

바이오화학공학에서 3D 바이오프린팅 기술

엄태윤[†]

한국과학기술정보연구원
34141 대전시 유성구 대학로 245
(2015년 10월 8일 접수, 2016년 2월 3일 수정본 접수, 2016년 2월 5일 채택)

3D Bioprinting Technology in Biochemical Engineering

Tae Yoon Eom[†]

Korea Institute of Science and Technology Information, 245, Daehak-ro, Yuseong-gu, Daejeon, 34141, Korea
(Received 8 October 2015; Received in revised form 3 February 2016; accepted 5 February 2016)

요 약

삼차원 프린팅(3D printing) 기술은 공학, 제조업, 교육, 예술, 그리고 바이오의학 같은 다양한 분야에 활용되고 있는 혁신적 기술이다. 프린팅 기술, 재료/생화학물질을 포함한 최근 기술의 진보는 생체적합성 물질, 세포, 지지체 성분의 3D 프린팅으로 복잡한 3D 기능성 조직과 장기를 제작할 수 있는 가능성을 보여주고 있다. 3D 바이오프린팅 기술은 신약 개발, 독성 연구를 위한 조직 모델의 제작에도 활용되고 있다. 3D 바이오프린팅 기술은 공학, 생체재료과학, 세포생물학, 생화학, 물리, 의학 같은 분야의 통섭이 필요한 연구 분야이다.

Abstracts – Three-dimensional (3D) printing is driving major innovation in various areas including engineering, manufacturing, art, education and biosciences such as biochemical engineering, tissue engineering and regenerative medicine. Recent advances have enabled 3D printing of biocompatible materials, cells and supporting components into complex 3D functional tissues. Compared with non-biological printing, 3D bioprinting involves additional complexities which require the integration of technologies from the fields of biochemical engineering, biomaterial sciences, cell biology, physics, pharmaceuticals and medical science.

Key words: 3D bioprinting, Ink-jet bioprinting, Pressure-assisted bioprinting, Laser-assisted bioprinting, Tissue-engineering, Organ fabrication

1. 서 론

1986년 Charles W. Hull이 개발한 3D 프린팅¹⁾ 공정은 [1] Watson과 Crick이 ball-and-stick 모델을 사용하여 DNA 구조를 만든 것과 같이 오늘날 복잡한 분자나 단백질 상호작용 모델, 실험 도구의 제작 등에 3D 프린팅 기술이 활용되기 시작하였다[2,3]. 21세기에 들어서면서 이 기술을 사용하여 생물학적 물질로부터 3D 지지체를 형성하기 위한 희생 레진 주형의 제작과 수용액에 기초한 시스템의 개발로 이식에 사용할 수 있는 생물학적 물질을 세포-있는/없는 3D 지지체로 직접 프린팅 하는 것이 가능하게 되었다[4]. 최근 세포 생물학과 재료 과학의 진보에 따라 재생 의학에 활용되는 3D 바이오프린팅 기술이 개발되어 임상에서 사용되는 스텐트(stents)와 스플린트(splints) 같은 의료 디바이스와 손상된 장기의 일부 또는 전체를

재구성하여 환자에게 사용할 수 있는 인공 장기의 제조를 위한 조직공학 분야에도 3D 바이오프린팅 기술이 사용되고 있다.

구조 매트릭스를 사용해야 하는 조직 공학과 재생 의학적 접근 방법이 성공하려면 지지체(scaffold)와 그에 따른 조직 구조물의 디자인이 대단히 중요하다. 조직 공학에서는 세포 침투와 증식을 위한 구조, 세포외 매트릭스 형성과 재구성을 위한 공간, 세포 거동을 지시하는 생화학적 신호, 그리고 손상된 조직을 위한 물리적 연결을 제공하는 지지체가 대단히 중요하다. 지지체의 제작에서, 환자 및 장기 특성, 해부학적 양상에 따라 복잡할 수 있는 디바이스의 전체적인 형태, 공극 크기, 형태, 공극도, 공간 분포, 공극 상호연결 같은 조직의 마이크로구성, 세포 점착, 증식과 분화를 위한 바이오분자 부착 같은 표면 변환을 포함한 나노구성 디자인, 모두가 영양소 수송, 세포-매트릭스 상호작용 조건을 위하여 대단히 중요하다.

과거에는 지지체와 조직 구조물을 만들기 위하여 기계 발포, 용매 캐스팅, 염 추출, 냉동 캐스팅 같은 화학 공정들이 사용되었다. 그리

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: tyeom1@resear.re.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

¹⁾이차원 인쇄와는 다르게 삼차원 구조물을 만드는 기술을 나타내기 위하여 3D 프린팅이란 용어를 사용하였다.

고 최근에는 섬유형 소재의 컴퓨터 보조-가열 접착(fiber bonding)/전기방사(electrospinning) 같은 적층방법 등이 활용되고 있다[5,6]. 그러나 이 공정들로 제작된 지지체에는 세포 심기(seeding)가 잘 안 되고 지지체 매트릭스 내에 여러 다양한 세포의 분배가 어려운 점 등의 문제들이 있다. 이러한 전통적인 제조 방법에 비하여 최근 개발되고 있는 3D 바이오프린팅 기술은 구조물 디자인과 제작 과정에 세포를 직접 사용함으로써 세포 심기 효율과 세포 분배 문제를 극복하고 있으며, 더 나아가 *in situ* 세포 구조물을 구축하는 제작 과정까지 개발되고 있다. 이 과정들에는 광중합-기초 공정, 레이저-기초 패턴 생성, 접착 인쇄, 그리고 다중 세포 조직 구형(spheroids)을 만들기 위한 세포 마이크로캡슐화 그리고 캐스팅-기초 생체적합성 공정들이 개발되어 복잡한 마이크로-마크로 삼차원 구조물이 제작되고 있다[7,8].

2. 3D 바이오프린팅 기술

3D 바이오프린팅 기술은 기본적으로 지지체 제작과 세포 배치 과정 모두를 동시에 수행할 수 있는 적층 프린팅 공정으로서 지지체 바이오물질, 화학 분자, 살아 있는 세포를 원하는 공간 패턴을 가진 3D 비균질 구조물의 구축이 가능한 기술이다. 이는 지지체 제작, 제작된 지지체에 세포 심기, 배양기 내에서 전처리, 그리고 적절한 세포 증식과 분화 및 기능을 위한 바이오반응기 내에서 구조물의 조정, 등의 과정을 사용하는 전통적인 조직 공학 방법에서는 불가능한 것이다.

3D 바이오프린팅 공정은 제작하려는 세포 또는 조직 구조물에 대한 디지털 모델을 정립하는 것에서 시작된다. 이 복잡한 3D 구조의 디지털 모델 작업은 전형적인 CAD 소프트웨어로 수행된다. 3D 구조물에 대한 내부와 외부 구조 모두가 조직/장기의 대체가 필요한 환자의 CT/MRI 영상으로부터 얻은 초기 데이터로부터 디자인 될 수 있다. 영상-기초 3D 재구성 과정은 조직 대체 구조물의 3D 디지털 모델을 결정하고 소프트웨어 환경에서 가용될 수 있는 도구들은 바이오물질 매트릭스, 생물학적 분자, 그리고 살아 있는 세포의 배치를 결정하는 여러 물질 영역을 확인할 수 있도록 한다. 공정 알고리즘은 디지털 모델을 하드웨어 시스템의 구동에 필요한 프린터해

드 경로로 변환되도록 작성된다. CAM에서 기계어 명령을 위한 정확한 포맷은 프린팅 기술과 사용되는 하드웨어 구성에 따라 결정된다(Fig. 1).

생물학적 물질들의 증착과 패턴 형성을 위하여 지금까지 사용되고 있는 주된 기술들은 잉크-젯(inkjet), 압출(pressure-assisted) 및 레이저(laser-assisted) 바이오프린팅이다.

2-1. 잉크-젯 바이오프린팅(Ink-jet Bioprinting)

잘 통제되고 조절된 분량의 잉크가 미리 정해진 위치에 배송되는 잉크-젯 프린터는 비생물학적/생물학적 활용 모두에서 가장 흔히 사용되는 형태의 프린터이다. 바이오프린팅 활용에 사용된 최초의 잉크-젯 프린터는 시판되는 2D 잉크-기반 프린터의 변형으로서 카트리지 속 잉크를 생물학적 물질로 대체하고 종이도 z 축(x와 y 축에 더한 삼차원)을 제어하기 위하여 전자적으로 통제되는 엘리베이터 받침대로 대체된 것이다. 현재 잉크-젯에 기초한 프린터는 높은 분해능, 정밀성과 속도로 생물학적 물질을 다루고 프린트 하도록 디자인 되고 있다.

잉크-젯 바이오프린팅은 ‘바이오종이’(하이드로겔 기질, 배양기, 등) 위에 ‘바이오잉크’(살아 있는 세포, 바이오분자, 성장 인자 등의 저-점도 현탁액의 액적(pL~nL 크기))를 정밀하게 증착시키는 비접촉성 프린팅 공정이다. 바이오프린팅에서 주로 사용되는 DOD(drop-on-demand) 방법은 액적 분사 메커니즘에 따라 열 또는 압전(기계적 압축) 방식으로 나눈다. 두 DOD 모두에서 잉크의 점도와 표면 장력 특성이 중요하며 잉크 점도가 시스템에 따라 따르는 하지만 대표적인 값은 30 mPa/s 부근으로 보고되었다.[10] 잉크 특성에 더하여 구멍 크기, 노즐과 기질 사이의 거리, 전류 펄스 주파수와 그에 따른 온도 차(열 DOD), 전압 펄스 주파수와 변환기의 압전-변형 특성(압전 DOD) 등이 분사되는 액적 크기와 공간 분해능에 영향을 미친다.

DOD 잉크-젯 바이오프린터는 DNA와 단백질 같은 바이오분자의 구조를 만드는데 사용되었고 살아 있는 포유류 세포를 프린트 하는데 성공하였다. 조직 공학과 재생 의학 분야에서 사용되고 있는 이 기술은 단위 조각으로 다중 세포 형, 바이오물질, 또는 이들의 조합을 프린트 하는 능력을 가져 복잡한 다중세포 패턴과 구조물의 제작이 가능한 장점이 있다[11,12]. 오늘날 널리 연구되고 있는 조직과 장기의 3D 프린팅 개념은 잉크-젯 바이오프린팅에서 시작되어 발전되고 있다. 열 및 압전 DOD 모두가 세포 바이오프린팅에 사용되어 왔으나 열 DOD가 더 많이 사용되고 있다[13].

열 잉크-젯 바이오프린터는 노즐로부터 액적에 힘을 가하는 압력 펄스를 만들기 위해 프린터 헤드를 전기적으로 가열한다. 이 가열이 국소적으로 200 °C에서 300 °C에 이르는 짧은 가열 시간(~2 μs)으로 프린터 헤드 전체에 단지 4~10 °C의 온도 상승을 일으켜 DNA 같은 생물학적 물질의 안정도나 포유류 세포의 생존도 또는 인쇄 후 기능에 영향을 주지 않는다고 보고되고 있다[11,14,15]. 빠른 인쇄 속도, 낮은 비용과 넓은 활용 범위 등이 열 잉크-젯 프린터의 장점이다. 그러나 세포와 재료가 열과 기계적 응력에 노출되는 위험과 부정확한 액적 방향성, 불균일한 액적 크기, 빈번한 노즐 막힘(clogging)과 세포 캡슐화의 불확실성 등이 3D 바이오프린팅에 이 프린터들의 사용에서 고려되어야 할 약점으로 제기되고 있다.

많은 잉크-젯 프린터가 규칙적인 간격으로 액적을 만드는 프린터 헤드에서 음파를 발생시키기 위해 압전 결정체를 사용하고 있다.

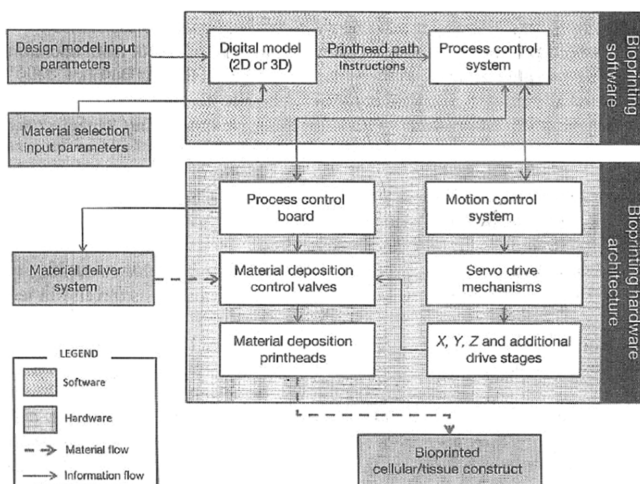


Fig. 1. General 3D bioprinting hardware and software information and material flow [9].

압전 재료에 전압을 걸어주면 급격한 형상 변화를 유발하며 이것이 노즐에서 액적을 분사하는데 필요한 압력으로 변하게 된다[16]. 다른 잉크-젯트 프린터는 공기-액체 계면으로부터 액적을 분사하기 위한 초음파 장에 수반된 음향 복사 힘(acoustic radiation force)을 사용하고 있다[17]. 액적 크기와 분사 속도를 조절하기 위하여 펄스, 지속 시간과 진폭 같은 초음파 변수들이 조정된다. 음향 잉크-젯트는 균일한 액적 크기와 분사 방향성을 조절하고 만들 수 있으며 열과 압력 응력에 세포가 노출되는 것을 피할 수 있는 장점이 있다.

잉크-젯트 세포 프린팅에 압전 메커니즘을 적용하는데 따르는 문제는 먼저 시판되는 압전 프린터에 사용되는 주파수와 전력이 세포막을 파괴하는 것으로 알려진 진동 주파수(15~25 kHz)와 전력(10~375 W)과 같은 범위에 있어 세포 분해를 일으킬 수 있다는 점이다[12]. 또 점도가 높은 용액을 사용하여 액적을 사출하는데 필요한 과잉의 힘 때문에 물질의 점도에 따르는 제한도 있다[18]. 주파수와 전력을 낮추기 위하여 점도가 낮은 잉크를 압전 프린터에 사용하면 프린팅 중에 잉크 누설과 미세한 물방울의 생성으로 공간 그리고 형상 분해능에 영향을 미친다. 최근 압전 프린터를 이용하여 사람 조골세포, 섬유아세포, 그리고 소 연골세포를 포함한 포유류 세포를 90% 이상의 생존도로 성공적으로 증착시킬 수 있는 연구 결과가 발표되었다[19].

잉크-젯트 바이오프린팅에서 공통적인 하나의 단점은 액적을 생성하기 위하여 생물학적 물질을 액체 형태로 만들어야 하며, 결과적으로 프린팅 후에 액체가 고체 구조 유기체와 기능성을 가진 3D 구조로 변환되어야 한다는 점이다. 여러 연구진들이 프린팅에 의한 증착 후에 화학적, pH, 또는 UV 메커니즘을 사용하여 교차결합 될 수 있는 재료를 사용함으로써 이러한 한계를 극복할 수 있다고 보고하였다[20,21]. 그러나 교차결합을 위한 요건이 흔히 바이오프린팅 공정을 지연시키고 자연계에 있는 ECM 물질에 대한 화학적 변형을 일으키면 이로서 세포 생존도와 기능성이 감소하게 된다. 여기에 더하여 어떤 교차결합 메커니즘은 세포에 유독한 생성물 또는 조건이 필요하고 이 또한 생존도와 기능성을 떨어뜨린다. 잉크-젯트-기초 바이오프린팅 기술의 사용에서 직면하는 또 다른 제약은 생물학적으로 연관된 세포 밀도를 얻기 어렵다는 데 있다. 흔히 액적 생성을 쉽게 하고 노즐 막힘을 피하고 전단 응력을 줄이기 위하여 낮은 세포 밀도(<10,000,000 cells/ml)가 사용된다[19]. 보다 높은 세포 농도는 하이드로겔 교차결합 메커니즘을 방해할 수도 있다.

2-2. 압출 바이오프린팅(PAB, Pressure-Assisted Bioprinting)

압출은 비생물학적 3D 프린터에서 가장 일반적으로 사용되는 방법으로서 일반적으로 온도-조절, 재료-취급 및 분배 시스템과, 하나 또는 둘 다 x, y, 그리고 z 축을 따라 움직일 수 있고 증착 표면을 비추거나 광개시제 활성을 위한 광섬유 광원, x-y-z 명령과 조절을 위한 비디오카메라, 그리고 압전 가습기를 장착한 받침대로 구성되어 있다. 몇몇 시스템은 재장전 하지 않고 여러 재료를 연속적으로 분배하기 쉽도록 다중 프린트 헤드를 사용한다[22]. 전 세계적으로 약 30,000 세트의 3D 프린터가 매년 판매되고 있으며 조직 및 장기 공학 연구에서 미세압출 기술의 활용이 증가하고 있다[23]. 3D 바이오프린팅에서 생물학적 물질을 압출하기 위하여 일반적으로 공기압출(pneumatic) 또는 기계식(피스톤 또는 나선식) 압출 방법이 가장 많이 활용되고 있다[24-28].

PAB는 컴퓨터로 조정된 3D 패턴과 구조물을 만들 수 있는 압출

적층 제조 공정으로 폴리머와 세라믹을 포함하는 바이오물질, 단백질과 바이오분자, 살아 있는 세포, 그리고 성장 인자와 그들의 혼성 구조물들이 이 기술로 제작될 수 있다. 세포를 프린팅하기 위한 바이오잉크는 기본적으로 세포 생존력을 유지하기 위하여 37 °C 부근 온도에서 미세 노즐 구멍 또는 주사 바늘을 통하여 압출될 수 있는 적당한 점도를 가진 세포-담재 하이드로겔이다. 압출된 구조물의 기계적 전전성은 열- 또는 화학-교차 결합 반응, 또는 다중 물질 채널 후-증착을 통하여 조절될 수 있다.

전통적인 지지체 제작 공정인 염 침출과 용매 주조 같은 과정으로는 제조될 수 없는 공극 구조를 CAD/CAM-조절 적층 방법으로 제작이 가능하므로 PAB가 조직 공학 지지체를 제작하는데 활용되고 있다. 3D 바이오프린팅 압출 증착 공정을 활용하여 polycaprolactone (PCL), poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA), poly-L-lactic acid (PLLA), polyethyleneglycol (PEG), 같은 폴리머, 그리고 이들과 hydroxyapatite 같은 세라믹 복합체, 등을 사용한 지지체의 디자인과 최적화에 대한 연구들이 수행되었다[22]. PAB는 문헌에 소개된 일련의 생체적합성 재료들을 사용하는 공정에 적합한 대단히 광범위한 유체 특성을 가지고 있다. 높은 점도를 가진 재료는 프린트 된 구조물에 구조적 지지체를 만드는데 사용된다. 세포 생존도와 기능을 유지하는데 유리한 보다 낮은-점성을 가진 재료(30 mPa/s에서 >6×10⁷ mPa/s까지 범위의 점도를 가진)들이 미세압출 PAB에 사용할 수 있는 것으로 보고되어 있다[29].

PAB에서는 열적으로 교차결합 될 수 있거나 전단유동화(shear-thinning) 특성을 가진 재료들이 흔히 사용된다. 몇몇 생체적합성 재료들은 실온에서 흐를 수 있고 이것은 생리학적인 온도에서 교차 결합으로 안정한 재료로 되는 다른 생물학적 물질들과 함께 압출 할 수 있다[30]. 생리학적으로 적당한 온도(35~40 °C)에서 유동적이거나 실온에서 교차 결합하는 또 다른 재료들도 바이오프린팅에서 유용하다[31]. 전단유동화 특성을 가진 재료들이 일반적으로 미세압출에서 활용되며 이 비-뉴턴 재료 거동은 전단 속도 증가에 반응하여 점도가 감소한다[32]. 제작 과정에서 노즐에 존재하는 높은 전단 속도가 이들을 노즐을 통해 흐르게 하고 증착과정에서 점도의 급격한 증가를 일으켜 전단 속도가 감소한다. 미세압출 시스템의 높은 분해능은 CAD 소프트웨어를 사용하여 디자인된 복잡한 구조를 바이오프린터가 정확히 제작할 수 있도록 하며 다중세포 형 패턴 생성을 쉽도록 한다.

PAB 기술의 주 장점은 대단히 높은 세포 밀도로 증착이 가능하다는 것이다. 조직-공학적인 장치에서 생물학적 세포 밀도를 달성하는 것은 3D 바이오프린팅 분야에서 주요한 목표이다. 어떤 연구진들은 미세압출 프린팅으로 3D 조직을 생성하기 위하여 단지 세포로만 구성된 용액을 사용하였으며 다중 세포 소구체들은 증착된 다음 자기-응집으로 원하는 3D 구조를 만든다[33,34]. 조직 소구체들은 조직 세포외기질(extracellular matrix)의 기계적 그리고 기능적 특성을 복제할 수 있는 재료 특성을 가진다. 조직 세포 소구체로 이루어진 빌딩 블록의 점탄성 특성에 따라 인접한 세포 응집체가 서로 융합하여 응집력 있는 큰 구조물을 만든다. 자기-응집 소구체 전략의 이점은 조직 구성을 촉진하고 복잡한 구조를 생성할 수 있는 잠재력이 있다는 것이다. 이 방법은 3D 바이오프린터로 만든 장치에서 프린트-후 조직 내에 분기된 혈관 또는 자기-응집 혈관 조직 소구체 패턴 형성에 의한 조직 구조물에서 장기 내 분기 혈관의 생성이 가능하다는 점에서 유망하다. 지지체-없는 조직 소구체 바이오프린팅

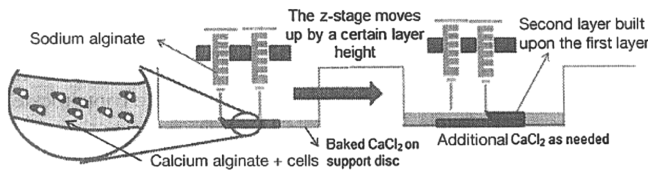


Fig. 2. Preparation of calcium alginate-base hydrogel by PAB. (Sodium alginate and CaCl_2 were used as cross-linking agents)[9].

을 위해 사용되는 가장 일반적인 방법은 기계적 PAB 방식이다.

최근 장기 프린팅에 대한 개념의 등장으로 PAB를 이용한 세포-캡슐화 하이드로겔의 직접 프린팅에 대한 연구들이 수행되었다. 초기의 구조 지지체를 저온 주사기로부터 압출된 gelatin의 교차-결합으로 만든 다음 화학 교차-결합으로 더욱 강화하는 과정을 거쳐 완성된 이 구조물의 우수한 세포 생존도와 기능이 간 조직 마커(urea와 albumin 생성물)에 의하여 확인되었다. Gelatin/chitosan 구조물의 효소 분해로 3D 구조물을 안정시키는데 어려움이 있지만 이 공정으로 바이오펜질 내의 살아 있는 세포를 직접 증착하는 것을 가능하게 되었다[35]. 또 gelatin 하이드로겔에 캡슐화한 adipose-유도 줄기 세포와 간세포의 동시 증착에 의한 생체모방 3D 구조물들이 PAB로 제작되었다[36,37]. 최근에는 PCL과 조골세포-탐재 alginate의 혼성 구조물이 제작되었고 같은 방법으로 PCL/PLGA 구조 폴리머와 조골모세포를 함유한 콜라겐을 함유한 혼성 구조물이 제작되는 등, 다 물질 다기능 구조물이 PAB에 의하여 제작되고 있다[38](Fig. 2).

이와 같이 폴리머와 세포-탐재 하이드로겔 복합체를 사용하는 전략으로 구조 골격으로 PCL을, 수용성 PEG를 희생 물질로, alginate 하이드로겔에 캡슐화한 adipose-유도된 기질 세포로부터 분화된 연골세포/지방세포를 생물학적 성분으로 하여 생육 가능한 껍따귀가 성공적으로 제작되었다. 이 구조물의 구조 건전성과 형태 유지, >90%의 연골세포 생존도, 그리고 고주파 수용에 대한 증강된 청각, 등이 프린트된 3D 구조물에서 입증되었다[39]. 최근에는 심장 판막[40], 분기 혈관[41], 그리고 *in vitro* 약력학적 모델[42] 및 암 모델[43], 등을 포함하는 다양한 조직 형태의 제작에도 PAB가 사용되고 있다. 복잡한 구조를 고-분해능으로 제조하는데 제작 시간이 오래 걸리기는 하나 PAB 장치를 이용하여 임상 조직 크기에서 미세-조직 크기에 이르는 구조물들이 제작되고 있다.

2-3. 레이저 바이오프린팅(LAB, Laser-assisted Bioprinting)

LAB는 원래 금속을 운반하기 위하여 개발된 레이저-유발 전방 운반(forward transfer)의 원리에 기초한, 세포를 사용한 바이오펜질을 기질 상에 증착하기 위하여 펄스 레이저 빔을 이용하는 일련의 비접촉 직접 프린팅 공정이다. 대부분의 LAB 시스템에서 자외선 또는 근자외선 파장을 가진 레이저를 펄스 레이저 광원, 바이오잉크-도포된 '리본', 그리고 수용체 기질이 핵심적인 세 구성 요소이다. '리본'은 레이저 광 파장 투과성이고 한 면이 바이오폴리머에 부착되었거나 하이드로겔 박막으로 캡슐화 된 세포로 구성된 광 민감성 바이오잉크로 도포된 유리 또는 수정을 사용한다. 바이오잉크의 광학 특성과 레이저의 파장에 따라 표적과 바이오잉크 사이에 생 세포 이송을 위한 레이저-흡수 층이 시스템에 포함될 수도 있다. 리본의 바이오잉크-도포면 아래에 위치한 수용체는 세포 부착을 유지하여 리본으로부터 세포 이송 후 성장을 지속하기 위한 바이오폴리머 또는 세포 배지가 도포되어 있다(Fig. 3).

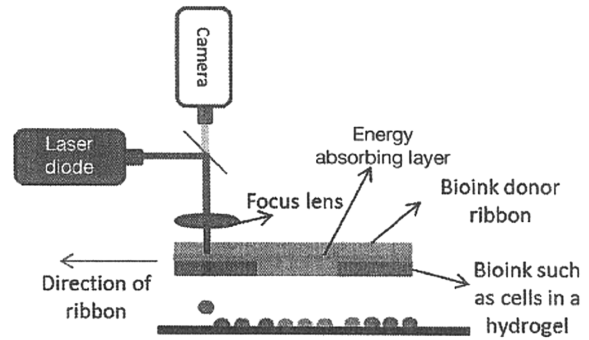


Fig. 3. Schematics of a laser-assisted bioprinting system [9].

LAB의 분해능은, 레이저 fluence(단위 면적 당 전달된 에너지), 표면 장력, 기질의 습윤도(wettability), 리본과 기질 간의 간격, 생물학적 층의 두께와 점도, 등을 포함하는 여러 변수들의 영향을 받는다[44]. LAB는 노즐이 없기 때문에 다른 바이오프린팅 기술에서 문제가 되는 노즐 막힘을 피할 수 있다. LAB는 광범위한 점도(1~300 mPa/s)에 적합하고 세포 생존도와 기능에 미치는 영향 없이 포유동물 세포를 바이오프린트 할 수 있다[45]. 5 kHz의 레이저 펄스 반복율을 사용한 LAB에서 1,600 mm/s의 속도로 액적 당 단일 세포 분해능, 10^8 세포/ml 세포 밀도까지 증착할 수 있음이 보고되었다[46].

LAB 원리에 기초한 기술로서 AFA-LIFT (absorbing film-assisted laser-induced forward transfer) 또는 BioLP (biological laser processing) 및 MAPLE-DW (matrix-assisted pulsed laser evaporation direct writing), 등이 사용되고 있다[47]. AFA-LIFT와 BioLP에서는 바이오잉크를 기질 위에 증착하는데 고출력 펄스 레이저를 사용한다. 세포가 고출력 레이저 빔에 직접 노출되는 것을 막기 위하여 희생 금속(Au, Ag, Ti) 또는 금속 산화물(TiO_2) 박막(~100 nm)이 표적 판과 바이오잉크 사이의 계면에 포함된다. AFA-LIFT와 BioLP와는 달리 MAPLE-DW는 저출력 펄스 레이저와 세포 이송을 위해 금속 박막 대신 Matrigel® 같은 하이드로겔을 희생 계면 층으로 사용한다. 또 다른 LAB 기술인 LG-DW (laser-guided direct writing)는 위에서 기술한 LAB와는 달리 펄스 레이저 또는 프린트 리본을 사용하지 않는다. 그 대신 약하게 집속된 연속 레이저의 광학 에너지를 표적에 직접 사용하고 세포 현탁액으로부터 개별 세포를 기질 위에 부착한다. 레이저 광원, 바이오잉크, 기질, 계면 리본 층, 등에 관련된 몇몇 변수들이 LAB의 분해능과 성능에 영향을 미친다[8].

MAPLE-DW는 처음으로 포유류 세포의 레이저-기초 프린팅의 가능성을 입증한 기술 중 하나이다. 이 기술을 사용하여 CHO (Chinese hamster ovary) 세포 패턴을 프린팅 하였으며, 같은 기술을 사용하여 쥐 암종 세포(P19), 사람 뼈 육종(MG-63), 그리고 쥐 심장 세포를 프린트 하였다(생존도 >95%). 최근에는 사람 피부 섬유아세포, 쥐 C2C12 근육 모세포, 소의 폐동맥 내피 세포, 유방암(MCF-7), 그리고 쥐 신경 줄기 세포의 살아 있는 패턴을 얻는데 성공하였다[48]. AFA-LIFT와 BioLP도 사람 뼈 육종(MG-63), 사람 배꼽 정맥 내피 세포, 사람 배꼽 혈관 평활근 세포를 포함한 다양한 세포형을 프린트 하는데 성공적으로 사용되었다[49].

세포로 구성된 피부 구조물을 제작하기 위한 LAB 활용은 임상학적 세포 밀도를 가진 적층 조직 구조물을 인쇄할 수 있음을 입증하였으나 이 시스템이 보다 큰 조직 구조물을 위한 대형화를 할 수 있는지는 아직 불투명하다. LAB는 쥐 두개골 3D 손상 모델에서 NHA

(nano-hydroxyapatite)를 *in vivo* 증착하는 연구의 개념-증명으로 사용되었다[50]. 레이저 3D 프린팅은 맞춤형, 비 세포, 바이오재흡수성 호흡기용 스프린트 같은 의학용 디바이스를 제작하는데 사용되었다. 이 디바이스는 국소 상기도연화증을 가진 어린 환자에게 이식되었다[51]. 앞으로의 연구에서는 환자의 조직에 직접 결합할 수 있는 재료들이 사용될 것이다. 또한 환자 자신의 세포를 결합함으로써 조직의 구조적 그리고 기능적 구성 성분 모두에 기여할 수 있는 이러한 형태의 구조물들의 활용을 더욱 용이하게 할 것이다.

2-4. 솔레노이드 밸브(Solenoid valve-based) 바이오프린팅

압출 기술의 하나인 솔레노이드 밸브를 이용한 미량분배는 전지 기관 위에 접착제 증착, 광학 및 전기 폴리머의 증착, 그리고 DNA, 단백질, 진단시약 같은 바이오분자의 증착에 활용되고 있다. 이 시스템은 그 자체로 피부 재생, 조직 우물 판 위에 중간엽 줄기 세포의 프린팅 및 통제된 환경 내에서 구조물 프린팅 등을 할 수 있다. 전체 시스템은 액체 저장기, 5 pL~10 pL 부피의 액체를 분배하는 솔레노이드 디바이스, 노즐 온도를 조절하는 열 소자, 공기압 조절기, 그리고 불활성 기체 통으로 구성되며 다중 프린터 헤드 장치가 시스템의 생산성을 올리기 위해 장착될 수 있다(Fig. 4).

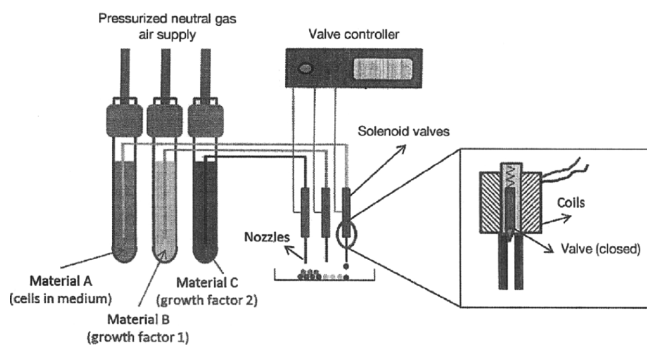


Fig. 4. Schematics of a solenoid valve-based bioprinting system [9].

이 기술을 이용하여 신경 세포 계, VEGF (vascular endothelial growth factor)를 함유한 섬유소 매트릭스, 콜라겐 하이드로겔로 구성된 구조물의 주문 제작을 위한 시스템이 보고되었다. 섬유소 겔을 카트리지에 미리 충전할 수 없으므로 구성 성분들 fibrinogen, thrombin과 heparin을 따로 두 개의 카트리지에 넣고, 프린트 할 신경 세포를 넣은 세 번째 카트리지와 콜라겐 겔의 교차결합 시약 중 탄산소다 용액을 네 번째 카트리지로 시스템을 구성하였다. 두께 500 μ m 콜라겐 구조물 내의 세포 생존도는 93% 이상으로 보고되었다. 이 연구는 세포 증식과 분화에 영향을 미치는 구조물 공간 내부 정확한 위치에 원하는 농도의 VEGF를 분배할 수 있는 가능성을 입증하였다[52]. 같은 기술을 사용하여 표피와 진피를 발현하는 섬유

유모세포와 케라틴형성세포를 콜라겐과 함께 바이오프린팅 하여 사람 피부를 제작하는 기술이 개발되었다. 이 연구는 복잡한 생체 시스템을 제작할 수 있는 가능성을 보여주는 대표적인 예로서 프린트된 피부는 국소 제제 개발과 상처 치료를 위한 동종이식에 따르는 선별을 위하여 활용되었다[53].

위에서 기술된 3D 바이오프린팅 기술에서 가장 중요한 요소인 표면 분해능, 세포 생존도(cell viability), 그리고 바이오프린팅에서 사용되는 생물학적 물질, 등의 제각기 다른 양상들이 3D 바이오프린팅 기술의 활용에서 고려되어야 한다(Table 1).

3. 바이오화학에서 3D 바이오프린팅

3D 프린팅은 미세유체 및 lab-on-a-chip 분야에서 실질적으로 큰 영향을 미치고 있다. 바이오분석 연구를 위한 3D 프린팅은 지금까지 세포 패턴링 조절하는 3D 환경을 만들기 위하여 사용하는 SL (soft lithography)연구의 연장으로 보인다. 이 분야에서 SL이 성공적으로 활용되고 있으나 3D 프린팅 기술을 사용함으로써 얻을 수 있는 이점들도 있다. RP (rapid prototyping) 도구로서 SL-기초 PDMS (polydimethylsiloxane) 미세유체 디바이스의 매력은 짧은 시간에 원하는 효과를 얻을 때까지 미세-조정을 쉽게 하는 사용자의 능력에 달려있다. 재래식 기술이 가진 장점도 있으나 3D 프린팅 기술이 재래식 복제 금형 기술의 단점을 보완할 수 있는 해결책이 될 수 있을 것이다.

미세유체에 활용된 3D 프린팅 기술 중 하나는 층류 하에서 확산-기초 혼합뿐 아니라 난류로 혼합할 수 있는 100~300 μ m 원통 채널로 구성된 복합 미소혈관 네트워크의 제작이다. 미소혈관 지지체는 DW 3D 프린팅 기술로 중발 유기 잉크를 층층으로 침착하여 16층 지지체를 제작하고 그 후에 고형 지지체를 만들기 위하여 실온-건조되는 epoxy 수지를 도포한 다음 60 °C에서 진공 건조하여 잉크를 중발시키면 수 십 nm 크기 차수 평균제곱근 편차의 표면 거칠기를 가진 상호 연결된 채널을 만들 수 있다[55].

유기 합성을 위한 화학반응 디바이스(총량 0.65 mL)를 3D 프린팅 기술로 제작하고 ESI-MS (Electrospray Ionization Mass Spectrometer)와 연결하여 합성된 유기 생성물을 분석할 수 있는 디바이스가 제작되었다. 이 디바이스는 FDM 3D 프린터를 사용하여 화학적으로 불활성인 polypropylene으로 제작되었으며 크기는 46.5×80 mm, 내부 지름 1.5 mm, 합성 중 반응 유체 속도를 62.5에서 312.5 μ L/min 까지 변화시킬 수 있다. 같은 3D 프린팅 기술로 만든 다른 polypropylene 디바이스는 지름 0.8 mm 원통 채널인 반응 공간(총 반응 부피가 60 μ m)으로 구성되어 있다. 이러한 유기 합성 반응 디바이스의 이점은 몇 시간 내에 제작할 수 있고 재사용이 가능하며, mm 크기의 디바이스는 생성물에서 생기는 막힘을 피할 수 있다는 점이다[56].

Table 1. Comparison of bioprinter types [54]

	Bioprinter type		
	Ink-jet	Pressure-assisted	Laser-assisted
Material viscosity	3.5~12 mPa/s	30 mPa/s to $>6 \times 10^7$ mPa/s	1~300 mPa/s
Gelation methods	Chemical, photo-crosslinking	Chemical, photo-crosslinking, shear thinning, temperature	Chemical, photo-crosslinking
Preparation time	Low	Low to medium	Medium to high
Print speed	Fast (1~10,000 droplets/second)	Slow (10~50 μ m/s)	Medium fast (200~1,600 mm/s)
Resolution or droplet size	<1 pL to >300 pL droplets, 50 μ m wide	5 μ m to millimeters wide	Microscale resolution
Printer cost	Low	Medium	High

최근 디바이스를 통한 약물 수송 관찰, 삽입 막에서 배양된 세포에 영향을 줄 수 있는 통합 연결체와 막을 삽입한 다중 채널 디바이스가 3D 프린터로 제작되었다. 다중 잉크젯 프린터를 사용하여 제작된 이 디바이스는 100에서 2000 nM 농도범위의 두 항생물질을 1 μ L/min 속도로 세포 배양 삽입 막 아래 채널에 흘리고 채취한 시료를 MS로 분석하는 약물 수송 연구 목적으로 활용되었다[57].

4. 결론 및 전망

최근에 개발되고 있는 3D 바이오프린팅에 기초한 방법들은 생물학적 3D 구조물의 제작에서 다른 경쟁 방법들을 능가하는 다음과 같은 장점들을 가지고 있다. 1) 2D 및 3D 구조물 모두를 만들 수 있고, 2) 다중-크기 패턴으로 정해진 공간 구조에 둘 또는 그 이상의 다른 형태의 세포들을 함께 심을 수 있으며, 3) CNC-기초 시스템에서와 같이 단순한 스위칭 조작으로 혼성 과정을 수행할 수 있는 융통성을 가지며, 4) 디지털 공정은 공정에 수반되는 컨트롤 시스템으로 공정 변수들을 조정하여 원하는 구조물의 특성을 만족시킬 수 있다.

기존의 기술을 개량하는 것이 아니라 특정 생화학적 성분을 취급하기 위한 3D 바이오프린터 디자인을 시작하려면 적합한 재료의 범위를 확대해야 하고 재료 증착에서 정밀도와 특이성을 증가시키는 방법이 개발되어야 하며 실제 쓸 수 있는 크기를 가진 구조물 제작 속도도 빨라져야 한다. 이를 달성하기 위한 하나의 방안은 소형 기능성 블록을 제작하고 마이크로-지지체를 사용하여 블록을 결합시킴으로써 크기를 키우는 것이다. 상업화를 위하여 바이오제작 생산라인의 각 성분들을 통합하는 자동화 로봇 기술이 필요하게 된다. 여기에는 바이오프린팅 디바이스 뿐 아니라 재료, 생체물질 및 지지체 성분의 제조도 포함된다.

바이오프린팅에 사용되는 재료들도 세포 성장과 기능에 적합할 뿐 아니라 그들의 교차결합 또는 압출 특성도 고려하여 선택되어야 한다. 이러한 이유로 많은 연구들에서 collagen, hyaluronic acid, alginate, 변형 공중합체와 광경화성 acrylate를 포함하는 제한된 범위의 재료들만을 사용하고 있다. 하이드로겔의 바이오프린팅 가능성을 결정하는 주된 이화학적 변수들은 유변학적(rheological) 특성과 교차결합 메커니즘이다. 바이오프린팅에 유용한 재료는 바이오 적합성, 복잡한 3D 구조물로 증착시키는 바이오프린터 기술로 쉽게 조작할 수 있어야 원하는 기계적/기능적 특성도 재현될 수 있을 것이다[58,59].

3D-바이오프린팅에 의하여 제작되는 조직 구조물들은 신약 개발, 화학적, 생물학적, 독성학적 화합물의 분석과 기초 연구에도 활용되고 있다. 3D 프린팅 기술이 발전됨에 따라 이 분야에서 3D 바이오프린팅 기술이 더욱 유망한 활용분야가 될 것으로 기대된다.

감 사

이 자료는 미래창조과학부 과학기술진흥기금 및 복권기금의 지원을 받은 RESEAST program으로 이루어 진 것입니다.

References

1. Hull, C. W., "Apparatus for Production of Three-dimensional

- Objects by Stereolithography," U. S. Patent 4575330A(1986).
2. Shimizu, T. S., Le Novère, N., Levin, M. D., Beavil, A. J., Sutton, B. J. and Bray, D., "Molecular Model of a Lattice of Signalling Proteins Involved in Bacterial Chemotaxis," *Nature Cell Biology*, **2**, 792-796(2000).
3. Symes, M. D., Kitson, P. J., Yan, J., Richmond, C. J., Cooper, G. J. T., Bowman, R. W., Vilbrandt, T. and Cronin, L., "Integrated 3D-printed Reactionware for Chemical Synthesis and Analysis," *Nature Chemistry*, **4**, 349-354(2012).
4. Nakamura, M., Iwanaga, S., Henmi, C., Arai, K. and Nishiyama, Y., "Biomatrices and Biomaterials for Future Developments of Bioprinting and Biofabrication," *Biofabrication*, **2**, 014110(2010).
5. Griffith, L. G. and Naughton, G., "Tissue Engineering: Current Challenges and Expanding Opportunities," *Science*, **295**, 1009-1016(2002).
6. Mikos, A. G. and Temenoff, J. S., "Formation of Highly Porous Biodegradable Scaffolds for Tissue Engineering," *Electron. J. Biotechnol.*, **3**, 114-119(2000).
7. Tsang, V. L. and Bhatia, S. N., "Three-dimensional Tissue Fabrication," *Advanced Drug Delivery Reviews*, **56**(11), 1635-1647(2004).
8. Derby, B., "Printing and Prototyping of Tissues and Scaffolds," *Science*, **338**, 921-926(2012).
9. Starly, B. and Shirwaiker, R., "3D Bioprinting Techniques," In: Zhang, L. G., Fisher, J. P. and Lerong, K. W. (eds.) *3D Bioprinting and Nanotechnology in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Academic Press, 57-77(2015).
10. Derby, B., "Bioprinting: Inkjet Printing Proteins and Hybrid Cell-Containing Materials and Structures," *Journal of Materials Chemistry*, **18**, 5717-5721(2008).
11. Okamoto, T., Suzuki T. and Yamamoto, N., "Microarray Fabrication with Covalent Attachment of DNA," *Nature Biotechnology*, **18**, 438-441(2000).
12. Delaney, Jr., J. T., Smith, P. J. and Schubert, U. S., "Inkjet Printing of Proteins," *Soft Matters*, **5**, 4866-4877(2009).
13. Cui, X., Boland, T., D'Lima, D. D. and Lotz, M. K., "Thermal Inkjet Printing in Tissue Engineering and Regenerative Medicine," *Recent Patents on Drug Delivery and Formulation*, **6**(2), 149-155(2012).
14. Goldmann, T. and Gonzalez, J. S., "DNA-printing: Utilization of a Standard Inkjet Printer for the Transfer of Nucleic Acids to Solid Supports," *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **42**, 105-110(2000).
15. Cui, X., Dean, D., Ruggeri, A. M. and Boland, T., "Cell Damage Evaluation of Thermal Inkjet Printed Chinese Hamster Ovary Cells," *Biotechnology and Bioengineering*, **106**, 963-969(2010).
16. Tekin, E., Smith, P. J. and Schubert, U. S., "Inkjet Printing as a Deposition and Patterning Tool for Polymers and Inorganic Particles," *Soft Matters*, **4**, 703-713(2008).
17. Demirci, U. and Montesano, G., "Single Cell Epitaxy by Acoustic Picolitre Droplets," *Lab on a Chip*, **7**, 1139-1145(2007).
18. Kim, J. D., Choi, J. S., Kim, B. S., Choi, Y. C. and Cho, Y. W., "Piezoelectric Inkjet Printing of Polymers: Stem Cell Patterning on Polymer Substrates," *Polymer*, **51**, 2147-2154(2010).
19. Saunders, R. E., Bosworth, L., Gough, J. E. and Derby, B., "Delivery of Human Fibroblast Cells by Piezoelectric drop-on-demand Inkjet Printing," *Biomaterials*, **29**, 193-203(2008).

20. Murphy, S. V., Skardal, A. and Atala, A., "Evaluation of Hydrogels for Bio-printing Applications," *Journal of Biomedical Materials Research A*, **101**, 272-284(2013).
21. Khalil, S. and Sun, W., "Biopolymer Deposition for Freeform Fabrication of Hydrogel Tissue Constructs," *Material Science and Engineering C*, **27**, 469-478(2007).
22. Smith, C. M., Stone, A. L., Parkhill, R. L., Stewart, R. L., Simpkins, M. W., Kachurin, A. M., Warren, W. L. and Williams, S. K., "Three-dimensional Bioassembly Tool for Generating Viable Tissue-engineered Constructs," *Tissue Engineering*, **10**, 1566-1576 (2004).
23. Jones, N., "Science in Three Dimensions: the Print Revolution," *Nature*, **487**, 22-23(2012).
24. Chang, C. C., Boland, E. D., Williams, S. K. and Hoying, J. B., "Direct-writing Bioprinting Three-dimensional Biohybrid Systems for Future Regenerative Therapy," *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, **98**, 106-170(2011).
25. Fedorovich, N. E., Swennen, I., Girones, J., Moroni, L., van Blitterswijk, C. A., Schacht, E., Alblas, J. and Dhert, W. J. A., "Evaluation of Photocrosslinked Lutrol Hydrogel for Tissue Printing Applications," *Biomacromolecules* **10**, 1689-1695(2009).
26. Chang, R., Nam, J. and Sun, W., "Effects of Dispensing Pressure and Nozzle Diameter on Cell Survival from Solid Freeform Fabrication-based Direct Cell Writing," *Tissue Eng. Part A*, **14**, 41-48(2008).
27. Jakab, K., Damon, B., Neagu, A., Kachurin, A. and Forgacs, G., "Three-dimensional Tissue Constructs Built by Bioprinting," *Biorheology*, **43**, 509-513(2006).
28. Visser, J., Peters, B., Burger, T. J., Boomstra, J., Dhert, W. J. A., Michels, F. P. W. and Malda, J., "Biofabrication of Multi-material Anatomically Shaped Tissue Constructs," *Biofabrication*, **5**, 035007(2013).
29. Park, S. A., Lee, S. H. and Kim, W. D., "Fabrication of Porous Polycaprolactone/hydroxyapatite(PCL/HA) Blend Scaffold Using a 3D Plotting System for Bone Tissue Engineering," *Bioprocess and Biosystem Engineering*, **34**(4), 505-513(2011).
30. Schuurman, W., Levett, P. A., Pot, M. W., van Weeren, P. R., Dhert, W. J. A., Huttmacher, D. W., Melchels, F. P. W., Klein, T. J. and Malda, J., "Gelatin-methacrylamide Hydrogels as Potential Biomaterials for Fabrication of Tissue-engineered Cartilage Constructs," *Macromolecular Bioscience*, **13**, 551-561(2013).
31. Smith, C. M., Christian, J. J., Warren, W. L. and Williams, S. K., "Characterizing Environmental Factors that Impact the Viability of Tissue-engineered Constructs Fabricated by a Direct Write Bioassembly Tool," *Tissue Engineering*, **13**, 373-383(2007).
32. Guvendiren, M., Lu, H. D. and Burdick, J. A., "Shear-thinning Hydrogels for Biomedical Applications," *Soft Matters*, **8**, 260-272(2012).
33. Mironov, V., Kasyanov, V. and Markwald, R. R., "Organ Printing from Bioprinter to Organ Biofabrication Line," *Current Opinions in Biotechnology*, **22**, 667-673(2011).
34. Marga, F., J. K., Khatriwala, C., Shepherd, B., Dorfman, S., Hubbard, B., Colbert, S. and Forgacs, G., "Toward Engineering Functional Organ Modules by Additive Manufacturing," *Biofabrication*, **4**, 022001(2012).
35. Xu, W. Wang, X., Yan, Y., Zheng, W., Xiong, Z., Lin, F., Wu, R. and Zhang, R., "Rapid Prototyping Three-dimensional Cell/gelatin/ Fibrinogen Constructs for Medical Regeneration," *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, **22**, 363-377(2007).
36. Xu, M. Yan, Y., Liu, H., Yao, R. and Wang, X., "Controlled Adipose-derived Stromal Cell Differentiation Into Adipose and Endothelial Cells in a 3D Structure Established by Cell-assembly Technique," *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, **24**(1 suppl), 31-47(2009).
37. Li, S., Xiong, Z., Wang, X., Yan, Y., Liu, H. and Zhang, R., "Direct Fabrication of a Hybrid Cell/hydrogel Construct by a Double Nozzle Assembling Technology," *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, **24**, 249-265(2009).
38. Shim, J.-H., Kim, J. Y., Park, M., Park, J. and Cho, D.-W., "Development of a Hybrid Scaffold with Synthetic Biomaterials and Hydrogel Using Solid Freeform Fabrication Technology," *Biofabrication*, **3**, 034102(2011).
39. Lee, J.-S., Hong, J. M., Jung, J. W., Shim, J.-H., Oh, J.-H. and Cho, D.-W., "3D Printing of Composite Tissue with Complex Shape Applied to Ear Regeneration," *Biofabrication*, **6**, 024103(2014).
40. Duan, B., Hokaday, L. A., Kang, K. H. and Butcher, J. T., "3D Bioprinting of Heterogeneous Aortic Valve Conduits with Alginate/gelatin Hydrogels," *Journal of Biomedical Materials Research A*, **101**, 1255-1264(2013).
41. Norte, C., Marga, F. S., Niklason, L. E. and Forgacs, G., "Scaffold-free Vascular Tissue Engineering Using Bioprinting," *Biomaterials*, **30**, 5910-5917(2009).
42. Chang, R., Nam, J. and Sun, W., "Direct Cell Writing of 3D Microorgan for in vitro Pharmacokinetic Model," *Tissue Engineering Part C Methods*, **14**, 157-166(2008).
43. Xu, F., Celli, J., Rizvi, I., Moon, S., Hasan, T. and Demirci, U., "A Three-dimensional in vitro Ovarian Cancer Coculture Model Using a High-throughput Cell Patterning Platform," *Biotechnology Journal*, **6**, 204-212(2011).
44. Guillemot, F., Souquet, A., Catros, S. and Guillotin, B., "Laser-assisted Cell Printing: Principle, Physical Parameters Versus Cell Fate and Perspectives in Tissue Engineering," *Nanomedicine*, **5**, 507-515(2010).
45. Hopp, B., Smausz, T., Kresdz, N., Barna, N., Bor, Z., Kolozsdvari, L., Chrisey, D. GB., Szabo, A. and Nogra, A., "Survival and Proliferative Ability of Various Living Cell Types After Laser-induced Toward Transfer," *Tissue Engineering*, **11**, 1817-1823(2005).
46. Guillotin, B., Souquet, A., Catros, S., Duocastella, M., Pippenger, B., Bellance, S., Bareille, R., Remy, M., Bordenave, L., Amedee, J., and Guillemot, F., "Laser Assisted Bioprinting of Engineered Tissue With High Cell Density and Microscale Organization," *Biomaterials*, **31**, 7250-7256(2010).
47. Barron, J., Wu, P., Andouceur, H. and Ringeisen, B., "Biological laser printing: a novel technique for creating heterogeneous 3- dimensional cell patterns", *Annals of Biomedical Engineering*, **6**(2), 121-130(2005).
48. Schiele, N. R., Chrisey, D. B. and Corr, D. T., "Gelatin-based Laser Direct-write Techniques for the Precise Spatial Patterning of Cells," *Tissue Engineering Part C Methods*, **17**(3), 289-298 (2011).
49. Schiele, N. R., Corr, D. T., Huang, Y., Xie, Y. Roaf, N. A. and Chrisey, D. B., "Laser-based Direct-write Techniques for Cell Printing," *Biofabrication*, **2**(3), 032001(2010).

50. Keriquel, V., Guillemot, F., Arnaut, I., Guillotin, B., Miraux, S., Amédée, J., Fricain, J.-C. and Catros, S., "In vivo Bioprinting for Computer- and Robotic-assisted Medical Intervention: Preliminary Study in Mice," *Biofabrication*, **2**, 014101(2010).
51. Zopf, D. A., Hollister, S. J., Nelson, M. E., Ohye, R. G. and Green, G. E., "Bioresorbable Airway Splint Created with a Three- Dimensional Printer," *The New England Journal of Medicine*, **368**, 2043-2045(2013).
52. Lee, Y. B., Polio, S., Lee, W., Dai, G. Menon, L., Carrol, R. S. and Yoo, S. S., "Bioprinting of Collagen and VEGF-releasing Fibrin Gel Scaffolds for Neural Stem," *Experimental Neurology*, **223**, 645-652(2010).
53. Lee, V., Singh, G., Trassati, J., Bjornsson, C., Xu, X., Tran, T. N., Yoo, S.-S., Dai, G. and Karande, P., "Design and Fabrication of Human Skin by 3D Bioprinting," *Tissue Engineering part C Methods*, **20**(6), 473-484(2014).
54. Murphy, S. V. and Atala, A., "3D Bioprinting of Tissues and Organs," *Nature Biotechnology*, **32**(8), 773-785(2014).
55. Therriault, D., White, S. R. and Lewis, J. A., "Chaotic Mixing in Three-dimensional Microvascular Networks Fabricated by Direct-write Assembly," *Nature Materials*, **2**, 265-271(2003).
56. Kitson, P. J., Rosnes, M. H., Sans, V. and Cronin, L., "Configurable 3D Printed Millifluidic and Microfluidic 'lab on a chip' Reactionware Devices," *Lab on a Chip*, **12**, 3267-3271(2012).
57. Anderson, K. B., Lockwood, S. Y., Martin, R. S. and Spence, D. M., "A 3D Printed Fluidic Device that Enables Integrated Features," *Analytical Chemistry*, **85**(12), 5622-5626(2013).
58. Lee, K. R. and Song, K. H., "Effect of Plasma Power on Degradation of Chitosan," *Korean J. Chem. Eng.*, **32**(1), 162-165(2014).
59. Jeong, G. T., "Production of Levulinic Acid from Chitosan by Acidic-Hydrothermal Reaction," *Korean Chem. Eng. Res.*, **52**(3) 355-359(2014).