

Линия биофабрикации органов: реализация технологии печати органов. Часть I: от автоматизированного проектирования до формирования сфероидов

Аннотация

Печать органов представляет собой автоматизированный процесс послойного создания трехмерных фрагментов тканей человека или целых органов путем использования тканевых сфероидов в качестве строительных блоков. В течение последнего десятилетия печать органов рассматривается в качестве потенциально превосходящей альтернативы классическому подходу к разработке тканей с использованием каркасов. Становится все более очевидно, что печать органов не может быть сведена только к процессу биопринтинга, а скорее должна рассматриваться как совокупность технологических процессов, которые могут быть объединены в технологическую линию биофабрикации органов. Информационные технологии, такие как автоматизированное проектирование, программное обеспечение, математические модели и машинное моделирование, являются критически важными технологическими процессами, обеспечивающими прецизионное размещение тканевых сфероидов в трехмерном пространстве в соответствии с разработанным проектом (blueprint) при печати органа. Технологическая линия печати органов должна также включать в себя устройства для сортировки клеток, устройства для создания тканевых сфероидов, биопринтеры, биореакторы с неинвазивными и неразрушающими системами биомониторинга и биосенсорами. Настоящий обзор посвящен последним достижениям и перспективам развития технологий печати органов.

Классический подход к разработке тканей, основанный на использовании каркасов, к настоящему времени уже неактуален. Основные ограничения при использовании каркаса – невозможность прецизионного размещения клеток с высокой плотностью и проблемы с созданием сосудистой сети. Печать органов, или биопринтинг, – перспективный подход, который можно рассматривать как многообещающую и потенциально превосходящую альтернативу классическому подходу к разработке тканей. Под печатью органов обычно понимают автоматизированный процесс послойного создания трехмерных тканей человека путем использования самособирающихся тканевых сфероидов в качестве строительных блоков [1]–[4]. Печать органов – биомедицинский вариант технологии быстрого прототипирования, в настоящее время известной как 3D-принтинг, которая включает в себя предварительную обработку, обработку и постобработку. Первоначально предполагалось, что для печати трехмерного фрагмента ткани или целого органа с использованием технологии биопринтинга будет достаточно иметь основные элементы – биочернила, биобумагу и биопринтер [3]. Однако путь от автоматизированного проекта к имплантированному в человеческое тело напечатанному органу оказался гораздо сложнее и включает в себя такие существенные этапы, как разработка, производство, созревание и клиническая фаза (рис. 1).

Становится все более очевидным, что каждый шаг на этом пути требует развития или использования специальных технологий, которые могут быть определены как критические технологии печати органов. Таким образом, успешный перевод технологии печати органов в клиническую практику будет зависеть от разработки не только автоматизированного биопринтера, но и всего комплекса соответствующих технологий и их интеграции. В этом контексте технология печати органов представляет собой не столько отдельный инструмент или устройство, сколько группу объединенных технологий печати органов или линию биофабрикации органов [5]. В данном обзоре представлено современное состояние технологий печати органов.

BIOCAD, или проектирование печати органов

Печать органов, как и любая технология быстрого прототипирования, по существу является информационной технологией, потому что она преобразует виртуальный автоматизированный проект, или «проект органа», в физическую действительность, или напечатанный орган. Хотя автоматизированное проектирование – хорошо отработанная в промышленности технология, включающая в себя стандартное программное обеспечение, в настоящее время нет детальных «проектов» для печати сложных трехмерных человеческих органов. Человеческая анатомия – также хорошо изученная дисциплина с детальным знанием микроскопической организации всех органов и тканей. Клинические технологии визуализации постоянно совершенствуются, и разрешающая

способность таких методов, как ЯМР-томография, компьютерная томография (КТ) и микрокомпьютерная томография (МКТ), постоянно повышается и уже приближается к такому уровню, который является достаточным, чтобы получить необходимую анатомическую и гистологическую информацию для биопечати органа. Компьютерные методы реконструкции на основе анализа последовательных гистологических срезов человеческих органов могут обеспечить такую информацию о гистологической организации человеческих органов, которую невозможно получить *in vivo* путем использования современных методов визуализации. И наконец, математическое моделирование анатомических и гистологических структур все чаще используется как дополнительный мощный инструмент при разработке проекта. Таким образом, основная проблема при реализации автоматизированного проектирования человеческих органов состоит не в отсутствии необходимой анатомической информации, а скорее в отсутствии понимания того, как трансформировать накопленные знания по человеческой анатомии и гистологии в жизнеспособный проект с достаточными и необходимыми инструкциями для печати человеческого органа с помощью автоматизированного биопринтера.

Печать органа с использованием тканевых сфероидов в качестве элементарных блоков представляет собой не аналоговый процесс, а скорее цифровой или квантовый биопринтинг, основанный на нанесении отдельных частиц или капель. Однако большинство из известных пакетов программного обеспечения для автоматического проектирования не предназначено для цифрового биопринтинга. Существует несколько ограничений, характерных для программного обеспечения автоматизированного проектирования, основанного на традиционном подходе, особенно в случае создания STL-файлов для цифрового биопринтинга или биопринтинга на основе струйной технологии. Последние достижения в разработке программного обеспечения, основанные на новом подходе, так называемом функциональном представлении, позволяют преодолевать эти ограничения. Основное преимущество от использования нового функционального программного обеспечения состоит в том, что оно допускает возможность цифрового биопринтинга без использования STL-файла с лучшей разрешающей способностью и правильными данными.

Таким образом, проект цифрового биопринтинга человеческого органа с использованием тканевых сфероидов в качестве элементарных блоков пока не существует, но он может быть реализован при использовании нового функционального программного обеспечения.

Клинические сортировщики клеток

Поиски клинически доступного источника клеток – основная проблема любой технологии тканевой инженерии. Идеальный источник клеток для тканевой инженерии должен обеспечивать получение достаточно большого количества клеток,

должна существовать возможность переключения источника путем управляемой дифференциации на генерацию широкого спектра гисто- и органоспецифичных фенотипов клеток, и, наконец, идеальный источник клеток должен быть аутологическим и не приводить к нежелательным или неожиданным эффектам, таким как иммунная реакция или отторжение [6]. В случае биопринтинга органа все эти требования становятся более жесткими, так как для того чтобы напечатать человеческий орган необходимы миллионы и миллиарды человеческих клеток с чрезвычайно разнообразными фенотипами. Для биопринтинга некоторых человеческих органов необходимо иметь большое количество клеток десятков различных фено-

типов. На сегодняшний день доступны коммерческие клинические сортировщики клеток, разработанные «Cytori Therapeutics» (Сан-Диего, США) и «TissueGenesis» (Гонолулу, Гавайи, США) (рис. 2). Эти клинические сортировщики используют жировую ткань в качестве источника человеческих клеток и обеспечивают быстрое (в течение 1...2 ч) выделение большого количества взрослых стволовых клеток из жировой ткани человека. Клинические сортировщики клеток требуют разрешения FDA, и получение разрешения на такие приборы регулирующими органами может ускорить получение необходимого количества типов человеческих клеток, сделав, таким образом, печать органов более доступной.

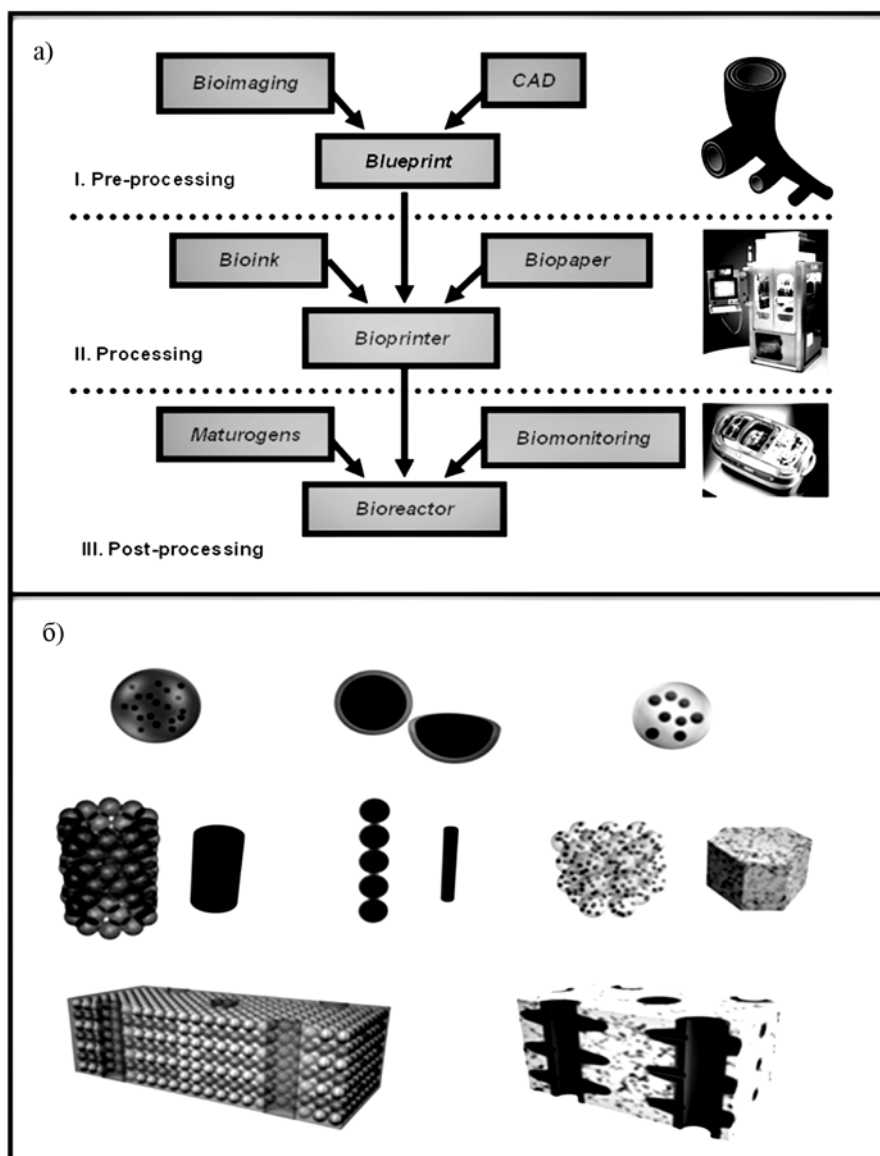


Рис. 1. Концепция печати органа: а) блок-схема печати органа (CTI, Кампинас, Бразилия); б) схема печати органа с использованием самособирающихся тканевых сфероидов

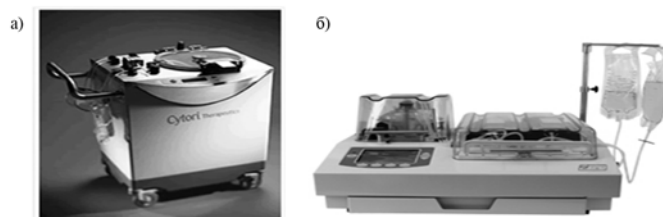


Рис. 2. Коммерчески доступные клинические сортировщики клеток: а) коммерческий клинический сортер клеток «Celution», разработанный «Cyturi Therapeutics», Сан-Диего, США, в сотрудничестве с «Olympus», Япония, и коммерциализированный «General Electric Health Care», США; б) коммерческий клинический сортер клеток, разработанный «TissueGenesis Inc», Гонолулу, Гавайи, США

Биореактор для размножения стволовых клеток

Биореакторы для размножения стволовых клеток необходимы, если количества полученных от человека клеток недостаточно для биопечати органа. Это касается, например, стволовых клеток, полученных из пульпы зуба или из костного мозга. По существу, это проблема масштабируемости. Коммерчески доступные биореакторы для размножения стволовых клеток – уже действительность, например «Aastrom Inc», Анн-Арбор, Мичиган, США. Разработка нового, более эффективного типа биореактора для размножения человеческих стволовых клеток – важное условие для реализации технологических линий печати органов. Остается понять, в каком направлении будут развиваться конструкции биореакторов. Будут ли они разрабатываться только для размножения стволовых клеток, или же они будут способны еще и обеспечивать дифференциацию стволовых клеток в клетки заданного фенотипа?

Масштабируемые сфероиды для биофабрикации ткани

Простые вычисления, основанные на известных размерах и объемах человеческих органов, таких как почка, печень и легкое, и диаметре и объеме тканевого сфероиды, показывают, что для обеспечения печати человеческого органа требуемого размера необходимо разработать технологию биофабрикации миллионов тканевых сфероидов. Таким образом, биофабрикация тканевых сфероидов должна рассматриваться как одна из критических технологий, обеспечивающих возможность реализации печати органов. Существует много различных технологий биофабрикации тканевых сфероидов [7], но не все из них можно рассматривать как методы масштабной биофабрикации тканевых сфероидов. В данной статье будут рассмотрены три технологии, которые, по мнению авторов, представляются наиболее перспективными.

Модифицированный классический метод висячей капли

Классический метод висячей капли – один из наиболее простых и самых популярных методов биофабрикации тканевых сфероидов, основанный на объединении клеток под действием силы тяжести [8]. Однако он обладает рядом недостатков, среди которых следует отметить разброс в размерах тканевых сфероидов, потенциальную возможность формирования нежелательных микросфероидов, а также сфероидов неправильной формы [9]. Недавно технология была улучшена и модифицирована таким образом, что перечисленные сфероиды удаляются. После модификации она стала пригодной для автоматизации (автоматизированное распределение суспензии клеток) и очень удобной в использовании, особенно для сбора изготовленных тканевых сфероидов. Эта технология коммерциализирована швейцарской start-up компанией «InSphero» (<http://www.insphero.com>). Тканевые сфероиды могут использоваться не только как элементарные блоки при печати органа, но и как трехмерные фрагменты человеческой ткани для исследования токсичности лекарственных препаратов, моделирования болезней человека (таких как рак), а также для тестирования новых лекарств на основе нанотехнологических контейнеров. Можно высказать предположение, что развитие технологий печати органов, таких как автоматическая биофабрикация тканевых сфероидов, приведет к развитию многочисленных новых приложений в регенеративной медицине и инженерии тканей (например, внешняя искусственная печень). И, наконец, технологии фабрикация тканевых сфероидов могут также использоваться для увеличения производства мяса *in vitro* в промышленных масштабах [10]. На сегодняшний день есть несколько компаний («InSphero», Швейцария; «Microtissue», США; «Nano3D Biosystems», США; «Stem Cell Technologies», США; «Co.don», Германия; «OsteoSphere», США; «Shrink Nanotechnologies», США), которые уже активно коммерциализируют технологии биофабрикации тканевых сфероидов. Более того, некоторые из этих компаний, такие как

«Co.don» (Германия), уже выпускают коммерчески доступные изделия (хондросферы) для клинических испытаний.

Сфероиды для биофабрикации тканей с использованием нелипкого гидрогеля

Для того чтобы преодолеть ограничения метода висячей капли, ряд научных групп развивают технологии биофабрикации ткани с использованием микроформ. Группа Джефа Моргана из Brown University разработала формы с использованием быстрой технологии прототипирования, которая позволяет создавать впадины в нелипком гидрогеле агарозы и таким образом обеспечивает биофабрикацию тканевых сфероидов стандартного размера. (рис. 3а-г) [11]. Эта технология была коммерциализирована start-up компанией «Microtissues». Мы недавно немного изменили оригинальную технологию группы Джефа Моргана и сделали ее более удобной для автоматизированного формирования, используя 96 микроуглублений и автоматизированное пипеточное устройство «Eppendorff» (eMotion 5075) [9] (рис. 3ж). Канадская группа стволовых клеток Петера Зандстры успешно разработала и испытала формовочное устройство, которое напоминает перевернутую пирамиду и которое также было коммерциализировано «Stem Cell Technologies» [12]. «Buchi Company» разработала инкапсуляторы, способные внедрять клетки в тканевые сфероиды (рис. 3з, и).

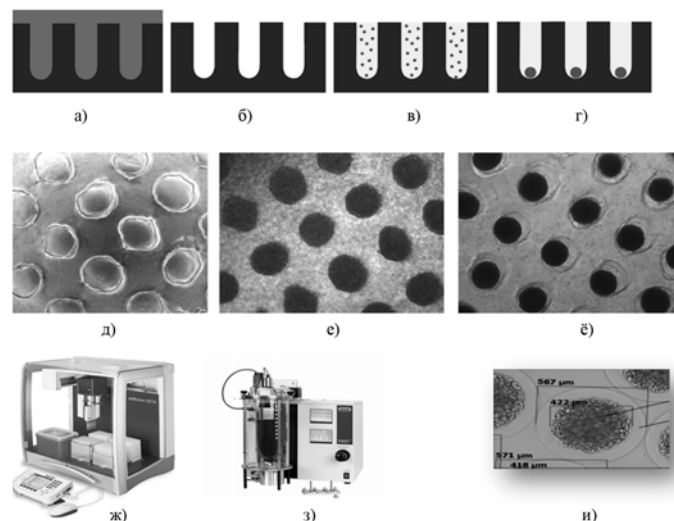


Рис. 3. Биофабрикаторы и инкапсуляторы тканевых сфероидов: а)–г) схема биофабрикации тканевых сфероидов с использованием форм из нелипкого гидрогеля: а) формирование впадин в нелипком гидрогеле; б) пустая впадина; в) впадина с суспензией клеток; г) впадины со сформированными тканевыми сфероидом; д) сформированные впадины перед отбором клеток; е) впадина с суспензией клеток; ё) впадины со сформированными тканевыми сфероидом; ж) «eMotion-4075» – автоматизированный диспенсер («Eppendorff», Германия); з) инкапсулятор («Buchi», Швейцария); и) капсульные тканевые сфероиды

Американская компания «Shrink Nanotechnologies» недавно разработала и коммерциализировала сотовую структуру, или так называемую технологическую платформу «StemDisk» (см. «Shrink Nanotechnologies», вебсайт <http://www.shrinknano.com/products/product-tools/stemdisc>). Наша команда работает над улучшением этого проекта, имея в виду, что скругленное основание является существенным условием для быстрой биофабрикации тканевого сфероиды в форме идеального шарика и что некоторые клетки могут быть незапланированно внесены на пустое место между углублениями в нелипком гидрогеле агарозы, что может привести к образованию нежелательных сопутствующих тканевых микросфероидов неправильной формы и размера. СТИ использует для создания форм быструю производственную технологию («Objet Geometries Inc»), которая может обладать очень высокой разрешающей способностью и обеспечивать создание малых де-

талей сложной конфигурации. Сравнительный анализ различных методов биофабрикации тканевых сфероидов с использованием нелипких поверхностей и гидрогелей – необходимый шаг в дальнейшем улучшении и усовершенствовании этой технологии. Другая важная задача – автоматизация технологии биофабрикации ткани. Созданный из стволовых клеток тканевый сфероид может быть использован для производства хондросфер, остеосфер, кардиосфер, миосфер, нейросфер и гепатосфер путем использования направленной дифференциации.

Недавно развитая в Centro de Tecnologia da Informacao Renato Archer, Campinas, Бразилия, новая концепция блокируемого микроаркаса, или просто «Lockyballs» [13], представляет собой технологию на основе каркаса в комбинации с технологией биофабрикации на основе тканевых сфероидов. Этот объединенный подход может привести к развитию технологии блокируемых тканевых сфероидов или нового простого и изящного метода **быстрой биофабрикации трехмерных фрагментов ткани in vivo**. Такая технология может быть особенно успешной при биофабрикации тканей хряща и кости *in vivo*.

Биофабрикация с использованием микрофлюидики (микрогидродинамики)

Развитие технологий, основанных на достижениях микрофлюидики (микрогидродинамики), особенно цифровых и капельных технологий, открывает уникальные возможности биофабрикации большого количества тканевых сфероидов. Устройства такого типа позволяют формировать до 10 000 капель в секунду. Хотя достижения микрофлюидики уже использовались для инкапсуляции клеток и изготовления коллоидных капель со сложной внутренней структурой путем применения элегантного прибора, разработанного в Гарвардском университете группой David Weitz, говорить о широком применении микрофлюидики в масштабируемой биофабрикации тканевых сфероидов пока еще рано [14]. Мы разрабатываем конструкцию устройства, которое обеспечит создание различных типов масштабируемых тканевых сфероидов.

Производство и экспериментальное испытание такого устройства с источником подходящего фоточувствительного абляционного гидрогеля может обеспечить важный вклад в развитие новых методов масштабируемой биофабрикации тканевых сфероидов.

Комбинация микрофлюидики с нанотехнологиями путем использования магнитных наночастиц может в перспективе обеспечить разработку тканевых сфероидов, способных самостоятельно выбирать направление движения и самособираться, как это было предложено в одном из наших обзоров по применению нанотехнологий в инженерии тканей [4], [15]. Наконец, это в конечном счете может привести к разработке высокоскоростного магнитного биопринтера и таким образом обеспечить усовершенствование технологии печати органов.

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. Mironov V., Boland T., Trusk T., Forgacs G., Markwald R.R. Organ printing: Computer-aided jet-based 3D tissue engineering // Trends Biotechnol. 2003. Vol. 21 (4). PP. 157-161.
2. Mironov V., Kasyanov V., Drake C., Markwald R.R. Organ printing: Promises and challenges // Regen. Med. 2008. Vol. 3 (1). PP. 93-103.
3. Mironov V., Visconti R.P., Kasyanov V., Forgacs G., Drake C.J., Markwald R.R. Organ printing: Tissue spheroids as building blocks // Biomaterials. 2009. Vol. 30 (12). PP. 2164-2174.
4. Mironov V., Kasyanov V., Markwald R.R. Nanotechnology in vascular tissue engineering: From nanoscaffolding towards rapid

vessel biofabrication // Trends Biotechnol. 2008. Vol. 26 (6). PP. 338-344.

5. Mironov V., Kasyanov V., Markwald R.R. Organ printing: From bioprinter to organ biofabrication line // Curr. Opin. Biotechnol. Vol. 16. [Epub ahead of print].
6. Visconti R.P., Kasyanov V., Gentile C., Zhang J., Markwald R.R., Mironov V. Towards organ printing: Engineering an intra-organ branched vascular tree // Expert Opin. Biol. Ther. 2010. Vol. 10 (3). PP. 409-420.
7. Lin R.Z., Chang H.Y. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research // Biotechnol. J. 2008. Vol. 3 (9-10). PP. 1172-1184.
8. Kelm J.M., Timmins N.E., Brown C.J., Fussenegger M., Nielsen L.K. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types // Biotechnol. Bioeng. 2003. Vol. 20. № 83 (2). PP. 173-180.
9. Mehesz A.N., Brown J., Hajdu Z., Beaver W., da Silva J.V.L., Visconti R.P., Markwald R.R., Mironov V. Scalable robotic biofabrication of tissue spheroids // Biofabrication. 2011. Vol. 3 (2). 025002. Epub 2011 May 12.
10. Mironov V., Trusk T., Kasyanov V., Little S., Swaja R., Markwald R. Biofabrication: A 21st century manufacturing paradigm // Biofabrication. 2009. Vol. 1 (2). 022001.
11. Napolitano A.P., Dean D.M., Man A.J., Youssef J., Ho D.N., Rago A.P., Lech M.P., Morgan J.R. Scaffold-free three-dimensional cell culture utilizing micromolded nonadhesive hydrogels // Biotechniques. 2007. Vol. 43 (4). № 494. PP. 496-500.
12. Dang S.M., Gerecht-Nir S., Chen J., Itskovitz-Eldor J., Zandstra P.W. Controlled, scalable embryonic stem cell differentiation culture // Stem Cells. Vol. 22 (3). PP. 275-282.
13. Rezende R., Pereira F., Kasyanov V., Ovsianikov A., Torgensen J., Gruber P., Stampfl J., Brakke K., Nogueira J., Mironov V., Da Silva J. Design, physical prototyping and initial characterisation of «lockyballs» // Virtual and Physical Prototyping. 2012. Vol. 7. Issue 4. PP. 287-301.
14. Shah R.K., Shum H.C., Rowat A.C., Lee D., Agresti J.J., Utada A.S., Chu L.-Y., Kim J.-W., Fernandez-Nieves A., Martinez C.J., Weitz, D.A. Designer emulsions using microfluidics // Materials Today. 2008. Vol. 11. PP. 18-27.
15. Rezende R., Azevedo F., Pedreira F., Kasyanov V., Wen X., Da Silva J., Mironov V. Nanotechnological Strategies for Biofabrication of Human Organs // Journal of Nanotechnology. 2012. Vol. 2012a. 10 p.

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