

УДК 57.086.83

Дарина ПОДОЛЯК, студент,

Єлизавета ТОКАРЧУК, студент

Валентина МОТРОНЕНКО, доктор філософії, доцент

Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»,
м. Київ, Україна, e-mail: dary.podoliak03@gmail.com, tokarchuk-bf01@iitl.kpi.ua, motronenkovalya@gmail.com

БІОЧОРНИЛА ТА МЕТОДИ БІОПРИНТИНГУ

Анотація. Швидкий розвиток технологій став причиною виникнення нових галузей, одною з яких є біопринтинг – сфера зіткнення біології та інженерії. Біодрук відкриває для людства безліч нових можливостей у медицині, науці, тестуванні ліків, що особливо актуально за умов війни та пандемії. У роботі представлено аналіз основних методів біопринтингу, на основі огляду характеристик існуючих типів біочорнил.

На основі отриманих даних можемо зробити висновок, що рівень розвитку 3D-біодруку в цілому та отримання біочорнил, в тому числі, стрімко розвивається та застосовується в сучасній біомедичній інженерії. А отримання нових біочорнил з вищою біосумісністю є одним з основних завдань розвитку 3D-біодруку в сучасній тканинній інженерії та імплантології.

Ключові слова: біочорнила, 3D-біопринтинг, біодрук, тканинна інженерія, живі клітини, біотехнології, біосумісні матеріали.

Вступ. Біопринтинг – нова технологія, яка утворилась і розвивається завдяки об'єднанню знань з областей біології та інженерії. Метою є створення складних об'ємних моделей органів та тканин на основі друку з біологічно релевантних матеріалів – живих клітин, біоматеріалів і біомолекул. 3D-біопринтинг в перспективі дозволяє створювати багатоклітинні конструкції, в яких взаємодія між клітинами та їхня реакція на зовнішні та внутрішні стимули буде ідентичною тій, яку ми спостерігаємо *in vivo* [1].

Мета роботи – представити поглиблений аналіз методів біодруку та сучасного стану існуючих біочорнил.

Матеріали та методи. Сучасні наукові розробки в області матеріалів для отримання біочорнил та методів біодруку.

Результати та їх обговорення

Ідеальний принтер для біодруку повинен володіти такими властивостями [2]:

- свобода руху;
- висока швидкість;
- точність;
- здатність використовувати різні види біочорнил для друку гетерогенних тканин;
- простота у використанні;
- компактність;
- простота у стерилізації;
- автоматичність;
- універсальність.

Біодрук може здійснюватися на основі трьох методів (рис. 1):

1. Лазерний біодрук (лазерний і за допомогою акустичних хвиль);
2. Друк на основі екструзії (пневматичний та механічний);
3. Крапельний біодрук/струменевий біодрук (п'єзоелектричний та термічний).

Під час лазерного біодруку (LIFT) імпульсний лазер фокусується на підкладці і створює локальне випаровування поглинаючого слою, що призводить до переміщення малих порцій біочорнил до колектора і утворює тимчасовий натяг між двома підкладками. Цей метод підходить для біочорнил з в'язкістю 1...300 МПа·с і середньою щільністю клітин 10^8 клітин/мл. На друк цим методом впливають параметри лазера, товщина і в'язкість біочорнил [3].

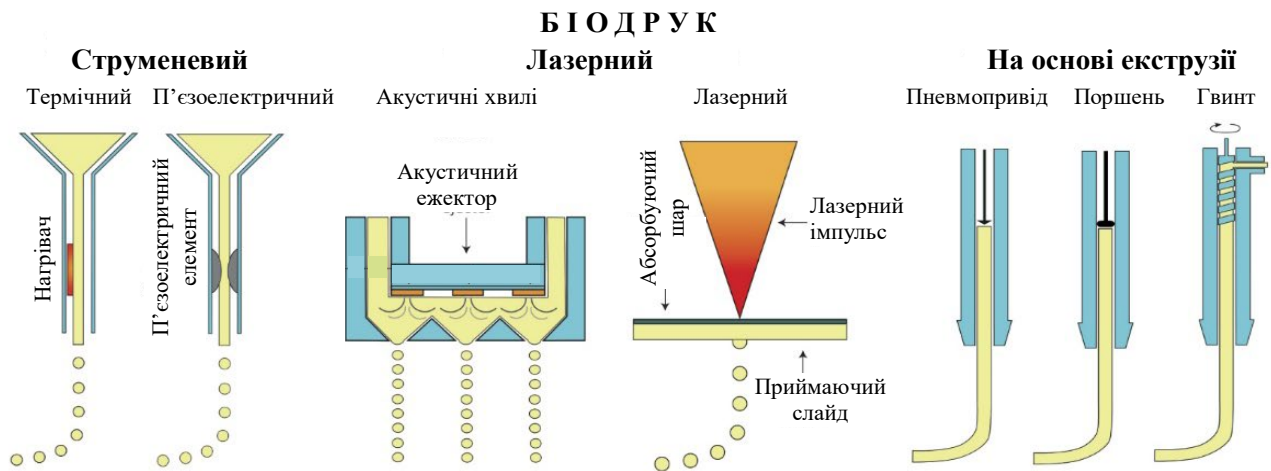


Рис. 1. Види біодруку [3]

Біодрук іншим методом здійснюється за допомогою акустичних хвиль. Змінюючи довжину хвилі можна коригувати діаметр капель – від 3 до 200 мкм, а життєздатність клітин у цьому методі становить більше 89,8%, оскільки на них не впливають розміри сопла, температура чи високий тиск [3].

Лазерний біодрук має певні переваги перед іншими методами. Зокрема, не відбувається засмічення сопла клітинами та матеріалами, що можливо під час інших видів друку. Також цей метод друку характеризується високою роздільною здатністю, але низькою життєздатністю клітин [4].

Для екструзійного друку використовують одноразові шприци з механічним чи пневматичним дозатором, які видають гідрогелеві нитки діаметром 150-300 (мкм). За допомогою цього методу можна друкувати в'язкими біочорнилами $30 \dots 6 \cdot 10^7$ МПа·с. Екструзійний біодрук є економічно вигідним, хоча займає більше часу ніж інші техніки, проте мікроструктура надрукованого матеріалу буде обрє сконструйованою. Однак недоліком є те, що через перепади тиску під час друку можуть зазнавати шкоди клітинні мембрани [4].

П'єзоелектричний метод біодруку ґрунтується на використанні п'єзоелектричних кристалів, які створюють акустичні хвилі і так проштовхують біочорнило через сопло. У даному методі використовують сучасні друкувальні головки з декількома соплами, що збільшує пропускну здатність і дозволяє створювати складні конструкції [5].

Під час термічного струменевого біодруку нагрівальний елемент принтера досягає температури до 300° і видавлює краплі з друкуючої головки. Хоча струменеві принтери сумісні з різними чорнилами, проте у них є певні недоліки, оскільки біочорнило мають відповідати строгим вимогам до в'язкості (< 10 МПа·с) і поверхневого натягу [3].

Біодрук повинен відповідати двом вимогам – вибраний метод не повинен бути шкідливим для клітин та їхньої ДНК, а друковані конструкції повинні бути стабільними. Для цього біочорнило мають відповідати певним параметрам [6].

Ідеальні біочорнила повинні мати такі фізико-хімічні властивості, як правильні механічні, реологічні, хімічні та біологічні характеристики. Оскільки визначення оптимального складу біочорнил, наповнених клітинами, є життєво важливим кроком на шляху до успішного біодруку, на сьогоднішній день використовуються різні природні та синтетичні біоматеріали зі специфічними властивостями. У таблиці 1 представлений короткий перелік біочорнил різних класів [7].

Розробка матеріалів біочорнил дозволяє вченим маніпулювати біологічними та біохімічними середовищами, а також живими клітинами для створення складних біологічних конструкцій. Успіх вимірюється стійкою життєздатністю клітин під час короткострокового та довгострокового культивування, поширенням та проліферацією клітин, взаємодіями між клітинами та позаклітинним матриксом, а також функціональністю біодрукованих конструкцій. Хоча для тка-

нинної інженерії та регенеративної медицини був розроблений широкий спектр біоматеріалів, переважна більшість з них несумісні з існуючими технологіями біодруку [8].

Таблиця 1

Біочорнила різних класів

Клас біочорнил	Приклади матеріалів	Цільова тканина
Біочорнила на основі натуральних біоматеріалів	Альгінат, желатин, колаген, фібриноген/фібрин, геланова камедь, шовк, гіалуронова кислота, декстран, хітозан, гідрокси-апатит, на основі деклітинної матриці, на основі фактору росту, матригель	Хрящова, кісткова, жирова, легенева, серцева, шлунково-кишкова, судини, печінка, аортальний клапан, шкіра, мозок, клапани серця
Біочорнила на основі синтетичних біоматеріалів	PCL, PEG, Pluronic, НАМА- рНРМА-lac / PEG, PG-НА, PVP	Хрящова, кісткова, судини
Біочорнила на основі клітинного агрегату/пеллет	Cell aggregate/ pellet-based bioinks	Серцева, нервова, легенева, шкіра, аорта
Комерційні біочорнила	Дерма- матриця, новогеля	Аорта
Композитні біочорнила/біочорнила з біоактивними молекулами	AuNPs, магнітні частинки оксиду заліза, плазма крові, кріо-біочорнила, ультракороткі пептиди, генно-інженерний фаг, провідні біочорнила	Хрящова, жирова, кісткова, серцева, судини, шкіра

Існує два основних типи матеріалів біочорнил. Перший і найпоширеніший з них – це біочорнила на основі каркасу, коли клітини завантажуються в гідрогелі або аналогічні екзогенні матеріали та біопринується у 3D-конструкції. Навантажені клітинами гідрогелі забезпечують проліферацію та зростання клітин та полегшують формування тканини. У другому типі біочорнил клітини біопринується без використання екзогенного біоматеріалу, без каркасу. Клітини спочатку формуються в нові тканини, призначені для біодруку; отримані неоктани потім відкладаються у певні патерни, де вони зливаються і дозрівають для виготовлення більш масштабних функціональних тканин [7].

Гідрогелі – клас зшитих полімерних речовин, здатних поглинати та утримувати велику кількість води. Гідрогелі в тканинній інженерії поділяються на дві групи: гідрогелі природного походження, такі як желатин, фібрин, колаген, хітозан та альгінат, та гідрогелі синтетичного походження, такі як Pluronic або поліетиленгліколь [9]. Гідрогелі природного походження можна додатково класифікувати залежно від того, звідки вони були отримані. Гідрогелі, такі як колаген, фібрин і желатин, зазвичай отримують з хребетних, і тому вони мають властиві їм сигнальні молекули для клітинної адгезії, тоді як гідрогелі, такі як альгінат і агароза, отримують з інших живих організмів, таких як водорості, у яких відсутні ці сигнальні молекули [10]. Гідрогелі використовуються в біотехнології та тканинній інженерії для широкого спектру застосувань, таких як доставка ліків, контактні лінзи та ранові пов'язки. Природні гідрогелі, як правило, мають слабкі механічні властивості, у той час як у синтетичних аналогах відсутні основні компоненти, такі як біоактивні молекули для адгезії або міграції клітин. Відмінні риси природних і синтетичних гідрогелів не можуть бути чітко визначені, проте більшість природних гідрогелів нешкідливі для клітин [8].

У той час, коли природні полімери пропонують сприятливе середовище для тканинної інженерії, синтетичні полімери можуть бути адаптовані відповідно до вимог біодруку. *Синтетичні полімери* можуть бути хімічно модифіковані не тільки функціональними групами, що зшиваються, але й доменами, здатними покращувати структурні та механічні властивості біодруківаних конструкцій. Це дозволяє ретельно спроектувати конструкцію полімерної ос-

нови або клітинно-адгезивними доменами, що містять послідовність RGD, або з доменами, що реагують на зовнішні електричні або магнітні стимули [7].

Клітини секретують специфічні молекули для створення позаклітинного матриксу, локалізованого середовища, що сприяє прикріпленню клітин, проліферації, передачі сигналів та розвитку тканин. У спробі відтворити це природне тканинне середовище було розроблено матеріал біочорнил на основі децелюляризованого позаклітинного матриксу (dECM). Приготування біочорнил dECM вимагає видалення клітинного матеріалу за допомогою хімічних, фізичних та ферментативних процесів без пошкодження. *Децелюляризований позаклітинний матрикс* є чудовим алогенним або ксеногенним біоматеріалом, який використовувався в тканинній інженерії для отримання ряду комерційних продуктів, таких як Alloderm, SurgiSIS і Synergraft [10].

Мікроносії є підтримуючими структурами для зростання та поширення клітин; вони виготовлені із синтетичних (декстрану, пластику, скла) або натуральних (целюлоза, желатин та колаген) матеріалів зі спеціально спроектованою пористістю. Як правило, вони використовуються як армуючі блоки в біопринтингу. Вони забезпечують велике моношарове середовище, значно покращуючи процес культивування клітин [9, 10].

Біочорнила без каркасу. Тканинні сфероїди є типом біочорнил без каркаса, де клітини організовані сферично в клітинні агрегати діаметром 200...400 мкм, які можуть служити будівельними блоками та тканинними моделями для тканинної інженерії та фармацевтики відповідно. Одним із найбільш популярних методів є культивування клітин у мікролунках із закругленими кінцями на інертній для клітинної адгезії формі, виготовленої з гідрогелів, таких як агароза, метакрилова гіалуронова кислота та альгінат [10].

Техніка клітинного осаду заснована на відцентрових або гравітаційних силах, що концентрують клітини на дні конічної трубки. Потім осад можна перенести в мікропіпетку або в іншу форму, де додатково встановлюються міжклітинні взаємодії для поліпшення зчеплення. Техніка клітинних гранул – це практичний метод створення агрегатів без необхідності використання складних систем; проте циркуляція середовища проживання і кисню обмежена, а життєздатність клітин помітно знижується через 24 години [10].

Тканинні нитки можуть бути визначені як циліндричні новотканини, створені для біодруку збільшених тканин. Клітини дуже високої щільності вводять і пакують у порожнисті альгінатні пробірки. Напівпроникні альгінатні трубки забезпечують обмін середовища живленням та киснем; клітини ростуть у заданій формі, оскільки вони не прикріплюються до альгінатної поверхні просвіту. Потім сформовану нитку тканини поміщають у виготовлену на замовлення головку біопринтера і механічно екструдують. Тканинні нитки повинні бути оптимально дозрілими, щоб забезпечити відповідні умови біодруку. Незрілі нитки, які неповністю агреговані, можуть не сформувати бажану форму і можуть розпастися під час біодруку. Тканини, які перезріли, можуть бути недостатньо податливими для відкладення. Низький рівень кисню в серцевині нитки може бути нестачею деяких тканинних конструкцій, проте цей метод особливо підходить для формування хряща, оскільки хондроцити переважно проліферують в умовах гіпоксії [10].

Висновки. В роботі були проаналізовані матеріали для отримання біочорнил, що використовуються в технології 3D-біодруку, а саме гідрогелі, мікроносії, dECM та клітинні агрегати та три основні методи біопринтингу. Можна зробити висновок, що майбутні зусилля в еволюції матеріалів біочорнил повинні привести до рішень, які зміцнять механічні властивості для стабілізації біодрукованих конструкцій, нададуть біологічні сполуки, що забезпечать кращу клітинну взаємодію, створять сприятливе середовище для утворення фізіологічно значущих, функціональних тканин.

Вищезгадані проблеми є одними з основних причин того, що науковці ще далекі від біодруку функціональних органів клінічно значущого розміру. Проте з появою нових матеріалів біочорнил та сумісних процесів біодруку 3D-біодрук стане ключовою технологією майбутньої тканинної інженерії, регенеративної терапії та фармацевтики. А дослідження по удо-

сконаленню отримання біочорнил та методів 3D-біодруку є перспективним напрямком розвитку біомедичної інженерії

Література

1. 3D printable hyaluronic acid-based hydrogel for its potential application as a bioink in tissue engineering / I. Noh et al. *Biomaterials Research*. 2019. Vol. 23, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s40824-018-0152-8>.
2. Ozbolat I. T., Moncal K. K., Gudapati H. Evaluation of bioprinter technologies. *Additive Manufacturing*. 2017. Vol. 13. P. 179–200. URL: <https://doi.org/10.1016/j.addma.2016.10.003>.
3. Bioink properties before, during and after 3D bioprinting / K. Hölzl et al. *Biofabrication*. 2016. Vol. 8, no. 3. P. 032002. URL: <https://doi.org/10.1088/1758-5090/8/3/032002>.
4. Vyas D., Udyawar D. A Review on Current State of Art of Bioprinting. *3D Printing and Additive Manufacturing Technologies*. Singapore, 2018. P. 195–201. URL: https://doi.org/10.1007/978-981-13-0305-0_17.
5. Bio-ink for on-demand printing of living cells / C. J. Ferris et al. *Biomater. Sci*. 2013. Vol. 1, no. 2. P. 224–230. URL: <https://doi.org/10.1039/c2bm00114d>.
6. Mironov V., Reis N., Derby B. Review: Bioprinting: A Beginning. *Tissue Engineering*. 2006. Vol. 12, no. 4. P. 631–634. URL: <https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.631>.
7. Bioinks for 3D bioprinting: an overview / P. S. Gungor-Ozkerim et al. *Biomaterials Science*. 2018. Vol. 6, no. 5. P. 915–946. URL: <https://doi.org/10.1039/c7bm00765e>.
8. Willson K., Atala A., Yoo J. J. Bioprinting Au Natural: The Biologies of Bioinks. *Biomolecules*. 2021. Vol. 11, no. 11. P. 1593. URL: <https://doi.org/10.3390/biom11111593>.
9. Sakai S., Harada R., Kotani T. Freeform 3D Bioprinting Involving Ink Gelation by Cascade Reaction of Oxidase and Peroxidase: A Feasibility Study Using Hyaluronic Acid-Based Ink. *Biomolecules*. 2021. Vol. 11, no. 12. P. 1908. URL: <https://doi.org/10.3390/biom11121908>.
10. The bioink: A comprehensive review on bioprintable materials / M. Hospodiuk et al. *Biotechnology Advances*. 2017. Vol. 35, no. 2. P. 217–239. URL: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.12.006>.