



Příprava 3D tisknutého konstruktů na PCL, kolagenových nanovlákních a decelularizovaného nosiče

Ing. Roman Matějka, Ing. Jana Štěpanovská

Mezi dostupnými technologiemi v tkáňovém inženýrství v posledních deseti letech rychle roste bioprinting. Tento způsob zahrnuje tisk biomateriálů pomocí trojrozměrné tiskárny, avšak místo materiálu jako je termoplast nebo pryskyřice se používá speciální bio-inkoust. Tento bioinkoust je především na bázi přírodních hydrogelů vytvářející vhodné podmínky pro buněčného růst a může přímo v sobě inkorporovat živé buňky. Díky tomu je možné vytvářet homogenně osazené lešení s integrací buněk v celém objemu. Oproti jiným metodám přípravy lešení (odlívání hydrogelu do formy) také umožňuje kontrolovanější přístup k modifikaci tvaru, vlastností povrchu, kombinací povrchu apod.

Důležitým prvkem je nosný substrát na který je tisk realizován. Z aplikačního hlediska jsou vhodné tenké filmové nebo membránové konstrukty, jež zajistí dostatečnou pevnost, umožní iniciální adhezi tisknutého materiálu a zároveň budou biokompatibilní. V tomto přípravě bude tento substrát tvořen nanovláknennou membránou tvořenou PCL a kolagenovými nanovláknem. PCL zajistí vhodnou pevnost a kolagen zase napomůže integraci podložky s tisknutým materiálem.

Přístroje

- Laminární box
- 3D biotiskárna
- Systém na přípravu nanovláken pomocí elektrostatického zvlákňování
- Invertovaný fluorescenční mikroskop

Další pomůcky

- Sterilní nástroje pro manipulaci s buněčnou kulturou a nosiči
- Kultivační média, PBS, Trypsin a EDTA
- Roztok prasečího kolagenu pro vlákňení
- Roztok PCL polymeru pro vlákňení
- Bioinkoust – cellink bioink
- Buněčnou kulturu PrASC – prasečí kmenové buňky z tukové tkáně
- Roztoky pro fluorescenční barvení – blokovací, permeabilizační, ředící na Phalloidin a DAPI

Před zahájením přípravy umístěte 3D biotiskárnu do laminárního boxu a vysterilizujte box pomocí germicidní lampy.

Příprava plošného kompozitního nanovláknenného nosiče pomocí bezjehlového emitoru

1. Připravte polymery do 5 ml stříkaček – každý polymer zvlášť stříkačka
2. Připravte systém pro vlákňení – základní nastavení
 - a. Připravte dvoukanalový emitor pro bezjehlové zvlákňení
 - b. Připravte kolektor typu plošná deska a umístěte na jeho povrch vrstvu sterilního alobalu nebo netkanné textilie, event. sterilní gázy
 - c. Do dávkovače vložte adaptér pro použití dvou stříkaček
 - d. Propojte obě stříkačky s emitorem

Biomedicínské inženýrství pro znalostní ekonomiku,

CZ.02.2.69/0.0/0.0/16_018/0002242

Modernizace laboratoří pro biomedicínské inženýrství,

CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_017/0002244



EVROPSKÁ UNIE
Evropské strukturální a investiční fondy
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání



Příprava 3D tisknutého konstruktů na PCL, kolagenových nanovlákních a decelularizovaného nosiče

Ing. Roman Matějka, Ing. Jana Štěpanovská

- e. Vložte kolektor i emitör do depoziční komor, uchyťte stříkačky v dávkovači
 - f. Odvzdušněte emitör a dávkovač, je nutné aby byly dávkovány oba roztoky ve stejném poměru
3. Nastavte depoziční parametry
 - a. Depoziční vzdálenost 15 cm
 - b. Nastavte základní napětí 40 kV
 - c. Dávkovaný objem nastavte na 120 ul/min
 - d. V komoře nastavte proudění vzduchu na 35 l/min, teplota 35 °C
 4. Spustíte vlákní proces
 - a. Postupně zvyšujte depoziční napětí dokud nedojde ke vzniku vlákní trysek z obou polymeru, cca. 45 – 60 kV dle stupně rozvolnění polymeru
 - b. Kontrolujte zda dochází k vláknění z obou roztoků
 - c. V případě, že dochází k rychlému zvláknění kapky na jehle, zvýšte dávkovaný objem na ca. 120-140 ul, v případě že dochází k hromadění polymeru tak snižte dávkovací objem na ca. 80 – 90 ul
 5. Deponujte po dobu 15 minut
 6. Po ukončení depozice vyjměte kolektor s připravenými vlákny, pomocí skalpelu tyto vlákna odřízněte rozdělte na čtverce 30 x 30 mm a nechte po dobu 30 min sterilizovat pod UV zářením v laminárním boxu. **OD TOHOTO BODU SE PRACUJE STERILNĚ!!!** Připravené čtverce uchyťte do sterilních držáků pro následný 3D tisk.

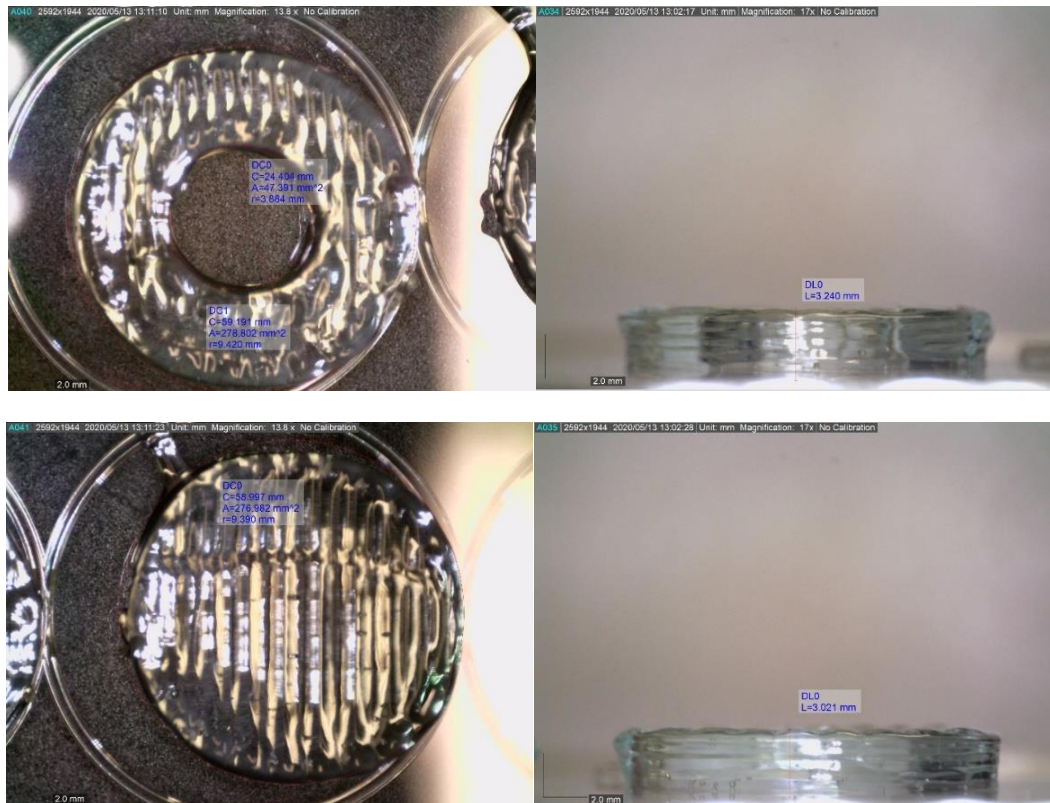
Příprava 3D tisknutého gelu na nanovlákněný nosič

1. Připravte 3D biotiskárnu
 - Spustíte SW HeartWare
 - Vložte prázdnou kartuši s jehlou
 - Proveďte vynulování tiskárny – pozor musí být vložena kartuše
 - Proveďte kalibraci Z osy na testovacím modelu
2. Připravte buněčnou kulturu
 - Oplach PBS, T+E, kultivace
 - Centrifugace 300g 5 min
 - Rozsuspendování na 10 mil.b. / ml
3. Připravte Cellink-Bioink dle přiloženého návodu a rozmíchejte s buněčnou kulturou
4. V cellink HearWare načtete model Circle and Annuloid, použijte šablonu Simple shape Bioink a nastavte tlak na 25 kPa
5. Do tiskárny vložte připravený nanovlákněný nosič vytiskněte model
 - 1 tisk při 25 kPa
 - 2 tisk při 18 kPa
 - 3 tisk při 35 kPa
6. Srovnejte tvarovou stabilitu

Příprava 3D tisknutého konstruktů na PCL, kolagenových nanovlákních a decelularizovaného nosiče

Ing. Roman Matějka, Ing. Jana Štěpanovská

- Umístěte do 2 kultivačních 6j desek – polovina vzorků bude kultivovaná staticky a druhá polovina dynamicky, přilijte kultivační médium



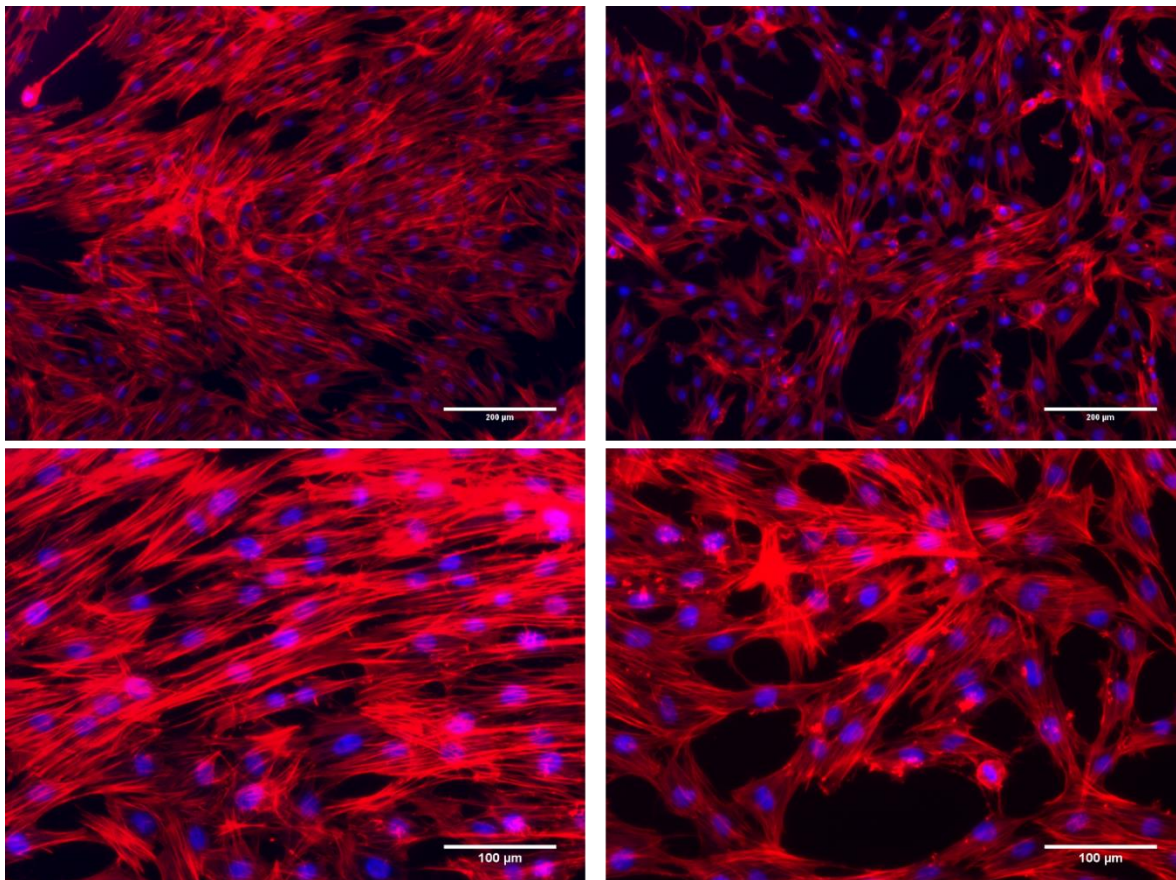
Obrázek 1 - optimální tvary tisknutých substrátů

Analýza nosičů

- Kultivujte po dobu 3 dnů
- Poté vzorky zafixujte pomocí 4% PFA a propláchněte PBS s azidem
- Permeabilizujte pomocí připraveného roztoku 15 min
- Zablokujte nespecifické proteiny pomocí blokačního roztoku 60 min
- Připravte 2 ml roztoku Phalloidinu (1:50) a DAPI (1:500)
- Odsajte blokovací roztok a připravený roztok Ph. a DAPI přilijte ke vzorkům, inkubujte 60 min
- Důkladně propláchněte
- Připravte mikroskopické snímky vzorků – fluorescence, kombi filtr, obj. 10x nebo 20x

Příprava 3D tisknutého konstruktů na PCL, kolagenových nanovlákních a decelularizovaného nosiče

Ing. Roman Matějka, Ing. Jana Štěpanovská



Obrázek 2 - srovnání dynamické (vlevo) a statické (vpravo) kultivace u vytištěných nosičů. Barvení F-actin (červená) a jádra (modrá).

Příprava decelularizovaných nosičů

Přístroje

- Horkovzdušný sterilizátor
- Laminární box
- Systém na přípravu ultračisté vody
- Analytické váhy
- Invertovaný fluorescenční mikroskop

Další pomůcky

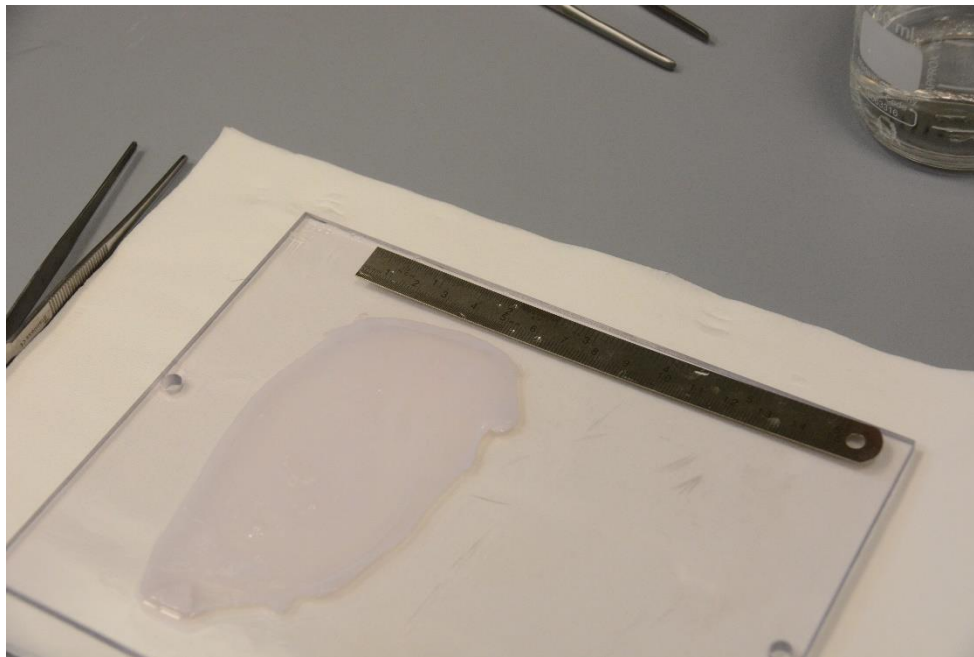
- Sterilní nástroje pro manipulaci
- Chirurgické šití
- Roztok deoxycholátu sodného
- DNAzu I
- dH₂O

Příprava 3D tisknutého konstruktů na PCL, kolagenových nanovlákních a decelularizovaného nosiče

Ing. Roman Matějka, Ing. Jana Štěpanovská

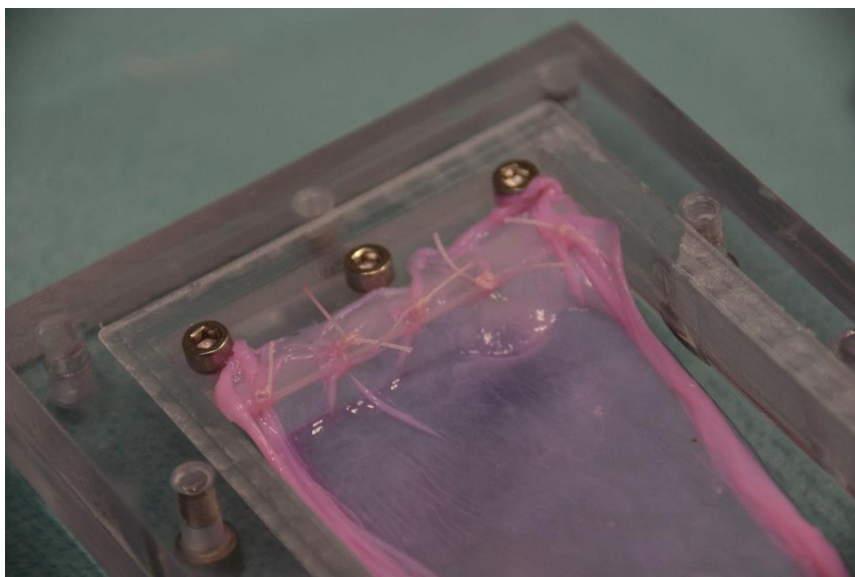
Příprava tkáně pro decelularizaci

- 1) Opláchnutí tkáně od zamrazovacího média pomocí PBS
- 2) Oříznutí tkáně do požadovaných rozměrů, max. 100x150 mm.
- 3) Mechanické očištění tkáně – pro zajištění optimální decelularizace je nutné z tkáně odstranit velké tukové tělesa, hemoragické části event. jiné nehomogenity, zároveň je nutná kontrola tkáně z hlediska perforací.



Obrázek 3 - perikardiální tkáň po mechanickém očištění připravená pro uchycení do decelularizační komory.

- 4) Uchycení tkáně do decelularizační komory, fixace chirurgickým hedvábím (nevstřebatelné, vel 4-0 – 2-0) na silikonový držák v decelularizační komoře, celkem 5 bodů pro fixaci, pro minimalizaci rizika odtržení je vhodné nechat lem 3 – 5 mm.

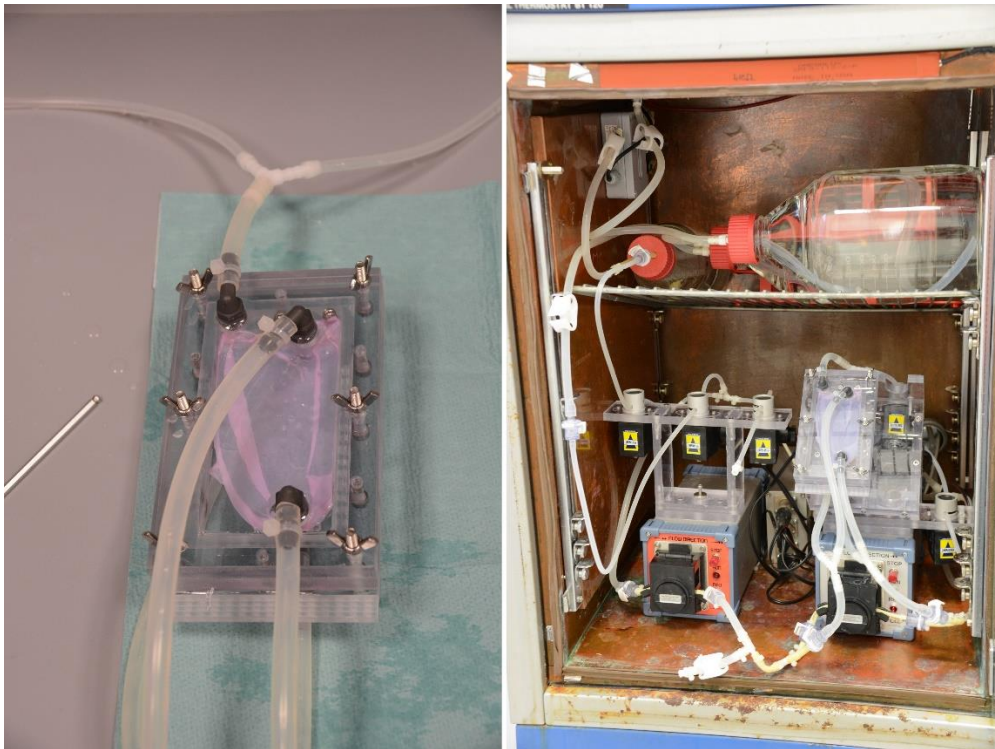


Obrázek 4 - fixace tkáně v decelularizační komoře na silikonový držák.

Příprava 3D tisknutého konstruktů na PCL, kolagenových nanovláčkách a decelularizovaného nosiče

Ing. Roman Matějka, Ing. Jana Štěpanovská

- 5) Příprava roztoků do decelularizačního systému: 600 ml 4% deoxycholátu sodného, 4 000 ml deionizované vody, 60 ml roztoku DNAzy (2 mg na 54 ml pufru).
- 6) Instalace do decelularizačního systému.



Obrázek 5 – A-sestavená komora pro decelularizaci, B-systém pro automatizovanou decelularizaci s instalovanou komorou.

Decelularizační postup

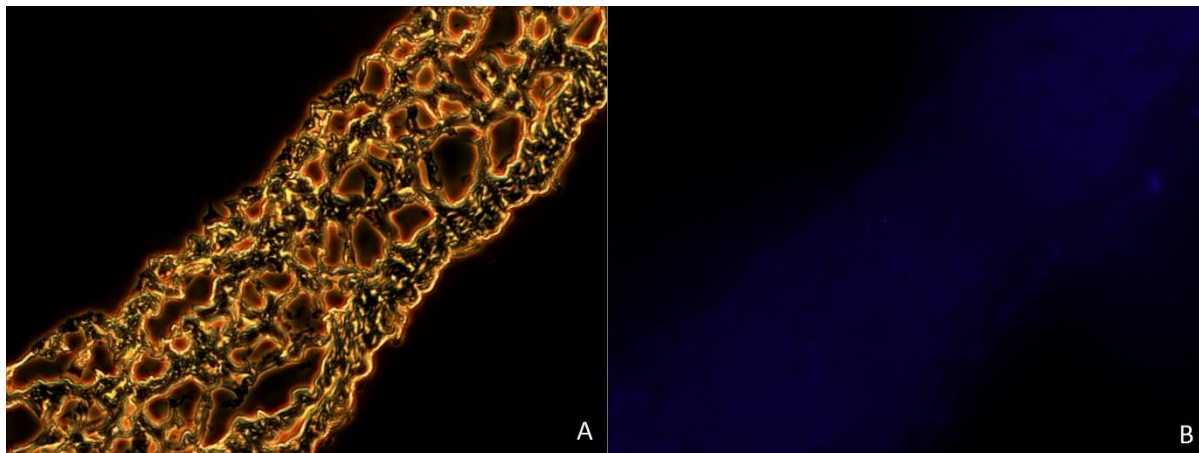
Pro docílení optimální decelularizace a proplachu probíhá při tomto postupu několikanásobná výměna jednotlivých činidel a poplachové vody. Celý tento postup je automatizovaný v decelularizačním systému. Postup vyžaduje vnější zásah pouze v okamžiku vpravení DNAzy. Celý postup probíhá při teplotě 37 °C.

- 1) Decelularizace tkáně 4% deoxycholátem sodným, celková doba 120 min, 8x výměna objemu komor po 15 min.
- 2) Proplach deionizovanou vodou, celková doba 15 min, 3x výměna objemu komory po 5 min.
- 3) Decelularizace DNAzou, 2 mg rozpuštěné v 54 ml pufru (10mM Tris-HCl, 2,5mM MgCl₂, 0,5mM CaCl₂, pH 7.6 při 25°C), celková doba 60 min bez výměny.
- 4) Finální proplach tkáně deionizovanou vodou, celková doba 60 hodin, 60x výměna objemu komory po 60 min.

Mikroskopická verifikace postupu decelularizace na tenkých vzorcích (nařezání na mikrotomu s kryostatem) a následné barvení pomocí Hematoxilinu-Eosinu a Hoechstu. Na vzorcích nesmí být patrné zbytky jader původních buněk.

Příprava 3D tisknutého konstruktů na PCL, kolagenových nanovláčkách a decelularizovaného nosiče

Ing. Roman Matějka, Ing. Jana Štěpanovská



Obrázek 6 - decelularizovaná tkáň, A-barvení pomocí Hematoxilinu-Eosinu, B-barvení Hoechstem

Sterilizace tkáně

- 1) Vyjmutí tkáně z držáku v decelularizační komoře, odstranění fixačního hedvábí
- 2) Sterilizace v 70% etanolu (P.A. kvalita) po dobu 60 minut
- 3) Sterilní oplach tkáně pomocí PBS v laminárním boxu
- 4) Uchování decelularizované tkáně ve sterilním PBS