

Metody 3D tisku biologických materiálů pro tkáňové inženýrství

3D Printing Methods of Biological Materials used in Tissue Engineering

Aleš Gregor

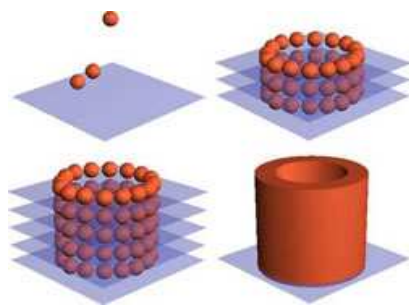
Abstrakt: Fibrin je základním fyziologickým biopolymerem působícím při zástavě krvácení a díky jeho vlastnostem biodegradability je v současnosti široce využíván ve tkáňovém inženýrství jako stavební prvek pro tvorbu biologických struktur (scaffoldů). Implementací vhodných kmenových buněk do těchto scaffoldů a jejich řízeným růstem vzniká postupně nová tkáň předem požadovaných tvarů a vlastností. Fibrin lze získat v laboratorních podmínkách smícháním dvou komerčně dostupných biologických složek, proteinů fibrinogenu a trombinu. Předpokládá se, že nedaleké budoucnosti bude tento princip využívaným prostředkem pro mnoho oblastí medicíny, kde je nutná náhrada nebo obnova jakéhokoli druhu tkáně. Současný výzkum v této oblasti směřuje k vývoji principu tvorby těchto struktur metodou 3D tisku a to především na bázi technologie ink-jet printing.

Klíčová slova: biologické mikrostruktury, fibrin, scaffold, 3D tisk, ink-jet printing, tisk vrstvy po vrstvě

Úvod

Primárním cílem tkáňového inženýrství je obnova nebo náhrada tkání a orgánů poškozených onemocněním, zraněním nebo vrozenou anomálií. V současné době tato vědecká disciplína využívá mimo jiné pro opravu poškozených tkání a orgánů umělé podpůrné struktury scaffolds (z anglického scaffold - konstrukce, kostra, lešení), které slouží k uchycení buněk a řízení jejich růstu. Dle dosavadních poznatků veškerá výzkumná pracoviště v České republice řeší tuto otázku pouze z biologické podstaty. To znamená, že jejich úsilí je směřováno spíše k postupnému experimentálnímu výzkumu podmínek, za kterých by se dosáhlo nejvhodnějších parametrů biologických struktur v souvislosti s jejich cílenou implementací do živého organismu.[1] Naproti tomu se v současné době v tuzemsku dle dostupných vědeckých zdrojů a publikací žádné pracoviště nezabývá konkrétním výzkumem a vývojem technologické tvorby biologických struktur pomocí metod 3D tisku.

V zahraničí se v této otázce obzvláště v posledních letech vědecké zdroje a publikace zmiňují o výzkumu těchto struktur jak z pohledu experimentálního v biologické rovině, tak i z hlediska jejich technologické tvorby a to zejména pomocí metod technologie inkoustového tisku. Z tohoto pohledu se ovšem dlouhodobě jednalo o experimenty, ve kterých nebylo prozatím dosaženo adekvátních výsledků, na jejichž základě by tato metoda byla v nejbližších letech aplikovatelná do klinické praxe. [2],[3],[4],[5] V prosinci roku 2009 nastal v této oblasti průlom. Společnost ORGANO, zabývající se tkáňovým inženýrstvím spolu s technologickou společností INVETECH a Universitou v Missouri představily první prototyp komerční bio-tiskárny pro tvorbu tkáňových struktur. Přístroj pracuje na principu tisku vrstvy po vrstvě s využitím dvou tiskových hlav s tryskami. První z trysek zajišťuje deponování buněk a druhá pak hydrogelu, který slouží jako podpůrná matrice pro uchycení buněk. Prvním veřejně představeným biologickým produktem této technologie je kopie lidské žíly. Tato žíla byla vytvořena deponováním jednotlivých buněk do kruhového tvaru mezi speciální, taktéž tištěné hydrogelové biomatrice vytvořené z agaróзовého gelu (viz. obr.1). Tyto matrice postupně v průběhu srůstání buněk degradují a následně mizí. Vrstvením těchto kruhových buněčných struktur vzniká válec – žíla, která má velmi blízké biologické i mechanické vlastnosti jako původní žíla. [6],[8]



obr. 1 – deponování jednotlivých buněk mezi hydrogelové matrice, zdroj <http://inhabitat.com>

Zásadním úkolem při vývoji tohoto přístroje, jak sami autoři zmiňují, bylo zajištění opakovaného precísniho polohování dávkovací kapiláry v řádech mikrometrů.

Současný výzkum v této oblasti na fakultě strojní ČVUT a jeho výsledky

Na Ústavu přístrojové a řídicí techniky fakulty strojní ČVUT ve spolupráci s Ústavem Biofyziky II. Lékařské fakulta UK a Ústavem experimentální medicíny Akademie Věd v Praze byl v minulých letech proveden soubor experimentů, které se obecně zabývaly možnostmi průchodu různých typů tiskových médií běžnými typy tiskových hlav včetně proteinových složek fibrinogenu a trombinu. Zmíněné složky jsou základním stavebním prvkem pro tvorbu fibrinového gelu, který je mimo jiné také využíván jako konstrukční hmota proteinových biologických struktur (scaffoldů). Použito bylo více druhů tiskových hlav od dvou výrobců Hewlett-Packard a Epson. Provedené experimenty prokázaly možnost využití

relativně široké škály tekutin pro proces tisku v tiskových hlavách, které byly použity. Bylo zjištěno, že zásadními kritérii pro úspěšný tisk jsou hustota a viskozita tiskového media a to u obou využitých technologií inkoustového tisku. Kvalita výsledků u experimentů s proteinovými složkami (fibrin, trombin) byla různorodá v souvislosti s použitou technologií a typem tiskové hlavy. Obecně lze říci, že využití dané technologie pro aplikaci biologických materiálů je zcela jistě možná, nicméně pro stabilní a kvalitní výsledky by byla nutná technologická úprava tiskové hlavy a trysek. [7]

V současné době je na Ústavu přístrojové a řídicí techniky ČVUT zcela novým přístupem řešení 3D tisku biologických struktur pomocí dispenzoru Ultimius 2400 (obr. 2), kde hnacím médiem je pouze tlak vzduchu.



Základní parametry přístroje

Tlakový rozsah: 0 – 7 bar

Frekvence dávkování: 0,0001 – 999,9999s

Nejmenší vnitřní průměr trysky: 0,1mm

Přístroj dále disponuje funkcí zpětné tvorby vakua v trysce, které zajišťuje vyšší přesnost dávkování, kdy nadbytečné množství dávky je vtaženo zpět do trysky.

Přístroj umožňuje vstřikování ze dvou trysek zároveň.

Obr. 2 – dispenzor Ultimius 2400, zdroj <http://www.efd-inc.com>

Vzhledem k výše uvedeným parametrům přístroje je zřejmé, že se svými vlastnostmi dávkování blíží parametrům dávkování inkoustového tisku. Zcela zásadní výhodou této technologie je předpoklad, že samotný tlak vzduchu nemá žádný negativní vliv na biologické vlastnosti použitých materiálů. Navíc přístroj sám o sobě je natolik sofistikovaný, že úprava vlastností vstřikování media se může libovolně v široké škále možností upravovat bez jakýchkoli technologických zásahů do přístroje. Tento fakt je nespornou výhodou oproti použití inkoustových tiskových hlav. Aktuálně bude proto výzkum zaměřen na využití zmíněného dispenzoru.

Prozatím byly na dispenzoru provedeny pouze dílčí experimenty průchodnosti proteinů fibrinogenu a trombinu. Bylo zjištěno, že vhodné parametry pro dosažení nejmenší opakovatelné dávky v řádech stovek mikrometrů (průměr kapky) jsou následující:

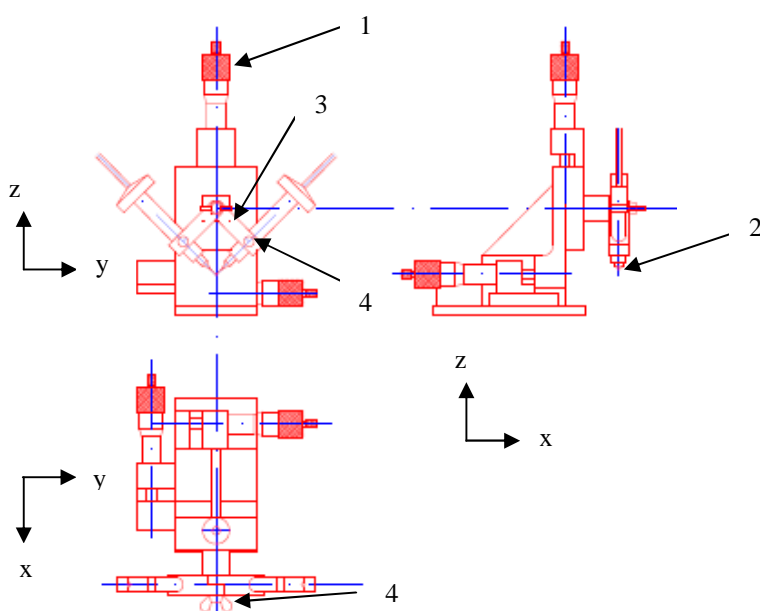
Medium	Frek. dávkování (s)	Tlak (bar)	Nastavení vakua (in H₂O)
Voda	0,005	0,1 – 0,15	2,5 - 3
Trombin	0,005	0,1 – 0,15	2,5 - 3
Fibrinogen	0,005	0,2 – 0,25	2,5 - 3

tab.1 – parametry vstřikování pro dosažení nejmenší dávky

Rozsáhlejší metodické experimenty budou provedeny na přípravku, jehož schéma je uvedeno na obr.3.

Technický popis přípravku:

Přípravek se skládá z manuálního přesného polohovacího mechanismu umožňujícího pohyb v osách XYZ. Přesnost pohybu ve všech třech osách je zajištěna mikrometrickými hlavicemi(1) s rozsahem pohybu v délce 25mm a polohovací přesností 0,005mm. Přípravek dále umožňuje uchopení dvou trysek dispenzoru(2), které jsou polohovatelné kolem své osy v rovině YZ s možností svislého posunu v úchytném rameni. Aretace polohy úhlového natočení ramen je zajištěna křídlatým šroubem(4). Aretace posunu trysky v rameni je zajištěna stavěcím šroubem(5). Každá z trysek zajišťuje dávkování jedné ze složek fibrinogen, trombin.



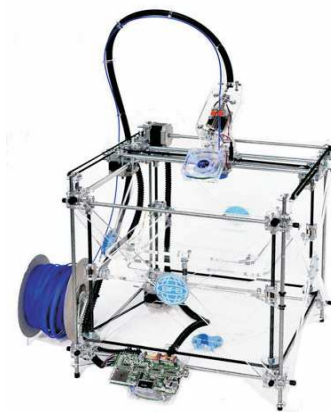
obr. 3 - experimentální přípravek

Metodický popis experimentů:

Experimentálně budou zjištěny vlastnosti jednotlivých dávek v závislosti na čase, tlaku, úhlu, a vzdálenosti vstřikování. Zkoumána bude dále schopnost smíchání jednotlivých složek deponováním jedné kapky do druhé v souvislosti s uvedenými parametry tak, aby vytvořili tuhnoucí strukturu požadovaných tvarů.

Závěr

Na základě výsledků experimentů budou dále práce zaměřeny na sestavení prototypu přístroje, který by zajišťoval automatizovaný tisk. Přístroj by měl zajišťovat pohyb tiskové hlavy(hlav) ve třech osách tak, aby bylo možné realizovat tisk 3D struktur požadovaných tvarů. Pro tyto účely bude využita 3D (rapid prototyping) tiskárna Rap Man 3.1(obr. 4).



Obr. 4 - RAP MAN 3.1, zdroj <http://www.easycnc.cz>

Toto zařízení zajišťuje řízené polohování ve třech osách s přesnostmi v řádech desítek mikrometrů. Dále umožňuje v rámci svého softwarového vybavení okamžitou komunikaci s běžně dostupnými grafickými aplikacemi pro jednoduchý přechod od návrhu k reálnému produktu. Díky těmto dispozicím bude možné soustředit se ve výzkumu pouze na oblast propojení a synchronizaci trysek dispenzoru s tímto zařízením, případně na vývoj vhodných konstrukčních parametrů trysek a tiskových hlav. Následně budou zkoumány podmínky tvorby biologických struktur při pohybu trysky a hledání optimálního řešení pro zdárné výsledky.

Ve třetí fázi bude výzkum zaměřen na možnosti implementace kmenových buněk. V současnosti se předpokládá tisk přímo do roztoku, ve kterém budou konkrétní kmenové buňky obsaženy, a tím bude zajištěna jejich samovolná implementace do struktury. Jiná metoda může být založena na souběžném vstřikování roztoku s buňkami mezi jednotlivé

vrstvy. V poslední fázi bude projekt zaměřen na sestavení sofistikovanějšího automatizovaného přístroje s řízenými polohovacími mechanismy ve třech osách.

Reference

- [1] Filová E., Rampichová M., Handl M., Lytvynets A., Halouzka R., Usvald D., Hlucilová J., Procházka R., Dezortová M., Rolencová E., Kostáková E., Trc T., Stastný E., Koláčná L., Hájek M., Motlík J., Amler E., Composite Hyaluronate-Type I Collagen-Fibrin Scaffold in the Therapy of Osteochondral Defects in Miniature Pigs. *Institute of Experimental Medicine, CzAcadSci, Prague, Czech Republic. May 2007*
- [2] Janmey P.A., Winer J.P., Weisel J.W., Fibrin Gels and Their Clinical and Bioengineering Applications. *Institute for Medicine and Engineering, University of Pennsylvani, USA Sep 2008*
- [3] Sachlos E., Czernuszka J.T., Making Tissue Engineering Scaffolds Work Review on The Application of Solid Freeform Fabrication Technology to The Production of Tissue Engineering Scaffolds *Department of Materials, University of Oxford, Parks Road, Oxford, OX1 3PH, UK*
- [4] Boland T., Xu T., Damon B., Cui X., Application of inkjet printing to tissue engineering, *Department of Bioengineering, Clemson University, Clemson, SC, USA Department of Physics and Astronomy, University of Missouri, Columbia, MO, USA July 2006*
- [5] Landers R., John H., Mülhaupt R., Scaffolds for tissue engineering applications fabricated by 3D Plotting, *Freiburger Materialforschungszentrum and Institut für makromolekulare Chemie of the Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg, Germany Envision Technologies, Marl, Germany*
- [6] Norrotte C., Marga F.S., Niklason L.E., Forgacs G., Scaffold – free vascular tissue engineering using bioprinting, *Biomaterials. 2009, vol 30, s 5910-5917*
- [7] Gregor A., Analýza možností vytváření 3D struktur pomocí Ink Jet Printing, Diplomová práce, *Odbor Přístrojové a řídicí techniky, Fakulta strojní, České vysoké učení technické v Praze, The Czech republic, Sep 2008*
- [8] <http://organovo.com/>