

MedTrends –Europejskie Forum Nowoczesnej Ochrony Zdrowia

Zabrze, 18-19 marca 2016

Prof. dr hab. med. Zygmunt Pojda

NOWE ASPEKTY WYKORZYSTANIA DRUKU 3D W MEDYCYNIE REGENERACYJNEJ



MEDYCYNĄ REGENERACYJNĄ – cykl działań terapeutycznych zmierzających do odtworzenia struktury i/lub funkcji uszkodzonych elementów strukturalnych organizmu:

- komórki
- tkanki
- narządy

WYKORZYSTANE METODY

- stymulowanie lokalnej naprawy uszkodzenia (indukowane "gojenie" skuteczniejsze, niż miałyby miejsce bez ingerencji terapeuty);
- przeszczepianie elementów podporowych dla regenerującej tkanki (scaffoldy);
- przeszczepianie żywych komórek lub tkanek

DLACZEGO NIE WYSTARCZY TRANSPLANTOLOGIA?

- niedostateczna podaż tkanek i narządów
- niedopasowanie w zakresie zgodności tkankowej
- niedopasowanie w zakresie wymiarów i kształtów (np przeszczepy kostne)

WYTWARZANIE TRÓJWYMIAROWYCH STRUKTUR NA POTRZEBY MEDYCYNY REGENERACYJNEJ:

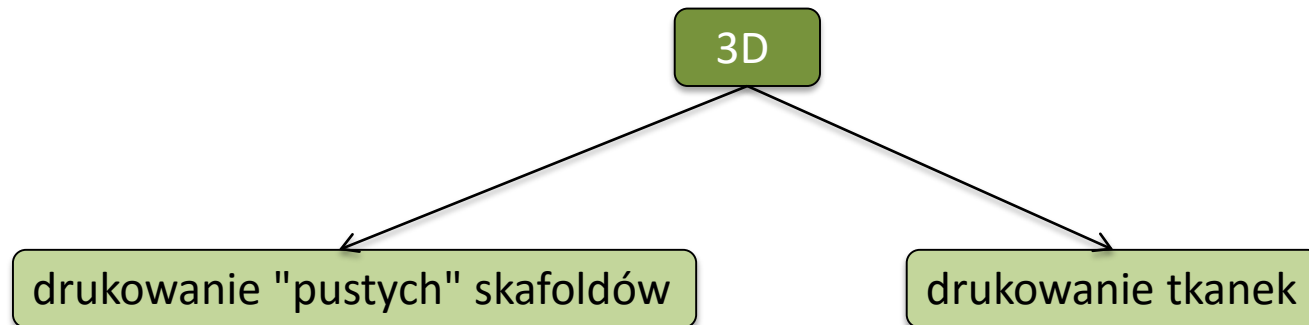
a) Metody "klasyczne":

- wypłukiwanie soli
- wytapianie porogenów
- spienianie gazami

b) Metody "additive manufacturing" (AM)

- stereolitografia (lata 80-te XX wieku)

- **drukowanie 3D**



Konstrukcja trójwymiarowych struktur (tzw. skafoldów) tworzących mechaniczną podporę dla komórek regenerowanego narządu

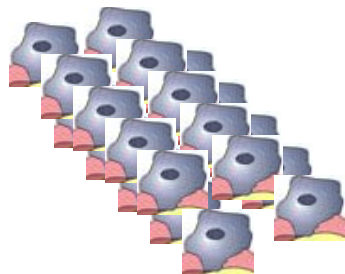
Skafoldy są zasiedlane komórkami w hodowli in vitro lub komórkami migrującymi do ich wnętrza po wszczepieniu do tkanek biorcy



Cell Isolation



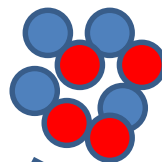
Cells growth



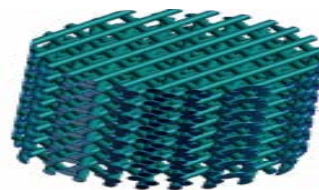
Navigation System



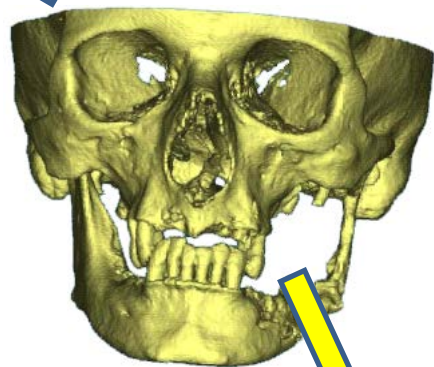
Growth factors



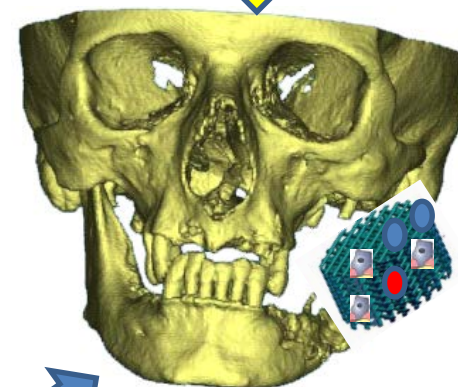
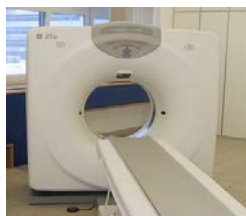
Custom-made Scaffold



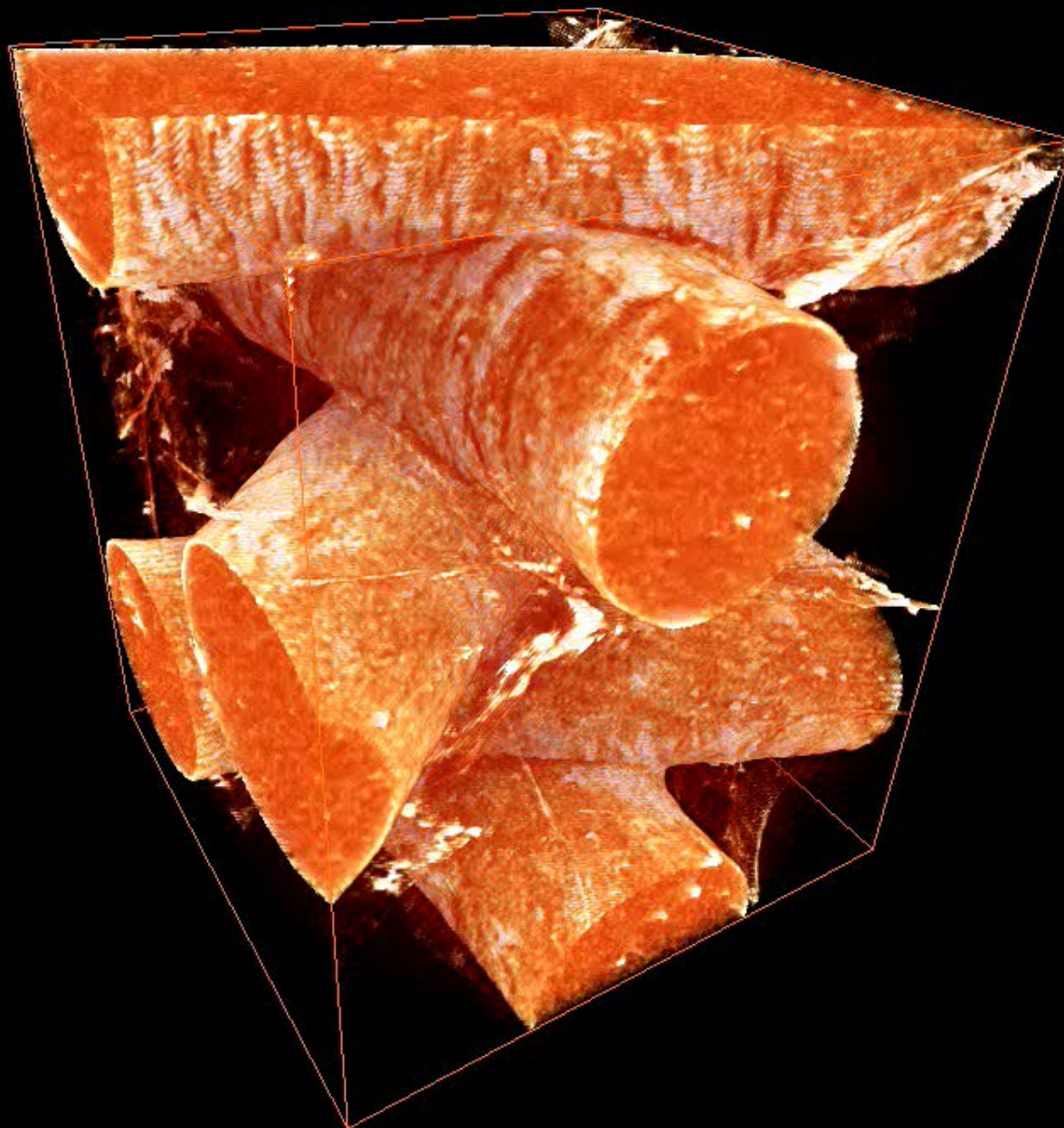
Patient

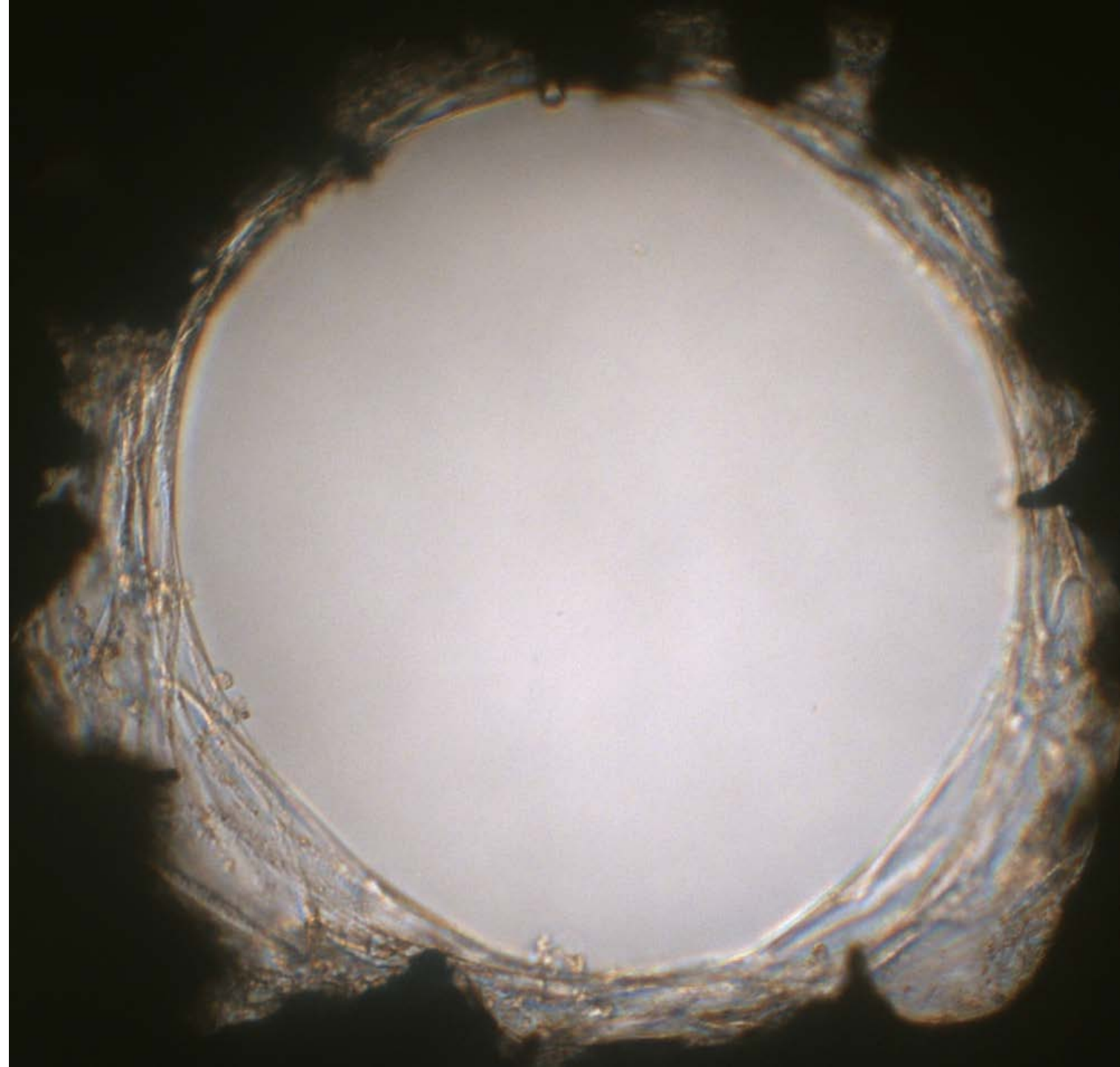


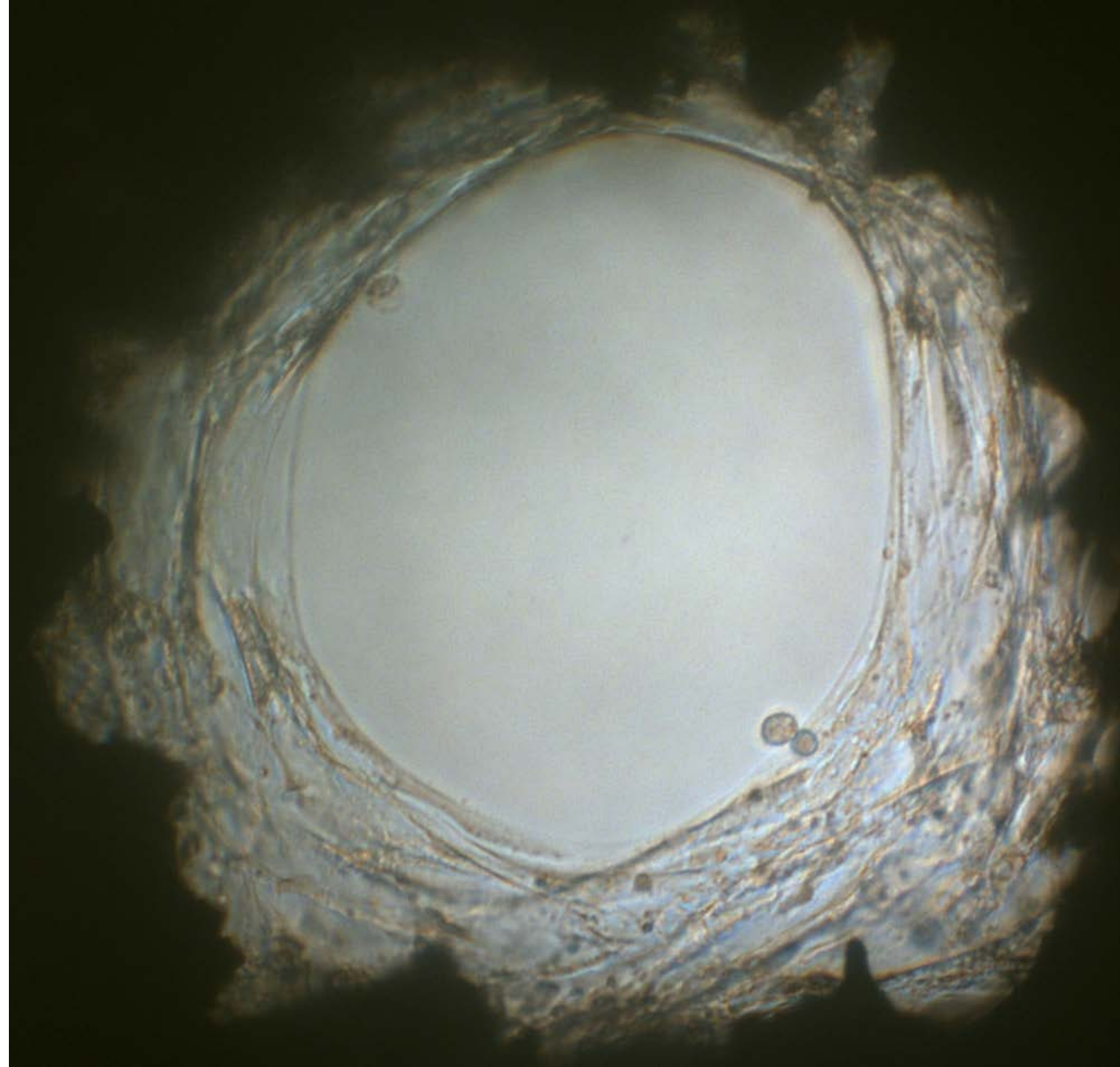
**CT+
Computer
System**

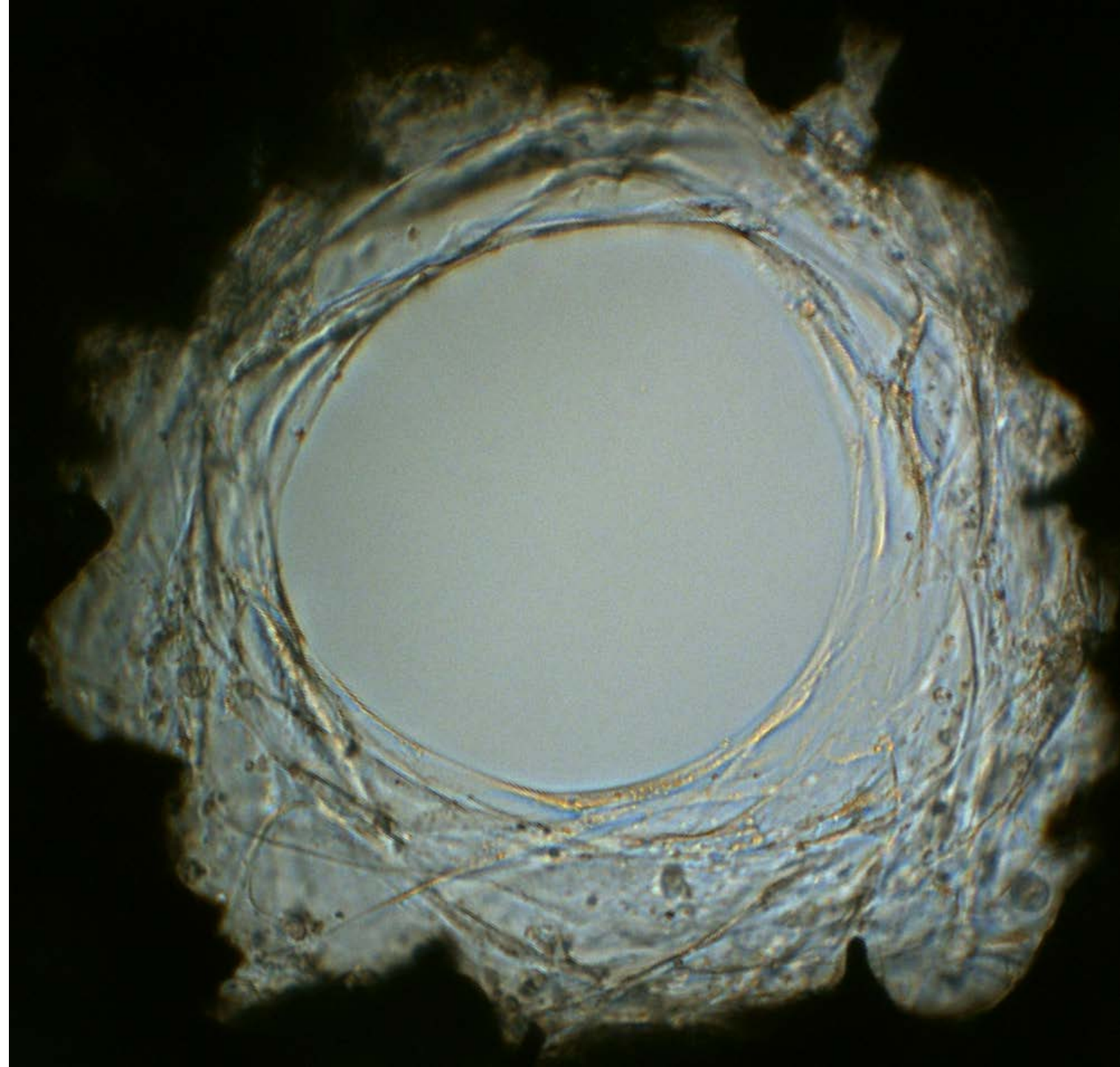


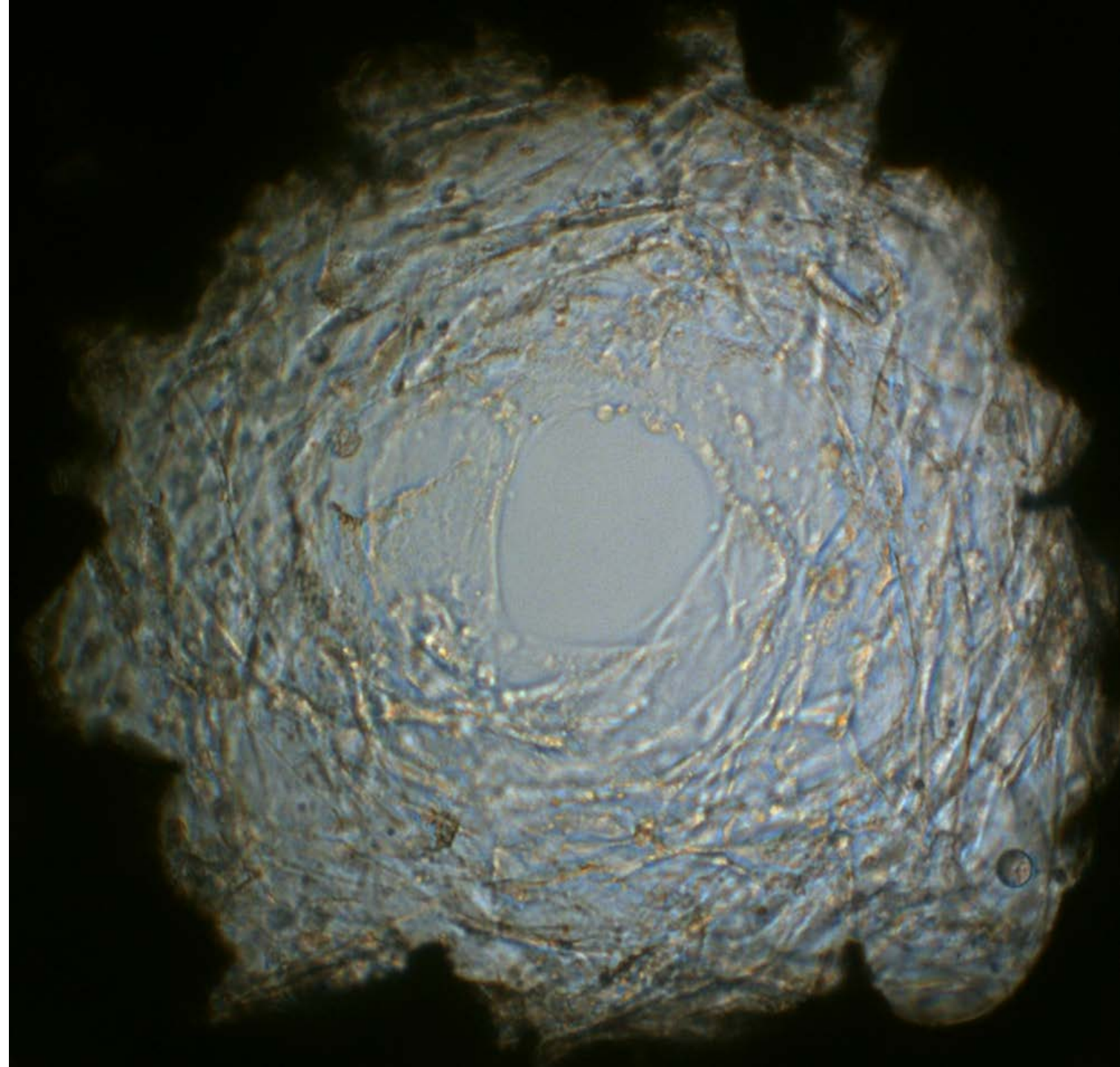
**Patient
with BIOIMPLANT**

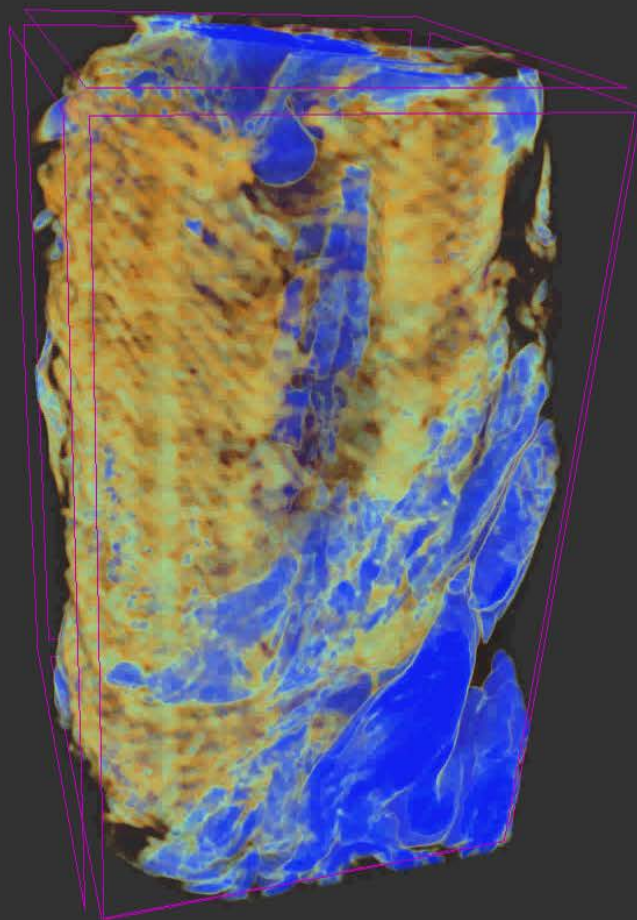














**„Drukowanie 3D” żywymi komórkami lub mieszaniną
komórek i elementów podporowych celem
wytworzenia kompletnej struktury odtwarzanego
narządu**

OGRANICZENIA METOD AM W ZASTOSOWANIU DO KONSTRUKCJI ŻYWYCH TKANEK

- temperatury $>39^{\circ}\text{C}$
- kwasy lub alkalia
- toksyny
- naprężenia mechaniczne, gradient ciśnień
- UV, promieniowanie jonizujące, promieniowanie mikrofalowe
- laser dużej mocy

WYMOGI W ZAKRESIE KOMPONENTY KOMÓRKOWEJ

- zapewnienie żywotności komórek (czas, czynniki odżywcze i wzrostowe, mikrośrodowisko)
- umożliwienie proliferacji i różnicowania komórek w produkcji
- kompatybilność biomateriału i urządzenia modelującego ("drukarki")
- integralność i stabilność produktu końcowego
- biogodność produktu z organizmem biorcy

ZASADY DZIAŁANIA DRUKAREK 3D

a) drukarki typu ink-jet

- rozproszenie "atramentu biologicznego w postaci kropeł zawierających jedną lub kilka – kilkanaście komórek
- linearny wypływ strumienia z dyszy prostopadle do "biopapieru" tzn. podłoża, na którym drukowana jest struktura trójwymiarowa

b) drukowanie metodą bezpośredniego nanoszenia bioatramentu na podłoże (direct – write)

Cechy wspólne dla (a) i (b):

- bioatrament złożony z płynnego lub półpłynnego nośnika komórek utwardzającego się po naniesieniu na podłoże (hydrożele, jak alginiany, żelatyna, chitosan)
- komórki bezpośrednio w zawiesinie lub upakowane uprzednio w podjednostki typu mikrokapsuł lub bloków chroniących je przed uszkodzeniami podczas druku

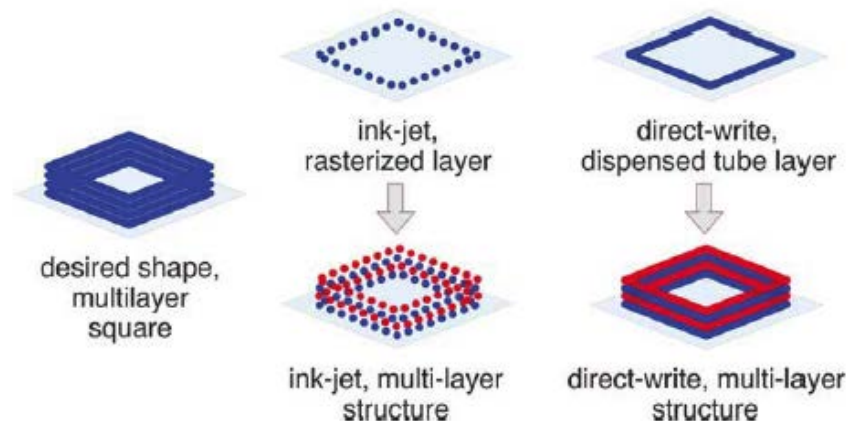
c) drukowanie wspomagane laserem (Laser-Assisted Cell Printing, LACP)

- komórki umocowane (żel) pod warstwą absorbującą światło lasera, podwieszone pod płytką szklaną
- aktywacja światłem lasera odparowuje warstwę absorbującą wyrzucając komórkę na "biopapier"

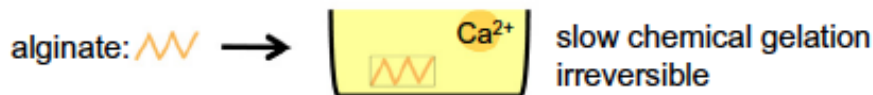
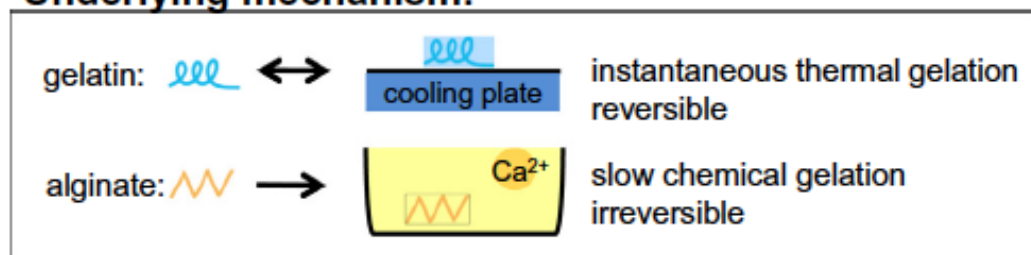
TABLE I. Comparison of Prominent Bioprinting Methods

	Ink-Jet Bioprinting	Direct-Write Bioprinting
Computer-designed pattern	Yes	Yes
Method of pattern printing	Pattern rasterized into dots	Pattern translated into lines
Viscosity of printed material	3.5–12 mPa s ²¹	30 to $>6 \times 10^7$ mPa s ^a
Printed feature height	5 μm ²⁴	10 μm to millimeters ^{8,31}
Printing resolution	1–20 μm ^{21,24}	5 μm ⁸
Print multiple materials in single pass	Yes ^{15,21,24}	No ^{8,31}
Nozzle or needle size	20–150 μm ^{15,21,32}	20 μm to millimeters ^{8,30}
Dispense cells	Yes ^{15,22,71}	Yes ^{8,27,28}
Dispense complex, multicellular clusters	No	Yes ^{23,25,29}
Cell viability after printing	Greater than 85% ²²	Up to 98% ^{27,30}

^a Viscosities measured with Brookfield Digital Rheometer, model DV-III+.

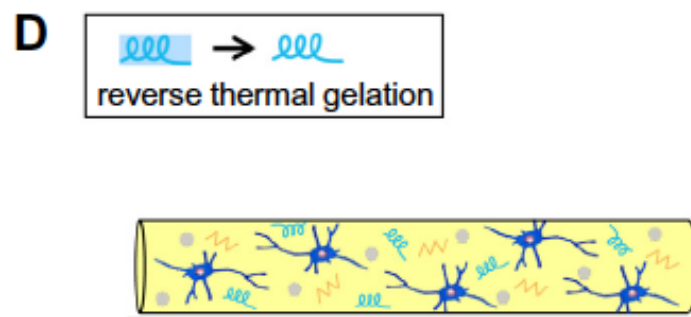
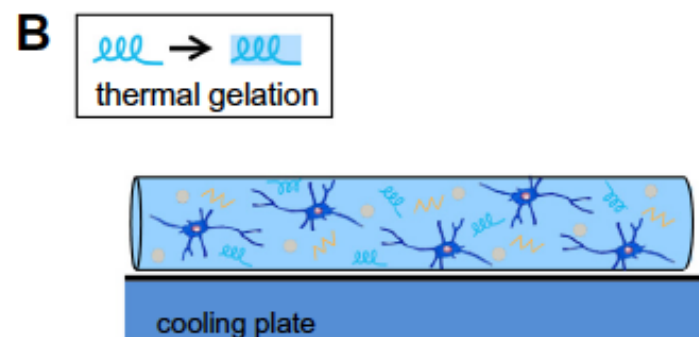
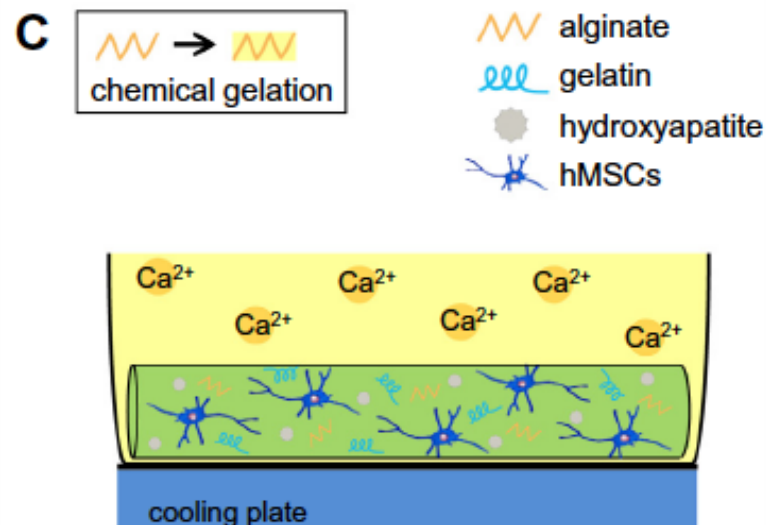
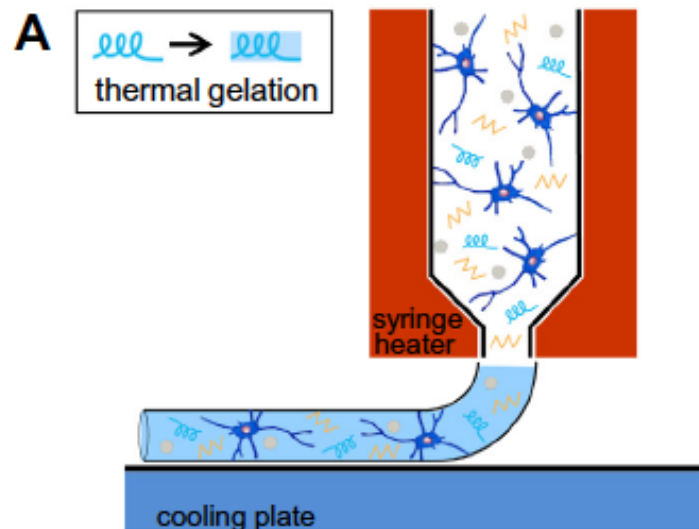


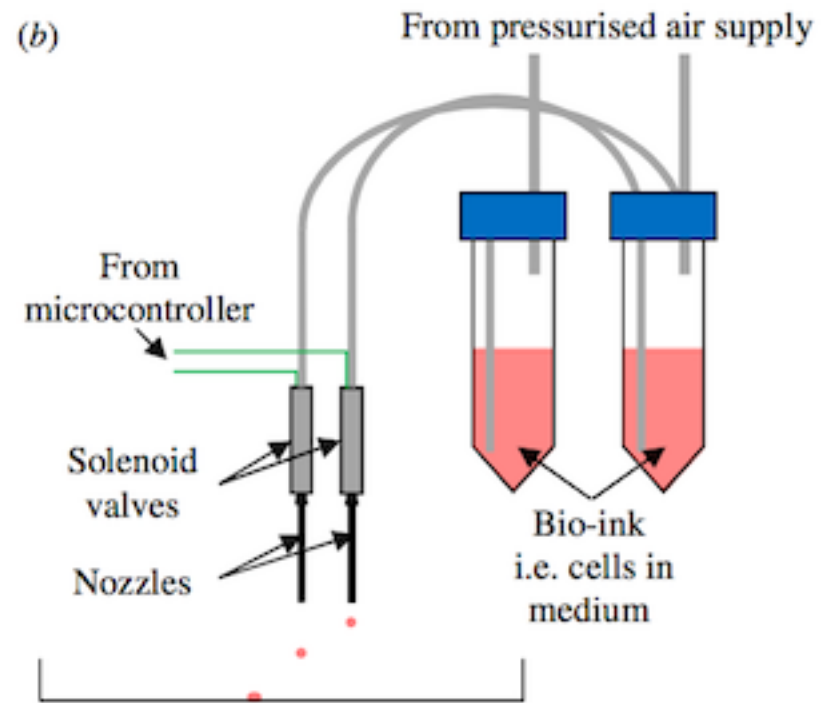
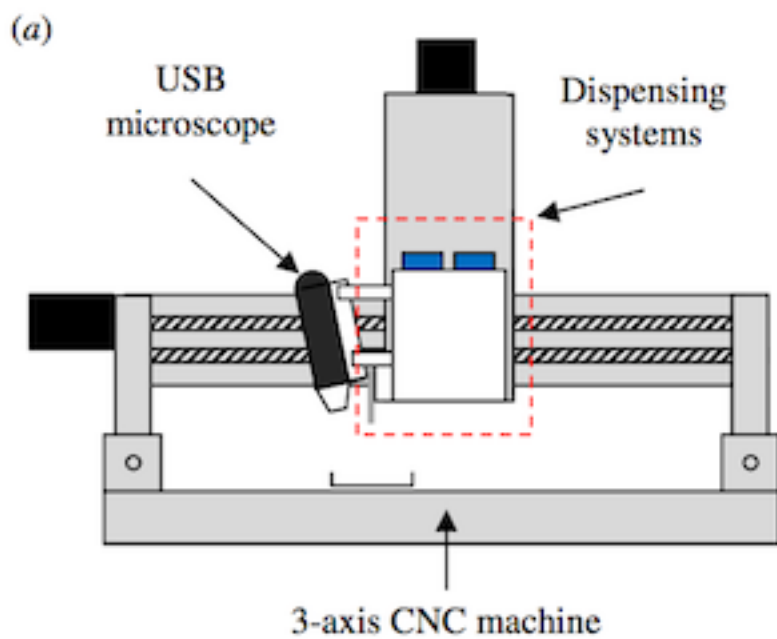
Underlying mechanism:



1.  $\rightarrow$ 
thermal gelation
2.  $\rightarrow$ 
chemical gelation
3.  $\rightarrow$ 
reverse thermal gelation

Technology:





Faulkner-Jones A i wsp.: Development of a valve-based cell printer for the formation of human embryonic stem cell spheroid aggregates

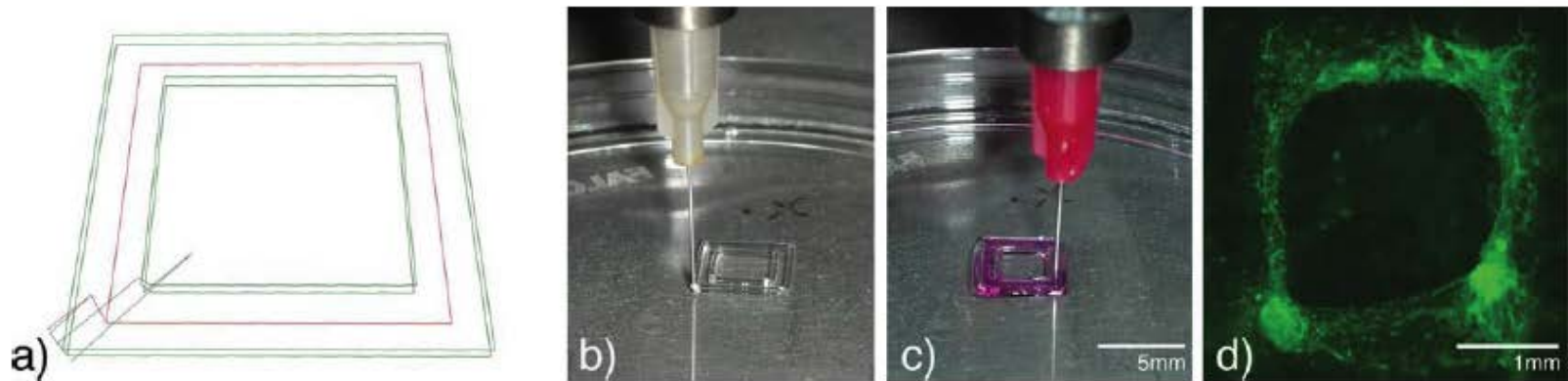
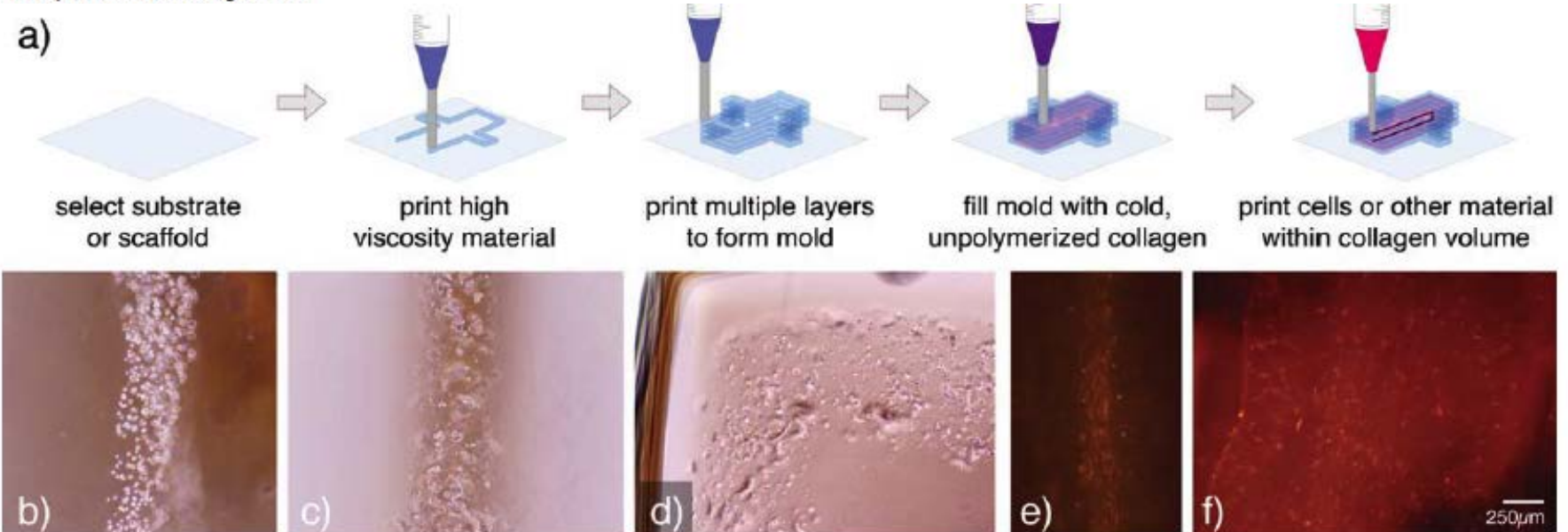


FIGURE 4. Example of simple two-material direct-write printed pattern. (a) Line path representing printed high viscosity material (green) and low viscosity material (red). Actual images of bioprinted high viscosity 40 wt % Pluronic F127 (b) followed by low viscosity collagen with suspended microvascular cells and microvesesl fragments (c). After 7 days of culture, cells and fragments (green) form neovascular networks within the patterned collagen (d).



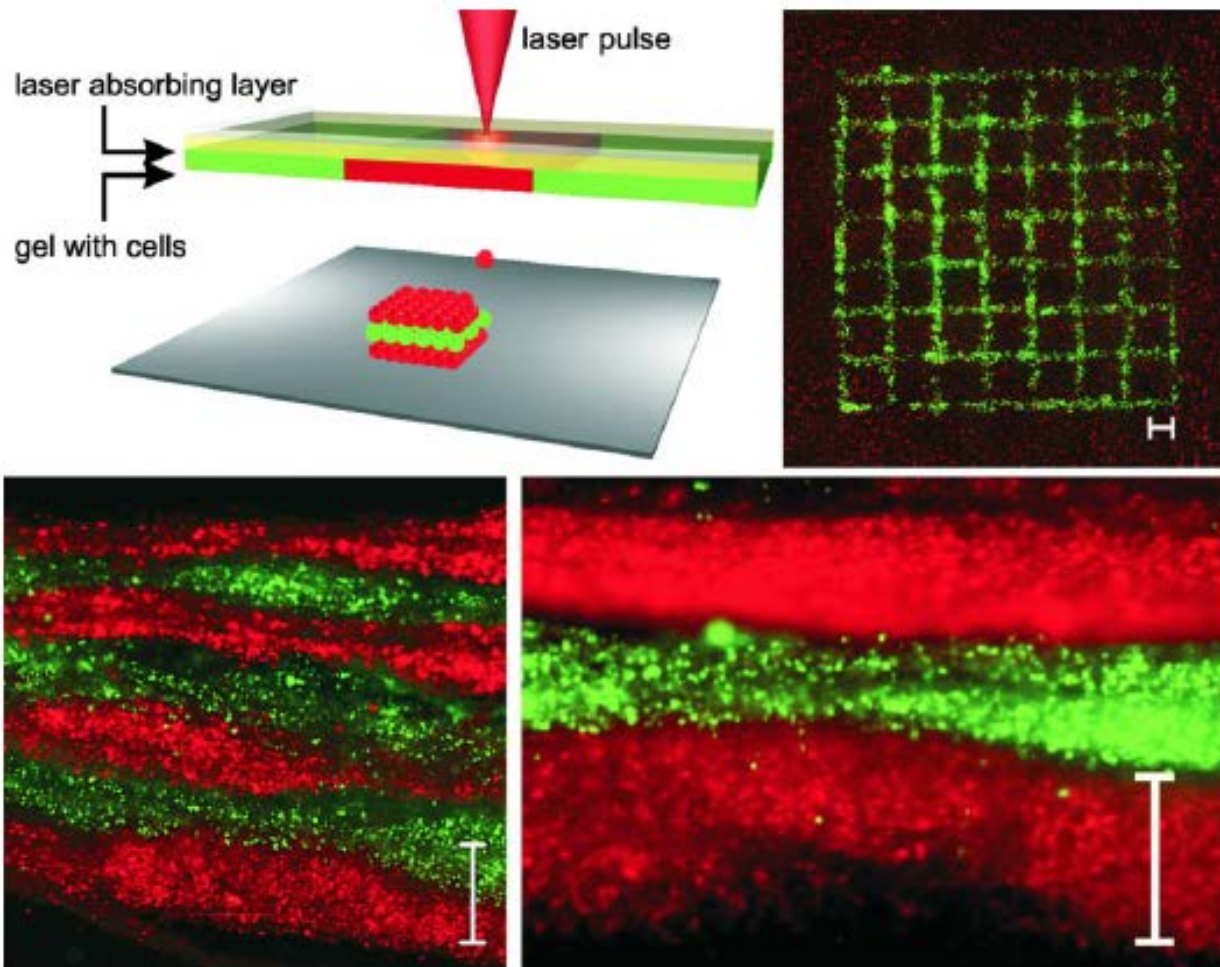
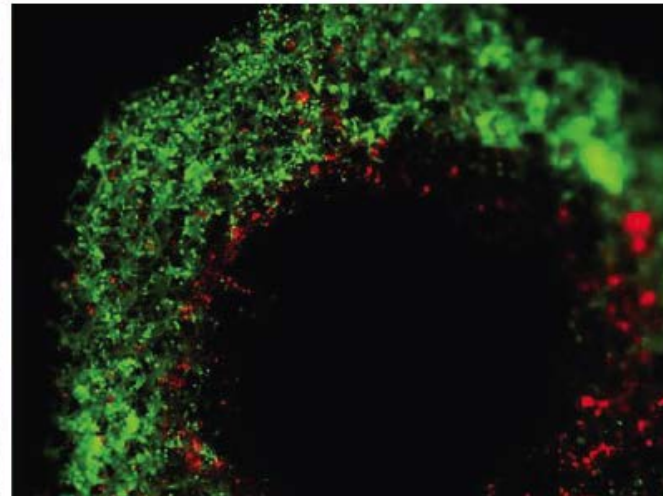
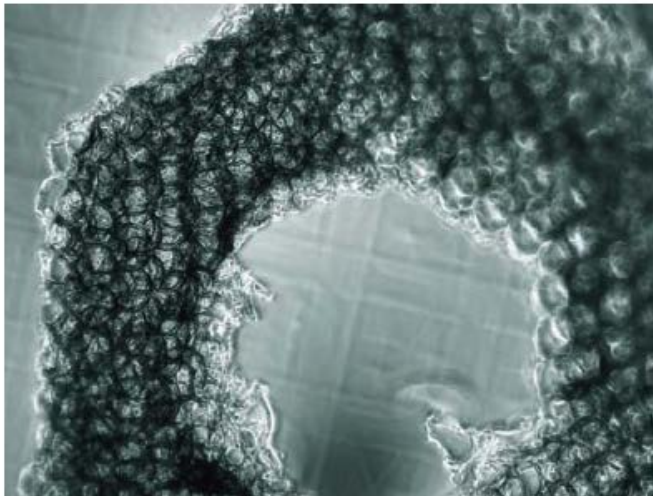
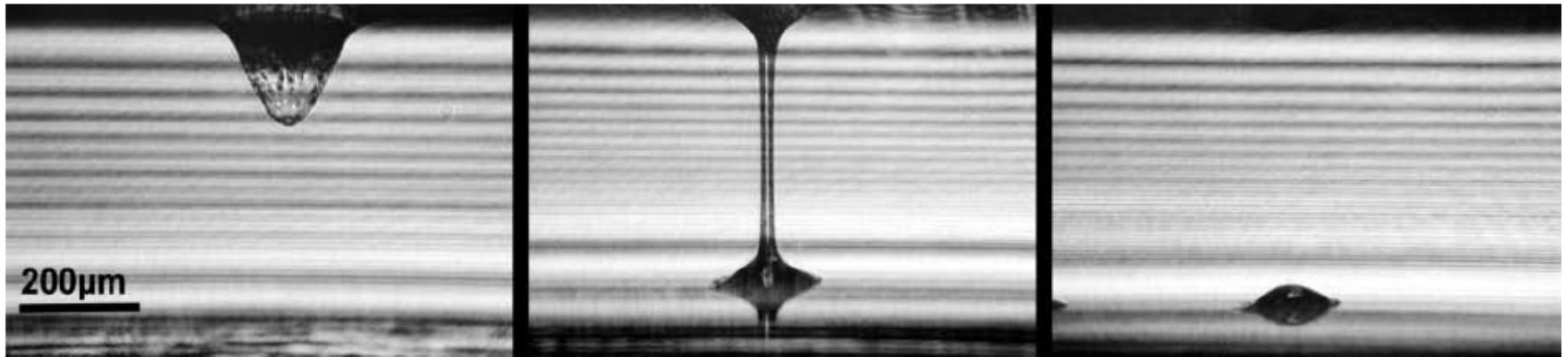


Figure 1. **Top:** Sketch of the laser printing setup. The cell–hydrogel compound is propelled forward as a jet by the pressure of a laser-induced vapour bubble. Layer-by-layer a 3D cell pattern is generated. A printed grid structure (top view) of fibroblasts (green) and keratinocytes (red) demonstrates micropatterning capabilities of the laser printing technique. **Bottom:** Seven alternating colour-layers of red and green keratinocytes (left; detail right). Each colour-layer consists of four printed sublayers. A histological section was prepared 18 h after printing. The whole structure has a height of about 2 mm and a base area of 10 mm × 10 mm. Scale bars are 500 μ m. [Color figure can be seen in the online version of this article, available at <http://wileyonlinelibrary.com/bit>]

Laser Assisted Cell Printing

L. Koch, M. Gruene, C. Unger and B. Chichkov

Current Pharmaceutical Biotechnology, 2013, Vol. 14, No. 1 93



DRUKOWANIE STRUKTUR ZŁOŻONYCH Z RÓŻNYCH TYPÓW KOMÓREK

- tkanki i narządy mają strukturę złożoną z różnych typów komórek
- organizacja przestrzenna komórek w tkance jest warunkiem koniecznym dla jej funkcjonowania
- reakcje przestrzenne pomiędzy komórkami w układzie 3D determinują ich funkcje i kierunkują ich różnicowanie i dojrzewanie
- naczynia krwionośne są niezbędne dla zachowania żywotności komórek i tkanek

PRZYKŁADY TKANEK I NARZĄDÓW AKTUALNIE MOŻLIWYCH DO ODTWARZANIA TECHNIKĄ DRUKU 3D (FAZA EKSPERYMENTALNA)

- kość
- fragment oskrzela
- elementy struktury nerki
- naczynie krwionośne
- skóra
- krtań
- moczowód

PROBLEMY I PERSPEKTYWY DRUKOWANIA 3D W MEDYCYNIE REGENERACYJNEJ

- metody szybkiego wytwarzania dużych struktur zawierających żywe komórki
- metody łączące formowanie struktur komórkowych z mechanicznymi nośnikami (skafoldy z wbudowanymi komórkami)
- zróżnicowanie dostępnych "cegieł" tzn. modułów podstawowych złożonych z pakietów komórek, substancji międzykomórkowej lub polimerów i minerałów
- opracowanie modułów zawierających cytokiny – czynniki wzrostu i różnicowania
- metody druku 3D bezpośrednio w organizmie pacjenta, np. laparoskopowe odtworzenie wątroby, trzustki, naczyń krwionośnych
- techniki 3D w neurologii i neurochirurgii

Jak stworzyć człowieka?

**Bóg Stwórca: od razu,
według gotowej receptury**

**Ewolucja – niekończąca się metoda
„prób i błędów”**

?

**Druk 3D – na kim się wzorować?
Produkty końcowe czy materiały konstrukcyjne?**