

Streszczenie

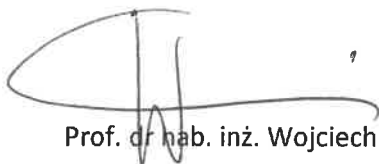
Z punktu widzenia materiałoznawcy: kość to materiał kompozytowy składający się z fazy organicznej i nieorganicznej. Dokładniej mówiąc, wagowo około 70% kości to materia nieorganiczna – złożona ze specyficznej substancji krystalicznej zwanej hydroksyapatytem, która jest impregnowana zanieczyszczeniami, oraz macierz organiczna – złożona z kolagenu typu I, różnych białek niekolagenowych i komórek kostnych. Kość ma wyjątkową zdolność do przekształcania się, która trwa przez całe życie, aby dostosować właściwości materiału kości do stawianych jej wymagań mechanicznych oraz utrzymać biomechaniczne parametry szkieletu poprzez zapobieganie gromadzeniu się uszkodzeń zmęczeniowych a także zapewnić składniki tkanki dostępne dla homeostazy mineralnej. Jednak w przypadkach, gdy występuje duży defekt kości spowodowany poważnym urazem lub chorobą ogólnoustrojową, złamania patologiczne (jako konsekwencja przerzutów lub jako część pierwotnego nowotworu złośliwego), zakażenia kości i/lub otaczających ją tkanek lub dopływ krwi, ta zdolność do odpowiedniej przebudowy zawodzi. Może to spowodować trwałe uszkodzenia tkanki kostnej, które mogą prowadzić do utraty jej funkcjonalności u osób dotkniętych chorobą. Obecnie podstawę leczenia klinicznego dużych ubytków kostnych stanowią autologiczne przeszczepy kostne lub osteogeneza dystrykcyjna. Chociaż zalety biologiczne tych technik są liczne, nadal istnieją obawy co do dostępności przeszczepów, wynikające z ograniczonej ilości tkanki i znacznego ryzyka zachorowalności w miejscu pobrania, wydłużonego czasu powrotu do zdrowia a także wysokiego ryzyka infekcji. W ostatnich dekadach, aby przezwyciężyć ograniczenia związane z obecnym podejściem medycyny, inżynieria biomedyczna zaproponowała zbadanie funkcjonalnych alternatyw mających na celu wsparcie regeneracji kości w z krytycznymi defektami. Cel ten miał zostać osiągnięty poprzez produkcję rusztowań tkanki kostnej, które łączą osteokondukcję i integrację, zapewniają stabilność mechaniczną i w zależności od potrzeby albo integrują się ze strukturą kości, albo ulegają rozłożeniu i są wydalane przez organizm.

Inżynieria tkankowa (TE) ma na celu stworzenie złożonego środowiska o zbliżonych właściwościach do tych występujących *in vivo* przy użyciu zaawansowanych materiałów do rekapitulacji niszy tkankowej. Komórki, trójwymiarowe rusztowania i czynniki sygnalizacyjne są trzema głównymi i niezbędnymi składnikami TE. Z biegiem lat materiały i procesy stawały się coraz bardziej wyrafinowane, umożliwiając naukowcom precyzyjne dopasowanie końcowych cech chemicznych, mechanicznych, strukturalnych i biologicznych projektowanych rusztowań. W pierwszym rozdziale chciałabym omówić cel, hipotezę, zakres i systematykę niniejszej rozprawy doktorskiej. W drugim rozdziale zwróciłam uwagę na dwie specyficzne klasy polimerów pochodzenia naturalnego: białka włókniste i glikozaminoglikany (GAG). Materiały te są bardzo obiecujące dla postępów w dziedzinie medycyny regeneracyjnej, ponieważ 1) generalnie przechodzą szybką przebudowę *in vivo* sprzyjającą neowaskularyzacji i funkcjonalnej organizacji komórek oraz 2) wywołują znikomą reakcję immunologiczną zapobiegając ciężkiej odpowiedzi zapalnej, co jest niezwykle istotne dla pomyślnej integracji skonstruowanych rusztowań z tkanką pacjenta. Omówiono najnowsze osiągnięcia medycyny regeneracyjnej w zakresie użycia białek i GAG, ich zalety i wady oraz bieżące wyzwania związane z przeniesieniem obecnie proponowanych rozwiązań na praktyczne zastosowanie kliniczne. Dokładny przegląd literatury na temat polimerów pochodzenia naturalnego: białek włóknistych i glikozaminoglikanów (GAG) wykazał, że hydrożele z metakrylanu żelatyny (GelMA) są jednym z najbardziej odpowiednich polimerów mających zastosowanie w inżynierii tkanek kostnych.

Metakrylan żelatyny (GelMA) to niedrogi, fotosieciewalny, reagujący na komórki hydrożel, który przyciągnął uwagę w szerokim zakresie zastosowań w inżynierii tkankowej. GelMA dzięki możliwości modyfikacji stężenia polimeru, stopnia metakrylacji i intensywności aplikowanego światła UV może być dostosowana do różnych zastosowań w TE. W trzecim rozdziale rozprawy przedstawiłam wpływ stężenia polimeru w rusztowaniach GelMA na różnicowanie osteogenne. W związku z tym przygotowano rusztowania GelMA o stężeniu 5 i 10% polimeru i scharakteryzowano je pod względem porowatości, wielkości porów, charakterystyki pęcznienia i właściwości mechanicznych. Następnie, w celu oceny wpływu stężenia polimeru na właściwości osteogenne komórek hodowano na rusztowaniach GelMA zanurzonych w odpowiednich pożywkach o właściwościach osteogennych szczerze mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące ze szpiku kostnego (MSC). Po 7, 14, 21 i 28 dniach hodowli oceniono zawartość DNA, odkładanie się wapnia i aktywność ALP przy pomocy analizy kolorymetrycznej. Dodatkowo, w celu oceny odkładania się wapnia użyto mikrotomografii komputerowej (μ CT). Uzyskane dane sugerują, że hydrożele GelMA przygotowane z 5% stężeniem polimeru sprzyjają jednorodnemu zwapnieniu macierzy zewnątrzkomórkowej i są doskonałym kandydatem do zastosowań w inżynierii tkanki kostnej.

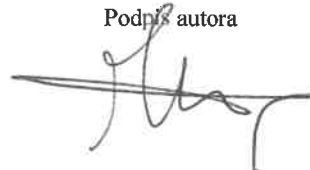
Następnie biorąc pod uwagę wyniki pochodzące z eksperymentów *in vitro*, opracowałam koncepcję druku trójwymiarowego (3D) nowych rusztowań z metakrylanu żelatyny w inżynierii tkanki kostnej, które możnaby zastosować na etapie badań klinicznych. Przełożenie technologii z laboratorium do zastosowań klinicznych musi przebiegać zgodnie z pewnymi krokami. Pierwszym krokiem jest opracowanie koncepcji weryfikacji tezy, która może być zastosowana na etapie badań klinicznych. Biorąc pod uwagę wymagania dobrej praktyki produkcyjnej (GMP) i potencjalne przełożenie na grunt medyczny, rusztowania BTE (bone tissue engineering) powinny być wytwarzane zgodnie z znormalizowanymi metodami, które to powinny być połączone z oceną po przeszczepie przy użyciu powszechnie stosowanych technologii obrazowania medycznego. W rozdziale czwartym przedstawiłam optymalizację procesu druku 3D rusztowań z GelMA, który można później przełożyć na GMP. Co więcej, wykazałam, że po wszczepieniu *in vivo*, rusztowania z GelMA charakteryzują się wysoką biokompatybilnością. W badaniach histologicznym nie zaobserwowałam oznak zwłóknienia lub zahamowania tworzenia się kości. Zintegrowane obrazowanie CT-MRI umożliwiło jednoczesne ilościowe i jakościowe monitorowanie zarówno tworzenia się nowej kości, jak i degradacji rusztowania. Podsumowując, uzyskane wyniki pokazują wysoki potencjał rusztowań z GelMA w druku 3D i ich potencjalne zastosowanie w inżynierii tkanki kostnej. W tym samym badaniu oceniono również rusztowania GelMA, w których komórki MSC zostały dodane do hydrożelu podczas drukowania 3D. Uzyskane wyniki wykazały wysoką żywotność komórek oraz duże zwapnienie tkanki w porównaniu z rusztowaniami, do drukowania których użyto hydrożelu bez komórek. Tym samym sugerując, że rusztowania z GelMA mogą również być wykorzystane do dostarczania komórek. W końcowym etapie prac, aby uzyskać dodatkowe informacje o rusztowaniach poprzez obrazowanie CT, przed procesem drukowania 3D wprowadzono do hydrożelu GelMA nanocząsteczki złota (AuNP). Oceniono wpływ dodatku AuNP na wzmocnienia tłumienia promieniowania rentgenowskiego bez zmiany właściwości fizykochemicznych drukowanych 3D rusztowań z GelMA.

Podpis promotora



Prof. dr hab. inż. Wojciech Świąszkowski

Podpis autora



Mgr Nehar Celikkin