

**»Mladi za napredek Maribora 2019«  
36. srečanje**

# **RAZISKAVA GRADIV, PRIMERNIH ZA DODAJALNO IZDELAVO TRDIH TKIV V REGENERATIVNI MEDICINI**

Raziskovalno področje **ZDRAVSTVO**

Raziskovalna naloga

PROSTOR ZA NALEPKO

**Avtor: TINKARA DRSTVENŠEK**

**Mentor: BOŠTJAN VIHAR, ANDREJA SENČAR**

**Šola: PRVA GIMNAZIJA MARIBOR**

**Število točk: 148**

**Mesto: 3**

**Priznanje: srebrno**

**Maribor, 2019**

**»Mladi za napredek Maribora 2019«  
36. srečanje**

**RAZISKAVA GRADIV, PRIMERNIH ZA DODAJALNO  
IZDELAVO TRDIH TKIV V REGENERATIVNI MEDICINI**

Raziskovalno področje **ZDRAVSTVO**

Raziskovalna naloga

**Maribor, 2019**

# KAZALO

KAZALO .....	3
KAZALO SLIK.....	4
SEZNAM KRATIC .....	5
POVZETEK .....	7
ZAHVALA .....	8
1. UVOD.....	9
1.1  Kosti .....	11
1.2  Ogrodja v tkivnem inženirstvu .....	13
1.3  Biomateriali za kostna ogrodja .....	15
1.3.1  Kolagen.....	15
1.3.2  Hitozan.....	15
1.3.3  Hidroksiapatit .....	15
1.3.4  Alginat.....	16
1.3.5  Tris.....	16
1.3.6  Želatina .....	16
1.4  Dodajalna izdelava .....	17
1.5  Dodajalna izdelava v tkivnem inženirstvu .....	22
2. METODE IN MATERIALI.....	26
2.1  Homogenizacija kolagena .....	28
2.2  Mešanje kolagena s hidroksiapatitom.....	30
2.3  3D BIO-pisanje .....	32
3. ZAKLJUČEK IN SMERNICE ZA NADALJNJE DELO.....	39
4. Publication bibliography.....	40

## KAZALO SLIK

Slika 1: Princip selektivnega strjevanja.....	18
Slika 2: Princip selektivnega sintranja .....	19
Slika 3: Princip ciljnega nalaganja. a) neprekinjeno, b) kapljično-prašno .....	20
Slika 4: Princip nalaganja krojenih plasti. ....	21
Slika 5: Suha snov v hitozanu.....	27
Slika 6: a) Tiskanje kolagena, razredčenega z vodo. b) Homogenizacija kolagena z mešalcem. ....	28
Slika 7: a) Mešanje HA in kolagena v terilnici. b) Nehomogena zmes HA in kolagena. ....	30
Slika 8: a) Pipetiranje vode. b) Priprava mešanice HA in hitozana. ....	31
Slika 9: Vitaprint.....	32
Slika 10: Tiskanje mšanice HA-kolagen z različnimi oblikami in premeri šob. ....	33
Slika 11: Poskusi tiskanja pri različnih hitrostih iztiskovanja. ....	33
Slika 12: Brizgalki, napolnjeni z mešanico HA in hitozana (a) oziroma HA in alginata (b). ....	34
Slika 13: Poskus tiskanja mešanice HA-alg na prostem.....	35
Slika 14: Tiskanje homogeniziranega kolagena na prostem.....	35
Slika 15: a) Iskanje ustreznega zamreževalca. b) Zamrežene mešanice chi-HA. ....	36
Slika 16: a) HA-alg v želatini. b) HA-chi v želatini. ....	36
Slika 17: a) Jemanje ogrodja iz želatine. b) Natisnjena ogrodja. ....	37
Slika 18: Tiskanje kolagena v podporne zmesi.....	37
Slika 19: Reguliranje volumskega pretoka in tiskanje z različnimi debelinami igel. ..	38

## SEZNAM KRATIC

CT – Computer Tomography – Računalniška tomografija

HA - Hidroksiapatit

CAD – Computer Aided Design – Računalniško podprto konstruiranje

UV - Ultravijolično

PVC - Polivinilklorid

CNC – Computer Numerical Control – Računalniško numerično krmiljenje obdelovalnih strojev

SLA - Stereolitografija

PPF – Poli (propilen fumarat)

TCP – tri-kalcij-fosfat

PCL - Polikaprolakton

$\beta$ -TCP – beta-tri-kalcij-fosfat

Ca-P/PHBV – Kalcijev fosfat/poli(hidroksibutirat-ko-hidroksivaleerate)

CHAp/PLLA - Naogljichen hidroksiapatit v poli(L: -laktidni) mreži

PVA – polivinil alkohol

ECM – Extra cellular matrix – zunajcelična mreža

3DP – trirazsežno tiskanje

PLGA - poli(laktična-ko-glikolna kislina)

FDM – Fused Deposition Modelling – neprekinjeno ciljno nalaganje

PCL-TCP – Polikaprolakton-tri kalcij fosfat

PLGA-TCP - poli(laktična-ko-glikolna kislina) – tri kalcij fosfat

PMMA – poli metil meta akrilat

PLA – poli laktična kislina

UZ – Ultrazvok

HA-chi – hidroksiapatit - hitosan

HA-alg – hidroksiapatit - alginat

## POVZETEK

Kost je, za krvjo, najpogosteje presajeno tkivo. Vzroki za presaditev kosti so nesreče, odstranitev rakastih tumorjev in prirojene deformacije. Presaditev kosti zahteva dodaten poseg in z njim povezana tveganja, ki jih poskušamo zmanjšati z izdelavo sintetičnih kostnih nadomestkov. S pomočjo 3D tiskanja je mogoče tak sintetičen material oblikovati v natančen oblikovni posnetek manjkajoče kostnine, s čimer se poseg poenostavi in bistveno skrajša. Material za kostni nadomestek mora omogočati integracijo kostnih tkiv pacienta in se s časoma izločiti iz telesa. Med najzanimivejše materiale v regenerativni medicini kostnih tkiv spada zmes kolagena in hidroksiapatita. Za 3D tisk je treba material spraviti v pastozno obliko, primerno za iztiskovanje skozi šobo in ki ima po iztiskovanju zadostno trdnost, da lahko nosi lastno težo oziroma težo celotnega ogrodja.

S poskusi smo ugotovili, da je kolagen in hidroksiapatit težko zmešati v primerno homogeno pasto. Zmes, ki smo jo lahko tiskali pa je bila prerodka, da bi nosila samo sebe. Zato smo izvedli preizkuse z alternativnimi zmesmi hidroksiapatita, alginata in hitozan ter čistega kolagena. S temi smo dobili zadovoljive rezultate, vendar bi za končno zmes kolagena in hidroksiapatita morali uporabiti modificirano šobo 3D tiskalnika, s katero bi oba materiala zmešali šele ob izstopu iz šobe tiskalnika.

Raziskava je kljub temu potrdila tezo, da je 3D tiskanje kostnih ogrodij iz omenjenih materialov mogoče, za uporabo v klinični praksi pa bo potrebnih še nekaj dodatnih raziskav.

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se svoji mentorici za usmerjanje in spodbudo pri delu. Zahvaljujem se zaposlenim na inštitutu Inras, kjer so mi omogočili izvedbo praktičnega dela ter mi pri tem pomagali in me usmerjali. Zahvaljujem se očetu, ki mi je pomagal pri raziskovanju problema s svojim znanjem in izkušnjami na tem področju.



## 1. UVOD

Pri kirurških posegih z večjimi izgubami kostnine obstaja več različnih možnosti za nadomestitev manjkajočega tkiva. Najpogosteje je za manjše defekte, še posebej na področju obrazne kirurgije, v uporabi transplantacija tkiva z drugih delov telesa istega pacienta, t.i. avtograft. Transplantat mora kirurg oblikovati tako, da se prilega v defekt, ki ga želi zapolniti. S prostoročno tehniko, brez vnaprejšnjega načrtovanja je to zelo težko doseči. Zato so izgube transplantirane kosti velike, ves poseg pa povzroči dodatno poškodbo in poveča možnosti infekcije. To je še posebej izrazito pri velikih defektih, za katere je treba zagotoviti velike transplantate, kar povzroči oslabitev dela s katerega vzamemo transplantat (prelomi črevnice, lopatice in podobno). Alternative avtograftom so alografi, transplantati s preminulega darovalca, in ksenografi, transplantati iz živalskega tkiva. Pri obeh obstaja velika možnost zavrnite transplantiranega tkiva s strani pacienta pri ksenograftih pa tudi do zapletov z zavrnitvijo med vrstami.

Pri jemanju transplantatov si danes lahko pomagamo z modernimi tri-razsežnimi tehnikami načrtovanja in dodajalno izdelavo kirurških vodil za izrez transplantatov. Z njimi je, v primerih avtograftov, mogoče poškodbe na donatorski strani omejiti, poseg pa bistveno skrajšati. Še vedno pa ostane dodatna poškodba na telesu.

Z izdelavo sintetičnih nadomestkov transplantatov, se izognemo večini naštetih problemov, če material sintetičnega nadomestka omogoča vraščanje lastnega tkiva in se sčasoma izloči iz telesa.

Dodajalna izdelava, popularno imenovana 3D tisk, je proizvodna tehnologija, ki je posebej primerna za posamično izdelavo oblikovno zapletenih izdelkov. Zaradi teh lastnosti se hitro uveljavlja v medicini, trenutno predvsem za izdelavo komunikacijskih modelov različnih organov ter kirurških vodil in vsadkov, narejenih za posameznega uporabnika. V zadnjem času poteka precej raziskav uporabe dodajalnih tehnologij na področju regenerativne medicine. Raziskovalci poskušajo z njihovo pomočjo izdelati nadomestne organe oz. tkiva. Pri tem 3D tiskalnik uporabijo za nanašanje materiala v končno želeno obliko, za dokončno kultivacijo s celicami pa poskrbijo t.i. bioreaktorji.

Kost je, za krvjo, najpogosteje presajeno tkivo. Vzroki za presaditev kosti so nesreče, odstranitev rakastih tumorjev in prirojene deformacije. Kot rečeno, je zlati standard v takih primerih uporaba avtograftov, ki s sabo nosijo precej negativnih posledic; izgubo kostnine na donatorski strani in dodatno poškodbo (Wahl and Czernuszka 2006).

3D tiskalniki se že danes uporabljajo za izdelavo resekcijskih vodil, oblikovanih na osnovi CT posnetkov poškodovanega mesta, ki kirurgom omogočajo natančen izrez in oblikovanje transplantata. S tem se poraba kostnine zmanjša na minimum, poseg pa je zaradi zanesljivosti bistveno krajši. Žal še vedno ostaneta poškodba in izguba kostnine na donatorskem mestu. Zato raziskovalci poskušajo najti gradiva s katerimi bi bilo mogoče 3D natisniti nadomestek pravilne oblike in se tako izogniti dodatnim posegom v telo.

**S predstavljeno raziskovalno nalogo smo zasledovali možnosti 3D tiskanja materialov, iz katerih bi bilo mogoče izdelati kostni nadomestek. Pri tem so nas zanimali materiali kot taki ter njihova obdelovalnost v smislu 3D tiskanja. Izhajali smo iz hipoteze, da je mogoče najti ustrezno mešanico biokompatibilnih materialov, ki jo bo mogoče uporabiti v 3D tiskalniku in bo po svoji kemični in biološki sestavi čim bolj podobna kostnemu tkivu.**

## 1.1 Kost

Kost je gosto, čvrsto, porozno, kalcirano vezivno tkivo, ki gradi poglavitni del vretenčarskega ogrodja. Sestavljena je iz goste, matične snovi in iz anorganske mineralne sestavine (Stušek et al. 2011).

Večina vretenčarjev ima notranje ogrodje, sestavljeno iz kostnega in hrustančnega tkiva v različnih razmerjih.

Hrustanec nastaja tako, da začnejo hrustančne celice v svojo neposredno okolico izločati medceličnino, ki je sestavljena iz organskih in anorganskih snovi, med katerimi je 60 – 70% vode. Glavna organska snov je posebna vrsta glikoproteinov, med njimi pa se razpredajo še velika nitasta kolagenska (dajejo hrustancu trdnost) in elastična (dajejo hrustancu veliko prožnost) vlakna. Žile potekajo po zunanji ovojnici hrustanca, ki jo imenujemo pohrustančnica.

Hrustanec in kost sodita med oporna vezivna tkiva.

Hrustančna in kostna tkiva nastanejo iz zarodkovih vezivnih tkiv. Nazadnje v razvoju, kostno tkivo ali kostnina nadomesti hrustančno.

Zakostevanje ali osifikacija je proces pretvarjanja vezivnega oz. hrustančnega tkiva v kostno. To poteka tako, da začne kostno tkivo nastajati v hrustancu, pri čemer se hrustančno tkivo nadomesti s kostnim. Na obodu kosti se mineralizirana medceličnina bolj zgosti in se naloži v obliki koncentričnih lamel. Med zakostenevanjem propade veliko hrustančnega tkiva, tako da nastanejo v notranjosti kosti votline, ki jih napolni kostni mozeg (Stušek et al. 2011).

Živi del kosti so kostne celice ter žile in živci, neživi del pa je deloma iz organskih, večinoma pa iz anorganskih snovi, ki jih izločajo žive kostne celice. Gre za tkivo, ki ima veliko trdne, nežive medceličnine. Organske snovi, ki jih celice izločajo, so pretežno velika beljakovinska vlakna, predvsem kolagenska, ki so odporna predvsem proti nateznim silam. V mrežo teh vlaken se nalagajo kristali kalcijevih in fosforjevih soli (kalcijev fosfat in kalcijev karbonat), ki pa so odporne bolj proti tlačnim silam.

Kost sestavlja približno 70% anorganskih mineralov, 20% organskih snovi in 10% vode. Pretežni del mineralov v kosti predstavlja hidroksiapatit (HA), organske snovi pa

v glavnem predstavlja kolagen tipa I (90%) in manjša količina (pod 10%) nekolagenskih proteinov kot sta osteonektin in osteokalcin. Biomehansko, HA zagotavlja kosti togost, kolagen pa elastičnost (Antebi et al. 2013). Za stanje kosti, torej za količino medceličnine, skrbita dve vrsti kostnih celic. Ene kost izgrajujejo - osteoblasti, druge pa jo razgrajujejo - osteoklasti. Kost se ves čas izgrajujejo in hkrati tudi razgrajujejo, kar imenujemo remodelacija.

Kost sestavlja kompaktna kostna skorja in gobasta sredica. Notranje, gobasto tkivo vsebuje precej praznih prostorov (50 – 90% poroznost) in je zato bolj gibko in manj trdno od kompaktne kostne skorje. Kompaktno kostno tkivo je zgrajeno iz kostnih stebričkov, ki potekajo vzdolž smeri kosti in je precej gostejše od gobaste sredice saj je poroznost manj kot 10%. Osnovna funkcionalna enota kompaktnega kostnega tkiva se imenuje osteon, ki je zgrajen iz koncentrično razporejenih plasti organske in anorganske medceličnine, ki jo izločajo prav tako koncentrično razporejene kostne celice. Na sredini vsakega osteona je kanal, v katerem potekajo živci in žile. Te oskrbujejo kostne celice z vsemi potrebnimi snovmi. V gobastem tkivu so kostne celice razporejene nepravilno, tako da ni osteonov, saj tudi plasti niso koncentrično razporejene. Kost se ves čas spreminjajo, pravimo, da se v njih dogaja dinamična remodelacija, na katero vpliva več zunanjih dejavnikov. Remodelacija poteka s staranjem, diferenciacijo in resorbcijo kosti, njeno dinamiko pa nadzorujejo interakcije med osteociti, osteoblasti in osteoklasti. Osteociti so celice, ki nastajajo iz osteoblastov z diferenciacijo med formiranjem nove kosti. Osteoklasti pa resorbirajo staro kost, kar v celotnem procesu predstavlja remodelacijo kosti in ji daje značilno sposobnost samoobnavljanja (Bose et al. 2013).

## 1.2 Ogradnja v tkivnem inženirstvu

Sintetični kostni nadomestki so objekti, ki imajo natančno obliko kostnine, ki jo želimo zamenjati. Po vstavitvi morajo ti nadomestki zagotavljati želeno nosilnost, omogočati preraščanje s tkivom pacienta in se počasi resorbirati ter dokončno izločiti iz telesa, ko lastno tkivo v celoti prevzame svojo funkcijo. Zato te, sintetične nadomestke imenujemo ogradnja (Inzana et al. 2014; Antebi et al. 2013)

Oblika ogradnje predstavlja ključno vlogo v tkivnem inženirstvu. Učinkovito ogradnje mora priskrbeti idealno mikrookolje za spodbujanje rasti celic in tkiva. Minimalne zahteve, ki jih mora ogradnje izpolnjevati so ustrezna mehanska stabilnost, da prenese sile krčenja celic, visoka poroznost z medsebojno povezanimi porami, ki olajšajo dovajanje hranil in odstranjevanje metabolnih odpadkov, biokompatibilnost materiala za spodbujanje tvorbe in integracije tkiv ter ustrezna stopnja biorazgradljivosti za regeneracijo tkiva.

Kolagen tipa I je eden izmed bolj priljubljenih materialov za izdelavo ogradenj v regenerativni medicini in tkivnem inženirstvu, zaradi njegove vsestranskosti, biorazgradljivosti in odličnih biokompatibilnih lastnosti. Slabost kolagena je njegova majhna mehanska nosilnost (i.e., low compressive modulus), zaradi katere kolagen sam po sebi ni primeren za nosilne elemente v kostnem tkivnem inženirstvu. Zato se ponavadi pojavlja v kompozitnih mešanica z anorganskimi materiali, predvsem hidroksiapatitom, s katerim najbolje posnema naravno sestavo kosti (Leukers et al. 2005; Bose et al. 2013).

V kostnem inženirstvu je razen razumevanja materiala pomembno tudi jasno razumevanje biologije celic, zunajceličnega matriksa (ECM) in rastnih faktorjev. Ogradnja so sestavni del kostnega inženirstva. So trirazsežne biokompatibilne strukture, ki lahko posnemajo lastnosti ECM, kot so mehanska podpora, celična dejavnost in proizvodnja beljakovin z biokemičnimi in mehanskimi interakcijami, ter zagotavljajo podlogo za pritrditev celic in spodbujajo tvorbo kostnega tkiva in-vivo.

Kritični parametri, ki določajo učinkovitost ogradnje, so njegove kemične lastnosti, velikost in prostornina por ter mehanska trdnost. V zgodnji fazi se vraščanje kosti dogaja na obrobju ogradnje z zmanjševanjem mineralizacije proti notranosti. Za nadaljnje vraščanje kostnega tkiva je pomembna medsebojna povezanost por. Odprte

in med seboj povezane pore omogočajo hranilnim snovem in molekulam, da se prenesejo v notranje dele ogrodja, kar olajša rast celic, vaskularizacijo in odstranitev odpadnega materiala. Ker večja poroznost poveča površino na enoto prostornine, lahko na kinetiko biorazgradnje ogrodij vplivamo s spreminjanjem parametrov por.

Biološka razgradnja, ki poteka preko celičnih procesov, in kemično raztapljanje sta pomembni za zagotavljanje stabilne obnove in zamenjavo ogrodja z novo kostjo, brez ostankov.

Za tvorbo kosti je minimalna potrebna velikost por med 100 in 150  $\mu\text{m}$ , a kot poročajo (Karageorgiou and Kaplan 2005; Xue et al. 2007; Otsuki et al. 2006), je tvorba kosti in vaskularizacija veliko boljša v porah, ki so večje od 300  $\mu\text{m}$ . Velikost por igra pomembno vlogo tudi pri nastajanju in organizaciji ECM. Volumen por nadzoruje tudi prepustnost hranilnih snovi v ogrodje in njegove mehanske lastnosti.

Za zagotavljanje optimalnega celjenja kosti, se morajo začetne mehanske lastnosti in hitrost razgradnje ogrodja, ujemati z lastnostmi tkiva v katerega ogrodje vgrajujemo. Kinetika upadanja trdnosti poroznih ogrodij je odvisna od velikosti por, njihove oblike in usmerjenosti opornikov glede na smer obremenitve. Površinske lastnosti, kot so površinski naboji, topografija in kemijske lastnosti, prav tako vplivajo na hidrofilitnost in posledično interakcije med celicami in materiali za vraščanje kostnega tkiva.

Porozna ogrodja lahko izdelamo z različnimi metodami; kemično/plinsko penjenje, litje s topili, sušenje z zamrzovanjem in penjeni geli so nekatere od tistih, ki se najpogosteje uporabljajo. Toda velikosti por in njihove povezanosti s temi pristopi ni mogoče nadzorovati v celoti. Prav tako je z večino teh pristopov težko izdelati ogrodje s prilagojeno poroznostjo za točno določeno obliko poškodb. Zato se za izdelavo takšnih ogrodij vse pogosteje uporablja dodajalna izdelava (AM – Additive Manufacturing).

## 1.3 Biomateriali za kostna ogrodja

### 1.3.1 Kolagen

Kolagen je glavna strukturna beljakovina zunajceličnega prostora vezivnega tkiva v telesu. Kot glavna komponenta vezivnega tkiva, predstavlja 25 – 30% celotne vsebine beljakovin v telesu. Kolagen je sestavljen iz aminokislin, ki so povezane skupaj, tako da tvorijo trojne spirale podolgovatih vlaken.

Najdemo ga v kosteh (Tip I), hrustancu (Tip II) in v stenah krvnih žil (Tip III) vseh sesalcev, njegovo pridobivanje pa je relativno enostavno. Kolagen se hitro razkraja in resorbira v telesu in omogoča dobro pritrjevanje celic. Njegove mehanske lastnosti ( $E \sim 100$  MPa) so v primerjavi s kostjo ( $E \sim 2-50$  GPa) dokaj nizke (Wahl and Czernuszka 2006; Chia and Wu 2015).

### 1.3.2 Hitozan

Hitozan je linearni polisaharid, sestavljen iz naključno razporejenih D-glukozaminov in N-acetil-D-glukozaminov. Pridobivajo ga iz hitinskih oklepov škampov in drugih členonožcev z alkalnimi snovmi kot je NaOH. Hitozan ima raznovrstno uporabnost v biomedicini in komercialnih področjih. Uporabljamo ga v agronomiji za pripravo semen in kot biopesticid za zatiranje glivičnih infekcij. V vinarstvu se uporablja za stabilizacijo vina in zagotavljanje obstojnosti. V medicini se uporablja kot dodatek obližem, za preprečevanje krvavenja, in kot baktericid; uporabljajo ga tudi za pomoč pri dovajanju zdravil skozi kožo (Wikipedia 2019a).

### 1.3.3 Hidroksiapatit

Hidroksiapatit (HA) je naravna mineralna oblika kalcijevega apatita -  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ . Kristalizira v heksagonalno rešetko in je bele barve. Do 50% volumskih in 70 masnih % človeške kosti je modificirana oblika hidroksiapatita, ki jo poznamo kot kostni mineral. Hidroksiapatit predstavlja tudi osnovno sestavino sklenine. Hidroksiapatit se vse pogosteje uporablja kot kostni nadomestek pri popravilih manjših poškodb. Nekatere vsadke kot so kolčne endoproteze, zobni vsadki prevlečejo s hidroksiapatitom da s tem izboljšajo njihovo integracijo v gostiteljsko kostno tkivo. Ker je hitrost naravnega raztapljanja HA (10 wt%/leto) bistveno manjša od rasti novega kostnega tkiva, poskušajo najti načine za povečanje njegove topnosti in s tem boljšo biokompatibilnost (Wikipedia 2019b).

#### 1.3.4 Alginat

Alginska kislina, algin ali alginat je polisaharid, ki je zelo razprostranjen v celičnih stenah rjavih alg. Alginska kislina je linearni kopolimer, sestavljen iz homopolimernih blokov s kemično formulo  $(C_6H_8O_6)_n$

Alginat pridobivajo iz rjave morske trave, ki jo predelujejo v t.i. natrijev alginat. Najdemo ga v prehrambeni, tekstilni in farmacevtski industriji. Iz njega izdelujejo material za jemanje odtisov zob v zobozdravstvu, zaradi njegove sposobnosti želiranja in ohranjanja oblike.

Alginat lahko uporabljamo kot hidrogel v bioinženirstvu. Še posebej zanimiva je njihova raba pri rekonstrukciji kostnih tkiv, saj vzpodbuja regeneracijo z izboljšano poroznostjo, prehajanjem celic in mehansko trdnostjo (Wikipedia 2019e).

#### 1.3.5 Tris

Tris (hydroxymethyl)aminomethane, v medicini poznan kot tromethamine ali THAM, je organska spojina s kemično formulo  $C_4H_{11}NO_3$ . Uporablja se predvsem v biokemiji kot spojina za vzdrževanje stalnega pH (Wikipedia 2019d).

#### 1.3.6 Želatina

Želatina nastane s hidrolizo kolagena za uporabo v prehrambni industriji kot želirni reagent, v medicini, papirni in kozmetični industriji. Hidroliza kolagena reducira njegove beljakovinske fibrile v manjše peptide in je nepovratna (Wikipedia 2019c).



## 1.4 Dodajalna izdelava

Dodajalna izdelava je novo področje proizvodnih tehnologij, ki se je v poznih 80' letih pridružilo bolj znanima področjema odrezavanja in preoblikovanja. Kot ime pove, pri dodajalnih tehnologijah materiala niti ne odrezujemo od surovca niti ga ne potiskamo v kalupe z namenom preoblikovanja. Pri dodajalnih tehnologijah material dodajamo po slojih, na mesta, ki jih določa vnaprej oblikovan računalniški model izdelka, ki ga želimo narediti. Predstavljajmo si, da trirazsežen, računalniški model »narežemo« na tanke sloje, recimo debeline enega lista pisarniškega papirja. Tako dobimo veliko število slojev od katerih vsak predstavlja en prerez celotnega modela. Tak prerez je dvorazsežna slika, ki bi jo lahko natisnili z običajnim tiskalnikom. Če bi natisnili vse prereze na posamezne liste papirja, bi jih lahko izrezali s škarjami, namazali z lepilom, jih v pravilnem zaporedju položili enega na drugega in nastal bi otipljiv model. Problematične pri tem pristopu so škarje in dejstvo, da ne režejo same. Zato se je razvilo precej različnih procesov dodajalnih tehnologij, ki opisan postopek avtomatizirajo. Nekateri med njimi za gradnjo uporabljajo tudi papir, večina pa različne polimere, keramiko in kovine. Ne glede na material je vsem skupen naslednji postopek:

- Trirazsežen CAD model želenega objekta uvozimo v program s katerim model pripravimo za izdelavo. Priprava vključuje pregled modela in njegovo postavitv v delovni prostor naprave. Zaradi gradnje po slojih postavitv modela vpliva na kakovost površine in čas izdelave, ki je predvsem odvisen od višine (Z) modela med izdelavo.
- Sledi izdelava podpornega sistema, če ga postopek potrebuje in »razrez« modela na sloje.
- Podatki o posameznih slojih nato potujejo do krmilne enote naprave, ki poskrbi za njihovo izdelavo. Podajalni sistem se po vsakem izdelanem sloju pomakne za debelino sloja navzdol (ponekod tudi navzgor – odvisno od konstrukcije naprave), čemur sledi izdelava naslednjega sloja.

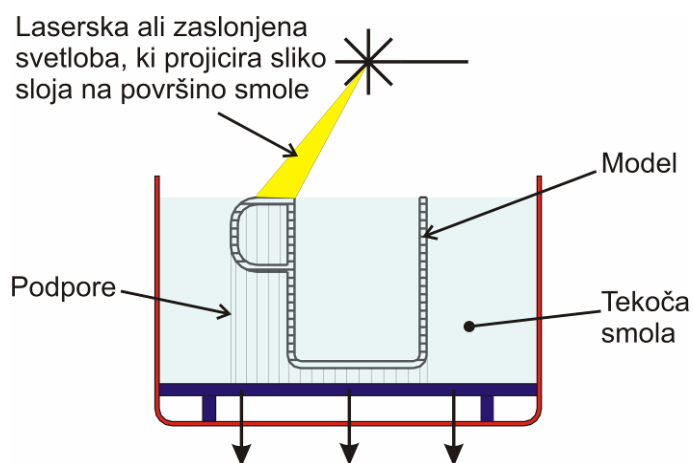
Zaradi neposredne povezave med napravo za dodajalno izdelavo in računalnikom se je teh naprav prijelo ime 3D tiskalniki, kljub temu, da le redki dejansko spominjajo na avtomatizacijo Gutenbergove zamisli.

Princip po katerem posamezne naprave izdelujejo/nanašajo sloje je od postopka do postopka različen in odvisen predvsem od materiala.

Glede na način dodajanja gradiva lahko postopke delimo na:

- selektivno strjevanje,
- selektivno sintranje,
- ciljno nalaganje in
- nalaganje krojenih plasti.

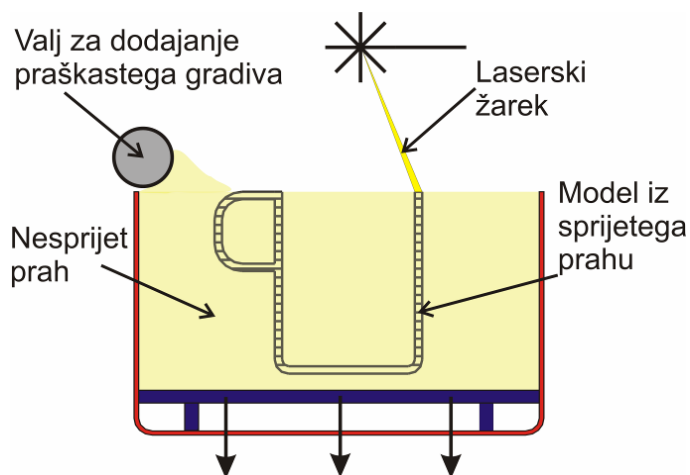
Pri selektivnem strjevanju s pomočjo vnaprej oblikovanega energetskega snopa (svetloba, elektroni,...) strujemo umetno smolo na določenih mestih, da nastane želen model. Trenutno so postopki omejeni na foto-polimerizacijo, pri čemer polimerizacijo sproži usmerjen svetlobni snop, ki navadno prihaja iz laserskega vira. Vir je lahko tudi UV svetloba, zaslonjena s posebej pripravljenimi zaslonkami, ki imajo obliko posameznega sloja ali pa UV svetloba, ki prihaja iz projektorja, podobnega tistim v učilnicah.



*Slika 1: Princip selektivnega strjevanja.*

Postopki selektivnega sintranja precej odstopajo od klasičnega sintranja, pri katerem celoten proces sestavljata dve fazi. V prvi prah z velikim tlakom stisnemo v končno obliko izdelka, v drugi pa tako stisnjen izdelek izpostavimo visokim temperaturam in s

tem povzročimo spajanje (difuzijo) prašnih delcev – sintranje. Pri selektivnem sintranju prve faze ni, drugo pa opravi navadno laserski žarek, ki praškasto gradivo nataljuje na določenih mestih, zaradi česar se prašni delci sprimejo v celoto želene oblike.

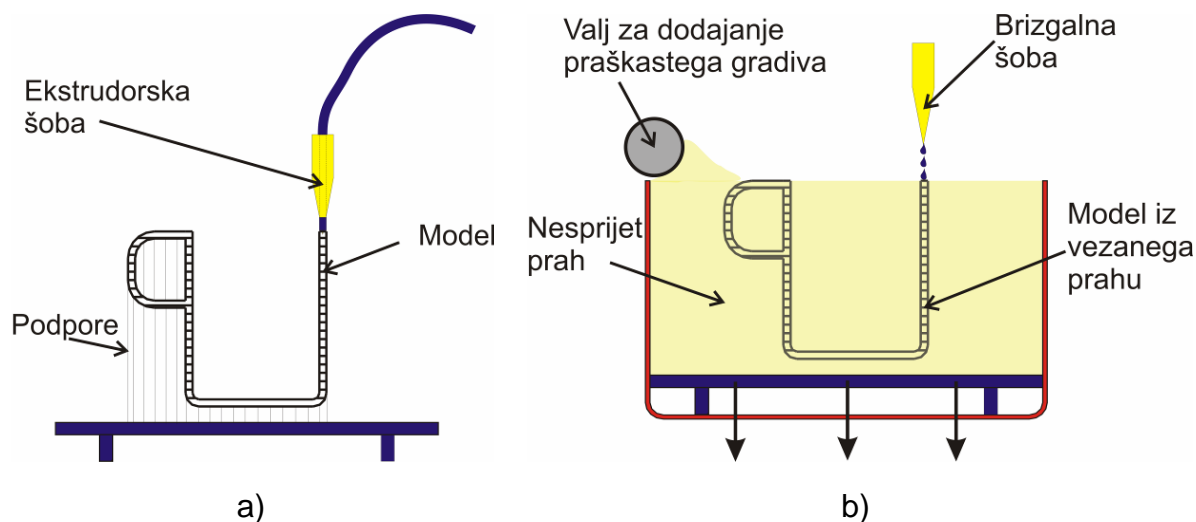


Slika 2: Princip selektivnega sintranja

Ciljno nalaganje je skupina postopkov pri katerih je tok gradiva usmerjen na določena mesta rastočega modela. Glede na obliko toka gradiva in način nastajanja izdelka ločimo med tremi nalagalnimi postopki:

- kapljično,
- neprekinjeno,
- kapljično-prašno.

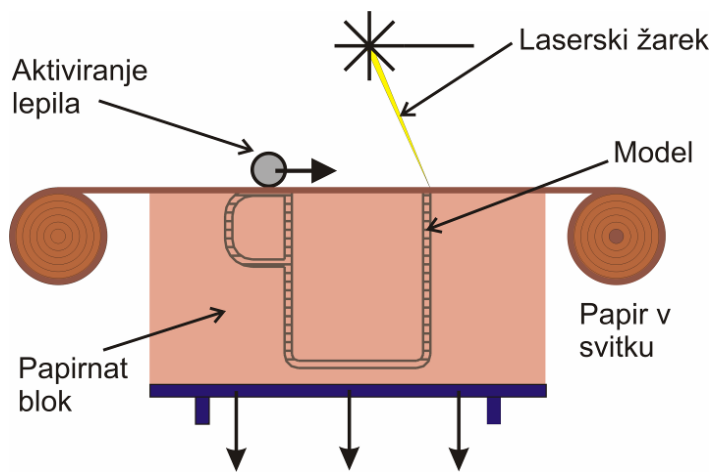
Pri kapljičnem nalaganju gradivo prihaja v toku drobnih kapljic iz »tiskalne« glave na podstavek naprave. Postopek spominja na tehnologijo kapljičnih tiskalnikov, le da iz tiskalne glave ne prihaja barva, temveč gradivo iz katerega nastaja model. Naprav, ki delujejo po postopku kapljičnega in kapljično-prašnega nalaganja, se je prijel naziv trirazsežni tiskalniki. Neprekinjeno nalaganje pomeni, da gradivo prihaja v neprekinjenem toku skozi iztiskovalno šobo. Gradivo je ponavadi termoplastičen polimer, ki ga naprava segreje in v obliki tanke nitke nanaša na podlago.



Slika 3: Princip ciljnega nalaganja. a) neprekinjeno, b) kapljično-prašno

Kapljično-prašno nalaganje se od kapljičnega razlikuje po tem, da iz tiskalne glave ne prihaja gradivo, temveč le vezivo, ki pada na plast praškastega gradiva. Model nastaja s spajanjem gradiva pod vplivom veziva.

Nalaganje krojenih plasti še najbolj spominja na princip slojevite gradnje, opisan na začetku, le da vlogo škarij prevzame rezalni sklop naprave. Gradivo, po navadi papir ali PVC, v obliki tankih slojev (listi in plošče), naprava oblikuje, izrezuje in lepi v model. Postopek vedno poteka v dveh korakih. V prvem koraku rezalni sklop naprave izreže »kroj« plasti, ki se nalaga, v drugem koraku pa lepilni sklop poskrbi za spajanje plasti med sabo. Rezalni sklop je lahko izveden kot laserska rezalna naprava ali kot rezilo, ki ga krmilni sistem vodi po plasti podobno kot pri peresnih risalnikih pero. Obstajajo tudi postopki, kjer vlogo rezila prevzame CNC rezkalnik (Drstvenšek 2004).



*Slika 4: Princip nalaganja krojenih plasti.*

## 1.5 Dodajalna izdelava v tkivnem inženirstvu

Od navedenih postopkov se v tkivnem inženirstvu največ uporabljajo postopki neprekinjenega ciljnega nalaganja in postopki kapljično-prašnega nanašanja, ker je z njimi mogoče neposredno uporabiti biokompatibilne materiale, brez dodajanja veziv in ostalih, »tehnoloških« materialov. Sicer pa so v tkivnem inženirstvu v uporabi naprave iz vseh naštetih skupin dodajalnih tehnologij.

Postopki selektivnega strjevanja, med katerimi je najbolj znana stereolitografija (SLA) uporabljajo fotopolimerne smole, med katerimi praktično ni biokompatibilnih. Zato se postopek pretežno uporablja za posredno izdelavo ogrodij oziroma izdelavo komunikacijskih modelov za operativne posege. Sicer pa tipični materiali obsegajo akrilne in epoksi smole.

Za uporabo v tkivnem inženirstvu obstaja zelo malo biorazgradljivih in biokompatibilnih materialov, ki so med fotopolimerizacijo dimenzijsko stabilni. V SLA se običajno uporablja poli (propilen fumarat) (PPF), s katerim so izvedli izdelavo kompleksnega 3D ogrodja z nadzorovanimi mikrostrukturami za rekonstrukcijo dela lobanje zajca. Za zagotavljanje ustreznih obdelovalnih pogojev, je treba viskoznost smole zmanjšati z reaktivnim razredčilom kot je dietil fumarat ali N-vinil-2-pirolidon (N-vinyl-2-pyrrolidone). S temi razredčili pride v ogrodje večja količina nerazgradljivih komponent.

Medtem, ko so biokompatibilni materiali še v pospešenem razvoju, pa je dostopnih že precej disperzij keramičnih prahov kot sta HA in TCP v fotopolimernih materialih. Tako je s SLA tehnologijo mogoče izdelati zelo natančna keramična ogrodja, ki jih po izdelavi sintramo pri visokih temperaturah in jim naknadno dodamo organske dodatke kot so kolagen in podobni.

Selektivno strjevanje je postopek s katerim brez izjeme uporabljamo praškaste materiale, ki jih z energijskim virom stalimo in tako selektivno povežemo v homogen izdelek. Materiali, ki jih pri teh postopkih uporabljamo so lahko termoplastični polimeri, keramika ter kovine, ki pa morajo biti v praškasti obliki. Energetski viri so po navadi laserji, za kovinske izdelke pa tudi elektronski snop. Bistvena prednost te tehnologije je možnost izdelave izdelkov s spremenljivo togostjo, kar je še posebej pomembno pri posnemanju sestave kompaktne (skorja) in gobaste kosti ter njunega prehoda.

Nedavni napredek v SLS tehnologiji je zmožnost proizvodnje ogrodij nižje togosti in večjih ločljivosti. PCL ogrodja so tako izdelana pri togosti 300-400 kPa namesto pri 14,9-113,4 MPa kot v preteklosti. Nižja togost omogoča uporabo SLS tehnologije v inženirstvu mehkih tkiv kot je srčno tkivo. Precej naporov so vložili tudi v pospešitev procesa računalniškega oblikovanja funkcijsko stopnjevanih ogrodij. To so ogrodja katerih mehanske lastnosti se spreminjajo skozi njihovo strukturo. To so dosegli z uporabo knjižnic poliedrov za generiranje poroznosti s čimer regulirajo togost končnega izdelka. Metodo so preizkusili z izdelavo funkcijsko stopnjevanih ogrodij iz PCL.

Materiali, ki se običajno uporabljajo s SLS tehnologijo pri izdelavi bioloških ogrodij so PCL in HA, PCL in  $\beta$ -TCP s kolagensko prevleko, Ca-P/PHBV in CHAp/PLLA ter PVA.

S kapljično prašnim nalaganjem je mogoče izdelovati ogrodja iz kompozitnih materialov, pri katerih je en material v praškasti obliki, drugi pa igra vlogo veziva, ki ga na vsako plast nanese tiskalna glava za kapljično nanašanje. Vezivo je lahko kemična spojina, ki keramična zrnca zgolj začasno spoji med sabo, nakar je treba izdelano ogrodje še termično obdelati – sintrati. Lahko pa so veziva tudi organski materiali, ki jih najdemo v ECM in v končanem ogrodju igrajo dejavno vlogo. Nekaj najpogosteje uporabljenih materialov v postopku kapljično-prašnega nanašanja so kalcijev polifosfat in PVA, HA in TCP, TCP, TCP z dodajanjem SrO in MgO, HA in apatitno-volastonitnega stekla z vezivom, ki temelji na vodi, kalcijev fosfat s kolagenskim vezivom, PLGA in farringtonitski prah ( $Mg_3(PO_4)_2$ ) (Chia and Wu 2015).

Neprekinjeno ciljno nalaganje se v tkivnem inženirstvu uporablja tako v svoji originalni obliki kot FDM (Fused Deposition Modelling) postopek in v modificirani obliki, ki jo pogosto najdemo pod imenom 3D pisanje (3D plotting) in bio-tiskanje (Direct-write bioprinting). Pri originalnem postopku uporabljamo material v obliki termoplastičnih žic, ki jih tiskalna glava tali in iztiskuje skozi šobo na delovni pladenj. V modificirani obliki pa namesto iztiskovalnih šob najdemo valjaste vsebnike iz katerih z nadtlakom iztiskujemo tekoč ali pastozen material.

S FDM postopkom se največ uporabljajo biokompatibilni plastični polimeri z nizkimi temperaturami tališč. Za izdelavo ogrodij se tako uporabljajo PCL in bioaktivno steklo

PCL-TCP z gentamicinom, PCLTCP, PLGA-TCP s prevleko iz HA, PCL z želatinsko prevleko, PCL, PMMA, in PLA.

3D pisanje so razvili v Freiburgu na Centru za raziskave materialov, leta 2000 za izdelavo ogrodij za mehka tkiva. 3D pisanje temelji na iztiskanju viskoznega tekočega materiala (raztopine, paste ali disperzije) iz brizge pot tlakom v tekoči medij primerljive gostote. Material se odlaga v dolgi neprekinjeni niti ali v posameznih kapljicah, iz šobe ali brizge, ki ustvarijo želeno 3D obliko iz keramike, polimerov ali hidrogelov. Postopek lahko poteka pri sobni ali pa pri povišanih temperaturah in ne vključuje termoplastov kot pri FDM. Ta metoda dodajalne izdelave je še posebej primerna za naravne biomateriale, ki jih uporabljajo za ustvarjanje hidrogelov. Landers in drugi (Landers et al. 2002) so za bio-pisanje uporabili naravne termoplaste kot je raztopina agarja in želatine. Raztopino so segreli na  $\sim 80^{\circ}\text{C}$  in jo skozi šobo iztiskali v hladnejšo ( $\sim 20^{\circ}\text{C}$ ) tekočo želatino ali silikonsko olje, kjer se je hitro ohladila. Drug pristop pa je iztiskovanje polimerov v tekoč medij, ki vsebuje zamreževalce, npr. iztiskanje želatine v posodo s  $\text{Ca}^{2+}$ . Trdne materiale kot je TCP lahko uporabimo v vodni raztopini, ki jo iztisnemo iz brizge in nato z liofilizacijo odstranimo vodo. Za vodnimi kristali ostanejo pore med katerimi so nosilni elementi premera  $\sim 400 \mu\text{m}$ .

Bistveni prednosti tega postopka sta prilagodljivost na različne materiale in delovanje pri sobni temperaturi. Tega večina drugih dodajalnih tehnologij ni sposobna. Ključna slabost 3D pisanja je nezmožnost izdelave previsov, saj bi zanje potrebovali drug, začasen podporni material. Poleg tega imajo tako narejeni hidrogeli nizko togost, zaradi česar se lahko narejene strukture sesedejo, kar otežuje izdelavo ogrodij zahtevnih oblik.

Bio-tisk je zelo podobna tehnologija za izdelavo struktur iz hidrogelov, pri kateri pa vanje neposredno dodajamo celice. Celice dodajamo z različnimi strategijami kot sta iztiskovanje zmesi celic (govejih kondrocitov) in alginata skozi brizgalno šobo in elektrostatično »ink-jet« tiskanje endotelijskih celic iz govejih žil v kultivacijski medij.

Tehnologija biotiskanja zagotavlja nadzorovano prostorsko razporeditev celic ali rastnih faktorjev kot tudi ostalih struktur ogrodja. Zaradi svoje narave je omejena na hidrogelne materiale kot sta alginat in fibrin ki nista primerna za vstavljanje v biološka okolja, ki zahtevajo veliko mehansko trdnost.



Primeri uporabe so kapljice kolagena (premera 650  $\mu\text{m}$ ), napolnjene s celicami podganjih gladkih mišic za izdelavo posebnih prostorskih vzorcev. Ta metoda dodajalne izdelave je posebej primerna za nizko viskozne materiale, ki jih lahko iztiskujemo v tekoč medij, v katerem jih pred sesedanjem varuje vzgon. Debelina iztisnjene niti lahko reguliramo z viskoznostjo materiala, hitrostjo nalaganja, premerom šobe in tlakom.

Bistvene prednosti tega postopka so delovanje pri sobni temperaturi ter neposredno vključevanje in enakomerna razporeditev celic.

Ključne pomanjkljivosti so omejena mehanska togost, kratek čas želiranja, primerljive gostote materiala in okolijskega medija in nizka ločljivost. Z nadaljnjim razvojem materialov, primernih za biofaktorsko tiskanje, in tiskalnih glav (šob), ki lahko neodvisno nanašajo več biofaktorjev in materialov na isto platformo, bo mogoče izdelati zahtevna ogrodja, ki bodo izpolnjevala biološke zahteve za tkivno inženirstvo.

## 2. METODE IN MATERIALI

Iz razpoložljive literature (Bergmann et al. 2010; Hinton et al. 2015; Murphy and Atala 2014; Shirazi et al. 2015) je razbrati, da je kombinacija hidroksiapatita in kolagena najobetavnejši kompozit v tkivnem inženirstvu, saj nudi vse, zgoraj naštete lastnosti, ki jih mora imeti ogrodje za regeneracijo kostnega tkiva. Tehnologija, ki omogoča največ tehnološke prožnosti oziroma raznovrstnosti v uporabi obeh materialov pa je proces neprekinjenega ciljnega nalaganja imenovan tudi 3D bio-pisalnik. Zato smo pričujočo raziskavo zasnovali na obeh omenjenih materialih, ki smo ju poskušali zmešati in oblikovati v želeno obliko preizkušanca.

Na teh izhodiščih smo postavili hipotezo raziskave, ki pravi, da je iz obeh materialov mogoče narediti pastozno zmes, ki jo je mogoče uspešno iztisniti iz delovne šobe 3D pisalnika, in ki nanešena v delovni prostor ohranja svojo obliko, je torej samonosilna.

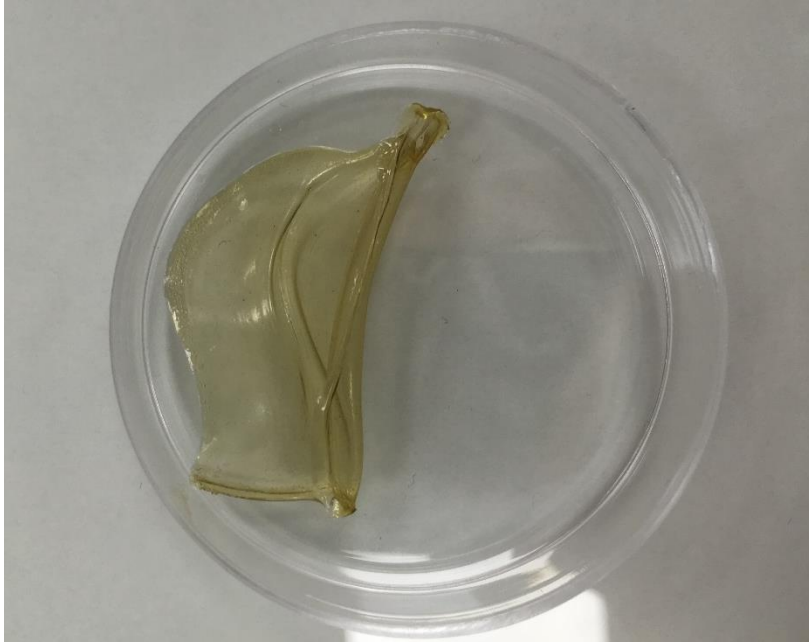
V raziskavi smo uporabili kolagen z 1,7% koncentracijo suhe snovi in hidroksiapatit, pridobljen iz lupin morskih školjk. Proizvajalec obeh materialov je podjetje GTR Ltd, Fuzhou, Kitajska. Med poskusi smo uporabljali tudi hitozan, istega proizvajalca, alginat ter tris,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NaOH}$  in  $\text{NH}_4\text{OH}$  proizvajalca Sigma Aldrich.

Preizkuse 3D pisanja smo izvajali na napravi Vitaprint, proizvajalca IRNAS iz Maribora.

Tehtali smo na laboratorijskih tehtnicah Kern EMB 600-2 in Mettler toledo. Za doziranje materialov in mešanje smo uporabljali 100 in 1000  $\mu\text{l}$  pipeti proizvajalca Carl Roth, ter magnetno mešalo Snijders Thermal Stirrer 34533.

Homogenizacijo kolagena smo izvajali s pomočjo električnega mešalca Grundig SN 3330 in UZ kopeli SilverCrest SUR 48 C4.

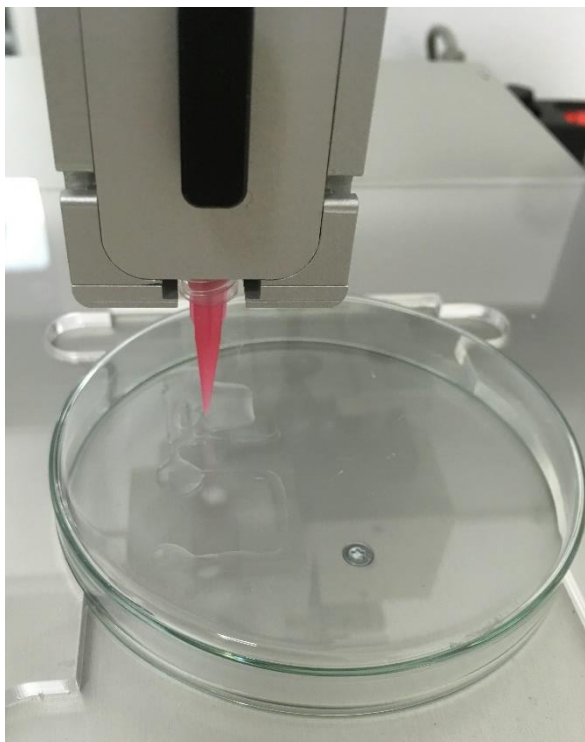
Raziskave smo začeli s karakterizacijo materialov. Preverili smo vsebnost suhe snovi v razpoložljivem kolagenu in hitozanu. S tehtanjem in sušenjem smo izračunali koncentracijo suhe snovi v raztopinah, ki smo jih uporabljali. Koncentracija kolagena je bila 1,7%, koncentracija hitozana pa 7,2%.



*Slika 5: Suha snov v hitozanu.*

## 2.1 Homogenizacija kolagena

Kolagen, je bil preveč nehomogen, da bi ga lahko iztiskali skozi šobo tiskalnika ali ga mešali z ostalimi komponentami, zato smo ga poskušali homogenizirati. V ta namen smo najprej uporabili (destilirano) vodo in poskušali zmanjšati viskoznost. Po večurnem mešanju z magnetnim mešalom nismo dosegli želenih rezultatov, saj smo dobili zelo tekočo mešanico, ki med tiskanjem ni bila samonosilna.



a)



b)

*Slika 6: a) Tiskanje kolagena, razredčenega z vodo. b) Homogenizacija kolagena z mešalcem.*

Naslednji poskus homogenizacije je bilo mešanje električnim mešalnikom, s katerim smo poskušali vlakna ločiti in razporediti po vsebini. Sprememba je bila opazna, vendar se je kolagen kmalu spet povrnil v stanje pred mešanjem.

Zaradi predhodnih izkušenj smo poskusili kolagen homogenizirati z amonijakom, vendar se je metoda izkazala za napačno, saj se je kolagen zgrudil zaradi povečanja pH vrednosti raztopine.

V nadaljevanju smo poskusili homogenizacijo kolagena doseči s segrevanjem v vodni kopeli in z obdelavo z ultrazvokom. Vzorec kolagena smo dali v čašo, čašo pa v vodno kopel s temperaturo 51 °C. Kolagen se je homogeniziral, lahko smo ga tiskali, a samo dokler je bil topel, ko pa se je ohladil, se je šoba zamašila. Za ultrazvočno obdelavo smo uporabili pripravo za čiščenje z UZ v vodni kopeli. V posodo priprave smo nalili vodo, vzorec kolagena pa dali v plastično vrečko in jo potopili v kopel. Z ultrazvokom pri frekvenci 48 kHz smo kolagen obdelovali v časovnih intervalih 80, 160, 240 in 480 sekund. Kolagen smo uspeli homogenizirati po 480 sek, pri čemer je sprememba ostala trajna, tako da smo ga lahko tiskali tudi v hladnem stanju.

## 2.2 Mešanje kolagena s hidroksiapatitom

Pri poskusih mešanja kolagena s hidroksiapatitom v prahu, se je material vedno zgrudil, ne glede na to ali smo uporabili homogeniziran ali nehomogeniziran kolagen.

Najprej smo kolagen in HA poskušali zmešat s terilnico. Prišlo je do dovolj velike spremembe, da smo mešanje lahko nadaljevali z magnetnim mešalnikom. Mešali smo čez noč, naslednji dan pa poskusili tiskati, a delci v zmesi niso bili dovolj majhni, da bi proces lahko potekal brez težav.



a)



b)

Slika 7: a) Mešanje HA in kolagena v terilnici. b) Nehomogena zmes HA in kolagena.

Zaradi dobrih izkušenj z UZ homogenizacijo kolagena, smo poskusili HA zmešat s kolagenom v UZ kopeli. Žal neuspešno.

Nato smo se odločili, da bomo HA poskušali mešati z alternativnimi materiali. Izbrali smo hitozan in alginat. Oba smo lahko zmešali s HA v homogeno, pastozno zmes, primerno za iztiskovanje skozi šobo. Naredili smo 2mL raztopine alginata, za kar smo potrebovali 10mL vode in 0,11g alginata, torej smo naredili 1% raztopino, v katero smo

nato zmešali 3g HA. Za mešanico hitozana in HA pa smo uporabili 8,3g hitozana in 7g HA.



a)



b)

Slika 8: a) Pipetiranje vode. b) Priprava mešanice HA in hitozana.

## 2.3 3D BIO-pisanje

Za poskuse 3D pisanja smo uporabili napravo VITAPRINT. Napravo sestavlja pomični portalni nosilec, na katerem so prečna vodila, ki nosijo tiskalno glavo. Takšna zasnova omogoča pomike v kartezijskem koordinatnem sistemu. V konkretnem primeru se portal premika v smeri Y osi, prečna vodila imajo smer X osi, tiskalna glava pa se pomika v Z smeri.



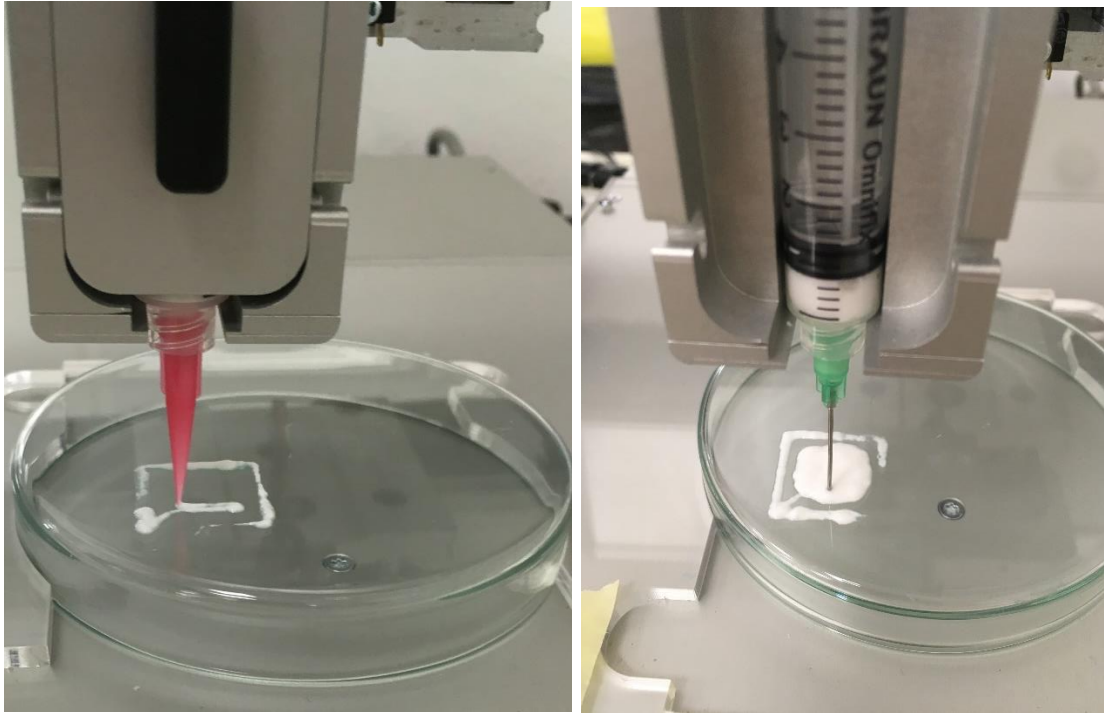
*Slika 9: Vitaprint*

Tiskalno glavo tvori vpenjalo za plastično brizgalko z vretenom in pogonom vretena. Vreteno omogoča pomikanje bata brizgalke, ki ga reguliramo s hitrostjo pogona vretena. Brizgalka omogoča priklop različnih šob, od topih injekcijskih igel, za manjše premere iztiskovanja, do posebnih koničnih nastavkov z večjimi odprtini.

Za vzorec 3D pisanja smo izbrali kvader s stranicami  $10 \times 10 \times 5 \text{ mm}^3$ , ki smo ga polnili z razmiki med sledmi, velikosti 1mm. Na ta način smo generirali poroznost vzorca kot jo navaja literatura v zvezi s potrebami preraščanja s kostnim tkivom.

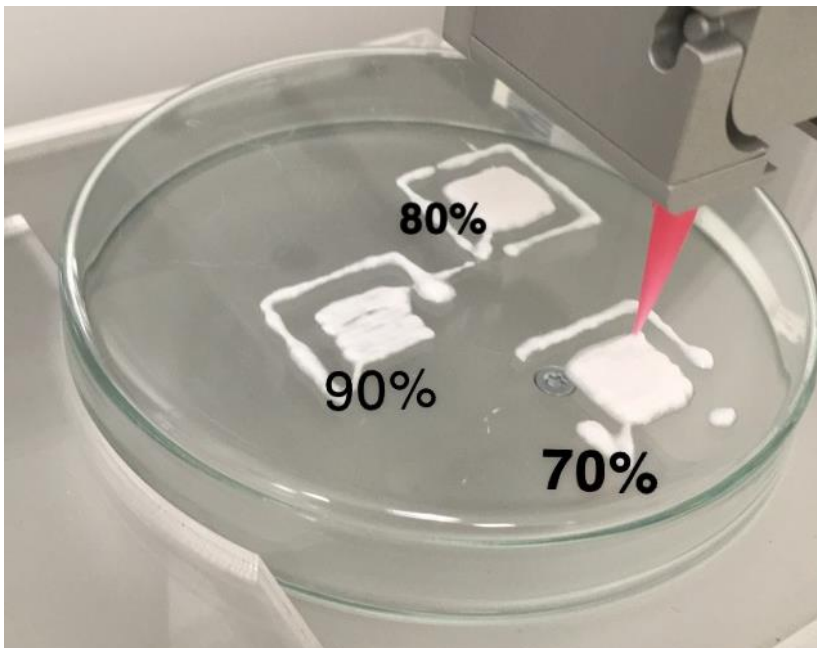
Najprej smo poizkusili tiskanje mešanice kolagena in HA, ki smo ju zmešali v terilnici. Preizkus smo izvedli z različnimi premeri šob in z različnimi hitrostmi iztiskovanja.





*Slika 10: Tiskanje mešanice HA-kolagen z različnimi oblikami in premeri šob.*

Žal rezultati niso bili preveč obetavni. Poleg nezadostne trdnosti iztisnjene materiala, je bila problematična tudi nehomogenost, zaradi katere se je material zatikal in mašil šobe. Poizkušali smo z različnimi hitrostmi iztiskovanja, vendar neuspešno.

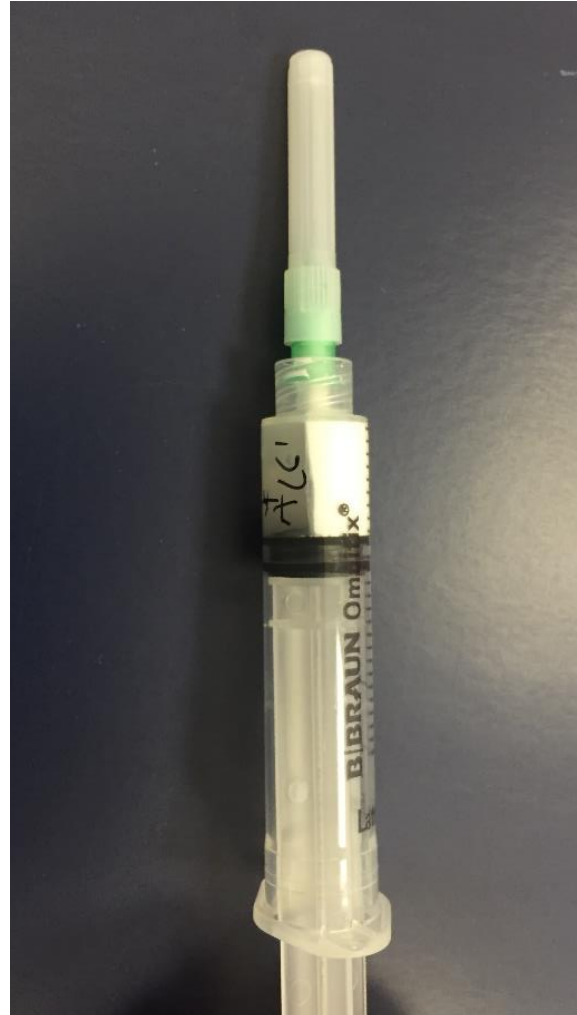


*Slika 11: Poskusi tiskanja pri različnih hitrostih iztiskovanja.*

Poskuse tiskanja smo nadaljevali z mešanicama HA-hitozan in HA-alginat, s katerima smo napolnili dve brizgalki. Brizgalko z mešanico alg-HA smo vstavili v prijemalo tiskalne glave in preverili poskusne parametre tiskanja (hitrost pomikanja in iztiskovanja).



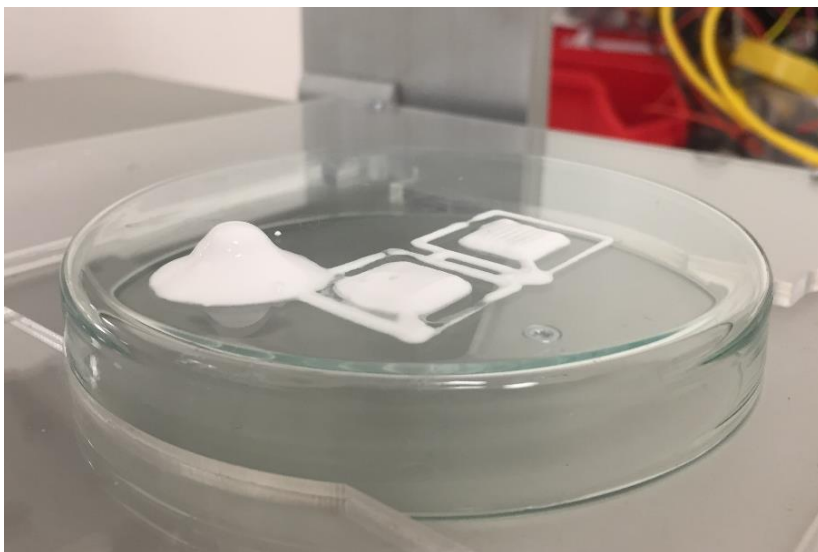
a)



b)

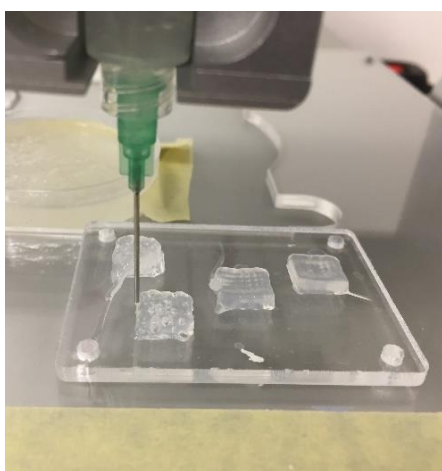
*Slika 12: Brizgalki, napolnjeni z mešanico HA in hitozana (a) oziroma HA in alginata (b).*

Najprej smo poizkusili s tiskanjem na prostem. Trdnost iztisnjenega materiala žal ni bila dovolj velika, da bi lahko podpirala lastno maso, zato se je material začel sesedati. Enak problem se je ponovil tudi pri mešanici Chi-HA.

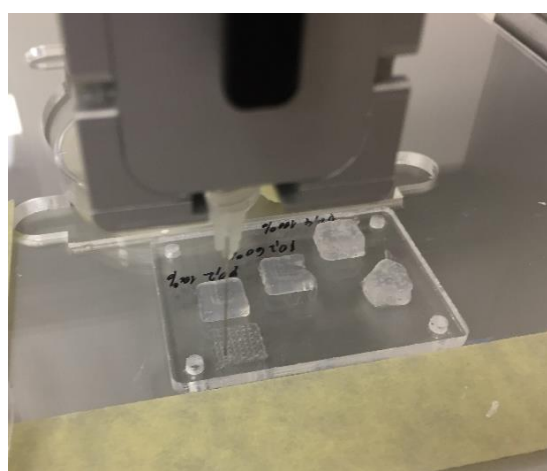


*Slika 13: Poskus tiskanja mešanice HA-alg na prostem.*

Preizkusili smo tudi tiskanje čistega, homogeniziranega kolagena na prostem, ki je dalo zelo obetavne rezultate, saj smo dobili obstojno strukturo z jasno razvidnimi mejami med posameznimi sledmi.



a)



b)

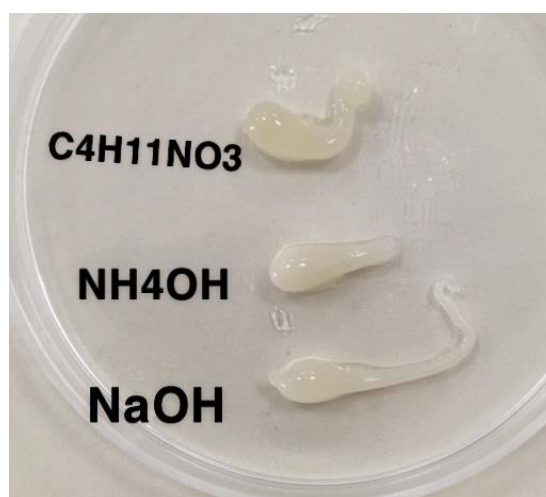
*Slika 14: Tiskanje homogeniziranega kolagena na prostem.*

Zaradi neobstojnosti obeh mešanic na prostem smo se odločili za tiskanje v podporni tekočini. Podporna tekočina mora imeti gostoto podobno delovnemu materialu, ne sme pa se z njim mešati. Vzgon, ki deluje na iztisnjen material tako omogoča njegovo lebdenje in s tem prepreči sesedanje. Poleg tega lahko podporna tekočina vsebuje zamreževalce, ki povzročijo zamrežitev polimerov in s tem povečanje viskoznosti ter trdnosti izdelanega ogrodja.

Izdelali smo dve podporni zmesi, od katerih je ena vsebovala zamreževalce. Ustrezen zamreževalec smo iskali med NaOH, NH<sub>4</sub>OH in C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub> (tris), tako da smo na mešanico hitozana in HA nanesli nekaj kapljic vsake od spojin. Ugotovili smo, da reakcije najhitreje potečejo pri NH<sub>4</sub>OH, vendar smo zaradi praktičnih razlogov za nadaljnje poizkuse izbrali tris.



a)



b)

Slika 15: a) Iskanje ustreznega zamreževalca. b) Zamrežene mešanice chi-HA.

Za osnovno podporno zmes smo izbrali želatino in z njo izvedli tiskanje vseh prej naštetih materialov. Kasneje smo naredili še podporno zmes s trisom, ki naj bi poleg podpore povzročil tudi zamrežitev in s tem trdnejši izdelek.



a)



b)

Slika 16: a) HA-alg v želatini. b) HA-chi v želatini.





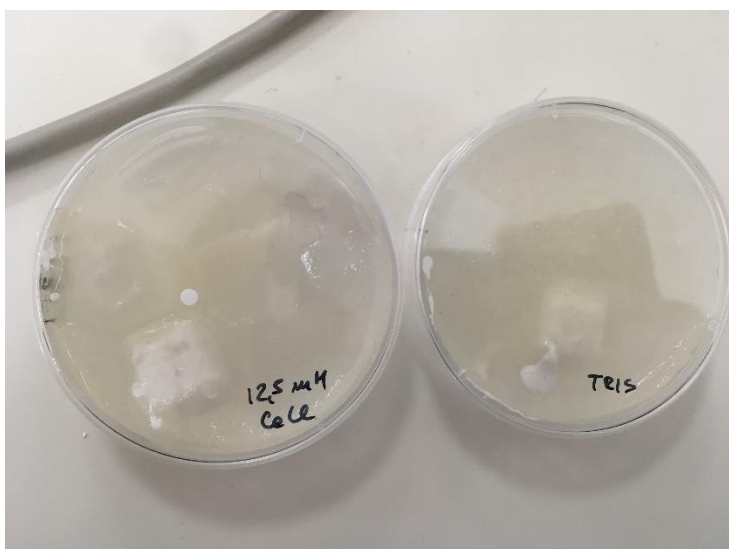
a)



b)

*Slika 17: a) Jemanje ogrodja iz želatine. b) Natisnjena ogrodja.*

Tudi kolagen smo tiskali v podporne zmesi, da bi videli, če se bo zamrežil, vzorce, ki smo jih tiskali na prostem, pa prepojili s trisom. Ugotovili smo, da se v vseh zmesih kolagen zamreži.



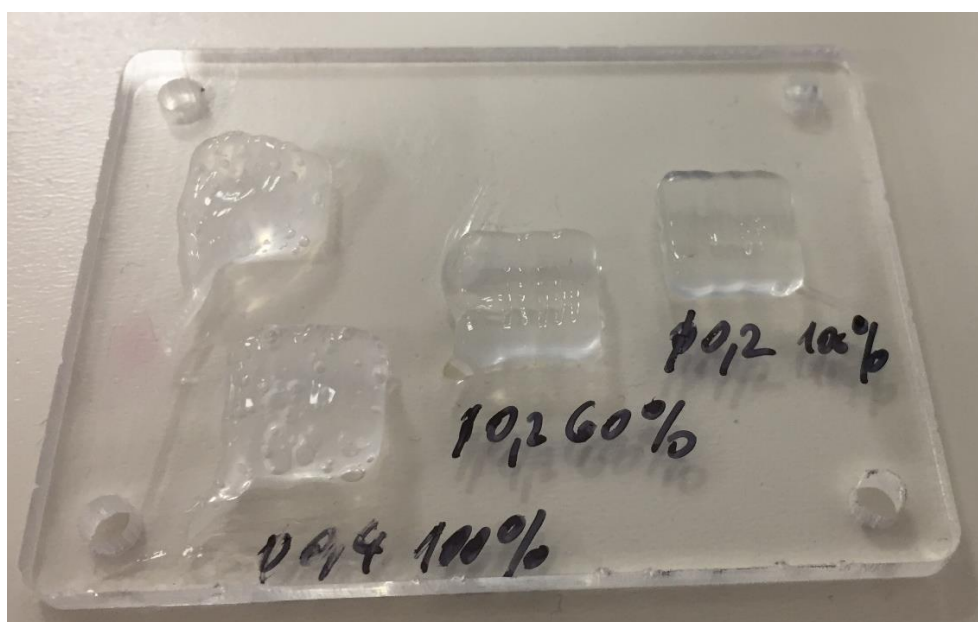
*Slika 18: Tiskanje kolagena v podporne zmesi.*

Zaradi različnih lastnosti materialov smo morali regulirati nastavitve tiskanja.

Pri tiskanju mešanic HA-chi in HA-alg smo najprej tiskali pri hitrosti 350mm/min in volumskem pretoku iztiskanja 0,0196mm/min. Nato smo volumski pretok povečali na 0,2485mm/min. Povečali smo tudi debelino sloja, ki je bila prej 0,2mm na 0,3mm in s

tem volumski pretok na 0,035mm/min, kar je ustrezalo obema materialoma. Uporabljali smo igle premera 0,4mm. Pri prvotnih volumskih pretokih, so bili le-ti prepočasni, zato se je iztiskana sled trgala in smo jih morali povečati.

Pri tiskanju kolagena smo uporabljali dve igli različnih premerov, ena je bila 0,4mm, druga pa 0,2mm. Pri širši igli pa je bila hitrost 500mm/min in volumski pretok 0,035mm/m. Pri ožji igli je bila hitrost 500mm/min in volumski pretok 0,0175mm/m. Lepša ogrodja smo natisnili z ožjo iglo, saj se sledi niso posedale in so držale predvideno obliko.



Slika 19: Reguliranje volumskega pretoka in tiskanje z različnimi debelinami igel.

### **3. ZAKLJUČEK IN SMERNICE ZA NADALJNJE DELO**

Začeli smo s hipotezo, da je mogoče najti ustrezno mešanico biokompatibilnih materialov, ki jo bo mogoče uporabiti v 3D tiskalniku in bo po svoji kemični in biološki sestavi čim bolj podobna kostnemu tkivu.

Rezultati raziskave kažejo, da osnovni problem pri tiskanju ogrodij iz mešanice kolagena in hidroksiapatita predstavlja mešanje obeh materialov v homogeno zmes. Ugotovili smo, da je mogoče tiskati sam kolagen in da so rezultati tiskanja na prostem zelo obetavni. Prav tako smo z mešanjem HA z drugimi biokompatibilnimi materiali prišli do pastoznih zmesi, primernih za tiskanje v podporni tekočini. Vse tri materiale smo tudi uspešno zamrežili in prišli do dokaj obstojnih vzorcev ogrodij.

Za nadaljevanje raziskave bi morali nadgraditi obstoječ pisalnik, da bi omogočal hkratno iztiskovanje iz dveh oziroma treh brizgalk. Na ta način bi lahko hkrati tiskali kolagen in HA-chi oziroma HA-alg zmes, v posebno mešalno šobo. Na ta način bi se izognili težavam s predhodnim mešanjem, obenem pa bi lahko regulirali razmerje med obema komponentama in po potrebi dodajali druge.

Z obstoječim tiskalnikom bi lahko uporabili tudi zmes HA z drugimi, tekočimi polimeri, ki bi omogočala izdelavo ogrodij iz HA. Takšno ogrodje bi lahko sintrali in ga naknadno prepajili s kolagenom.

## 4. Publication bibliography

Antebi, Ben; Cheng, Xingguo; Harris, Jeffrey N.; Gower, Laurie B.; Chen, Xiao-Dong; Ling, Jian (2013): Biomimetic collagen-hydroxyapatite composite fabricated via a novel perfusion-flow mineralization technique. In *Tissue engineering. Part C, Methods* 19 (7), pp. 487–496. DOI: 10.1089/ten.TEC.2012.0452.

Bergmann, Christian; Lindner, Markus; Zhang, Wen; Koczur, Karolina; Kirsten, Armin; Telle, Rainer; Fischer, Horst (2010): 3D printing of bone substitute implants using calcium phosphate and bioactive glasses. In *Journal of the European Ceramic Society* 30 (12), pp. 2563–2567. DOI: 10.1016/j.jeurceramsoc.2010.04.037.

Bose, Susmita; Vahabzadeh, Sahar; Bandyopadhyay, Amit (2013): Bone tissue engineering using 3D printing. In *Materials Today* 16 (12), pp. 496–504. DOI: 10.1016/j.mattod.2013.11.017.

Chia, Helena N.; Wu, Benjamin M. (2015): Recent advances in 3D printing of biomaterials. In *Journal of biological engineering* 9, p. 4. DOI: 10.1186/s13036-015-0001-4.

Drstvenšek, Igor (Ed.) (2004): Slojevite tehnologije. Layered technologies. Mednarodna delavnica o slojevitih tehnologijah. Maribor: Fakulteta za strojništvo.

Hinton, Thomas J.; Jallerat, Quentin; Palchesko, Rachelle N.; Park, Joon Hyung; Grodzicki, Martin S.; Shue, Hao-Jan et al. (2015): Three-dimensional printing of complex biological structures by freeform reversible embedding of suspended hydrogels. In *Science advances* 1 (9), e1500758. DOI: 10.1126/sciadv.1500758.

Inzana, Jason A.; Olvera, Diana; Fuller, Seth M.; Kelly, James P.; Graeve, Olivia A.; Schwarz, Edward M. et al. (2014): 3D printing of composite calcium phosphate and collagen scaffolds for bone regeneration. In *Biomaterials* 35 (13), pp. 4026–4034. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2014.01.064.

Karageorgiou, Vassilis; Kaplan, David (2005): Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. In *Biomaterials* 26 (27), pp. 5474–5491. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.02.002.

Landers, Rüdiger; Hübner, Ute; Schmelzeisen, Rainer; Mülhaupt, Rolf (2002): Rapid prototyping of scaffolds derived from thermoreversible hydrogels and tailored for applications in tissue engineering. In *Biomaterials* 23 (23), pp. 4437–4447.

Leukers, B.; Gülkan, H.; Irsen, S. H.; Milz, S.; Tille, C.; Seitz, H.; Schieker, M. (2005): Biocompatibility of ceramic scaffolds for bone replacement made by 3D printing. In *Mat.-wiss. u. Werkstofftech.* 36 (12), pp. 781–787. DOI: 10.1002/mawe.200500968.

Murphy, Sean V.; Atala, Anthony (2014): 3D bioprinting of tissues and organs. In *Nature biotechnology* 32 (8), pp. 773–785. DOI: 10.1038/nbt.2958.

Otsuki, Bungo; Takemoto, Mitsuru; Fujibayashi, Shunsuke; Neo, Masashi; Kokubo, Tadashi; Nakamura, Takashi (2006): Pore throat size and connectivity determine



bone and tissue ingrowth into porous implants: three-dimensional micro-CT based structural analyses of porous bioactive titanium implants. In *Biomaterials* 27 (35), pp. 5892–5900. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2006.08.013.

Shirazi, Seyed Farid Seyed; Gharekhani, Samira; Mehrali, Mehdi; Yarmand, Hooman; Metselaar, Hendrik Simon Cornelis; Adib Kadri, Nahrizul; Osman, Noor Azuan Abu (2015): A review on powder-based additive manufacturing for tissue engineering: selective laser sintering and inkjet 3D printing. In *Science and technology of advanced materials* 16 (3), p. 33502. DOI: 10.1088/1468-6996/16/3/033502.

Stušek, Peter; Škornik, Sonja; Vodnik, Dominik; Turk, Boris; Pfanz, Hardy; Hladnik, Jože et al. (2011): Zgradba in delovanje organizmov. Učbenik za gimnazijski program izobraževanja. With assistance of Erika Omerzel Vujić, Mojca Lampe Kajtna, Roman Remškar. 1. izd., 1. natis. Ljubljana: DZS.

Wahl, D. A.; Czernuszka, J. T. (2006): Collagen-Hydroxyapatite Composites for Hard Tissue Repair. In *eCM* 11, pp. 43–56. DOI: 10.22203/eCM.v011a06.

Wikipedia (Ed.) (2019a): Chitosan - Wikipedia. Available online at <https://en.wikipedia.org/w/index.php?oldid=880137790>, updated on 2/2/2019, checked on 2/2/2019.

Wikipedia (Ed.) (2019b): Hydroxyapatite - Wikipedia. Available online at <https://en.wikipedia.org/w/index.php?oldid=878584883>, updated on 2/2/2019, checked on 2/2/2019.

Wikipedia (Ed.) (2019c): Gelatin - Wikipedia. Available online at <https://en.wikipedia.org/w/index.php?oldid=878830694>, updated on 2/3/2019, checked on 2/2/2019.

Wikipedia (Ed.) (2019d): Tris - Wikipedia. Available online at <https://en.wikipedia.org/w/index.php?oldid=856878138>, updated on 2/3/2019, checked on 2/2/2019.

Wikipedia (Ed.) (2019e): Alginic acid - Wikipedia. Available online at <https://en.wikipedia.org/w/index.php?oldid=880071144>, updated on 2/5/2019, checked on 2/2/2019.

Xue, Weichang; Krishna, B. Vamsi; Bandyopadhyay, Amit; Bose, Susmita (2007): Processing and biocompatibility evaluation of laser processed porous titanium. In *Acta biomaterialia* 3 (6), pp. 1007–1018. DOI: 10.1016/j.actbio.2007.05.009.