

# TROJDIMENZIONÁLNA BIOTLAČ NA BÁZE ACELULÁRNYCH SKAFOLDOV

Mária Danko <sup>1</sup>, Jana Hlubeňová <sup>1</sup>, Radovan Hudák <sup>1</sup>, Marianna  
Trebuňová <sup>1</sup>, Jozef Živčák <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Technická univerzita v Košiciach, Košice

## ABSTRAKT

*Štúdia sa zaoberá princípom hodnotenia kvality trojdimenzionálnej biotlače. Predstavuje základné pojmy a s nimi spojené vlastnosti vplyvajúce na potlačiteľnosť hydrogélových biomateriálov. Cieľom bolo navrhnúť postupový algoritmus pre kritickú analýzu výtlačkov vyrobených extrúznou 3D biotlačou. Experimentálne bolo vytvorených štyridsaťjeden cylindrických skafoldov z rovnakého materiálu a za meniacich sa parametrov tlače. Nastavenia najhodnovernejšej vzorky v porovnaní s CAD návrhom sa použili pre 3D biotlač desiatich cylindrických vzoriek. Na hodnotenie sa využila analýza systému merania (ASM) s tromi operátormi. Výsledky ukázali, že systém merania potlačiteľnosti vyhovuje podmienčne, zatiaľ čo metodika hodnotenia tvarovej zhodnosti vzoriek skrz makroskopickú klasifikáciu pórov si žiada prehodnotenie a ďalšie experimenty.*

## KLÍČOVÁ SLOVA

*3D bioprinting, 3D biotlač, skafold, hydrogél, kvalita tlače*

## ÚVOD

3D biotlač umožňuje vytvárať heterogénne objekty a zložité biologické štruktúry na základe digitálneho CAD modelu, a to procesmi aditívnej výroby.[1] Na základe tlačového materiálu delíme 3D biotlač na bunkovú a nebunkovú. [1], [2], [3] Pri celulárnom spôsobe sú bunky vždy začlenené do tlačového materiálu čiže bio-inku. Pri acelulárnej tlači sa na výrobu objektov napr. skafoldov používa termín biomateriál. [4], [5], [6] Najčastejšie ide o hydrogély. V súčasnosti sa veľká pozornosť sústreďuje na formulovanie poznatkov a zásad ohľadne hydrogélovej biotlače a hľadá sa konsenzus medzi kritériami hodnotenia kvality tlače. Medzi diskutovanými termínmi sú potlačiteľnosť, kontinuálna extrudovateľnosť, presnosť tlače, precíznosť, mikroštruktúra a konštrukčná integrita. [5] Základným faktorom je potlačiteľnosť (printability), ktorá charakterizuje termín hodnotiaci rozdiel medzi navrhnutým (CAD) a skutočne vytlačeným konštruktom. [3] Zahŕňa mechanické vlastnosti atramentu umožňujúce prechod dýzou (reológia) [4] a nanášanie jednotlivých vrstiev (extrudovateľnosť) na seba, podľa vopred naplánovaného kódu (g-code). Ide o termín zahrňujúci celý proces od fázy programovania (CAD návrh, voľba atramentu, slicerovanie, g-code), cez proces vytvárania konštruktu (parametre tlače, zosieťovanie atď.) pričom tvarová vernosť objektu je ovplyvniteľná aj typom biotlačiarne a okrem reologických vlastností materiálu aj tvarom a priemerom dýz. [4]

Rozdiel medzi návrhom a vytvoreným objektom môže byť spôsobený extrudovateľnosťou tlačeného bioatramentu a/alebo štrukturálnou tvarovateľnosťou a stabilitou tlačených konštruktov. [5] Tvarová vernosť je zas miera, do akej sa 3D tlačená konštrukcia zhoduje veľkosťou a priestorovým umiestnením s pôvodným CAD modelom z hľadiska geometrie.

Aditívna výroba na báze hydrogélův je náročná z hľadiska premenlivého fyzikálno-chemického správania sa tlačového materiálu. Vzhľadom na problematiku 3D biotlač je cieľom predloženej štúdie navrhnúť všeobecný postupový algoritmus použiteľný pri zavádzaní nového biomateriálu pre kritickú analýzu výtlačkov.

## MATERIÁLY A METODY

Pomôcky: biotlačiareň Cellink BIO X; biomateriál Start Cellink; kartuša 3ml; kónická dýza 22G; Solid Works (CAD); Slic3r (G-code); SW CorellDraw (vektorový grafický editor), pravítko; fotoaparát (iPhone 14 Pro) so statívom, laboratórne sklíčka.

Meranie sa uskutočnilo v jeden deň za bežnej teploty prostredia v laboratóriu ( $T \approx 23,5^\circ\text{C}$ ). Použitý biomateriál Start Cellink má teplotu skladovania do  $25^\circ\text{C}$ .

### BIOTLAČIAREŇ A MATERIÁL

Cellink BIO X je biotlačiareň na báze pneumatickej extrúzie s integrovaným kompresorom, s UV-C germicídnyimi lampami a systémom dvojitého filtra HEPA H14, tri tlačové hlavy (hotendy) s integrovanými výhrevnými telesami s termistorom, senzorom priblíženia, chladienia a iné.

Biomateriál CELLINK START\* (Polybutylén sukcinát (PBS; polytetrametylén sukcinát) je termoplastická polymérna živica (polyester). Biodegradovateľná živica. Ide o vo vode rozpustný gél používaný ako podporný materiál pre bunkami zaťažené konštrukty, bioatramenty so slabou tvarovou vernosťou a konštrukty s pórovitosťou pozdĺž všetkých troch osí.

Zadanie, jednoduchý cylindrický skafold s priemerom 10 mm, výškou 3mm, 20% priamočiary vzor výplne.

### POSTUPOVÝ ALGORITMUS ZHODNOCOVANIA VÝTLAČKU

Cieľ: Vytvorenie protokolu [7], [8] tlače pre zadaný vzorový 3D model a biomateriál. (1) Vytlačilo sa 41 cylindrických skafoldov. Každý s inými parametrami nastavenia tlače. Experimentálne sa menil tlak (25-45 kPa), teplota (30-32 °C) a rýchlosť (16-20 mm/s). (2) Výber najlepšieho výtlačku na základe makroskopického pozorovania extrudovateľnosti a tvarovej zhodnosti. (3) Opakovateľnosť: 3D biotlač desiatich vzoriek s rovnakými nastaveniami tlače. (4) Snímkovanie vytvorených skafoldov ( $n=10$ ) z preddefinovanej kolmej vzdialenosti na hornú plochu objektu (TOP). (5) Analýza systému merania (MSA).

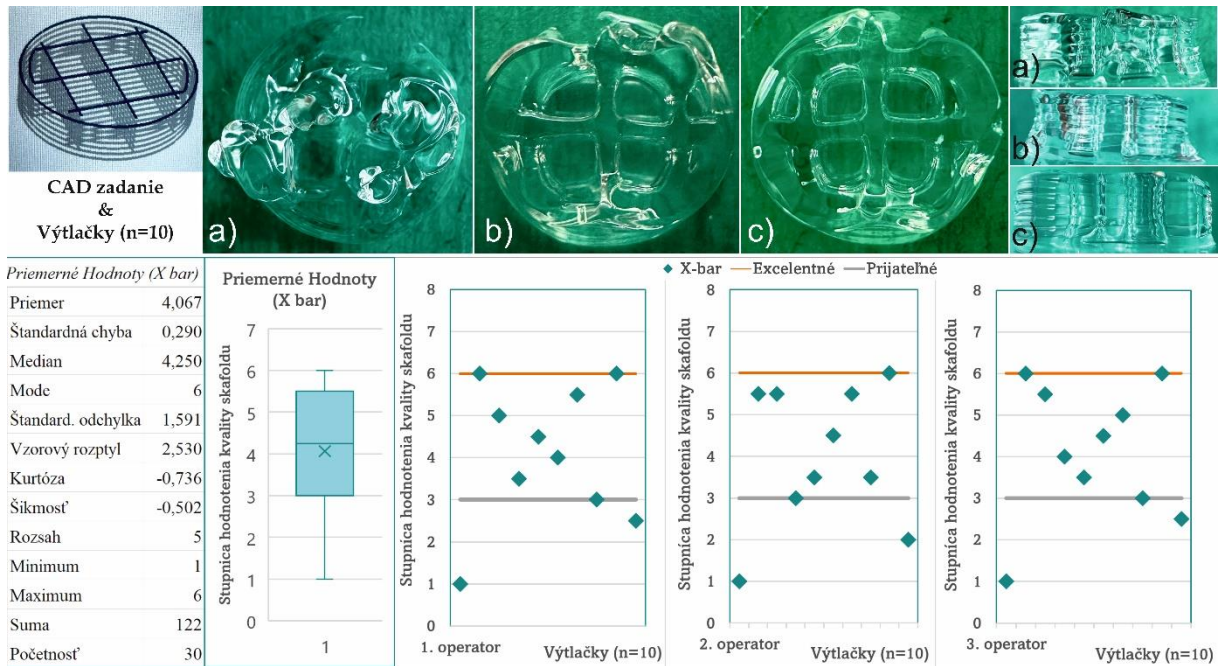
### ANALÝZA SYSTÉMU MERANIA (MSA)

Cieľom je posúdenie extrúzie a prijateľnosti meracieho systému z hľadiska opakovateľnosti a reprodukovateľnosti (R&R). Hodnotenie vzoriek previedli traja operátori ( $h=3$ ). Na testovanie sa vyrobilo desať vzoriek ( $j = 10$ ), všetky za rovnakých parametrov tlače. Každý operátor hodnotil každú vzorku dvakrát ( $k=2$ ) s použitím vopred dohodnutých šablón merania pre hodnotené ukazovatele. Na základe získaných dát sa vypočítali charakteristiky popisujúce systém merania ako linearita, presnosť, stabilita, R&R a rozlišovacia schopnosť.

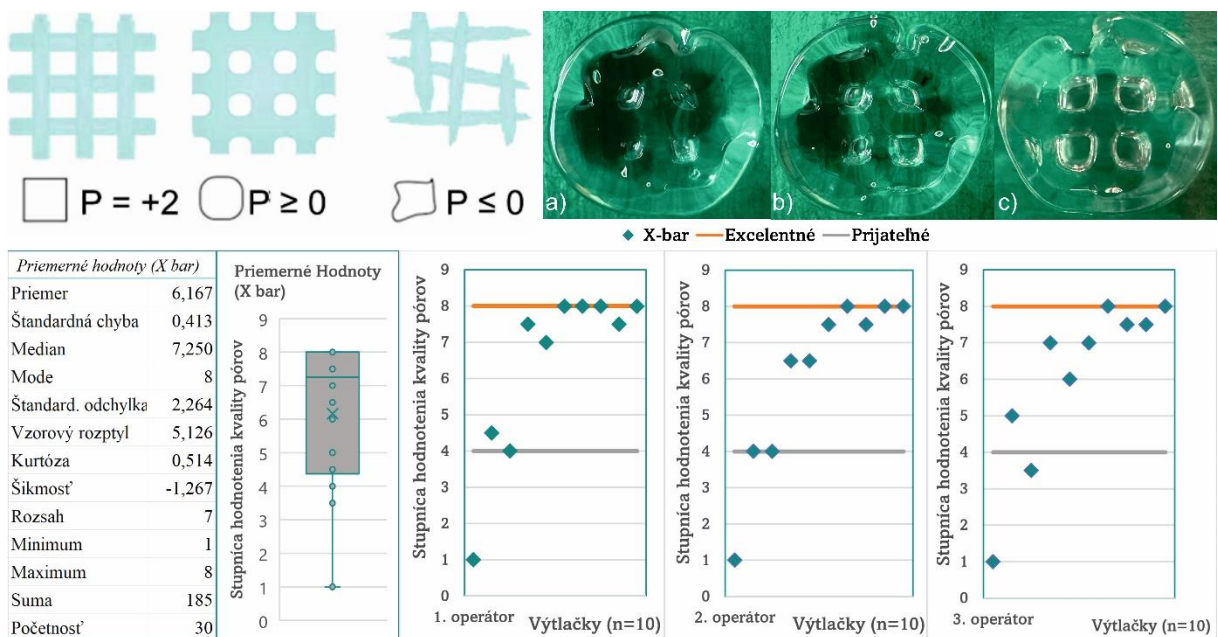
Prijateľnosť meracieho systému: (1)  $R\&R < 10\%$  vyhovuje úplne; (2)  $R\&R = 10\% - 30\%$  vyhovuje podmienčne; (3)  $R\&R > 30\%$  nevyhovuje a je potrebné zlepšenie.

## VÝSLEDKY

Potlačiteľnosť, viď Obr. 1. Pomocou B-spline v grafickom softvéri CorelDRAW sa vykonal obrys prvej a spodnej vrstvy, ktoré sa následne rozmerovo porovnali s CAD návrhom. Na hodnotenie potlačiteľnosti výtlačku bola použitá šesť-stupňová hodnotiacia škála v intervale <0; 6>, kde 0-nepoužiteľné, 1-veľmi zlé, 2 – zlé, 3- priemerné, 4-dobré, 5- veľmi dobré, 6- excelentné. Shapiro-Wilkov test ukázal výrazný odklon od normálneho rozloženia dát,  $W(30) = 0,91$ ;  $p = 0,015$ .



Obr. 2 Potlačiteľnosť. Ukážka nárezového CAD modelu; Príklady hodnotenia: a) nepoužiteľné; b) priemerné- dobré; c) veľmi dobré – excelentné. Analýza dát od troch operátorov.



Obr. 3 Tvarová zhodnosť. Ukážka hodnotenia pórov. Príklady hodnotenia: a) nepoužiteľné; b) priemerné; c) veľmi dobré. Analýza dát od troch operátorov.

Hodnotenie tvarovej zhodnosti, vid' Obr. 4. Na hodnotenie tvarovej zhodnosti výtlačku s CAD návrhom bola použitá troj-stupňová hodnotiaca škála v intervale  $\langle 0; 2 \rangle$ , kde 0-nepoužiteľné, 1-priemerné, 2 – veľmi dobré. Hodnotenie jedného póru bolo definované rozdielom spodnej plochy a poslednej vrchnej plochy póru. Každá bola trasovaná vektorovou funkciou b-spline v SW CoreIDRAW. Na každom výtlačku sa hodnotili štyri centrálné póry. Shapiro-Wilkov test ukázal významný odklon od normálneho rozloženia dát,  $W(30) = 0,78$ ,  $p < 0,001$ .

## DISKUSIA

Makroskopické pozorovanie vnútornej štruktúry so zameraním sa na priestorový tvar a prítomnosť viditeľných pórov poukázalo na problematické odčítavanie výsledku. Podľa doterajších štúdií [1], [2], [3], [4] závisí potlačiteľnosť hydrogélových materiálov od reologických vlastností ako je viskozita, šmykové namáhanie či medza sklzu a rovnako aj od procesu zosieťovania. Za hlavný faktor ovplyvňujúci potlačovateľnosť, presnosť tlače a tvarovú vernosť možno označiť viskozitu [3] čiže odpor tekutiny voči prúdeniu počas pôsobenia napätí, alebo ako pomer šmykového napätia k šmykovej rýchlosti. Pričom viskozita hydrogélových atramentov je ovplyvniteľná teplotou, molekulárnymi interakciami a molekulovou hmotnosťou či koncentráciou polyméru. [3] Pre stanovenie exaktných parametrov 3D biotlače a zosieťovania hydrogélův by bolo do budúcnosti zaujímavé priebežne monitorovať stav teploty v miestnosti a zároveň overovať viskozitu biomateriálu. Prípadne hľadať iné súvislosti zapríčínajúce deformovanie stavby výtlačku.

## ZÁVER

Hlavným cieľom štúdie bolo zostavenie postupového algoritmu pri zavádzaní nových materiálov a zhodnotenie nastaveného systému merania. Výsledky poukázali na fakt, že napriek rovnakým podmienkam 20% výtlačkov nedosahovalo požadovaných vonkajších rozmerov podľa stanoveného vzoru (rovnomerný cylinder 10x3 mm). Štatistickou analýzou bolo vypočítané percento celkovej variability pre extrudovateľnosť R&R 29,5% tzn., že systém merania vyhovuje podmienčne. Hodnotenie tvarovej zhodnosti R&R vyšlo 41,4%, čo znamená, že je potrebné prepracovať metodiku hodnotenia zhodnosti vzoriek.

## POĎAKOVANIE

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Výskum a vývoj inteligentných traumatologických externých fixačných systémův vyrobených s využitím digitalizačných metód a technológií aditívnej výroby (SMARTfix), kód ITMS2014+: 313011BWQ1, spolufinancovaný zo zdrojův Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Táto práca bola vypracovaná za podpory projektův: KEGA 018TUKE-4/2023 Implementácia metód fyzikálno-chemických analýz v študijnom programe biomedicínske inžinierstvo; KEGA 050TUKE-4/2022 Aditívna výroba v medicíne – tvorba multimediálneho materiálu a pomôcok pre podporu výučby v biomedicínskom inžinierstve; KEGA 044TUKE-4/2022 Implementácia progresívnych technológií do vzdelávania v oblasti technickej ortopedie a podporu integrácie s praxou.

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Centrum medicínskeho bioaditívneho výskumu a výroby (CEMBAM), kód ITMS2014+: 313011V358, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja; Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Otvorená vedecká komunita pre moderný interdisciplinárny výskum v medicíne (OPENMED), kód ITMS2014+: 313011V455, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

## LITERATÚRA

- [1] Mandrycky C, Wang Z, Kim K, Kim DH. 3D bioprinting for engineering complex tissues. *Biotechnol Adv.* 2016;34(4):422-434. doi:10.1016/j.biotechadv.2015.12.011
- [2] Bom S, Ribeiro R, Ribeiro HM, Santos C, Marto J. On the progress of hydrogel-based 3D printing: Correlating rheological properties with printing behaviour [published correction appears in *Int J Pharm.* 2022 Dec 15;629:122334]. *Int J Pharm.* 2022;615:121506. doi:10.1016/j.ijpharm.2022.121506.
- [3] Greco I, Miskovic V, Varon C, Marraffa C, Iorio CS. Printability of Double Network Alginate-Based Hydrogel for 3D Bio-Printed Complex Structures. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022;10:896166. Published 2022 Jul 8. doi:10.3389/fbioe.2022.896166
- [4] Malekpour A, Chen X. Printability and Cell Viability in Extrusion-Based Bioprinting from Experimental, Computational, and Machine Learning Views. *J Funct Biomater.* 2022;13(2):40. Published 2022 Apr 10. doi:10.3390/jfb13020040
- [5] Naghieh S, Chen X. Printability-A key issue in extrusion-based bioprinting. *J Pharm Anal.* 2021;11(5):564-579. doi:10.1016/j.jpha.2021.02.001
- [6] Matai I, Kaur G, Seyedsalehi A, McClinton A, Laurencin CT. Progress in 3D bioprinting technology for tissue/organ regenerative engineering. *Biomaterials.* 2020;226:119536. doi:10.1016/j.biomaterials.2019.119536
- [7] Zvárová, Jana. *Biomedicínská statistika I. Základy statistiky pro biomedicínské obory.* Univerzita Karlova v Praze, 2016; 220; ISBN 9788024634166
- [8] Mochnacká T. *Hodnotenie tvarovej presnosti 3D biotlačce.* Košice, 2023. Diplomová práca. Technická univerzita v Košiciach, Strojnícka fakulta. Vedúci práce doc. RNDr. Marianna Trebuňová, PhD.