

## The Application of 3D Bioprinting Technology in the Treatment of Spinal Cord Lesions

Arash Abdolmaleki<sup>1</sup>, Leila Taghizadeh Momen<sup>2</sup>, Asadollah Asadi<sup>2\*</sup>, Shukur Wasman Smail<sup>3,4</sup><sup>1</sup>Department of Bioinformatics, Faculty of Advanced Technologies, University of Mohaghegh Ardabili, Namin, Iran<sup>2</sup>Department of Biology, Faculty of Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran<sup>3</sup>Department of Medical Microbiology, College of Science, Cihan University-Erbil, Kurdistan Region, Iraq<sup>4</sup>Department of Biology, College of Science, Salahaddin University-Erbil, Kurdistan Region, Iraq

## Article Info:

Received: 25 Sep 2023

Revised: 14 Dec 2023

Accepted: 18 Dec 2023

## ABSTRACT

**Introduction:** Spinal cord injury is a disease related to the central nervous system that leads to impaired sensory and motor functions, loss of axon, cell body and glial cell support. Currently, the treatment of spinal injuries is limited to physiotherapy, occupational therapy, and surgery. However, current treatment methods cannot fully and effectively regenerate damaged nerve fibers and improve nerve function. Neural tissue engineering has focused on building biomimetic scaffolds inspired by the complex structure of the spinal cord together with cells to repair spinal cord lesions. In recent years, the 3D bioprinting technique has been used to make highly specialized and complex biological models, such as the spinal cord. Bioprinting is done by placing bioink on a substrate in layers. The additive approach of bioprinting enables the construction of fine 3D tissue models with precise control over the spatial position of cells. **Conclusion:** The application of 3D bioprinting technology in the field of making cell-rich scaffolds and in vivo studies in spinal cord injury models indicate the bright prospects of this technology in the field of treating spinal lesions. However, to completely simulate the spinal cord tissue and improve the nerve function of the spinal cord after injury, it is necessary to conduct more research with different cells, biomaterials, and spinal cord injury models. In this review article, the method of 3D bioprinting, the types of printing techniques in spinal cord tissue engineering, and the studies conducted in line with the application of bioprinting in the treatment of spinal cord injuries are discussed.

## Keywords:

1. Bioprinting
2. Spinal Cord Injuries
3. Tissue Engineering

\*Corresponding Author: Asadollah Asadi

Email: asad.asady@gmail.com

## کاربرد فناوری چاپ زیستی سه بعدی در درمان ضایعات طناب نخاعی

آرش عبدالملکی<sup>۱</sup>، لیلا تقی زاده مومن<sup>۲</sup>، اسداله اسدی<sup>۳\*</sup>، شوکور واسمن اسماعیل<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup>گروه بیوانفورماتیک، دانشکده فناوری‌های نوین، دانشگاه محقق اردبیلی، نمین، ایران  
<sup>۲</sup>گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران  
<sup>۳</sup>گروه میکروبیولوژی پزشکی، دانشکده علوم، دانشگاه جهان اربیل، منطقه کردستان، عراق  
<sup>۴</sup>گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه صلاح الدین اربیل، منطقه کردستان، عراق

## اطلاعات مقاله:

پذیرش: ۲۷ آذر ۱۴۰۲

اصلاحیه: ۲۳ آذر ۱۴۰۲

دریافت: ۳ مهر ۱۴۰۲

## چکیده

**مقدمه:** آسیب طناب نخاعی یک بیماری مرتبط با سیستم عصبی مرکزی است که منجر به اختلال در عملکردهای حسی و حرکتی، از دست دادن آکسون، جسم سلولی و پشتیبانی سلول‌های گلیال می‌شود. در حال حاضر، درمان آسیب‌های نخاعی محدود به فیزیوتراپی، کاردرمانی و جراحی است. با این حال، روش‌های درمانی فعلی نمی‌توانند به طور کامل و مؤثر رشته‌های عصبی آسیب دیده را بازسازی کرده و عملکرد عصب را بهبود بخشند. مهندسی بافت عصبی متمرکز بر ساخت داربست‌های بیومیمتیک الهام گرفته از ساختار پیچیده نخاع به همراه سلول‌ها در جهت ترمیم ضایعات نخاعی می‌باشد. در سال‌های اخیر، از روش چاپ زیستی سه بعدی برای ساخت مدل‌های زیستی بسیار تخصصی و پیچیده مانند نخاع استفاده شده است. چاپ زیستی با قرار دادن جوهر زیستی بر روی یک بستر به صورت لایه لایه انجام می‌شود. رویکرد افزودنی چاپ زیستی امکان ساخت مدل‌های بافتی سه بعدی ظریف را با کنترل دقیق بر موقعیت مکانی سلول‌ها فراهم می‌کند. **نتیجه‌گیری:** استفاده از فناوری چاپ زیستی سه بعدی در زمینه ساخت داربست‌های غنی از سلول و مطالعات درون تنی در مدل‌های آسیب طناب نخاعی نشان‌دهنده چشم‌انداز روشن این فناوری در زمینه درمان ضایعات نخاعی است. با این حال، برای شبیه‌سازی کامل بافت نخاع و بهبود عملکرد عصبی نخاع پس از آسیب، لازم است تحقیقات بیشتری با سلول‌ها، بیومواد و مدل‌های آسیب نخاعی مختلف انجام شود. در مقاله مروری حاضر، به روش چاپ زیستی سه بعدی، انواع تکنیک‌های چاپ در مهندسی بافت طناب نخاعی و مطالعات انجام شده در راستای کاربرد چاپ زیستی در درمان ضایعات طناب نخاعی پرداخته شده است.

## واژه‌های کلیدی:

- ۱- چاپ زیستی
- ۲- آسیب طناب نخاعی
- ۳- مهندسی بافت

\*نویسنده مسئول: اسداله اسدی

پست الکترونیک: asad.asady@gmail.com

## مقدمه

طناب نخاعی<sup>۱</sup> یک بخش جدایی‌ناپذیر از سیستم عصبی مرکزی<sup>۲</sup> با ساختاری استوانه‌ای و کشیده است که از بصل‌النخاع<sup>۳</sup> در ساقه مغز<sup>۴</sup>، تا ناحیه کمر در ستون مهره‌ها امتداد یافته است. آسیب طناب نخاعی (SCI)<sup>۵</sup> ارتباط بین قسمت‌های مختلف بدن و مغز را مختل کند و منجر به نقص در حس، حرکت، تنظیم خودکار و مرگ شود. تصادفات رانندگی، اعمال خشونت آمیز، سقوط و آسیب‌های ورزشی بیشتر آسیب‌ها را تشکیل می‌دهند. SCI بر کیفیت زندگی بیماران تأثیر می‌گذارد، خانواده‌ها را تحت فشار قرار می‌دهد و تأثیرات اجتماعی-اقتصادی بر سیستم‌های مراقبت‌های بهداشتی در سراسر جهان ایجاد می‌کند (۱). نشانه‌های بالینی SCI به شدت و محل ضایعه بستگی دارد و ممکن است شامل از دست دادن جزئی یا کامل عملکرد حسی و یا حرکتی زیر سطح آسیب باشد. ضایعات قفسه سینه تحتانی می‌تواند باعث پاراپلژی<sup>۶</sup> شود در حالی که ضایعات در سطح گردنی با کوادری پلژی<sup>۷</sup> همراه است (۲، ۳). SCI معمولاً سطح گردنی نخاع را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۵۰ درصد). سایر آسیب‌ها شامل سطح قفسه سینه (۳۵ درصد) و ناحیه کمر (۱۱ درصد) است (۴). در حال حاضر، درمان بالینی آسیب نخاعی به طور عمده به درمان غیر جراحی و درمان جراحی تقسیم می‌شود. یکی از درمان‌های غیر جراحی برای SCI ها، شوک درمانی پس از آسیب با دوزهای بیش از حد متیل پردنیزولون (MP) است. MP یک کورتیکواستروئید است که منجر به مهار پراکسیداسیون لیپیدی، مهار رادیکال‌های آزاد، محدود کردن پاسخ التهابی، حفاظت از سد خونی نخاع و افزایش جریان خون به نخاع آسیب دیده می‌شود (۵). با این حال، از آنجایی که مزایای درمانی آن نیز بحث برانگیز است- از جمله افزایش خطرات عفونت‌های مجاری ادراری، تنفسی و زخم- این عوارض، استفاده از آن را محدود می‌کند (۶). مطالعات مختلف نشان دادند که تجویز درمان‌های فعلی SCI مانند داروها، ایمپلنت‌های عصبی، سلول‌های بنیادی، عمل‌های جراحی برای تثبیت نخاع و جلوگیری از آسیب‌های آینده، برداشتن فشار از نخاع و مراقبت‌های پزشکی توانبخشی باعث کاهش التهاب عصبی، رشد آکسونی، افزایش میلین و کاهش اندازه حفره می‌شوند (۷). با این حال، استراتژی‌های درمانی فعلی می‌توانند تنها برای مدت کوتاهی کمک کنند و نتوانند به طور کامل بر اثرات مضر SCI غلبه کنند (۸).

پیشرفت‌های اخیر در نانو تکنولوژی و مهندسی بافت، راهبردهای موثری را برای ترمیم بیماری‌های سیستم عصبی مرکزی ارائه می‌دهد. مهندسی بافت عصبی

متمرکز بر بهبود محیط مناسب جهت اتصال داربست بیومیمتیک با سلول‌ها برای ترمیم و بازایی عملکرد بافت عصبی می‌باشد. پشتیبانی فیزیکی جهت بازسازی موفقیت آمیز اعصاب توسط داربست سه بعدی و مواد داربست مانند انجام می‌گیرد (۹، ۱۰). ویژگی‌های یک داربست ایده آل در مهندسی بافت عصبی شامل: (۱) زیست سازگاری، تجزیه پذیری زیستی، توانایی انتقال پیام عصبی و رسانای الکتریکی بودن، خواص مکانیکی مناسب و تقلید از ویژگی‌های ماتریکس خارج سلولی (ECM)<sup>۸</sup> بافت طبیعی در رگ‌زایی، پراکنش سلول‌ها، مبادله مواد غذایی و خروج مواد زائد می‌باشد (۱۱). روش‌های به کار گرفته شده برای تولید داربست‌های سه‌بعدی ساخته‌شده از پلیمرهای مصنوعی و طبیعی، مانند تکنیک الکتروریسی و جداسازی گاز، نمی‌توانند شکل داربست یا پیکربندی کانال داخلی و اندازه منافذ را دقیق تنظیم کنند (۱۲). علاوه بر این، این تکنیک‌ها به دلیل شرایط سخت پردازش نمی‌توانند اجازه ساخت داربست حاوی سلول را بدهند. اخیراً روش‌های چاپ زیستی سه‌بعدی مورد توجه قرار گرفته‌اند که به راحتی می‌توانند ابعاد و شکل داربست سه‌بعدی را تنظیم کنند و داربست را همراه با سلول بسازند (۱۳).

چاپ زیستی از فناوری چاپ سه بعدی برای قرار دادن جوهر زیستی یا بیومتریال بر روی یک بستر جامد، ژل و یا مخزن مایع تعریف شده است. با استفاده از این فناوری، ساختارهای بیولوژیکی که از ویژگی‌های بافت/اندام طبیعی تقلید می‌کنند، ساخته می‌شوند (۱۴). در چاپ زیستی سه بعدی از برنامه طراحی به کمک رایانه (CAD<sup>۹</sup>) و نرم‌افزار تقسیم بندی برای لایه بندی متوالی تصاویر پزشکی دو بعدی (مانند: CT، MRI و غیره) در مدل‌های سه بعدی ذخیره شده به عنوان فایل‌های دیجیتال (به‌عنوان مثال: STL، AMF) استفاده می‌شود (۱۵). با توسعه چاپ سه بعدی، بسیاری از محققان بر روی امکان پذیر ترمیم SCI با استفاده از این تکنیک تمرکز کرده‌اند. در این تکنیک بر اساس نوع SCI بیمار، داربست شخصی سازی شده با استفاده از ترکیب چاپ سه بعدی و تصاویر سه بعدی ساخته می‌شود. در نتیجه، ساختار بافت چاپ شده با ریزمحیط آسیب مطابقت خواهد داشت (۱۶). در عین حال، چاپ سه بعدی منجر به بازسازی آکسون‌ها و تشکیل سیناپس بین آن‌ها می‌گردد تا بازسازی مسیرهای عصبی در نخاع و تشکیل شبکه‌های عصبی را تقویت کند (۱۷). سرعت تشکیل نمونه‌های آزمایشگاهی مرتبط با ترمیم SCI در چاپ زیستی در مقایسه با سایر رویکردهای مهندسی بافت بالاتر است. همچنین مدل‌های آزمایشگاهی ساخته شده با چاپ زیستی، به‌عنوان شبیه سازهای قبل از عمل، کاربرد

<sup>۱</sup> Spinal cord

<sup>۲</sup> Central nervous system (CNS)

<sup>۳</sup> Medulla Oblongata

<sup>۴</sup> Brainstem

<sup>۵</sup> Spinal cord injury

<sup>۶</sup> Paraplegia

<sup>۷</sup> Quadriplegia

<sup>۸</sup> Extra cellular matrix

<sup>۹</sup> Computer-aided design

در ساخت داربست، منجر به دقیق تر شدن ریزساختار داربست‌ها، از نظر ویژگی‌های آناتومیکی، و چسبندگی دقیق تر سلول‌ها و مواد زیستی می‌شود (۲۶). از نظر تکنیکی، امکان ساخت سیستم‌های بافتی پیچیده‌تر بر اساس تصاویر پزشکی، کنترل بیشتر متخصصان بر روی قرارگیری درست و دقیق سلول‌ها و زیست‌مواد، امکان سفارشی‌سازی ویژگی‌های آناتومیکی کلیدی درون ماکت بافتی که منجر به بهبود رگ‌زایی، پرفیوژن و ارتباطات سلولی می‌شود و در نتیجه امکان تشکیل بافت‌های بزرگ‌تر از دیگر مزایای کاربرد فناوری چاپ زیستی سه بعدی هستند (۲۷، ۲۴، ۲۰). خطرات رد پیوند و پاسخ ایمنی بیمار در برابر پیوند ساختار زیستی حاصل فناوری چاپ زیستی سه بعدی از طریق استفاده از سلول‌های بنیادی نشأت گرفته از مغز استخوان یا چربی خود بیمار بسیار کاهش می‌یابد (۲۸). به طور کلی، کاربرد چاپ زیستی سه بعدی به منظور بازسازی بافت باعث بهبود دقت با توجه به مورفولوژی، آناتومی، تخلخل و سایر ویژگی‌های بافت بازسازی‌شده می‌شود.

#### فرآیند چاپ زیستی سه بعدی

فرآیند چاپ زیستی سه بعدی را می‌توان در سه مرحله اصلی توصیف کرد: (۱) پیش از پردازش - ساخت مدل دیجیتالی سه بعدی برای چاپ، (۲) پردازش - ایجاد جوهر زیستی و انجام فرآیند چاپ زیستی و (۳) پس از پردازش - تثبیت و بلوغ مدل سه بعدی چاپ شده زیستی (مراجعه به تصویر ۱) (۲۹، ۲۱، ۲۰).

در مرحله پیش از پردازش، ابتدا تصویربرداری از توموگرافی بافت مورد نظر با استفاده از روش‌های تصویربرداری دوبعدی مرسوم مانند MRI و CT به دست می‌آید. سپس، طراحی مدل سه بعدی با استفاده از نرم‌افزار CAD انجام شده و به فرمت فایل STL تبدیل می‌شود (۲۰). مرحله پردازش شامل چاپ واقعی و ساخت مدل سه بعدی با انتخاب روش چاپ و همچنین جوهر زیستی متشکل از مواد زیستی و رده سلولی مورد نظر می‌باشد. ۳ فناوری چاپ زیستی متداول شامل چاپ زیستی جوهرافشان<sup>۱۰</sup>، چاپ زیستی با کمک لیزر<sup>۱۱</sup> و چاپ زیستی مبتنی بر اکستروژن<sup>۱۲</sup> می‌باشد (۲۷). به طور کلی، هر روش دارای مزایا و محدودیت‌های خاص خود است. قبل از تصمیم‌گیری در مورد روش چاپ زیستی، درک ویژگی‌های کلیدی بافت در حال بازسازی و همچنین خواص هر چاپگر زیستی مهم است. تولید جوهر زیستی یک مرحله چالش برانگیز در فرآیند چاپ زیستی است، زیرا عملکرد کلی ساختار بافت را تعیین می‌کند. جوهرهای زیستی از دو جزء اصلی تشکیل شده‌اند: مواد زیستی و سلول‌ها (۳۰). در انتخاب این اجزا باید توانایی مقاومت در برابر نیروها در

داشته و منجر به ترمیم دقیق‌تر و موثرتر SCI می‌گردند (۱۸). در نتیجه، فناوری چاپ زیستی سه بعدی، با دارا بودن پتانسیل تولید بافت شخصی‌سازی شده، رویکرد درمانی جدیدی را برای بازسازی SCI ارائه می‌کند.

در مقاله مروری حاضر، به بررسی کاربرد تکنیک چاپ زیستی سه بعدی در جهت درمان SCI و چگونگی عملکرد آن در پیشرفت مهندسی بافت عصبی می‌پردازیم. در ابتدا به کلیات چاپ زیستی سه بعدی و انواع روش‌های انجام آن خواهیم پرداخت و در ادامه پژوهش‌های مرتبط با چاپ زیستی در درمان SCI را معرفی می‌کنیم.

#### چاپ زیستی سه بعدی

##### تعریف چاپ زیستی سه بعدی و مزیت‌های آن

فناوری چاپ سه بعدی در بسیاری از زیرشاخه‌های پزشکی از جمله برنامه‌ریزی برای جراحی، مدل‌سازی آموزشی و ساخت دستگاه‌های پزشکی قابل کاشت مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۹). در چاپ سه بعدی معمولی از یک ماده غیر زیستی مانند پودرها یا ژل‌ها برای ایجاد شی چاپ شده سه بعدی استفاده می‌شود. در مقابل، به فرآیندی که در آن از مواد زیستی و سلول‌های زنده (جوهر زیستی) جهت چاپ سه بعدی ساختار استفاده گردد، چاپ زیستی می‌گویند (۱۹، ۲۰). کاربرد فناوری چاپ زیستی سه بعدی در جهت مونتاژ کردن سلول‌های زنده، مواد زیستی و بیوشیمیایی در ساختارهای بافت مانند عملکردی مورد مطالعه پژوهشگران قرار می‌گیرد (۲۱). شکل‌گیری این فناوری از طریق ساخت اولین داربست‌های چاپ سه بعدی و به دنبال آن کشت سلول‌ها در آن‌ها به طور همزمان انجام شده است (۲۲). پس از کاشت ساختارهای بیولوژیکی مملو از سلول، چاپ زیستی سه بعدی امکان یکپارچه‌سازی بافت مهندسی شده با بافت طبیعی و در نتیجه بازسازی بافت طبیعی و عملکرد اندام را فراهم می‌کند (۲۳، ۲۱).

با وجود موفقیت‌هایی که در کاربست روش‌های مرسوم مهندسی بافت وجود دارد، محدودیت‌های آن‌ها همچون ساخت داربست نامناسب در مقایسه با آناتومی بافت طبیعی، محدودیت در مواد زیستی قابل تحویل، برهم‌کنش‌های نامناسب بین رده‌های سلولی مختلف، زیست ناسازگاری و واکنش‌های ایمنی نامطلوب، باعث شده‌اند تا پژوهشگران به دنبال تکنیکی باشند تا محدودیت‌های ذکر شده را برطرف کند (۲۴، ۱۹، ۲۵).

چاپ زیستی سه بعدی نسبت به روش‌های متداول مهندسی بافت مزایای بیشتر را از خود نشان داده است. چاپ زیستی سه بعدی شرایطی را برای خودکارت‌ر کردن فرآیند و دقت و شخصی‌سازی بیشتر آن فراهم کرده است (۲۰). به علاوه، استفاده از چاپ زیستی سه بعدی

<sup>10</sup> Inkjet bioprinting

<sup>11</sup> Laser-assisted bioprinting

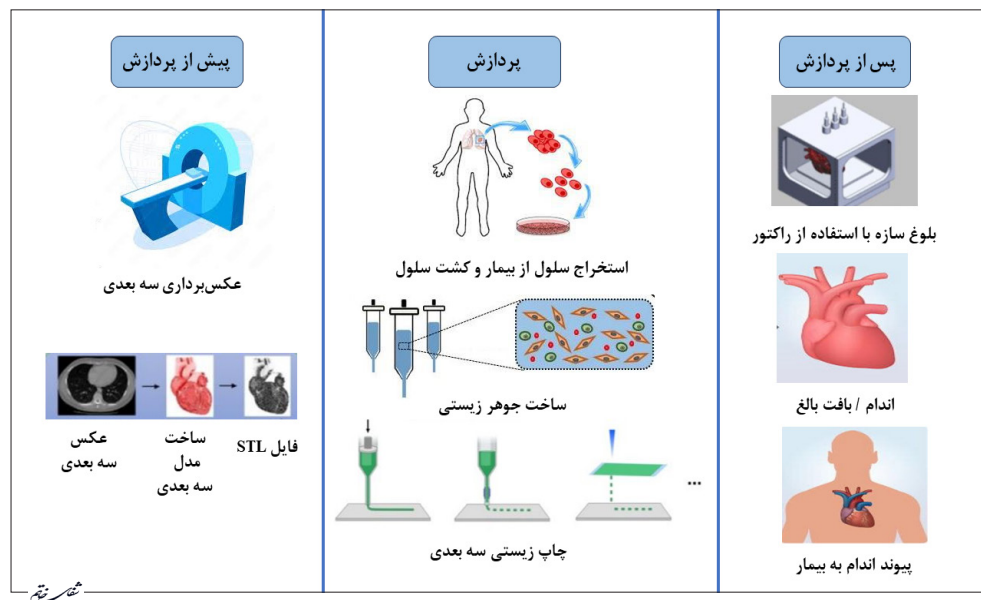
<sup>12</sup> Extrusion-based bioprinting

## تکنیک‌های چاپ زیستی سه بعدی در مهندسی بافت نخاعی

### چاپ زیستی مبتنی بر اکستروژن

در میان تمام تکنیک‌های چاپ زیستی سه بعدی موجود، چاپ مبتنی بر اکستروژن به شکل گسترده تری مورد استفاده قرار گرفته است. در این تکنیک، جوهر زیستی از یک میکرو نازل خارج شده و بر روی بستر قرار می‌گیرد (۴۰). میکرو نازل وسیله‌ای شبیه به سرنگ است که از دستورالعمل‌های خاصی برای جایگذاری مواد بر روی بستر به شکل مهره‌ها استفاده می‌کند. ابتدا مهره‌ها در جهت X-Y قرار گرفته و پس از آن سر نازل در امتداد محور Z حرکت می‌کند تا یک ساختار سه بعدی پیچیده ایجاد شود. دستگاه به طور مداوم و پیوسته مواد را از نازل بیرون می‌کشد و ساختارهای زیستی سه بعدی را لایه به لایه ایجاد می‌کند (۴۱). در این روش، جوهر زیستی باید باید دارای خاصیت الاستیکی بالا و چاپ‌پذیری آسان باشد تا به راحتی از نازل خارج شود و شکل و خواص مکانیکی خود را پس از خروج از نازل حفظ نماید (۴۲). مهم‌ترین روش‌های چاپ اکستروژن، سیستم‌های توزیع پنوماتیک و مکانیکی (پیستونی یا پیچ) هستند. راه‌اندازی سیستم با رسوبدهی پیستونی، منجر به کنترل گسترده سرریز جوهر زیستی می‌شود، در حالی که سیستم‌های پیچی کنترل فضایی خوبی را امکان‌پذیر کرده و برای

چاپ زیستی؛ زیست سازگاری، زیست تخریب پذیری، ویژگی‌های مکانیکی و یکپارچگی ساختاری در نظر گرفته شوند (۳۱). مواد زیستی به عنوان بستری برای حمایت از سلول‌های لانه‌سازی شده جهت چسبندگی، تکثیر و عملکرد مناسب آن‌ها عمل می‌کنند (۳۲). سه گروه از بیومواد شامل، پلیمرهای طبیعی، پلیمرهای مصنوعی و سرامیک بیشترین کاربرد را در مهندسی بافت دارند (۹). در انتخاب رده سلولی مناسب برای جوهرزیستی به معیارهایی از جمله منبع سلول، عملکرد بافت مورد نظر، تعداد و زنده ماندن سلول‌ها توجه می‌شود (۳۳). سلول‌های بنیادی، به دلیل توانایی تکثیر سلولی تقریباً نامحدود، رایج‌ترین رده سلولی اولیه به کار برده شده در بازسازی بافت هستند (۳۴). در نهایت، در مرحله پس از پردازش، چاپ شده زیستی، قبل از کاشت در داخل بدن و تا رسیدن به بلوغ، در شرایط آزمایشگاهی نگهداری می‌شود (۳۵). در این مرحله، جهت فراهم آوردن شرایط محیطی شبیه به شرایط داخل بدن، تامین مواد مغذی و تحریک شیمیایی و فیزیکی مورد نیاز برای تمایز و بلوغ سلول‌ها از بیوراکتورها استفاده می‌شود (۳۶، ۳۲). انواع مختلفی از بیوراکتورها از جمله سیستم‌های استاتیک<sup>۱۳</sup> و بیوراکتورهای پرفیوژن<sup>۱۴</sup> وجود دارند (۳۷) و تفاوت اصلی بین آن‌ها مربوط به سرعت جریانی است که منجر به تفاوت در انتشار مواد مغذی و انتقال تنش به ساختار بافت می‌گردد (۳۸).



تصویر ۱- مراحل فرایند چاپ زیستی سه بعدی در سه بخش پیش از پردازش، پردازش و پس از پردازش

<sup>13</sup> Static systems

<sup>14</sup> Perfusion bioreactors



زیستی، زنده‌مانی یا عملکرد بافت پستانداران پس از چاپ ندارد. سرعت چاپ در این تکنیک بالاست و قدرت وضوح آن بین ۲۰ تا ۱۰۰ میکرومتر می‌باشد. به علاوه، توانایی چاپ قطرات در حجم پیکولیتتر جهت دستیابی به وضوح بالاتر را دارد. در چاپ جوهر افشان پیزوالکتریک، قطرات با اعمال یک محرک پیزوالکتریک تشکیل می‌شوند. ولتاژ اعمال شده، کریستال پیزوالکتریک جای گرفته در سر چاپگر را تحریک می‌کند. سرعت و ابعاد قطرات خارج شده با تغییر عواملی مانند زمان، پالس و دامنه قابل کنترل می‌باشد. در مقایسه با چاپ حرارتی، چاپ پیزوالکتریک؛ به دلیل عدم حضور گرما، آسیب کمتری به سلول‌ها وارد کرده و در نتیجه بقای سلولی بالاتر می‌رود (۴۹). چاپ زیستی جوهرافشان فرآیند ساده‌ای را برای چاپ انواع مختلفی از سلول‌های ارائه می‌دهد و برای چاپ ساختارهای بافتی نازک مانند برش‌های مغز مفید می‌باشد. در حال حاضر، کاربرد این روش برای چاپ زیستی طناب نخاعی چالش برانگیز است؛ زیرا روش جوهر افشان نمی‌تواند ساختارهایی با دقت پیچیده تولید کند و به دلیل ناپیوسته بودن خروج قطرات از نازل، ساخت داربست‌های پر از سلول یا داربست‌های زنده نیز دشوار است (۵۰).

#### استریولیتوگرافی

روش استریولیتوگرافی<sup>۱۵</sup> (SLA) از یک لیزر ماوراء بنفش و یا نور مرئی تشکیل شده است که لیزر را بر روی مخزنی از یک هیدروژل یا رزین حساس به نور متمرکز می‌کند. در این روش چاپ، از نور ماوراء بنفش یا نور مرئی برای تشکیل پیوندهای کووالانسی در جوهر زیستی برای تشکیل پیوند عرضی بدون ایجاد سمیت قابل توجه در سلول‌ها استفاده می‌شود. با غوطه‌ور شدن صفحه چاپ در مخزن مایع توسط لیزر و تغییر حرکت آن از بالا به پایین، لایه‌ها در جهت پایین به بالا ساخته می‌شوند (۵۱). چاپگرهای زیستی SLA محدودیتی در ویسکوزیته سلول ندارد و وضوح چاپ بسیار بالایی را با در نظر گرفتن عواملی مانند قدرت لیزر، مدت زمان در معرض لیزر بودن، اندازه نقطه لیزری و مقدار طول موج نور ارائه می‌کنند. با این حال، روش SLA تا حدودی کند، پرهزینه و دارای قابلیت استفاده از انواع محدودی از مواد برای کاربردهای چاپ سه بعدی دارد. ضخامت هر لایه به انرژی منبع نور و مدت زمان در معرض قرار گرفتن آن بستگی دارد (۵۲). با این روش می‌توان مواد پلیمری حساس به نور، با قابلیت پلیمریزاسیون به مواد بستری نرم، که عموماً دارای نشانه‌های مکانیکی مشابه انواع بافت عصبی هستند، چاپ کرد؛ در نتیجه به تمایز سلول‌های کشت داده شده به سلول‌های عصبی کمک می‌کند (۵۳). با وجود اینکه اشعه ماوراء بنفش یک روش رایج در پلیمریزاسیون است،

رسوب‌گذاری جوهر زیستی با ویسکوزیته بالا بسیار مفید هستند. سیستم پنوماتیک برای رسوب‌کردن انواع جوهر زیستی با ویسکوزیته‌های مختلف با تعدیل فشار مفید واقع می‌شود (۴۰). مزایای این تکنیک شامل، رسوب تراکم سلولی بالا، گستره وسیع ویسکوزیته جوهر زیستی، ایجاد ساختارهای بافتی سه بعدی بزرگ و هزینه پایین تولید هستند. داربست‌های با تراکم سلولی بالا پشتیبانی بیشتری را در راستای بهبود آسیب نخاعی فراهم می‌کنند. همچنین، چاپ پیوسته (لایه به لایه) باعث حصول اطمینان از توزیع نسبتاً متوسط سلول‌ها در تمام سطح داربست می‌شود (۲۰، ۴۳). در مقابل، وضوح بسیار پایین روش اکستروژن (۱۰۰ میکرومتر)، سرعت کند تولید، خطر انسداد نازل توسط جوهر زیستی، امکان تأثیرگذاری منفی فشار و تنش اعمال شده، قطر نازل و افزایش غلظت جوهر زیستی بر روی زنده‌مانی سلول‌ها از معایب این روش محسوب می‌شوند. بهینه‌سازی پارامترهای تجهیزات چاپ یک اقدام کلیدی برای بهبود میزان بقای سلول‌ها خواهد بود (۲۰، ۴۳).

#### چاپ زیستی جوهرافشان

چاپ زیستی جوهرافشان روشی مقرون به صرفه و پرکاربرد در مهندسی بافت و پزشکی ترمیمی است که در آن جوهرهای زیستی را می‌توان به صورت قابل کنترل پراکنده ساخت. ویژگی ذکر شده باعث می‌شود تا سلول‌های محصور در جوهر زیستی، به صورت همزمان و بدون تماس با یکدیگر در جهت‌های خاص بر روی بستر پراکنده شوند (۴۵). در این روش به دلیل عدم بالابودن ویسکوزیته جوهر زیستی، ساختارهای زیستی ساخته شده دارای خواص مکانیکی پایینی هستند. کوچک بودن ابعاد نازل، منجر به آسیب رسیدن به سلول‌ها به دلیل تغییر شکل آن‌ها به هنگام عبور از نازل می‌شود (۴۶). علاوه بر این، کوچک بودن ابعاد نازل و سرعت جریان منجر به کاهش حجم انباشته شده در هر قطره می‌شود. این بدان معناست که کشت غلظت‌های بالای سلولی (بیش از ۵ میلیون سلول در میلی‌لیتر) ضرورت دارد تا احتمال حضور سلول در هر قطره جوهر زیستی به حداکثر برسد (۴۷). محدودیت دیگر این روش این است که در طول فرآیند چاپ، با شروع رسوب سلول‌ها در کارتريج، تراکم جوهر افزایش می‌یابد و در نتیجه امکان مسدود شدن نازل وجود خواهد داشت (۴۸). دو نوع چاپگر جوهر افشان دارد: حرارتی و پیزوالکتریک. در چاپگرهای جوهر افشان حرارتی، دما باعث گرم شدن نازل شده و گرما نیز به نوبه خود باعث به وجود آمدن پالس‌های فشار هوا به منظور پرتاب قطرات از نازل می‌گردد. مطالعات نشان داده‌اند که گرمایش موضعی، بین ۲۰۰ تا ۳۰۰ درجه سانتیگراد، تأثیر قابل توجهی بر پایداری مولکول‌های

<sup>15</sup> Stereolithography

قرار گیرد. پس از چاپ، مواد ذوب شده در دمای اتاق جامد می‌شود. این فرآیند به صورت لایه لایه ادامه می‌یابد تا ساختار سه بعدی نهایی تشکیل شود (۵۹). بالا بودن دمای استفاده شده باعث عدم کاربرد این روش در چاپ مستقیم سلولی می‌شود. بنابراین، پس از فرآیند چاپ، سلول‌ها بر روی سازه کشت داده می‌شوند. از مزایای این روش می‌توان به سهولت ساخت و جابه‌جایی مواد به دلیل عدم وجود حلال، امکان تولید مداوم بدون نیاز به تغییر ماده اولیه، هزینه پایین، وضوح و سرعت بالا اشاره کرد. با این حال، دارای معایبی مانند خواص مکانیکی ضعیف، ظاهر لایه به لایه، دقت پایین و مقدار محدود پلیمر ترموپلاستیک است. از تکنیک FDM برای کاربردهای اسکلتی-عضلانی و بافت عصبی استفاده شده است (۴۷،۶۰).

#### بیوپلاتینگ سه بعدی

بیوپلاتینگ سه بعدی<sup>۱۸</sup> یک روش چاپ بیولوژیکی مبتنی بر اکستروژن است. برخلاف FDM، سر سوزن توسط کامپیوتر در سه جهت محورهای x، y و z حرکت می‌کند و بستر تولید ثابت می‌ماند. خروج قطره‌ای یک مایع چسبناک به یک ماده ژل مانند با استفاده از سوزنی به اندازه میکرو انجام می‌گیرد. پس از خروج مایع، مواد از طریق اتصال عرضی یونی یا فوتوپلیمریزاسیون جامد می‌شود (۱۳،۶۱). راجارام و همکاران ساختار آلژینات/هیالورونیک اسید/سلول‌های شوان را با بیوپلات چاپ کردند. در این پژوهش، هر داربست، به‌منظور اتصال متقابل، در یک حمام کلرید کلسیم غوطه‌ور می‌شود. در این شرایط، ساختار داربست و فعالیت سلول‌های شوان حفظ می‌شود. داربست‌های متخلخل آلژینات/هیالورونیک اسید با یکپارچگی ساختاری خوب و زنده‌مانی طولانی سلول‌ها برای کاربرد در مهندسی بافت عصبی مناسب هستند (۶۲). چن و همکاران از بیوپلاتر سه بعدی برای خروج جوهر هیدروژل ژلاتین متاکریلویل به همراه فاکتور رشد عصبی استفاده کردند و سپس داربست را تحت تابش فرابنفش ۳۶۵ نانومتر جامد کردند. سلول‌های PC12 و سلول‌های شوان موجود در داربست، زنده‌مانی قابل توجهی را نشان دادند (۳۱). داربست‌های تولید شده توسط این تکنیک به‌طور کلی سطح صافی را به دلیل روش اکستروژن و سخت شدن نشان می‌دهند. مطالعات نشان داده‌اند که توپولوژی سطح داربست تا حد زیادی بر چسبندگی و تکثیر سلولی تأثیر می‌گذارد. بر این اساس، ایجاد زبری سطح با اصلاح سطح داربست برای افزایش چسبندگی سلولی بر روی ساختارهای بیوپلات شده ضروری است (۱۳).

اما مطالعات نشان داده‌اند که منجر به آسیب به DNA و حتی سرطان پوست می‌شود. در نتیجه، در سال‌های اخیر محققان توجه خود را بر روی فتوپلیمریزاسیون نور مرئی متمرکز کرده‌اند. وانگ و همکاران از نور مرئی به عنوان یک عامل ایجاد پیوند عرضی در مطالعه خود استفاده کردند. مطالعه آن‌ها نشان داد که کاربرد نور مرئی باعث چاپ با وضوح ۵۰ میکرومتر و نرخ بقای سلولی ۸۵ درصد می‌شود (۵۴). در پژوهشی دیگر نشان داده شد که با استفاده از نور مرئی، به عنوان یک عامل تشکیل دهنده پیوند عرضی، میزان آسیب سلولی، در طول ۷ روز آزمایش، تقریباً ۵ درصد بود (۵۴).

#### پردازش نور دیجیتالی

چاپ سه بعدی با روش پردازش دیجیتال نور (DLP<sup>۱۶</sup>) روش توسعه یافته استریولیتوگرافی است که در آن نور لیزر به شکل همزمان از میلیون‌ها پیکسل میکروآینه دیجیتال عبور کرده و با تابش به محلول پلیمری، افزایش قابل توجه سرعت تشکیل هر لایه و چاپ مشاهده می‌گردد (۵۵). در این روش چاپ زیستی، ابتدا بستر کار در مایع غوطه‌ور شده و سپس تصویر موجود بر روی میکروآینه با استفاده از منبع نور تحریک می‌گردد تا لایه‌ای از تصویر دو بعدی روی بستر ایجاد شود. سپس، با حرکت بستر به اندازه فاصله بین لایه از پایین به بالا، ساختار سه بعدی به صورت لایه به لایه تشکیل می‌شود (۵۶). از تکنیک DLP می‌توان برای چاپ ماتری کس خارج سلولی سلول‌زدایی شده با وضوح ۳۰ میکرومتر استفاده کرد (۵۷). به علاوه، کیم و همکاران نیز از فناوری DLP برای چاپ یک هیدروژل مخلوط با فیبروئین ابریشم و آلژینات با ویسکوزیته کم و به دقت چاپ بالا با وضوح ۱ میکرومتر استفاده کردند (۵۸). این پژوهش‌ها نشان دهنده بهبود قابل توجه در وضوح چاپ- یعنی > ۱۰۰ میکرومتر- و سرعت ساخت سریع‌تر نسبت به سیستم‌های مبتنی بر اکستروژن است. از آنجایی که ساختار سه بعدی ساخته شده در این روش از طریق غوطه‌ور کردن صفحه چاپ در مخزن حاوی مایع به جای بارگیری مواد در کارتریج استفاده می‌شود و سرعت چاپ بسیار سریع است، این فرآیند تولید دارای اثرات تنظیم بسیار کمی است. همچنین، به دلیل روش ساخت لایه به لایه، ساختار بیولوژیکی نخاع را به طور موثرتری شبیه‌سازی می‌کند (۵۰).

#### مدل سازی رسوب ذوب شده

تکنیک مدل سازی رسوب ذوب شده (FDM<sup>۱۷</sup>) از رشته‌ای از جنس پلیمر ترموپلاستیک ساخته شده است که در نازل قرار گرفته شده است. با اعمال دما، نازل داغ و رشته ذوب می‌شود تا فرم قابل چاپ رشته (حالت نیمه مایع) از نازل خارج شده و بر روی بستر جامد

<sup>۱۶</sup> Digital light processing

<sup>۱۷</sup> Fused deposition modeling

<sup>۱۸</sup> 3D Bioplotting

از تکنیک چاپ نورا فکس پیوسته در مقیاس میکرو ( $\mu\text{CPP}^{19}$ ) برای کاربردهای پزشکی احیا کننده در نخاع معرفی کردند. این چاپگر سه بعدی به منبع نور فرابنفش (۳۶۵ نانومتر) برای فوتوپلیمریزاسیون پلی اتیلن گلیکول-ژلاتین متاکریلات (PEG-GelMA<sup>20</sup>) مجهز شده بود. مقطع T3 در نخاع موش برای ایجاد تصاویر دیجیتالی از ماده خاکستری و سفید استفاده شد. داربست‌ها با سلول‌های پیش‌ساز عصبی بارگیری شدند و برای توانایی آنها در حمایت از بازسازی آکسون در T3 نخاع مورد آزمایش قرار گرفتند. چهار هفته پس از کاشت، داربست‌ها نفوذ توسط آکسون‌های میزبان، تشکیل میلین در آکسون‌ها توسط سلول‌های شوان میزبان و حداقل واکنش آستروسیت را نشان دادند. شش ماه پس از کاشت، آکسون‌های میزبان با سلول‌های پیوند شده ارتباط عملکردی برقرار کرده و سلول‌های پیوند شده از داربست به صورت خطی خارج شدند. موش‌های حاوی داربست نیز بهبود عملکردی بهتری را در مقایسه با گروه‌های کنترل نشان دادند. در نهایت، داربست‌ها رله‌های الکتروفیزیولوژیکی را تسهیل کردند که نشان‌دهنده انتقال سیگنال در سراسر محل ضایعه بود (۶۵). در رویکردی دیگر، چاپ سه بعدی مبتنی بر استریولیتوگرافی برای ایجاد ریزکانال‌های هدایت با هیدروژل‌های شفاف از جنس فیبرینوژن حاوی پلی اتیلن گلیکول برای رشد جهت داده شده نوریت‌ها از گره‌های ریشه پشتی استفاده شد. ساختار حاصل از میکروکانال‌های دارای الگوی نوری تشکیل شده بود که قادر به هدایت رشد جهت دار نوریت‌ها بود (۶۶). اولین مطالعه اعتبار سنجی تجربی درون تنی با استفاده از داربست پر از سلول بنیادی عصبی توسط لیو و همکاران با استفاده از یک داربست هیدروژل کامپوزیتی متشکل از هیدروکسی پروپیل کیتوزان (HBC)، اسید هیالورونیک تیوله (HA-SH)، اسید هیالورونیک وینیل سولفوناته (HA-VS) و ماتریژل (MA) از طریق تکنیک چاپ سه بعدی اکستروژن انجام شد. به هنگام چاپ، توزیع سلول‌های بنیادی عصبی در داربست‌ها که ساختار شبکه‌ای چند بعدی با کانال‌های ۴۰۰ میکرومتر داشتند، به صورت مساوی انجام گردید. نتایج آزمایش‌های برون تنی حاکی از این بودند که داربست کامپوزیتی دارای سرعت تخریب، تخلخل و استحکام مکانیکی مناسب برای تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی عصبی بود. نتایج آزمایش‌های درون تنی و اندازه‌گیری‌های بیومکانیکی نیز نشان دهنده بازسازی نورون‌ها، شبیه‌سازی ساختار خطی موازی نخاع و بهبود عملکردهای حرکتی در مدل‌های SCI بودند (مراجعه به تصویر ۲) (۶۷). پژوهشگران به منظور افزایش خواص مکانیکی و هدایتی آکسون به دنبال آسیب نخاعی در داخل بدن، داربست‌های سولفات

هدف از ساخت داربست بافت عصبی چاپ شده زیستی سه بعدی، ساخت شبکه‌ها و مدارهای عصبی برای بازسازی عصبی یا ترمیم آسیب عصبی می‌باشد. بنابراین، داربست‌های چاپ شده سه بعدی باید پشتیبانی مکانیکی لازم را برای حفظ داربست پیوندی در بدن بیمار را فراهم کنند (۶۳). همانطور که قبلاً ذکر شد، چاپ جوهر افشان به دلیل محدودیت حالت چاپ با چالش‌های بزرگی در چاپ زیستی طناب نخاعی مواجه است. چاپ اکستروژن پرکاربردترین است و توانسته است داربست‌هایی با قابلیت زنده ماندن سلولی بالا را چاپ کند که بدون شک برای نخاع مفید است. تکنیک FDM نیز از رایج‌ترین روش‌های چاپ سه بعدی برای تقلید از بافت سیستم عصبی هستند. SLA و DLP روش‌های چاپ نسبتاً جدیدی هستند. با این حال، به دلیل توانایی آن‌ها در تولید داربست‌هایی با وضوح بالا، زنده ماندن سلولی بالا و ویژگی‌های هندسی بسیار پیچیده، جایگزین‌های بالقوه‌ای برای چاپ زیستی طناب نخاعی شده‌اند (۶۳، ۵۰).

#### کاربرد چاپ زیستی سه بعدی در درمان ضایعات طناب نخاعی

چاپ زیستی برخلاف تکنیک‌های پیشین مهندسی بافت، پتانسیل کاربرد در ساخت ساختارهای پیچیده‌تر را دارد. چاپ زیستی را می‌توان به چاپ با جوهر سلولی و چاپ بدون سلول تقسیم کرد. در مقایسه با داربست‌های ساخته شده با تکنیک‌های رایج پیشین، داربست‌های بدون سلولی چاپ شده زیستی ساختار فضایی دقیق‌تری داشته و ساختار خطی چند بعدی تولید شده با نخاع مطابقت دارند. در داربست‌های حاوی سلول نیز می‌توان سلول‌ها را در یک موقعیت مکانی خاص قرار داد و بدین ترتیب داربست‌هایی پر از سلول ساخته و در نتیجه، نیازهای نخاع را در جهت ترمیم سلولی برآورده ساخت (۶۳، ۵۰). به صورت کلی، داربست‌های چاپ زیستی سه بعدی بهبود عملکرد حرکتی را بهبود می‌بخشند، تعداد رشته‌های عصبی بازسازی شده را در محل آسیب افزایش می‌دهند، بازسازی آکسون و تمایز عصبی را به طور موثرتری تحریک می‌کنند، نتایج بررسی‌های الکتروفیزیولوژیکی را بهبود بخشیده و تقریباً به طور کامل انتهای دیستال و پروگزیمال را در قطع نخاع در مقایسه با گروه کنترل به هم متصل می‌کنند. علاوه بر این، افزودن سلول‌های بنیادی یا فاکتورهای رشد به ساختار داربست‌های چاپ زیستی سه بعدی، بهبود بیشتری را در تمام جنبه‌های ذکر شده نشان داده‌اند (۶۴). چاپ سه بعدی توانایی ساخت ساختارهای پیچیده شبیه ریزمحیط طبیعی نخاع را دارد. کوفلر و همکارانش

<sup>19</sup> Microscale continuous projection printing

<sup>20</sup> Polyethylene glycol-gelatin methacrylate



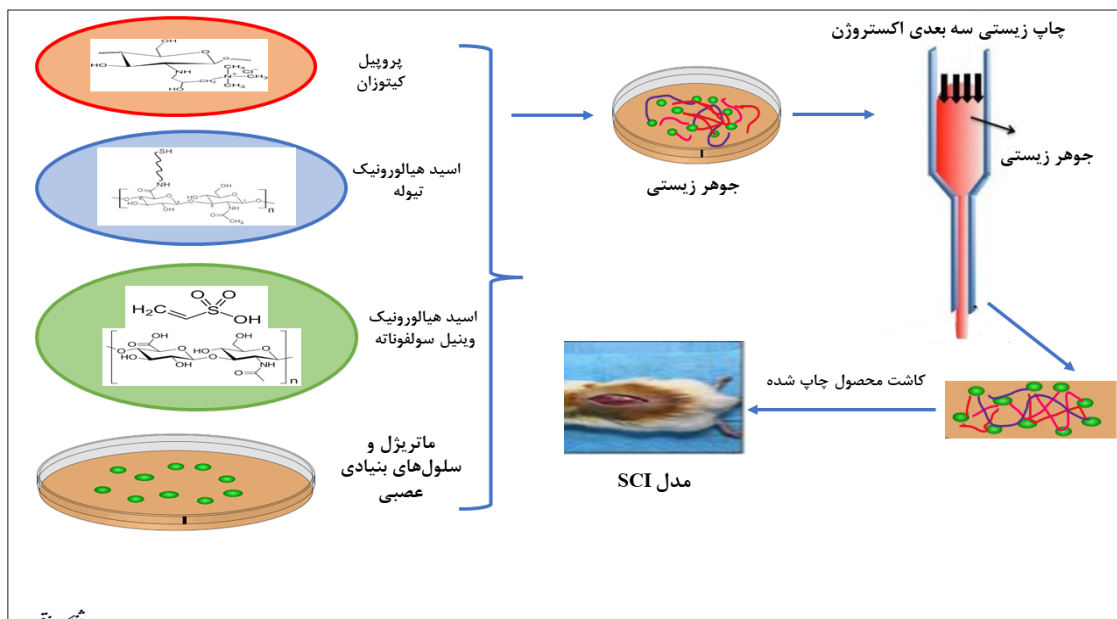
به طور موثرتری به نورون‌ها تمایز پیدا کنند. نتایج مطالعه آن‌ها یک استراتژی جدید برای تمایز سلول‌ها و استفاده از داربست‌های بیولوژیکی در درمان SCI‌s ارائه کرد (۷۰). وونگ و همکاران از چاپگر زیستی سه بعدی جهت ساخت داربست‌هایی در معمارهای مختلف و بررسی اثرات آن‌ها را بر بازسازی نخاع استفاده کردند. داربست‌های متخلخل در طرح‌های ماکرو سیلندر، لوله توخالی، پنج کاناله، مسیر باز با هسته و مسیر باز بدون هسته ساخته شدند. این داربست‌ها به مدت ۱ و ۳ ماه در مدل SCI موش‌های صحرایی کاشته شدند. مطالعات درون‌تنی نشان دهنده اسکار کمتر و افزایش طول رشته‌های عصبی با استفاده از داربست با معماری مسیر بودند. از سوی دیگر، طرح‌های سیلندر، لوله و کانال محیط مساعدی را برای بازسازی نخاع فراهم نکرده‌اند. در نتیجه نوع معماری داربست چاپ شده زیستی نیز در اثرات درمانی آن تاثیرگذار است (۷۱) در مطالعه‌ای دیگر در جهت توسعه روش‌های درمانی جدید برای SCI، از فناوری اکستروژن داربست‌هایی از آلژینات و متیل سلولز به همراه کشت دو نوع سلول عصبی شامل سلول‌های پیش‌ساز الیگودندروسیت و سلول‌های پیش‌ساز عصبی استفاده شد تا هر دو نوع سلول به طور همزمان در یک کانال خاص چاپ شوند. نتایج نشان دادند که هر دو نوع سلول‌های پیش‌ساز توانایی رشد و گسترش در امتداد کانال داربست و تمایز به نورون‌ها و الیگودندروسیت‌ها را داشتند. به علاوه، سلول‌های پیش‌ساز عصبی در بستر آلژینات و متیل سلولز می‌توانند به سایر بافت‌های مرتبط با نورون تمایز پیدا کنند. این مطالعه ارائه دهنده یک داربست بیولوژیکی جدید با ایده‌های جدیدی برای شبیه‌سازی ساختار سیستم عصبی در شرایط آزمایشگاهی و راهکاری برای توسعه روش‌های جدید درمان بالینی برای SCI بود (۷۲). در پژوهشی که به منظور مقایسه عملکرد داربست کلاژن/کیتوزان ساخته شده با دو تکنیک مختلف شامل چاپ سه بعدی و انجماد-خشک کردن در مدل‌های موش SCI انجام گرفته بود. در داربست‌های چاپ شده زیستی، بهبود عملکرد حرکتی با توجه به امتیاز BBB<sup>۲۲</sup> و زاویه صفحه شیب‌دار، تعداد فیبرهای عبوری از ضایعه و درجه بازسازی پروفایل‌های BDA<sup>۲۳</sup> بیشتر بود (۷۳).

کلاژن/هپارین به همراه فاکتور رشد فیبروبلاست پایه بی‌حرکت با استفاده از روش چاپ زیستی اکستروژن ایجاد کردند. داربست‌های شبکه‌ای چند بعدی با ساختار متخلخل ساخته شده مقاومت فشاری مشابهی با طناب نخاعی طبیعی نشان دادند. این سازه توانایی شبیه‌سازی ساختار خطی نخاع را داشت و سلول‌های بنیادی عصبی، به صورت نسبتاً منظم در امتداد کانال داربست رشد کردند. علاوه بر این، داربست‌های کاشته شده در ضایعه T10 در موش‌ها منجر به بهبود عملکرد حرکتی و بهبود خواص الکتروفیزیولوژیکی شد (۶۸). در مطالعه دیگری، جیانگ و همکاران، با استفاده از چاپگر زیستی اکستروژن، داربست کلاژن/فیبروئین ابریشم به همراه سلول‌های بنیادی عصبی را ایجاد کردند. مدل داربست در این مطالعه، به صورت متفاوت از مطالعه قبل، در تلاش بود تا ساختار پروانه مانند ماده خاکستری نخاع را تقلید کند، که عموماً یک ساختار بیضی شکل با چهار ساختار منفذی خطی در قسمت میانی ماده خاکستری و ماده سفید اطراف آن است. ساختار مطالعه حاضر نسبت به ساختار شبکه‌ای مطالعه پیشین با ساختار واقعی نخاع سازگاری بیشتری دارد. مانند مطالعه قبلی، داربست‌های سلول‌دار ساخته شده ویژگی‌های مکانیکی بهینه و عملکرد الکتروفیزیولوژیکی بهبود یافته را نشان داد. علاوه بر این، سلول‌ها به خوبی به داربست‌ها چسبیده و داربست‌ها از زیست سازگاری خوبی برخوردار بودند. سازه‌های آن‌ها در مقایسه با داربست‌های خالی، آکسون‌های بازسازی‌کننده و اسکار گلیالی کمتری را نشان دادند (۶۹). لی و همکاران به منظور مطالعه تمایز سلولی در داربست‌های چاپ شده زیستی، سلول‌های بنیادی اکتومزاننشیمی (EMSCs<sup>۲۱</sup>) را در داربست‌های از جنس هیدروژل آلژینات سدیم-ماتریژل ساخته شده با روش چاپ زیستی اکستروژن کشت دادند. از کشت سلولی دو بعدی که در آن سلول‌ها به صورت مستقیم در محیط کشت کشت داده می‌شوند، به عنوان گروه کنترل استفاده شد. مقایسه تمایز EMSC‌ها بین جوهرزیستی مملو از سلول و کشت ۲ بعدی نشان داد که در مقایسه با کشت سلولی دوبعدی، ریزمحیط ارائه شده توسط داربست‌های چاپ سه‌بعدی می‌تواند رشد و تکثیر سلول‌ها را تقویت کند و EMSC‌ها می‌توانند

<sup>21</sup> Ectomesenchymal stem cells

<sup>22</sup> Basso-Beattie-Bresnahan

<sup>23</sup> Biotin Dextran Amine



تصویر ۲- نمایش شماتیک چاپ زیستی سه بعدی داربست هیدروژل کامپوزیتی مملو از سلول‌های بنیادی عصبی با استفاده از تکنیک چاپ سه بعدی اکستروژن و کاربرد آن برای ترمیم SCI در مدل موش صحرایی

جوهر زیستی، برآورده ساختن همه معیارهای مورد نیاز برای ساخت جوهر زیستی ایده آل از جمله، حفظ یکپارچگی مکانیکی سازه، پشتیبانی از چسبندگی، تکثیر و تمایز سلول‌ها، تقلید از ماتریکس خارج سلولی، پشتیبانی مکانیکی، استحکام بالا و ارائه سیگنال‌های بیوشیمیایی، الکتریکی و مکانیکی می باشد (۸۰).

چالش بعدی چاپ زیستی مرتبط با ادغام سازه سه بعدی ساخته شده با شبکه‌های عروقی است. بدون مجاری مناسب برای تحویل مواد مغذی و دفع مواد زائد، بافت‌هایی با پیچیدگی جزئی نیز قادر به ادامه حیات نخواهند بود (۲۹). چالش‌های فعلی برای چاپ عروق زیستی عمدتاً به دلیل محدودیت در وضوح و سرعت چاپ است. برای مثال، مویرگ‌ها ممکن است به اندازه ۳ میکرومتر قطر داشته باشند، در حالی که چاپگرهای زیستی مبتنی بر لیزر با بالاترین وضوح در حال حاضر توانایی چاپ با اندازه قطر ۲۰ میکرومتر را دارند. همچنین، زمان مورد نیاز با فناوری موجود بسیار زیاد است. به طوری که، اگر چاپ به موقع کامل نشود، زنده ماندن سلول ممکن است به خطر بیفتد (۱۹).

چالش بزرگتر به هنگام پیوند عضو چاپ شده ایجاد می‌شود. زیرا آزمایش و بررسی پیوند عضو مهندسی شده بر روی داوطلبان سالم غیراخلاقی است (۸۱). علاوه بر این، تمایز میزان اثر گذار بودن عضو چاپ شده از پاسخ‌های طبیعی بدن بیمار به درمان مشکل است. عدم رضایت بیماران برای مشارکت کامل در کارآزمایی نیز از دیگر مشکلات می‌باشد. بدون انجام کارآزمایی‌های بالینی مناسب نیز

### چالش‌های پیش رو

چالش‌های زیادی در طول فرآیند چاپ زیستی وجود دارد. همه اجزای ضروری چاپ زیستی اعم از سلول‌ها، جوهرهای زیستی و چاپگرهای زیستی مسائل زیستی، فنی و اخلاقی و همچنین ابهاماتی را در مورد اثربخشی بالینی و مقرون به صرفه بودن ایجاد می‌کنند (۷۴). منبع سلولی رایج مورد استفاده در مهندسی بافت مربوط به منابع حیوانی می‌باشد. کاربرد فراوان این منابع به دلیل توانایی تولید انبوه در زمان کمتر و با هزینه مقرون به صرفه تر است. با این حال، کاربری منابع حیوانی باخطر انتقال بیماری و ایمنی زایی رو به رو است (۷۵). از طرف دیگر، منابع انسانی، با وجود اینکه زیست سازگاری بالاتر و امکان شخصی سازی درمان را فراهم می‌کنند، کاربرد آن‌ها همراه با با قوانین اخلاقی سخت‌تر، مدت زمان تولید انبوه طولانی تر و قیمت‌های بالاتر می‌باشد (۷۶). منبع جوهر زیستی چالش بعدی مرتبط به چاپ زیستی است. زیست سازگاری چاپ زیستی باقیه اجزای فرآیند مدل سازی سه بعدی از اهمیت به سزایی برخوردار است (۷۷). رایج ترین عناصر مورد استفاده در تولید جوهر زیستی از گونه های غیر انسانی مانند ژلاتین از گوشت خوک و آلژینات از جلبک دریایی به دست می‌آیند. این عناصر خطر عفونت، التهاب و ایمنی زایی را افزایش می‌دهند (۷۸). همچنین، بسیاری از مواد از نظر زیستی بیش از اندازه فعال هستند و منجر به تمایز نامطلوب سلول‌های بنیادی و برهم کنش‌های ناخواسته سلولی شوند (۷۹). در حال حاضر، مسئله بعدی مرتبط

عملکرد در SCI مفید باشد. علاوه بر این، اعتقاد بر این است که چاپ جوهر زیستی داربست‌های طناب نخاعی یک مرحله گذرا در چاپ زیستی سه بعدی برای درمان SCI است. هنگامی که چاپ زیستی سه بعدی از نقطه چاپ داربست عبور کند، احتمالاً قادر به چاپ بافت عصبی خواهد بود. سپس، کاربردهای چاپ زیستی سه بعدی ممکن است بافت عصبی را بازسازی کند و صنعت پزشکی را کاملاً تغییر دهد. می‌توان پیش‌بینی کرد که در آینده، چاپگرهای سه بعدی در کاربردهای بالینی به اندازه تجهیزات پزشکی استاندارد امروزی رایج خواهند بود. با این حال، تحقیقات بیشتر در این زمینه هنوز مورد نیاز است. یکی از اهداف آینده چاپ زیستی سه بعدی می‌تواند این باشد که به اهداکنندگان عضو بیشتری نیاز نباشد، زیرا اندام‌های انسانی شخصی شده را می‌توان با استفاده از سلول‌های خود بیمار چاپ کرد. این فناوری می‌تواند انقلابی در پیشگیری و رفع بیماری‌های عصبی باشد (۸۵، ۸۷). در آینده، این امکان وجود دارد که از یادگیری عمیق برای شناسایی عیوب، بهینه‌سازی فرایندها و تجزیه و تحلیل دقت ابعادی در چاپ زیستی سه بعدی استفاده شود. در حال حاضر، مطالعات کمی در مورد یادگیری عمیق مورد استفاده در فرایندهای چاپ زیستی گزارش شده است. یکی از دلایل احتمالی کمبود داده در مورد پرینت زیستی سه بعدی است زیرا یادگیری ماشینی به داده‌های کافی برای ساخت مدل‌ها و پیش‌بینی نیاز دارد. شاید بتوان از یادگیری ماشین برای ارزیابی عملکردها و خواص ساختارهای بافت مانند چاپ زیستی بهره‌برداری بیشتری کرد. با پیشرفت روزافزون و بلوغ پرینت زیستی سه بعدی، اعتقاد بر این است که یادگیری عمیق نقش بسزایی در بهینه‌سازی فرایند و کیفیت محصولات خواهد داشت (۲۶).

چشم‌انداز درخشان پژوهشگران در جهت حرکت به سمت چاپ چهار بعدی است. چاپ زیستی چهار بعدی منجر به تغییر شکل و عملکرد ساختار چاپ شده زیستی سه بعدی به هنگام قرار گرفتن در معرض محرک‌های خارجی و افزایش کیفیت آن می‌شود. پژوهش‌های متعددی با تمرکز بر توسعه و کاربست فناوری چاپ زیستی چهار بعدی در زمینه‌های مختلف، از جمله مهندسی عصبی، ساخت مجرای قلب، مهندسی بافت استخوان و شبکه عروقی انجام شده است. چاپ زیستی چهار بعدی امکان ساخت ساختارهای پیچیده را با دقت استثنایی فراهم می‌کند و از محدودیت‌های چاپ زیستی سه بعدی سنتی فراتر می‌رود. علاوه بر این، چاپ زیستی ۴ بعدی پتانسیل تولید نانو و ریزساختارهایی را نشان می‌دهد که می‌توانند به محرک‌های مختلف از جمله نور، دما، رطوبت، میدان‌های الکتریکی و

تردید در تایید محصولات چاپ زیستی سه بعدی از سمت سازمان غذا و دارو بیشتر خواهد بود (۷۸).

به طور کلی، کارایی فرایند چاپ زیستی باید بهبود یابد. فرایند چاپ زیستی فعلی زمان‌بر، پرهزینه، پیچیده، محدود در ساخت محصولات با مقیاس بزرگ، نیازمند مصرف انرژی بالا، محدود در منابع در دسترس برای چاپ زیستی، نیاز به پردازش‌های گران قیمت و زمان‌بر پس از تولید و دارای مسائل اخلاقی است (۸۲). به علاوه، در حال حاضر توانایی ارائه مداوم تعداد سلول‌های مورد نیاز برای بسیاری از انواع بافت را نداشته و نیروهای مکانیکی تحمیل‌شده توسط فرایند چاپ اغلب منجر به تغییر شکل سلول، تغییر سیگنال‌دهی و حتی مرگ سلول می‌شود (۷۹).

در مطالعات کاربرد چاپ زیستی برای ترمیم نخاع، مدل‌های ساخته شده با شبکه عروقی، سرکوب سیستم ایمنی، و التهاب ترکیب نشده‌اند. تا به امروز، تعداد مطالعات نخاعی انجام گرفته محدود به چند نوع سلول خاص و مدل داربست در چاپ بوده است (۸۳). ساخت یک داربست با شبکه عروقی مناسب لازم و ضروری است تا بتوان اکسیژن و مواد مغذی کافی را در طول بازسازی منتقل کرد، اما تعداد کمی از داربست‌ها به طور ویژه برای دستیابی به بازسازی عصبی با عروق لازم آماده شده‌اند. از این رو، برای تولید داربستی با افزایش بازسازی عصبی و افزایش رگ‌زایی، استراتژی‌های مناسبی مانند آزادسازی کنترل‌شده فاکتور رگ‌زایی و ایجاد کانال‌های عروقی مانند در داربست مورد نیاز است (۸۴). به علاوه، ساختار داربست‌های ساخته شده منجر به شبیه‌سازی هدایت پیام الکتریکی خطی نخاع می‌گردد، اما ماده خاکستری پروانه‌مانند و ساختار ماده سفید اطراف نخاع را به طور کامل بازیابی نمی‌کند. اگرچه فناوری چاپ زیستی کنونی قادر به شبیه‌سازی اندام‌های مختلف بدن است، اما بازسازی و ترمیم کامل نخاع به دلیل ساختار پیچیده و مسیرهای عصبی متناظر آن بسیار چالش‌برانگیز می‌باشد (۸۵، ۸۶).

#### چشم‌انداز آینده

چاپ زیستی بافت عصبی چشم‌انداز بالینی خوبی برای ترمیم SCI دارد. با این حال، این فناوری هنوز در مراحل ابتدایی خود است. تحقیقات و آزمایشات بالینی محدود هستند و کاربردهای بالینی نادر است. از سوی دیگر، اگرچه زمینه چاپ زیستی سه بعدی در مراحل اولیه است، اما با موفقیت برای پیوند برخی از بافت‌ها از جمله پوست چند لایه، عروق، بافت قلب، استخوان و ساختارهای غضروفی استفاده شده است. در عین حال، نسل‌های جدید فناوری چاپ بیولوژیکی سه بعدی مانند چاپ سه بعدی یکپارچه ممکن است برای بهبود

فناوری های پیشرفته، سیستم های مواد بهینه، و ترکیب سلول ها و عناصر بیولوژیکی ضروری است. این امر تکامل ساختارهای عصبی چاپ شده با چاپ سه بعدی را تسهیل می کند و تحول بالینی درمان آسیب عصبی را تسریع می بخشد. تا کنون از این فناوری در ساخت تعداد محدودی مدل داربست نخاعی و چند نوع سلول خاص استفاده شده است. در حالی که تا شبیه سازی کامل ساختار پروانه مانند ماده خاکستری و ماده سفید اطراف و مسیرهای عصبی پیچیده مطالعات بیشتری نیاز است. به علاوه، جنبه هایی مانند اثربخشی داربست ها در اقسام مختلف مدل حیوانی SCI، شفاف سازی ایمن ترین و مؤثرترین روش چاپ زیستی سه بعدی، خواص ضدالتهابی داربست، ترکیب مطالعات با رگ زایی و سرکوب سیستم ایمنی، باید قبل از کاربرد در مطالعات بالینی به طور کامل بررسی شوند. در نهایت می توان اذعان کرد که با همکاری های گسترده بین رشته ای و کاربست مواد و تکنیک های بهینه در فناوری چاپ زیستی سه بعدی در جهت ساخت مدل های طناب نخاعی و تبدیل تحقیقات بنیادی به کارآزمایی های بالینی مناسب، امکان ساخت داربست های طناب نخاعی غنی شده با سلول ها و فاکتورهای زیستی فعال مؤثر بر بهبود عملکردی بیماران پس از SCI و کاربرد بالینی آن ها در بیماران دور از انتظار خواهد بود.

میدان های مغناطیسی پاسخ دهند. با نگاهی به آینده، چاپ زیستی چهار بعدی توانایی ایجاد انقلاب در زمینه علوم زیست پزشکی، به ویژه در حوزه های خاص مانند مهندسی بافت و پزشکی بازساختی را دارد (۸۸).

### نتیجه گیری

در این بررسی، ما در مورد چگونگی استفاده از فناوری چاپ زیستی سه بعدی برای ترمیم SCI بحث کردیم. با استفاده از این روش می توان از ویژگی های مکانیکی، ساختاری و بیوشیمیایی بافت طبیعی تقلید کرد. در مقایسه با سایر فناوری ها، فناوری چاپ سه بعدی دارای مزایای منحصربه فردی در ساخت داربست های عصبی است: قابلیت کنترل بالا در طراحی داربست ها با شکل ها و ساختارهای مختلف و کنترل پارامترهایی مانند اندازه و توزیع منافذ، امکان سفارشی سازی داربست ها بر اساس نیازهای فردی، راندمان تولید بالا، تکرارپذیری خوب در ساخت چندین باره داربست آماده شده با شکل و ساختار ثابت، توانایی ایجاد ساختارهای پیچیده، شبیه سازی ساختارهای طبیعی و مورفولوژی بافت عصبی و بهبود بازسازی عصبی. کاربرد پیوندهای عصبی مهندسی بافت در بازسازی نخاع با ظهور فناوری چاپ سه بعدی و مواد جدید بسیار تکامل یافته است. رایج ترین روش های چاپ گرافت های عصبی و استفاده از آن ها در درمان آسیب عصبی در این بررسی ترسیم شده اند. برای افزایش عملکرد داربست های چاپ،

### منابع

1. Maribo T, Jensen CM, Madsen LS, Handberg C. Experiences with and perspectives on goal setting in spinal cord injury rehabilitation: a systematic review of qualitative studies. *Spinal Cord*. 2020;58(9):949-58.
2. Luthra A, Prabhakar H. Chapter 10 - Postoperative Paraplegia and Quadriplegia. In: Prabhakar H, editor. *Complications in Neuroanesthesia*. San Diego: Academic Press; 2016. p. 77-87.
3. Soluki M, Mahmoudi F, Abdolmaleki A, Asadi A, Sabahi Namini A. Cerium oxide nanoparticles as a new neuroprotective agent to promote functional recovery in a rat model of sciatic nerve crush injury. *Br J Neurosurg*. 2020;1-6.
4. Alizadeh A, Dyck SM, Karimi-Abdolrezaee S. Traumatic Spinal Cord Injury: An Overview of Pathophysiology, Models and Acute Injury Mechanisms. *Frontiers in Neurology*. 2019;10.
5. Liu Z, Yang Y, He L, Pang M, Luo C, Liu B, et al. High-dose methylprednisolone for acute traumatic spinal cord injury: A meta-analysis. *Neurology*. 2019;93(9):e841-e50.
6. Cheung V, Hoshida R, Bansal V, Kasper E, Chen CC. Methylprednisolone in the management of spinal cord injuries: Lessons from randomized, controlled trials. *Surg Neurol Int*. 2015;6:142.
7. Katoh H, Yokota K, Fehlings MG. Regeneration of spinal cord connectivity through stem cell transplantation and biomaterial scaffolds. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2019;13:248.
8. O'Shea TM, Burda JE, Sofroniew MV. Cell biology of spinal cord injury and repair. *The Journal of clinical investigation*. 2017;127(9):3259-70.
9. Abdolmaleki A, Karimian A, Asadi A, A. Ghanimi H. 3D Bioprinting Applications as New Technology for Nerve Regeneration. *Zahedan J Res Med Sci*. 2023;25(2):e121121.
10. Abdolmaleki A, Zahri S, Asadi A, Wassersug R. Role of Tissue Engineering and Regenerative Medicine in Treatment of Sport Injuries. *Trauma Monthly*. 2020;25(3):106-12.
11. Abdolmaleki A, Asadi A, Taghizadeh Momen L, Parsi Pilerood S. The Role of Neural Tissue Engineering in the Repair of Nerve Lesions. *The Neuroscience Journal of Shefaye Khatam*. 2020;8(3):80-96.
12. Liu K, Yan L, Li R, Song Z, Ding J, Liu B, et al. 3D printed personalized nerve guide conduits for precision repair of peripheral nerve



- defects. *Advanced Science*. 2022;9(12):2103875.
13. Bedir T, Ulag S, Ustundag CB, Gunduz O. 3D bioprinting applications in neural tissue engineering for spinal cord injury repair. *Materials Science and Engineering: C*. 2020;110:110741.
  14. Zhang B, Luo Y, Ma L, Gao L, Li Y, Xue Q, et al. 3D bioprinting: an emerging technology full of opportunities and challenges. *Bio-Design and Manufacturing*. 2018;1:2-13.
  15. Murphy SV, De Coppi P, Atala A. Opportunities and challenges of translational 3D bioprinting. *Nature biomedical engineering*. 2020;4(4):370-80.
  16. Koffler J, Zhu W, Qu X, Platoshyn O, Dulin JN, Brock J, et al. Biomimetic 3D-printed scaffolds for spinal cord injury repair. *Nature medicine*. 2019;25(2):263-9.
  17. Yuan TY, Zhang J, Yu T, Wu JP, Liu QY. 3D Bioprinting for Spinal Cord Injury Repair. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022;10:847344.
  18. Johnson BN, Lancaster KZ, Hogue IB, Meng F, Kong YL, Enquist LW, et al. 3D printed nervous system on a chip. *Lab Chip*. 2016;16(8):1393-400.
  19. Ravnicek DJ, Leberfinger AN, Koduru SV, Hospodiuk M, Moncal KK, Datta P, et al. Transplantation of bioprinted tissues and organs: Technical and clinical challenges and future perspectives. *Annals of Surgery*. 2017;266(1):48-58.
  20. Vijayavenkataraman S, Yan W-C, Lu WF, Wang C-H, Fuh JYH. 3D bioprinting of tissues and organs for regenerative medicine. *Advanced drug delivery reviews*. 2018;132:296-332.
  21. Xie Z, Gao M, Lobo AO, Webster TJ. 3D bioprinting in tissue engineering for medical applications: the classic and the hybrid. *Polymers*. 2020;12(8):1717.
  22. Hockaday L, Kang K, Colangelo N, Cheung P, Duan B, Malone E. Rapid 3D printing of anatomically accurate and mechanically heterogeneous aortic valve hydrogel scaffolds. *Biofabrication*. 2012;4(3):035005.
  23. Vettori L, Sharma P, Rnjak-Kovacina J, Gentile C. 3D bioprinting of cardiovascular tissues for in vivo and in vitro applications using hybrid hydrogels containing silk fibroin: state of the art and challenges. *Current Tissue Microenvironment Reports*. 2020;1:261-76.
  24. Seol Y-J, Kang H-W, Lee SJ, Atala A, Yoo JJ. Bioprinting technology and its applications. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 2014;46(3):342-8.
  25. Ali M, PR AK, Lee SJ, Jackson JD. Three-dimensional bioprinting for organ bioengineering: promise and pitfalls. *Current opinion in organ transplantation*. 2018;23(6):649-56.
  26. Tan B, Gan S, Wang X, Liu W, Li X. Applications of 3D bioprinting in tissue engineering: Advantages, deficiencies, improvements, and future perspectives. *Journal of Materials Chemistry B*. 2021;9(27):5385-413.
  27. Agarwal S, Saha S, Balla VK, Pal A, Barui A, Bodhak S. Current developments in 3D bioprinting for tissue and organ regeneration—a review. *Frontiers in Mechanical Engineering*. 2020;6:589171.
  28. Irvine SA, Venkatraman SS. Bioprinting and differentiation of stem cells. *Molecules*. 2016;21(9):1188.
  29. Matai I, Kaur G, Seyedsalehi A, McClinton A, Laurencin CT. Progress in 3D bioprinting technology for tissue/organ regenerative engineering. *Biomaterials*. 2020;226:119536.
  30. Gungor-Ozkerim PS, Inci I, Zhang YS, Khademhosseini A, Dokmeci MR. Bioinks for 3D bioprinting: an overview. *Biomater Sci*. 2018;6(5):915-46.
  31. Chen J, Huang D, Wang L, Hou J, Zhang H, Li Y, et al. 3D bioprinted multiscale composite scaffolds based on gelatin methacryloyl (GelMA)/chitosan microspheres as a modular bioink for enhancing 3D neurite outgrowth and elongation. *Journal of colloid and interface science*. 2020;574:162-73.
  32. Zhang YS, Oklu R, Dokmeci MR, Khademhosseini A. Three-dimensional bioprinting strategies for tissue engineering. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2018;8(2):a025718.
  33. Xing F, Xiang Z, Rommens PM, Ritz U. 3D bioprinting for vascularized tissue-engineered bone fabrication. *Materials*. 2020;13(10):2278.
  34. Ghayour MB, Abdolmaleki A, Fereidoni M. Use of stem cells in the regeneration of peripheral nerve injuries: an overview. *The Neuroscience Journal of Shefaye Khatam*. 2015;3(1):84-98.
  35. Augustine R. Skin bioprinting: a novel approach for creating artificial skin from synthetic and natural building blocks. *Progress in biomaterials*. 2018;7(2):77-92.
  36. Rosser J, Thomas DJ. Bioreactor processes for maturation of 3D bioprinted tissue. *3D Bioprinting for reconstructive surgery*; Elsevier; 2018. p. 191-215.
  37. Smith LJ, Li P, Holland MR, Ekser B. FABRICA: a bioreactor platform for printing, perfusing, observing, & stimulating 3D tissues. *Scientific reports*. 2018;8(1):7561.
  38. Salehi-Nik N, Amoabediny G, Pouran B, Tabesh H, Shokrgozar MA, Haghighipour N, et al. Engineering parameters in bioreactor's design: a critical aspect in tissue engineering. *BioMed research international*. 2013;2013.



39. Lima TdPL, Canelas CAdA, Concha VOC, Costa FAMd, Passos MF. 3D Bioprinting Technology and Hydrogels Used in the Process. *Journal of Functional Biomaterials* [Internet]. 2022; 13(4).
40. Mohan MK, Rahul AV, De Schutter G, Van Tittelboom K. Extrusion-based concrete 3D printing from a material perspective: A state-of-the-art review. *Cement and Concrete Composites*. 2021;115:103855.
41. Murphy SV, Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nature Biotechnology*. 2014;32(8):773-85.
42. Truby RL, Lewis JA. Printing soft matter in three dimensions. *Nature*. 2016;540(7633):371-8.
43. Bishop ES, Mostafa S, Pakvasa M, Luu HH, Lee MJ, Wolf JM, et al. 3-D bioprinting technologies in tissue engineering and regenerative medicine: Current and future trends. *Genes Dis*. 2019;95:185-4;7
44. Zhang X, Zhang Y. Tissue Engineering Applications of Three-Dimensional Bioprinting. *Cell Biochem Biophys*. 2015;72(3):777-82.
45. Iwanaga S, Arai K, Nakamura M. Chapter 4 - Inkjet Bioprinting. In: Atala A, Yoo JJ, editors. *Essentials of 3D Biofabrication and Translation*. Boston: Academic Press; 2015. p. 61-79.
46. Hölzl K, Lin S, Tytgat L, Van Vlierberghe S, Gu L, Ovsianikov A. Bioink properties before, during and after 3D bioprinting. *Biofabrication*. 2016;8(3):032002.
47. O'Brien CM, Holmes B, Faucett S, Zhang LG. Three-dimensional printing of nanomaterial scaffolds for complex tissue regeneration. *Tissue Eng Part B Rev*. 2015;21(1):103-14.
48. Rider P, Kačarević Ž P, Alkildani S, Retnasingh S, Barbeck M. Bioprinting of tissue engineering scaffolds. *J Tissue Eng*. 2018;9:2041731418802090.
49. Li X, Liu B, Pei B, Chen J, Zhou D, Peng J, et al. Inkjet Bioprinting of Biomaterials. *Chemical Reviews*. 2020;120(19):10793-833.
50. Yuan T-Y, Zhang J, Yu T, Wu J-P, Liu Q-Y. 3D Bioprinting for Spinal Cord Injury Repair. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2022;10.
51. Knowlton S, Yenilmez B, Anand S, Tasoglu S. Photocrosslinking-based bioprinting: Examining crosslinking schemes. *Bioprinting*. 2017;5:10-8.
52. Melchels FP, Feijen J, Grijpma DW. A review on stereolithography and its applications in biomedical engineering. *Biomaterials*. 2010;31(24):6121-30.
53. Edgar JM, Robinson M, Willerth SM. Fibrin hydrogels induce mixed dorsal/ventral spinal neuron identities during differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Acta Biomater*. 2017;51:237-45.
54. Sakai S, Kamei H, Mori T, Hotta T, Ohi H, Nakahata M, et al. Visible Light-Induced Hydrogelation of an Alginate Derivative and Application to Stereolithographic Bioprinting Using a Visible Light Projector and Acid Red. *Biomacromolecules*. 2018;19(2):672-9.
55. Derakhshanfar S, Mbeleck R, Xu K, Zhang X, Zhong W, Xing M. 3D bioprinting for biomedical devices and tissue engineering: A review of recent trends and advances. *Bioact Mater*. 2015;6:144-2;3;8
56. Zhang J, Hu Q, Wang S, Tao J, Gou M. Digital light processing based three-dimensional printing for medical applications. *International journal of bioprinting*. 2020;6(1).
57. Yu C, Ma X, Zhu W, Wang P, Miller KL, Stupin J, et al. Scanningless and continuous 3D bioprinting of human tissues with decellularized extracellular matrix. *Biomaterials*. 2019;194:1-13.
58. Kim SH, Yeon YK, Lee JM, Chao JR, Lee YJ, Seo YB, et al. Precisely printable and biocompatible silk fibroin bioink for digital light processing 3D printing. *Nature communications*. 2018;9(1):1620.
59. Mohamed OA, Masood SH, Bhowmik JL. Optimization of fused deposition modeling process parameters: a review of current research and future prospects. *Advances in Manufacturing*. 2015;3:53-42:(1)
60. Chohan JS, Singh R, Boparai KS, Penna R, Fraternali F. Dimensional accuracy analysis of coupled fused deposition modeling and vapour smoothing operations for biomedical applications. *Composites Part B: Engineering*. 2017;117:138-49.
61. Do AV, Khorsand B, Geary SM, Salem AK. 3D Printing of Scaffolds for Tissue Regeneration Applications. *Adv Healthc Mater*. 2015;4(12):1742-62.
62. Rajaram A, Schreyer D, Chen D. Bioplotting alginate/hyaluronic acid hydrogel scaffolds with structural integrity and preserved schwann cell viability. *3D Printing and Additive Manufacturing*. 2014;1(4):194-203.
63. Joung D, Lavoie NS, Guo SZ, Park SH, Parr AM, McAlpine MC. 3D printed neural regeneration devices. *Advanced functional materials*. 2020;30(1):1906237.
64. Szymoniuk M, Mazurek M, Dryla A, Kamieniak P. The application of 3D-bioprinted scaffolds for neuronal regeneration after traumatic spinal cord injury - A systematic review of preclinical in vivo studies. *Exp Neurol*. 2023;363:114366.
65. Koffler J, Zhu W, Qu X, Platoshyn O, Dulin JN,

- Brock J, et al. Biomimetic 3D-printed scaffolds for spinal cord injury repair. *Nat Med.* 2019;25(2):263-9.
66. Sarig-Nadir O, Livnat N, Zajdman R, Shoham S, Seliktar D. Laser photoablation of guidance microchannels into hydrogels directs cell growth in three dimensions. *Biophys J.* 2009;96(11):4743-52.
67. Liu X, Hao M, Chen Z, Zhang T, Huang J, Dai J, et al. 3D bioprinted neural tissue constructs for spinal cord injury repair. *Biomaterials.* 2021;272:120771.
68. Chen C, Zhao ML, Zhang Rk, Lu G, Zhao Cy, Fu F, et al. Collagen/heparin sulfate scaffolds fabricated by a 3D bioprinter improved mechanical properties and neurological function after spinal cord injury in rats. *Journal of Biomedical Materials Research Part A.* 2017;105(5):1.32-324
69. Jiang J-P, Liu X-Y, Zhao F, Zhu X, Li X-Y, Niu X-G, et al. Three-dimensional bioprinting collagen/silk fibroin scaffold combined with neural stem cells promotes nerve regeneration after spinal cord injury. *Neural regeneration research.* 2020;15.959:(5)
70. Li Y, Cao X, Deng W, Yu Q, Sun C, Ma P, et al. 3D printable Sodium alginate-Matrigel (SA-MA) hydrogel facilitated ectomesenchymal stem cells (EMSCs) neuron differentiation. *Journal of Biomaterials Applications.* 2021;35(6):709-19.
71. Wong DY, Leveque JC, Brumblay H, Krebsbach PH, Hollister SJ, Lamarca F. Macro-architectures in spinal cord scaffold implants influence regeneration. *J Neurotrauma.* 2008;25(8):1027-37.
72. Joung D, Truong V, Neitzke CC, Guo SZ, Walsh PJ, Monat JR, et al. 3D printed stem-cell derived neural progenitors generate spinal cord scaffolds. *Advanced functional materials.* 2018;28(39):1801850.
73. Sun Y, Yang C, Zhu X, Wang JJ, Liu XY, Yang XP, et al. 3D printing collagen/chitosan scaffold ameliorated axon regeneration and neurological recovery after spinal cord injury. *Journal of Biomedical Materials Research Part A.* 2019;107(9):1898-908.
74. Veeravalli RS, Vejandla B, Savani S, Nelluri A, Peddi NC. Three-Dimensional Bioprinting in Medicine: A Comprehensive Overview of Current Progress and Challenges Faced. *Cureus.* 2023;15.(7)
75. Reddy VS, Ramasubramanian B, Telrandhe VM, Ramakrishna S. Contemporary standpoint and future of 3D bioprinting in tissue/organs printing. *Current Opinion in Biomedical Engineering.* 2023;27:100461.
76. Rizzo ML, Turco S, Spina F, Costantino A, Visi G, Baronti A, et al. 3D printing and 3D bioprinting technology in medicine: ethical and legal issues. *Clin Ter.* 2023;174(1):80-4.
77. Gungor-Ozkerim PS, Inci I, Zhang YS, Khademhosseini A, Dokmeci MR. Bioinks for 3D bioprinting: an overview. *Biomaterials science.* 2018;6(5):915-46.
78. Jovic TH, Combella EJ, Jessop ZM, Whitaker IS. 3D Bioprinting and the Future of Surgery. *Frontiers in Surgery.* 2020;7.
79. Bishop ES, Mostafa S, Pakvasa M, Luu HH, Lee MJ, Wolf JM, et al. 3-D bioprinting technologies in tissue engineering and regenerative medicine: Current and future trends. *Genes & Diseases.* 2017;4(4):185-95.
80. Kačarević ŽP, Rider PM, Alkildani S, Retnasingh S, Smeets R, Jung O, et al. An introduction to 3D bioprinting: possibilities, challenges and future aspects. *Materials.* 2018;11(11):2199.
81. Datta P, Cabrera LY, Ozbolat IT. Ethical challenges with 3D bioprinted tissues and organs. *Trends Biotechnol.* 2023;41(1):6-9.
82. Mao H, Yang L, Zhu H, Wu L, Ji P, Yang J, et al. Recent advances and challenges in materials for 3D bioprinting. *Progress in Natural Science: Materials International.* 2020;30(5):618-34.
83. Lu D, Yang Y, Zhang P, Ma Z, Li W, Song Y, et al. Development and Application of Three-Dimensional Bioprinting Scaffold in the Repair of Spinal Cord Injury. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine.* 2022;19(6):1113-27.
84. Song J, Lv B, Chen W, Ding P, He Y. Advances in 3D printing scaffolds for peripheral nerve and spinal cord injury repair. *International Journal of Extreme Manufacturing.* 2023.
85. Xia QQ, Yuan H, Wang TH, Xiong LL, Xin ZJ. Application and progress of three-dimensional bioprinting in spinal cord injury. *Ibrain.* 2021;7(4):325-36.
86. Yuan T-Y, Zhang J, Yu T, Wu J-P, Liu Q-Y. 3D bioprinting for spinal cord injury repair. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology.* 2022;10:847344.
87. Lu D, Yang Y, Zhang P, Ma Z, Li W, Song Y, et al. Development and Application of Three-Dimensional Bioprinting Scaffold in the Repair of Spinal Cord Injury. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine.* 2022;19(6):1113-27.
88. Amukarimi S, Mozafari M. 4D bioprinting of tissues and organs. *Bioprinting.* 2021;23:e00161.