

Линия биофабрикации органов: реализация технологии печати органов. Часть II: от инкапсуляторов до линии биофабрикации

Аннотация

Первая часть обзора существующих и перспективных технологий печати органов опубликована в журнале «Медицинская техника» № 3 за 2013 год. Во второй части статьи рассмотрены особенности создания и применения инкапсуляторов тканевых сфероидов, автоматизированных биопринтеров, биореакторов, а также проблемы машинного проектирования линий биофабрикации.

Инкапсуляторы тканевых сфероидов

Капсулирование клеток – хорошо отработанная технология. В контексте печати органов есть несколько возможных способов исследовать технологию капсулирования. Тканевые сфероиды можно создать капсулированием клеток. Однако плотность клеток обычно низка. В качестве более перспективного подхода можно рассматривать капсулирование сфероидов ткани, которые уже имеют высокий уровень плотности клеток. На этом этапе капсулирование используется не для того, чтобы создать пригодные для печатания сфероиды, а скорее для того, чтобы предотвратить нежелательное слияние тканевых сфероидов в картридже автоматизированного биопринтера перед печатью. Капсулирование тканевых сфероидов предотвращает их слияние и превращает их в линейную структуру в картридже биопринтера. Например, капсулирование в гиалуронат обеспечит эффект

смазки и предотвратит слияние тканевых сфероидов в биопринтере, но не помешает слиянию тканевых сфероидов после печати. Таким образом, биоматериалы или гидрогели для капсулирования тканевых сфероидов должны предотвращать слияние сфероидов в процессе печати и в то же время не должны препятствовать слиянию сфероидов после печати в процессе постобработки. Таким образом, очевидно, что гидрогель для капсулирования должен быть разлагаем.

Автоматизированные биопринтеры

Автоматизированный биопринтер – самый существенный элемент, обеспечивающий технологии биопринтинга.

Биопринтер – автоматизированное устройство точного послойного нанесения клеток и фрагментов ткани, таких как тканевые сфероиды, для формирования трех-

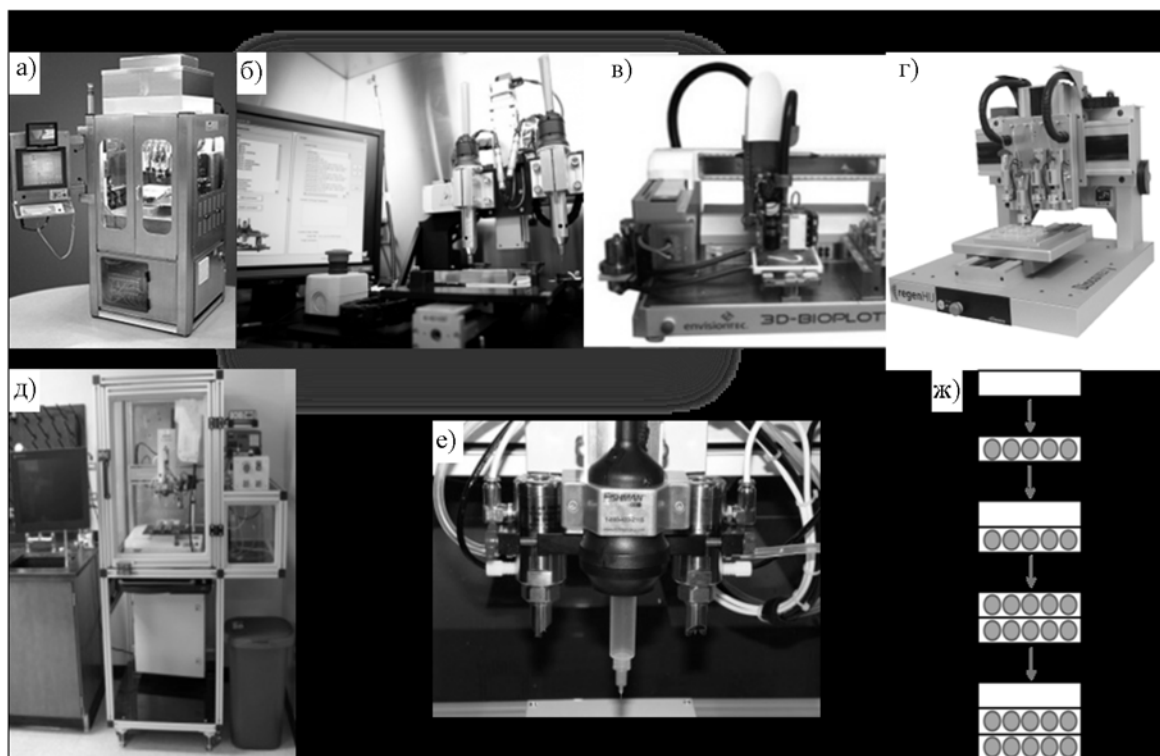


Рис. 1. Автоматизированные биопринтеры: а) биопринтер «Sciperio» (США); б) биопринтер «Organovo» (США); в) биопринтер «EnvisionTech» (США); г) биопринтер «RegenHu» (Швейцария); д) биопринтер «Cuspis» (США); е) форсунки Касписа (США); ж) схема послойного биопринтинга с использованием распыляемого фибринового гидрогеля и внедрения тканевых сфероидов

мерной структуры. В этом контексте биопринтер можно рассматривать как своего рода автоматизированный биосборщик тканей. Самым главным компонентом любого биопринтера является трехосевое позиционирующее устройство – XYZ-манипулятор. Кроме него биопринтер включает в себя форсунку или систему распределения и систему управления. Таким образом, печать органа входит в группу автоматизированных производственных технологий. Один из авторов предсказал несколько лет назад, что биопринтер скоро будет столь же обычным прибором в биомедицинской лаборатории, как, например, микроскоп. Однако отсутствие коммерчески доступного и приемлемого по цене биопринтера было основным препятствием для быстрого развития технологии печати органов. В настоящее время ситуация улучшилась. Уже существуют коммерчески доступные профессиональные биопринтеры (рис. 1а-ж), а также и относительно дешевые биопринтеры приемлемого качества. Таким образом, производство коммерчески доступных биопринтеров – уже жизнеспособный реальный бизнес и прямое проявление коммерческого потенциала развивающейся технологии печати органов.

«Advanced Tissue Biofabrication Center at MUSC» вместе с «СТП», «Campinas» разрабатывает и тестирует новый автоматизированный биопринтер с высоким разрешением, который обеспечит биофабрикацию трехмерных фрагментов ткани и органов путем послойного напыления гидрогеля с управляемым компьютером прецизионным нанесением тканевых сфероидов (рис. 1ж). «СТП» также модифицировала систему картриджей популярных принтеров «Fab@home 3-D» и созданного биопринтера «Fab@СТП 3-D» для распределения гидрогеля с живыми клетками и изготовления каркасов на основе гидрогеля.

Биореактор тройной перфузии с капельным орошением

Биореактор – важный компонент классической технологии инженерии ткани. Опубликовано несколько обзоров [1], [2] и, по крайней мере, две книги, посвященные биореакторным технологиям [3], [4].

Первоначально биореакторы использовались для выращивания клеток, засеянных на твердых каркасах. Перфузионные биореакторы дополнительно использовались для того, чтобы обеспечивать механические свойства проектируемых трубчатых конструкций из биоткани. И, наконец, в качестве биореактора может быть использована емкость, которая позволяет сохранять фрагменты созданной ткани во влажной среде, тем самым поддерживая их жизнеспособность, а также сохраняя сформировавшиеся фрагменты ткани при хранении и транспортировке. При реализации технологии печати органа функция перфузионного биореактора состоит в том, чтобы выиграть время, необходимое для того, чтобы произошло слияние тканевых сфероидов, а также обеспечить моделирование и созревание напечатанных тканевых фрагментов. Напечатанный фрагмент ткани, даже со встроенной сосудистой системой, не готов к немедленной внутрисосудистой перфузии, потому что требуется некоторое время для слияния сосудистых сфероидов и формирования достаточно зрелого и готового к внутрисосудистой перфузии сосудистого дерева. Мы разработали новую концепцию биореактора тройной перфузии с капельным орошением, чтобы обеспечить созревание фрагмента напечатанной ткани, включая ее сосудистое дерево, перед

началом внутрисосудистой перфузии. Три системы перфузии в этом новом типе перфузионного биореактора обеспечивают достижение трех целей: первая система перфузии обеспечивает влажную среду вокруг напечатанных фрагментов; вторая система перфузии предназначена для внутрисосудистой перфузии созревшего встроенного сосудистого дерева, и, наконец, третья система перфузии обеспечивает временный промежуточный поток через сменные пористые минитрубки. Эти сменные пористые трубки также обеспечивают временную поддержку и служат в качестве неразлагаемой, но удаляемой поддерживающей структуры, являясь аналогом каркаса в классической технологии тканевой инженерии. Расстояния между этими трубками, а также параметры их пористости должны рассматриваться на основе математического моделирования и компьютерной имитации.

Сменные минитрубки должны быть тонкими, насколько это возможно, и для их создания вероятно должен использоваться новый прочный материал (композит из углеродных нанотрубок). Кроме того, эти минитрубки должны быть покрыты нелипким, пористым, инертным, подобным тефлону биоматериалом, который не прилипает к клеткам и, следовательно, допускает возможность неразрушающего удаления микротрубок после созревания ткани, обеспечивая переключение от промежуточной временной к внутрисосудистой перфузии. Разработка проекта биореактора тройной перфузии с капельным орошением является первым шагом на пути создания нового типа биореакторов. Второй шаг – выбор и испытание материалов для сменных пористых минитрубок. И наконец, третий и последний шаг – построение и испытания биореактора. Интересно, что сменные пористые трубки могут обеспечивать дополнительные функции: они могут использоваться в качестве биосенсоров степени функционального созревания напечатанной ткани, для доставки растворимых внеклеточных молекулярных матриц и даже клеток для ускорения процесса созревания ткани и, наконец, их можно использовать для обеспечения электрической стимуляции и других физических методов ускорения созревания функциональных тканей. Разработка, производство, испытания и дальнейшая оптимизация нового типа перфузионного биореактора – нетривиальная, но выполнимая техническая задача. По крайней мере, концептуальный проект такого биореактора уже завершен. Использование опыта коммерческой технологии капельного орошения, которая широко и успешно применяется в сельском хозяйстве, позволит резко снизить цену перфузии за счет более рационального использования дорогостоящих сред для перфузии клеточных культур. Таким образом, очевидно, что разработка перфузионного биореактора является важным условием для развития технологии печати органов.

Концепция ускоренного созревания ткани

Важно понять, что фрагменты ткани, которые получаются в результате биопечати, еще не готовы к немедленной имплантации. Чтобы трансформировать напечатанный 3D-фрагмент ткани или органа в функциональную ткань, его необходимо подвергнуть ускоренной процедуре созревания. Этот процесс называют ускоренным созреванием ткани. Он базируется на фундаментальном предположении, что тканевый сфероид может плавиться и относительно быстро превращаться в функциональную

ткань путем использования специально разработанных технологий быстрого созревания ткани. Химические и физические факторы, которые запускают ускоренное созревание ткани, известны как факторы созревания. Показано, что для систематических исследований и поисков новых факторов созревания могут быть использованы относительно простые анализы слияния клеток и обволакивания тканей [5]. С помощью такого рода анализов было продемонстрировано, что кандидатами в факторы созревания могут служить молекулы таких веществ, как TGF бета, серотонин, периостин и трансглутаминаза. Существуют указания на то, что 3D-фрагменты ткани, такие как тканевые сфероиды, имеют склонность к ускоренному созреванию ткани, обусловленную гипоксией, вызванной синтезом коллагена и/или так называемым эффектом исключения объема, сопутствующим молекулярному эффекту перенаселения, который может быть усилен перфузией растворимых внеклеточных матричных молекул, таких как фибронектин [6]-[8]. Также было продемонстрировано, что передача сигналов от клетки к клетке и межклеточные коммуникации (например, между эндотелиальными клетками и клетками гладкой мышцы в случае сосудистой ткани) являются существенным фактором драматического ускорения синтеза, осаждения и биоасSEMBЛИРОВАНИЯ основных структурных компонентов внеклеточных матриц, таких как коллаген и эластин, которые определяют материальные (механические) свойства напечатанных тканей. Наконец, также было показано, что факторы созревания, такие как серотонин, периостин и трансглутаминаза, усиливают внеклеточные матричные молекулы. Эти молекулы являются возможными ингредиентами будущего эффективного коктейля факторов созревания. Дальнейшие открытия, экспериментальная проверка и тщательный выбор потенциальных кандидатов в факторы созревания – важная задача в развитии технологии ускорения созревания ткани. Таким образом, методы ускоренного созревания ткани являются принципиально важными технологиями при печати органов.

Стратегии неинвазивного и неразрушающего мониторинга созревания напечатанной ткани

Один из принципиальных вопросов в технологии печати органов заключается в том, как определить, что напечатанный 3D-фрагмент ткани или орган могут функционировать и готовы к имплантации. В этом контексте существует несколько возможных стратегий. В качестве одного из вариантов можно использовать параллельную разработку нескольких напечатанных 3D-фрагментов биоткани или органов с последовательным послойным анализом некоторых из них для инвазивных и деструктивных тестов созревания и уровня функциональности ткани, но это будет обходиться слишком дорого. Таким образом, идеальные оценочные методы и технологии должны быть атравматичными и неразрушающими. Один из возможных атравматичных подходов – биохимическая оценка перфузии и поиск биомаркеров созревания ткани. Еще один интересный подход заключается в использовании малого количества беспорядочно распределенных сторожевых клеток с сигнальными генами, которые начинают генерировать флуоресцентные маркерные гены типа GFP при достижении некоторого уровня созревания и функциональности. Наконец, сменная

трубка перфузии в предложенном биореакторе (см. выше) может использоваться как биосенсор для оценки созревания ткани. Например, с помощью биосенсора можно измерить импеданс или электропроводность ткани и оценить степень созревания ткани. Могут быть также использованы атравматичные и неразрушающие технологии визуализации, такие как УЗИ- или ЯМР-томография.

Перспективным инструментом для оценки целостности ткани и степени функциональности и созревания может служить метод перфузии с использованием меченых инертных атомов в комбинации с визуализацией (двухфотонная микроскопия). Наконец, индикатором созревания может служить атравматичная оценка механических свойств напечатанной ткани или органа. Например, для оценки степени созревания напечатанной ткани могут быть адаптированы атравматичные клинические методы диагностики цирроза и фиброза печени. С большой степенью уверенности можно предсказать, что по мере развития технологии печати органов роль неразрушающих и атравматичных методов оценки степени созревания ткани и ее функциональности будет только увеличиваться. Без развития эффективных предимплантационных и постимплантационных методов контроля функциональности, степени созревания и целостности напечатанных фрагментов ткани и органов невозможно получить разрешение регулирующих организаций на клиническое использование и имплантацию.

Линия биофабрикации

Создание компьютерной модели производства – один из важных этапов разработки промышленной технологии, и в настоящее время этот этап является стандартной практикой во многих отраслях промышленности. Например, компьютерные модели успешно использовались в проектировании и оптимизации технологических процессов в нефтедобывающей промышленности. Очевидно, что практическая реализация биофабрикации органов в индустриальном масштабе не сводится только к автоматизированному биопринтеру. Будущая линия биофабрикации органов должна включать ряд связанных автоматизированных инструментальных средств для биофабрикации, таких как сортировщики клеток, устройства для формирования тканевых сфероидов, инкапсуляторы, автоматизированные биопринтеры и перфузионные биореакторы (рис. 2а). На рис. 2б представлена первая попытка проектирования и машинного моделирования линии биофабрикации органов.

Проектирование и машинное моделирование линии биофабрикации решает три основных технических задачи: 1) виртуальное представление оборудования для биофабрикации с элементами машинного моделирования его функциональной деятельности; 2) оптимальное размещение виртуального оборудования для биофабрикации в производственном помещении в соответствии с последовательностью этапов процесса биофабрикации; 3) динамическое машинное моделирование и визуальное представление последовательных шагов процессов биофабрикации органа на микроуровне.

Для компьютерного моделирования и виртуального представления процесса биофабрикации использовалось коммерчески доступное программное обеспечение (Autodesk® Factory Design Suite). Первый шаг – машинное моделирование и виртуальное представление основ-

ного оборудования для биофабрикации, такого как сортировщик клеток, автоматизированный формирователь тканевых сфероидов, автоматизированный биопринтер и перфузионный биореактор. Второй шаг – виртуальное размещение оборудования для биофабрикации в производственном помещении в соответствии с логикой процесса биофабрикации и ограничениями, наложенными в соответствии с требованиями контролирующих организаций. И наконец, на микроуровне была смоделирована последовательность процессов создания фрагментов тканей и формирования органов в соответствии с виртуальным оборудованием для биофабрикации. Законченная виртуальная линия биофабрикации была дополнительно оптимизирована.

Виртуальная линия биофабрикации может использоваться для разработки экономически эффективного процесса биофабрикации органов в индустриальном масштабе, для анализа и оптимизации биопроцессинга, а также в образовательных целях.

Выводы и перспективы

Печать органов – биомедицинский вариант технологии быстрого 3D-прототипирования или послойного выращивания ткани под управлением компьютера с использованием тканевых сфероидов в качестве строительных элементов.

Очевидно, что печать органов не может быть сведена только к автоматической печати. Это ведет к чрезмерному упрощению (сведению всех биологических аспектов к вопросу жизнеспособности ткани) или ложному представлению о действительной биологической сложности

(динамической и эволюционной природы самоорганизованных тканей и органов), связанной с технологией печати органов.

Быстрое внедрение печати органов связано с интегрированным комплексом множества технологий. Эти технологии обладают рядом общих характеристик: это автоматизированные компьютерные технологии; они базируются на специальных информационных технологиях и специализированном программном обеспечении; они оперируют с живыми биологическими материалами, что накладывает жесткие технологические ограничения; наконец, эффективное использование этих технологий будет зависеть от возможности их интеграции и высокой степени совместимости. В идеальном случае эти технологии должны быть достаточно гибкими, чтобы их можно было объединять и использовать для разных типов клеток, тканей и органов. Не исключена также возможность разработки технологий биопринтинга, специфичных для определенных тканей или органов.

Также важно подчеркнуть, что технологии биопринтинга и биофабрикации, как и все технологии быстрого прототипирования, по существу являются информационными технологиями, так как они преобразуют виртуальную информацию, или проект, в биологическую реальность – напечатанный орган. Это означает, что автоматизация процессов биопринтинга и разработка интегрированной линии для биофабрикации органов потребует тщательного операционного контроля, включая разработку новых типов программного обеспечения. Более того, разработка проекта для печати органа, так же как и разработка методов цифрового (основанного на формировании из капель) биопринтинга с высоким разре-

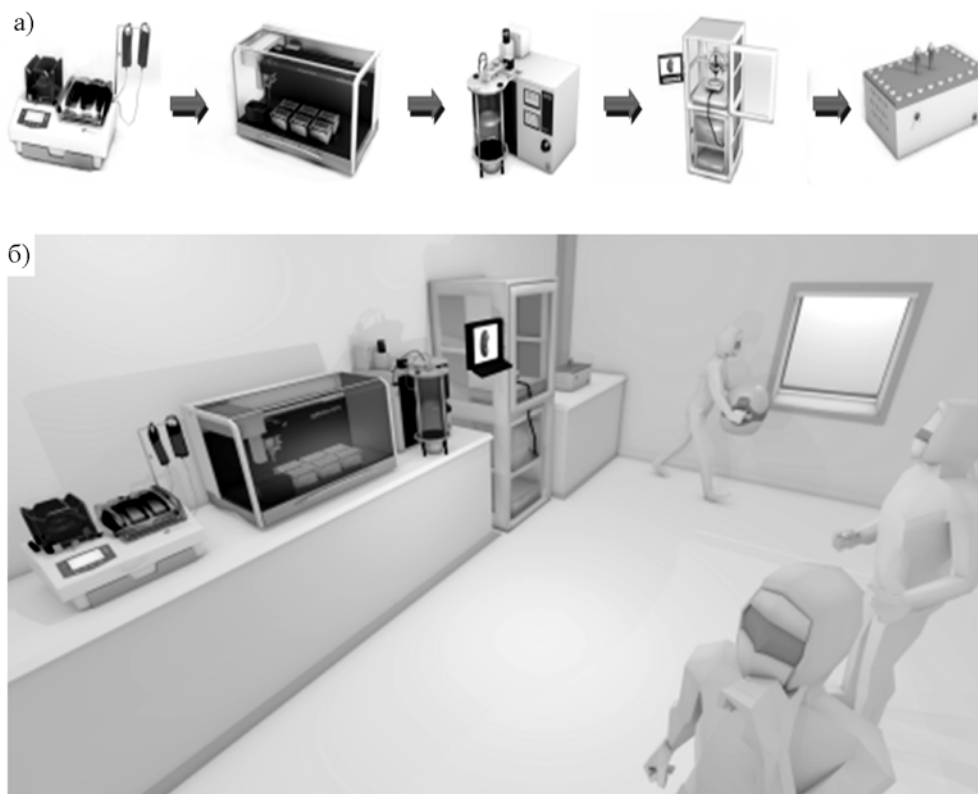


Рис. 2. Линия биофабрикации органов:
а) основные элементы линии биофабрикации органов; б) общий вид линии биофабрикации органов

шением и воспроизводимостью, требуют оптимизации существующего программного обеспечения (CAD) и разработки нового поколения программного обеспечения (BioCAD), основанного на новых функциональных представлениях (принципах). Технологии биофабрикации, как и многие другие современные промышленные технологии, тесно связаны с компьютерным дизайном, математическим и компьютерным моделированием *in silico* или виртуальным тестированием. Таким образом, можно предсказать, что первый сложный человеческий орган, такой как почка, будет сначала напечатан *in silico*.

Разработка виртуальной линии биофабрикации органов – другое интересное приближение и логический путь для передачи технологии печати органов в промышленность и клинику. Виртуальное производство (например, виртуальная очистка) уже является обычным подходом при разработке промышленных процессов в нефтяной промышленности. Виртуальная линия биофабрикации органов должна содержать всю возможную визуальную информацию о машинах, приборах и процессах для интерактивной компьютерной анимированной презентации, включающей возможность виртуального посещения завода по биофабрикации органов в качестве аватара для визуального наблюдения и виртуального взаимодействия со всеми компонентами линии биофабрикации. Виртуальная линия биофабрикации органов должна быть важным компьютерным инструментом для проверки оптимального дизайна и разработки процессов биофабрикации в будущей линии биофабрикации органов и связанных с ней процессов биофабрикации и биопринтинга, отличным инструментом для образовательных целей, а также она позволит объединять национальные, и даже интернациональные исследовательские группы. Виртуальная линия биофабрикации органов будет необходимым шагом в разработке реального промышленного предприятия по биофабрикации органов. Таким образом, компьютерный дизайн, компьютерная симуляция, математическое моделирование, методы виртуальной реальности и информационные технологии являются базовыми инструментами для развития технологий печати органов и разработки процессов биофабрикации в промышленном масштабе.

Работа выполнена при частичной поддержке Исследовательского фонда Сан-Паоло [The Sao Paulo Research Foundation (FAPESP)], Бразильского института биофабрикации [The Brazilian Institute of Biofabrication (INCT-Biofabris)] и Национального совета по науке и технологиям [The National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), CTI/PCI program].

Список литературы:

1. Martin I., Wendt D., Heberer M. The role of bioreactors in tissue engineering // Trends Biotechnol. 2004. Vol. 22 (2). PP. 80-86.

2. Mironov V., Kasyanov V.A., Yost M.J., Visconti R., Twal W., Trusk T., Wen X., Ozolanta I., Kadishs A., Prestwich G.D., Terracio L., Markwald R.R. Cardiovascular tissue engineering I. Perfusion bioreactors: A review // J. Long Term Eff. Med. Implants. 2006. Vol. 16 (2). PP. 111-130.

3. Kasper C., Van Griensven M., Portner R. Bioreactor Systems for Tissue Engineering (Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology). – Springer, 2009. 271 p.

4. Chaudhuri J., Al-Rubeai M. Bioreactors for Tissue Engineering: Principles, Design and Operation. – Springer, 2005. 383 p.

5. Hajdu Z., Mironov V., Mehesz A.N., Norris R.A., Markwald R.R., Visconti R.P. Tissue spheroid fusion-based in vitro screening assays for analysis of tissue maturation // J. Tissue Eng. Regen. Med. 2010. Vol. 4 (8). PP. 659-664.

6. Lareu R.R., Subramhanya K.H., Peng Y., Benny P., Chen C., Wang Z., Rajagopalan R., Raghunath M. Collagen matrix deposition is dramatically enhanced in vitro when crowded with charged macromolecules: The biological relevance of the excluded volume effect // FEBS Lett. 2007. Vol. 581 (14). PP. 2709-2714.

7. Lareu R.R., Arsianti I., Subramhanya H.K., Yanxian P., Raghunath M. In vitro enhancement of collagen matrix formation and crosslinking for applications in tissue engineering: A preliminary study // Tissue Eng. 2007. Vol. 13 (2). PP. 385-391.

8. Robinson E.E., Foty R.A., Corbett S.A. Fibronectin matrix assembly regulates alpha5beta1-mediated cell cohesion // Mol. Biol. Cell. 2004. Vol. 15 (3). PP. 973-981.

Родриго Алваренга Резенде,
канд. наук, научный сотрудник,
Центр информационных технологий
Ренато Арчера, Бразилия,
Сергей Васильевич Селищев,
д-р физ.-мат. наук, профессор,
зав. кафедрой,
кафедра биомедицинских систем,
Национальный исследовательский университет «МИЭТ»,
г. Москва,
Владимир Александрович Касьянов,
д-р техн. наук, профессор, зав. лабораторией биомеханики,
Рижский технический университет,
г. Рига, Латвийская Республика,
Хорхе Висенте Лопес да Сильва,
канд. наук, руководитель отдела 3D-технологий,
Центр информационных технологий
Ренато Арчера, Бразилия,
Владимир Александрович Миронов,
канд. мед. наук, приглашенный исследователь,
Центр информационных технологий
Ренато Арчера, Бразилия,
ведущий научный сотрудник,
кафедра биомедицинских систем,
Национальный исследовательский университет «МИЭТ»,
г. Москва,
e-mail: sersel@miee.ru

* * * * *