



10ο Πανελλήνιο Συνέδριο Φυσικών Επιστημών στην Υγεία:
Καινοτομίες και Προοπτικές
22-23 Σεπτεμβρίου 2023

Βιοεκτύπωση τρισδιάστατων αγγειακών δομών με πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια για αναγέννηση ενδοθηλιακού ιστού

Βαρβάρα Πλατανιά ¹, Νικολέτα Ν. Ταβερναράκη ¹, Ιωάννα Γόντικα ², Ειρήνη Φραγκιαδάκη ², Νικολέττα
Τριαντοπούλου ³, Ελένη Α. Παπαδάκη ², Καλλιόπη Αλπαντάκη ⁴, Μαρίνα Βιδάκη ^{3,5}, Μαρία
Χατζηνικολαΐδου ^{1,6}

¹ Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Υλικών, Πανεπιστήμιο Κρήτης, 70013 Ηράκλειο, Ελλάδα

² Εργαστήριο Αιμοποίησης, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης & Δημόσια Τράπεζα Ομφαλικών Βλαστοκυττάρων, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ηρακλείου, 70013 Ηράκλειο, Ελλάδα

³ Τομέας Βασικής Έρευνας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης, 70013 Ηράκλειο, Ελλάδα

⁴ Κλινική Ορθοπεδικής και Τραύματος, Βενιζέλειο Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου, 70013 Ηράκλειο, Ελλάδα

⁵ Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Ίδρυμα Έρευνας και Τεχνολογίας, 70013 Ηράκλειο, Ελλάδα

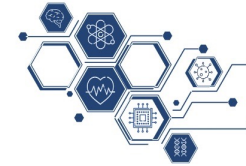
⁶ Ινστιτούτο Ηλεκτρονικής Δομής και Λέιζερ, Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας, 70013 Ηράκλειο, Ελλάδα



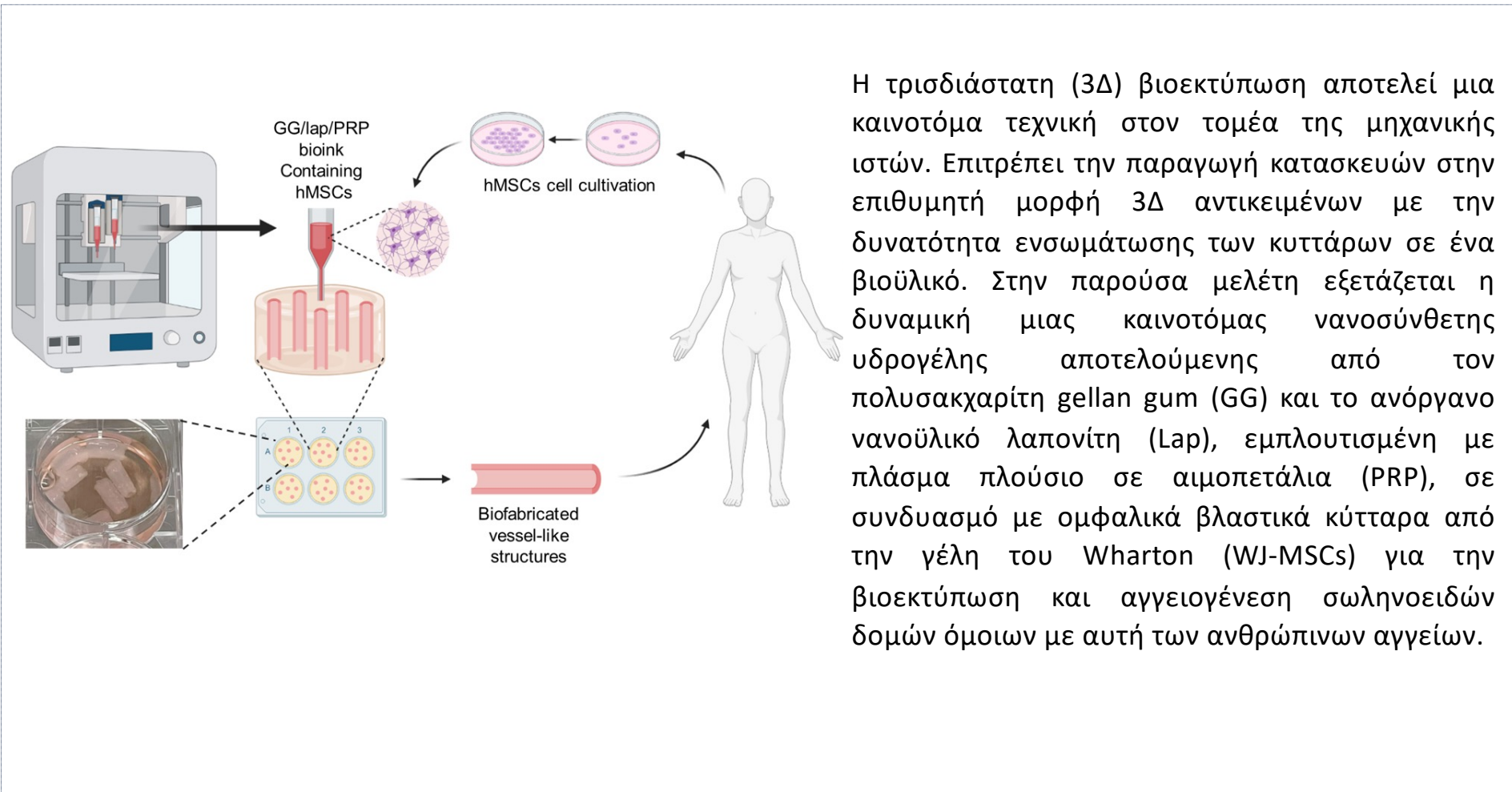
Διοργανωτές



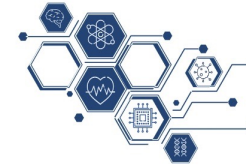
1. Εισαγωγή-Σκοπός



1ο Πανελλήνιο Συνέδριο Φυσικών Επιστημών στην Υγεία:
Καινοτομίες και Προοπτικές
22-23 Σεπτεμβρίου 2023



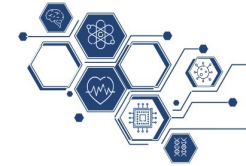
2. Μέθοδοι και Υλικά



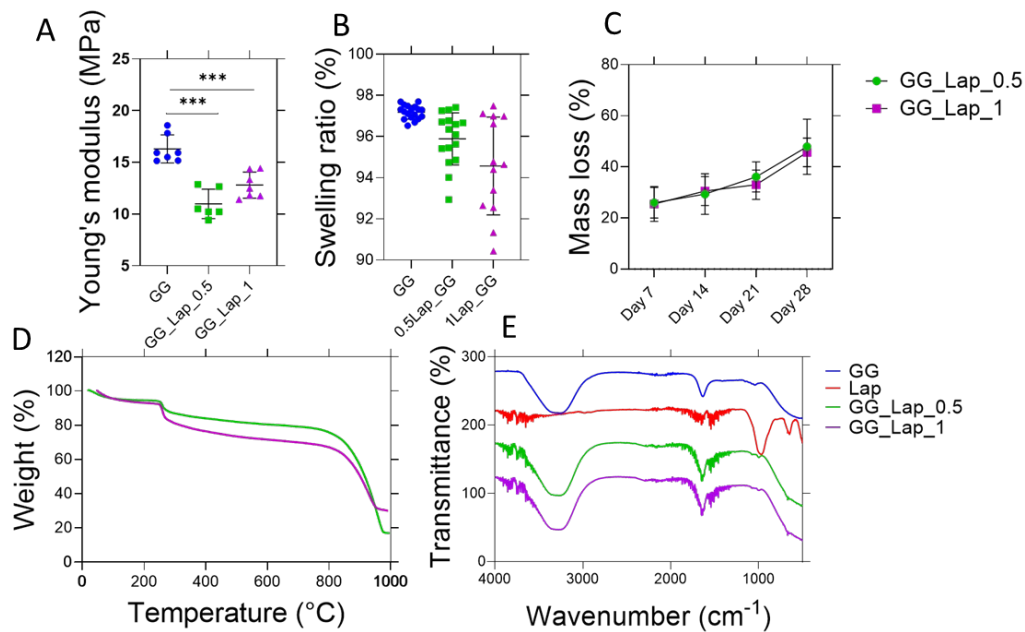
1ο Πανελλήνιο Συνέδριο Φυσικών Επιστημών στην Υγεία:
Καινοτομίες και Προοπτικές
22-23 Σεπτεμβρίου 2023

Ο σχεδιασμός των δομών έγινε μέσω ενός μοντέλου ψηφιακής απεικόνισης (CAD). Δυο διαφορετικές συγκεντρώσεις Lap (0.5 και 1% w/v) αναμείχθηκαν με 1% w/v GG και 25% v/v PRP. Ακολούθησε 3D βιοεκτύπωση σε δομές που προσομοιάζουν μορφολογικά τμήμα μικρών αρτηριών διαμέτρου 1 mm. Τα ικρίωματα διασταυρώθηκαν με 2.5% w/v χλωριούχο κάλιο. Μελετήθηκαν οι φυσικοχημικές ιδιότητες των δομών όπως ο ρυθμός διόγκωσης και αποδόμησής τους, το μέτρο ελαστικότητας (Young modulus) και η κυτταρική βιωσιμότητα, η μορφολογία, καθώς και η δυνατότητα *in vitro* διαφοροποίησης των κυττάρων προς ώριμα ενδοθηλιακά μέσω χρώσεων των αγγειογενών δεικτών von Willebrand (vW) και PECAM-1 (μόριο προσκόλλησης ενδοθηλιακών κυττάρων αιμοπεταλίων, CD31), και μέσω γονιδιακής έκφρασης των δεικτών PECAM-1, VEGFR2, VEGFA, Ang1 και Tie-2 μετά από 14 και 21 ημέρες. Τα βιοεκτυπωμένα αγγεία μελετήθηκαν *in vivo* κατόπιν υποδόριας εμφύτευσης σε επίμυες και αξιολογήθηκαν ιστολογικά οι δείκτες ενδοθηλίου CD45, κολλαγόνου (Sirius red) και γλυκοζαμινογλυκανών με χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού και οπτικής μικροσκοπίας αντίστοιχα.

3. Αποτελέσματα



Φυσικοχημικός χαρακτηρισμός της πολυμερικής μήτρας

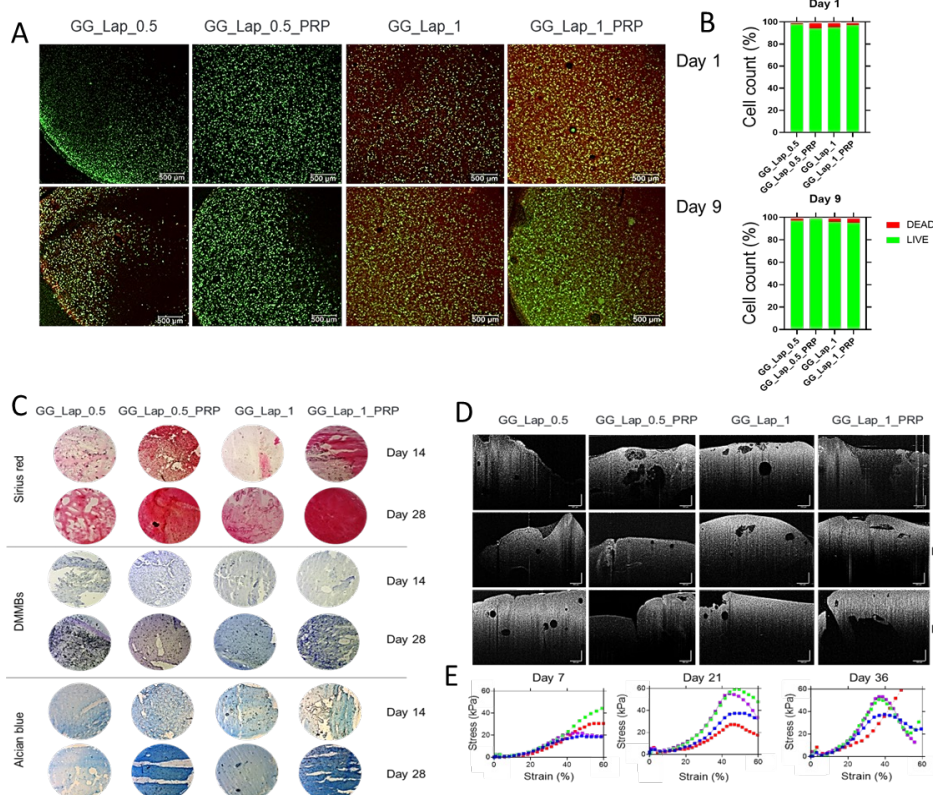


Φυσικοχημικός χαρακτηρισμός των διαφορετικών συστάσεων νανοσύνθετων υδρογελών. Προσδιορισμός του μέτρου ελαστικότητάς τους (A), του ρυθμού διόγκωσης (B), του ρυθμού αποδόμησης (C) και επικύρωση της ενσωμάτωσης λαπονίτη στα μείγματα διαφόρων συστάσεων μέσω θερμοβαρυμετρικής ανάλυσης (TGA) (D) και φασματοσκοπίας υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier (FTIR) (E).

3. Αποτελέσματα

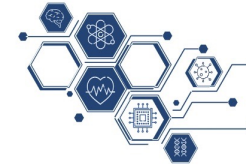


In vitro αξιολόγηση βιοσυμβατότητα και σχηματισμός ενδοθηλιακής εξωκυττάριας μήτρας

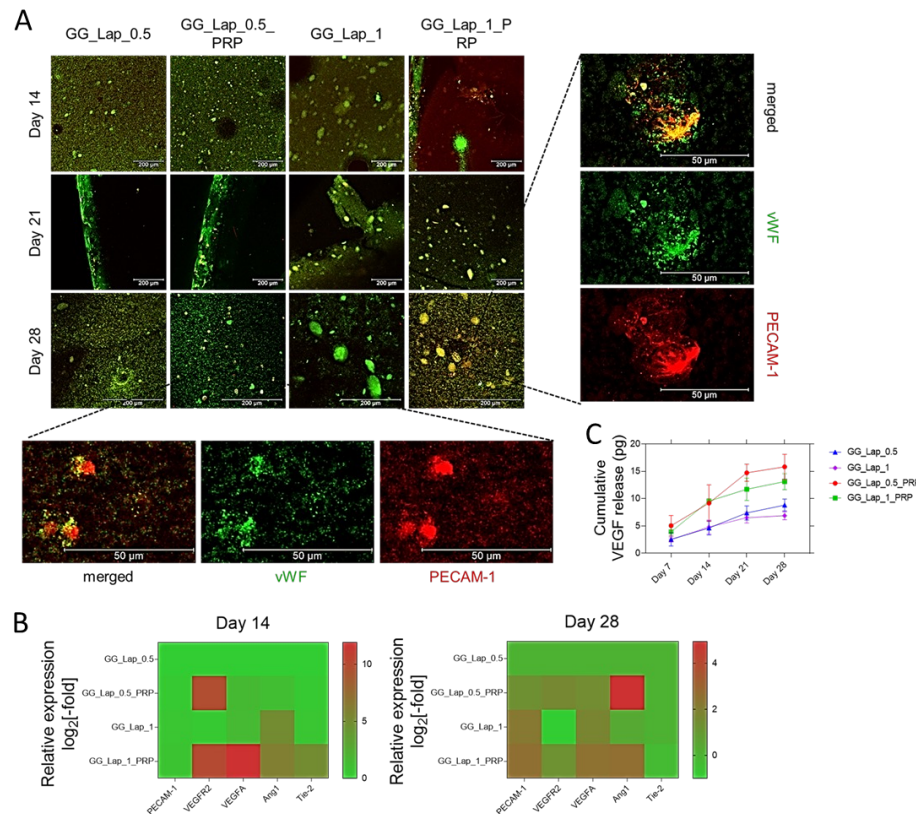


Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού των αγγείων όπου τα ζωντανά κύτταρα παρουσιάζονται με πράσινο χρώμα και τα νεκρά με κόκκινο χρώμα (κλίμακα 500 μm) (A). Τα ποσοστά βιωσιμότητας υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό ImageJ. Το γράφημα εμφανίζει το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων (με πράσινο) και των νεκρών κυττάρων (με κόκκινο) (B). Ιστολογική χρώση του εκκρινόμενου κολλαγόνου (Sirius red) και γλυκοζαμινογλυκανών (1,9-dimethylmethylene blue, DMMB και Alcian blue) ως δύο δομικά συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας (ECM) του αγγείου. κλίμακα = 200 μm (C). Αντιπροσωπευτικές εικόνες οπτικής τομογραφίας συνοχής (OCT) που δείχνουν το σχηματισμό ενδοθηλιακού ιστού μετά από 5 εβδομάδες καλλιέργειας. Η εναπόθεση ECM απεικονίζεται ως φωτεινές περιοχές, υποδεικνύοντας την οργάνωση και την ωριμότητα του ενδοθηλιακού ιστού (D). Καμπύλες ελαστικής καταπόνησης δείχνουν τη μεταβολή των μηχανικών ιδιοτήτων του σχηματισμένου ενδοθηλιακού ιστού (E).

3. Αποτελέσματα

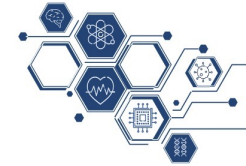


Ενδοθηλιακή διαφοροποίηση των WJMSC εντός του αυτόλογου μοσχεύματος



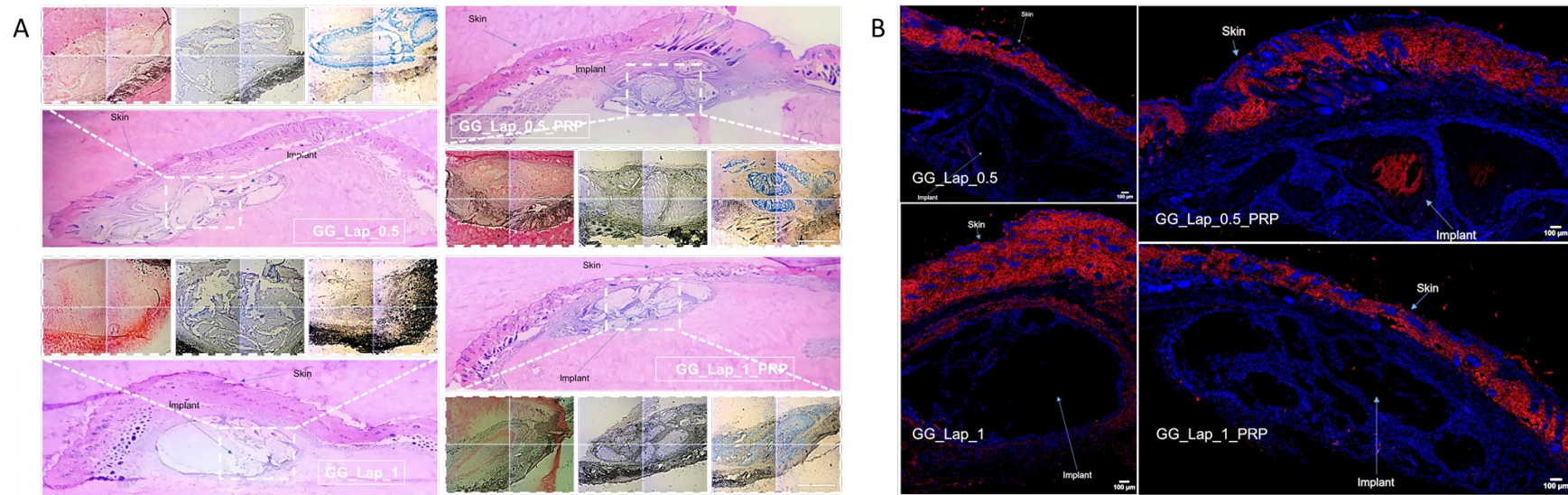
Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού των ενδοθηλιακών δεικτών vWF (πράσινος φθορισμός) και PECAM-1 (κόκκινος φθορισμός) στα τρισδιάστατα εκτυπωμένα αγγεία μετά από 14, 21 και 28 ημέρες σε καλλιέργεια. κλίμακα = 200 μm, 50 μm (A). Σχετικά επίπεδα γονιδιακής έκφρασης των PECAM-1, VEGFR2, VEGFA, Ang1 και Tie-2 μετά από 14 και 21 ημέρες σε καλλιέργεια (B). Ποσοτικοποίηση της απελευθέρωσης του παράγοντα VEGF με την πάροδο του χρόνου. Το γράφημα εμφανίζει την απελευθερωμένη μάζα του VEGF (σε pg) που ανιχνεύεται στο μέσο καλλιέργειας. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση (SD) από τρία ανεξάρτητα πειράματα (C).

3. Αποτελέσματα



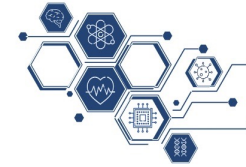
1ο Πανελλήνιο Συνέδριο Φυσικών Επιστημών στην Υγεία:
Καινοτομίες και Προοπτικές
22-23 Σεπτεμβρίου 2023

In vivo σχηματισμός ενδοθηλιακής εξωκυττάριας μήτρας



Ιστολογική εκτίμηση της υποδόριας εμφύτευσης των βιοκατασκευασμένων αγγείων. Χρώση κολλαγόνου (Sirius red) και γλυκοζαμινογλυκανών (DMMB, Alcian blue) σε τομές επιδερμικού/υποδόριου ιστού γύρω από τα εμφυτευμένα αγγεία (κλίμακα: 400 μm). Δεν παρατηρούνται διαφορές στον περιβάλλοντα ιστό όσον αφορά την κυτταρική ή την ανοσοαπόκριση (A). Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας του ενδοθηλιακού δείκτη CD45 (κόκκινο) σε τομές επιδερμικού/υποδόριου ιστού γύρω από τα εμφυτευμένα αγγεία (κλίμακα: 100 μm) (B).

4. Συμπεράσματα

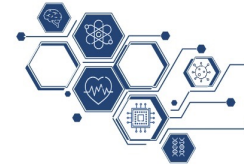


1ο Πανελλήνιο Συνέδριο Φυσικών Επιστημών στην Υγεία:
Καινοτομίες και Προοπτικές
22-23 Σεπτεμβρίου 2023

Ο συνδυασμός των τριών υλικών είχε θετική επίδραση στην απόδοση της 3D βιοεκτύπωσης με υψηλή ακρίβεια σχήματος. Η ελαστικότητα των δομών κυμάνθηκε μεταξύ 10 και 12 MPa. Επιπλέον ο ρυθμός αποδόμησης έδειξε απώλεια μάζας κατά 46% μετά από 28 ημέρες. Τα πειράματα υποδόριας εμφύτευσης σε ποντίκια έδειξαν βιοσυμβατότητα και αγγειογένεση.

Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν την καταλληλότητα του σύνθετου βιοϋλικού από GG, Lap, και PRP για την παραγωγή δομών υψηλής ακρίβειας σχήματος, ελαστικότητας και αντοχής. Ειδικότερα, η προσθήκη του PRP ενισχύει τη διαφοροποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων και προάγει την αναγέννηση του ενδοθηλιακού ιστού.

5. Βιβλιογραφία



1ο Πανελλήνιο Συνέδριο Φυσικών Επιστημών στην Υγεία:
Καινοτομίες και Προοπτικές
22-23 Σεπτεμβρίου 2023

1. Woodfield, T., et al., 5.14 Biofabrication in Tissue Engineering☆, in Comprehensive Biomaterials II, P. Ducheyne, Editor. 2017, Elsevier: Oxford. p. 236-266.
2. Mammoto, T., et al., Platelet rich plasma extract promotes angiogenesis through the angiopoietin1-Tie2 pathway. *Microvasc Res*, 2013. 89: p. 15-24.
3. Li, Z., et al., 3D bioprinted gelatin/gellan gum-based scaffold with double-crosslinking network for vascularized bone regeneration. *Carbohydrate Polymers*, 2022. 290: p. 119469.
4. Ma, Z., et al., 3D bioprinting of proangiogenic constructs with induced immunomodulatory microenvironments through a dual cross-linking procedure using laponite incorporated bioink. *Composites Part B: Engineering*, 2022. 229: p. 109399.
5. Camasão, D.B. and D. Mantovani, The mechanical characterization of blood vessels and their substitutes in the continuous quest for physiological-relevant performances. A critical review. *Materials Today Bio*, 2021. 10: p. 100106.
6. Awad, N.K., H. Niu, and U. Ali, Electrospun Fibrous Scaffolds for Small-Diameter Blood Vessels: A Review. 2018. 8(1).