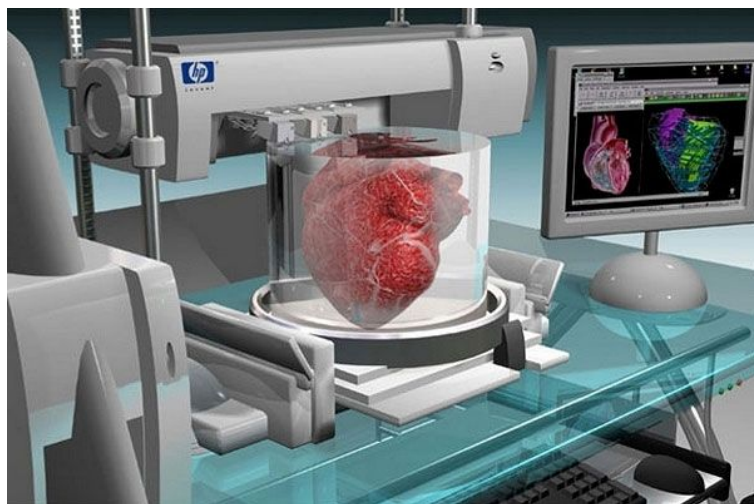


Проект по теме «Аддитивные технологии 2030»





I. Введение

Гортань – это важный орган дыхательной системы, участвующий в проведении воздуха, голосообразовании и защите дыхательных путей от попадания пищи. Как и любой другой орган, она подвержена различным заболеваниям, опасность которых очень высока.



Серьезным заболеванием является рак, связанный с развитием злокачественного новообразования в гортани. Частота встречаемости около 3% от всех злокачественных опухолей человека. Преимущественно встречается у мужчин 40-60 лет. Наиболее частыми причинами проявления заболевания являются курение и алкоголь. В России ежегодно выявляют рак гортани у 6,5-7 тыс. человек.



Из-за малой осведомлённости пациентов и врачей чаще всего рак гортани выявляют уже на последних стадиях. На III и IV стадиях заболевания один из возможных вариантов лечения – это операция по удалению или проведение химиолучевой терапии.

В связи с тем, что гортань является важным органом дыхательной системы, необходимым для жизни человека, его создание с помощью аддитивных технологий мы считаем наиболее актуальным.

Показатели относительной 5-летней выживаемости при раковой опухоли в преддверии полости гортани:

- рак I стадии: 59%;
- рак II стадии: 59%;
- рак III стадии: 53%;
- рак IV стадии: 34%.

Показатели относительной 5-летней выживаемости при раковой опухоли в голосовой щели:

- рак I стадии: 90%;
- рак II стадии: 74%;
- рак III стадии: 56%;
- рак IV стадии: 44%.

Показатели относительной 5-летней выживаемости при раковой опухоли в подголосовой полости:

- рак I стадии: 65%;
- рак II стадии: 56%;
- рак III стадии: 47%;
- рак IV стадии: 32%.

Показатели относительной 5-летней выживаемости при раковой опухоли в гортанной части глотки:

- рак I стадии: 53%;
- рак II стадии: 39%;
- рак III стадии: 36%;
- рак IV стадии: 24%.

Структура заболеваемости раком в России

Мужчины



Цели и задачи

Цель проекта: создание гортани с помощью 3D-биопринтера.

Задачи проекта:

1. Выявить особенности строения гортани.
 2. Оценить преимущества и риски создания гортани с помощью 3D-биопринтера.
 3. Создать технологическую цепочку синтеза гортани.
 4. Создать 3D модель гортани.
-

II. Основная часть

1. Строение гортани

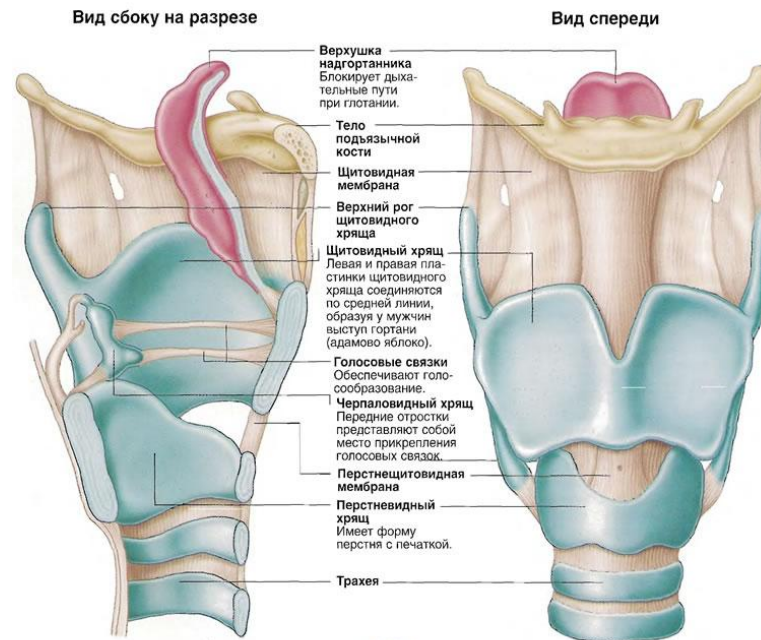
Каркас гортани (хрящевой скелет) образован несколькими подвижно соединёнными между собой гиалиновыми хрящами. Хрящи соединены связками, мембранами и относительно подвижными суставами.

Гортань состоит из непарных хрящей:

- перстневидный,
- щитовидный,
- надгортанный,

и парных хрящей:

- черпаловидный,
- рожковидный,
- клиновидный.



► Гортань – орган, выполняющий функцию проведения воздуха в дыхательные пути и голосообразования. Внутренние структуры гортани перекрывают воздухоносные пути во время глотания.



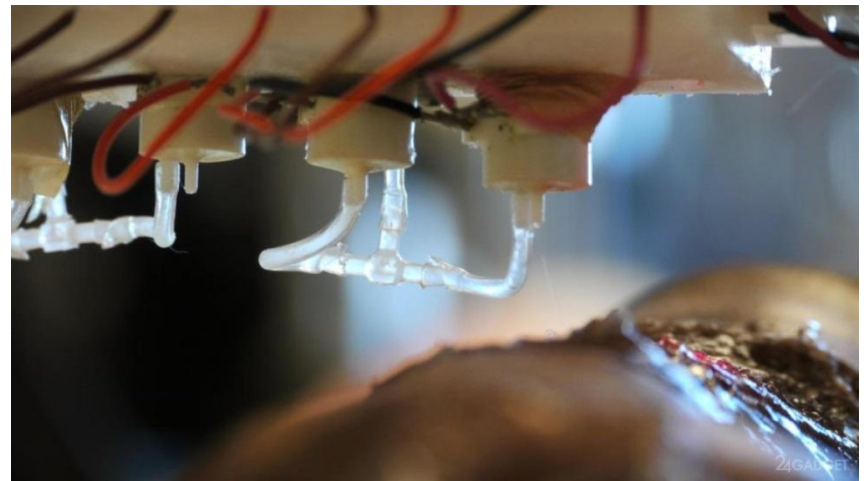
2. Преимущества создания гортани с помощью 3D-биопринтера

Мы предлагаем создание гортани для дальнейшей пересадки пациенту с помощью 3D-биопринтера. Этот способ имеет ряд преимуществ:

1. Меньше шансов отторжения органа организмом.
2. Сокращение времени получения необходимого органа.
3. Экономически более выгодно, так как себестоимость биопечати будет снижаться по мере автоматизации процесса, развития методик и увеличении объёмов заказов.
4. Точность печати органов

Риски:

1. Отторжение после трансплантации.



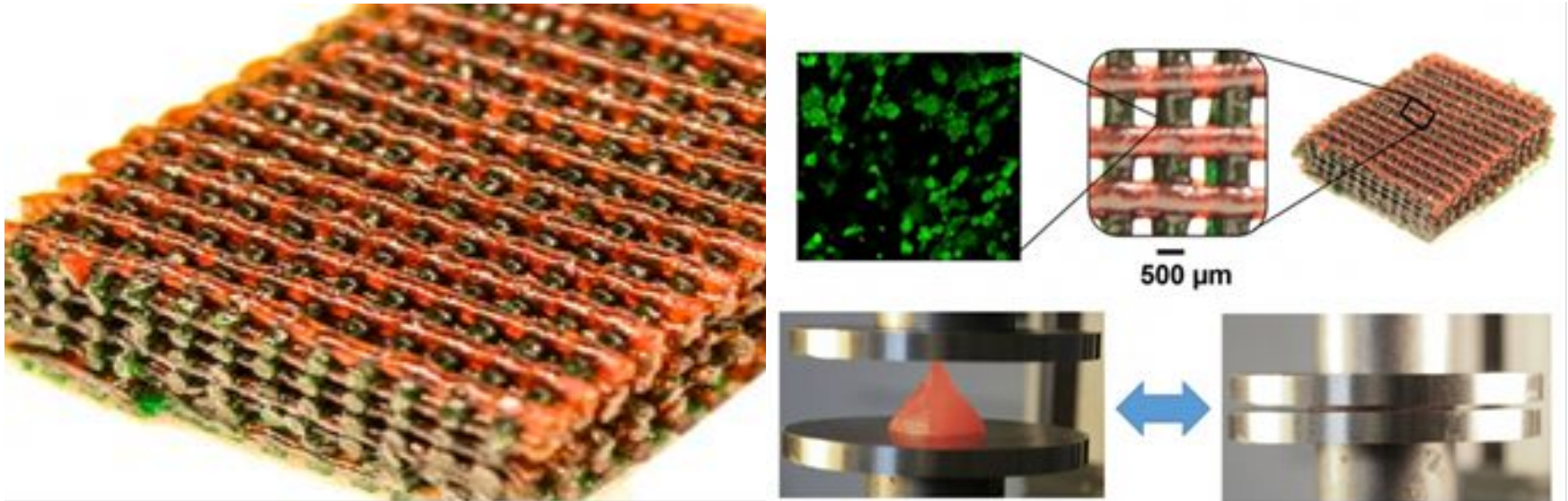
3. Каркас для создания гортани

Для создания гортани требуется каркас, на который будут наноситься необходимые для развития органа клетки. В качестве каркаса мы предлагаем гидрогель - это полимерный материал, способный впитывать и удерживать большое количество воды. Выбранный нами гидрогель представляет собой комбинацию полиэтиленгликоля (ПЭГ), альгината натрия и наноглины. ПЭГ и альгинат натрия - широко распространенные полимеры. Оба они обладают высокой биосовместимостью, а схема синтеза не предполагает нагрева до высоких температур. Это позволяет включать в состав гидрогеля живые клетки (например, стволовые). Альгинат натрия обеспечивает гибкость каркаса. ПЭГ повышает его пористость, что необходимо для поступления к клеткам питательных веществ и кислорода. А это создает основу для размножения (пролиферации) биоматериала.



Для придания гидрогелю вязкости, необходимой для печати на 3D-принтере, в его составе будет использована "наноглина" — минеральное вещество, которое часто используют как добавку к полимерным композитам. При сжатии фигурки из данного гидрогеля почти в 100 раз материал восстанавливает свою структуру, также он не рвётся при пятикратном растяжении.

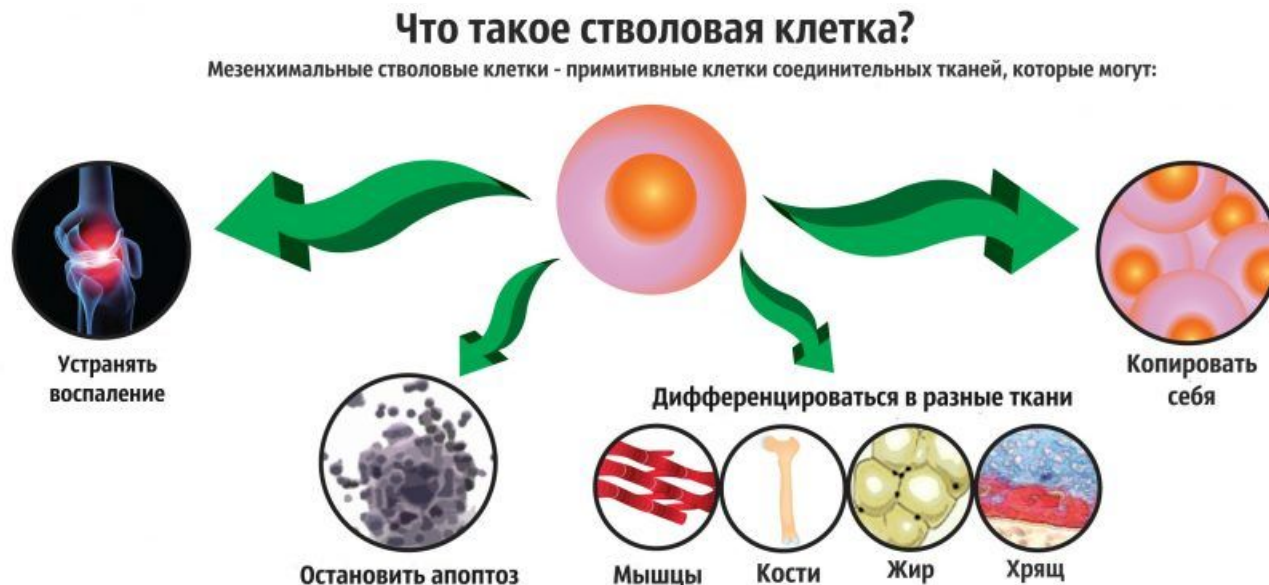
Этот материал хорошо подходит в качестве каркаса для выращивания новой ткани.



4. Использование стволовых клеток для нанесения на каркас

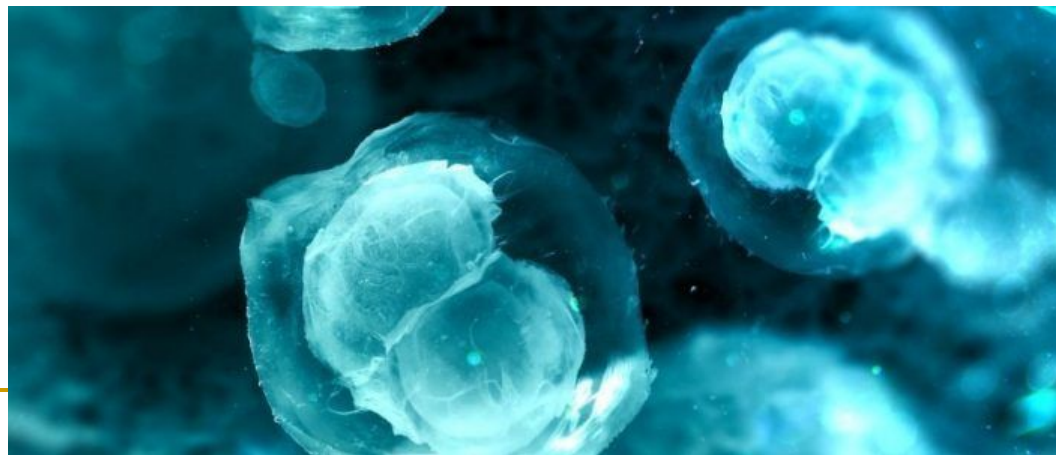
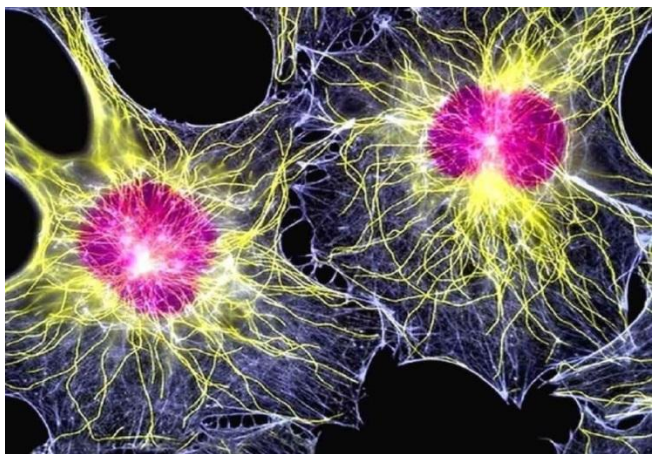
Стволовые клетки — недифференцированные (незрелые) клетки, имеющиеся у многих видов многоклеточных организмов. Они способны самообновляться, образуя новые стволовые клетки, делиться посредством митоза и дифференцироваться в специализированные клетки, то есть превращаться в клетки различных органов и тканей.

В нашем проекте мы будем использовать мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, именно их них можно создать хрящевую ткань. Их можно обнаружить в костном мозге, жировой ткани. Наиболее удобно забирать материал будет в жировой ткани.



1) Преимущества получения стволовых клеток из жировой ткани:

1. Быстрое, удобное и эффективное получение клеток в сравнении с красным костным мозгом или периферической кровью.
2. Количество полученных клеток больше, чем из других источников стволовых клеток.
3. Клеткам свойствен высокий пролиферативный потенциал – это означает, что в условиях лаборатории эти клетки возможно размножить до количества необходимого для терапии.
4. Эти клетки секретируют цитокины, различные факторы роста, факторы роста внеклеточного ремодулирования матрикса, гиалуроновую кислоту, коллаген, эластин, гликозаминогликаны и другие факторы, которые способствуют регенерации тканей.



2) Процедура забора жировой ткани:

Под местной анестезией или под интубационным наркозом (небольшое количество жира (100-200 мл) может забирается под местной анестезией) производится липосакция жировой клетчатки из области передней брюшной стенки, ягодичной области и наружной поверхности бедер. Для этого выполняется разрез кожи около 5 мм, через который подкожно вводится липосактор, соединенный с вакуумным насосом. Производится забор фрагментированной жировой ткани в стерильный сосуд. Объем сбора жировой ткани определяется объемом жировой ткани у пациента. Важно, что в 1 грамме жира содержится до $5 \cdot 10^3$ стволовых клеток. Далее, в стерильных условиях из жировой ткани выделяется стромально-васкулярная фракция, получаемая из жировой ткани (СВФЖТ).



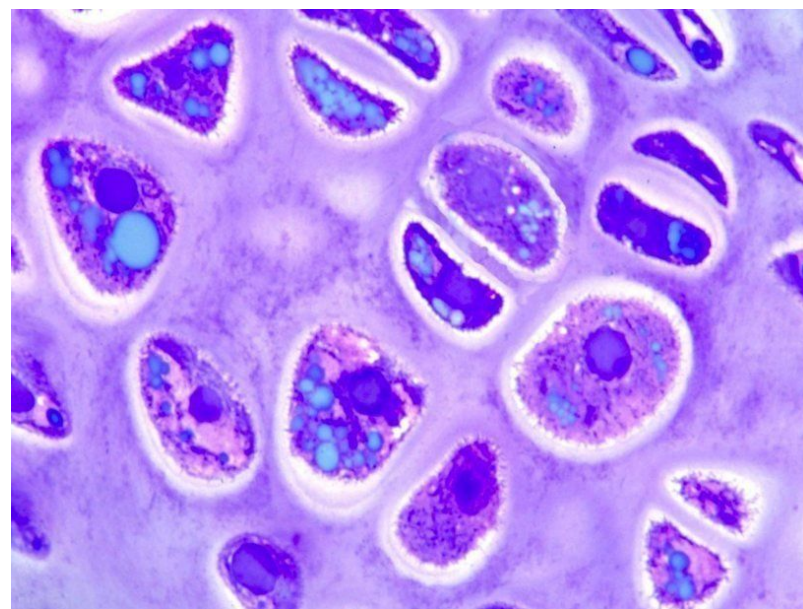
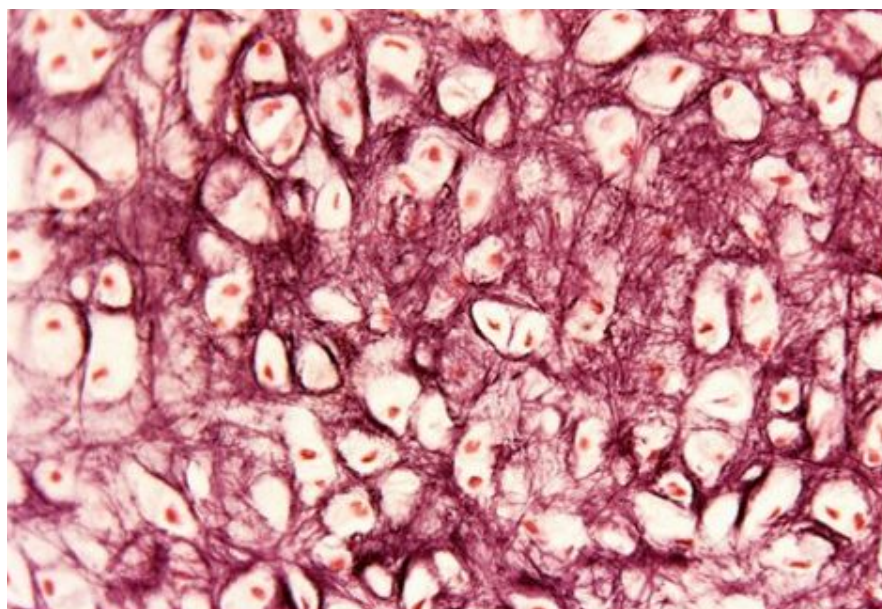
3) *Протокол выделения СВФЖТ:*

Процедура выделения стромальной сосудистой фракции жировой ткани производится в стерильных условиях, в ламинаре с использованием одноразовых расходных материалов:

1. Забранная жировая ткань промывается в фосфатном буфере 3 раза по 5 минут.
2. Производится аспирация буфера.
3. Жировая ткань растворяется в 0,1%-ном растворе коллагеназы в течение 40 минут в шейкере при температуре 37°C.
4. Зрелые адипоциты и соединительная ткань отделяются от стромально-васкулярной фракции путем центрифугирования (800 оборотов в минуту, 10 минут).
5. Для удаления эритроцитов полученные клетки ресуспендируются в лизирующем буфере (155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0.1 mM EDTA) в течение 5 минут при комнатной температуре.
6. Клетки промываются в фосфатном буфере и центрифугируются в режиме 800 об./мин., 10 минут.
7. Подсчет клеток производится в камере Горяева с использованием трипанового синего для определения количества жизнеспособных клеток.

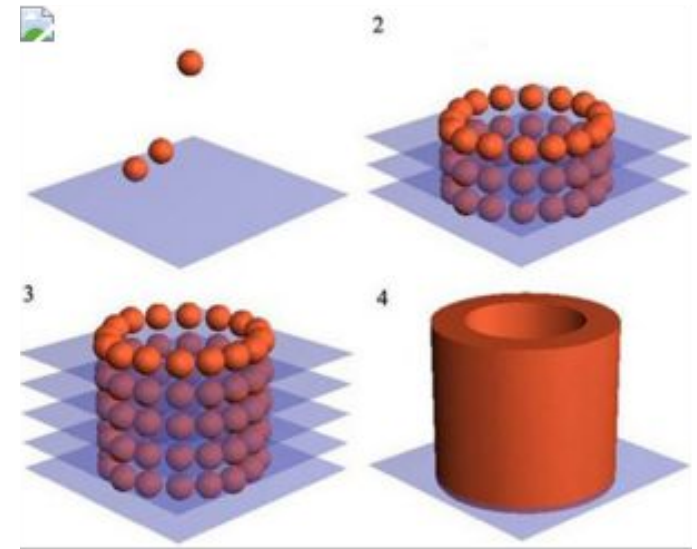
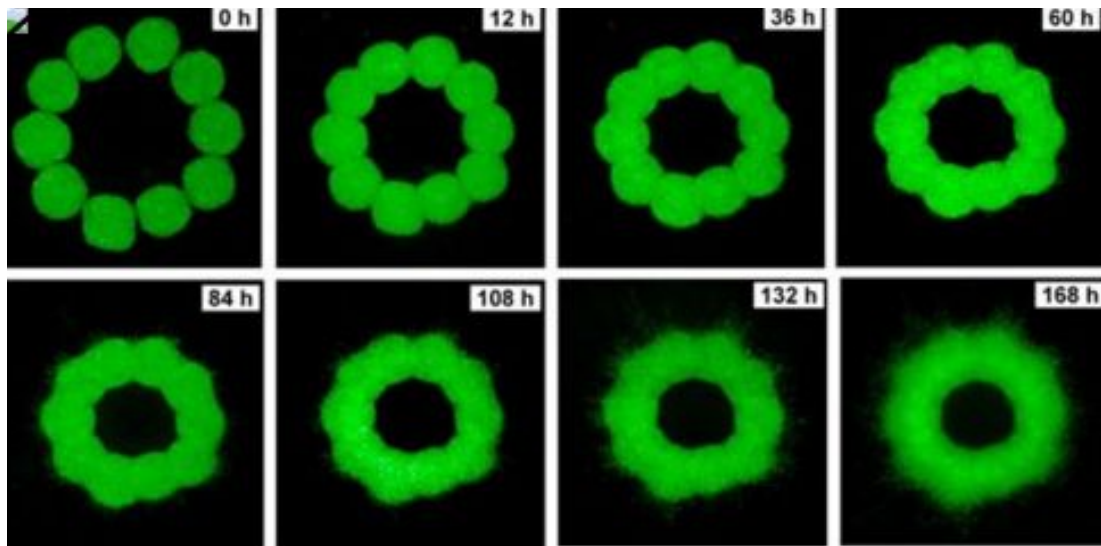
Липоаспират может храниться при комнатной температуре до 4 часов без существенного снижения жизнеспособности клеток, а при 2-8 °С — до 24 ч. Таким образом, существует значительный запас времени на транспортировку и выделение стволовых клеток.

Хондроцит — основная клетка хрящевой ткани, образуется за счет созревания и дифференцировки стволовых клеток.

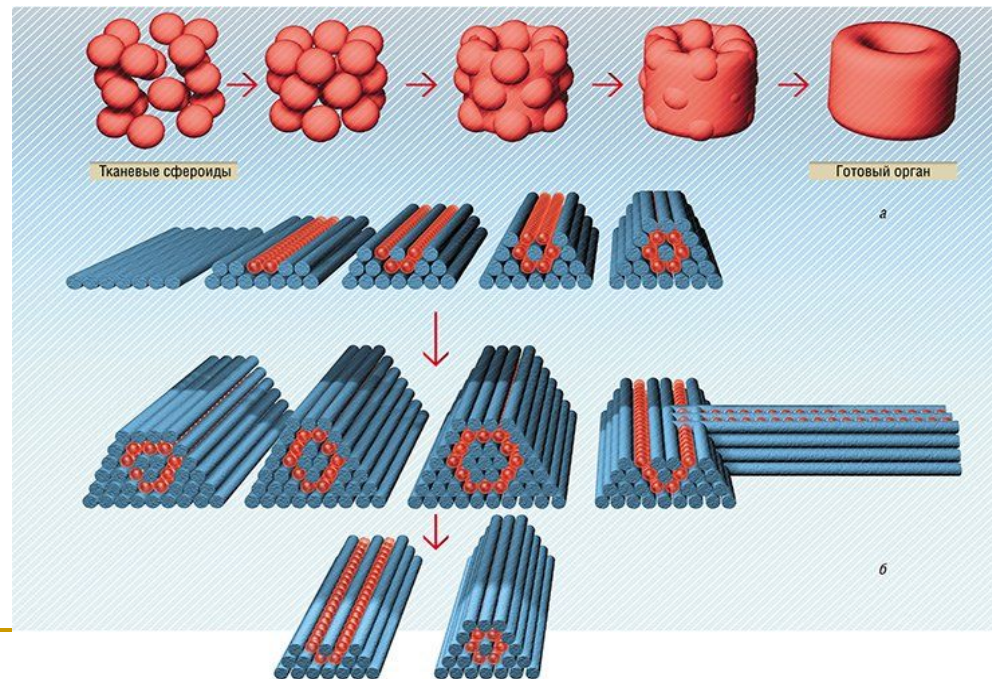


5. Создание сфероидов

Сфероид - это крошечный (200–300 мкм диаметром) шарообразный сгусток из живых клеток. Преимущество сфероидов перед отдельными клетками заключается в том, что они образуют между собой межклеточные связи и матрикс, по сути, являясь готовыми микротканями для сборки полноценной ткани. Следовательно, выживаемость клеток в сфероиде больше.



Простой вариант такой структуры можно получить путем инкубации суспензий различных клеток пациента в небольшом объеме культуральной среды, например, в формах в виде мелких пчелиных сот. Удобным «сырьем» для биопечати являются стволовые клетки жировой ткани пациента, которые мы и будем использовать. Тканевые сфероиды, произведенные из этих стволовых клеток, могут сращиваться в кольцо или торус и сокращаться под действием специфических стимулов.

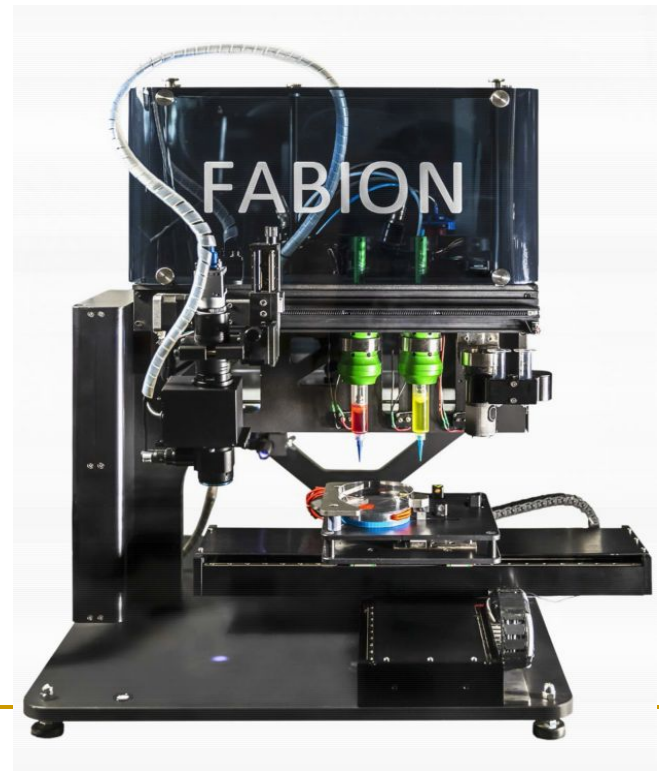


6. Технологии биофабрикации в 3D-биопринтере

В качестве среды для формирования сфероидов будет использоваться неадгезивный гидрогель, благодаря чему клетки будут прилипать не к поверхности культуральной посуды, а друг к другу, образуя шарообразную структуру. Автоматизированный вариант этой технологии, разработан в Медицинском университете Южной Каролины (США) группой В. А. Миронова. Он позволяет производить до 6 тыс. тканевых сфероидов в стандартных 96-луночных планшетах.



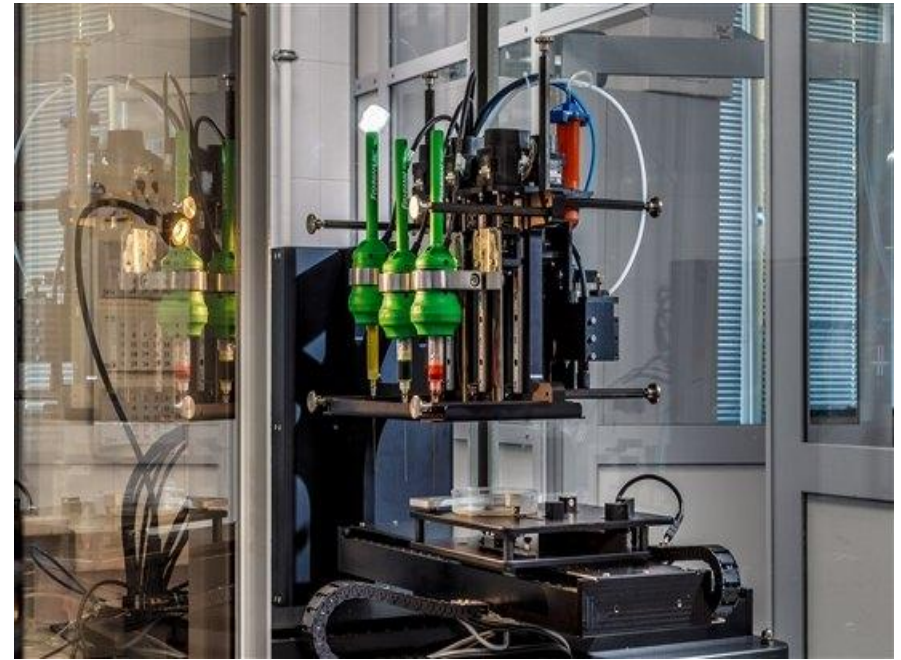
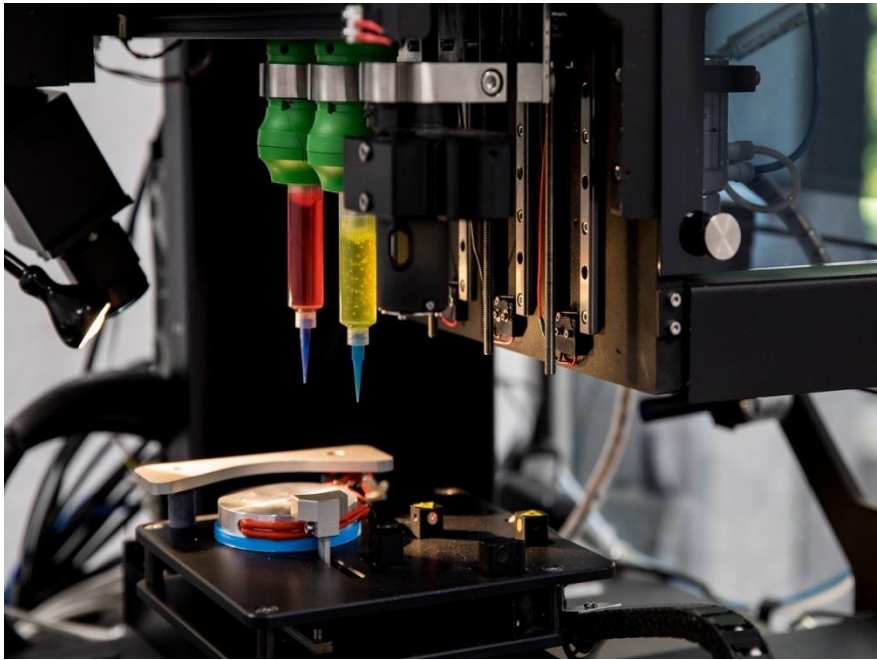
FABION – первый отечественный 3D-биопринтер оригинальной конструкции и дизайна, позволяющий точно распределять тканевые сфероиды (биочернила) в последовательных слоях гидрогеля (биобумага) согласно заданной цифровой модели. Уникальное техническое, дизайнерское и инженерное решение, разработанное в Лаборатории «3Д Биопринтинг Солюшенс», делают биопринтер универсальным. Предназначение этого аппаратно-программного комплекса – печать живого функционального трехмерного тканевого органного конструктора. Оригинальное техническое и инженерное решение базируется на особенностях собственной технологии 3D биопечати. FABION превосходит по ряду параметров существующие в мире в настоящее время коммерческие биопринтеры.



Основные преимущества и функциональные отличия биопринтера FABION:

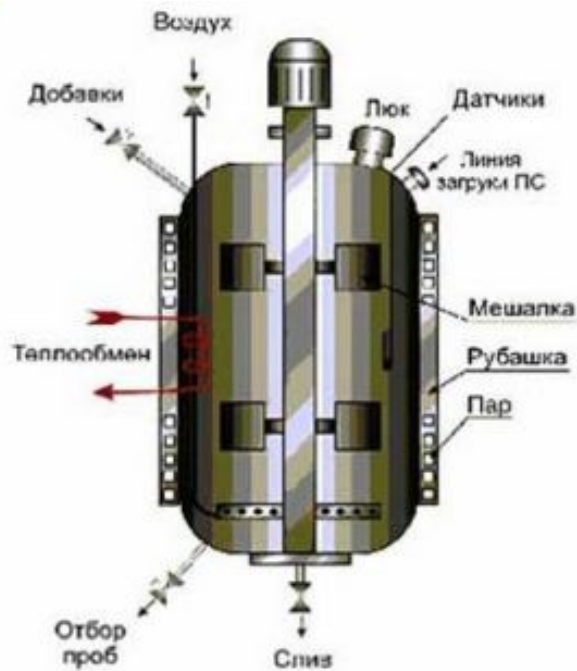
1. **Мультифункциональность.** Биопринтер FABION позволяет использовать все известные методы и способы трехмерной биопечати.
2. **Уникальное устройство** полимеризации гидрогелей (биобумаги) с использованием УФ-излучения не контактирует со сфероидами и клетками, и соответственно не повреждает ДНК клетки, в отличие от существующих в мире инженерных решений систем полимеризации, воплощенных в существующих коммерческих биопринтерах.
3. **Комбинаторность:** возможность комбинировать между собой различные вариации методов биопечати, способов нанесения, материалов. Широкий перечень управляемых программным обеспечением параметров биопечати дополняет определение комбинаторности.
4. **Точность.** Разрешающая способность печати биопринтера соответствует самым высоким требованиям стандартов ISO.
5. **Система перемещения по осям X-Y-Z выполнена с обратной связью,** что позволяет размещать форсунки биопринтера с точностью 5 микрон и тем самым точно воспроизводить заданную цифровую модель.
6. **Компактность.** Г-образный дизайн печатающей системы настоящего биопринтера обеспечивает достаточное пространство для размещения форсунок.
7. **Контроль.** Процессы трехмерной печати контролируются в режиме реального времени при помощи цифровой камеры, встроенной в биопринтер.

Данная модель 3D – биопринтера подойдёт для печати хрящей гортани. Её большим преимуществом является то, что она умеет печатать сфероидами. Также печать с помощью данного биопринтера будет обходиться дешевле, чем с помощью зарубежных.

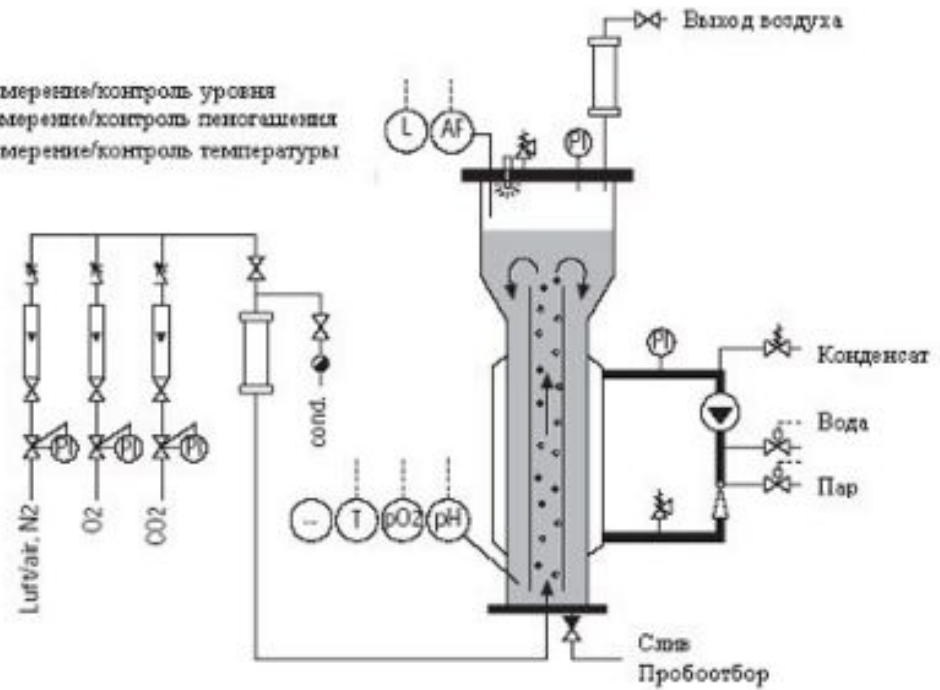


7. Помещение культуры клеток в биореактор

Биореактор – устройство, в котором биологические и биохимические процессы развиваются в жестко контролируемых искусственных условиях. Биореактор является своего рода «инкубатором», обеспечивая культуре клеток необходимое ей окружение, питание и кислород и отводя продукты жизнедеятельности.

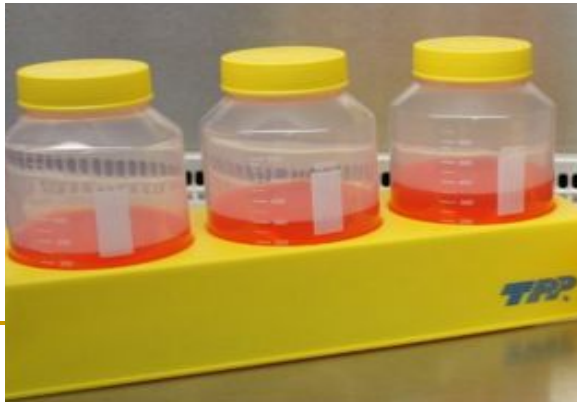


L измерение/контроль уровня
AF измерение/контроль пеногашения
T измерение/контроль температуры



Биореакторы для тканевой инженерии устроены гораздо сложнее, ведь клетки в них должны не только расти и нарабатывать какое-то целевое вещество: такие устройства предназначены для формирования полноценной ткани или даже целого органа. Для этого в питательную среду в строго определенном соотношении добавляют вещества, которые стимулируют размножение, дифференцировку и созревание тканей или тканево-инженерных конструкций.

Судя по последним данным, для этого требуется не только конкретное химическое окружение, но и определенное механическое воздействие (вибрации, растяжения и т. п.). По сути, нужно как можно точнее воспроизвести естественные условия, в которых происходят процессы формирования каждой ткани, лишь тогда в биореакторе удастся воспроизвести полноценный орган.



Стандартные условия культивирования для хрящевой ткани:

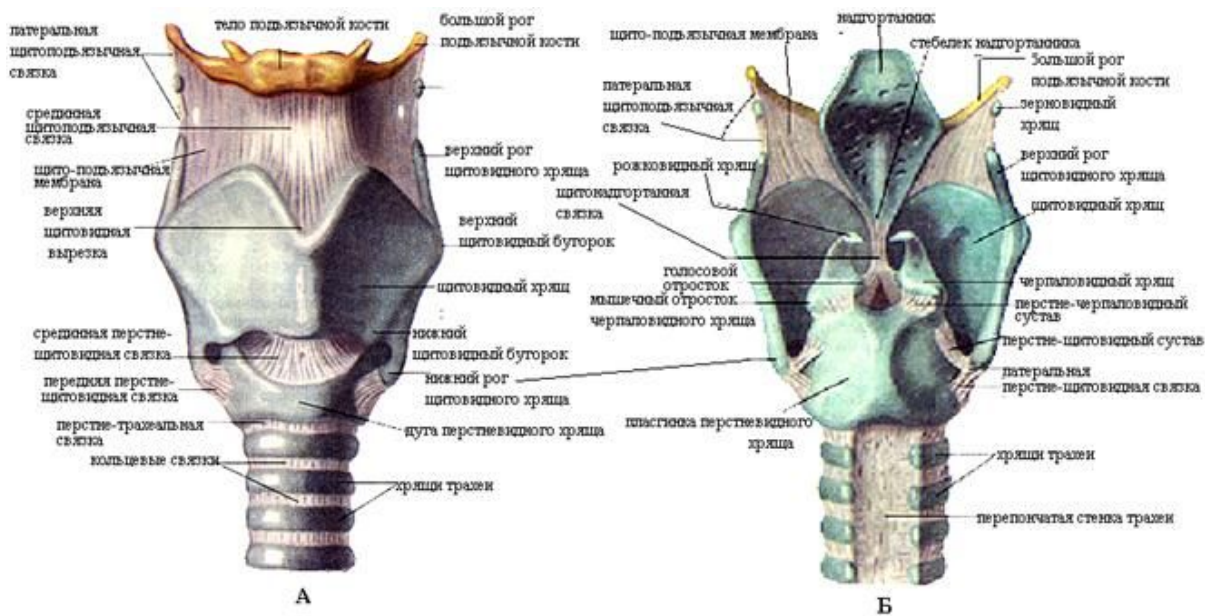
- ❑ Температура 37°C
- ❑ Относительная влажность воздуха 90-100%
- ❑ Содержание в газообразной смеси CO₂ – 5% и O₂ – 20%

Оптимальной комбинацией ростовых факторов для направленной хондрогенной дифференцировки стволовых клеток, полученных из жировой ткани, является BMP-2/TGF- β 3 (bone morphogenetic protein-2/transforming growth factor- β 3).



8. Соединение хрящей

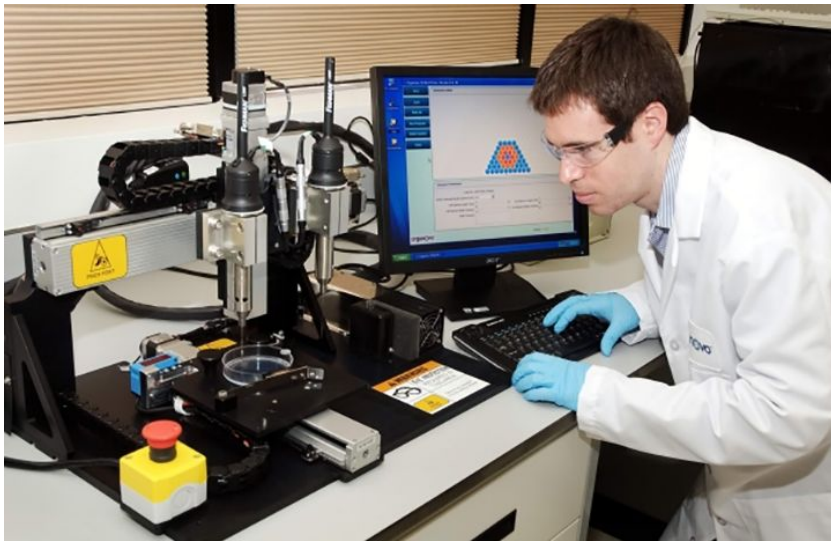
Соединение хрящей будет осуществляться при помощи поликапролактона. Поликапролактон - это биоразлагаемый полиэфир с низкой температурой плавления (59-64 градусов). Он является полимером ε-капролактона. В биомедицине поликапролактон применяется как шовный материал. Он одновременно и гибкий, и прочный. Биодegradация в теле человека происходит медленно, около 3 лет. Продуктами деградации являются капроновая кислота, вода, CO_2 .



III. Заключение

Печать органов уже не фантастика, а реальность. В мире появляется всё больше возможностей для 3D-биопринтинга. В данный момент лаборатории проводят множество исследований в данной области. В 2020 году, можно создавать мышечную, костную, хрящевую ткани и др.

Мы разработали план создания гортани с помощью 3D-биопринтера. Данный проект может быть взят на вооружение учёными при разработке гортани при помощи 3D печати.



Список использованных источников

1. Clarence T. Sasaki Обзор заболеваний гортани [Электронный ресурс]. Режим доступа:
<https://www.msmanuals.com/ru/%D0%BF%D1%80%D0%BE%D1%84%D0%B5%D1%81%D1%81%D0%B8%D0%BE%D0%BD%D0%B0%D0%BB%D1%8C%D0%BD%D1%8B%D0%B9/%D0%B7%D0%B0%D0%B1%D0%BE%D0%BB%D0%B5%D0%B2%D0%B0%D0%BD%D0%B8%D1%8F-%D1%83%D1%85%D0%B0,-%D0%B3%D0%BE%D1%80%D0%BB%D0%B0-%D0%B8-%D0%BD%D0%BE%D1%81%D0%B0/%D0%B7%D0%B0%D0%B1%D0%BE%D0%BB%D0%B5%D0%B2%D0%B0%D0%BD%D0%B8%D1%8F-%D0%B3%D0%BE%D1%80%D1%82%D0%B0%D0%BD%D0%B8/%D0%BE%D0%B1%D0%B7%D0%BE%D1%80-%D0%B7%D0%B0%D0%B1%D0%BE%D0%BB%D0%B5%D0%B2%D0%B0%D0%BD%D0%B8%D0%B9-overview-of-laryngeal-disorders%D0%B3%D0%BE%D1%80%D1%82%D0%B0%D0%BD%D0%B8>
2. Рак гортани [Электронный ресурс]. Режим доступа:
https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A0%D0%B0%D0%BA_%D0%B3%D0%BE%D1%80%D1%82%D0%B0%D0%BD%D0%B8
3. Рак гортани: прогноз [Электронный ресурс]. Режим доступа:
<https://oncocenter-ichilov.com/lechenie-raka-gortani-v-izraile/prognoz-pri-rake-gortani/>
4. Рак гортани: как жить после потери голоса? [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://takiedela.ru/news/2019/10/25/poterya-golosa/>

5. Гортань [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%93%D0%BE%D1%80%D1%82%D0%B0%D0%BD%D1%8C>
6. Миронов В.А. Вслед за Создателем. Технологии биопринтинга[Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://yandex.ru/turbo/s/scfh.ru/papers/vsled-za-sozdatelem-tekhnologii-bioprintinga/>
7. Новый гидрогель позволит печатать хрящи на 3D-принтере[Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://druid.ru/news/longborn/show/814.htm>
8. Стволовые клетки [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A1%D1%82%D0%B2%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B2%D1%8B%D0%B5_%D0%BA%D0%BB%D0%B5%D1%82%D0%BA%D0%B8
9. Мезенхимальные стволовые клетки из жировой ткани[Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://ivfrigastemcells.lv/ru/poleznaja-informacija/mezenkhimalnye-stvolovye-kletki-iz-zhirovoy-tkani/>
10. Масгутов Р.Ф., Богов (Мл.) А.А., Ризванов А.А., Салафутдинов И.И., Ханнанова И. Г., Галлямов А.Р. Стволовые клетки из жировой ткани биологические свойства и перспективы клинического применения [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://cyberleninka.ru/article/n/stvolovye-kletki-iz-zhirovoy-tkani-biologicheskie-svoystva-i-perspektivy-klinicheskogo-primeneniya>
11. Биопринтер FABION [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://bioprinting.ru/products-services/fabion/>
12. https://vk.com/away.php?to=https%3A%2F%2Fjournal.transpl.ru%2Fvtio%2Farticle%2Fdownload%2F706%2F596&cc_key=