki, M. S., Shue, H.-J., Ramadan, M. H., Hudson, A. R., Feinberg, A. W., "Three-dimensional printing of complex biological structures by freeform reversible embedding of suspended hydrogels", *Science advances*, Vol. 1, No. 9, p. e1500758, (2015).
- [62] Shin, S., Park, S., Park, M., Jeong, E., Na, K., Youn, H. J., Hyun, J., "Cellulose nanofibers for the enhancement of printability of low viscosity gelatin derivatives", *BioResources*, Vol. 12, No. 2, pp. 2941-2954, (2017).
- [63] Kang, H. -W., Lee, S. J., Ko, I. K., Kengla, C., Yoo, J. J., Atala, A., "A 3D bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity", *Nature biotechnology*, Vol. 34, No. 3, pp. 312, (2016).
- [64] Sung, H.-J., Meredith, C., Johnson, C., Galis, Z. S., "The effect of scaffold degradation rate on three-dimensional cell growth and angiogenesis", *Biomaterials*, Vol. 25, No. 26, pp. 5735-5742, (2004).
- [65] Discher, D. E., Janmey, P., Wang, Y.-I., "Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate", *Science*, Vol. 310, No. 5751, pp. 1139-1143, (2005).
- [66] Shin, Y. J., Shafrank, R. T., Tsui, J. H., Walcott, J., Nelson, A., Kim, D.-H., "3D bioprinting of mechanically tuned bioinks derived from cardiac decellularized extracellular matrix", *Acta Biomaterialia*, Vol. 119, pp. 75-88, (2021).
- [67] Sukmana, I., "Microvascular guidance: a challenge to support the development of vascularised tissue engineering construct", *The Scientific World Journal*, Vol. 2012, (2012).
- [68] Lee, V. K., Kim, D. Y., Ngo, H., Lee, Y., Seo, L., Yoo, S. -S., Vincent, P. A., Dai, G., "Creating perfused functional vascular channels using 3D bio-printing technology", *Biomaterials*, Vol. 35, No. 28, pp. 8092-8102, (2014).
- [69] Cui, X., Boland, T., "Human microvasculature fabrication using thermal inkjet printing technology", *Biomaterials*, Vol. 30, No. 31, pp. 6221-6227, (2009).
- [70] Kim, J. A., Kim, H. N., Im, S.-K., Chung, S., Kang, J. Y., Choi, N., "Collagen-based brain microvasculature model in vitro using three-dimensional printed template", *Biomicrofluidics*, Vol. 9, No. 2, p. 024115, (2015).
- [71] Muscari, C., Giordano, E., Bonafè, F., Govoni, M., Guarnieri, C., "Strategies affording prevascularized cell-based constructs for myocardial tissue engineering", *Stem cells international*, Vol. 2014, (2014).
- [72] Bogorad, M. I., DeStefano, J., Karlsson, J., Wong, A. D., Gerecht, S., Searson, P. C., "in vitro microvessel models", *Lab on a Chip*, Vol. 15, No. 22, pp. 4242-4255, (2015).
- [73] West, J. L., Moon, J. J., "Vascularization of engineered tissues: approaches to promote angiogenesis in biomaterials", *Current topics in medicinal chemistry*, Vol. 8, No. 4, pp. 300-310, (2008).
- [74] Yang, P., Huang, X., Shen, J., Wang, C., Dang, X., Mankin, H., Duan, Z., Wang, K., "Development of a new pre-vascularized tissue-engineered construct using pre-differentiated rADSCs, arteriovenous vascular bundle and porous nano-hydroxyapatite-polyamide 66 scaffold", *BMC musculoskeletal disorders*, Vol. 14, No. 1, p. 318, (2013).
- [75] Zhu, W., Qu, X., Zhu, J., Ma, X., Patel, S., Liu, J., Wang, P., Lai, C. S. E., Gou, M., Xu, Y., "Direct 3D bioprinting of prevascularized tissue constructs with complex microarchitecture", *Biomaterials*, Vol. 124, pp. 106-115, (2017).
- [76] Miller, J. S., Stevens, K. R., Yang, M. T., Baker, B. M., Nguyen, D.-H. T., Cohen, D. M., Toro, E., Chen, A. A., Galie, P. A., Yu, X., "Rapid casting of patterned vascular networks for perfusable engineered three-dimensional tissues", *Nature materials*, Vol. 11, No. 9, pp. 768-774, (2012).
- [77] Mirabella, T., MacArthur, J., Cheng, D., Ozaki, C., Woo, Y., Yang, M., Chen, C., "3D-printed vascular networks direct therapeutic angiogenesis in ischaemia", *Nature biomedical engineering*, Vol. 1, No. 6, p. 0083, (2017).
- [78] Gelber, M., Hurst, G., Comi, T., Bhargava, R., "Model-guided design and characterization of a high-precision 3D printing process for carbohydrate glass", *Additive Manufacturing*, Vol. 22, pp. 38-50, (2018).
- [79] Xu, C., Lee, W., Dai, G., Hong, Y., "Highly elastic biodegradable single-network hydrogel for cell printing", *ACS applied materials & interfaces*, Vol. 10, No. 12, pp. 9969-9979, (2018).
- [80] Kolesky, D. B., Truby, R. L., Gladman, A. S., Busbee, T. A., Homan, K. A., Lewis, J. A., "3D bioprinting of vascularized, heterogeneous cell-laden tissue constructs", *Advanced materials*, Vol. 26, No. 19, pp. 3124-3130, (2014).
- [81] Kolesky, D. B., Homan, K. A., Skylar-Scott, M. A., Lewis, J. A., "Three-dimensional bioprinting of thick vascularized tissues", *Proceedings of the national academy of sciences*, Vol. 113, No. 12, pp. 3179-3184, (2016).
- [82] Bertassoni, L. E., Cecconi, M., Manoharan, V., Nikkhah, M., Hjortnaes, J., Cristino, A. L., Barabaschi, G., Demarchi, D., Dokmeci, M. R., Yang,

- Y., "Hydrogel bioprinted microchannel networks for vascularization of tissue engineering constructs", *Lab on a Chip*, Vol. 14, No. 13, pp. 2202-2211, (2014).
- [83] Suntornnond, R., Tan, E. Y. S., An, J., Chua, C. K., "A highly printable and biocompatible hydrogel composite for direct printing of soft and perfusable vasculature-like structures", *Scientific reports*, Vol. 7, No. 1, p. 16902, (2017).
- [84] Zhao, X., Liu, L., Wang, J., Xu, Y., Zhang, W., Khang, G., Wang, X., "In vitro vascularization of a combined system based on a 3D printing technique", *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, Vol. 10, No. 10, pp. 833-842, (2016).
- [85] Mirdamadi, E., Tashman, J. W., Shiwarski, D. J., Palchesko, R. N., Feinberg, A. W., "FRESH 3D bioprinting a full-size model of the human heart", *ACS Biomaterials Science & Engineering*, Vol. 6, No. 11, pp. 6453-6459, (2020).
- [86] Xu, C., Chai, W., Huang, Y., Markwald, R. R., "Scaffold-free inkjet printing of three-dimensional zigzag cellular tubes", *Biotechnology and bioengineering*, Vol. 109, No. 12, pp. 3152-3160, (2012).
- [87] Visser, C. W., Kamperman, T., Karbaat, L. P., Lohse, D., Karperien, M., "In-air microfluidics enables rapid fabrication of emulsions, suspensions, and 3D modular (bio) materials", *Science advances*, Vol. 4, No. 1, p. eaao1175, (2018).