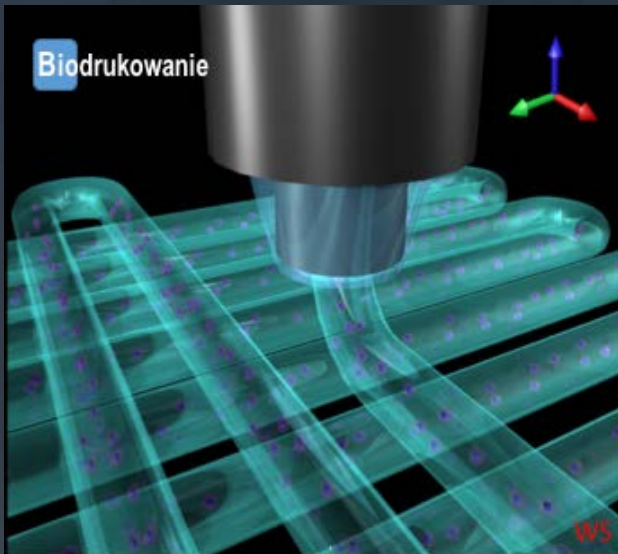




Perspektywy wykorzystania biodruku w medycynie: fikcja czy rzeczywistość?

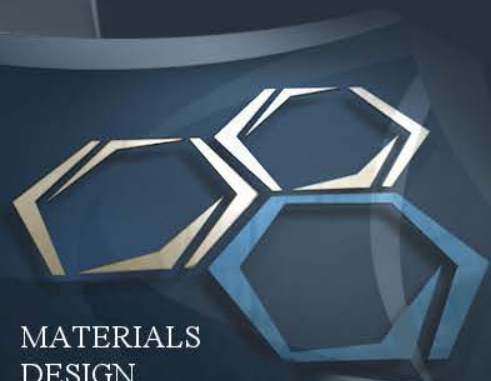
W. Święszkowski, J. Idaszek, M. Constantini

Grupa Biomaterials

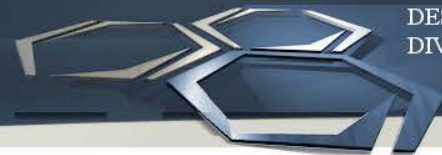
Zakład Projektowania Materiałów

Wydział Inżynierii Materiałowej

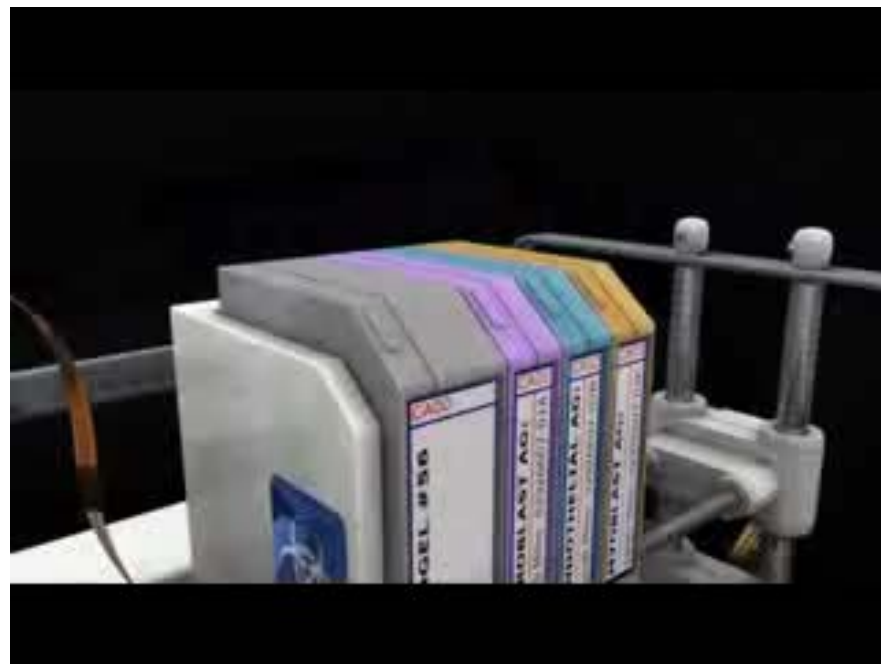
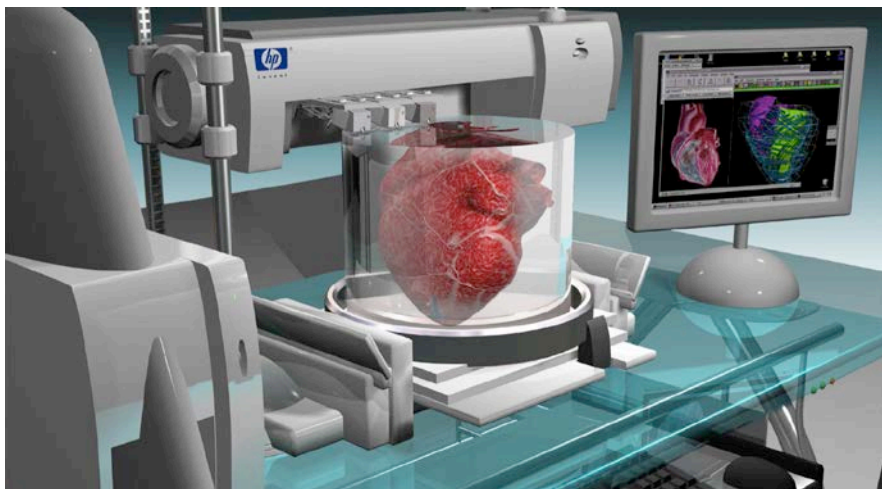
Politechnika Warszawska



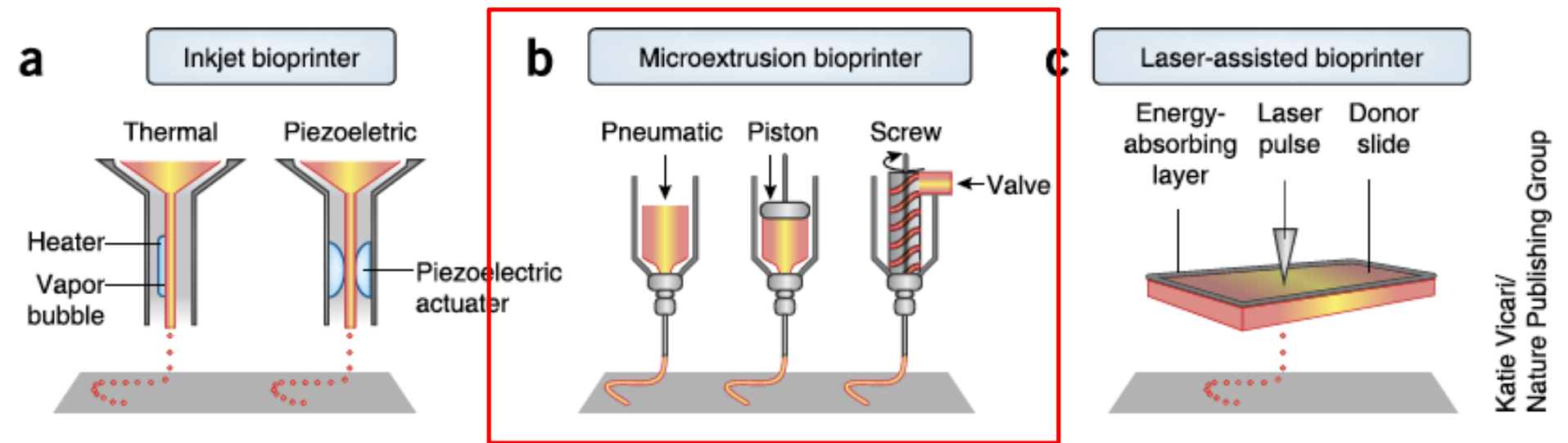
MATERIALS
DESIGN
DIVISION



- ❖ **Biodrukowanie** jest to zautomatyzowane, komputerowe osadzanie warstwa-po-warstwie materiałów biologicznych w celu produkcji funkcjonalnych tkanek i narządów.
- ❖ Pozwala na (w jednym etapie) dowolne przestrzenne rozmieszczenie komórek przez osadzanie biotuszu



Metody biodrukowania

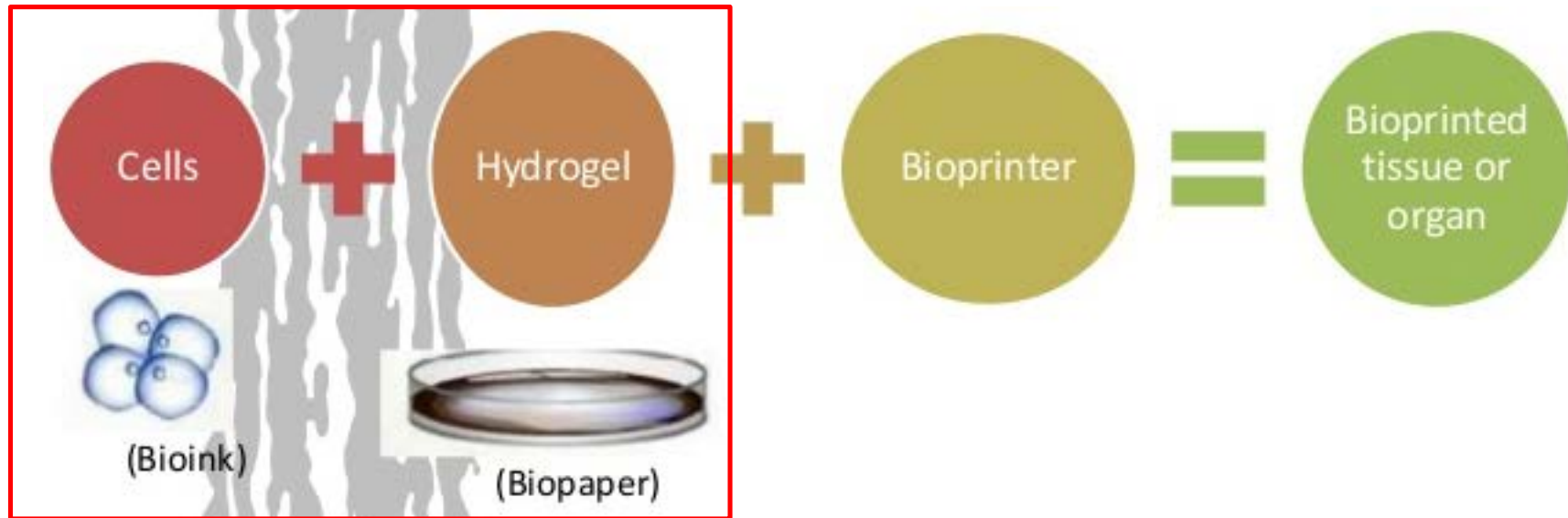


Katie Vicari/
Nature Publishing Group

Table 1 Comparison of bioprinter types

	Bioprinter type		
	Inkjet	Microextrusion	Laser assisted
Material viscosities	3.5–12 mPa/s	30 mPa/s to $>6 \times 10^7$ mPa/s	1–300 mPa/s
Gelation methods	Chemical, photo-crosslinking	Chemical, photo-crosslinking, shear thinning, temperature	Chemical, photo-crosslinking
Preparation time	Low	Low to medium	Medium to high
Print speed	Fast (1–10,000 droplets per second)	Slow (10–50 $\mu\text{m/s}$)	Medium-fast (200–1,600 mm/s)
Resolution or droplet size	<1 pL to >300 pL droplets, 50 μm wide	5 μm to millimeters wide	Microscale resolution
Cell viability	>85%	40–80%	>95%
Cell densities	Low, $<10^6$ cells/ml	High, cell spheroids	Medium, 10^8 cells/ml
Printer cost	Low	Medium	High

Proces biodrukowania i jego etapy

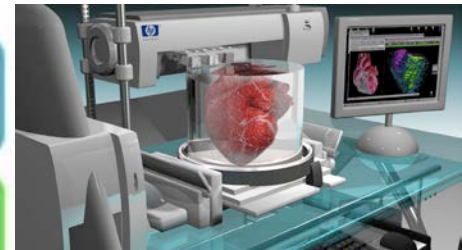


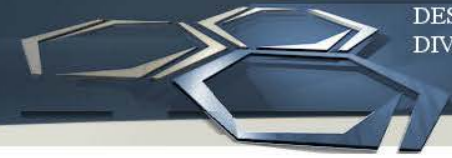
3 phases

Pre- processing

Processing

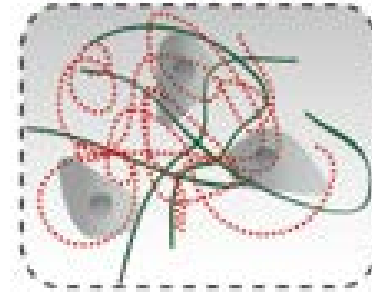
Post processing





- ❖ Biotusze to wodne roztwory polimerów w których zawieszone są komórki (mieszanina biomateriału i komórek) - użyte w celu formowania substytutów tkanek techniką drukowania 3D.
- ❖ Sformułowanie właściwego biotuszu jest trudne, ze względu na konieczność połączenia wymagań procesowych oraz idealnego środowiska dla drukowania, wzrostu i różnicowania komórek.

cell laden bioink



Właściwości biotuszu

- Odpowiednie właściwości reologiczne (stabilna zawiesina komórek, możliwość wytłaczania)
- Szybkie, efektywne żelowanie
- Właściwości mechaniczne umożliwiające manipulację wytworzonym rusztowaniem
- Biozgodność polimerów oraz czynnika sieciującego

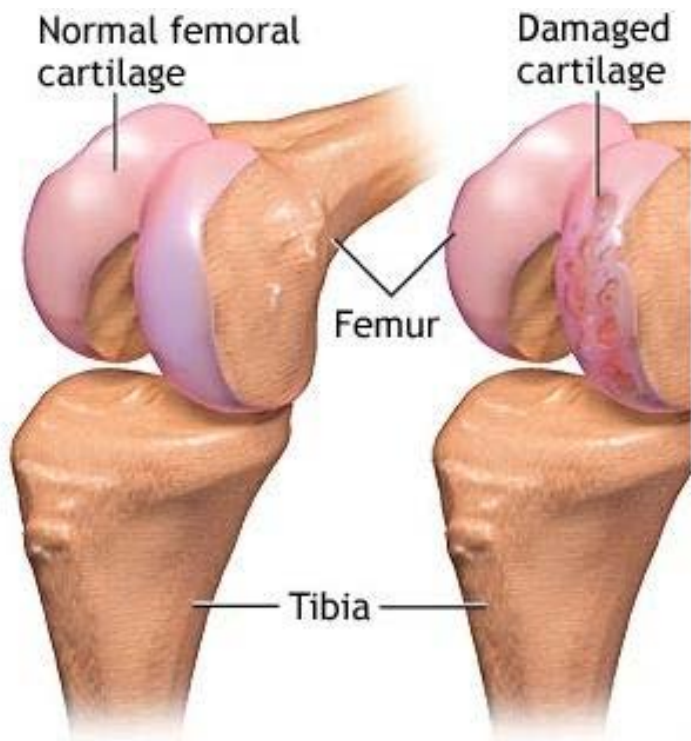
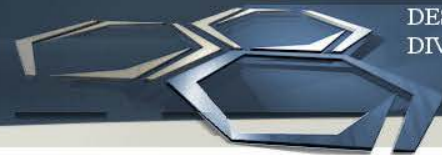
Przykład I

Biodrukowanie tkanki chrzęstnej *

*Współpracownicy: Krisztina Szöke, Magnus O. Olderøy, Tommy Karlsen, Jan Brinchmann

Oslo University Hospital – Rikshospitalet, Norwegian Center for Stem Cell Research, Oslo, Norwegia

Naprawa tkanki chrząstnej



Conventional ACL using periosteal flap (Carticel technique)

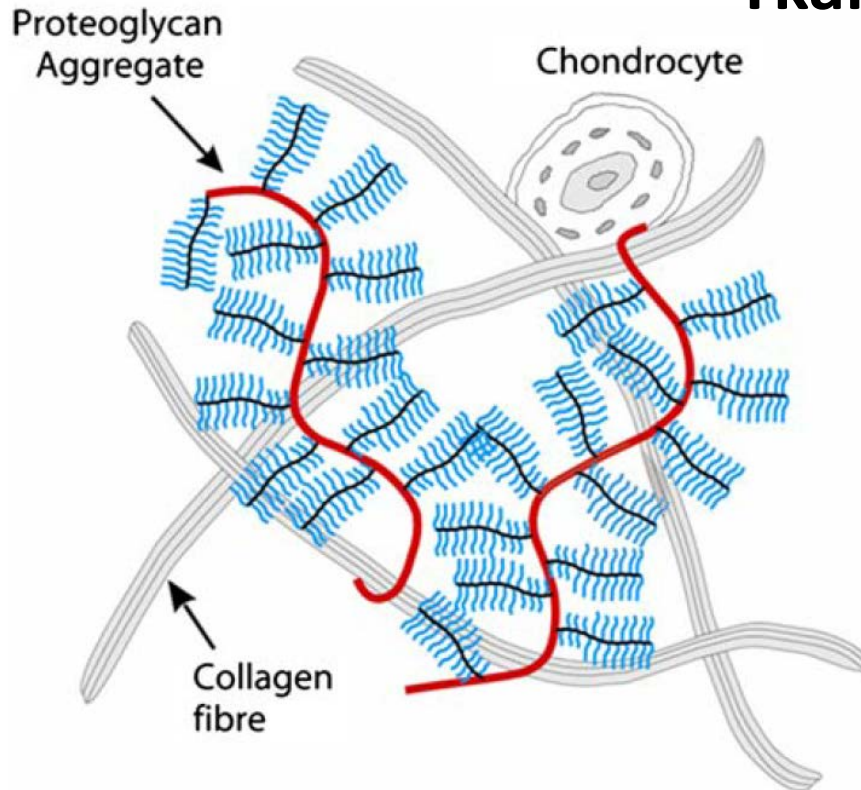


Chondron technique using fibrin gel

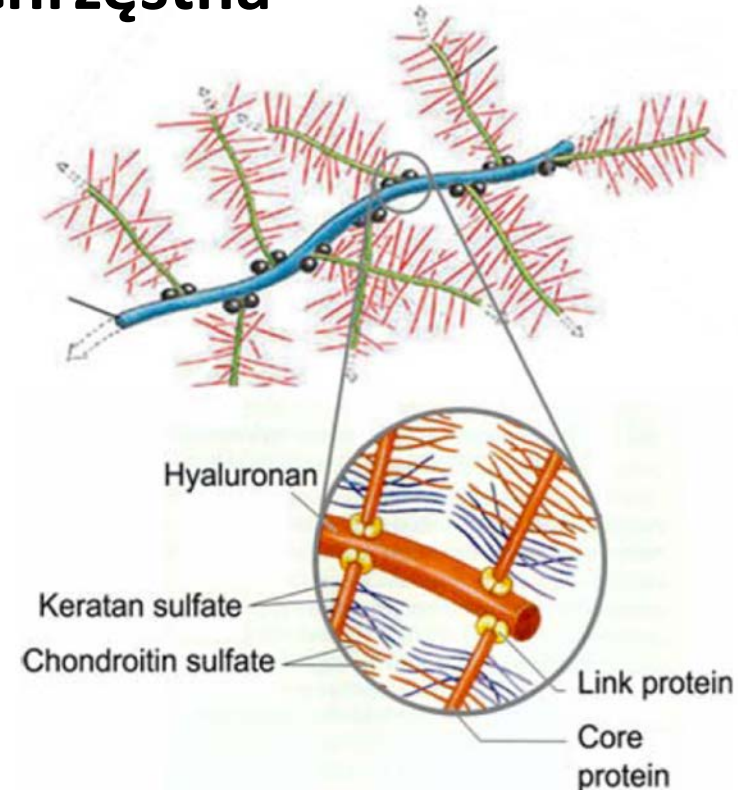
Ponad **20 milionów** ludzi w Stanach Zjednoczonych cierpi z powodu choroby zwyrodnieniowej stawu kolanowego (OA). W 2030 roku, 20% Amerykanów (około 70 mln osób) > 65 roku życia będą narażeni na OA. Globalne statystyki ujawniają ponad 100 milionów ludzi na świecie cierpi z OA, która jest jedną z najczęstszych przyczyn niepełnosprawności



Tkanka chrzęstna



Ilustracja organizacji macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) w tkance chrzęstnej



Schematyczne szkice najistotniejszych glikozaminoglikanów (GAG) w chrząstce stawowej.

Biodrukowanie 3D konstrukcji hydrożelowych dla inżynierii tkanki chrzęstnej z:

- wysoką gęstości komórek ($> 10^7$ BM-HMSCs /ml);
- wysoką przeżywalnością komórek ($> 85\%$);
- wysoką rozdzielczością druku (≈ 100 μm);
- z użyciem biomimetycznych tuszy: kolagen, siarczan chondroityny, kwas hialuronowy

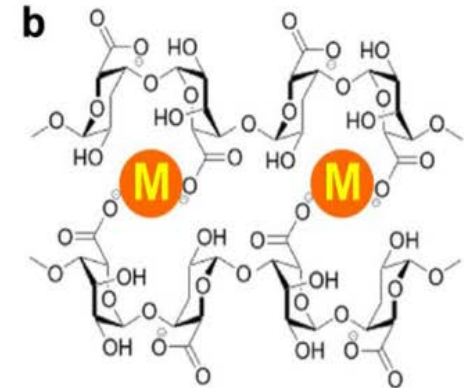
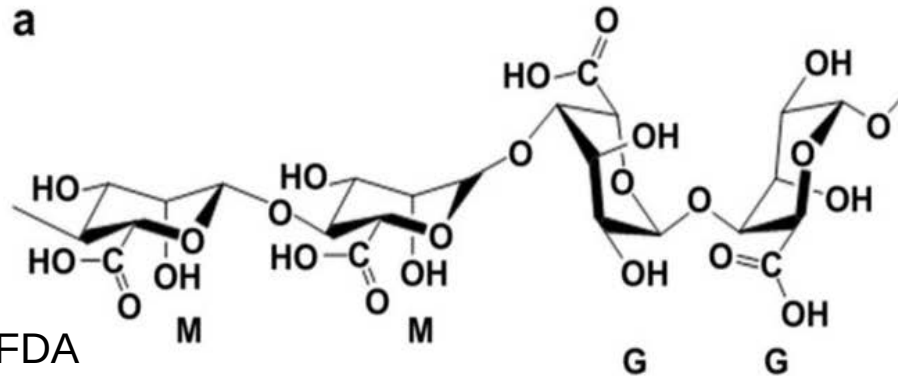


Biomateriały stosowane w druku 3D

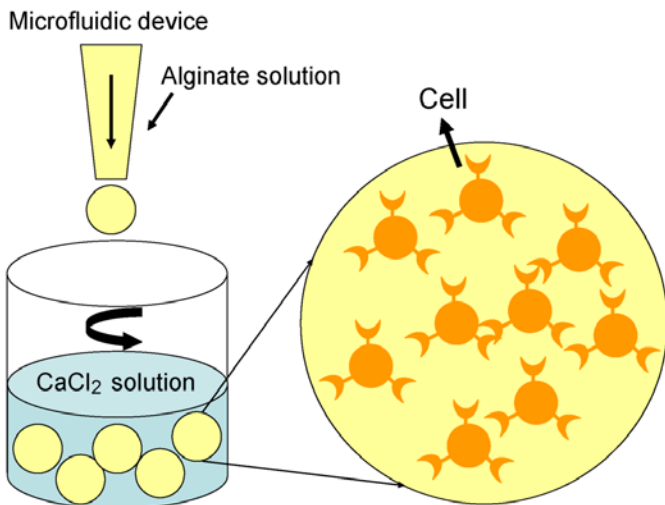
Materials	Synthetic or natural	Gelation mechanisms	Gelation speed	Advantages	Disadvantages
Acrylated PEG or multi-arm PEG	Synthetic	Photopolymerization	Seconds–minutes	Easy to control mechanical properties	No biological activities, needs modification
Collagen	Natural	pH and temperature	Hours	Natural bioactivity, major component of native ECM	Slow gelation, lacks mechanical properties
Thiolated hyaluronic acid	Natural	pH-mediated Michael addition	Minutes–hours	Commercially available in kit with gelation for cell adherence	Weak mechanical properties
Thiolated hyaluronic acid	Natural	Photopolymerization thiol–ene	Seconds	Easily controllable, fast gelation	Weak mechanical properties
Methacrylated hyaluronic acid	Natural	Photopolymerization	Minutes	Gelation speed modulated by UV intensity	Weak mechanical properties
Tyramine hyaluronic acid	Natural	Chemical cross-linking (oxidative coupling, tyramine–H ₂ O ₂)	Seconds	Fast gelling	Difficult to control geometry due to fast gelation
Gelatin	Natural	Temperature	Minutes–hours	Natural cell adherent	Unstable
Methacrylated gelatin	Natural	Photopolymerization	Minutes	Natural cell adherent	Weak mechanical properties
Alginate	Natural	Chemical cross-linking (Ca ²⁺)	Seconds	Easy to create gel microspheres	Difficult to control geometry, no cell adherent without modification
Fibrin	Natural	Enzymatic reaction (thrombin–fibrinogen)	Seconds	Cell adherent	Difficult to control geometry
PCL	Synthetic	Melt by high temperature	Seconds	Robust mechanical properties	High temperature, incompatible with cells

Alginiany

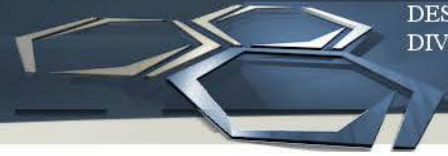
Alginiany to naturalnie występujące anionowe polisacharydy



Wiązanie jonowe
pomiędzy alginianem
i dwuwartościowymi
jonami



Guo JF1, Jourdian GW, MacCallum DK.
Culture and growth characteristics of
chondrocytes encapsulated in alginate beads.
Connect Tissue Res. 1989;19(2-4):277-97.



1. Zsyntetyzowano trzy grupy foto-utwardzalnych polimerów:

- metakryloamid żeletyny (GelMA);
- siarczan chondroityny metakrylowany grupami aminoetylowymi (CS-AEMA);
- metakryloamid kwasu hialuronowego (HAMA).

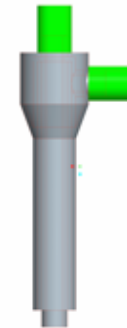
2. W celu syntezy polimerów przygotowano trzy biotusze:

- **6% w/w GelMA + 4% w/w ALG;**
- **6% w/w GelMA + 4% w/w CS-AEMA + 4% w/w ALG;**
- **6% w/w GelMA + 4% w/w CS-AEMA + 0.5% w/w HAMA + 4% w/w ALG.**

Alginiian stanowi kluczowy składnik do wytworzenia stabilnych włókien w procesie biodrukowania 3D.

Biodrukowanie wykorzystujące system współosiowej igły

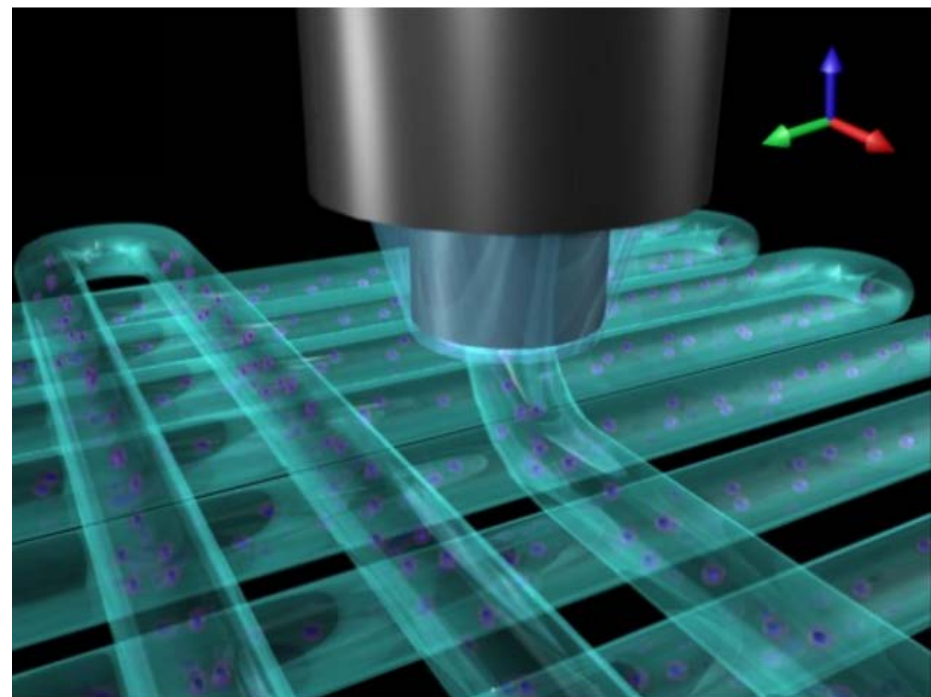
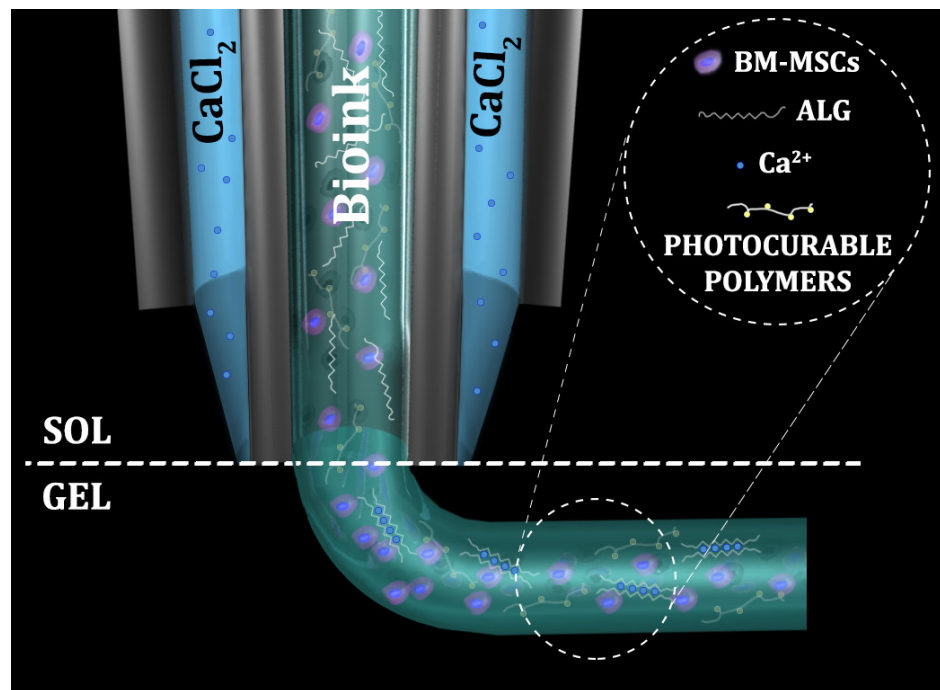
26 G dimension
(ID = 250 μm , OD = 520 μm)
4% Alginate LVG



19 G dimension
(ID = 690 μm , OD = 1070 μm)
0.2M CaCL₂



System współosiowej igły zapewniający wysoką rozdzielczość

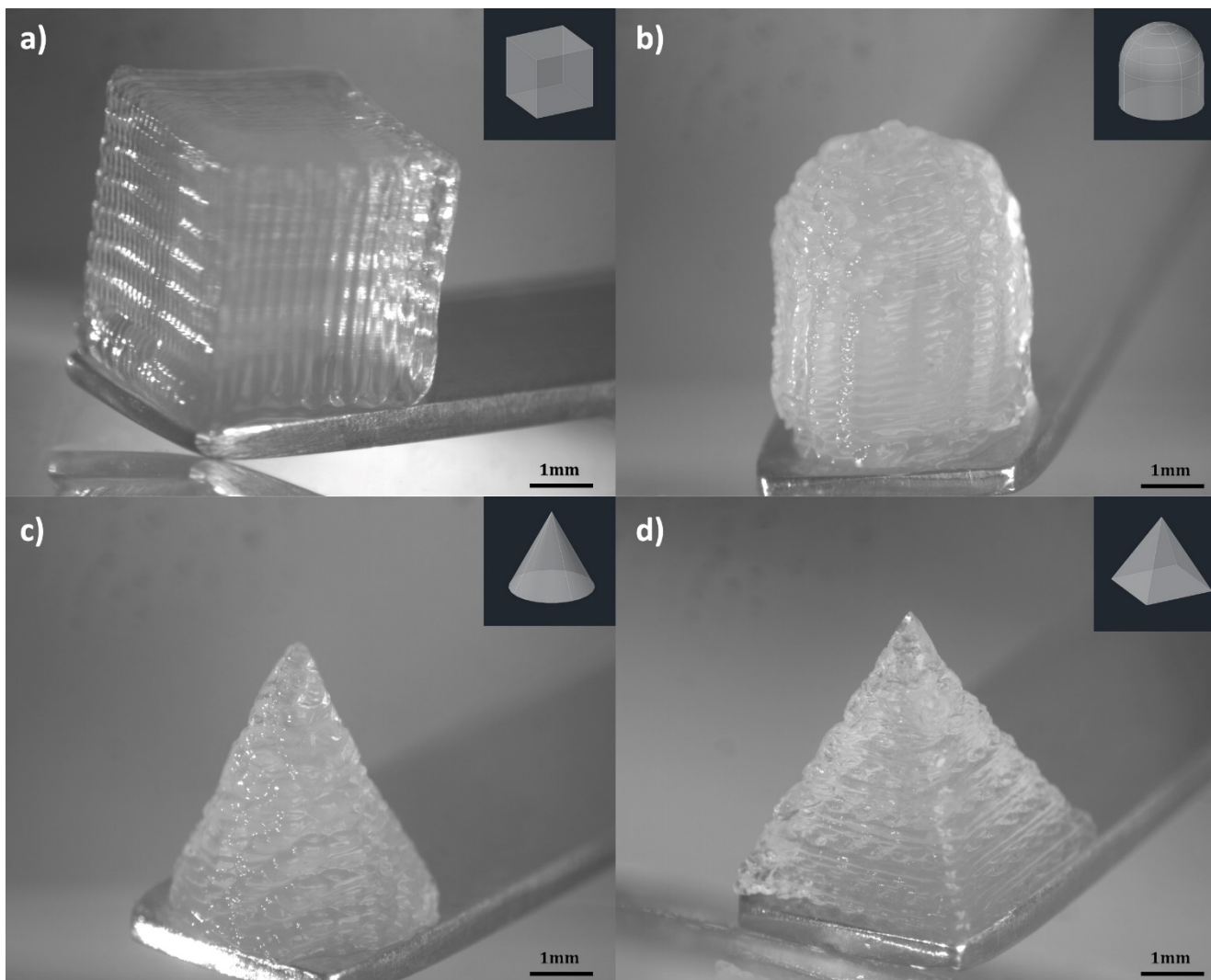


- ❖ System współosiowej igły został zaprojektowany z myślą o szybkim żelowaniu alginianów za pomocą jonów Ca^{2+} .
- ❖ Włókna hydrożelowe uformowaną poprzez podanie alginianu do części wewnętrznej współosiowej igły (25G), zaś CaCl_2 dozowano z części zewnętrznej (19G).

Drukowanie 3D biotuszy



MATERIALS
DESIGN
DIVISION



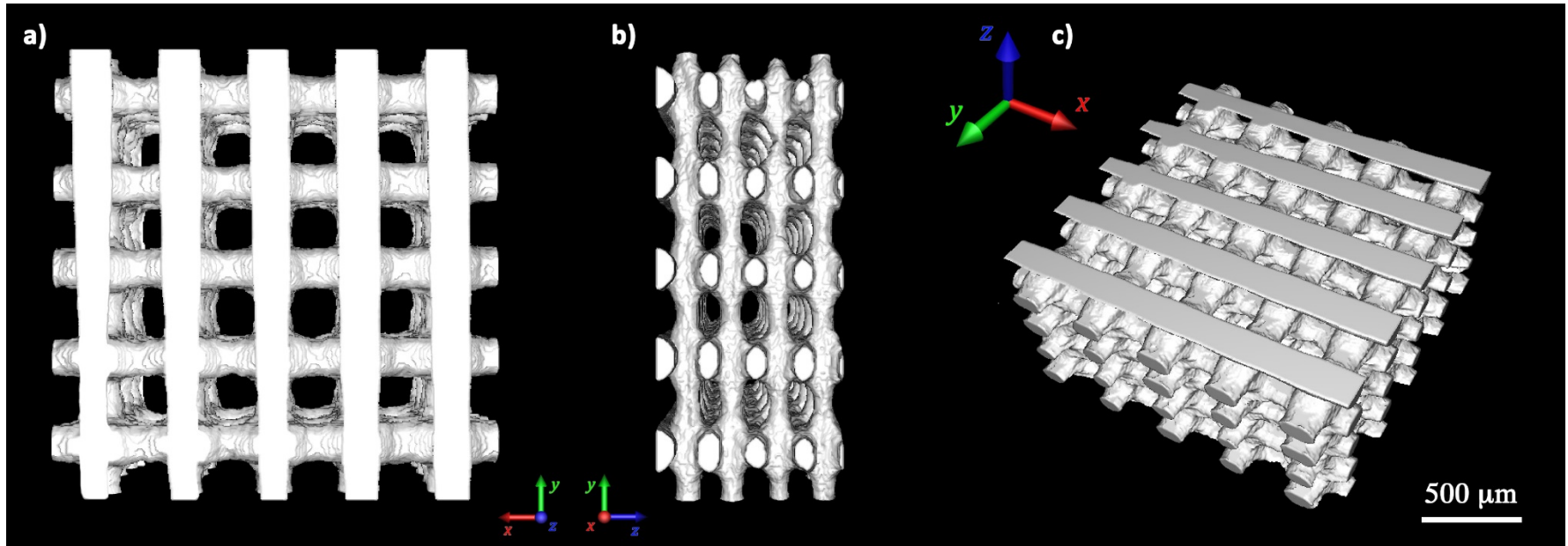
* Biotusze bez komórek



**Precyzyjne dopasowanie
zadanego kształtu**

Rusztowania
zawierały 50 warstw.
Grubość jednej
warstwy to 100 μm
(wysokość całości = 5
mm) Odległość
między włóknami to
300 μm .

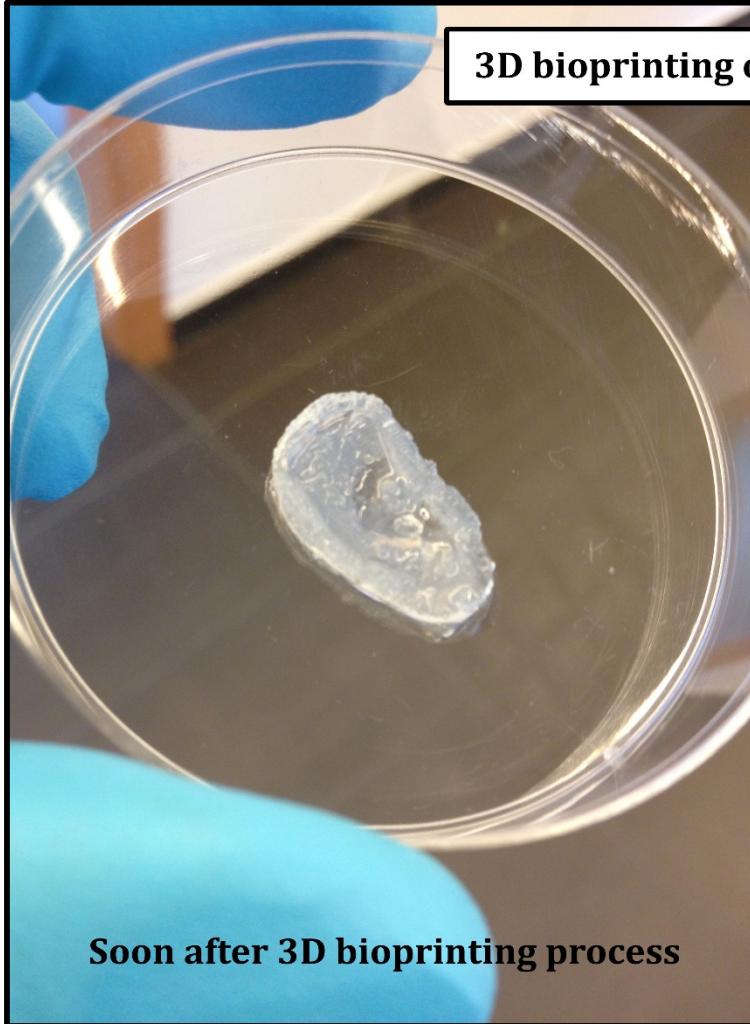
Rekonstrukcje 3D uzyskane ze skanów μ CT



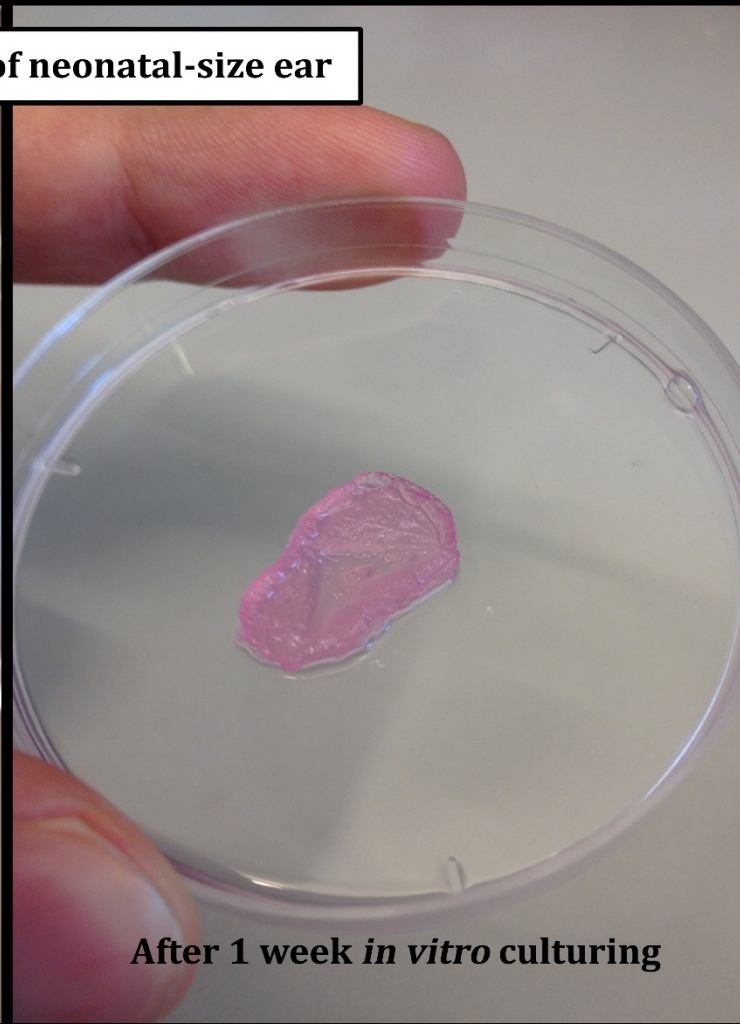
- Włókna zachowały swój okrągły kształt
- Regularne pory wewnątrz rusztowania

Drukowanie 3D biotuszy

3D bioprinting of neonatal-size ear



Soon after 3D bioprinting process



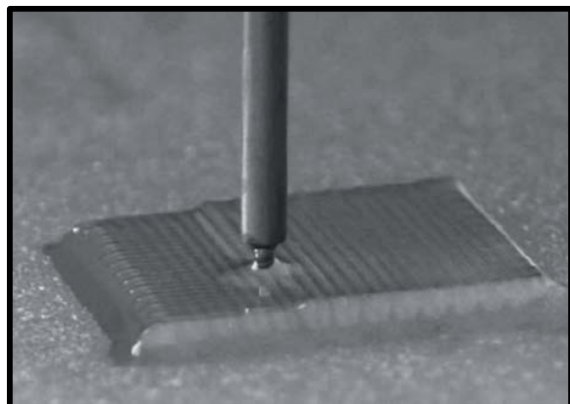
After 1 week *in vitro* culturing



Kliniczne
odwzorowanie
i zachowanie
wymiaru
konstrukcji

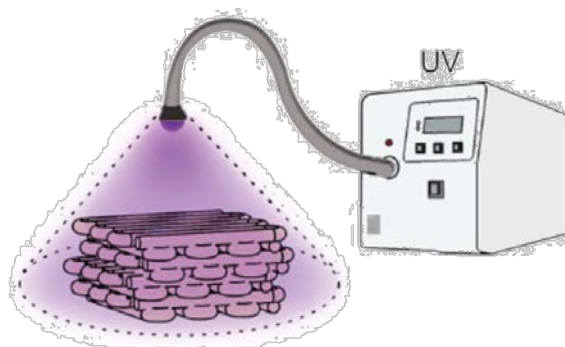
Proces biodrukowania

1 – Drukowanie



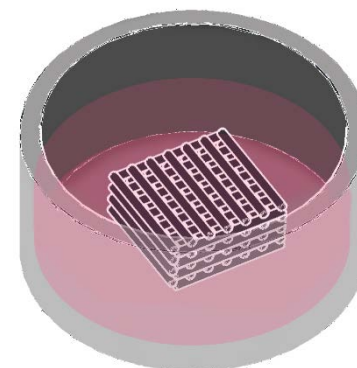
Włókna hydrożelowe formują
w rusztowanie 3D

2 – sieciowanie UV @ 365nm

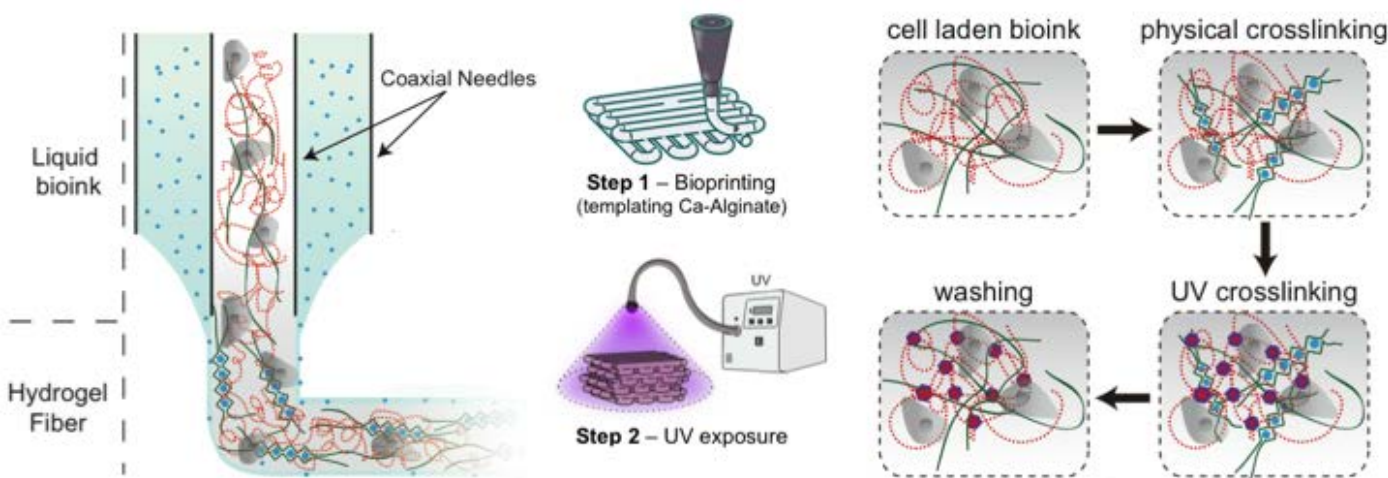


Fotoutwardzanie
polimerów

3 – In vitro hodowla komórek/różnicowanie



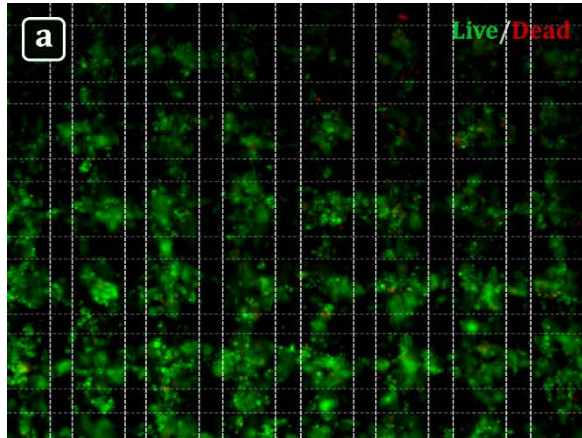
Różnicowanie BM-
hMSCs w chondrocyty
przez 21 dni.



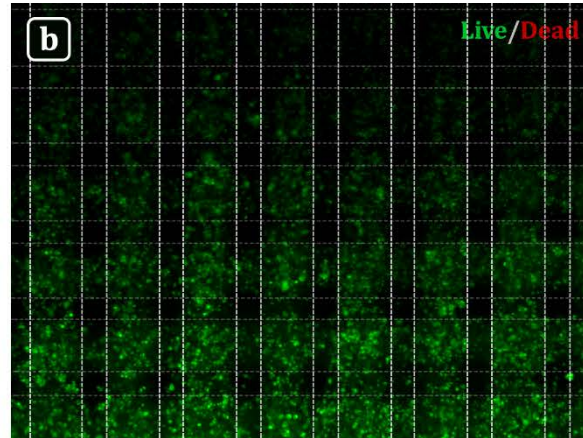
3D biodrukowanie komórek BM-hMSCs



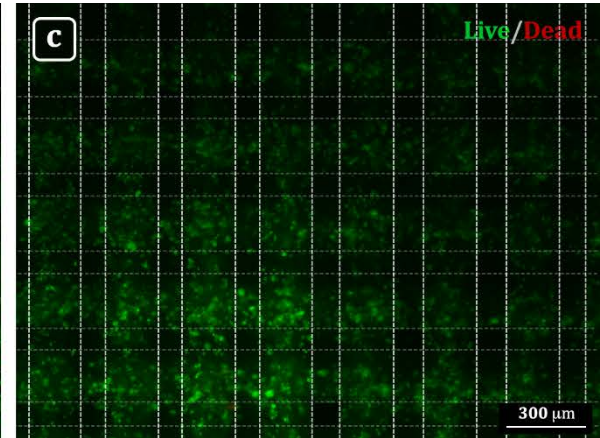
AlgGel



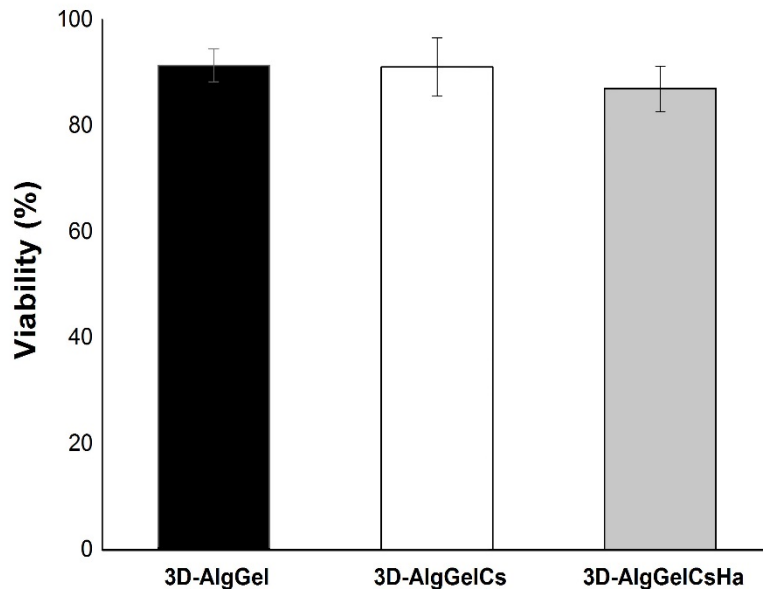
AlgGelCs



AlgGelCsHa



d)



W celu zbadania czy proces drukowania i sieciowanie UV wpływa na przeżywalność komórek, 3 godziny po drukowaniu przeprowadzono test *live/dead*.



Przeżywalność komórek – 3 h po drukowaniu – było zawsze wyższe od 90%.

Morfologia BM-hMSCs umieszczonych w hydrożelowych włóknach

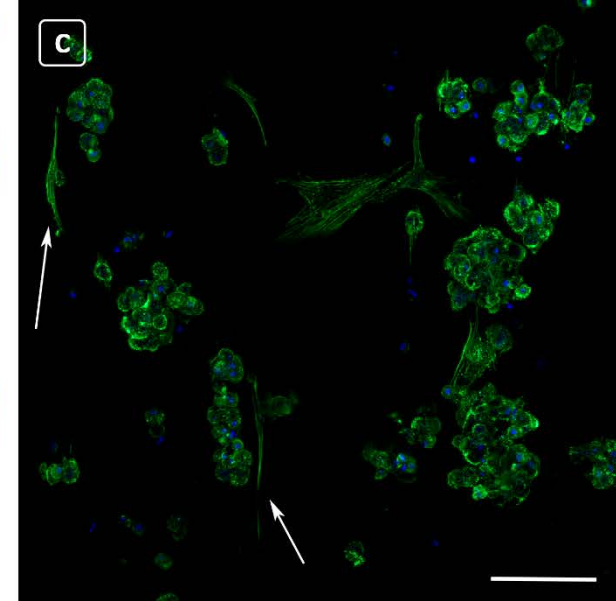
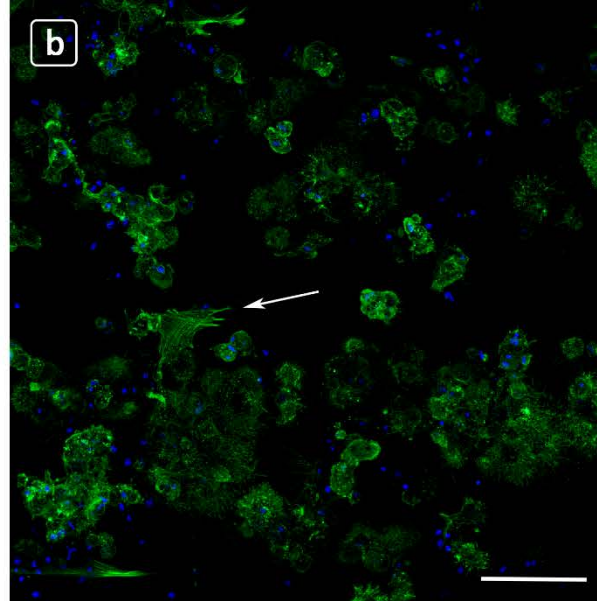
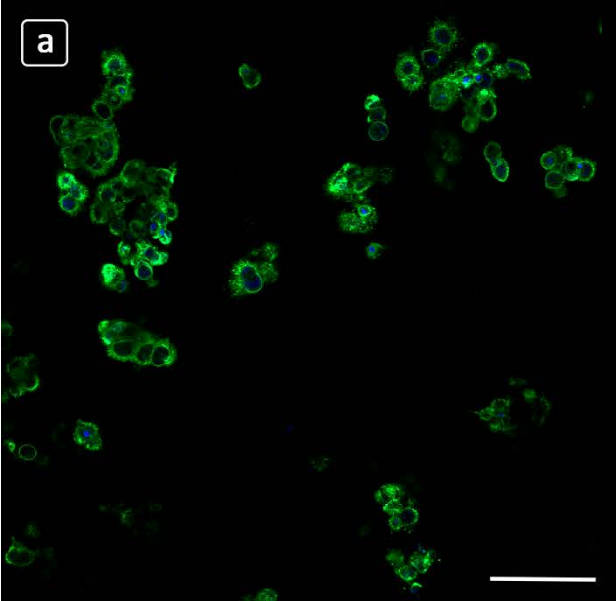


MATERIALS
DESIGN
DIVISION

AlgGel

AlgGelCs

AlgGelCsHa



Zabarwiony cytoszkielek i jądra komórkowe hodowanych komórek przez 21 dni w pożywce chondrogenicznej.



Komórki umieszczone w hydrożelowych włóknach zachowały swój okrągły kształt



Jednak komórki, które wychodzą z włókien przyłączają się do powierzchni i mają bardziej wydłużony kształt

Fluorescencja Immunocytochemiczna (ICC) dla 3D biodrukowanych konstrukcji po 21 dniach inkubacji



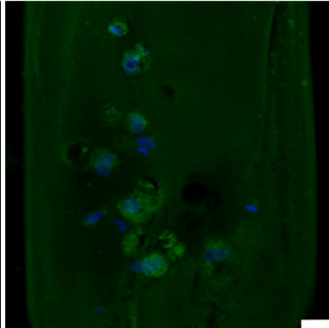
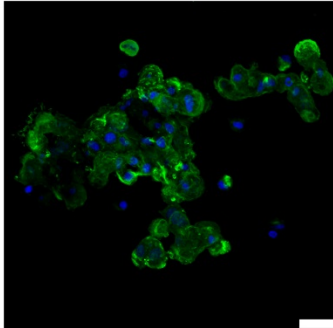
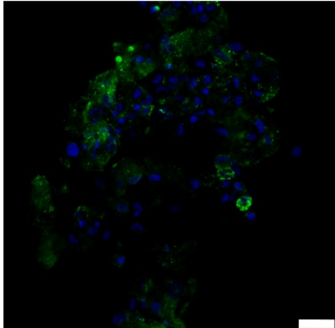
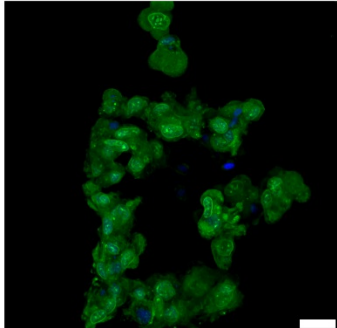
Aggrecan

Collagen 2

Collagen 1

Collagen 10

3D-AlgGel

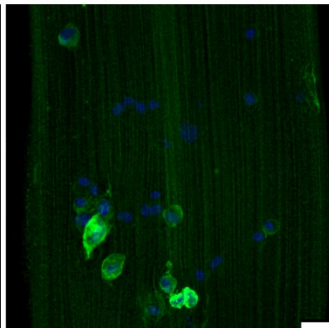
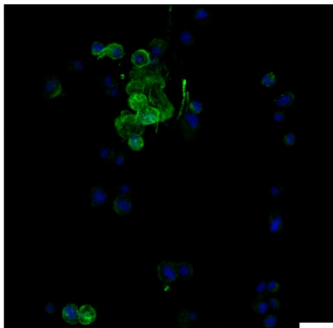
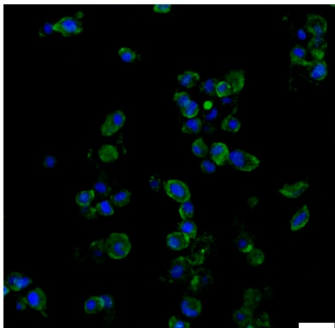
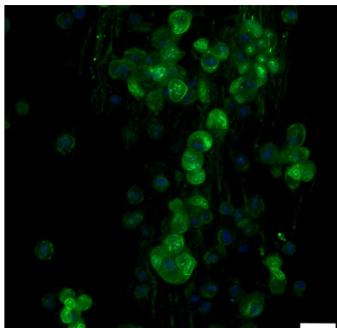


Produkcja agrekenu
i kolagenu typu 2

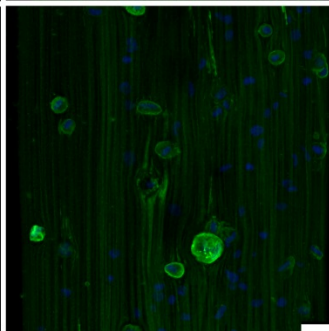
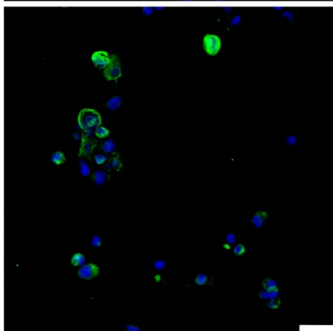
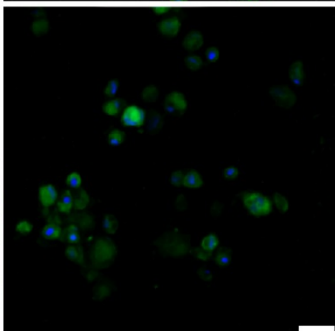
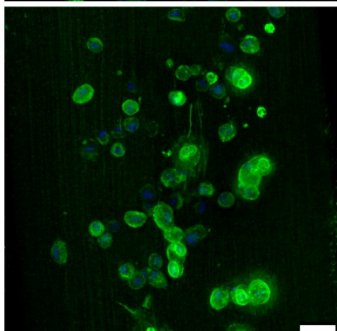


Produkcja
kolagenu typu I i
typu X

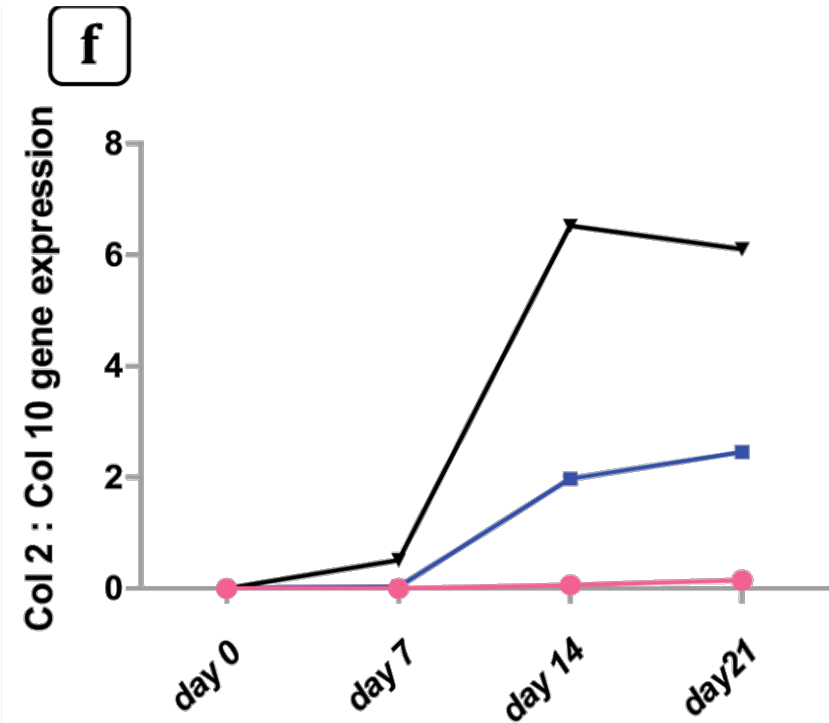
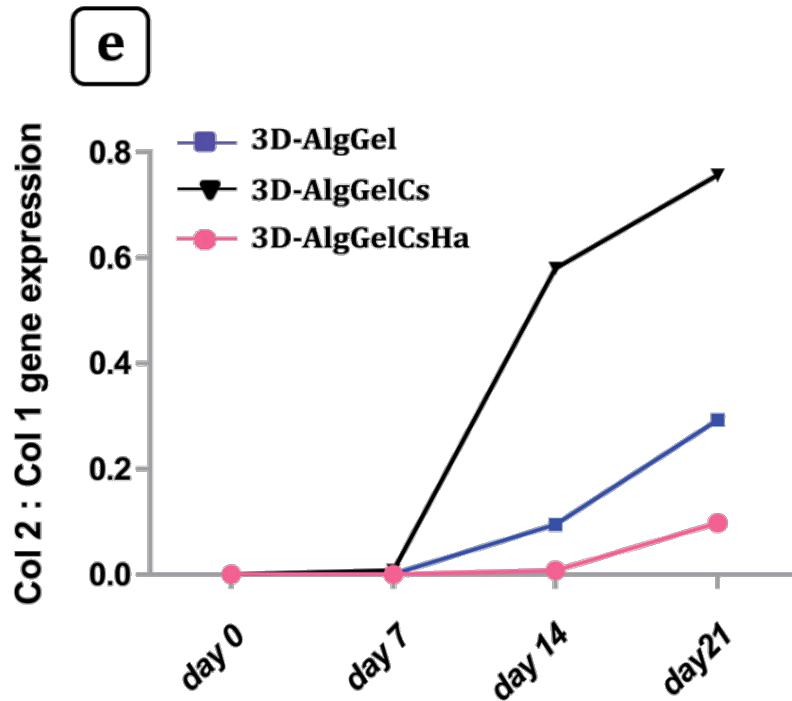
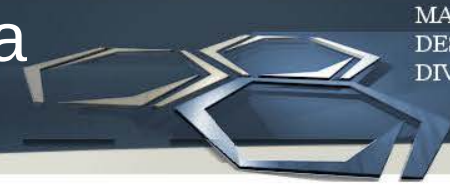
3D-AlgGelCs



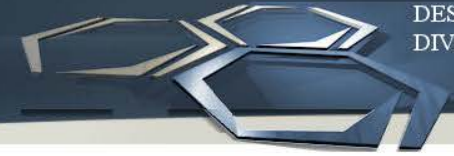
3D-AlgGelCsHa



Ocena poziomu ekspresji mRNA ECM za pomocą RT-qPCR



Rusztowania 3D z GelMA + CSAEMA biotuszu (3D-AlgGelCs) przewyższyła inne biotusze pod względem jakości zdeponowanej ECM



- ❖ Możliwe jest wytwarzanie substytutów tkanki chrzęstnej przeznaczonych do jej regeneracji stosując technikę biodrukowania i biomimetyczny biotusz zawierający MSC.



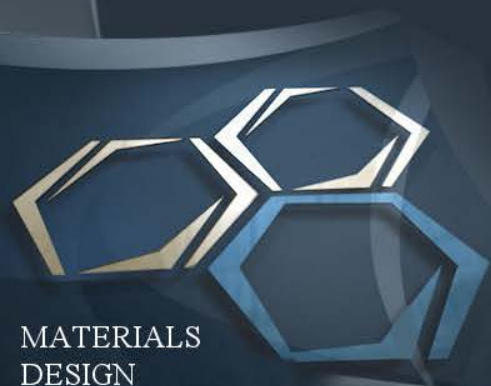
W przyszłości muszą być prowadzone dodatkowe badania, aby lepiej wyjaśnić związek między właściwościami mikrośrodowiska 3D hydrożelu i różnicowania MSC.

....

Przykład II

Biodrukowanie wysp trzuskowych*

* Współ. Dr Michał Wszola, WUM



Cukrzyca typu I

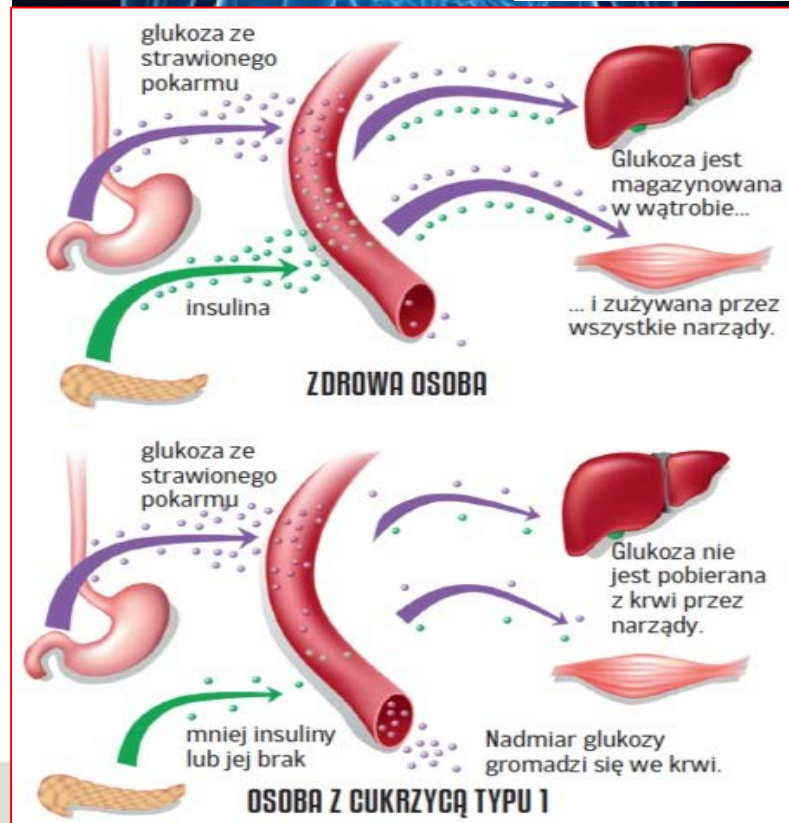
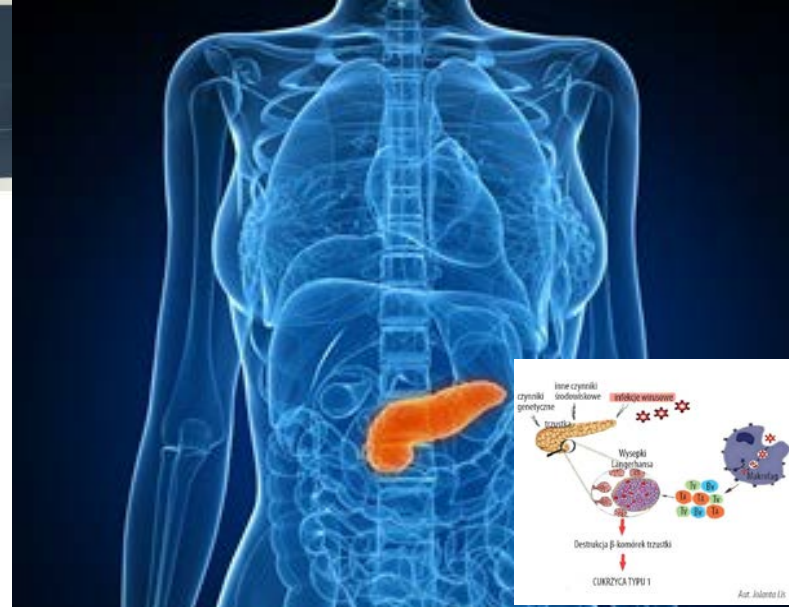
W trakcie procesu autoimmunologicznego niszczeniu ulegają komórki beta wysp trzustkowych, produkujących insulinę

Leczenie:

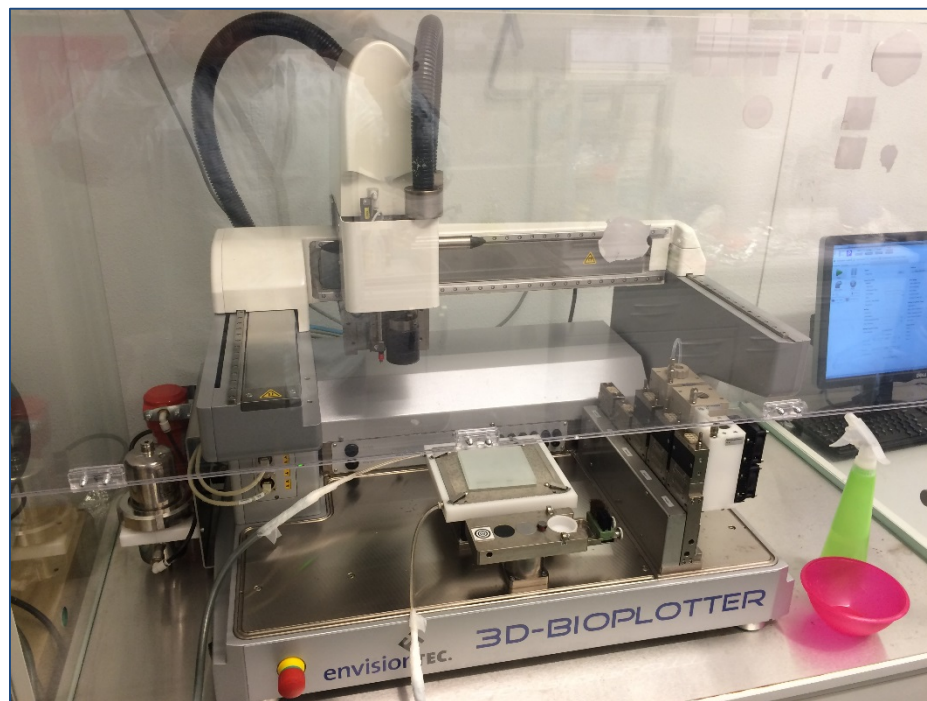
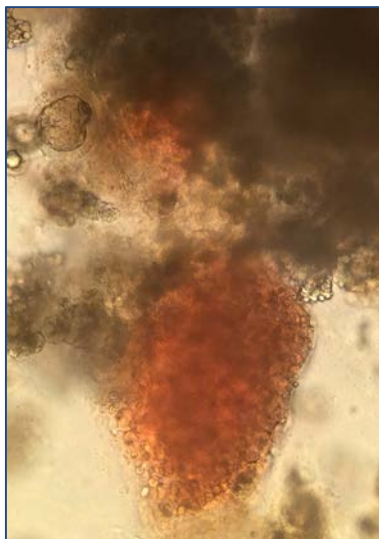
Przeszczepienie wysp trzustkowych, komórek produkujących insulinę, polega na pobraniu wysp trzustkowych od dawcy i wszczepieniu ich osobie z cukrzycą.

Problemy:

- Pozyskanie odpowiedniej ilości materiału do przeszczepu– milion wysp do wykonania jednego zabiegu
- Odrzuty przeszczepionych wysp Largenhansa
- Obumieranie wysp po przeszczepie



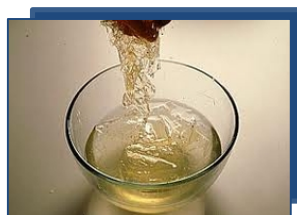
Celem było zbadanie, czy wyspy trzustkowe można stosować jako składnik biotuszu w procesie biodrukowania 3D





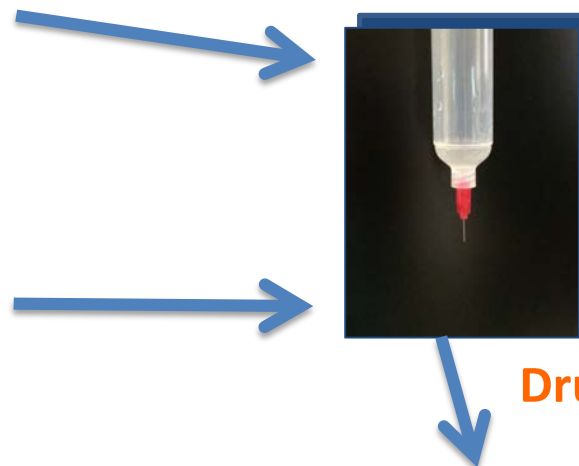
Wyspy trzuskowe:

✧ *Ludzkie i mysie wyspy trzuskowe*

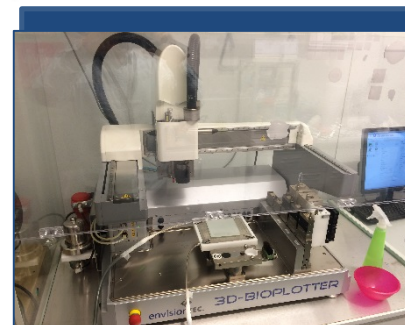


Hydrożel:

✧ *4% alginian sodu*

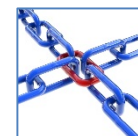


Drukowanie 3D

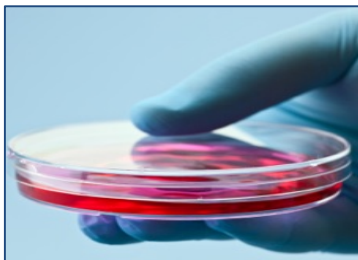
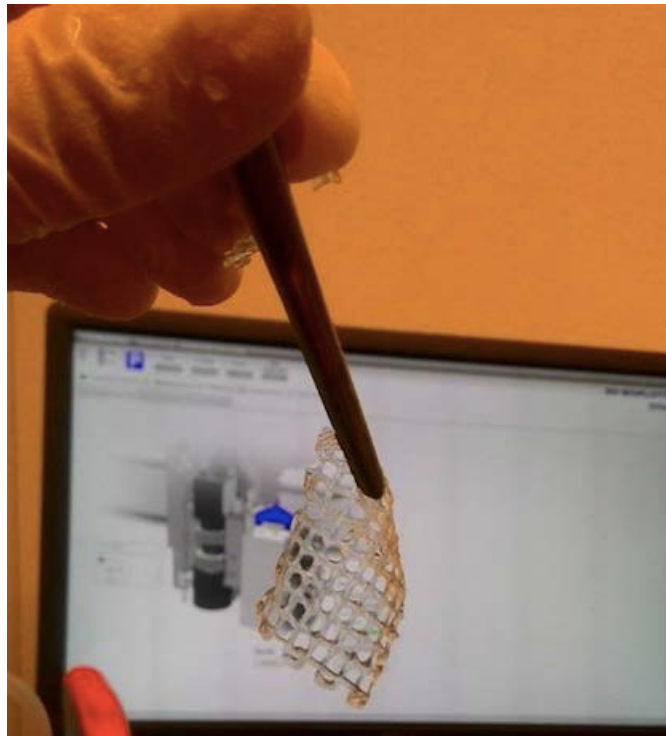
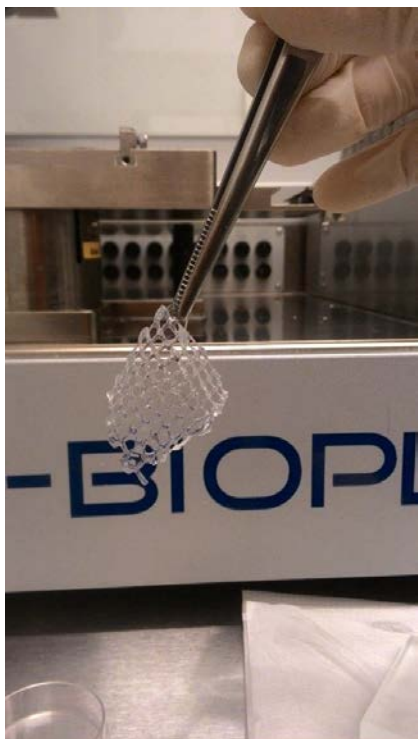


Sieciowanie:

✧ CaCl_2

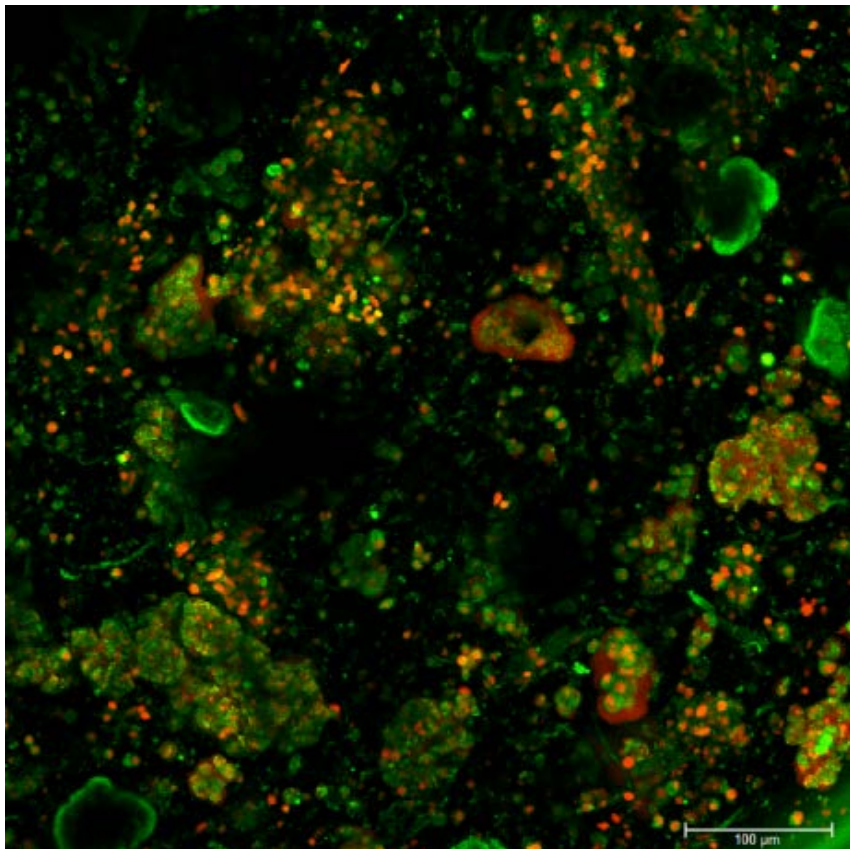


Trzuskowe rusztowania



Hodowla rusztowań i wysp:

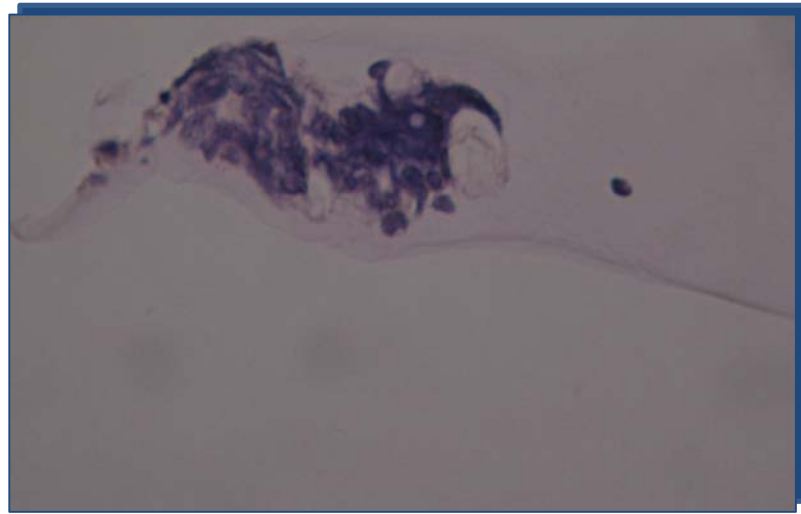
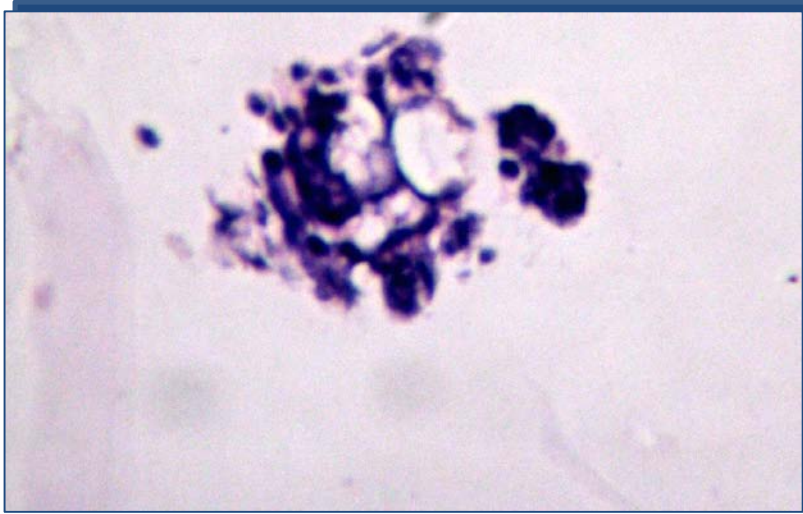
- ✧ RPMI 1640 uzupełnionej 10% płodową surowicą bydlęcą i 1% roztworem penicyliny-streptomycyny przez 10 dni



Dzień 1 - obrazowanie Live/Dead za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej

- ✧ Żywe/ Martwe wyspy trzustkowe po wydrukowaniu

Analiza histopatologiczna

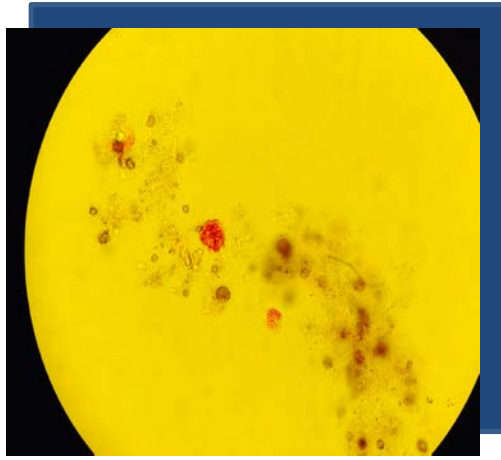


Hematoksylina/eozyna:

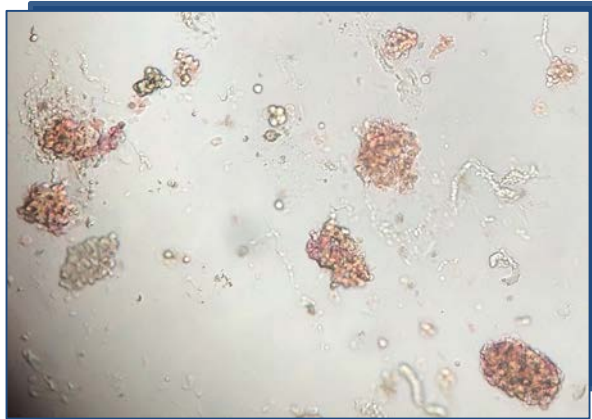
- ✧ Struktura wysp trzustkowych

Barwienie ditizonem:

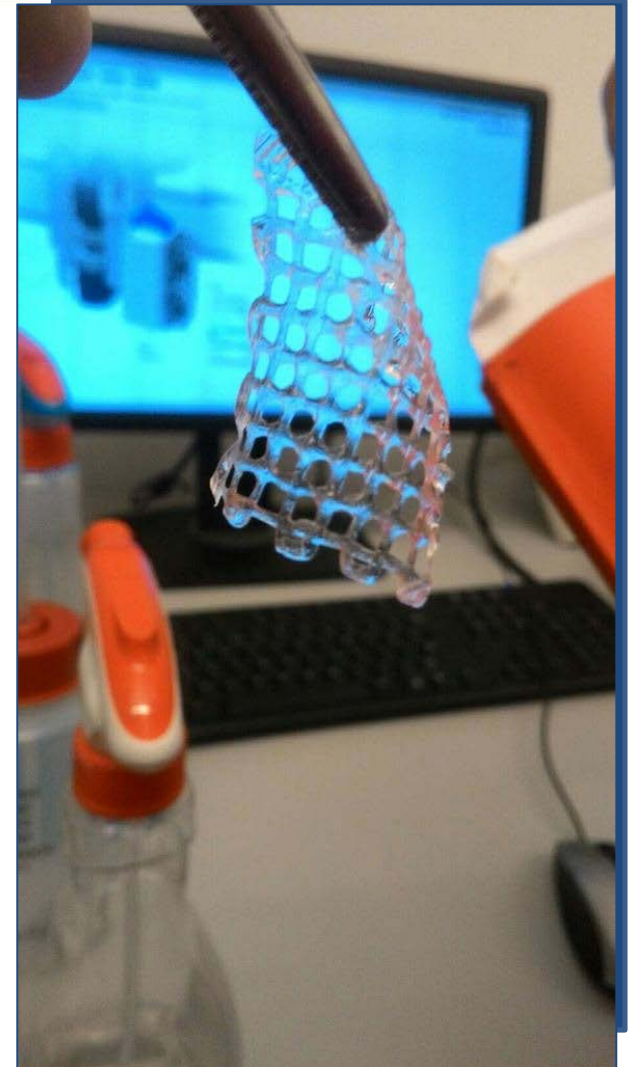
- ✧ Struktura wysp trzustkowych



Wyspy trzustkowe mogą być stosowane jako składnik biotuszu.



3D biodrukowanie wysp trzustkowych jest możliwe, ale konieczne są dalsze badania nad optymalizacją składu biotuszu.





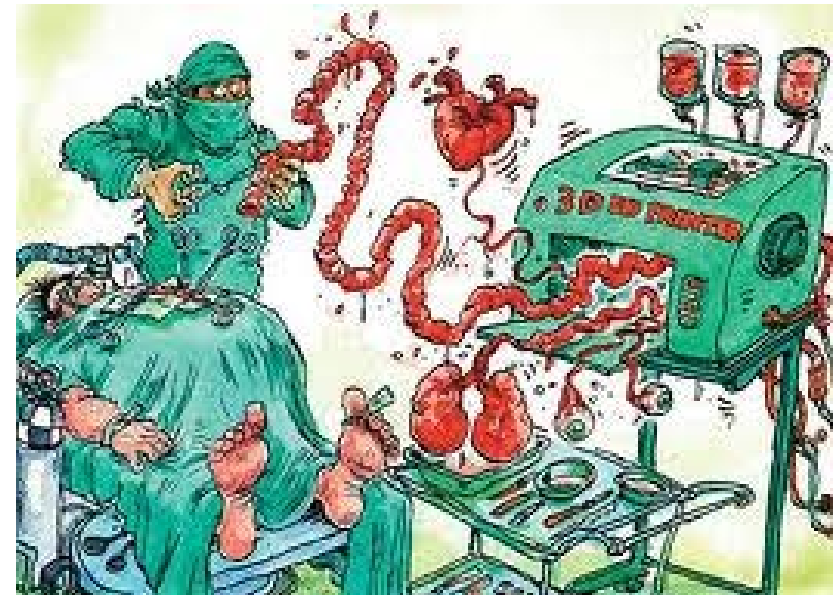
- ✓ Rozwój biomateriałów, nanotechnologii oraz biodrukowania 3D stwarza duże możliwości w tworzeniu:
 - ✓ nowych produktów medycznych i metod leczenia dostosowanych do potrzeb pacjenta,
 - ✓ modeli tkanek i narządów do badania nowych leków.
- ✓ Dalszy rozwój biodrukowania 3D w medycynie wymaga ciągłej współpracy inżynierów, biologów i lekarzy.

„Bio-fabryka”

FARMA NARZĄDÓW

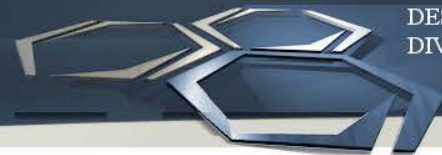


DRUKARNIA W SZPITALU



The Triumph of Regenerate Medicine” David Simonds

Podziękowania:



New Joint



BIO-IMPLANT

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO



NIMS

National Institute for Materials Science



Centrum Badań
Przedklinicznych i Technologii



Centrum Studiów Zaawansowanych PW
Center for Advanced Studies WUT



- PostDocs

- Monika Bil
- Jakub Jaroszewicz
- Ida Dulinska-Molak
- Joanna Idaszek
- Magda Płocińska
- Marcin Heljak
- Emilia Choińska
- Ewa Kijeńska

- PhDs

- Bartłomiej Wysocki
- Katarzyna Zalewska
–Wierzbicka
- Karol Szlązak
- Nehar Celikkin
- Alicja Kosik
- Żaneta Kublik
- Chiara Rinoldi
- Agnieszka Kucharska
- Maciej Łojkowski



DZIĘKUJĘ ZA UWAGĘ!