

Гелевая трехмерная биопечать. Оборудование и примеры реализации

Денис Маймистов¹, Константин Гусев¹, Лаврентий Данилов²

¹Лаборатория аддитивных технологий Санкт-Петербургского химико-фармацевтического университета (СПХФУ) Минздрава РФ

²Кафедра генетики и биотехнологий СПХФУ Минздрава РФ



Введение

В современном мире лекарственные препараты на растительной основе вновь становятся очень популярными. Раньше в качестве источника сырья для их производства выступали целые растения. Однако это экономически невыгодное решение, так как получение активных веществ из целых растений является трудоемким и малопродуктивным процессом. Оптимальным методом получения веществ стала разработка систем для культивирования клеток растений. Эта технология ста-

ла популярной и эффективной, и примерно с 80-х годов прошлого века применяют одну из лучших ее модификаций – культивирование иммобилизованных клеток. Поскольку иммобилизация является довольно трудоемким процессом, сейчас проводятся исследования по использованию 3D-принтеров для биопечати в качестве одного из вариантов иммобилизации растительных клеток (1).

В настоящее время методы биопечати широко распространены в отношении клеток животных

Авторы



Денис Маймистов,
лаборатория аддитивных технологий Санкт-Петербургского химико-фармацевтического университета (СПХФУ) Минздрава РФ



Константин Гусев,
лаборатория аддитивных технологий Санкт-Петербургского химико-фармацевтического университета (СПХФУ) Минздрава РФ



Лаврентий Данилов,
кафедра генетики и биотехнологий СПХФУ Минздрава РФ

и почти не применяются к клеткам растений. Возможности биопечати позволяют создать сложную трехмерную структуру из клеток и каналов, что, в свою очередь, может обеспечить более эффективную доставку кислорода и питательных веществ к каждой клетке. Это преимущество активно используют при культивировании клеток животных. Создание сложного каркаса с последующим нанесением таких клеток в определенные места позволяет получить копию их расположения в организме. Это особенно важно при проведении различных экспериментов, особенно по проверке эффективности доставки препарата к раковым опухолям внутри ткани, и изучении свойств кожи (2, 3). В растительных клетках создание определенной структуры позволяет увеличить выход различных вторичных клеточных метаболитов, таких как фенолы, алкалоиды, фитостероиды и др., а также обеспечить отток токсичных продуктов жизнедеятельности. Именно поэтому изучение процесса биопечати для иммобилизованных растительных клеток представляет большой интерес. На сегодня достаточно много растений введено в культуру *in vitro*. В основном ученые фокусировали свое внимание на изучении растений, которые полезны для человека, а именно на сельскохозяйственных культурах и некоторых лекарственных растениях. Для получения иммобилизованной культуры клеток чаще всего применяют метод микроклональ-

ного размножения растений, который хорошо подходит для достижения результатов в научной области. Однако в промышленности используют другие методы получения и культивирования клеток, а именно на плотной среде, методы поверхностного культивирования, а также культивирование в форме суспензий, метод глубинного культивирования. С помощью всех вышеперечисленных методов в сочетании с 3D-биопечатью и генной инженерией можно получить клетки растений с повышенным уровнем продукции необходимых веществ для использования в фармацевтической отрасли (4).

Оборудование и материалы **Асептический** **разбрызгивающий клапан** **784S-SS**

Асептический клапан микрораспыления 784S-SS, оснащенный в соответствии с требованиями FDA смачиваемыми деталями, обеспечивает плавный и равномерный поток жидкости, что делает его идеальным для тех областей применения, где требуется стерильность.

Используя технологию малого объема при низком давлении (LVLP), клапан 784S-SS создает однородные факелы распыления диаметром от 3,3 до 19,1 мм. Он позволяет точно контролировать нанесение большинства жидкостей средней и высокой вязкости. Для создания более крупного факела на клапан 784S-SS-F может быть установлена насадка с подачей воздуха от вентилятора.

Инновационность конструкции клапана заключается в использовании одноразового наконечника (иглы) и специальной центрирующей насадки, направляющей поток воздуха, которые позволяют работать с малыми объемами жидкости при низких показателях рабочего давления и тем самым формировать небольшие факелы распыла (5).

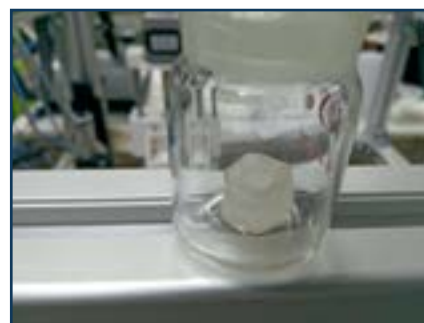
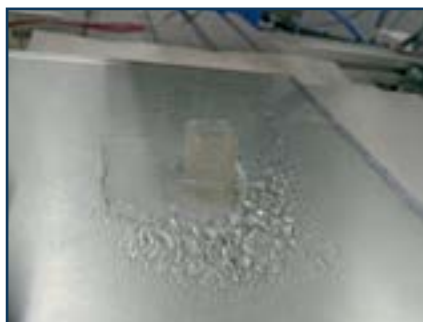
Асептический клапан 754V

Особенностью асептического дозирующего мембранного клапана 754V производства компании Nordson EFD является сплошная подача жидкости без участков завихрений. Такие условия способствуют ускорению цикла дозирования и увеличению скорости работы оборудования. Кроме того, рабочая камера клапана с электрохимической полировкой повышает долговечность и устойчивость к воздействию коррозии.

Объем дозирования находится в диапазоне от 0,5 мкл / с до непрерывного расхода 14 мл / с. Клапан полностью закрывается начисто в конце каждого цикла с быстрой отсечкой, что препятствует проникновению паразитных капель. Клапан не содержит внутренней резьбы, что упрощает процесс его очистки (6).

Использованные клапаны являются хорошим решением для работы в асептических условиях. Все смачиваемые детали изготовлены из нержавеющей стали марки 316L или фторопласта, позволяя проводить CIP (очистка на месте) и SIP (стерилизация на месте), что является актуальным для ис-





пользования на производствах, организованных в соответствии с требованиями Надлежащей производственной практики (GMP). Наиболее важными характеристиками данных клапанов, которые выделяют их среди других, являются простота стерилизации, а также соответствие всех смачиваемых деталей требованиям FDA. Более того, конструкция позволяет производить минимальное техническое обслуживание при достаточно широком спектре совместимых жидкостей. К таковым можно отнести различные растворы солей и полимеров, большинство органических растворителей, а также силиконовые масла и различные покрытия стентов.

Универсальная платформа с числовым программным управлением

Клапаны и дозирующую шприцевую систему размещали и приводили в движение с помощью платформы с числовым программным управлением (ЧПУ), которая была собрана в лаборатории для экспериментальной работы. Максимальный рабочий объем установки составил 650 x 410 x 200 мм. При установке раз-

личных манипуляторов объем уменьшают (в нашем случае рабочая площадь для печати составила 200 x 200 x 100 мм).

Установка представляет собой универсальный трехосевой станок с ЧПУ, на котором размещают различные инструменты. Возможна установка дополнительных четвертой и пятой осей. В использованной конфигурации четвертой осью была дозирующая шприцевая головка, которая отвечает за послойное нанесение вещества.

Дозирующая шприцевая головка является сменным узлом, управляется как четвертая ось установки. Он состоит из поршня, который перемещается с помощью пары винт – гайка. Этот поршень толкает шток шприца, установленного в основании узла. В процессе вращения шагового мотора поршень шприца смещается, в результате чего из внутреннего объема выдавливается точное количество геля или жидкости. Во время работы установки перемещение поршня и горизонтальных осей синхронизируется таким образом, чтобы нанести тонкий слой согласно траектории, заданной программой.

Подключение и управление

Установка управляется с помощью стандартных команд языка G-code, что позволяет достаточно гибко манипулировать и комбинировать различные инструменты. Для подбора параметров и тестирования технологии на языке Python 3 был написан генератор управляющей программы, позволяющий изменять большинство параметров, которые влияют на процесс печати. Управление, то есть передачу команд на платформу, осуществляли с компьютера. На устройство через последовательное соединение передавали управляющие команды с помощью программы Repetier Host (Kinetic Gear, LLC).

Результаты

Для апробации технологии была выбрана реакция осаждения натрия альгината из раствора с помощью кальция хлорида. Эта реакция является стандартной и ее достаточно успешно используют в клеточных технологиях для получения сфер, содержащих живые клетки. Обычно для получения сфер применяют 2 – 10 % раствор кальция хлорида, в который с помощью шприца с тонкой

иглой вводят раствор натрия альгината, содержащий клетки. При соприкосновении двух растворов образуются сферы из натрия альгината, покрытые слоем кальция альгината, при этом в зависимости от времени нахождения в растворе кальция хлорида можно получить сферы с различной степенью прохождения реакции и соответственно с разной прочностью.

В нашем эксперименте эту реакцию использовали для формирования трехмерных структур. Для отверждения раствор кальция хлорида распыляли на поверхность каждого вновь нанесенного слоя с помощью распылительного клапана.

В качестве объекта печати был выбран прямоугольник с нулевым заполнением. То есть формировалась структура, состоящая из четырех стенок, без основания и крышки, в результате печати получался канал с различной толщиной стенки.

Объекты печатали разных размеров, от 5 мм x 5 мм x 10 мм до 20 мм x 20 мм x 10 мм (Ш x Д x В), толщина стенки составила от 0,5 до 2 мм. В зависимости от толщины стенки менялась прочность объекта.

Печать гелем с отверждением жидким раствором

Печать

Процесс формирования объекта проходил с соблюдением технологии послойного нанесения, из названия которой следует, что объект воссоздавали послойно. Каждый слой представляет собой траекторию движения иглы, из которой выдавливается точное количество вещества и наносится или на подложку (первый слой), или на предыдущий слой. В нашем исследовании траекторией был квадрат с различной длиной стороны. Сначала игла двигалась в одну сторону, затем обратно и наносила два слоя, шприцевая головка отъезжала в сторону и нанесенные слои обрабатывались из распылительного клапа-



на кальция хлоридом для отверждения. После этого установка выдерживала паузу длительностью 10 с и продолжала печать. В результате повторения данных действий формировался объект.

Параметры, влияющие на процесс

- **Скорость печати.** От этого параметра зависит качество печати и сама возможность завершения процесса, так как

при слишком высокой скорости печати материал, нанесенный на рабочую поверхность, не успеет достаточно затвердеть, чтобы выдержать следующий слой, в результате весь объект будет стекать на подложку. Толщину слоя выбирают в зависимости от потребностей, диапазон рекомендуемой толщины составляет от 0,1 до 0,5 мм. Определяют ширину линии экструзии, задаваемую ге-

нератором задания, и уже исходя из этого параметра, а также учитывая толщину слоя и коэффициенты, рассчитывают объем материала, который будет выдавлен из шприца.

- **Время распыления отвердителя** выбирают и уточняют для конкретного случая. Данный параметр зависит от показателей пневматической системы, габаритов печатаемого объекта и скорости печати.

- **Высота и геометрия объекта.** Эти параметры определяют, что именно будет печататься установка, на данном этапе задана только одна структура (полый прямоугольник).

Кроме того, в программе заданы параметры установки, на которой происходит печать, такие как начальные координаты печати, диаметр иглы, расстояние между клапаном и печатающей головкой, диаметр шприца и коэффициент коррекции экструзии.

Пленки

С помощью этого оборудования можно получать пленки из различных материалов. В качестве лекарственной формы для приема внутрь пленки представляют большой интерес ввиду их быстрой распадаемости, высокой степени высвобождения и биодоступности лекарственных веществ. Представленная технология (послойное нанесение геля) позволяет формировать пленки из различных материалов разной толщины и размеров. При этом в отличие от классической технологии выливания или нанесения фильерой пленки наносятся с помощью иглы с высокой точностью, благодаря чему можно добиться высокоточной повторяемости толщины пленок. Кроме того, такая технология позволяет формировать пленки различной формы для создания индивидуальных вариантов лечения различных раневых покрытий.

При комбинировании головки послойного нанесения с распы-

лительным клапаном появляется возможность формировать многослойные пленки с нанесением действующего вещества между слоями. Это позволит создавать более сложные лекарственные формы с модифицированным высвобождением, либо слой носителя будет защищать действующее вещество от внешних воздействий, таких как кислород или влага, содержащихся в воздухе.

Обсуждение и заключение

В данной работе нами была апробирована технология послойной 3D-печати с затвердевающей матрицей. Также были проанализированы технические возможности и характеристики асептических клапанов производства компании Nordson, которые подтвердили свое высокое качество и удобство для работы с жидкостями в процессе нанесения печати. Данное оборудование легко объединять в функциональные системы как с другим оборудованием производства компании Nordson, так и с уникальными производными и лабораторными установками. Также клапаны совместимы с большинством биологических жидкостей и легко подвергаются стерилизации для достижения асептических условий. Это открывает широкий спектр возможностей для создания индивидуальных платформ, которые смогут предоставить большой набор опций – от точной дозировки лекарств и производства индивидуальных препаратов до создания трехмерных структур из клеточных культур для последующего получения искусственных органов (например, в целях тестирования лекарств).

Получение биоактивных веществ из растений представляет собой одно из основных направлений фармацевтической промышленности. Благодаря созданию особых биопленок и трехмерных структур, в которые помещают иммобилизованные клетки растений, можно упро-

стить процесс их культивирования. К примеру, кальция альгинат плохо усваивается растительными клетками, но для ускорения их метаболизма можно использовать комбинированные варианты, подразумевающие, что био-пленка, в которую заключены клетки, состоит не только из кальция альгината, но и также содержит такие питательные вещества для клеток, как глюкоза, аминокислоты и витамины. Также в состав био-пленки можно включать различные антиоксиданты и антибиотики для предотвращения преждевременного старения клеток и инфицирования их различными бактериями.

Технология, рассмотренная в данной статье, поможет в развитии фармацевтической промышленности и некоторых направлений персонализированной медицины.

Список использованной литературы можно получить у авторов статьи. □



Контактная информация:

Обратитесь в офисы продаж и технической поддержки компании Nordson EFD, расположенные более чем в 40 странах мира, или посетите наш сайт www.nordsonefd.com/ru

ООО «Нордсон РУС»

Россия, 117545, г. Москва
ул. Дорожная, д. 8, корп. 1
+7 (499) 519-319-0;
russia@nordsonefd.com

Европа

Данстэйбл, Бедфордшир,
Великобритания
0800 585733;
+44 (0) 1582 666334
europa@nordsonefd.com

Главный офис:

+1-401-431-7000;
info@nordsonefd.com

