3D printanje organa

Vuk, Tamara

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:498073

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

3D PRINTANJE ORGANA

3D ORGAN PRINTING

SEMINARSKI RAD

Tamara Vuk

Preddiplomski studij molekularne biologije

(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: doc.dr.sc. Inga Marijanović

Zagreb, 2015.

SADRŽAJ

1. UVOD……...…..2

2. OSNOVE TKIVNOG INŽENJERSTVA……...2

3. TRADICIONALAN PRISTUP TKIVNOG INŽENJERSTVA…….3

4. BIOMIMETIČKI PRISTUP……...5

5. BIOPRINTANJE……7

5.1. BIOTINTA……...8

5.2. BIOPRINTERI……...…...10

5.3. TEHNIKE BIOPRINTANJA……...…….....….12

5.4. KONCEPT UBRZANOG SAZRIJEVANJA TKIVA…….....13

5.5. MOGUĆNOSTI BIOPRINTANJA……...14

5.6. PRIMJENA BIOPRINTANJA……..19

6. LITERATURA……...……..24

7. SAŽETAK……25

8. SUMMARY……..25

1. UVOD

Jedan od glavnih problema današnje medicine predstavlja zatajenje organa zbog bolesti, nesreća ili starosti. Klinički tretmani za rješavanje ovog problema ovise o transplantaciji organa od umrlih ili živih donora, koja često nije moguća. Broj ljudi koji trebaju transplantaciju organa raste iz godine u godinu i daleko premašuje broj dostupnih donora. Zbog nedostupnosti potrebnog organa u SADu svakog dana umire 25 ljudi. Trošak transplantacije organa, kao i prateći troškovi, premašuje iznos od 300 milijardi dolara godišnje (podaci za SAD, 2009.g.) (Cui i sur., 2012). Upravo zbog navedenih nedostataka metoda koje se trenutno primjenjuju, terapije temeljene na tkivnom inženjerstvu i regenerativnoj medicini postaju sve atraktivnija alternativa.

Tkivno inženjerstvo evoluiralo je iz polja razvoja biomaterijala i označava praksu kombiniranja nosača, stanica i biološki aktivnih molekula u funkcionalne tkivne konstrukte koji obnavljaju, održavaju ili poboljšavaju oštećena tkiva ili cijele organe. Regenerativna medicina je široko polje koje obuhvaća tkivno inženjerstvo, ali i istraživanja sposobnosti samog tijela da, uz pomoć stranih bioloških materijala, stvori stanice te obnovi tkiva i organe. Oba područja imaju jednak cilj: rješavanje problema donora organa (www.nibib.nih.gov).

Cilj ovog rada je opisati dosadašnje metode popravka i zamjene oštećenih i bolesnih organa, ukazati na njihove prednosti i nedostatke te predstaviti alternativu ovim pristupima – bioprintanje, kao metodu velikog potencijala i široke primjene u tkivnom inženjerstvu.

2. OSNOVE TKIVNOG INŽENJERSTVA

Tkivno inženjerstvo je interdisciplinarno područje koje primjenjuje načela inženjerstva i prirodnih znanosti, a čiji je krajnji cilj osmišljavanje i izrada funkcionalnih tkiva i organa pogodnih za regeneraciju, popravak i zamjenu oštećenih, bolesnih ili izgubljenih dijelova tijela. Tri su klasična pristupa tkivnog inženjerstva:

1) upotreba instruktivnog okoliša (npr. bioaktivnog materijala) za aktiviranje i vođenje stanica domaćina u regeneraciji tkiva;

2) isporuka stanica i bioaktivnih čimbenika za popravak u oštećeno područje;

3) uzgoj stanica na nosačima od biomaterijala u bioreaktoru (u uvjetima dizajniranim za konstrukciju funkcionalnog tkiva za implantaciju).

U sva tri pristupa, uvjeti okoliša usmjeravaju stanice (iz egzogenog izvora ili mobilizirane iz domaćina) na regeneriranje specifične strukture i funkcije tkiva (Jakab i sur., 2010).

Industrija povezana s tkivnim inženjerstvom imala je uspona i padova kroz protekla dva desetljeća. Vodeće tvrtke bile su ATS (Advanced Tissue Sciences) i OI (Organogenesis) čija je djelatnost tijekom devedesetih godina prošlog stoljeća bila većinom usmjerena na proizvodnju zamjenske kože. Obje su tvrtke otišle u stečaj u ranim 2000-tim; ATS danas više ne postoji dok je OI postala profitabilna tvrtka koja se bavi bioprintanjem tkiva za testiranje toksičnosti eksperimentalnih lijekova na stanice jetre (Cui i sur., 2012). U zadnjih 5 godina dogodio se procvat ove industrije pa se danas u pred-kliničkim istraživanjima nalaze transplantati kože, hrskavice, kosti, dušnika, mjehura, skeletnih mišića, krvnih žila i miokarda (Jakab i sur., 2010). Jedan od razloga brzog napretka tkivnog inženjerstva je razvoj novih pristupa temeljenih na načelima razvojne biologije koji postupno, ali sigurno, zamjenjuju tradicionalne metode.

3. TRADICIONALAN PRISTUP TKIVNOG INŽENJERSTVA

Tradicionalan pristup ima korijene u znanosti o biomaterijalima i predstavlja adaptaciju razgradivih polimera korištenih u medicinskim uređajima za potrebe inženjerstva živih tkiva. Ovaj pristup uveli su 1993. g. Langer i Vacanti, a zasniva se na kultiviranju stanica na 3D nosačima u bioreaktoru, kako bi se razvila funkcionalna zamjenska tkiva koja se potom ugrađuju *in vivo* (Cui i sur., 2012). Nosači služe kao „logistički predlošci“ pružajući stanicama specifične topološke značajke, mehanički okoliš i površinske ligande, a variraju u nekoliko parametara (poroznost, elastičnost, oblik). Biorazgradivi su, a izbor biomaterijala za izradu nosača ovisi o vrsti zamjenskog tkiva koje se razvija (Jakab i sur., 2010).

Nekoliko je osnovnih pretpostavki na kojima se temelji ovaj pristup:

1) stanice trebaju čvrstu podlogu za rast i proliferaciju (rast stanica ovisi o vezanosti na podlogu);

2) nosači su nužni za održavanje željenog, organospecifičnog oblika tkivnog konstrukta;

3) nosač služi i kao izvor induktivnih i instruktivnih signala za staničnu diferencijaciju, migraciju, proliferaciju i orijentaciju;

4) porozna struktura podloge omogućava optimalno nasađivanje stanica, vijabilnost i vaskularizaciju tkivnog konstrukta;

5) nakon biodegradacije čvrstog kostura, mehanička svojstva će se održati kontroliranom neomorfogenezom (Mironov i sur., 2009).

Tradicionalan pristup i dalje se često primjenjuje u tkivnom inženjerstvu. Dokazana prednost ovog pristupa je postojanje čvrstih nosača na koje se stanice pričvršćuju čime se održava oblik presatka tkiva. Također, nosači mogu služiti kao alat za instruktivno morfogenetsko signaliziranje i usmjerenu staničnu diferencijaciju. Stanice unutar poroznog skeleta zadržavaju vijabilnost pa biorazgradivi nosač eventualno zamjenjuje novo formirano tkivo (Mironov i sur., 2009). Ovim pristupom ostvareni su značajni uspjesi u izgradnji avaskularnih, aneuralnih, alimfatičkih, tankih i šupljih organa. Tkiva projektirana na ovaj način nutrijente dobivaju difuzijom iz vaskulature domaćina. Problem predstavlja proizvodnja organa zahtjevnijih za transplantaciju (>90%), debelih i složenih tkiva (srce, bubreg, jetra) čija vaskularizacija i nakon dva desetljeća intenzivnih napora ostaje neriješen problem. Pri konstruiranju složenijih organa, tradicionalan pristup, koji podrazumijeva nasađivanje izoliranih stanica na prethodno formirane čvrste nosače, nailazi na sljedeća ograničenja:

a) unatoč znatnom poboljšanju dizajna, formiranje i sazrijevanje tkiva kroz nosač i dalje nije uniformno;

b) uvođenje više staničnih tipova (potrebnih za izgradnju organa kompleksne strukture) s pozicijskom specifičnošću je tehnološki zahtjevno;

c) nemogućnost izgradnje funkcionalne vaskulature u gotovim konstruktima tkiva;

d) postizanje gustoće stanica specifične za određeni organ;

e) akutni i dugoročni upalni odgovor koji proizlazi iz odgovora domaćina na nosač i produkte njegove biorazgradnje;

f) mehanička neusklađenost projektiranih tkiva s okolnim tkivom (Mironov i sur., 2009).

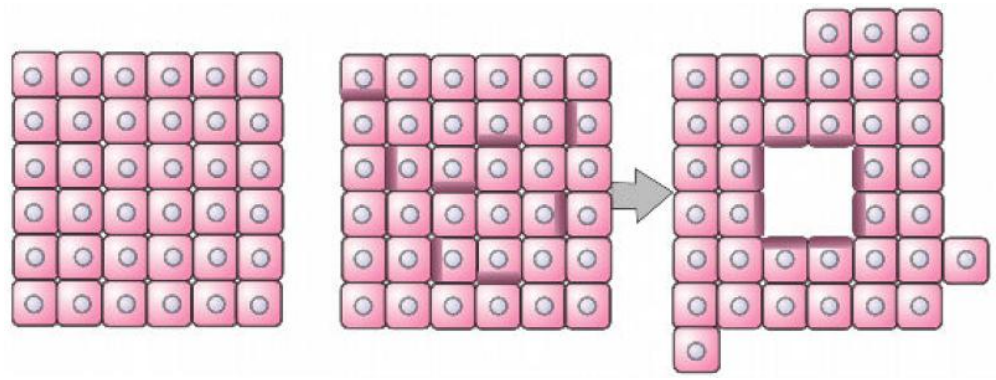
Ovi, i brojni drugi nedostaci tradicionalnog pristupa, učinili su potragu za mogućim alternativama nužnom. Alternativni pristupi moraju omogućiti automatiziranu biofabrikaciju,

precizno postavljanje stanica u visokoj gustoći i učinkovitu vaskularizaciju složenih tkiva (Mironov i sur., 2009). Jedan od tih pristupa je i bioprintanje opisano u nastavku.

4. BIOMIMETIČKI PRISTUP

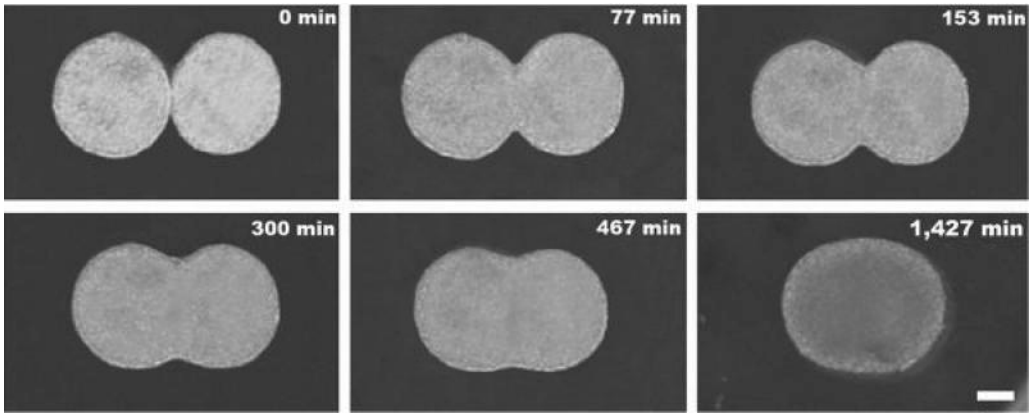
Biomimetički pristup predstavlja integraciju razvojne biologije i tkivnog inženjerstva. Većinom empirijski pristup tkivnom inženjerstvu postupno se zamjenjuje tehnologijom inspiriranom načelima razvojne biologije. Glavni fokus novih pristupa je na stanicama koje su glavni „tkivni inženjeri“. Na nama je da im pružimo uvjete koji će oponašati okoliš prisutan tijekom prirodnog razvoja kako bi se omogućilo ostvarenje njihova punog biološkog potencijala. Drugi fokus je na razvoju tehnologija koje će stanice usmjeravati u regeneraciji neispravnih tkiva. Izvanredan primjer takvih tehnologija su pristupi temeljeni na bioprintanju i samo-sastavljanju (autonomnoj organizaciji komponenti bez ljudske intervencije)(Jakab i sur., 2010).

Pristupi temeljeni na biofabrikaciji printanjem koriste nekoliko morfogenetskih mehanizama karakterističnih za rane razvojne procese. Stanično sortiranje je proces samo-sastavljanja koji predstavlja opći mehanizam uspostave staničnih odjeljaka i granica između različitih tkiva. Malcolm Steinberg formulirao je „diferencijalnu adhezijsku hipotezu“ (DAH) koja pruža jednostavno objašnjenje sortiranja stanica. Kako stanice u inicijalno homogenoj populaciji diferenciraju, postaju polarizirane te eksprimiraju adhezijske molekule (kadherine, selektine) samo na ograničenim dijelovima svoje površine. Stanice različitog tipa potom prianjaju jedne uz druge različitom snagom, odnosno, adhezivnije stanice agregiraju i okružuju se manje adhezivnim stanicama. Formiranje lumena pruža dobar primjer za razumijevanje molekularne osnove sortiranja stanica (Slika 1). Ovaj morfogenetski mehanizam najaktivniji je tijekom embrionalnog razvoja kad adhezivni kontakti još nisu u zreloj fazi (Jakab i sur., 2010).



Slika 1. Shema formiranja lumena kao posljedice diferencijalne adhezije. Osjenčana područja predstavljaju nedostatak adhezijskih molekula u toj regiji stanice. Stanice se orijentiraju i sortiraju u oblik lumena (preuzeto iz Jakab i sur., 2010).

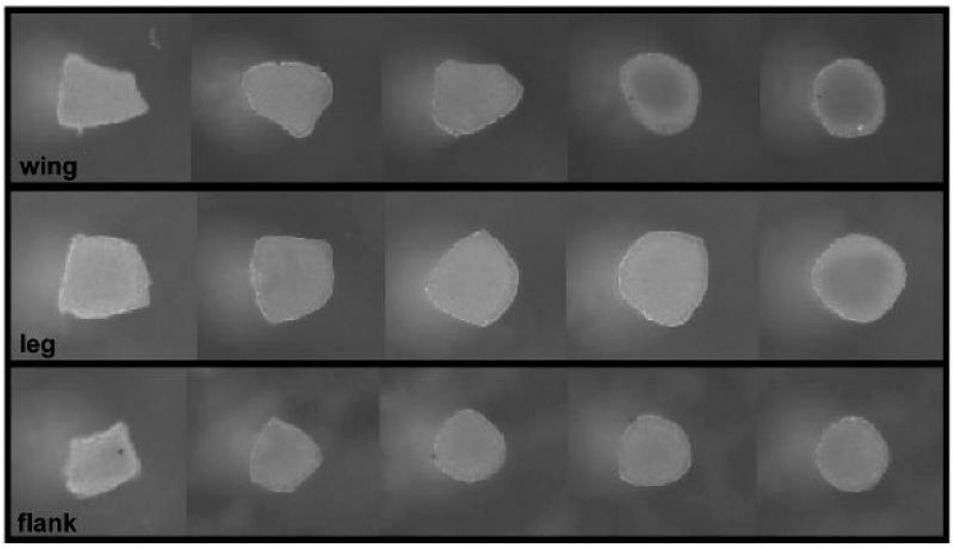
Mehanizam fuzije tkiva, procesa u kojem se sjedinjuju dvije ili više različitih populacija stanica, temelj je formiranja brojnih struktura u embriju (Slika 2). Fuzija tkiva također je u skladu s diferencijalnom adhezijskom hipotezom: tkivo veće površinske napetosti okružuje se onim manje površinske napetosti (Jakab i sur., 2010).



Slika 2. *In vitro* fuzija dvaju višestaničnih agregata (preuzeto iz Jakab i sur., 2010).

Spontano zaokruživanje fragmenata embrionalnog tkiva (Slika 3) i višestaničnih agregata jedna je od prvih indikacija da populacije adhezivnih i pokretnih stanica imaju svojstva nalik tekućinama. Prema ovoj analogiji, sortiranje i fuzija vođeni su graničnom i površinskom napetošću. Razlika u površinskoj napetosti je kvantitativna mjera diferencijalne stanične adhezije. Površinska napetost tkiva proporcionalna je broju adhezijskih molekula; što

je tkivo kohezivnije, veća je površinska napetost. Ipak, uzbudljiv i praktičan koncept likvidnosti tkiva, koji stanična svojstva sažima pomoću samo nekoliko parametara (površinska napetost, viskoznost, elastična konstanta), još uvijek nije univerzalan morfogenetski princip, budući da procesi koji su u skladu s njim ne moraju nužno djelovati u svim fazama ranog razvoja (Jakab i sur., 2010).



Slika 3. Spontano zaokruživanje fragmenata (embrionalnih pilećih) tkiva *in vitro* unutar 24 h. Indikacija ponašanja nalik tekućini (preuzeto iz Jakab i sur., 2010).

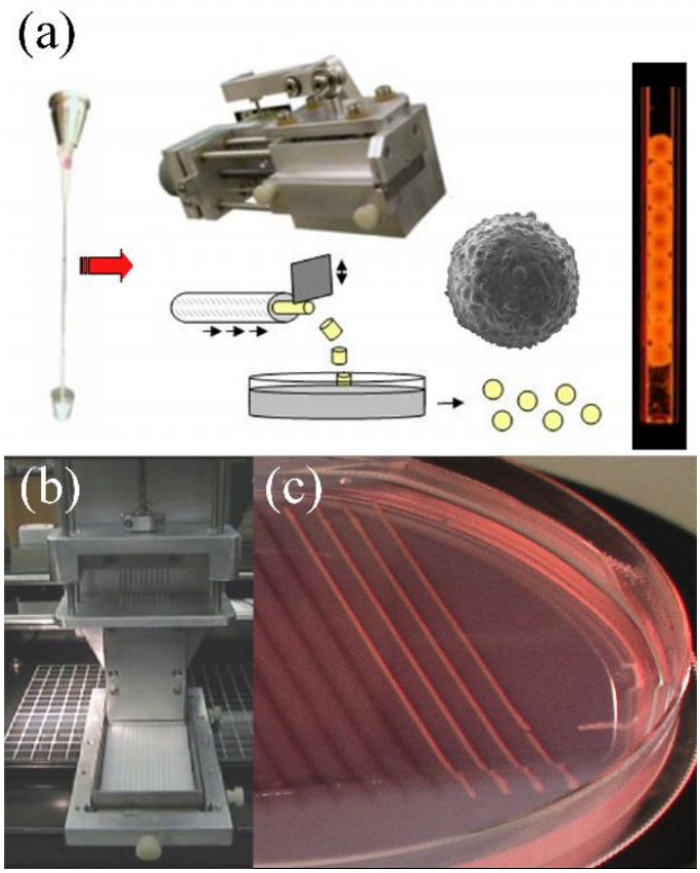
5. BIOPRINTANJE

Danas se smatra kako je najbolji pristup osloniti se na samo-sastavljanje i samo-organizacijska svojstva stanica i tkiva te urođene regenerativne sposobnosti samog organizma. Printanje organa je tehnološka paradigma u nastajanju koja predstavlja razvojnom biologijom nadahnutu alternativu klasičnim pristupima. To je potpuno biološki inženjerski pristup bez nosača zasnovan na printu koji koristi višestanične samo-sastavljajuće jedinice kao čestice biotinte i upotrebljava rane razvojne morfogenetske principe, kao što su sortiranje stanica i fuzija tkiva. Bioprintanje uglavnom nema posljedica na stanice, može se jednostavno kombinirati s transfekcijom gena i vjerojatno predstavlja rješenje za konstrukciju debelih i kompleksnih tkiva s funkcionalnom vaskulaturom.

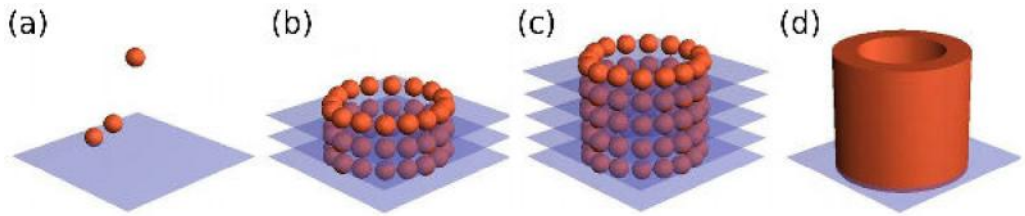
5.1. BIOTINTA

Biotinta je tekući materijal napravljen od živih stanica. Prvi korak u tkivnom inženjerstvu, bilo 3D printanju bilo nekoj drugoj metodi, jest biopsija bolesnog/nefunkcionalnog organa te izolacija i umnažanje stanica s regenerativnim potencijalom. Izbor stanica za popravak ključan je korak u svim metodama koje se primjenjuju u tkivnom inženjerstvu. Prednost autolognih tkivnih matičnih stanica je ta da su specifične za bolesnika pa ne dolazi do odbacivanja transplantata. Iako u početku izolirane iz koštane srži, potvrđena je njihova prisutnost i u masnom tkivu (ADSC = adipose tissue derived mesenchymal stem cells), krvi, amniotskoj tekućini te zubnoj pulpi. Adultne humane mezenhimalne matične stanice imaju sposobnost da stvore niz tkiva, uključujući hrskavicu, kosti, masno tkivo i krvne žile, ali ne i srčani mišić, živce ili hepatocite. Praktički neograničen potencijal za *in vitro* ekspanziju pokazuju matične stanice nalik embrionalnim (ELSC=embryonic-like stem cells) te inducirane pluripotentne matične stanice (iPS=induced pluripotent cells) izolirane iz različitih tkiva. Suspenzije ovih stanica za pripremu biotinte mogu biti homogene i sadržavati jedan tip stanica, ili heterogene i sadržavati mješavinu nekoliko staničnih tipova (Jakab i sur., 2010).

Priprema biotinte obično započinje centrifugiranjem stanične suspenzije. Dobiveni talog prenese se u kapilarnu mikropipetu te nakon kratke inkubacije u mediju na 37°C, interakcije između stanica su obnovljene. Biotintu sačinjavaju višestanični građevni blokovi cilindričnog ili sferičnog oblika. Sferični građevni blokovi biotinte dobivaju se tako da se gusta masa stanica istisnuta iz mikropipete reže na cilindrične fragmente (istog promjera i visine) jednake veličine. Čestice sferičnog oblika se formiraju spontanim zaokruživanjem cilindara tijekom inkubacije na okretnom „shakeru“ preko noći. Ako je početna suspenzija bila sastavljena od više tipova stanica, sortiranje i zaokruživanje odvija se paralelno. Izrada cilindričnih građevnih blokova zahtijeva sazrijevanje „kaše“ stanica u ne-adhezivnom agaroznom kalupu preko noći čime se povećava kohezivnost (Slika 4). Čestice biotinte pakiraju se u patrone i umeću u pisač neposredno prije printanja, zajedno s patronom koja sadrži biopapir. Sferične ili cilindrične višestanične jedinice isporučuju se prema računalnom predlošku zajedno s biopapirom (hidrogelom) koji služi kao poticajna sredina za napredovanje stanica (Slika 5). Stanice se potom stavljaju u odgovarajuće uvjete u bioreaktor (Jakab i sur., 2010).



Slika 4. Priprema višestaničnih građevnih blokova. (a) Priprema tkivnih sferoida. (b,c) Priprema cilindričnih građevnih blokova. Istovremeno do 10 staničnih smjesa u agaroznom kalupu sazrijeva u cilindre dovoljno čvrste za printanje (preuzeto iz Jakab i sur., 2010).

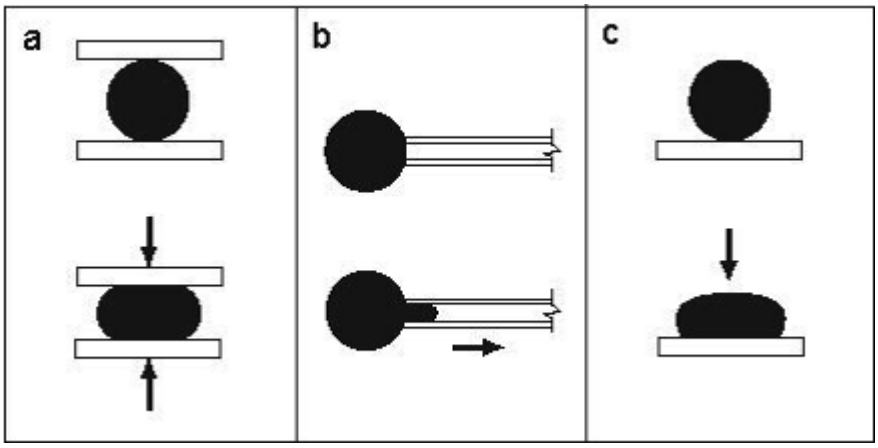


Slika 5. Nanošenje biotinte. (a) Na ispisani list biopapira polažu se čestice biotinte. (b,c) Slojevi biokompatibilnog hidrogela i građevni blokovi nastavljaju se naizmjenice nanositi prema nacrtu za izgradnju željene 3D strukture (ovdje: tubularni konstrukt). (d) Konstrukt dobiven nakon fuzije građevnih blokova i uklanjanja hidrogela nakon nekoliko dana (preuzeto iz Jakab i sur., 2010).

Danas je osobito popularna upotreba tkivnih sferoida ili „mini-tkiva“, samo-sastavljajućih živućih materijala određenog sastava te bioloških i materijalnih svojstava koja

se mogu kontrolirati. Tkivni sferoidi korišteni su kao 3D *in vitro* modelni sustavi u biomedicinskim i tumorskim istraživanjima kroz nekoliko desetljeća pa je s vremenom razvijen širok arsenal metoda za njihovu proizvodnju. Odabrana metoda za široku upotrebu u tkivnom inženjerstvu i printanju organa mora ispunjavati sljedeće kriterije: mora biti skalabilna metoda koja će davati tkivne sferoide maksimalno standardizirane veličine, ne smije ugrožavati njihov kapacitet za fuziju niti uzrokovati značajna oštećenja stanica ili DNA i mora biti dovoljno fleksibilna da omogući proizvodnju raznolikih tkivnih sferoida (Mironov i sur., 2009).

Razvoj visoko osjetljivih, direktnih i indirektnih kvantitativnih metoda za procjenu materijalnih svojstava „mikro-tkiva“ i tkivnih sferoida (prije i nakon fuzije u veće konstrukte) bitan je zadatak u razvoju novih pristupa tkivnog inženjerstva. Na taj će se način omogućiti bolja kontrola procesa tkivne fuzije i postizanje željene razine sazrijevanja tkiva. Najpopularnije metode mjerenja materijalnih svojstava tkivnih sferoida su tenziometrija, aspiracija i centrifugiranje (Slika 6)(Mironov i sur., 2009).



Slika 6. Metode kvantitativne evaluacije materijalnih svojstava tkivnih sferoida. (a) Tenziometrija – kontrolirana kompresija staničnih agregata između dvije paralelne ploče. Ograničenje ovog pristupa je zahtjev idealnog sferičnog oblika. (b) Aspiracija. (c) Centrifugiranje (preuzeto s downloads.deusm.com).

5.2. BIOPRINTERI

Za primjenu 3D printanja u konstrukciji živih struktura razvijene su 2 glavne tehnologije.

Prva se temelji na uporabi tintnih pisača. Tintni ispis je beskontaktna tehnika printanja koja pomoću sitnih kapi tinte reproducira informaciju digitalnog uzorka na podlogu. Ta je metoda nekoć naširoko korištena u elektronici i mikro-inženjerskoj industriji, a nedavno je našla uspješnu primjenu u biomedicinskom polju (Cui i sur., 2012). Ovom tehnikom printaju se ili pojedinačne stanice ili male nakupine stanica. Metoda je brza, svestrana i jeftina, a u uporabi su toplinski, piezoelektrični i elektromagnetski pisači (Jakab i sur., 2010).

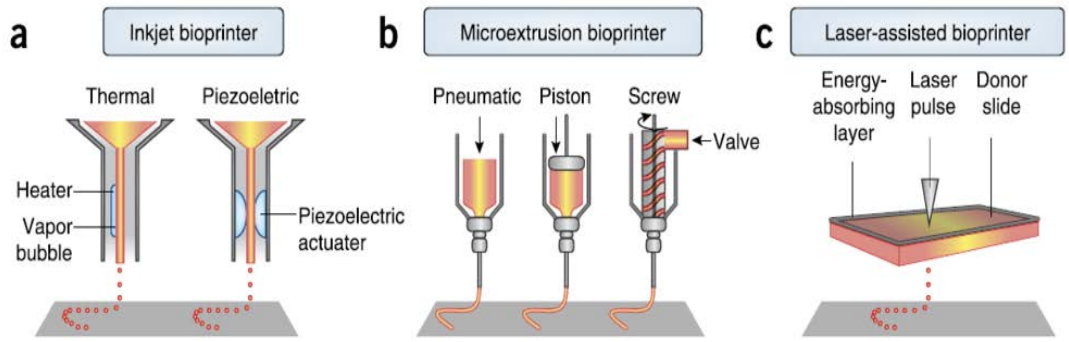
U piezoelektričnom tintnom printeru, pogon od polikristalinske piezoelektrične keramike u svakoj mlaznici pruža kratkotrajan pritisak za izbacivanje kapi tinte na podlogu. Iako su ovim pristupom postignuti brojni uspjesi u printanju krhkih i osjetljivih bioloških struktura (DNA), još uvijek se nailazi na poteškoće pri ispisu stanica sisavaca, gdje su zabilježena oštećenja staničnih membrana te liza stanica uzrokovana frekvencijom od 15-25 kHz koju rabe piezoelektrični tintni pisači (Cui i sur., 2012).

Termalni tintni pisači lakše se modificiraju, rabe i održavaju te su kompatibilniji sa živim sustavima u odnosu na piezoelektrične. Iako grijač u svakoj mlaznici termalnog pisača podiže lokalnu temperaturu na 300°C kroz nekoliko mikrosekundi tijekom ispisa, čime se generiraju mjehurići zraka potrebni za izbacivanje tinte, isprintane stanice sisavaca grijane su samo 2 μs na temperaturi 4-10°C višoj od okolne te je njihova vijabilnost u prosjeku 90%. Također, tinta koja se priprema za termalni tintni ispis obično je na bazi vode što smanjuje začepljenje glave pisača i omogućava jednostavno podešavanje koncentracije biotinte, što pak omogućava kontrolu broja stanica u pojedinačnim kapima tinte i upotrebu tintnog ispisa u kvantitativnom nasađivanju stanica. Iako se pretpostavlja da je metoda sigurna za žive sustave jer su stanice tijekom cijelog procesa printanja zaštićene u vodenom okruženju, i ova tehnologija ima nedostatke. U svrhu održanja velike razlučivosti ispisa, mlaznice u glavi pisača obično su vrlo male. Toplina i mehanički stres primijenjeni na stanice pri njihovu prolasku kroz uske mlaznice mogu oštetiti membranu stanica i izmijeniti im fenotip. Međutim, sveobuhvatnom procjenom vijabilnosti stanica, veličine pora stanične membrane, procesa staničnog popravka, apoptoze i ekspresije *heat shock* proteina, primijećene su tek neznatne razlike između ispisanih i neispisanih stanica. Pore na ispisanim stanicama uočene prodorom dekstranske boje su prolazne (stanice su ih mogle popraviti unutar 2 sata) te se mogu koristiti za transfekciju DNA pri ispisu. Zaključeno je da ova metoda ima manje štetan učinak na stanice (Cui i sur., 2012). Premda su tehnike tintnog ispisa dobro razvijene i prilagođene, njima se i dalje teško osigurava gustoća stanica potrebna za izradu čvrstih

struktura organa pa postizanje odgovarajuće strukturne organizacije i funkcionalnosti ostaje izazov (Jakab i sur., 2010).

Drugi pristup koristi mehaničke ekstrudere za stavljanje čestica biotinte na biopapir (nosivi materijal) prema računalno generiranim predlošcima. Prednost ove metode je korištenje ranih razvojnih mehanizama. Čestice biotinte predstavljaju male 3D fragmente tkiva pa su stanice u njima u adhezivnim kontaktima sa svojim susjedima čime se može osigurati prijenos vitalnih molekularnih signala. Fuzijom čestica biotinte i sortiranjem stanica unutar njih formiraju se organoidi. Međutim, relativno visoka cijena printera nedostatak je ove metode (Jakab i sur., 2010).

Pored navedenih, trenutno su dostupni i brojni drugi pristupi. Ti pristupi uglavnom imaju poteškoće u manipuliranju pojedinačnim stanicama što otežava izradu tkiva koja zahtijevaju viši stupanj organizacije stanica pa se i rjeđe koriste. Među njima je i laserski ispis koji koristi energiju lasera da ispari tekućinu u biološkim uzorcima, što može uzrokovati pretjerano sušenje i propadanje bioloških sustava (Slika 7)(Cui i sur., 2012).

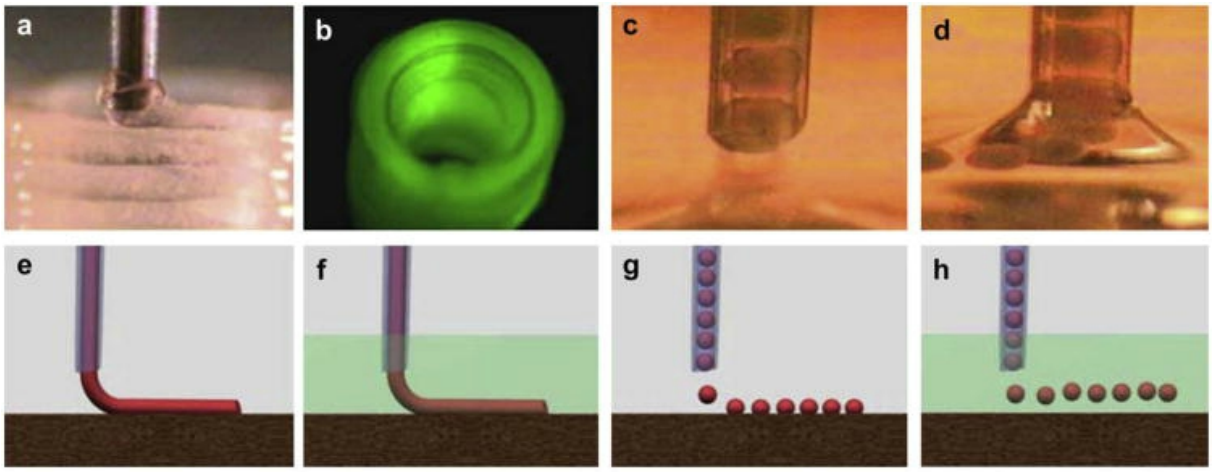


Slika 7. Komponente različitih vrsta bioprintera. (a) Tintni, (b) mikroekstruzijski i (c) laserski pisač (preuzeto iz Murphy i Atala 2014).

5.3. TEHNIKE BIOPRINTANJA

Razlikujemo dva načina bioprintanja. Kontinuirani (analogni) način obično je ograničen na jedan, homogeni materijal kao što su hidrogelovi, dok digitalni ispis pruža mnogo veću fleksibilnost u izboru materijala. Digitalni materijali mogu se podijeliti u dva

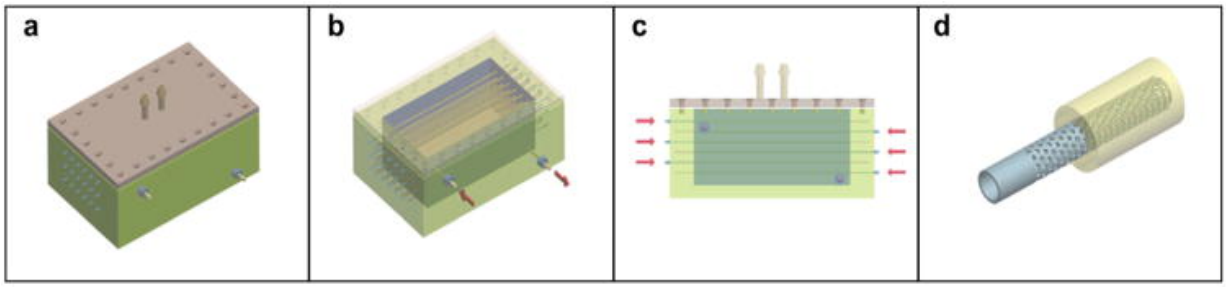
glavna razreda. Prvi razred uključuje precizno smještanje kapi materijala koje u mjestu očvrsnu, kao što su kapi izbačene tintnim ispisom. Drugi razred uključuje organizaciju prethodno oblikovanih čestica – voksela – koje se pasivno postroje sa susjednim česticama te se moraju moći jednostavno proizvesti u velikim količinama. Te kriterije zadovoljavaju tkivni sferoidi koji se mogu smatrati sferičnim fizičkim vokselima. Prema tome, printanje organa uporabom tkivnih sferoida kao građevnih blokova ne temelji se na analognom, već na digitalnom ispisu (Slika 8)(Mironov i sur., 2009).



Slika 8. Kontinuirano i digitalno printanje. (a,e) Printanje kontinuiranih linija stanica na ekstracelularni matriks (ECM). (b,f) Printanje kontinuiranih linija stanica u medij. (c,g) Printanje agregata na ECM. (d,h) Printanje agregata u medij. (Preuzeto i prilagođeno iz Mironov i sur., 2009)

5.4. KONCEPT UBRZANOG SAZRIJEVANJA TKIVA

U odsustvu čvrstih nosača tkivni konstrukti moraju proći kroz ubrzani proces sazrijevanja, odnosno tranzicije iz tekućeg u kruto stanje kako bi zadržali oblik, sastav i integritet. To se postiže odgovarajućom kombinacijom maturogena (faktora za ubrzano sazrijevanje tkiva) te razvojem nove tehnologije, kao što je perfuzijski bioreaktor koji može poslužiti održanju strukture osjetljivih tkivnih presadaka i dostavi maturogena (Slika 9)(Mironov i sur., 2009).



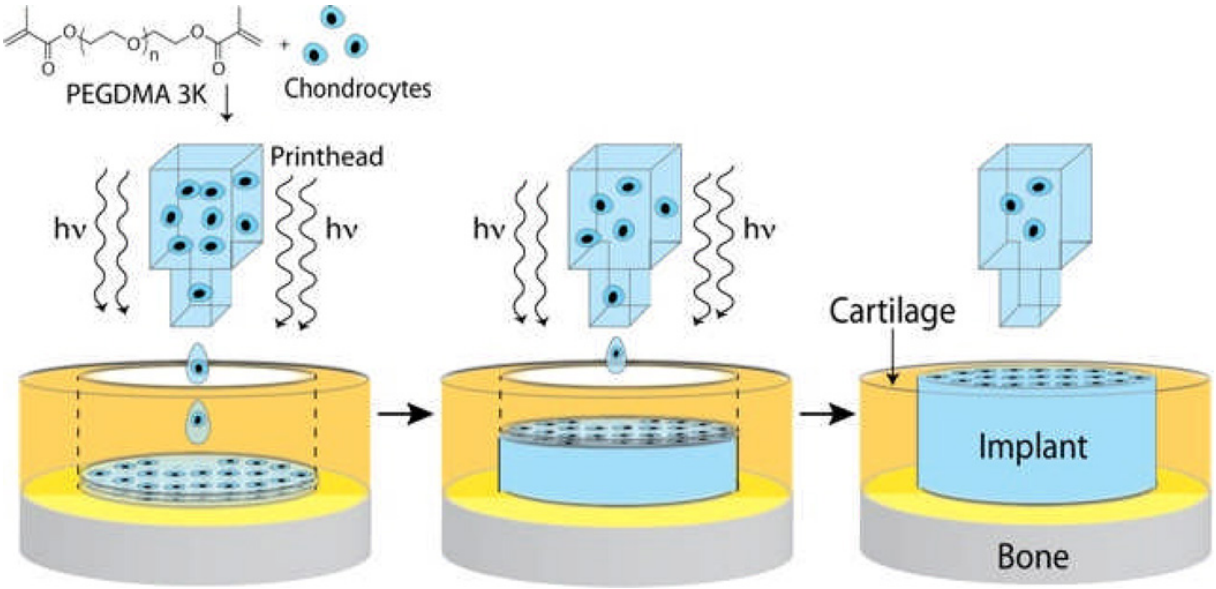
Slika 9. Dizajn perfuzijskog bioreaktora za ubrzano sazrijevanje tkiva (preuzeto iz Mironov i sur., 2009).

5.5. MOGUĆNOSTI BIOPRINTANJA

Jedan od izazova suvremene regenerativne medicine koji se nastoji riješiti bioprintanjem jest popravak oštećenja hrskavice koja nastaju kao posljedica osteoartritisa, starenja i ozljeda zglobova. Danas uobičajeni klinički tretmani vrlo su invazivni, kompliciranii ne obnavljaju hrskavicu trajno. Trenutne strategije popravka hrskavice koljena uključuju proces uklanjanja zdravog tkiva oko područja lezije čime se stvaraju umjetni defekti za buduću implantaciju. Taj postupak uzrokuje dodatnu nekrozu postojećeg tkiva te konačnu degeneraciju hrskavice i implantata. Direktan popravak hrskavice na mjestu lezije, bez ikakvog dodatnog oštećenja postojećeg tkiva, projektiranim tkivom koje blisko oponaša i integrira se s nativnom hrskavicom, predstavlja pogodno rješenje. Takav popravak mora biti prilagodljiv promjenjivim fizičkim dimenzijama i svojstvima tkiva. Te mogućnosti pruža tehnologija bioprintanja temeljena na tintnom ispisu (Cui i sur., 2012).

Standardni termalni tintni pisač je modificiran za precizno polaganje hondrocita i polietilen-glikol dimetilakrilata (PEGDMA) sloj po sloj na oštećenje hrskavice (Slika 10). Sintetički PEG hidrogelovi održavaju vijabilnost hondrocita, induciraju taloženje ekstracelularnog matriksa (ECM=extracellular matrix), topivi su u vodi i omogućuju simultanu polimerizaciju tijekom printanja, čime se postiže jednolika raspodjela hondrocita. Izbjegavanje akumulacije hondrocita uslijed gravitacije, kao i skraćeno vrijeme izlaganja stanica UV svjetlosti, prednosti su ove metode u odnosu na manualnu zonalnu izradu hrskavice. Izazov ove metode je ograničena maksimalna gustoća stanica za bioprintanje, budući da se optimalna razlučivost postiže samo s biotintom gustoće $8x10^6$ stanica/mL ili manje. Tom se problemu doskočilo sinergističkim tretmanom stanica s FGF-2/TGF-β1

faktorima rasta. Ta se kombinacija pokazala optimalnom za poticanje proliferacije stanica i odlaganja ekstracelularnog matriksa u izrađenoj hrskavici zadržavajući pritom visoku razlučivost ispisa (Cui i sur., 2012).



Slika 10. Shematski prikaz bioprintanja hrskavice uz simultanu fotopolimerizaciju (preuzeto iz Cui i sur., 2012).

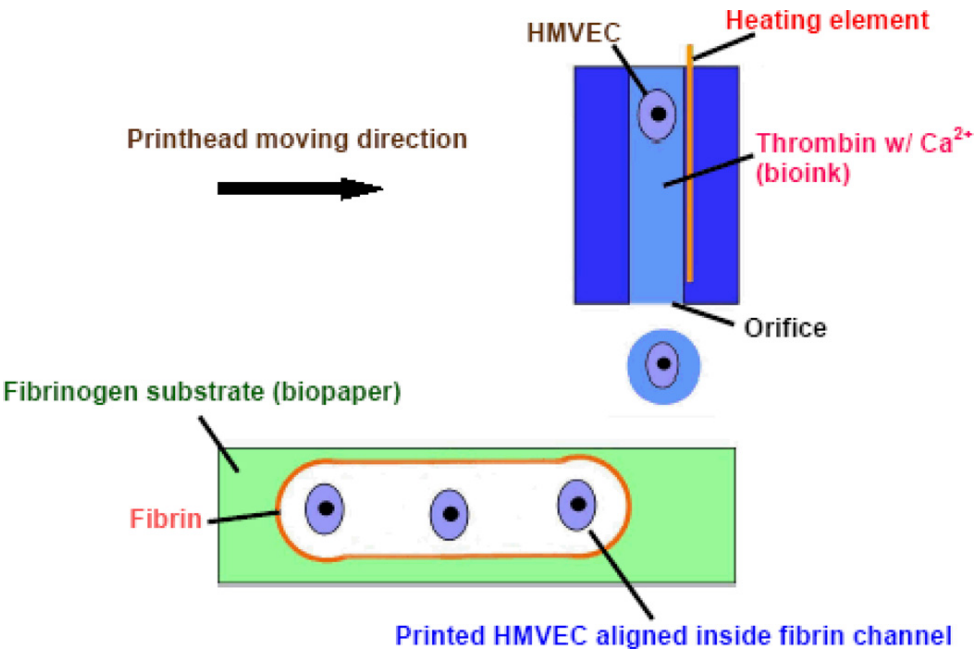
Vjerojatno najkritičniji i još uvijek neriješen problem tkivnog inženjerstva jest vaskularizacija debelih tkivnih konstrukata, budući da se molekularnom difuzijom osigurava izmjena nutrijenata i kisika samo u slojevima tkiva debljine do 100 μm (Jakab i sur., 2010).

Indirektno rješenje ovog problema ponudila je tehnologija temeljena na samo-sastavljanju stanica u listove koju je razvio L'Heureux (L'Heureux i sur., 1998). Uzastopnom implantacijom listova stanica (<80 μm) i pružanjem domaćinskoj vaskulaturi 1-3 dana vremena za vaskularizaciju svakog transplantiranog lista prije dodavanja sljedećeg, postignuta je funkcionalna vaskularizacija debelog (1mm) tkivnog konstrukta (miokarda) *in vivo*. Međutim, zbog rizika koji donose višestruki kirurški zahvati, ova metoda nije primjenjiva na pacijente (Jakab i sur., 2010).

Najveći izazov predstavlja prijenos i integracija tkiva iz *in vitro* u *in vivo* uvjete. S kirurškog gledišta, tkivni konstrukt trebao bi sadržavati hijerarhijsko vaskularno stablo

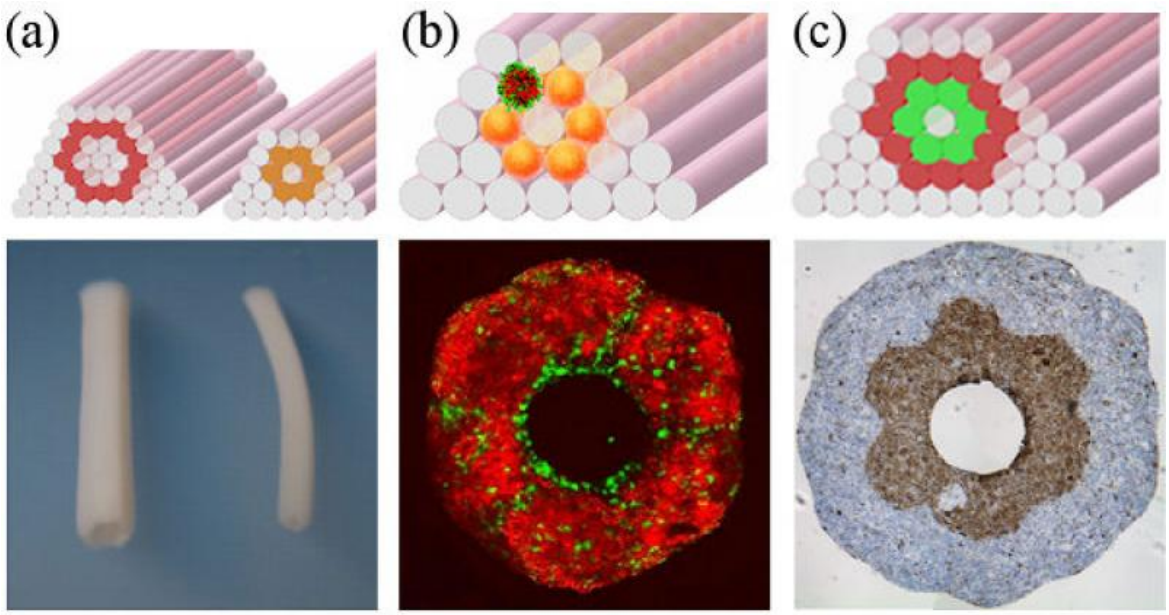
sastavljeno od sljedećih komponenti: mreže kapilara (10-20 μm), intermedijarne vaskulature (50-500 μm) i makrovaskulature (do 2 mm) (Jakab i sur., 2010).

Svaka od tih esencijalnih komponenata vaskularnog stabla može biti proizvedena zasebno. Za izradu mikrovaskulature uspješnom se pokazala metoda bioprintanja uz korištenje humanih mikrovaskularnih endotelnih stanica (HMVEC=human microvascular endothelial cells) i fibrina kao biotinte. Endotelne stanice temelj su opskrbe tkiva krvlju. One grade čitav unutrašnji sloj kardiovaskularnog sustava i jedine su stanice koje formiraju kapilare (Cui i sur., 2012). Tijekom embrionalne vaskulogeneze i angiogeneze formiraju osnovne cjevaste strukture te luče faktore rasta PDGF i TGF-β koji induciraju polaganje ekstracelularnog matriksa. Esencijalne komponente ECM-a su elastin i kolagen. Ključnu ulogu u proizvodnji elastina, proteina odgovornog za elastična svojstva krvnih žila, igra TGFβ (Jakab i sur., 2010). Fibrin pak igra značajnu ulogu u prirodnom zacjeljivanju rana. Fibrinski gelovi potiču migraciju, proliferaciju stanica, te sintezu matriksa. Modificiranje standardnog tintnog pisača za istovremeno polaganje HMVEC stanica i fibrina pokazalo se pogodnim za izradu mikrovaskulature; u ispisanim fibrinskim kanalima endotelne stanice proliferiraju i formiraju cjevaste strukture (Slika 11). Time je pokazano da ispisane i proliferirane endotelne stanice mogu vršiti bitnu funkciju angiogeneze (Cui i sur., 2012).



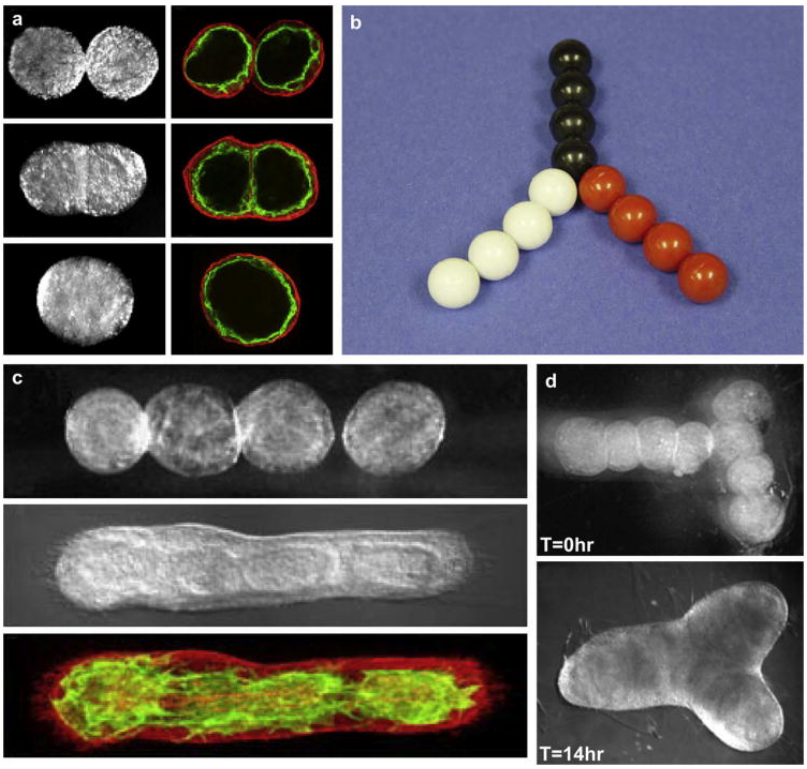
Slika 11. Shema mehanizma izrade mikrovaskulature simultanim polaganjem HMVEC stanica i fibrina pomoću termalnog tintnog pisača. Trombin služi za polimerizaciju fibrina. Polaganje stanica biotinte odvija se istovremeno sa formiranjem fibrinskog kanala. Stanice poredane u fibrinskom kanalu spremne su za proliferaciju (preuzeto iz Cui i sur., 2012).

Trenutni napori ulažu se u primjeni bioprintanja za proizvodnju intermedijarne vaskulature, karike koja bi povezala kapilarni sustav s makrovaskulaturom i omogućila uspostavljanje funkcionalnog vaskularnog stabla. Tubularne strukture dobivene su iz mješavine nasumice raspoređenih endotelnih (EC=endothelial cells) i glatkih mišićnih stanica (SMC=smooth muscle cells), pri čemu se endotel formirao tijekom fuzije i sortiranja uslijed printanja (Slika 12). Ovom metodom postignuta je bolja organizacija ECM-a, bolja vezanost endotela i brže sazrijevanje (Jakab i sur., 2010).

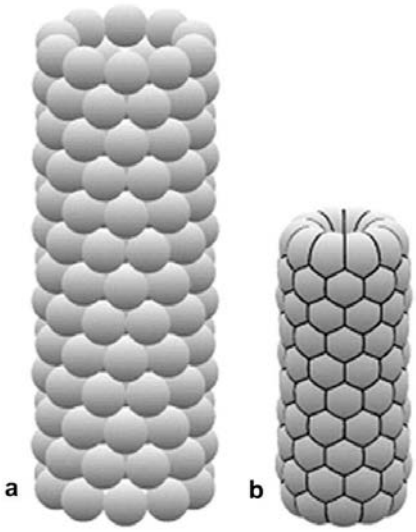


Slika 12. (a) Predlošci (gore) i fuzionirani vaskularni konstrukti različitih promjera dobiveni ispisom cilindrične biotinte (dolje). (b) Gore – predložak za izradu konstrukta pomoću tkivnih sferoida sastavljenih od SMC(crveno) i EC(zeleno); dolje – poprečni presjek fuzioniranog konstrukta: lumen je sastavljen pretežno od endotelnih stanica. (c) Gore - predložak za dvoslojnu vaskularnu cijev: unutarnji sloj čine SMC (zeleno), drugi sloj fibroblastni (crveno) građevni blokovi; dolje – poprečni presjek pokazuje fuziju i segregaciju dva tipa stanica (preuzeto iz Jakab i sur., 2010).

Još jedno potencijalno rješenje za izgradnju razgranatog intraorganskog vaskularnog stabla nudi pristup temeljen na tri tipa tkivnih sferoida dizajniran posebno za uporabu u tehnologiji bioprintanja. Metoda koristi tri osnovna tipa tkivnih sferoida: čvrste (bez lumena), monoluminizirane (s jednim velikim lumen) i histotipične mikrovaskularne tkivne sferoide (Slika 13). Nakon završenog printanja slijedi fuzija (Slika 14) i ubrzano sazrijevanje tkiva. Tada je vaskularno stablo spremno za integraciju u 3D konstrukte tkiva i organa. Proces ubrzanog sazrijevanja uglavnom se temelji na povećanju odlaganja kolagena i elastina (Mironov i sur., 2009).



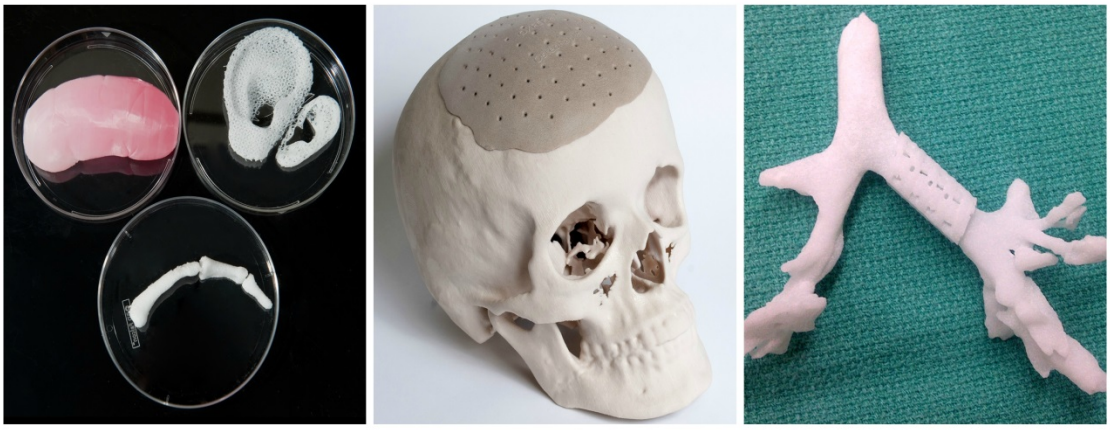
Slika 13. Primjer upotrebe monoluminiziranih tkivnih sferoida za printanje segmenata intraorganskog vaskularnog stabla. (a) Fuzija tkivnih sferoida. (b) Model za izradu razgranatih vaskularnih segmenata od monoluminiziranih tkivnih sferoida. (c) Uzastopni koraci fuzije tkivnih sferoida u hidrogelu. (d) Dobiveni razgranati vaskularni segmenti prije (gore) i nakon tkivne fuzije (dolje) (preuzeto iz Mironov i sur., 2009).



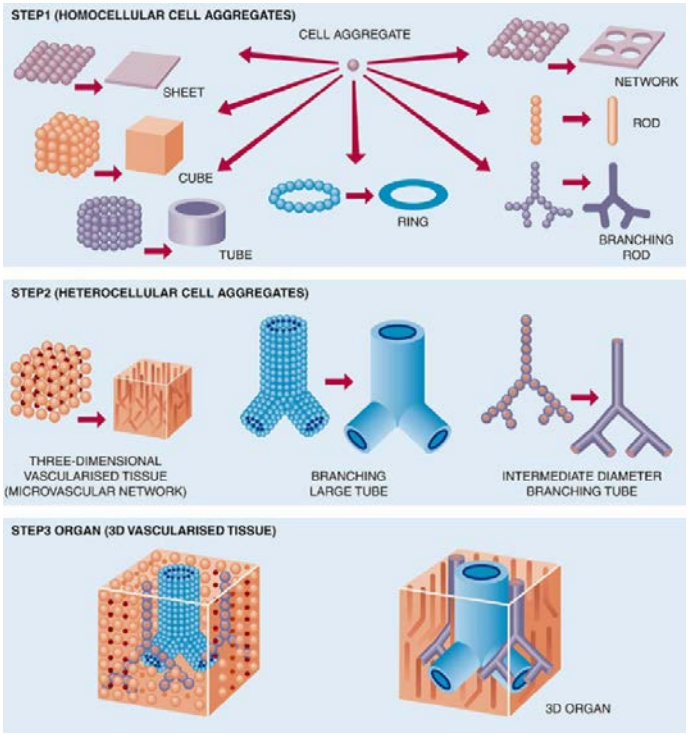
Slika 14. Simulacija promjene morfologije tubularnog tkivnog konstrukta tijekom fuzije. (a) Početni tkivni konstrukt se skraćuje i sužava. (b) Heksagonalan uzorak pakiranja tkivnih sferoida (preuzeto iz Mironov i sur., 2009).

5.6. PRIMJENA BIOPRINTANJA

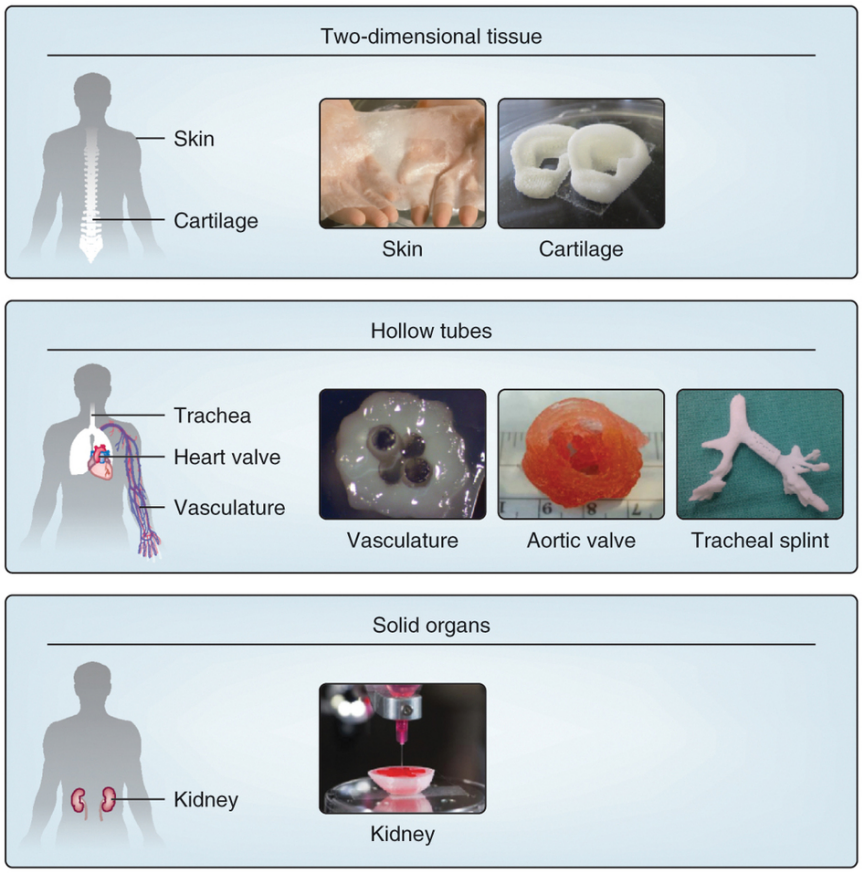
Aditivno manufakturiranje, znano i kao 3D printanje, donosi velike inovacije u razna područja kao što su inženjerstvo, proizvodnja, umjetnost, obrazovanje i medicina. Osim primjene u izradi zamjenskih dijelova tijela (metalnih i plastičnih implantata za zamjenu kostiju i sl.) (Slika 15), 3D printanje polako, ali sigurno preuzima centralnu ulogu u proizvodnji zamjenskih tkiva i organa, čime bi se mogao riješiti problem nedostatka donora. Međutim, usporedbom bioprintanja s ne-biološkim printanjem, uviđamo kako ono uključuje dodatne komplikacije kao što su izbor materijala, staničnih tipova, čimbenika diferencijacije i rasta te tehničke izazove vezane uz osjetljivost živih stanica i izgradnju tkiva. Unatoč brojnim preprekama s kojima se susreće, ova tehnologija, koja kao tintu koristi žive stanice, rapidno se razvija. 3D printanje se već koristi za proizvodnju više tipova tkiva. Uspješno su projektirane tri kategorije organa: ravne strukture poput kože, cjevaste strukture poput mokraćnih cijevi i krvnih žila te šuplje strukture kao što je mjehur (Slika 17). Krajnji cilj tehnologije printanja organa je proizvodnja 3D vaskulariziranih organa pogodnih za kliničku implantaciju (Slika 16, 18)(Ledford 2015).



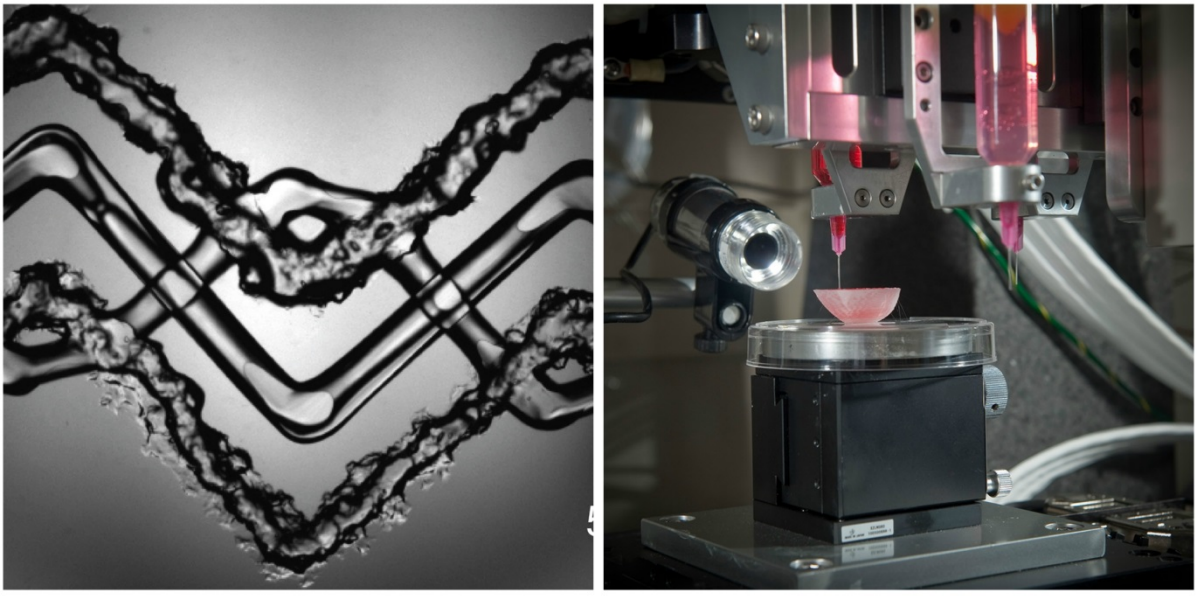
Slika 15. Zamjenski dijelovi tijela u uporabi. Lijevo – 3D isprintane strukture uključujući i rudimentarni bubreg sa živim stanicama (Wake Forest Baptist Medical Center, North Carolina). Sredina – implantat lubanje izrađen od polimera koji pospješuje rast kosti i integraciju s okolnim kosturom (Oxford Performance Materials of South Windsor,). Desno – udlaga na traheji izrađena od materijala koji tijelo postupno apsorbira kako oštećenje zacjeljuje (University of Michigan, Ann Arbor). (Preuzeto i prilagođeno iz Ledford 2015)



Slika 16. Mapa printanja organa (preuzeto iz Mironov i sur., 2009).



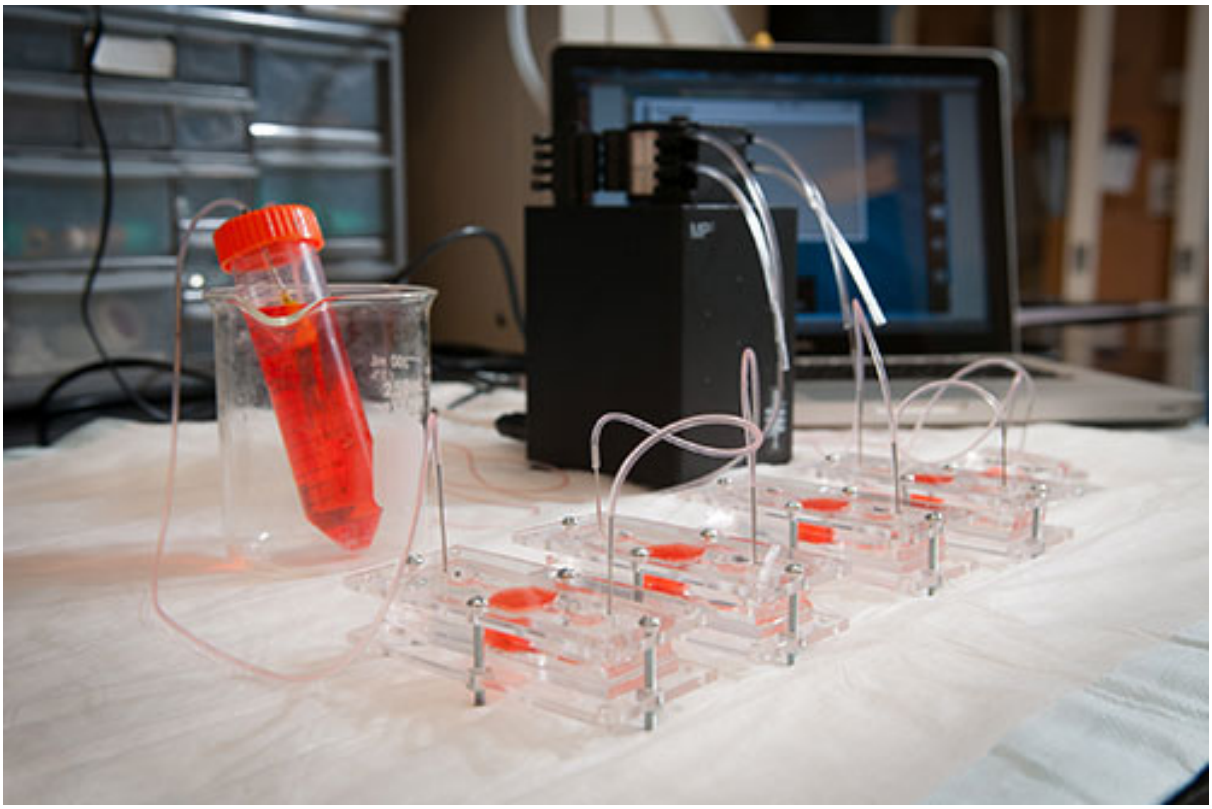
Slika 17. Organi projektirani uporabom 3D printanja (preuzeto iz Murphy i Atala 2014).



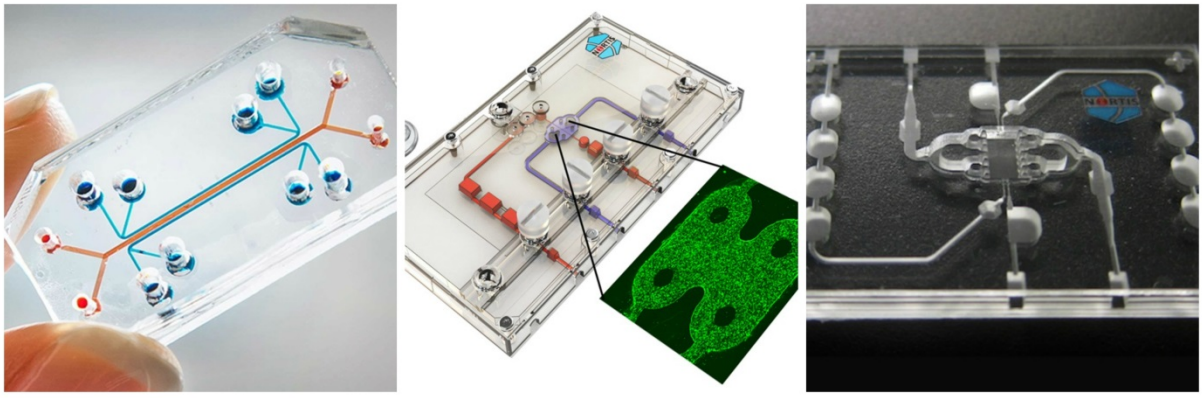
Slika 18. Lijevo – *„Fugitive ink“*, Jennifer Lewis (Harvard University) – prijedlog rješenja vaskularizacije kompleksnih tkivnih konstrukata. Materijal koji se koristi za izgradnju hlađenjem prelazi u tekućinu. Nakon printanja, vaskulatura se ohladi i zatim se dobivena tekuća biotinta usiše. Rezultat su šuplji kanali koji mogu služiti kao krvne žile. Desno – printanje 3D bubrega. Projekt je u ranoj fazi te je bubreg daleko od funkcionalnog (Wake Forest Baptist Medical Center, North Carolina). (Preuzeto i prilagođeno iz Ledford 2015)

Printanje organa ima brojne prednosti: to je automatizirani pristup koji otvara mogućnost masovne proizvodnje tkivnih konstrukata; dopušta simultano 3D pozicioniranje više staničnih tipova; omogućava stvaranje tkiva s visokom razinom gustoće stanica; može riješiti problem vaskularizacije debelih tkivnih konstrukata i može se raditi *in situ* (Mironov i sur., 2008).

Ipak, unatoč neprestanom usavršavanju pisača kako bi se povećala razlučivost ispisa i spriječilo oštećivanje stanica, te pronalasku novih materijala pogodnih za specifične strukture, rutinsko printanje i implantacija organa vjerojatno će biti ostvarivi tek kroz nekoliko desetljeća, a ne godina. Dotad, tehnologija bioprintanja usmjerava se na razvoj 3D modela tkiva za istraživanja, pronalazak lijekova i toksikologiju. Jedan takav relativno novi projekt, *„Body on a chip“*, fokusiran je na ispis „mini-organa“, kao što su srce, jetra, krvne žile i pluća, koji će oponašati odgovor organizma na kemijske i biološke agense te omogućiti razvoj potencijalnih tretmana (Slika 19, 20)(www.wakehealth.edu).



Slika 19. *„Body on a chip“* projekt. 3D printer koristi se za printanje organoida na čipove. Ljudske stanice smještaju se na čip veličine 2 inča i povezuju sa sintetičkim krvotokom, sustavom kanala obloženih vaskularnim stanicama. Oni oponašaju krvotok i omogućuju dostavu štetnih agensa kao i potencijalne terapije. Senzori mjere temperaturu, razinu kisika, pH i ostale faktore te omogućuju on-line nadzor individualnih organoida i cjelokupnog sustava. Trenutno se koristi za testiranje novih lijekova i cjepiva te razvoj protuotrova. (Preuzeto s www.wakehealth.edu)



Slika 20. Dosadašnji uspjesi *„Body on a chip“* projekta (Harvard's Wyss Institute). Lijevo – pluća na čipu. Sredina – „mini-jetra“ sa sposobnošću detoksikacije. Desno – bubreg. Zasad su uspješno povezana dva para čipova: pluća-jetra i pluća-srce. Radi se na povezivanju tri organoida – jetre, bubrega i crijeva – koji će oponašati glavni tjelesni sustav za procesiranje lijekova. (Preuzeto i prilagođeno s www.discovermagazine.com)

Tehnologija 3D printanja, koja je u početku podrazumijevala dugotrajan, mukotrpan način proizvodnje malih i nefunkcionalnih objekata, u vrlo se kratkom vremenu pretvorila u metodu koja bi u bliskoj budućnosti mogla početi spašavati i znatno poboljšati kvalitetu ljudskih života. Premda nije sigurno hoće li bioprintanje ikada omogućiti konstrukciju cjelovitih funkcionalnih organa za transplantaciju u ljude, vjeruje se kako će ova tehnologija već u bliskoj budućnosti omogućiti proizvodnju prilagođenih lijekova, personaliziranije tretmane te znatno umanjiti problem nedostatka donora i eliminirati potrebu za testiranjem na životinjama. Izbjegavanjem zasad neizbježnog dijela procesa starenja, kvara tjelesnih funkcija, 3D printanje bi moglo iz temelja promijeniti ljudske živote i u potpunosti redefinirati što to znači biti čovjek.

6. LITERATURA

Cui X, Boland T, D'Lima DD, Lotz MK, 2012. Thermal inkjet printing in tissue engineering and regenerative medicine. *Recent patents on drug delivery and formulation* **6**(2), 149-155.

Jakab K, Norotte C, Marga F, Murphy K, Vunjak-Novakovic G, Forgacs G, 2010. Tissue engineering by self-assembly and bio-printing of living cells. *Biofabrication* **2**(2), 022001.

Ledford H, 2015. The printed organs coming to a body near you. *Nature* **520**, 273.

L'Heureux N, Pâquet S, Labbé R, Germain L, Auger FA, 1998. A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *The FASEB Journal* **12**(1), 47-56.

Mironov V, Visconti RP, Kasyanov V, Forgacs G, Drake CJ, Markwald RR, 2009. Organ printing: Tissue spheroids as building blocks. *Biomaterials* **30**, 2164-2174.

Mironov V, Kasyanov V, Drake C, Markwald RR, 2008. Organ printing: promises and challenges. *Regenerative medicine* **3**(1), 93-103.

Murphy SV, Atala A, 2014. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nature biotechnology* **32**, 773-785.

Internetski izvori:

www.discovermagazine.com/2015/june/4-pieces-of-me (preuzeto: 16.07.2015., 11:15)

downloads.deusm.com/designnews/25419 Organ_Printing_How_to_Print_a_Human_Organ.pdf (preuzeto: 06.06.2015., 23:03)

www.nibib.nih.gov/science-education/science-topics/tissue-engineering-and-regenerative-medicine (preuzeto: 09.09.2015., 21:14)

www.wakehealth.edu/Research/WFIRM/Projects/Body-on-a-Chip.htm (preuzeto: 16.07.2015., 10:54)

7. SAŽETAK

Tkivno inženjerstvo još je uvijek daleko od zadanog cilja, izrade funkcionalnih zamjenskih humanih organa te je razumno pretpostaviti da tehnologija biofabrikacije vjerojatno neće omogućiti stvaranje 100% autentičnih funkcionalnih kopija organa. Realniji tehnološki cilj je projektiranje tkivnih i organskih konstrukata sa sposobnošću obnavljanja funkcije oštećenih organa. Zahvaljujući brzo-razvijajućem biomimetičkom pristupu koji predstavlja integraciju inženjerstva i razvojne biologije, taj je cilj postao ostvariv. Brzom napretku ovog područja osobito je pridonio početak upotrebe 3D printera u izradi bioloških struktura, odnosno bioprintanje.

Ovaj rad opisuje tradicionalne pristupe tkivnog inženjerstva, ukazuje na njihove nedostatke, uspoređuje ih s novijim metodama biomimetičkog pristupa te predstavlja nedavni napredak u izradi živih struktura koji je omogućila revolucionarna tehnologija bioprintanja.

8. SUMMARY

Tissue engineering is still far from the set goal, production of functional replacement human organs and it is reasonable to assume that biofabrication technology will probably not allow the creation of 100% authentic copies of functional organs. A more realistic technological goal is to design tissue and organ constructs with the ability to restore function of damaged organs. Thanks to the fast-evolving biomimetic approach which represents the integration of engineering and developmental biology, that goal has become feasible. The rapid progress in this area was especially stimulated by the beginning of use of 3D printers in the development of biological structures or bioprinting.

This paper describes the traditional approaches to tissue engineering, highlights their shortcomings, compares them with newer methods of biomimetic approach and presents recent advances in the development of the living structures which were enabled by the revolutionary technology of bioprinting.