

ZAKLJUČNO POROČILO

*o rezultatih internega raziskovalnega projekta UKC Maribor
za obdobje od 10. 2. 2017 do 9. 2. 2022*

A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra projekta:	IRP-2016/02-02	
Naslov projekta:	OBLIKOVANJE IN TESTIRANJE CELIČNIH NOSILCEV ZA TKIVNI INŽENIRING V ORTOPEDIJI	
Vodja projekta:	prof. dr. Matjaž VOGRIN, dr. med.	
Trajanje projekta (leta, od-do):	5 let	10. 2. 2017 – 9. 2. 2022
Velikost projekta	<input checked="" type="checkbox"/> mali (do 10.000,00 EUR)	<input type="checkbox"/> veliki (do 50.000,00 EUR)

B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

1. Poročilo o realizaciji predloženega programa raziskovalnega projekta - opis raziskave (izhodišča, predstavitev problema, metode dela), ugotovljeni rezultati in uporaba (*največ do 3 strani*)

OPIS RAZISKAVE

Regenerativna medicina predstavlja sodobni vidik zdravljenja različnih organskih sistemov, tkiv in celic, ki so zaradi poškodbe ali bolezni okvarjeni, z namenom doseči popolno obnovo in vzpostavitev normalne funkcije. V naravnem procesu celjenja vsa tkiva in celice nimajo regenerativne sposobnosti spontane obnove, zato se stanje popolnoma ne pozdravi in nastanejo lahko trajne posledice. V človeškem mišično-skeletnem sistemu je značilna omejena sposobnost celjenja oz. regeneracija predvsem hrustančnega tkiva, kar vodi v sklepno bolečino, motnjo gibljivosti, šepanje, delo nezmožnost in razvoj artroze (OA).

Intenzivno raziskovanje v zadnjem času kaže na to, da tkivni inženiring hrustančnega tkiva še vedno ostaja med najzanimivejšimi raziskovalnimi področji. Kljub temu je prehod v klinično prakso zaradi nerešenih vprašanj še vedno oviran. Najsodobnejši koncept razvoja hrustančnega tkiva združuje uporabo biokompatibilnih in biorazgradljivih materialov (nosilcev), ki zagotavljajo celično oz. tkivno podporo in mehansko stimulacijo, in uporabo rastnih faktorjev, za celično rast in ohranjanje zelenega fenotipa. V ta namen je potrebno izdelati posebne tridimenzionalne matrike (nosilce), ki delujejo kot začetna podpora celicam, da se pritrjujejo, razmnožijo in tvorijo svoj zunajcelični matriks ter sčasoma ustvarijo hrustančno tkivo z ustreznimi biomehanskimi lastnostmi. Končni cilj inženiringa hrustančnega tkiva je ustvarjanje umetnih matrik, ki jih je mogoče uporabiti pri uporabi *in vivo* (npr. za obnovo sklepnega hrustanca).

IZHODIŠČA

Glavni namen tkivnega inženirstva je obnove tkiva z uporabo celic, ki jim z izbiro ustreznih nosilcev in drugih biomaterialov ustvarimo ugodne pogoje za njihovo rast, razmnoževanje in izražanje ustreznih genov za njihovo diferenciacijo v tkivno specifično obliko. Tkivni inženiring hrustanca predstavlja velik izziv zaradi specifičnih lastnosti hrustančnega tkiva, počasne rasti, značilne strukturne urejenosti zunajceličnega matriksa, izrednih mehanskih lastnosti in velike stopnje de-diferenciacije v celičnih kulturah. Celični nosilec za tkivni inženiring hrustanca mora biti biokompatibilen, zajemati ustrezne arhitekturne značilnosti (poroznost, prepustnost por, mehanske lastnosti, itd.) in promovirati hrustančni fenotip. Za izgradnjo takšnih nosilcev se danes v največji meri uporablja sodobna tehnologija 3D (bio)tiskanja nosilcev.

PREDSTAVITEV PROBLEMA

Za uspešno izvedbo projekta so ključne tri sestavine: razvoj primerne biokompatibilnega nosilca z ustrezno mehansko čvrstostjo, ustrezne celice, in kombinacija ustreznih bioaktivnih molekul (npr. rastni faktorji). Pričakujemo, da bo interakcija komponent tkivnega inženiringa ustvarila ustrezni umetni tkivni konstrukt, ki se bo sposoben integrirati v poškodovan sklepni hrustanec. Splošni cilj projekta je izboljšati kvaliteto življenja ortopedskih bolnikov s hrustančno patologijo. Glavni namen raziskave je razvijati nove metode za učinkovitejšo regeneracijo hrustančnega tkiva, ki bodo v prihodnje potencialno prenesene v klinično prakso.

METODE DELA

Aktivnosti:

Pregled literature in zasnova nosilcev

- Pregled osnovnih materialov s poudarkom na naravnih materialih (polisaharidi in proteini)
- Pomen hidrogelov v hrustančnem tkivnem inženiringu
- Pregled tehnologij za izgradnjo celičnih nosilcev (3D tiskanje)
- Izdelava teoretičnih osnov in izdelava shematskega prikaza za izgradnjo 3D celičnih nosilcev
- Možnosti klinične uporabe

Zasnova in priprava 3D biotiskanih nosilcev za hrustančno tkivo

- Izbira materila (primerni materiali in kombinacije materialov), priprava vzorčnih filmov
- Zasnova 3D nosilcev z opredeljenimi x , y in z dimenzijami in opredeljenimi mikro in makroporoznimi strukturami

Karakterizacija materiala

- Določanje kemične sestave vzorčnih materialov in 3D tiskanih nosilcev
- Določanje morfologije površine vzorčnih materialov in 3D tiskanih nosilcev z uporabo AFM in SEM
- Določanje poroznosti strukture (velikost, oblika, poroznost) in ocenjevanje medsebojne povezljivosti, mehaničnon testiran

MEJNIKI:

1. Protokol za pripravo 3D tiskanih nosilcev, primernih za gojenje hrustančnega tkiva

PRIČAKOVANI REZULTATI:

1. Oblikovanje nosilca za tkivni inženiring

OBVLADOVANJE TVEGANJ:

Tveganje:

- Nosilce ne bo možno natiskati ali ne bodo samostojno stali
- Nosilec ne bo primeren za tkivno inženiring
 - neprimerna mikro in makrostruktura
 - nezadostne mehanične lastnosti
 - težava z biokompatibilnostjo in biorazgradljivostjo

Ukrep:

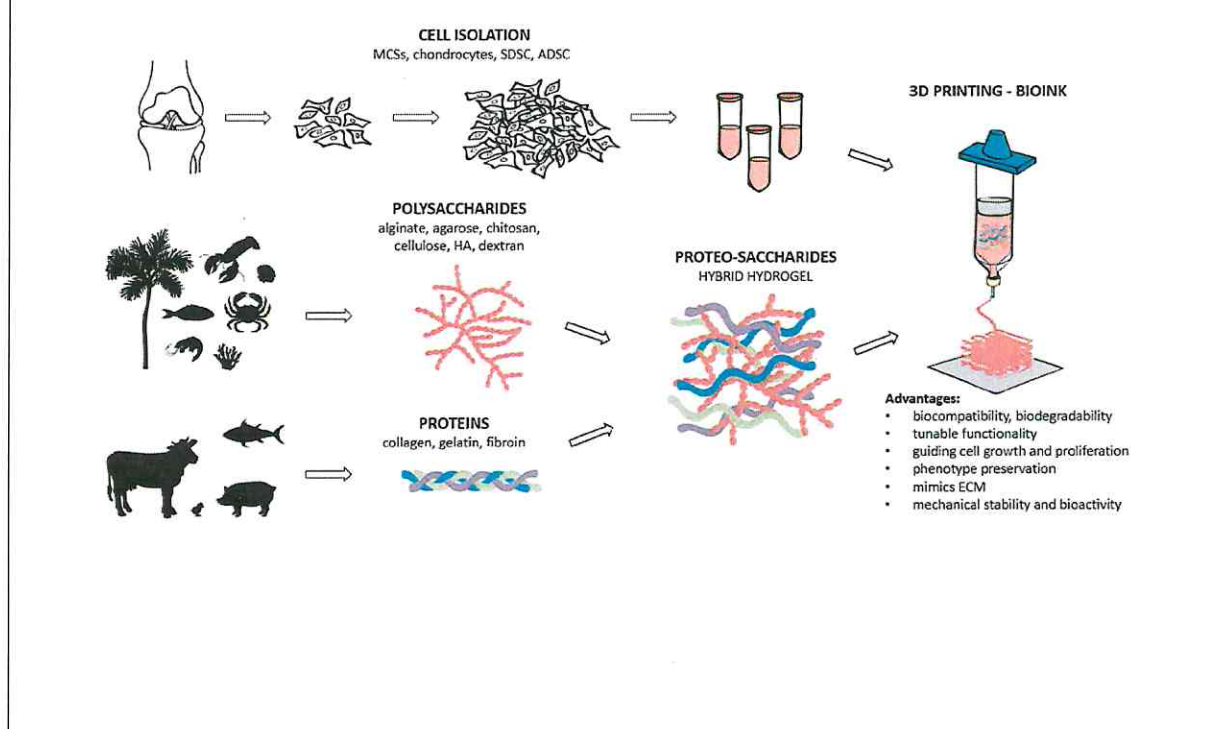
- Sprememba parametrov 3D tiskanja
- Sprememba materiala
- Sprememba parametrov zasnove/oblike

UGOTOVLJENI REZULTATI IN UPORABA

V tem raziskovalnem projektu smo se osredotočili na oblikovanje in testiranje celičnih nosilcev za tkivni inženiring hrustančnega tkivnega inženiringa. Sodoben koncept pri razvoju nosilcev v inženirstvu hrustančnega tkiva predstavlja uporabo hidrogelov iz naravnih materialov v kombinaciji s 3-dimenzionalnimi (3D) tehnologijami tiskanja, zato smo se tudi v tem projektu usmerili v razvoj takšnih nosilcev. To je predvsem posledica odlične biokompatibilnosti naravnih materialov, lastne bioaktivnosti in posebne mikrostrukture, ki podpira regeneracijo tkiva. Uporaba naravnih biomaterialov, zlasti polisaharidov in beljakovin, predstavlja privlačno strategijo za tvorbo nosilcev, saj posnemajo strukturo zunajceličnega matriksa (ECM) in usmerjajo rast celic, proliferacijo in ohranjanje fenotipa. Hidrogeli na osnovi polisaharidov, kot so alginat, agarosa, hitozan, celuloza, hialuronan in dekstran, so značilni materiali za ogrodje z ugodnimi lastnostmi, nizko citotoksičnostjo in nastavljivo funkcionalnostjo. Te vrhunske lastnosti je mogoče nadalje dopolniti z različnimi beljakovinami (npr. kolagenom, želatino, fibroinom), ki tvorijo nove osnovne formulacije, imenovane »proteosaharidi«, saj izboljšajo fiziološko signalizacijo in mehansko moč nosilca.

Iz tega področja smo opravili obsežen pregled literature in objavili pregledni članek iz področja 3D biotiskanih nosilcev na osnovi naravnih materialov, ki se uporabljajo v hrustančnem tkivnem inženiringu. Nadalje smo razpravljali o možnosti tiskanja in tvorbi biočrnila za razvoj hidrogelov na osnovi proteosaharidov, vključno z možnim kliničnim prenosom. Izdelali smo natančni protokol za razvoj takšnih materialov, kar prikazuje shematski prikaz in opravili pregled do sedaj testiranih naravnih hidrogelnih nosilcev, ki so bili izdelani iz naravnih materialov (polisaharidov v kombinaciji s proteini).

Slika: Shematski pregled kombinacije proteosaharidov, njihov izvor in priprava biočrnila za tvorbo hidrogelov v hrustančnem tkivnem inženiringu.



2. Ocena stopnje realizacije in zastavljenih raziskovalnih ciljev (obkrožite)

DA NE

Če je odgovor NE, napišite kratko utemeljitev

Raziskovalne cilje v tem raziskovalnem projektu smo delno realizirali. Kot je razvidno iz metod dela, smo opravili pregled literature, naše ugotovitve smo objavili v preglednem članku, medtem ko eksperimentalnega dela raziskave še nismo opravili. Glavni razlog za to je, da nismo uspeli pridobiti ustreznega tkiva oz. celic, ki predstavlja ključni del tkivnega inženiringa. Ustrezne celice namreč pridobivamo na Oddelku za ortopedijo tekom operativnega postopka pri vstavitvi umetnega kolenskega sklepa (TKA) po metodi, ki smo jo tekom predhodnih raziskav že objavili (Naranda et al, 2017). Zaradi epidemije Covid-19 smo takšne operaciji namreč izvajali v omejen obsegu. Kljub temu smo pred kratkim pridobili ustrezne celice in opravili njihovo izolacijo. Prav tako smo nabavili ustrezen material za proizvodnjo nosilcev, kot smo jih opisali v preglednem članku, zato pričakujemo, da bomo eksperimentalni del tega projekta uspešno zaključili in rezultate predvidoma predstavili še v tem letu.


NARANĐA, Jakob, GRADIŠNIK, Lidija, GORENJAK, Mario, VOGGRIN, Matjaž, MAVER, Uroš. Isolation and characterization of human articular chondrocytes from surgical waste after total knee arthroplasty (TKA). *PeerJ*. March 2017, vol. 5, str. 1-20, ilustr. ISSN 2167-8359.


3. Pridobitev za UKC Maribor - doktorska disertacija, članek, prispevek na znanstveni konferenci/simpoziju ali kongresu, patent, uvedba novih dejavnosti, smernic in metod ali izboljšanje že obstoječih itd. (največ do 1 stran)

Doktorska disertacija, magistrska naloga, raziskovalna naloga, specialistična naloga:
Objavljeni članki: Naranda, Jakob, Matej Bračič, Matjaž Vogrin, and Uroš Maver. 2021. "Recent Advancements in 3D Printing of Polysaccharide Hydrogels in Cartilage Tissue Engineering" <i>Materials</i> 14, no. 14: 3977. https://doi.org/10.3390/ma14143977
Nove metode, smernice, dejavnosti:
Prispevki (konference, srečanja, kongresi, simpoziji): NARANĐA, Jakob. Novel strategies in the treatment of cartilage lesions. V: <i>Book of abstracts</i> . South East European Forum on Orthopaedics and Traumatology, 24th-26th April 2019, Dubrovnik. [S.l.: s. n., 2019]. Str. 49. [COBISS.SI-ID 6704959]

4. Sumaričen prikaz ciljev projekta (obvezno izpolnite!)

	Doktorat, magisterij, raziskovalna ali specialistična naloga	Objavljeni članki	Nove metode, smernice, dejavnosti	Prenos znanja (konference, srečanja, kongresi, simpoziji)
(DA/NE)	NE	DA	NE	DA
Število		1		1

Datum: <u>10.3.2022</u>	Podpis vodje projekta: 
----------------------------	--

Izpolni Oddelek za znanstveno-raziskovalno delo	
REALIZACIJA PROJEKTA	Pregledal in ocenil predstojnik OZRD:
<input checked="" type="checkbox"/> CILJI IZPOLNJENI V CELOTI	Podpis: <u></u>
<input type="checkbox"/> CILJI DELNO IZPOLNJENI	Datum: <u>25.3.22</u>
<input type="checkbox"/> CILJI NISO IZPOLNJENI	
Porabljena sredstva (v EUR): <u>11.195,28</u> (podatki OZRD; iz FRS ni še noben podatek)	
PREDVIDENA SREDSTVA: 11.166,15	