

BIOMEDICÍNSKE POUŽITIE 3D TLAČE

NATÁLIA JANIGOVÁ, JAN GAJZIOK a DAVID VETCHÝ

*Farmaceutická fakulta, Masarykova Univerzita, Palackého tř. 1946/1, 612 00 Brno
gajdziokj@pharm.muni.cz*

Došlo 26.8.20, prijaté 8.3.21.

Kľúčové slová: 3D tlač, biomedicínske použitie, biokompatibilné materiály, bioatramenty

Obsah

1. Úvod
2. 3D tlač orgánov a tkanív
3. 3D tlač personalizovaných implantátov a protéz
4. 3D tlač anatomických modelov pre chirurgickú aplikáciu
5. 3D tlač personalizovaných aplikačných foriem a systémov
6. Biokompatibilné materiály a bioatramenty
 - 6.1. Základné biodegradovateľné polyméry
 - 6.2. Pokročilejšie biomateriály bez obsahu živých buniek
 - 6.3. Bioatramenty
 - 6.3.1. Jednoduché bioatramenty
 - 6.3.1.1. Proteínové štruktúry
 - 6.3.1.2. Polysacharidové štruktúry
 - 6.3.1.3. Decelularizovaný extracelulárny matrix
 - 6.3.1.4. Syntetické štruktúry
 - 6.3.2. Zložené bioatramenty
7. Záver

1. Úvod

Využívanie 3D tlače v oblasti medicíny a príbuzných odvetviach sa stále rozširuje. V súčasnosti sú už používané napríklad: 3D tlač orgánov a tkanív, vytváranie protéz a implantátov na mieru pacientovi, tvorba presných anatomických modelov a výroba špeciálnych liekových foriem¹.

Prvé použitie 3D tlače v medicíne bolo zaznamenané na začiatku milénia, kedy sa vytvárali dentálne implantáty a prvé protézy. Dnes sa bežne môžeme stretnúť s 3D tlačnými kosťami, ušnými chrupavkami, sánkou, medzistavcovou platničkou a inými^{1,2}. Americké vládne organizácie sa začali zameriavať na podporu výskumu a vývoja 3D tlače

v oblasti medicíny. FDA v decembri 2017 vydala prvý usmerňovací dokument o 3D tlači zdravotníckych pomôcok².

Používanie 3D tlače v medicíne má niekoľko výhod. Najväčšou je možnosť personalizácie terapie danému pacientovi. Vďaka individuálnemu prístupu sa zlepšuje efektívnosť liečby. Ďalšou z mnohých výhod je rýchlosť samotného procesu tlače¹.

2. 3D tlač orgánov a tkanív

Momentálne je jedinou terapiou pri zlyhaní orgánov a tkanív transplantácia od darcov, ktorú komplikuje nutosť zhody s pacientom. Podľa štatistiky z roku 2009 sa iba 18 % čakajúcich pacientov dočkalo kompatibilného darcu¹. Tento problém je možné vyriešiť použitím vlastných buniek pacienta na výrobu orgánov³.

Použitie živých buniek v 3D tlači sa už využíva vo výskume pomerne často. Firma Organovo[®] v roku 2015, v spolupráci s firmou L'Oreál[®], vytvorili kožné tkanivo pomocou 3D tlačiarne. V roku 2017 im bolo udelené povolenie FDA na liečbu deficitu alfa-1-antitrypsínu pomocou 3D tlačeného pečeneového tkaniva¹. Tento rok vystúpili s obličkovým tkanivom, ktoré vytvorili 3D biotlačou kmeňových buniek. Spoločnosť predstavila automatizovanú výrobu obličkových organoidov (miniaturizované a zjednodušené verzie orgánov produkované *in vitro*, ktoré zobrazujú reálnu mikroanatómiu)⁴. V súčasnosti čaká na schválenie postup ošetrovania aneuriziem brušnej aorty za pomoci aortálneho puzdra vytvoreného 3D tlačením. Každé puzdro je navrhnuté na základe jedinečnej anatómie pacienta⁵. Vedcom z Michiganskej Univerzity sa podarilo úspešne implantovať biologicky vstrebateľnú 3D tlačenú priedušnicovú dlahu, vyrobenú pomocou mikroextrúžnej biotlače^{1,6}.

3. 3D tlač personalizovaných implantátov a protéz

Kostné implantáty, ktoré sa vyrábajú tradičným spôsobom, často nezodpovedajú anatómii pacienta. Personalizovaný implantát sa vyznačuje anatomickou zhodou, pretože základom preň sú snímky pacienta, vytvorené modernými zobrazovacími technikami⁷. Spoločnosť Karl Leibinger Medizintechnik GmbH & Co. KG (Nemecko) využíva od roku 2013 na výrobu implantátov pre ústno-čelústnu a tvárovú chirurgiu výlučne 3D tlač. Výhodou tejto výroby implantátu je voľnosť tvaru, čo pre pacienta znamená nie len obnovenie funkcie, ale súčasne aj estetického vzhľadu⁸.

4. 3D tlač anatomických modelov pre chirurgov

3D tlač sa využíva tiež ako pomôcka pre lekárov pred operačnými zákrokmi. Orgán alebo tkanivo pacienta sa naskenuje a vytlačí ako 3D model, ktorý má väčšiu výpočtovú hodnotu ako skeny z MRI alebo CT. Tieto modely, vhodné na naštudovanie anatómie a tréning chirurgických postupov, sa hojne využívajú v ortopédii, pri predoperačnom plánovaní zákrokov. Je to hlavne pri operáciách oblastí s komplexnou anatómiou, deformitou alebo kostným nádorom⁷.

5. 3D tlač personalizovaných aplikačných foriem a systémov

Okrem chirurgie a transplantácie medicíny sa môže personalizovať aj farmakoterapia, kde sa kladie dôraz na špecifiká jednotlivého pacienta, akými sú vek, pohlavie alebo štádium choroby. S 3D tlačiarňou je možné vytvoriť za krátky čas individuálnu medikáciu s rôznym profilom uvoľňovania, obsahom účinných látok, alebo tvarom a veľkosťou liekovej formy¹.

Zatiaľ jediným schváleným a registrovaným (FDA) liečivým prípravkom na trhu, vyrábaným technológiou 3D tlače, je Spritam[®] s účinnou látkou levetiracetam od firmy Aprelia[™] Pharmaceuticals (USA). Na prípravu sa používa technológia „powder bed printing – ZipDose[®]“⁹. Pri tomto procese sa na pás vrstvi prášok, ktorý je uhladzovaný stierkou. V ďalšom kroku je na prášok nastriekavané spojivo. Tento proces sa niekoľkokrát opakuje, čím vzniká mnohovrstvový produkt. Po dosiahnutí želaného množstva vrstiev sa prebytočný prášok odstráni. Táto technológia umožňuje, aby bola účinná látka súčasťou nastriekavanej kvapaliny, prášku, alebo oboidvoch súčasne⁹.

Ďalším príkladom využitia 3D tlače je napr. vytvorenie orodispergovateľnej tablety s účinnou látkou paracetamolom. V testoch sa ukázalo, že táto tableta uvoľní 98,5 % paracetamolu za dve minúty, čo je v porovnaní s konvenčnými tabletami desaťnásobné zrýchlenie uvoľnenia¹⁰.

V roku 2015, v lekárskej inštitúte Howarda Hughesa, vyvinuli molekulárnu 3D tlačiareň. Princípom jej činnosti je syntéza malých blokov molekúl podľa základného chemického vzorca. V súčasnosti sú vyvíjané proteínové tyrosínfosfatázy, ktoré sa používajú ako inhibítor rakovinového bujnenia. Používajú kombináciu PCL s účinnou látkou, ktorá sa vpravuje do pankreasu postihnutého rakovinou. Ďalšou výskumnou firmou je FabRX Ltd., ktorá sa špecializuje na 3D tlačené liekové formy, akými sú tzv. „polypills“. Tento typ liekovej formy obsahuje viac účinných látok v jednej tablete. Pre každú látku je definovaný iný disolučný profil. Príkladom je kombinácia kaptoprilu, nifedipínu a glipizidu na liečbu hypertenzie, spojenej s diabetom typu II. V National Univerzity Singapur vytvorili software, ktorý umožňuje takto personalizovať tablety pre jednotlivého pacienta¹¹. Príklady využitia 3D tlače na výrobu rôznych liekových foriem sa nachádzajú v tab. I (cit.¹²).

6. Biokompatibilné materiály a bioatramenty

Za biokompatibilné materiály môžeme považovať také, ktoré po aplikácii do tela, nespôsobia patologické alebo iné nežiadúce reakcie¹³. 3D biotlač je nová technológia, najčastejšie vnímaná ako fyzikálne vytlačenie biokompatibilného materiálu alebo bioatramentu pomocou 3D tlačiarne vo vrstvách, ktoré sú rýchlo stabilizované rôznymi mechanizmami: odparovanie rozpúšťadla; zrážanie polymérnej matrice; tepelné, iónové alebo foto zosieťovanie; atď. Postupne je tak vytváraná funkčná štruktúra, ktorá má schopnosť interagovať so živým prostredím^{13,14}. Bioatrament je definovaný ako materiál, ktorý sa používa v tkanivovom inžinierstve na výrobu živých systémov. Je zložený zo živých buniek, ktoré sú dispergované alebo enkapsulované do matrice, tvorenej hydrogelovým základom. Ideálny bioatrament by mal vykazovať rovnaké mechanické, reologické a biologické vlastnosti ako cieľové tkanivo^{15,16}.

Materiály používané v 3D biotlači je možné rozdeliť do troch skupín.

6.1. Základné biodegradovateľné polyméry

Medzi základné biodegradovateľné polyméry používané v 3D tlači FDM technikou sa radia kyselina polylactóna, polyglykolová, ich kopolyméry a polykaprolaktón. Tieto materiály sú podobné štruktúrnym stavebným jednotkám. Existuje aj možnosť do týchto materiálov, resp. do vytvorených polymérnych matric, zapracovať bioaktívne častice a látky, ktoré by poskytli aspoň obmedzený stupeň biologickej funkčnosti a potenciál regenerácie tkaniv^{2,13}.

6.2. Pokročilejšie biomateriály bez obsahu živých buniek

Pokročilejšie biomateriály zahŕňajú mnoho druhov materiálov, ktoré však ešte nie sú zložené z buniek. Sú definované niekoľkými charakteristikami, ktorými sa líšia od pôvodných biokompatibilných materiálov. Prvou podmienkou je obsah bioaktívnej zložky (organické molekuly, rastové faktory) v materiáli. Ďalším špecifikom je, že požadovaná teplota počas výrobného procesu nesmie presiahnuť teploty bežné v biologickom prostredí (37 °C). Táto vlastnosť vylučuje materiály používané vo FDM a PBP (powder bed printing) technológiách 3D tlače, kde sú nutné vysoké pracovné teploty. Treťou podmienkou je biologická aktivita, teda materiály musia indukovať tkanivovo špecifické reakcie^{2,13}. Predpokladá sa, že v nasledujúcich rokoch bude schválené početné množstvo takýchto materiálov, zameraných na pohybové ústrojenstvo. Príkladmi takýchto materiálov sú Hyperelastic Bone[™] a 3D grafén. Tieto materiály vykazujú vysokú biologickú aktivitu a zároveň teplota pri ich spracovaní neprekračuje laboratórnu teplotu. Hyperelastic Bone[™] sa skladá z 90% hydroxyapatitu, zvyšok tvorí polykaprolaktón alebo kopolymér polykyselín mliečnej a glykolovej. 3D grafén je tvorený vrstvou atómov uhlíka, ktoré sú spojené

Tabuľka I
Príklady liekových foriem vyrobených pomocou 3D tlačiarne¹²

Metóda 3D tlače ^a	Lieková forma	Účinná látka	Použitie
Tryskanie spojiva	tableta s kompartmentami	metylénová modrá, alizarinová žltá	indikátor, farbivo
	tableta s okamžitým uvoľňovaním	paracetamol	analgetikum, antipyretikum
	tableta s uvoľňovaním 0. rádu	pseudoefedrín	sympatomimetikum, dekonescens
	orodispergovateľná tableta	levetiracetam	antiepileptikum
FDM	tobolka s riadeným uvoľňovaním	budesonid	kortikoid, antiastmatikum
	tableta s riadeným uvoľňovaním	hydrochlorothiazid	diuretikum
	zubný chránič	klobetasol	kortikoid
	orodispergovateľný film	aripipazol	antipsychotikum
	vaginálny inzert	progesterón	hormón
SSE	tableta s riadeným uvoľňovaním	guajfenezín	expektorans
	tableta s riadeným uvoľňovaním	nifedipín, glipizid, kaptopril	kombinácia antidiabetka a antihypertenzív
SLS	tableta s riadeným uvoľňovaním	paracetamol	analgetikum, antipyretikum
SLA	tableta s predĺženým uvoľňovaním	paracetamol	analgetikum, antipyretikum
	hydrogél s liečivom	ibuprofén	analgetikum, antipyretikum, antiflogistikum
	maska na tvár	kyselina salicylová	antiflogistikum

^a FDM – fused deposition modeling, SSE – semi-solid extrusion, SLS – selective laser sintering, SLA – stereolithography

do šesťuholníkovej mriežky². Do tejto skupiny je možné zaradiť aj biokeramické materiály, ako hydroxyapatit a fosforečnan vápenatý, ktoré sa používajú hlavne ako mechanická opora buniek pri tlači. Zároveň vykazujú osteogénnu aktivitu, vďaka čomu sú ideálne pre tlač kostného tkaniva¹⁷.

6.3. Bioatramenty

Bioatramenty sú špecifické materiály, ktoré obsahujú živé bunky enkapsulované do biokompatibilného materiálu. Základný bioatrament je možné popísať ako matricový materiál tvorený hydrogélom, ktorý obsahuje aspoň jeden druh buniek a slúži ako umelé extracelulárne prostredie pre ich rast¹⁸.

6.3.1. Jednoduché bioatramenty

Jednoduché bioatramenty sa skladajú z buniek a matrice, ktorá vytvára hydrogél. Biokompatibilné hydrogély majú všeobecne mnoho výhod pri vytváraní základnej konštrukcie živých tkanív. Väčšina z nich obsahuje väzobné miesta alebo štrukturálne priestory pre enkapsulované bunky¹⁵. Je možné ich rozdeliť podľa chemickej štruktúry do niekoľkých skupín.

6.3.1.1. Proteínové štruktúry

Kolagén

Je hlavný štrukturálny proteín extracelulárnej matrix u cicavcov, preto je široko využívaný v biomedicínskych

technológiách. Kolagén má niekoľko typov. Najvýznamnejší je typ I a typ II. Kolagén typu I sa nachádza hlavne v šľachách, väzoch a kostiach. Typ II je najviac zastúpený v chrupavke. Koch a spol. používali kolagén na enkapsuláciu keratocytov a fibroblastov za účelom vytvorenia mnohovrstvového kožného tkaniva¹⁹. Moon a spol. vytvorili systém na biotlač buniek hladkého svalstva do kolagénovej matrice¹⁵. Ďalším príkladom je enkapsulácia mezenchymálnych kmeňových buniek do samotného kolagénu, alebo do zmesi kolagénu s agarózou¹⁵. Výsledky ukazujú, že matrice s prevažujúcim množstvom kolagénu vykazujú silne osteogenickú aktivitu a matrice s prevažujúcou agarózou aktivitu adipogénnu. Kolagén sa tiež často kombinuje s alginátom. Výsledky potvrdili, že táto kombinácia vykazuje vyššiu osteogenickú aktivitu ako matrice tvorená samotným alginátom¹⁵.

Želatína

Je produkt denaturácie kolagénu. Roztok želatíny je termosenzitívny a vytvára hydrogél už pri nízkych teplotách. Je to jeden z najčastejšie používaných polymérov pre biologické aplikácie. Jeho chemicky upravená forma – metakrylát želatíny sa tiež často používa ako zložka alebo samotný bioatrament¹⁵. Kombinácia želatíny a alginátu bola použitá na enkapsuláciu myoblastov a následnú biotlač rôznych tkanív²⁰. V ďalšej štúdií bola táto kombinácia použitá na vytvorenie časti aortálnej chlopne²¹.

Fibrinogén a fibrín

Fibrinogén je rozpustný glykoproteín, ktorý sa zúčastňuje kaskády krvného zrážania. Pri tomto procese je transformovaný na nerozpustný fibrín²². V tkanivovom inžinierstve sa tieto molekuly používajú na vytvorenie funkčných tkanív, ktoré nahrádzajú poškodené časti, a to hlavne vďaka ich významnej úlohe pri hojení rán. Tieto glykoproteíny sú biokompatibilné, biodegradovateľné, nevytvárajú imunitnú odpoveď a indukujú spájanie buniek a ich proliferáciu²². Nakamura a spol. vytvorili bioatrament, v ktorom bola použitá kombinácia fibrínu a alginátu²³. Zmes fibrínu a kolagénu bola podľa inej štúdie využitá na zlepšenie mechanických vlastností pri vytváraní chrupavkového tkaniva¹⁵.

Hodváb

Hodváb je polymér, ktorý je používaný ako šicí materiál v medicíne. Má niekoľko výhod, predovšetkým elasticitu a pomalý rozpad²⁴. Na výrobu hydrogélů je používaný hlavne fibroín, získavaný práve z hodvábu. K tvorbe gélu dochádza bez významných štrukturálnych zmien, napríklad elektrostatickou interakciou, alebo vytvorením vodíkových väzieb²⁵. Zgélóvanie môže byť urýchléné zmenou pH, zvýšením teploty, alebo pôsobením ultrazvuku¹⁷. Hodváb je vhodný materiál na 3D biotlač. Je mechanicky stabilný a zároveň podporuje rast a proliferáciu buniek^{17,25}.

6.3.1.2. Polysacharidové štruktúry

Alginát

Alginát je neutrálny aniónový polysacharid, získavaný z hnedých morských rias. Je štrukturálne podobný glykosaminoglykanom, ktoré sa nachádzajú v extracelulárnej matrix ľudského organizmu. Skladá sa z (1-4)- β -D-manuronátových jednotiek. Tento materiál je hojne používaný v biomedicíne vďaka jeho biokompatibilite, nízkej cytotoxicite, dobrým gelačným vlastnostiam a nízkej cene. Alginátový bioatrament bol úspešne použitý na enkapsuláciu hepatocytov. Používaný je tiež v kombinácií so syntetickým polymérom PCL, ako hybridný bioatrament. Schurman a spol. úspešne použili tento materiál na enkapsuláciu chondrocytov^{15,26}.

Gelánová guma

Gelánová guma je hydrofilný vysokomolekulárny aniónový polysacharid produkovaný baktériami. Je podobný alginátu, formuje hydrogély pri nízkych pracovných teplotách s kationmi. Skladá sa z opakujúcich sa jednotiek, ktoré obsahujú dve molekuly D-glukózy, jednu molekulu L-rhamnózy a D-glukuronovú kyselinu. FDA ju schválila ako potravinárske aditívum a je široko používaná v potravinárskom a farmaceutickom priemysle ako gélotvorná látka a stabilizátor. V tkanivovom inžinierstve je tiež široko používaná ako substrát pri výrobe tkanív. Gelánová guma sa často kombinuje s inými polymérami na prípravu bioatramentu s výhodnými reologickými vlastnosťami^{15,27}. V niekoľkých štúdiách bol kombinovaný s metakrylátom želatíny, na enkapsuláciu osteoblastov a chondrocytov²⁷.

Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová je telu vlastný glykosaminoglykan. Nachádza sa v synoviálnej tekutine, sklovci a chrupavkách. Skladá sa z opakujúcich sa jednotiek N-acetylglukozamínu a kyseliny glukuronovej¹⁵. Podľa štúdie bolo vytvorené osteochondrálne rozhranie, kde boli do jednej časti vytlačené enkapsulované chondrocyty a osteoblasty v hydrogéli s kyselinou hyaluronovou a alginátom a v druhej časti enkapsulované s kolagénom typu I (cit.²⁸). Metakrylát kyseliny hyaluronovej spolu s metakrylátom želatíny bol použitý v štúdiu, kde boli tlačéné trojcipe srdcové chlopne pomocou enkapsulovaných ľudských buniek²⁹.

Dextran

Dextran je prírodný polysacharid bakteriálneho pôvodu. Hlavný reťazec je tvorený glukózovými jednotkami spojenými α -1,6 glykosidovou väzbou, vedľajšie sú tvorené α -1,3 spojeniami. Dextran je v tele cicavcov odbúravaný pomocou enzýmu dextranázy, takže je považovaný za plne biodegradovateľný. Jeho metakrylát bol použitý v kombinácii s kyselinou hyaluronovou na prípravu hydrogélů, v ktorých bola vytvorená polymérna sieť. Do tejto siete boli enkapsulované konské chondrocyty. Výsledky ukázali, že zmes má výhodné viskoelastické a pseudoplastické vlastnosti a môže byť použitá ako bioatrament v rôznych biomedicínskych aplikáciách¹⁵.

Agaróza

Je polysacharid získavaný z morských rias, ktorý je široko využívaný kvôli svojim gélotvorným vlastnostiam. Je zložený zo striedajúcich sa jednotiek galaktózy a 3,6-anhydrogalaktózovými podjednotkami. Neufurth a spol. použili zmes alginátu, želatíny a bunkovej línie osteogenického sarkómu ako bioatrament na 3D tlač¹⁵. V ďalšej štúdiu bola použitá zmes agarózy a alginátu na vytvorenie bioatramentu^{15,20}.

Chitosan

Chitosan je ďalším biodegradovateľným polysacharidom používaným ako gélotvorná látka. Skladá sa z β -(1-4) spojených D-glukozamínových jednotiek a N-acetyl-D-glukozamínových jednotiek. V publikovanej štúdiu, bol vytvorený bioatrament z chitosanu a agarózy. Do neho boli aplikované bunky, následne bola sledovaná ich životaschopnosť, ktorá dosiahla 95 % po 21 dňoch v inkubátore. Vďaka jeho špecifikám je to sľubný biomateriál pre tkanivové inžinierstvo³⁰.

6.3.1.3. Decelularizovaný extracelulárny matrix

Decelularizácia je proces, kedy sa z tkanív a orgánov odstraňujú bunkové komponenty pomocou chemických, mechanických alebo fyzikálnych procesov. Pati a spol. vytvorili bioatrament na báze dECM, ktorý napodobňuje špecifické prirodzené prostredie rôznych typov tkanív³¹. Ich výsledky vykazovali vysokú mieru prežitia buniek, vysokú génovú expresiu pre špecifickú líniu buniek a zároveň tvorbu extracelulárnej matrix decelularizovaných tukových, srdcových a chrupavkových tkanivových

štruktúr³¹. V ďalšej štúdií, Skardal a spol. použil Triton X-100 (tenzid) na získanie decelularizovanej extracelulárnej matrix z kostrových svalov, pečene a srdcových tkanív. Matrix bola zmiešaná s hydrogélom a použitá ako bioatrament³².

Poldervaart a spol. používali Matrigel, ktorý slúži ako prírodná extracelulárna matrix používaná pri pestovaní bunkových a tkanivových kultúr. Obsahuje esenciálne bioaktívne molekuly, ako sú laminin, kolagén a niekoľko rastových faktorov. V tejto štúdií, ktorá sa zaoberala vaskularizáciou, bol kombinovaný s alginátom a používaný ako bioatrament. Alginát bol pridávaný na zlepšenie tlačiteľnosti Matrigelu. Tiež doň pridávali VEGF – vaskulárny endoteliálny rastový faktor³³. Najväčšou limitáciou Matrigelu pri klinickom využití je jeho pôvod z myšieho sarkómu¹⁵.

6.3.1.4. Syntetické štruktúry

Polyetylén glykol

Je to obľúbený syntetický polymérny materiál vďaka jeho dobrým mechanickým vlastnostiam, ktoré uľahčujú proces biotlače a tvarovú stabilitu výsledného produktu. PEG nie je cytotoxický a nevyvoláva imunologickú odpoveď. Jeho hlavnou nevýhodou pri biotlači je bioinertnosť, takže je nutné kombinovať ho s biologicky aktívnymi hydrogélmi³⁴. Rutz a spol. použili PEG na vytvorenie bioatramentu, ktorý má veľmi variabilné mechanické a reologické vlastnosti³⁵. Vytvorili PEG s reaktívnymi skupinami (PEGX) so schopnosťou viazať sa s rôznymi materiálmi cez aminoskupiny. Boli používané kombinácie PEG-PEGX, PEGX-želatína, PEGX-želatína-fibrinogén a PEGX-želatína-kolagén ako bioatramenty, do ktorých boli enkapsulované rôzne druhy buniek³⁵. V inej štúdií bol používaný polyetylén glykol-diakrylát ako bioatrament pre tlač kostného tkaniva¹⁵.

Polyvinylpyrrolidon

Je vo vode rozpustný polymér tvorený monomérnymi jednotkami *N*-vinylpyrrolidónu. V niekoľkých štúdiách bol polyvinylpyrrolidon skúmaný ako potenciálne vhodný kandidát na bioatrament. Pri biotlači boli používané rôzne

koncentrácie PVP v zmesi. Výsledky dokazujú, že pridaním PVP sa zlepšovali vlastnosti bioatramentu, akými je napr. tlačiteľnosť a zároveň sa ukázal pozitívny vplyv na prežitie enkapsulovaných buniek¹⁵.

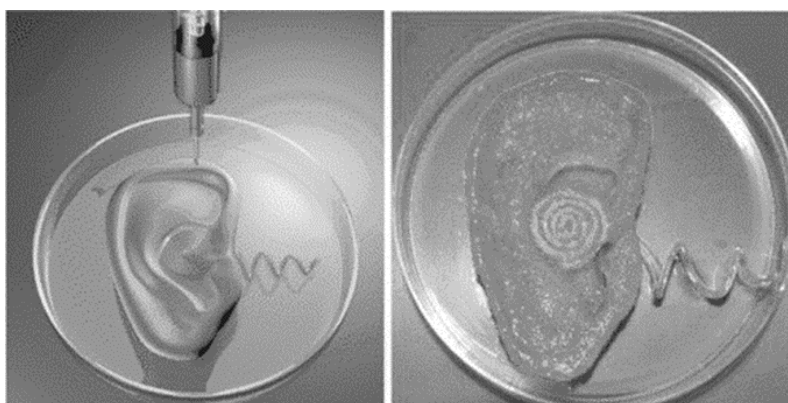
Okrem vyššie spomenutých materiálov sú na trhu dostupné aj hotové inovatívne bioatramenty. Príkladom môžu byť produkty s označením Cellink®. V súčasnosti je vyrábaných niekoľko druhov Cellink® bioatramentov. Sú zložené napríklad z GelMA, alginátu, hydratovaných celulóзовých vlákien, vápnika, fosforu, PCL a poloxaméru. Cellink® bol skúmaný v niekoľkých štúdiách, kde sa javil ako sľubný materiál pre biotlač. Boli úspešne vytvorené anatomicky tvarované chrupavkové štruktúry. V nich enkapsulované chondrocyty vykazovali vysokú mieru životaschopnosti, diferenciáciu buniek a syntézu extracelulárnej matrix^{15,36}. Ďalším z dostupných prírodných biomateriálov je DermaMatrix™. Je vyrábaný z darovanej ľudskej kože. Obsahuje dermis bez obsahu buniek. Je využívaný hlavne ako biopapier, alebo ako implantát v transplantáčnej medicíne. Po implantovaní do tela pacienta začnú jeho vlastné bunky prenikať do trojdimenzionálnej štruktúry, postupne sa vytvára vaskularizácia a nové fibroblasty. Po ukončení tohoto procesu je to plnohodnotná náhrada kožného tkaniva³⁷.

6.3.2. Zložené bioatramenty

Zložené bioatramenty môžeme definovať ako jednoduchý bioatrament, do ktorého sú pridávané ďalšie látky, ktoré zlepšujú fyzikálno-chemické vlastnosti, tlačiteľnosť, alebo majú pozitívny vplyv na prežívanie a diferenciáciu enkapsulovaných buniek. Týmito látkami sú anorganické nanomateriály (kovy, minerály), alebo bioaktívne materiály (rastové faktory, krvná plazma)¹⁵.

Nanomateriály

Nanomateriály majú mnoho atraktívnych vlastností a niekoľko výskumníkov ich použilo pri vytváraní bioatramentov. Skardal a spol. používali zlaté nanočastice ako komponent do bioatramentu. Tieto nanočastice majú afinitu k thiolovým skupinám. Táto skupina spojila nanočastice zlata s thiolovanou kyselinou hyaluronovu a želatínou,



Obr. 1. 3D bionické ucho vytvorené s nanočasticami striebra³⁹

výsledný bioatrament bol použitý na enkapsuláciu fibroblastov a následnú tlač vaskulárných štruktúr³⁸. Ďalšími použitými boli strieborné nanočastice pre biotlač 3D biotického ucha (obr. 1)³⁹. Ako základ pre bioatrament bol použitý alginát zmiešaný s nanočasticami striebra a následne boli do neho enkapsulované chondrocyty. Výsledky ukázali, že takto vytvorené uši boli schopné prijímať elektromagnetické signály a zároveň byť biologicky a metabolicky aktívne vďaka živým bunkám³⁹.

Ďalšia skupina nanomateriálov sú minerály. Napríklad hydroxyapatit je využívaný v tkanivovom inžinierstve na výrobu kostného tkaniva, vďaka jeho podpornej funkcii pri raste a proliferácii kostných buniek. Je veľmi podobný anorganickým časticiam, ktoré sa prirodzene nachádzajú v kostnom tkanive cicavcov. Catrol a spol. úspešne používali kombináciu nanočastíc hydroxyapatitu a osteoprogenitorových buniek v médiu pre tlač dvoj- a trojdimenzionálnych objektov^{15,40}.

Bioaktívne materiály

Medzi bioaktívne materiály je možné zaradiť rastové faktory. Tieto biomolekuly môžu byť inkorporované do bioatramentov na zlepšenie ich biologických vlastností. Rastové faktory patria do skupiny látok, ktoré stimulujú bunkový rast, diferenciaciu, proliferáciu a regeneráciu tkanív. Sú produkované rôznymi typmi tkanív a žliaz⁴¹. Do bioatramentov sa pridáva napríklad VEGF, ktorý má vplyv na cievny systém, insulin-like growth factor-2, fibroblast growth factor-2 a mnoho ďalších^{15,41}.

Ďalším používaným bioaktívnym materiálom je krvná plazma. Je to extracelulárna matrix krvných buniek tvorená roztokom solí a proteínov, akými sú fibrinogén, albumín a globulín. Vďaka jej výhodnému prirodzenému zloženiu bola tiež používaná ako komponent biotramentu. Gruene a spol. skombinovali alginát a krvnú plazmu na enkapsuláciu kmeňových buniek, odvodených z tukového tkaniva⁴². Ďalší experiment používal zmes alginátu a krvnej plazmy na vytvorenie kožného tkaniva¹⁹.

7. Záver

Od roku 1984, kedy bola Charlesom W. Hullom patentovaná technológia 3D tlače, uplynulo viac ako 30 rokov. Za tento čas prešla táto technológia obrovským vývojom. Na začiatku éry 3D tlače sa využívala na výrobu prototypov v priemyselnej výrobe, dnes už je možné vytlačiť živé bunky do požadovaného tvaru. Schopnosť výroby 3D objektov zo živých buniek a bioaktívnych matric je základným krokom k výrobe tkanív a orgánov. Samotná bioaktivita je dôležitá na to, aby si implantovaná štruktúra dokázala vytvoriť vlastnú vaskulatúru, rastové faktory a tak sa rýchlo integrovať s okolitými tkanivami. Výskum biotlače zatiaľ priniesol funkčné príklady živej chrupavky, šliach a svalov. 3D technológia týmto otvára nové možnosti personalizovanej medicíny a farmakoterapie. Najpokročilejšou aplikáciou 3D tlače, ktorá sa očakáva, je biotlač zložitých ľudských orgánov na transplantácie, prípadne ich použitie na testovanie *in vivo* pri výskume no-

vých liečiv. Okrem zavedenia nových postupov do medicíny je pravdepodobné, že 3D technológia sa stane bežnou súčasťou vzdelávania lekárov a zdravotníckych pracovníkov.

Zoznam skratiek

3D	trojdimenzionálny
CT	počítačová tomografia
dECM	decelularizovaný extracelulárny matrix
FDA	Food and Drug Administration
FDM	fused deposition modeling
GelMa	metakrylát želatíny
MRI	magnetická rezonancia
PBP	powder bed printing
PCL	polykaprolaktón
PEG	polyetylén glykol
PEGX	polyetylén glykol s reaktívnou skupinou označenou X
PVP	polyvinylpyrrolidon
SLA	stereolithography
SLS	selective laser sintering
SSE	semi-solid extrusion
VEGF	vaskulárny endotelialný rastový faktor

LITERATÚRA

- Ventola C. L.: *J. Clin. Pharm. Ther.* 39, 704 (2014).
- Jakus A. E.: *3D Printing in Orthopaedic Surgery: An introduction to 3D Printing – Past, Present, and Future Promise*. Elsevier, St. Louis 2019.
- Ozolat I. T., Yu Y.: *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 60, 691 (2013).
- Higgins J. W. a 19 spoluautorov: *bioRxiv 2018*, 1.
- Leotta D. F., Starnes B. W.: *Eur. J. Vasc. Surg.* 61, 1637 (2015).
- Zopf D. A., Hollister S. J., Nelson M. E., Ohye R. G., Green G. E.: *N. Engl. J. Med.* 271, 2043 (2013).
- Wong K. C.: *Orthop. Res. Rev.* 8, 57 (2016).
- https://www.technickytydenik.cz/rubriky/medicinska-technika/3d-kovovy-tisk-pomaha-zlepsovat-lebecni-a-oblicejovou-chirurgii_42161.html, stiahnuté 21.7.2020.
- <https://www.aprecia.com/>, stiahnuté 21.7.2020.
- Yu D., Shen X., Branford-White C., Zhu L., White K., Yang X. L.: *J. Pharm. Pharmacol.* 61, 323 (2009).
- Haring A. P., Tong Y., Halper J., Johnson B. N.: *Adv. Healthcare Mater.* 7, 201800213 (2018).
- Elbl J., Muselík J., Franc A.: *Chem. Listy* 113, 301 (2019).
- Jakus A., Rutz A., Shah R.: *Biomed. Mater.* 11, 014102 (2016).
- Rohaľová S., Gajdziok J., Wolaschka T., Vetchý D.: *Chem. Listy* 115, 25 (2021).
- Gungor-Ozkerim P. S., Inci I., Zhang, Y. S., Khademhosseini A., Dokmeci M. R.: *Biomater. Sci.* 6, 915 (2018).
- Kaňka J. a 10 spoluautorov: *Chem. Listy* 113, 726

- (2019).
17. Cornelissen D. J., Faulkner-Jones A. Shu. W.: *Curr. Opin. Biomed. Eng.* 2, 76 (2017).
 18. Camacho P., Busari H., Seims K. B., Tolbert J. W., Chow L. W.: *J. 3D Print. Med.* 2019, 67.
 19. Koch L. a 10 spoluautorov: *Biotechnol. Bioeng.* 109, 1855 (2012).
 20. Neufurth M., Wang X., Schröder H. C., Feng Q., Diehl-Seifer B., Ziebart T., Steffen R., Wang S., Müller W. E. G.: *Biomaterials* 35, 8810 (2013).
 21. Duan B., Hockaday L. A., Kang K. H., Butcher J. T.: *J. Biomed. Mater. Res., Part A* 101, 1255 (2013).
 22. Cui X., Boland T.: *Biomaterials* 30, 6221 (2009).
 23. Nakamura M., Iwanaga S., Henmi C., Arai K., Nishiyama Y.: *Biofabrication* 2, 014110 (2010).
 24. Vepari C., Kaplan D. L.: *Prog. Polym. Sci.* 32, 991 (2007).
 25. Wang H. Y., Thang Y. Q.: *Biotechnol. Prog.* 31, 630 (2015).
 26. Schuurman W., Khristov V., Pot M. W., Weeren P. R., Dhert W. J., Malda J.: *Biofabrication* 3, 021001 (2011).
 27. Melchels F. P., Dhert, W. J., Hutmacher D. W., Malda J.: *J. Mater. Chem. B* 2, 2282 (2014).
 28. Park J. Y., Choi J., Shim J., Lee J., Park H., Kim S. W., Doh J., Cho D.: *Biofabrication* 6, 035004 (2014).
 29. Duan B., Kapetanovic E., Hockaday L. A., Butcher J. T.: *Acta Biomater.* 10, 1836 (2014).
 30. Ahmadi F., Oveisi Z., Samani S. M., Amoozgar Z.: *Res. Pharm. Sci.* 10, 1 (2015).
 31. Pati F., Jang J., Ha D., Kim S. W., Rhie J., Shim J., Kim D., Cho D.: *Nat. Commun.* 5, 1 (2014).
 32. Skardal A. a 10 spoluautorov: *Acta Biomater.* 25, 24 (2015).
 33. Poldervaart M. T., Gremmels H., Deventer K., Fledderus J. O., Cuijpers P., Verhaar M. C., Dhert W. J. A., Alblas J.: *J. Controlled Release* 184, 58 (2014).
 34. Zhu J.: *Biomaterials* 31, 4639 (2010).
 35. Rutz A. L., Hyland K. E., Jakus A. E., Burghardt W. R., Shah R. N.: *Adv. Mater.* 27, 1607 (2015).
 36. Ávila H. M., Schwarz S., Rotter N., Gatenholm P.: *Bioprinting* 1, 22 (2016).
 37. Cooper G. M., Miller E. D., DeCesare G. E., Usas A., Lense E. L., Bykowski M. R., Huard J., Weiss L. E., Losee J.: *Tissue Eng., Part A* 16, 1749 (2010).
 38. Skardal A., Zhang J., McCoard L., Oottamasathien S., Prestwich G. D.: *Adv. Mater.* 22, 4736 (2010).
 39. Manoor M. S., Jiang Z., James T., Kong Y. L., Malatesa K. A., Soboyejo W. O., Verma N., Gracias D. H., McAlpine M. C.: *Nano Lett.* 13, 2634 (2013).
 40. Roveri N., Iafisco M.: *Nanotechnol., Sci. Appl.* 3, 107 (2010).
 41. Goldman R.: *Adv. Skin Wound Care* 17, 24 (2004).
 42. Gruene M., Pflaum M., Deiwick A., Koch L., Schlie S., Unger C., Wilhelmi M., Haverich A., Chichkov B. N.: *Biofabrication* 3, 015005 (2011).

N. Janigová, J. Gajdziok, and D. Vetchý
(Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Masaryk University Brno): Biomedical Use of 3D Printing

3D printing technology has developed rapidly in the last decade. In addition to its common use in industrial field, 3D printing is gaining importance in medicine and pharmacy. This review provides information on the use of 3D printing in organ and tissue formation. It describes examples currently presented in this field of research, and the specific use of artificial tissues in clinical practice. The article also deals with the modelling of specific implants and prostheses tailored to the individual patient. Moreover, for complicated surgeries, 3D printing is used to create models which are used to practise and select the correct surgical procedure. The use of 3D printers in the production of medicines and specific drug delivery systems is also discussed. Due to the development of 3D bioprinting in tissue engineering, the second part of the article is devoted to a detailed overview of biocompatible materials and bioinks, accompanied by specific examples of their use.

Keywords: 3D printing, biomedical use, biocompatible materials, bioinks