

НМИЦ ТО Вредена
ИНЦ РАН
СПбГУ
ИТМО

Аддитивные технологии для клеточной инженерии гиалинового хряща

Санкт-Петербург

2023

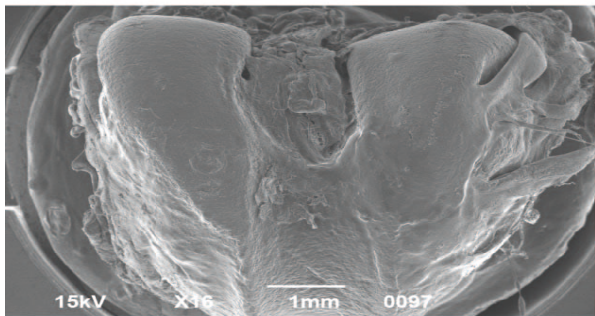
Актуальность восстановления повреждений гиалинового хряща

Гиалиновый хрящ – это аваскулярная соединительная ткань, состоящая большого количества внеклеточного матрикса (1\3) и воды (2\3), а также небольшого количества (5%) высокодифференцированных клеток (хондроцитов).

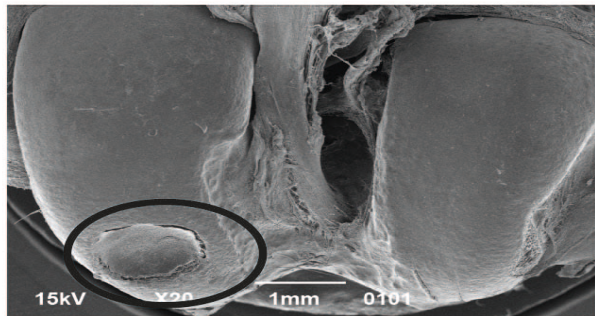
Задача восстановления повреждённой суставной поверхности гиалинового хряща в полном объёме не решена до сих пор.

Перспективным, динамично развивающимся направлением лечения локальных повреждений хряща является использование **клеточно-инженерных конструкций**

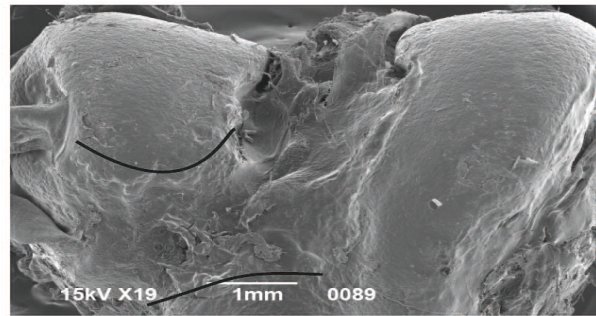
Контроль



Дефект 1,00 мм (30 сутки)



Дефект 1,00 мм (90 сутки)



СЭМ (сканирующая электронная микроскопия) фото суставной поверхности с различными дефектами

Vozhokin et al. (2016)

Создание аддитивных имплантов

Аддитивные технологии в НМИЦ ТО Вредена

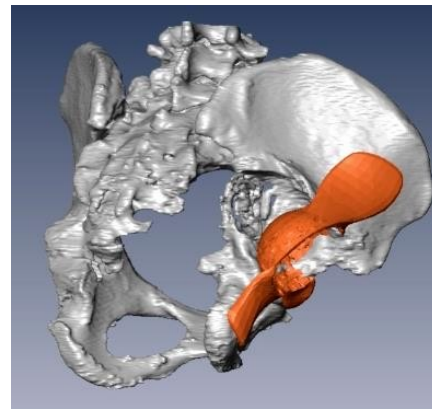
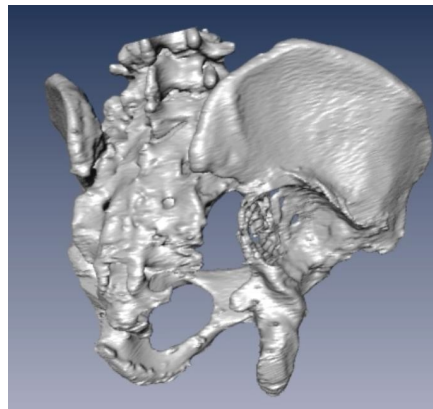
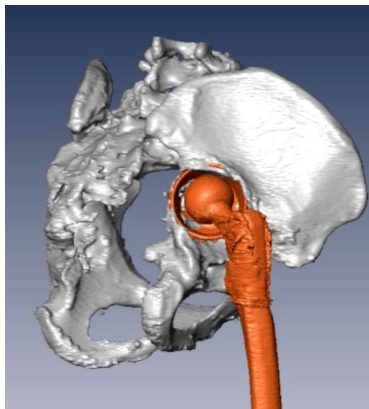
Custom-made – изделия, созданные с помощью аддитивных технологий и применяемые в травматологии и ортопедии, представляют собой «удобные» высокотехнологичные, биосовместимые и биodeградируемые имплантаты

Их отличительная черта – индивидуальный фактор, и в большинстве случаев они являются последней **«оптимистичной опцией»**, либо когда их достоинства явно превалируют над их недостатками.

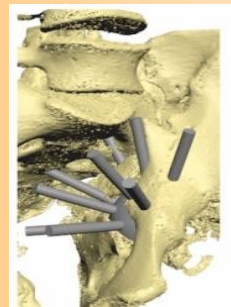
Аддитивные технологии в травматологии и ортопедии

Приоритетное направление исследований
НМИЦ ТО Вредена

Прототипирование

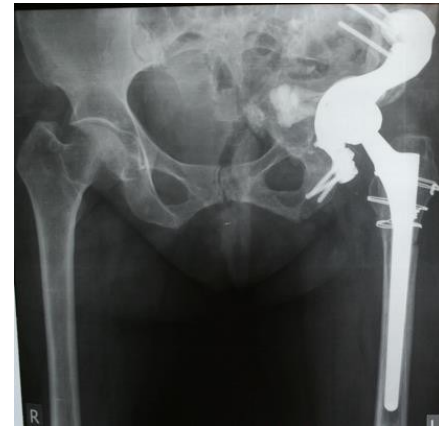
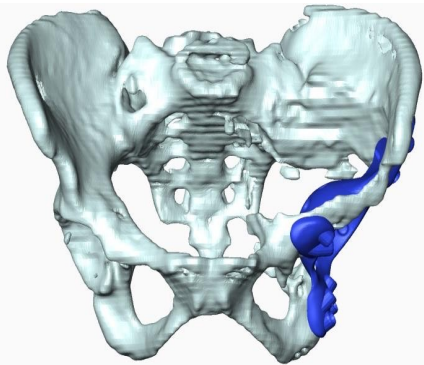


- ✦ Планирования хирургических вмешательств
- ✦ Отработка и планирование техники операции
- ✦ Оценка дефектов костной ткани
- ✦ Определение оптимального фиксации
- ✦ Изготовление индивидуального импланта



Приоритетные направления исследований

Использование аддитивных технологий

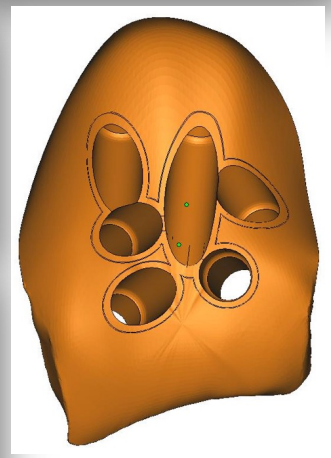
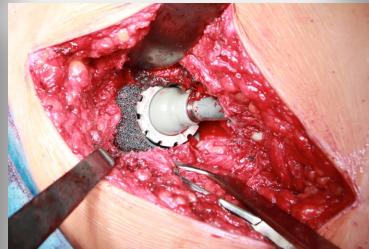
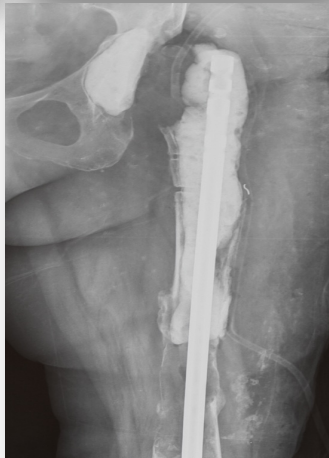
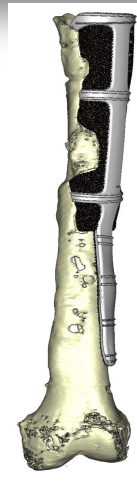
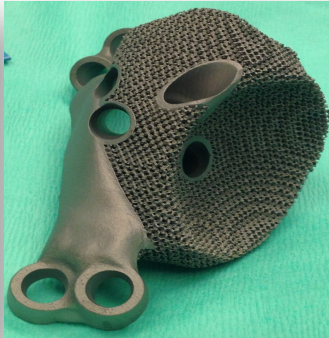
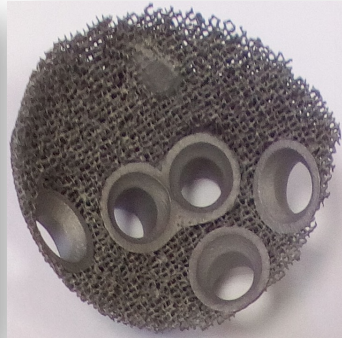


Первая в России операция по имплантации индивидуальной конструкции- 7 октября 2015 года

В настоящее время Центр имеет опыт установки **400** персонифицированных имплантов

Количество операций	>400
Максимальный период наблюдения	65 месяцев
Вывихи	3
Перипротезная инфекция	4
Разрушение импланта	4(>4)
Остеоинтеграция (биосовместимость)	в 97.9% случаях

Примеры



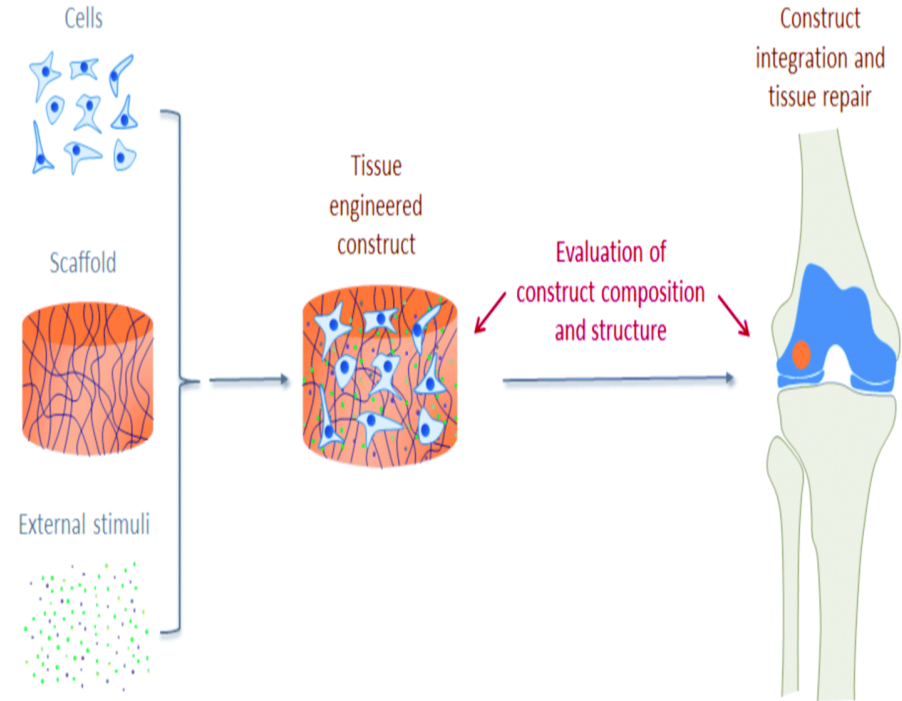
Клеточно – инженерная конструкция (КИК)

Клеточно-инженерной конструкцией называется объект, содержащий в себе культуру клеток, совмещённую с заранее созданным носителем (скаффолд, матрица, матрикс, мембрана).

Скаффолд из полимолочной кислоты:

1. Физически удерживает клеточную культуру при трансплантации
2. Способствует ее пролиферации в 3D
3. Защищает от механических нагрузок
4. Препятствует миграции (фильтрации) клеток в полость сустава
5. Безопасно биodeградирует с течением времени
6. Замещается регенератом из пролиферирующей и **предварительно модифицированной** культуры МСК

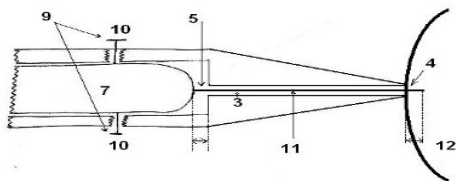
Принципиальная схема клеточной инженерии гиалинового хряща ([William Querido et.al.](#))



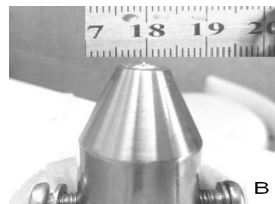
Разработанные устройства для выполнения работы

Устройство для формирования стандартизированного поверхностного дефекта гиалинового хряща определённого диаметра и глубины (Патент 2017116594/028665 от 11.05. 2017)

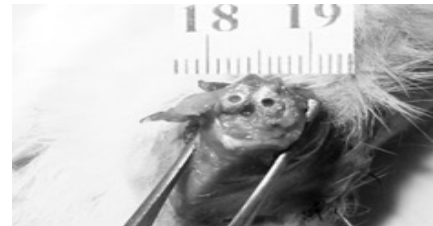
А



Б

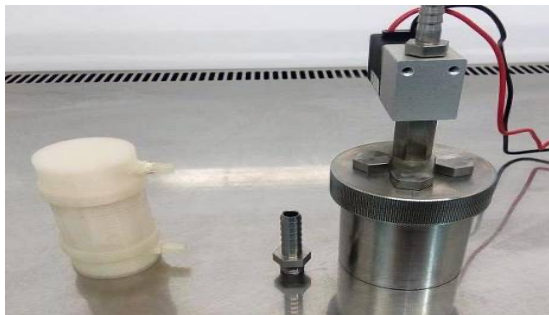


В



Устройство динамического заселения КИК (Патент на полезную модель RU 190863 U1, 15.07.2019. Заявка № 2019104311 от 15.02.2019.)

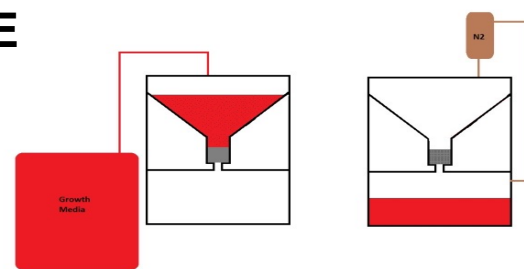
Г



Д



Е

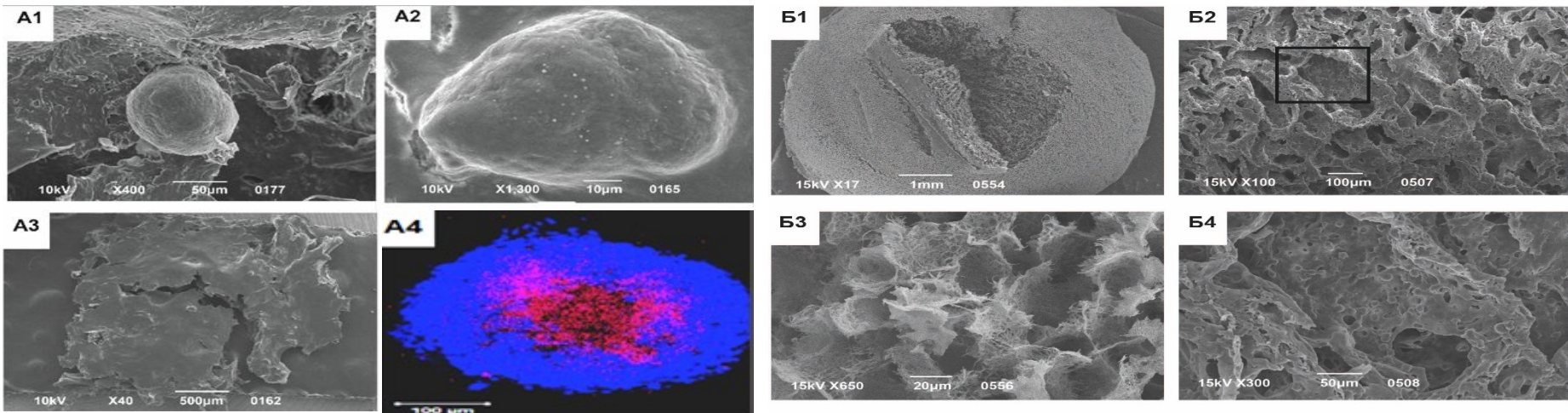


А-схема ус-ва для стандартизированных дефектов **Б**-общий вид ус-ва для стандартизированных дефектов

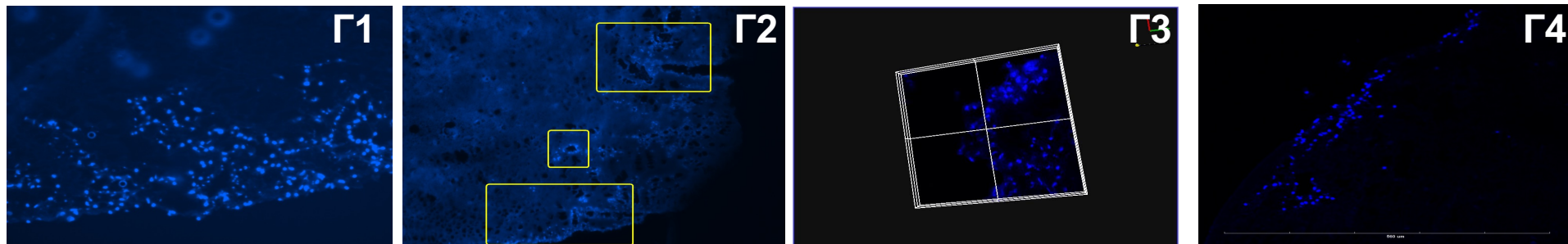
В – смоделированный дефект коленного сустава **Г**-устройство для создания КИК

Д – подготовка скаффолда для создания КИК **Е** – принципиальная схема ус-ва для создания КИК

Пролиферация МСК в составе КИК



A1-A3 СЭМ агрегатов на поверхности скаффолда **A4** – конфокальная микроскопия агрегата (красный – антитела на коллаген 2 типа, синий – ядра клеток) **Б1,Б3** СЭМ скаффолда без клеток на 14 сутки. **Б2,Б4** – СЭМ скаффолда с клетками (КИК) на 14 сутки

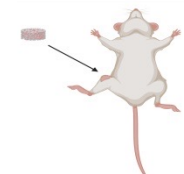
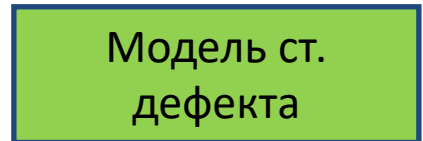
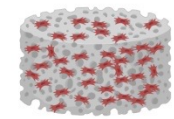
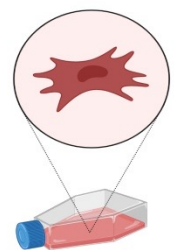
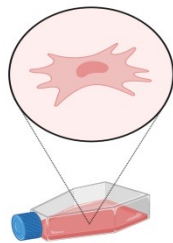
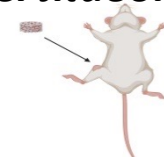


Г1,2 – криосрез КИК, 14 сутки. Окраска DAPI (ядра клеток) **Г3,4** – конфокальная микроскопия КИК, 14 сутки, окраска DAPI (ядра клеток)

Bozhokin et al. (2021)

Схема эксперимента по применению КИК *in vivo*

Группы животных



Получение и культивирование клеток

клетки + модификация

Создание КИК

Дефект+ КИК +(мод.)

Синтез PLA scaffold

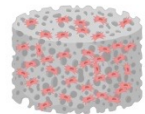
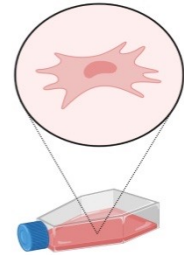
Модель ст. дефекта

Дефект

клетки

Создание КИК

Дефект+ КИК(без мод.)

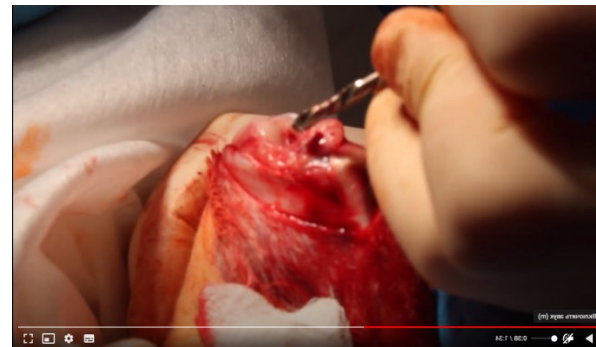


Имплантация КИК в эксперименте на кроликах.

Материалы и методы: гистология и СЭМ

Группа	Количество животных		
	14 суток	30 суток	90 суток
Контрольная (дефект)	8	8	8
Опытная (дефект + имплантация КИК)	12	12	12

А



Б



А – создание дефекта Б – имплантации конструкции **КИК** с фибробластами человека

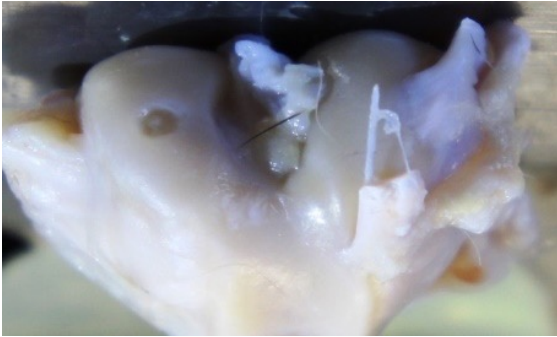
Результаты макрофото:

14 суток

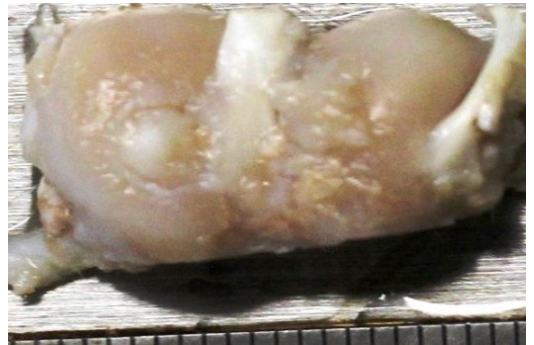
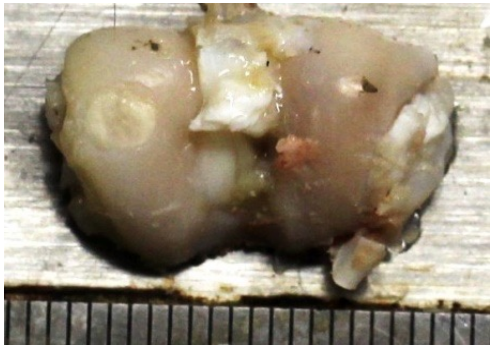
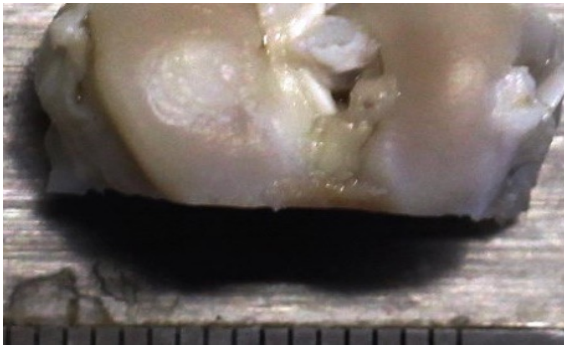
30 суток

90 суток

С



Е



Макрофото области дефекта. Контрольная группа (С) – просто дефект.
Экспериментальная группа (Е) – дефект и имплантация КИК с фибробластами человека

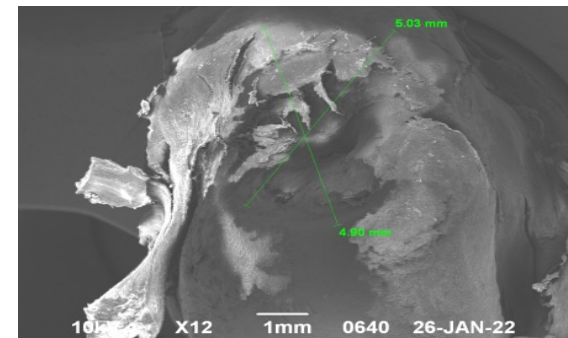
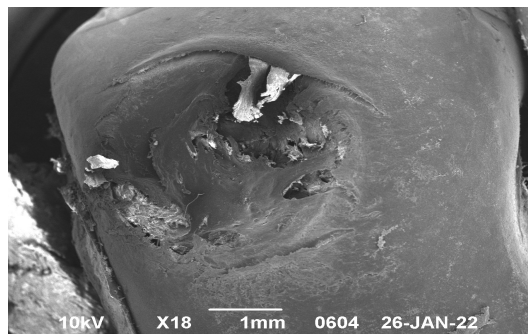
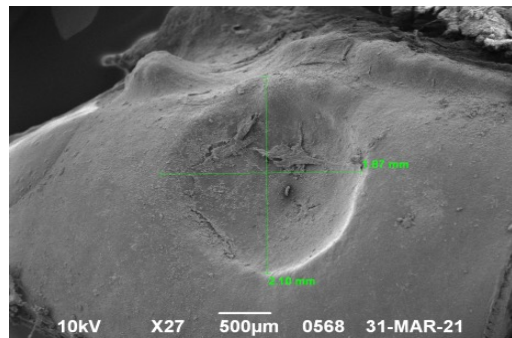
Результаты СЭМ:

14 суток

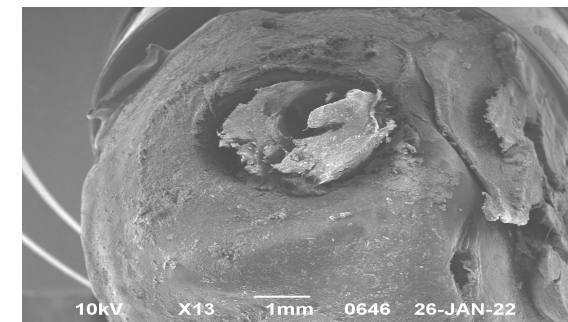
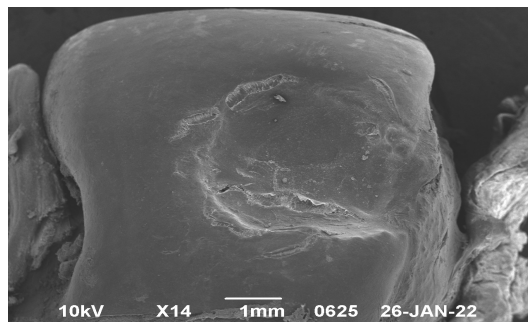
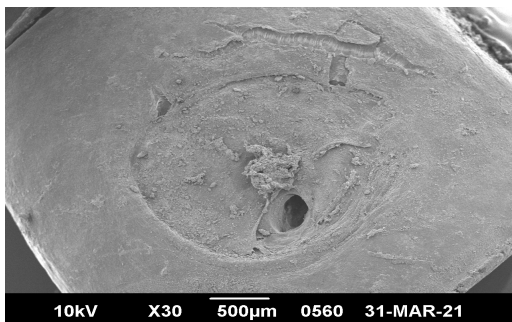
30 суток

90 суток

С



Е



СЭМ фото области дефекта. Контрольная группа (С) – дефект.
Экспериментальная группа (Е) дефект и имплантация КИК с фибробластами человека

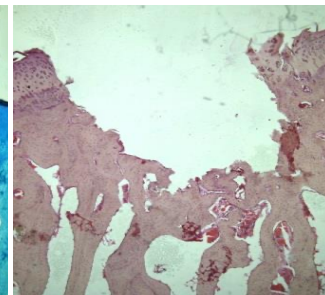
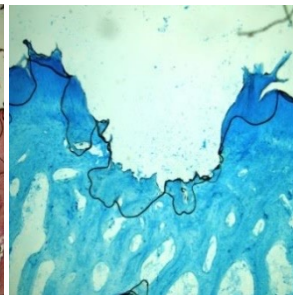
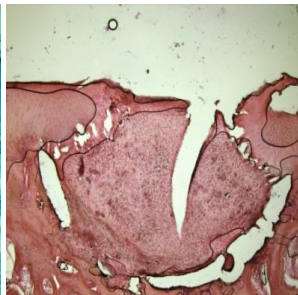
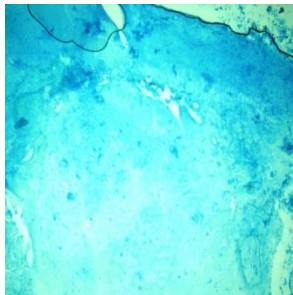
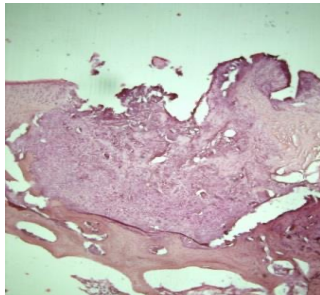
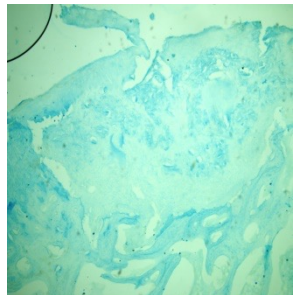
Результаты гистологического исследования:

14 суток

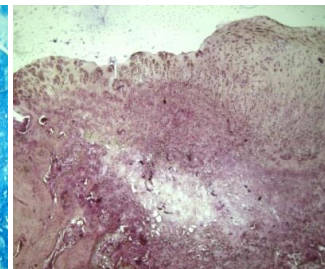
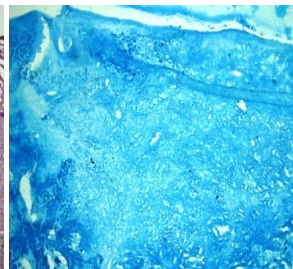
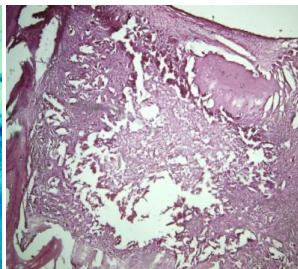
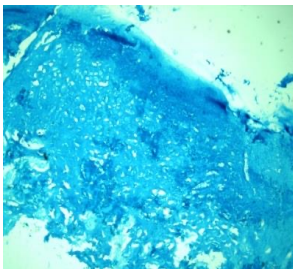
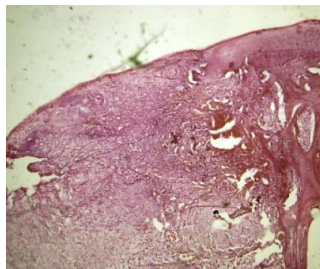
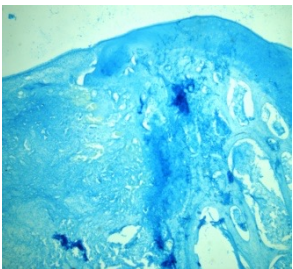
30 суток

90 суток

С



Е



Альциановый синий

Гематоксилин и эозин

Альциановый синий

Гематоксилин и эозин

Альциановый синий

Гематоксилин и эозин

СЭМ фото области дефекта. Контрольная группа (С) – дефект.
Экспериментальная группа (Е) дефект и имплантация КИК с фибробластами человека

Результаты конфокальной микроскопии

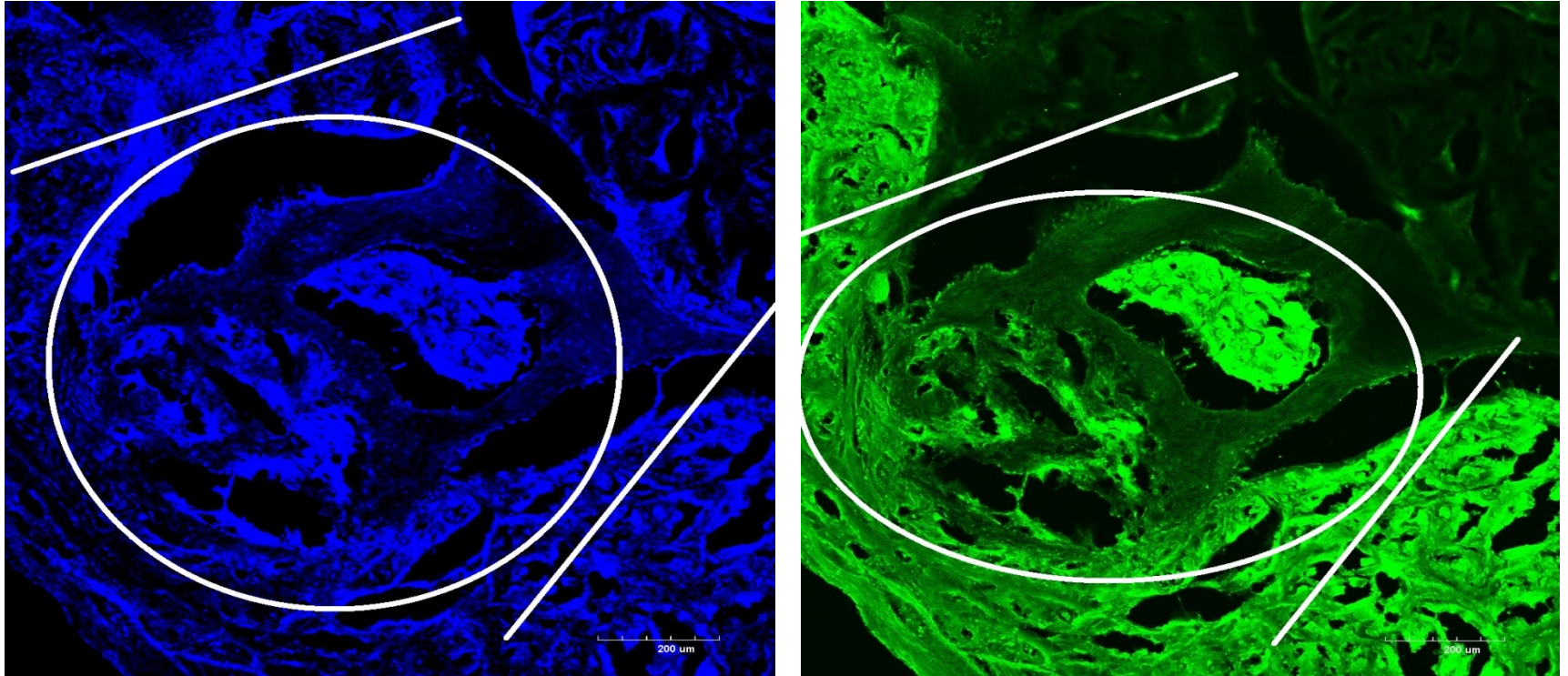
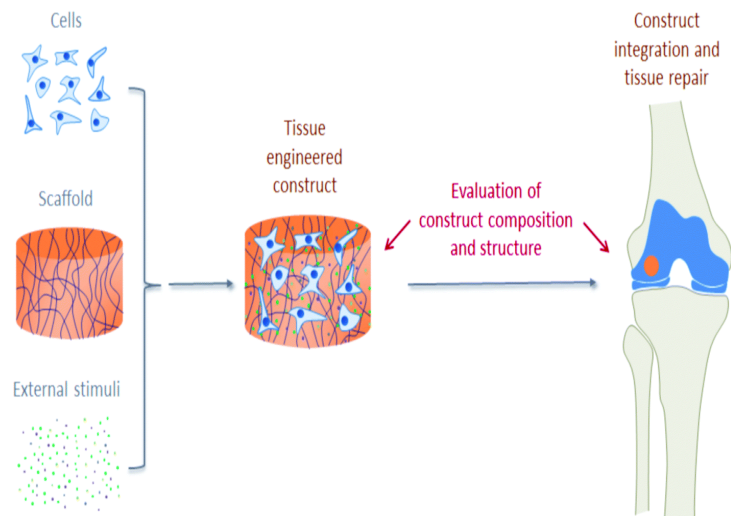


Фото области дефекта. 90 сутки экспериментальная группа. Слева DAPI, справа зеленый – антитела на коллаген 1 типа. В окружности область дефекта.

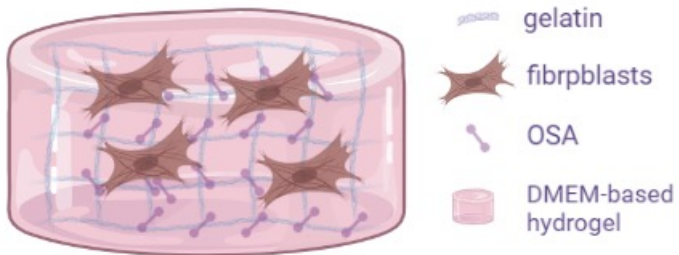
Часть IV. 3д биопечать КИК.

Требования к «идеальной КИК» для гиалинового хряща

- 1) Биосовместимость
- 2) Биodeградируемость
- 3) Отсутствие цитотоксичности
- 4) Пролиферация клеток
- 5) Модификация клеточной составляющей
- 6) Фиксация в области дефекта хряща
- 7) Модификация механических параметров
- 8) Стандартизация при производстве
- 9) Экономическая доступность



РАЗРАБОТКА И ХАРАКТЕРИСТИКА БИОЧЕРНИЛ (GEL-OSA-Коллаген 1 типа \ Желатин)



Принципиальный состав гидрогеля

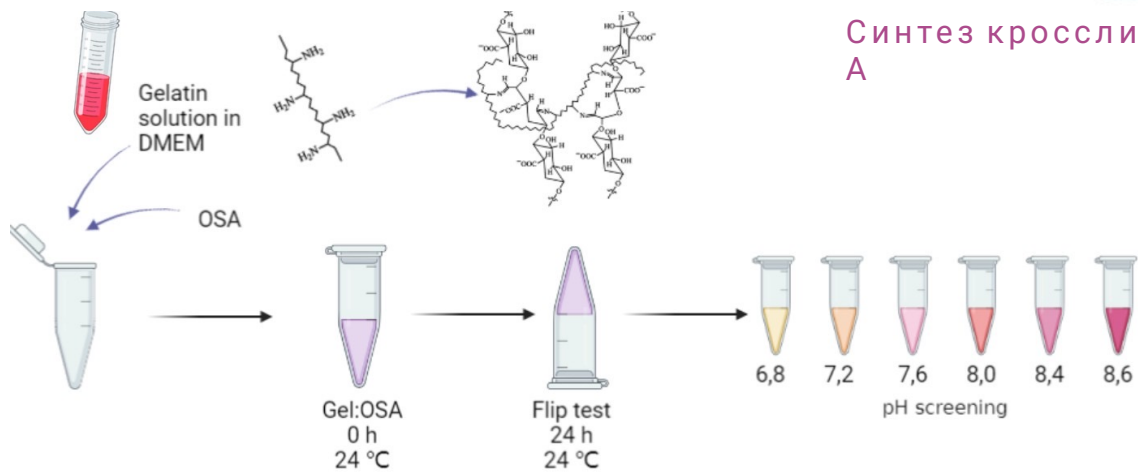
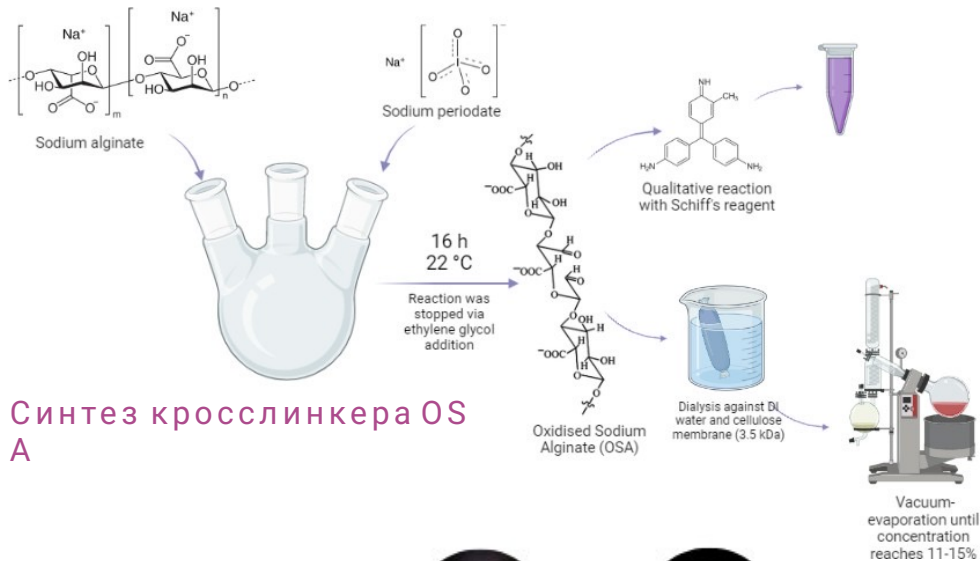
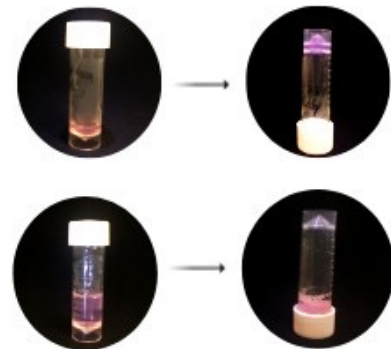


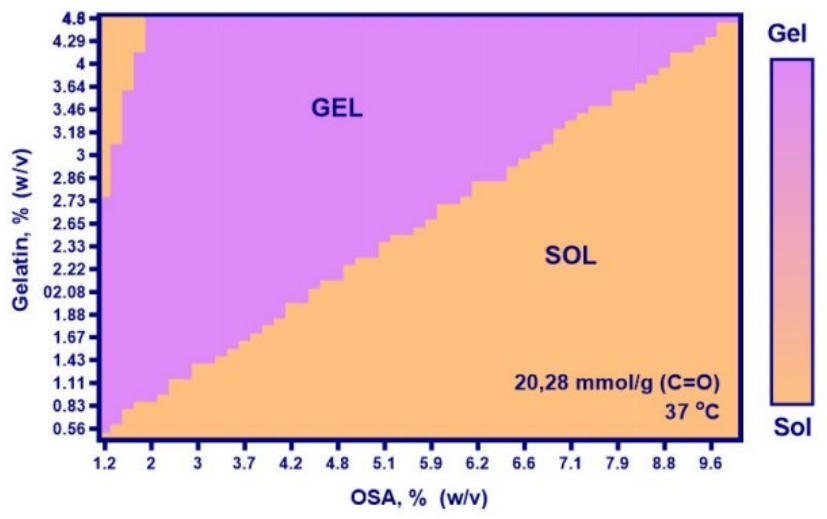
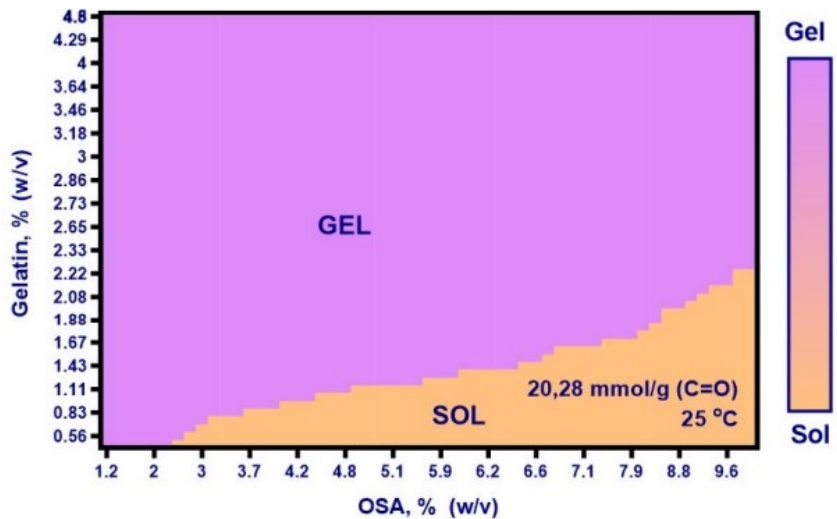
Схема приготовления флип-тестов



Синтез кросслинкера OSA



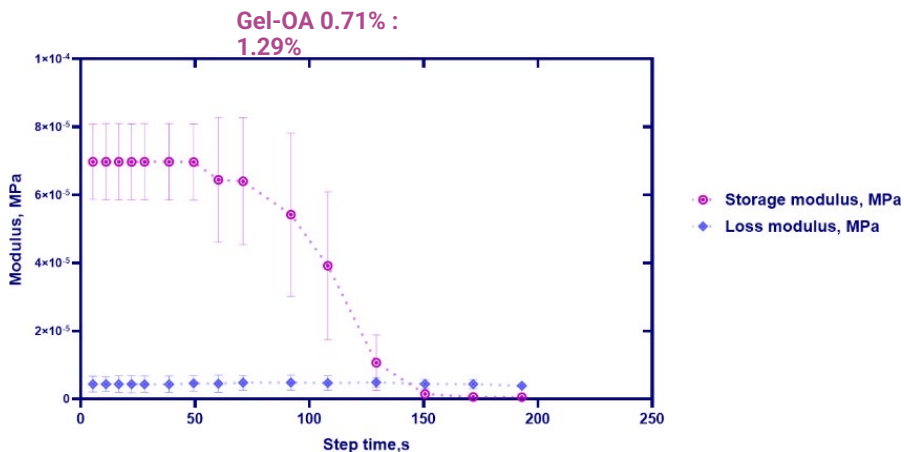
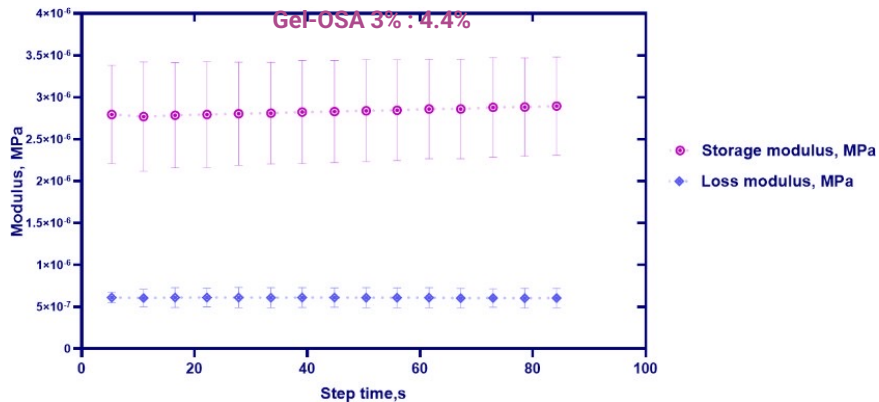
ЗОЛЬ-ГЕЛЬ ПЕРЕХОД GEL-OSA - СОБЫТИЕ, ЗАВИСЯЩЕЕ ОТ ТЕМПЕРАТУРЫ И МАССОВОГО СООТНОШЕНИЯ КОМПОНЕНТОВ, ЧТО БЫЛО ДОКАЗАНО СЕРИЕЙ ФЛИП-ТЕСТОВ



Гидрогели на основе ОА демонстрируют образование более жестких субстратов, чем гидрогели на основе ОСА

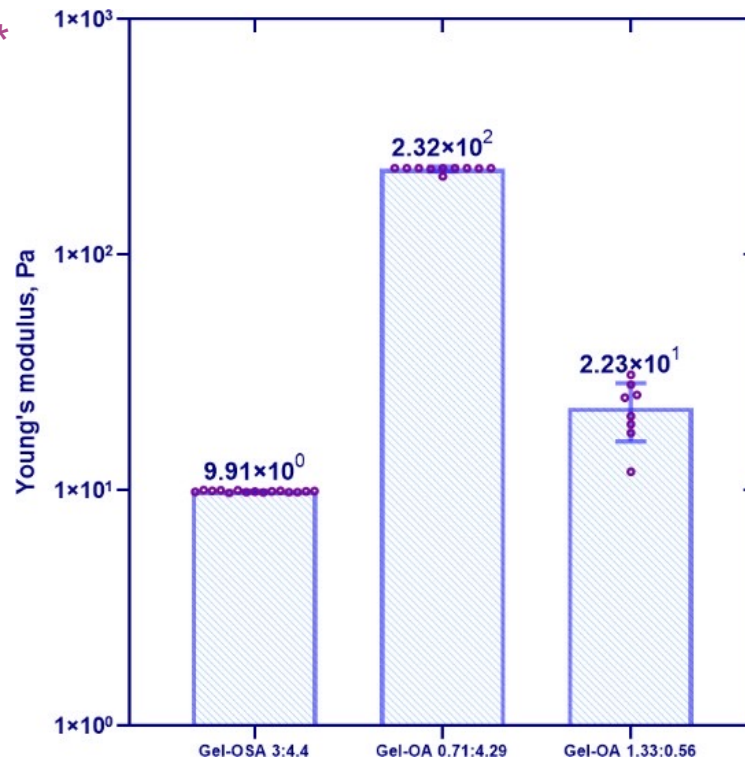


*



* Кривые G' и G'' Gel-OSA 3%:4.4% и Gel-OA 0.71% : 1.29% при 37 °C композиций непарный t-критерий, p(значение)<0,05

**

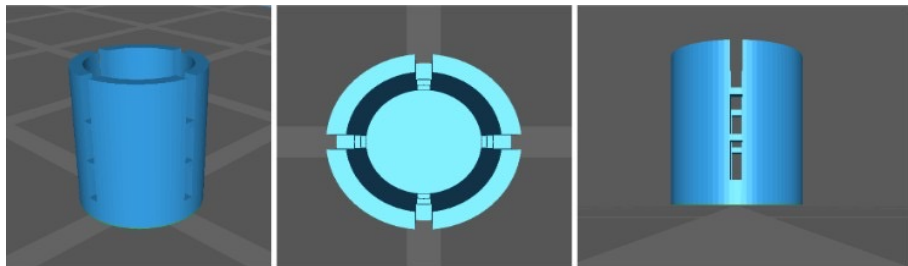


**Модуль Юнга исследованных композиций при 37 °C, непарный t-критерий, p(значение)<0,05

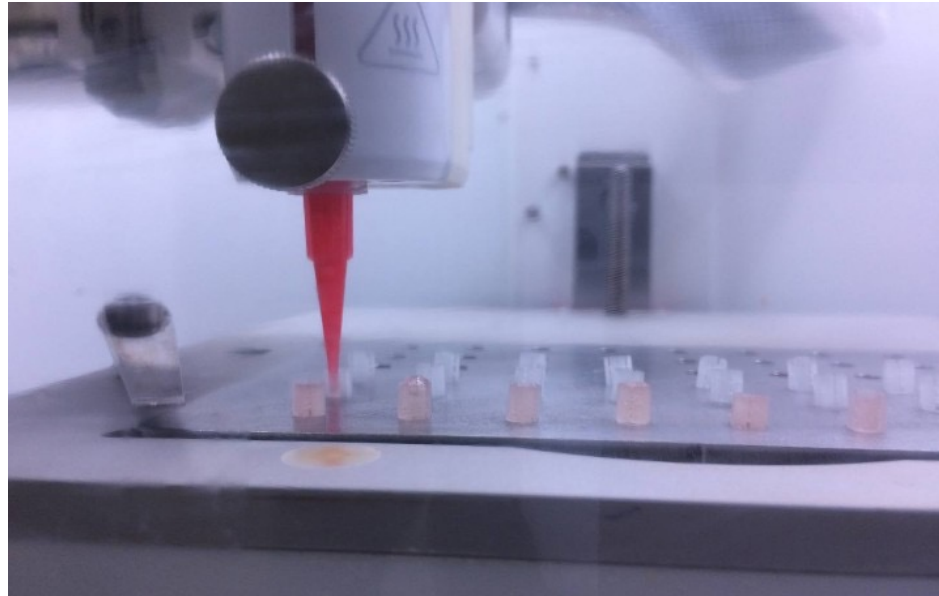


3D-печать
принтингом

каркаса импланта, комбинированная с геле-
с ориентировочной оценкой выживаемости культуры
фибробластов



Общий вид, вид сверху и вид сборки поддерживающего
полимерного скаффолда для гидрогеля, Chitubox slicer, V1.9.0



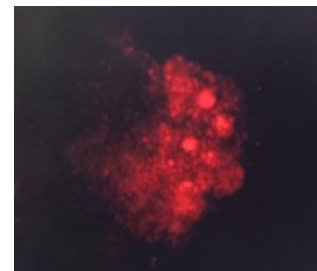
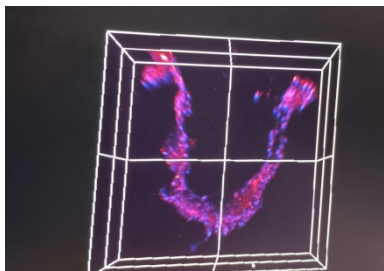
Процесс 3Д геле-экструзионной печати модельных имплантов на
основе гидрогеля Gel-OSA



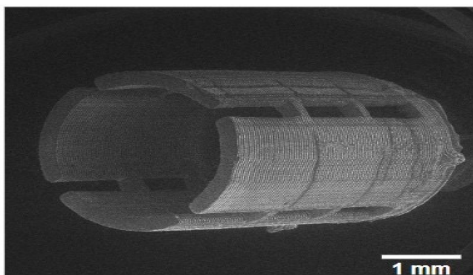
LCD напечатанные полимерный скаффолды (общее живое фото)

Инкубирование: 3D-биопечатные имплантаты были перенесены в 48-луночный планшет со средой DMEM с 10% FBS и 50 мкг/мл пенициллина-стрептомицина в качестве антибиотика.

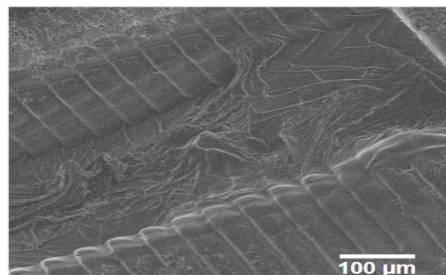
Результаты последнего этапа



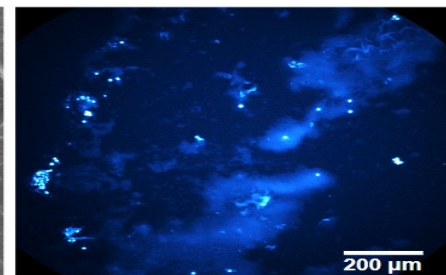
Клеточно - инженерная конструкция (КИК), напечатанная на 3D-принтере (d = 4 мм. h = 5 мм), живое фото



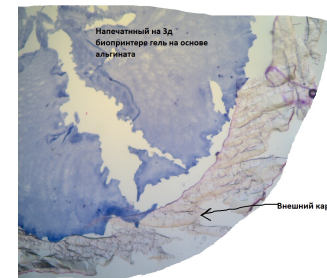
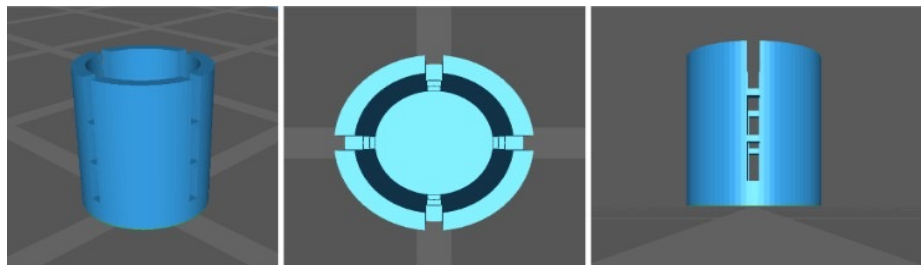
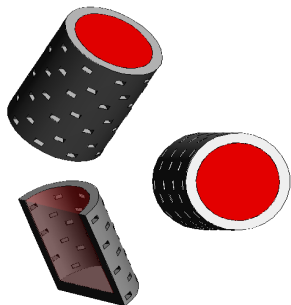
СЭМ-изображение каркаса, общий вид, SE-детектор (Oxford Scanning Electron Microscope TESCAN Vega 3)



СЭМ-изображение КИК на 1-й день инкубации, общий вид, детектор SE. Фиксацию проводили с помощью формалина pH = 7,2, сушка в крит. точке CO2



Флуоресцентная микроскопия гистологического среза. Фиксацию проводили с помощью формалина pH = 7,2, окрашивание DAPI.



Спасибо за внимание

