

В.А. МИРОНОВ

# ВСЛЕД ЗА СОЗДАТЕЛЕМ

## Технологии биопринтинга

*Давняя мечта человека о возможности замены больных или утраченных частей тела на новые воплотилась в реальность только в середине XX в., когда были раскрыты иммунные механизмы отторжения пересаженных органов. Первая успешная пересадка почки была осуществлена в 1954 г. американским хирургом Д. Мюрреем (США), ставшим Нобелевским лауреатом в 1990 г. К настоящему времени техническая сторона процесса освоена достаточно хорошо, но одной из критических и пока нерешенных проблем в трансплантологии остается нехватка донорских органов*

**К**аждый день почти два десятка человек умирает из-за нехватки донорских органов; каждые десять минут в лист ожидания на трансплантацию добавляется новое имя. Только в США более 114 тыс. человек ожидают донорские органы для пересадки, и большая часть из них – пациенты с почечной недостаточностью, которым требуется новая почка. К этому можно добавить, что период ожидания такой операции может достигать 10–15 лет, поэтому неудивительно, что почти четверть ожидающих очереди на трансплантацию умирают, ее не дождавшись.

Нехватка доноров – серьезнейшая медицинская проблема, причем тенденция такова, что доноров становится все меньше, а пациентов, которым требуются донорские органы, – все больше. Кроме того, пересадка той же почки означает для реципиента пожизненный прием лекарств, подавляющих иммунитет, а это делает людей более восприимчивыми к болезням и может приводить к онкологическим заболеваниям. Существующая альтернатива трансплантации почки – регулярный гемодиализ, очистка крови с помощью искусственных фильтров, процедура неприятная и дорогостоящая.

На сегодня существует несколько путей выхода из этой ситуации, однако практически все они имеют ряд серьезных недостатков.

Скульптура Б. Ваадия «Нахор с собакой», 1990. Сланец и булыжник, 55"×48"×67". Частная коллекция, Мичиган, США



МИРОНОВ Владимир Александрович – кандидат медицинских наук, профессор Государственного университета штата Вирджиния (США), научный руководитель Лаборатории биотехнологических исследований «3D Bioprinting Solutions» (Москва). Автор и соавтор более 100 научных работ и ряда патентов по биопринтингу

Ежегодно в мире осуществляется в общей совокупности около 100 тыс. трансплантаций органов. Один только «рынок почки» оценивается специалистами в 25 млрд долларов США.

В России сегодня более 20 тыс. человек страдают почечной недостаточностью и буквально прикованы к аппарату искусственной почки, при этом ежегодные затраты на одного пациента, нуждающегося в процедуре гемодиализа, составляют свыше 2 млн руб.

Число пациентов с потребностью в гемодиализе в России ежегодно увеличивается примерно на 6 тыс. человек, тогда как в 2009 г. было осуществлено только 820 трансплантаций донорской почки

*Ключевые слова:* печать органов, биопечать, биофабрикация

*Key words:* organ printing, bioprinting, biofabrication

© В.А. Мионов, 2013



В качестве каркаса для выращивания имплантатов используют освобожденные от клеток соединительнотканые остовы донорских органов либо органов свиньи – одного из самых «генетически близких» человеку животных.

На фото – «Суррогат», скульптура работы П. Пиччинини, 2005 г. Силикон, стеклопластик, кожа, фанера, человеческие волосы.

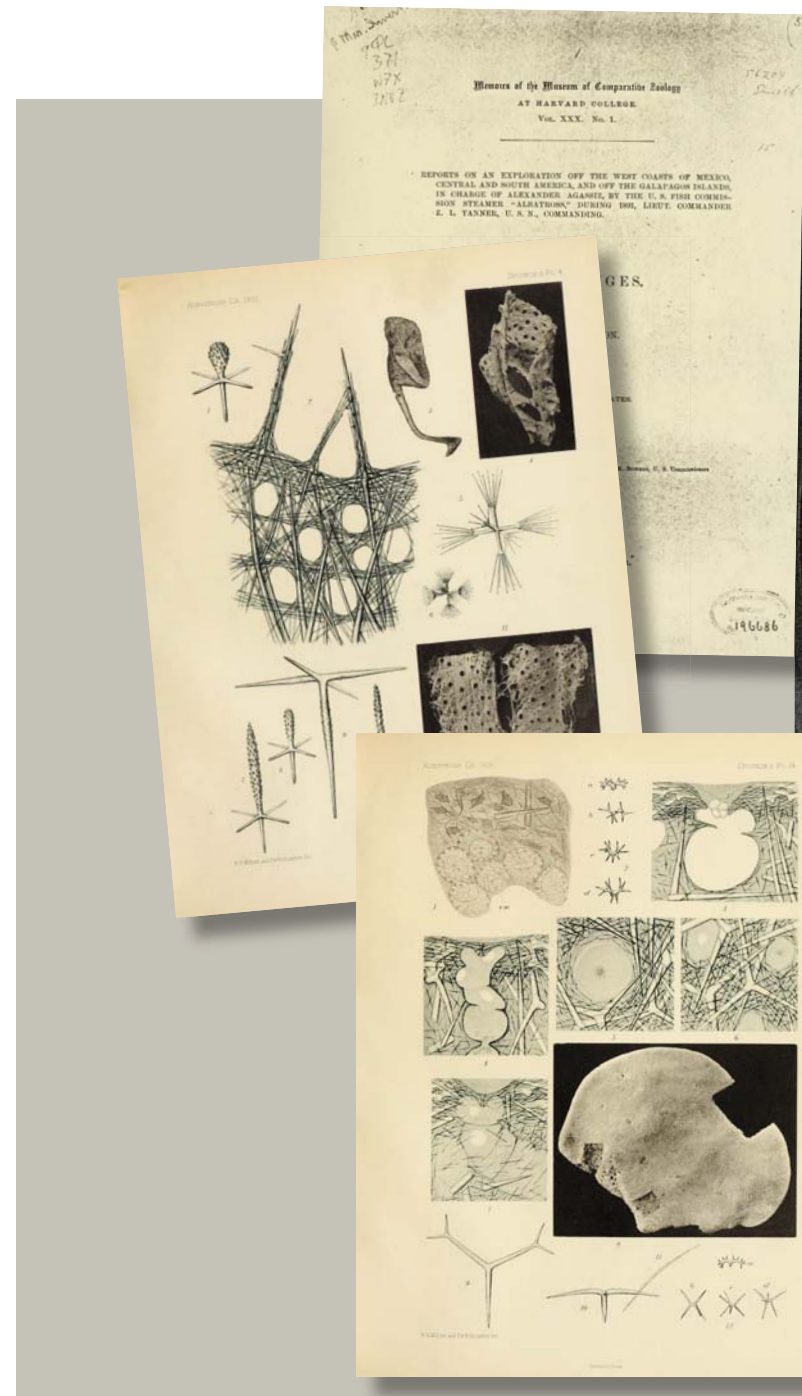
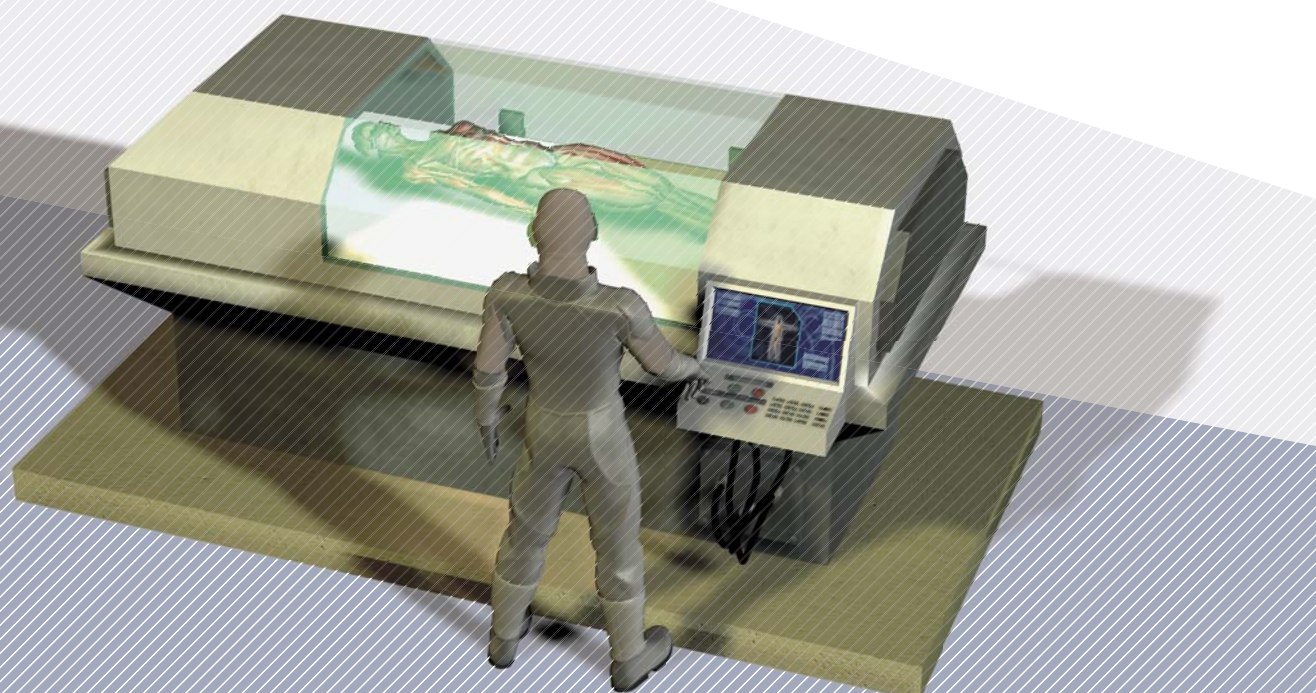
Публикуется с разрешения автора

## Инжиниринг органов

Среди технологий создания донорских органов есть технически осуществимые, но откровенно неэтичные и потому неприемлемые. Например, выращивание «на органы» анацефальных (не имеющих мозга) эмбрионов в матке суррогатной матери из стволовых клеток пациента.

При классических технологиях «инжиниринга органов» сначала изготавливается каркас – основа будущего органа. Это может быть имплантат из искусственных материалов, стойких или разлагающихся со временем, в который врастают клетки и сосуды пациента, образуя с ним единое целое. Однако к таким материалам предъявляются, и небезосновательно, серьезные требования, удовлетворить которым непросто.

В качестве основы имплантата можно использовать и «натуральный» соединительнотканый каркас органа человека или животного (например, свиньи). При этом соответствующий орган *децеллюляризируют*, т.е. убирают все клеточные элементы, чтобы снизить риск отторжения, и только потом на этот каркас наращивают собственные клетки пациента. Принципиальная возможность такого подхода была продемонстрирована на примере сердца (Ott *et al.*, 2010), легкого (Petersen *et al.*, 2010), печени (Uygun *et al.*, 2013). В апреле 2013 г. ученые из Гарвардского университета продемонстрировали успешно работающую почку крысы, которая была выращена в биореакторе и затем пересажена животному (Song *et al.*, 2013).



Американский морской биолог Г. В. Вильсон был одним из первооткрывателей уникального явления самосборки живой ткани вне организма. Он сделал свое открытие на клетках морских губок. На фото – портрет Г. В. Вильсона. North Carolina Collection, University of North Carolina at Chapel Hill Library. Справа – титульный лист и иллюстрации к книге Г. В. Вильсона «Губки» (H. V. Wilson. *The sponges*. USA, Cambridge, 1904). Biodiversity Heritage Library

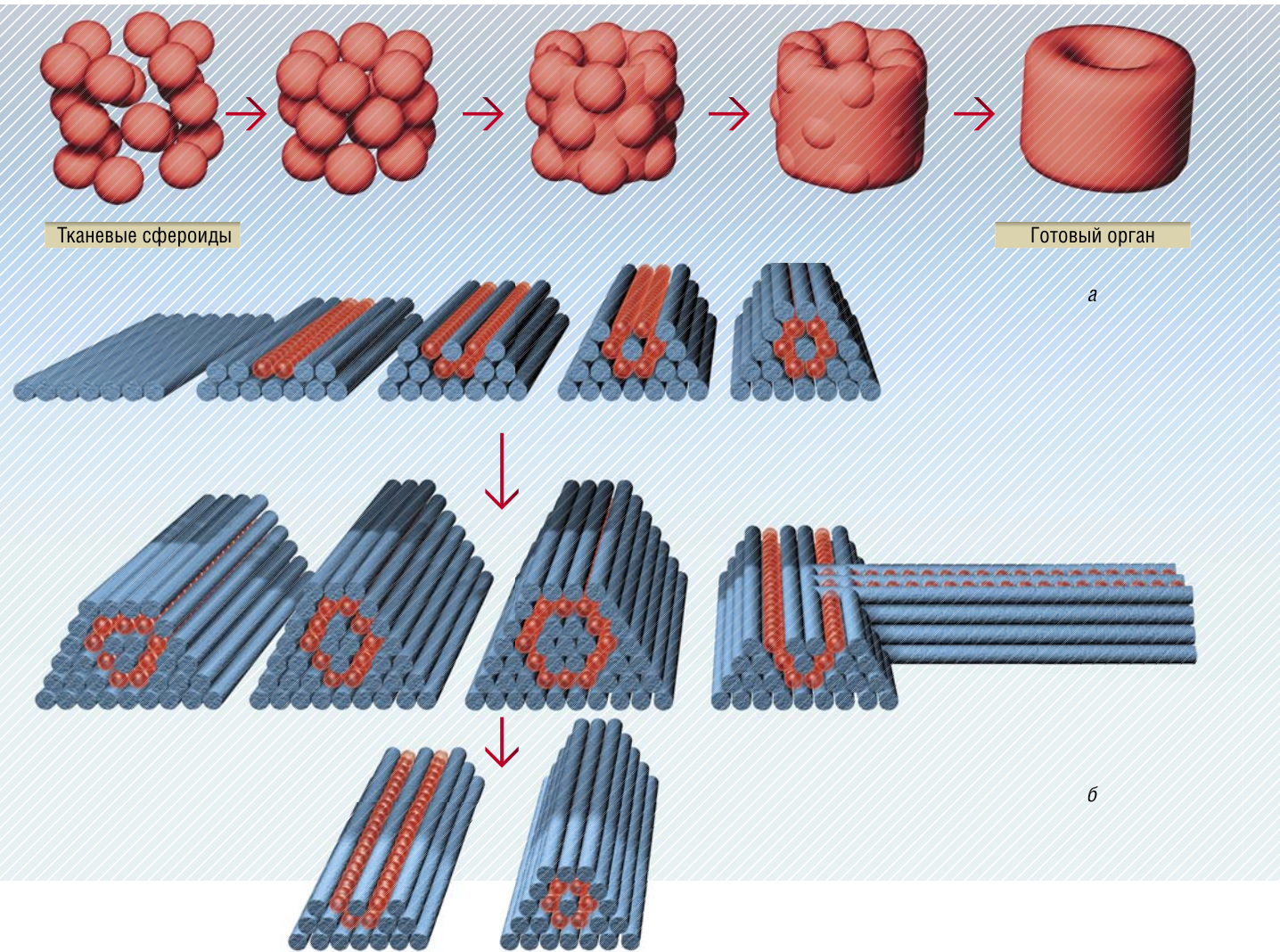
Но и при такой технологии остается риск иммунного отторжения; кроме того, при использовании органов животных всегда существует опасность передать человеку вирусы этих организмов.

От подобных недостатков избавлен альтернативный подход – так называемый *биопринтинг* или *биопечать* (трехмерная печать человеческих органов). Биопринтинг тоже принадлежит к группе технологий «инжиниринга органов», но основывается он на так называемом восходящем модульном бескаркасном подходе, когда

нужный орган конструируется из клеток самого пациента, что гарантирует отсутствие реакции отторжения.

## Идеи самосборки – сто лет

Технология биопринтинга базируется на известном явлении *самосборки* (направленной самоорганизации) клеточных структур. Этот процесс, управляемый силами поверхностного натяжения и межбелковыми взаимодействиями, повсеместно встречается в живом



Тканевые сфероиды

Готовый орган

а

б

Тканевые сфероиды – крошечные сгустки живых клеток, представляют собой мягкий, пластичный материал. Подобно каплям жидкости они могут сливаться, осуществляя самосборку (а). При создании будущего органа тканевые сфероиды разных типов в строго определенном порядке послойно накладываются на листы «биобумаги» – специальной гидрогелевой подложки. При их слиянии образуются готовые части органа, например, кровеносный сосуд или почечный клубочек. Клетки одного типа стремятся группироваться вместе, и сращивание ткани обычно происходит без значительной клеточной миграции. Для печати трубчатых структур (б) из тканевых сфероидов используется подложка из инертных гидрогелевых стержней. Послойное наложение сфероидов позволяет печатать трубки разного диаметра и разветвленные трубки  
 По: (Biofabrication. 2012. N 4)

Технология книгопечатания в современном ее понимании была разработана в середине XV в. немецким ювелиром и гравером Иоганном цум Гутенбергом, рожденным предпринимателем и изобретателем. Пять наиболее важных элементов технологии книгопечатания Гутенберга включают в себя текст, бумагу, чернила, съемные металлические литеры и печатный пресс. По аналогии с книгопечатанием технология биопечати включает в себя: виртуальную модель органа (аналог текста), тканевые сфероиды (аналог чернил), гидрогель (аналог бумаги), картридж, заправленный тканевыми сфероидами (аналог литер) и, наконец, аналог печатного пресса – биопринтер. Существует два типа биопечати: аналоговая и цифровая. Аналоговая биопечать – это непрерывное распыление биобумаги (гидрогеля) с тканевыми сфероидами. При цифровой печати происходит дискретное или каплеобразное распыление

мире, начиная от формирования клеточных мембран и заканчивая образованием органов у эмбриона.

Идея биопринтинга родилась из предположения, что такие процессы самосборки тканей можно воспроизводить *in vitro*, т.е. вне живого организма. Первооткрывателем этого феномена в конце XIX в. стал немецкий профессор анатомии Г. Борн. Однажды вечером Борн препарировал головастика, но ему пришлось прервать работу из-за ужина, чем профессор был немало раздосадован. Борн вернулся к работе только на следующий день и был очень удивлен, обнаружив, что рассеченные фрагменты головастика срослись. А в 1907 г. американский морской биолог Г. В. Вильсон обнаружил спонтанное сращивание тканей морских губок.

Таким образом, идейная основа биопринтинга была заложена уже более ста лет назад, и в этом смысле эта технология является не гениальным изобретением, а, скорее, практическим результатом многолетних интенсивных исследований в ряде научных областей: биологии моря, эволюционной биологии, молекулярной биологии и биологии стволовых клеток. Здесь как нельзя более уместно привести известное выражение И. Ньютона: «Если я и видел дальше, то лишь потому, что стоял на плечах гигантов».

Базовая методика биопринтинга аналогична уже хорошо отработанной технологии послойного формирования различных трехмерных объектов из металла, керамики или полимеров на основе виртуальной трехмерной компьютерной модели, только в качестве строительных блоков при этом используются живые объекты.

Элементарный живой «кирпичик» создаваемого таким образом тканевого «здания» называют тканевым сфероидом. Это крошечный (200–300 мкм диаметром) шарообразный сгусток из живых клеток. Структура его, скорее, жидкая, чем твердая, недаром ее называют также сложной или мультикомпонентной жидкостью. Это очень важно, потому что более плотные тканевые сфероиды медленнее срачиваются. При сращивании происходит существенное сокращение объема трансплантируемой ткани, что необходимо учитывать при «проектировании» органа.

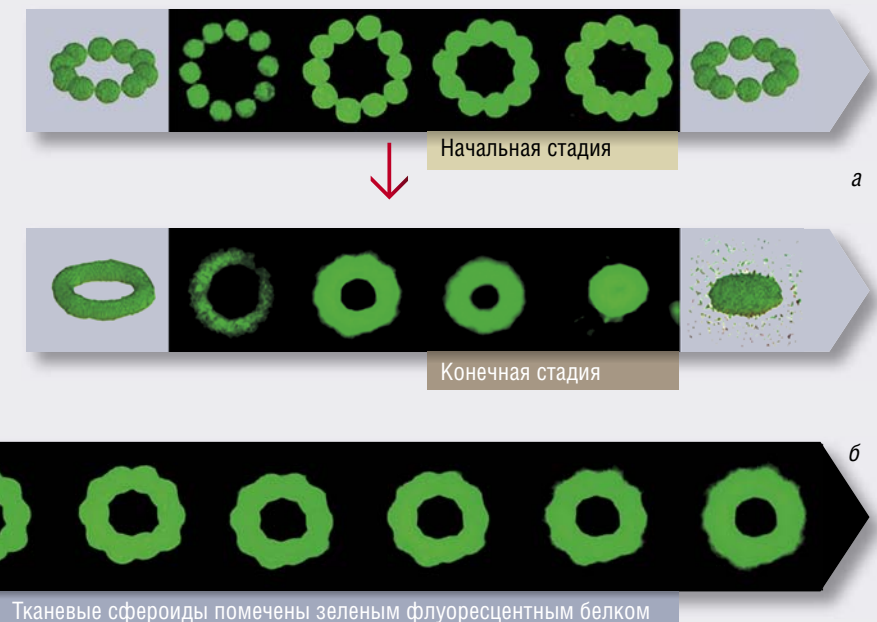
### От клетки – к органу

Экспериментальное развитие печати органов началось около десяти лет тому назад. На первом этапе это больше всего походило на создание деталей для конструктора «Лего», когда исследователи могли получать лишь отдельные фрагменты той или иной ткани. Затем появилась возможность создавать сегменты внутреннего органа, уже снабженные сосудистой сетью, что стало определяющим этапом развития новой технологии.

При производстве сфероидов сосудистой ткани используют фактор роста эндотелия сосудов, в результате чего можно получать сосудистые трубки разного диаметра. Так, группе исследователей из Цюрихского центра регенеративной медицины удалось создать сосудистую трубку из тканевых сфероидов с использованием специальной формовки, которую инкубировали в перфузионном биореакторе. По сообщению доктора

Гель, используемый при биопечати, должен отвечать определенным требованиям: он должен быть в меру мягок, но достаточно гибок.

На фото – результаты формирования турса из тканевых сфероидов при использовании шести разных образцов гидрогеля с различными свойствами (а); детальная «съемка» процесса слияния тканевых сфероидов при успешном формировании турса в образце гидрогеля (б)  
 По: (Jakab et al., 2004)



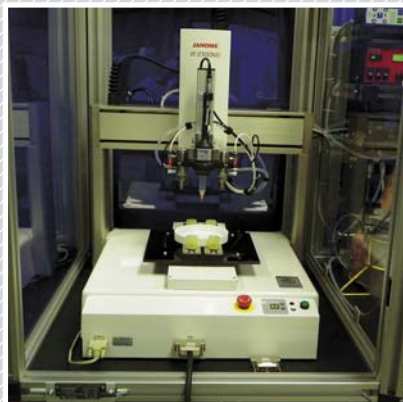
Начальная стадия

Конечная стадия

а

б

Тканевые сфероиды помечены зеленым флуоресцентным белком



Так выглядит биопринтер производства компании CUSPIS LLC, Южная Каролина, США для печати тканевых конструкций живыми клетками пациента

Дж. М. Келмы, свойства трубчатой конструкции, выращенной из таких сфероидов, вполне сравнимы с природными кровеносными сосудами. А американские исследователи Дж. Дэвис и Б. Вайнштейн (Nature, 2006) доказали, что помещенные в гидрогель клетки эндотелия, срастаясь и формируя вакуоли (полости), способны формировать сеть капилляров.

Таким образом, стало технологически возможным производить цельный внутренний орган, снабженный сосудистой сетью. Но для создания полноценного органа, пригодного для трансплантации, требуется усовершенствовать так называемую постобработку ткани или органа.

В частности, над этой проблемой работает группа В. А. Миронова из российской компании «3D Bioprinting Solutions», которая занимается разработкой технологий биопечати. Исследователи стараются добиться ускоренного развития тканей, используя так называемый «волшебный коктейль», состоящий из определенной комбинации специфических биомолекул – факторов роста и развития.

### Клеточные «инкубаторы»

Из чего же состоит «производственная цепочка» биопринтинга?

Как упоминалось выше, основой технологии являются тканевые сфероиды. Простой вариант такой структуры можно получить путем инкубации суспензий различных клеток пациента в небольшом объеме культуральной среды, например, в формах в виде мелких пчелиных сот. Удобным «сырьем» для биопечати являются стволовые клетки жировой ткани пациента, которые можно получить сразу в большом количестве с помощью вакуумной липосакции – малоинвазивной хирургической процедуры. Такие стволовые клетки могут легко дифференцироваться в гладкомышечные клетки, а тканевые сфероиды, произведенные из них, могут срастаться в кольцо или торус и сокращаться под действием специфических стимулов.

Полученные таким образом клетки выращивают в биореакторах – устройствах, в которых биологические и биохимические процессы развиваются в жестко контролируемых искусственных условиях. Биореактор является своего рода «инкубатором», обеспечивая культуре клеток необходимое ей окружение, питание и кислород и отводя продукты жизнедеятельности.

Линия биофабрикации органов представляет собой ряд интегрированных роботизированных устройств, в которых процесс сортировки клеток плавно переходит к стадии производства тканевых сфероидов, а затем к «печати» структур будущего имплантата

Подобные приборы давно используются для получения антител, вакцин, антибиотиков и ряда пищевых добавок.

Биореакторы для тканевой инженерии устроены гораздо сложнее, ведь клетки в них должны не только расти и нарабатывать какое-то целевое вещество: такие устройства предназначены для формирования полноценной ткани или даже целого органа. Для этого в питательную среду в строго определенном соотношении добавляют вещества, которые стимулируют размножение, дифференцировку и созревание тканей или тканево-инженерных конструкций.

Судя по последним данным, для этого требуется не только конкретное химическое окружение, но и определенное механическое воздействие (вибрации, растяжения и т. п.). По сути, нужно как можно точнее воспроизвести естественные условия, в которых происходят процессы формирования каждой ткани, лишь тогда в биореакторе удастся воспроизвести полноценный орган.

### От сортировщика до биореактора

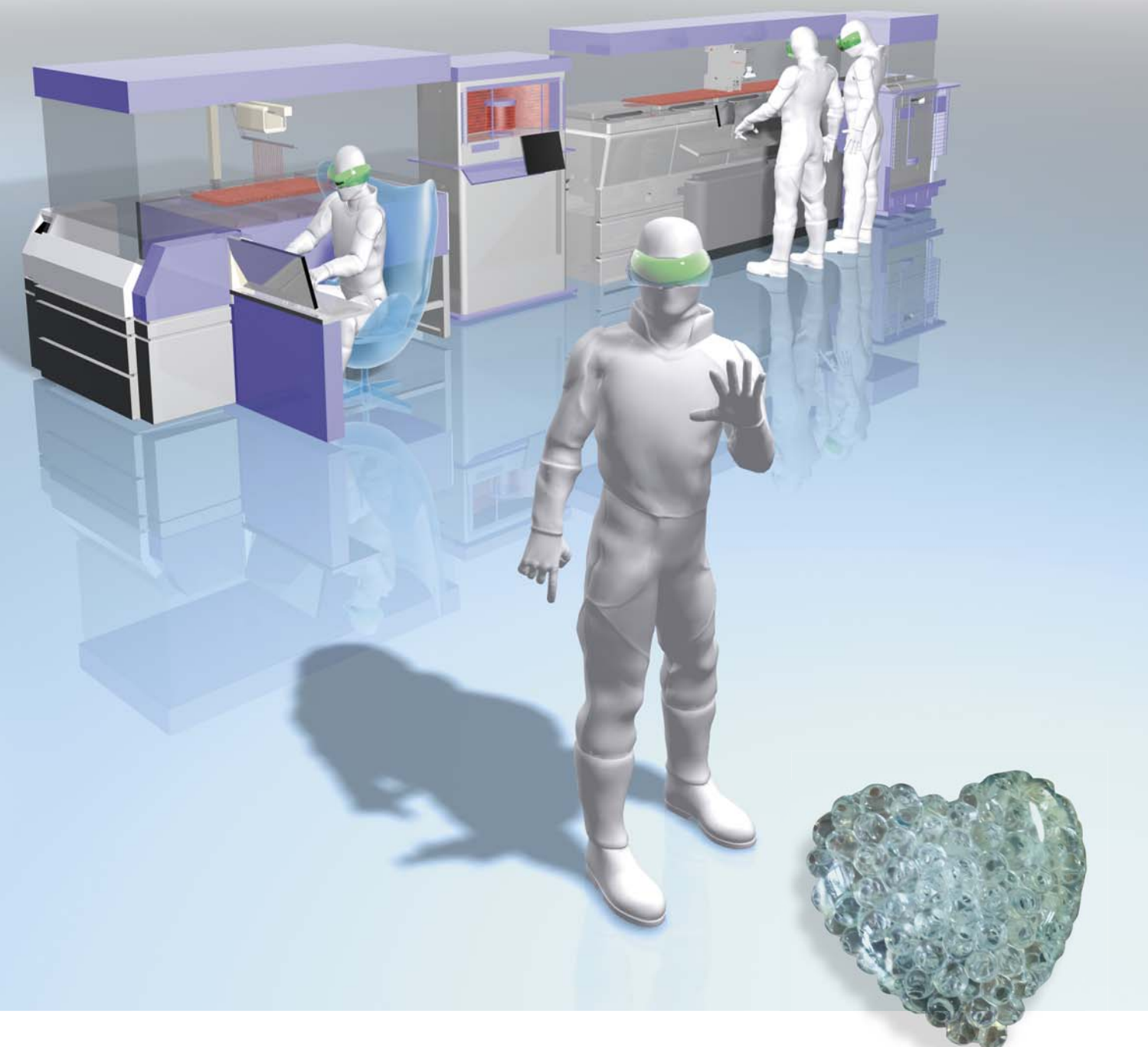
Полная производственная линия биофабрикации (искусственного производства живых органов) должна включать в себя несколько автоматических установок: сортировщик клеток пациента, биофабрикатор тканевых сфероидов, биопринтер и, наконец, вышеупомянутый биореактор. Все эти установки представляют собой сложные приборы, разработка и совершенствование которых в мире идет полным ходом.

Так, современный сортировщик клеток, разработанный компанией «Cytori Therapeutics» (США) в парт-

**Технологии печатания органов сегодня разработаны, но будут ли они рентабельны? Сколько будет стоить искусственный орган, например, та же почка, произведенная по технологии биопринтинга?**

**Для сравнения: цена искусственного механического сердца в США сегодня составляет около 250 тыс. долларов. Затраты на пациента с почечной недостаточностью, которому требуется процедура гемодиализа, за двенадцать лет составляют 1 млн долларов. Если цена «напечатанной» почки будет также, по ориентировочным оценкам, составлять 250 тыс. долларов плюс дополнительные затраты в 250 тыс. долларов на саму операцию трансплантации, то и в этом случае получается значительная экономия.**

**К этому стоит добавить, что только в США в очереди на пересадку донорской почки стоит свыше 60 тыс. человек**





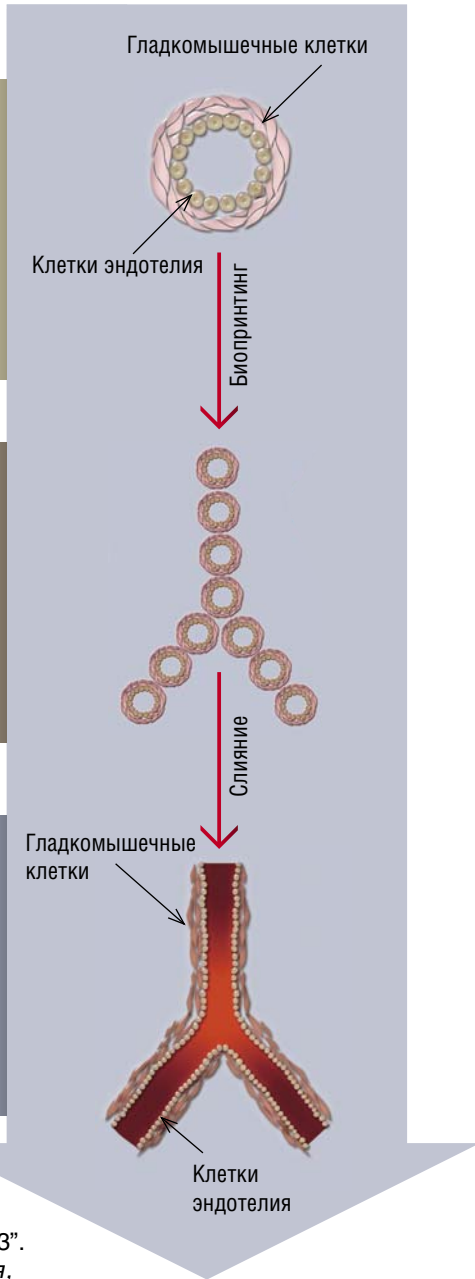
Макет сосудистого дерева почки. Пластик (по заказу лаборатории «3D Bioprinting Solutions», Москва)

Шаг 1. Получение сфероидов сосудистой ткани, содержащих внутри полость

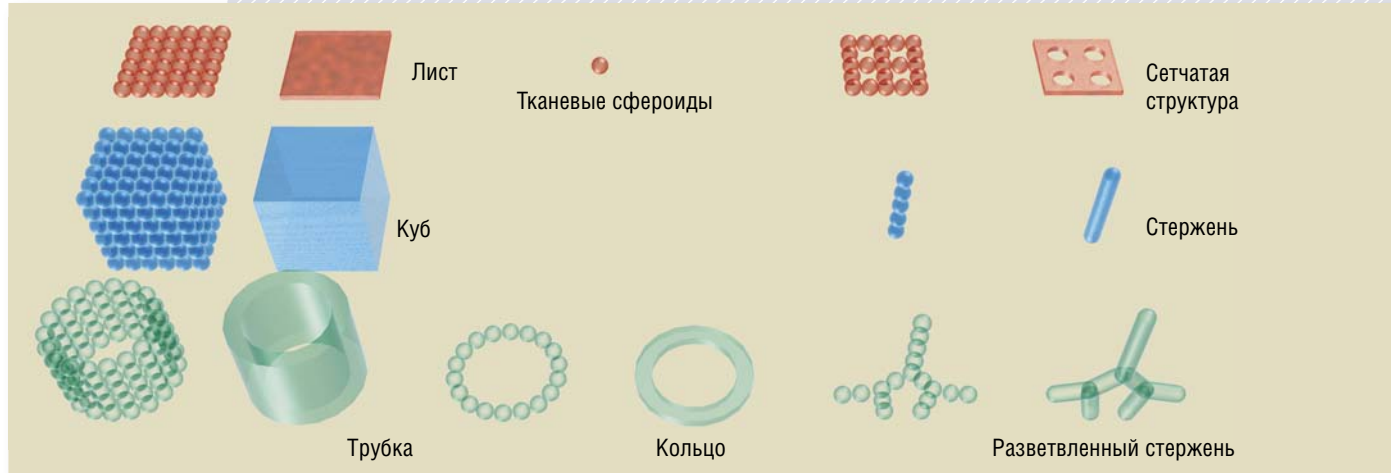
Шаг 2. 3D-печать разветвленного сегмента сосуда из сфероидов сосудистой ткани

Шаг 3. Самосборка сфероидов с образованием сосудистой трубки

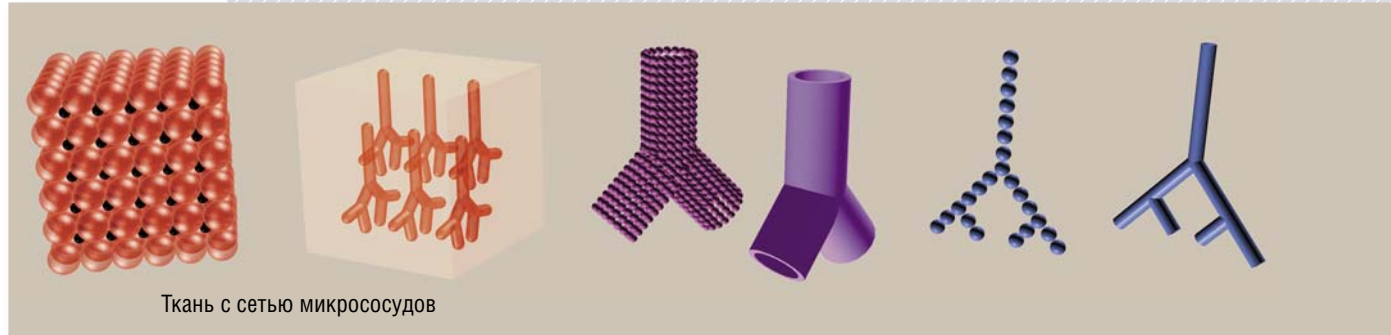
Скульптура Б. Ваадиа «Барак с кошкой», 2007. Сланец, 57"×23"×23". Частная коллекция, Германия



Важнейший этап в развитии биопринтинга – «печатание» органов со встроенной сосудистой сетью

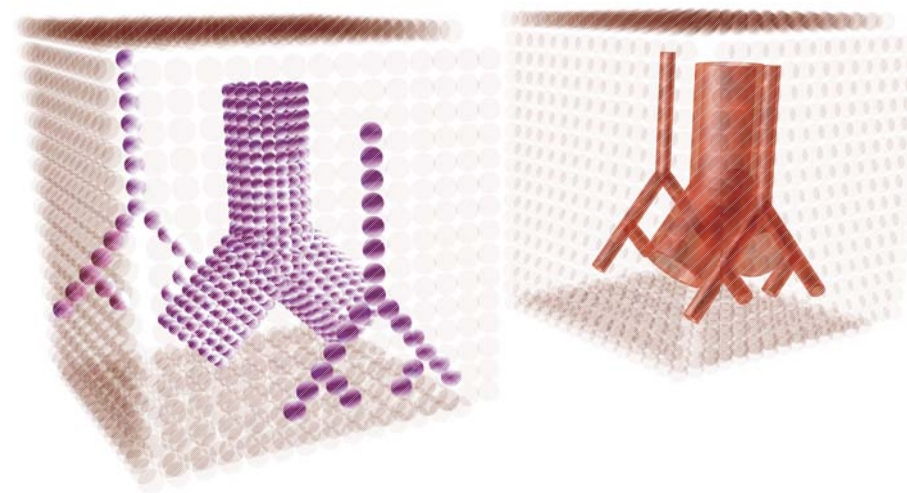


I. Получение (печать) клеточных агрегатов, состоящих из одного типа клеток (2003 г.)



II. Получение (печать) клеточных агрегатов, состоящих из разных типов клеток (2009 г.)

На этой «дорожной карте» представлены основные этапы развития биопечати органов. Концептуальное и экспериментальное развитие печати органов началось десятилетие тому назад с получения клеточных агрегатов из одного типа клеток. Согласно прогнозам и данным доклада Национального совета по разведке, США (National Intelligence Council), печать трехмерных функциональных тканевых модулей, снабженных сосудами, т.е. фактически, печать органов, начнется в 2030 г. По: (Science and Medicine. 2003. Vol. 9(2):April)



III. Получение (печать) готовых органов – трехмерных структур, содержащих несколько типов васкуляризованных тканей (предположительно 2030 г.),

нерстве с известной компанией «Olympus» (Япония), способен всего за 1–2 часа выделить нужную популяцию стволовых клеток из жировой ткани.

Сейчас в мире существует, по меньшей мере, шесть коммерческих компаний, занимающихся производством тканевых сфероидов. Так, компания «3D Biomatix» (США) и «InSphero» (Швейцария) создали автоматическую технологию биофабрикации тканевых сфероидов, основанную на модификации старого микробиологического метода висячей капли, разработанного Р. Кохом еще в конце XIX в. для культивирования бактерий в стерильных условиях.

Еще одна элегантная технология биофабрикации была создана компанией «Microtissues, Inc.» (США): в качестве среды для формирования сфероидов в ней используется неадгезивный гидрогель, благодаря чему клетки прилипают не к поверхности культуральной посуды, а друг к другу, образуя шарообразную структуру. Автоматизированный вариант этой технологии, разработанный в Медицинском университете Южной Каролины (США) группой В. А. Миронова, позволяет производить до 6 тыс. тканевых сфероидов в стандартных 96-луночных планшетах (Mehesz *et al.*, 2011).

Однако реальный прорыв в развитии биофабрикации тканевых сфероидов, очевидно, будет связан с применением так называемой цифровой микрофлюидики – совокупности технологий, основанных на микроманипулировании изолированными каплями (так работает, к примеру, обычный струйный принтер). Эта технология позволит генерировать до 10 тыс. тканевых сфероидов в секунду, что даст возможность создавать сложные составные сфероиды. Работы над созданием такого генератора тканевых сфероидов активно ведутся.

Уже разработаны и несколько поколений биопринтеров. К настоящему времени имеется несколько компаний, среди которых «EnvisionTEC» (Германия); «Sciperio-nScript» и «Organovo» (США), «regenHU Ltd» (Швейцария), которые производят коммерческие биопринтеры.

**И**так, технология искусственного производства живых органов на сегодня принципиально разработана, создано и выпускается необходимое оборудование. Однако биопринтинг органов до сих пор остается уделом исследователей: применение этих технологий в клинике нигде в мире пока официально не разрешено.

Тем не менее уже сегодня вполне реально «печатать» для медицинских целей такие относительно простые органы, как хрящи и кожу, которым не требуется «встроенных» кровеносных сосудов. Однако,

**В 2013 г. в Москве была открыта Лаборатория биотехнологических исследований «3D Bioprinting Solutions». Ее научный руководитель – профессор В. А. Миронов, пионер в области технологии печати органов и биофабрикации; заведующий – С.В. Новоселов, эксперт в области молекулярной и клеточной биологии и биомедицины; генеральный директор и председатель Совета директоров группы компаний «ИНВИТРО», ключевого инвестора Лаборатории – А. Ю. Островский. Долгосрочная цель проекта – создание технологии биопринтинга и производства почки, одного из самых востребованных донорских органов человека**

несмотря на все достигнутые успехи, биопечать человеческих почек и печени – самых востребованных и сложноорганизованных внутренних органов, пока недостижима. При достаточном финансировании научно-прикладных исследований это станет возможным через 10–15 лет.

Но прежде чем перейти к биопечати больших трехмерных тканевых моделей, необходимо будет решить ряд так называемых «производственных» проблем. Ведь для биопечати только одной человеческой почки требуются миллионы тканевых сфероидов, т.е. речь идет о настоящих промышленных масштабах!

Биопринтинг имеет много схожих характеристик с микропроцессорной и электронной индустрией, которые начали интенсивно развиваться лишь в результате систематического внедрения автоматизации и роботизации в производственные линии. И в этом смысле речь идет о создании не только роботизированного биопринтера, но и целой технологической линии самосборки тканей и органов, чтобы сделать «производство органов» рентабельным и прибыльным.

Для этого сегодня имеются все необходимые предпосылки, и нет сомнений, что именно трехмерной печати органов предстоит в недалеком будущем сделать решающий, революционный прорыв в регенеративной медицине.

#### Литература

Martin I., Wendt D., Heberer M. *The role of bioreactors in tissue engineering. Trends Biotechnol.* 2004 Feb; 22(2):80–6.

Mehesz, Brown J., Hajdu Z. *et al. Scalable robotic biofabrication of tissue spheroids // Biofabrication.* 2011 Jun; 3(2):025002. doi: 10.1088/1758–5082/3/2/025002. Epub 2011 May 12.

Song J.J., Guyette J.P., Gilpin S.E. *et al. Regeneration and experimental orthotopic transplantation of a bioengineered kidney // Nat Med.* 2013 May; 19(5):646–51. doi: 10.1038/nm.3154. Epub 2013 Apr 14.



Скульптура Б. Ваадиа «Сепфор», 1997. Сланец и булыжник, 49"×66"×66". Частная коллекция, Калифорния, США