

Anna KUROWSKA¹, Sabina PATEREK², Arkadiusz MATUSZEK³,
Dawid HOLISZ⁴

Opiekun naukowy: Izabella RAJZER⁵

ANALIZA PORÓWNAWCZA MIKROSTRUKTURY PRZESTRZENNYCH RUSZTOWAŃ DLA INŻYNIERII TKANKOWEJ WYKONANYCH W TECHNOLOGII DRUKU 3D

Streszczenie: W artykule przedstawiono sposób wytwarzania trójwymiarowych i porowatych podłoży dla inżynierii tkankowej przy wykorzystaniu technologii druku przestrzennego. Dokonano oceny porównawczej mikrostruktury wydrukowanych rusztowań, w odniesieniu do zaprojektowanego modelu podłoża. W analizie tej wykorzystano mikroskop optyczny i stereoskopowy wraz z oprogramowaniem Opta-View i Image J.

Słowa kluczowe: inżynieria tkankowa, druk 3D, podłoża, PCL

COMPARATIVE ANALYSIS OF SPATIAL SCAFFOLDS MICROSTRUCTURES FOR TISSUE ENGINEERING MADE IN 3D PRINTING TECHNOLOGY

Summary: The article presents the method of producing three-dimensional and porous scaffolds for tissue engineering made in 3D printing technology. An analysis of the microstructure of obtained scaffolds was compared with the microstructure of designed model. In this analysis an optical and stereoscopic microscope with Opta-View and Image J software were used.

Keywords: tissue engineering, 3D printing, scaffolds, PCL

¹ mgr inż., Akademia Techniczno Humanistyczna w Bielsku-Białej, Wydział Budowy Maszyn i Informatyki, Katedra Podstaw Budowy Maszyn, annakurowska@interia.pl

² Akademia Techniczno Humanistyczna w Bielsku-Białej, Wydział Budowy Maszyn i Informatyki, Katedra Podstaw Budowy Maszyn, sabina.paterek@gmail.com

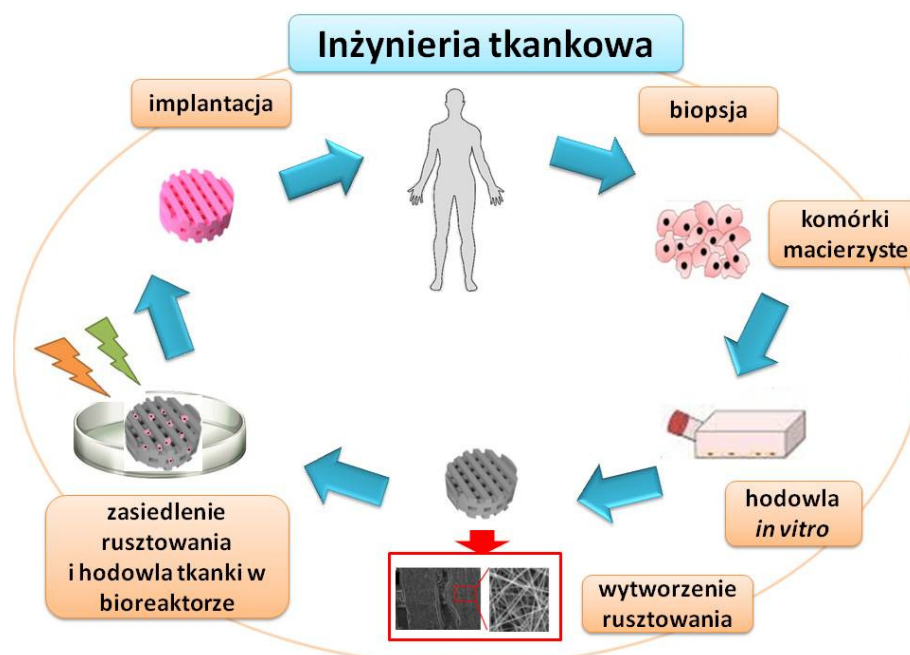
³ inż., Akademia Techniczno Humanistyczna w Bielsku-Białej, Wydział Budowy Maszyn i Informatyki, Katedra Podstaw Budowy Maszyn, matuszekpl3@gmail.com

⁴ Akademia Techniczno Humanistyczna w Bielsku-Białej, Wydział Budowy Maszyn i Informatyki, Katedra Podstaw Budowy Maszyn, dawid.holisz@gmail.com.

⁵ dr hab. inż., prof. ATH, Akademia Techniczno Humanistyczna w Bielsku-Białej, Wydział Budowy Maszyn i Informatyki, Katedra Podstaw Budowy Maszyn, irajzer@ath.bielsko.pl

1. Wprowadzenie

Inżynieria tkankowa to interdyscyplinarna dziedzina nauki, łącząca wiedzę z zakresu biologii, medycyny klinicznej oraz nauk technicznych, takich jak biofizyka, biochemia, biomechanika, a także inżynieria materiałowa i biomedyczna. Jej głównym celem jest odbudowa utraconych tkanek lub narządów (Rysunek 1).



Rysunek 1. Schemat inżynierii tkankowej

Działalność inżynierii tkankowej obejmuje zaprojektowanie, a następnie wytworzenie materiału, posiadającego strukturę przypominającą naturalną tkankę [1]. Do prowadzenia hodowli komórkowych, a tym samym do prawidłowego formowania się tkanki, niezbędne są trójwymiarowe rusztowania, które powinny cechować się porowatością, wysoce rozwiniętą budową przestrzenną oraz odpowiednią wielkością, geometrią mikrostruktury oraz biomimetycznością [2]. Ich mikrostruktura powinna naśladować pod względem rozmiaru i porowatości matrycę zewnątrzkomórkową (ECM), dając możliwości w zakresie proliferacji komórek i regeneracji tkanek [3]. Kształt porów wpływa na procesy życiowe komórek oraz ich adhezję i rozpłaszczanie, tworząc tym samym odpowiednie środowisko do odbudowy tkanki [4].

Dobór metody wytwarzania rusztowań, umiejętność ich łączenia, jak również zastosowanie różnorodnych materiałów, decyduje o właściwościach mechanicznych, mikrostrukturze podłoża oraz wpływa na czas biodegradacji. Istnieje wiele metod wytwarzania porowatych rusztowań: rozdzielanie faz, wyflukowanie porotwórczych dodatków, spienianie gazem, elektroprzędzenie oraz metody szybkiego prototypowania [4,5]. Wymagane właściwości, dotyczące mikrostruktury rusztowań stosowanych w inżynierii tkankowej, można osiągnąć wykorzystując metody szybkiego prototypowania w tym technologii druku przestrzennego metodą FDM.

Polega ona na wyłaczaniu uplastycznionego tworzywa i nałożeniu go warstwa po warstwie według wcześniej zaprojektowanego kształtu. Oprogramowanie (CAD) pozwala zaprojektować porowatą geometrię podłoża, o pożądanym kształcie [6,7]. Zaletą technologii drukowania przestrzennego jest możliwość dokładnego zaprojektowanie wirtualnego modelu przyszłego podłoża oraz uzyskanie modelu fizycznego, zgodnego z zaplanowaną architekturą wewnętrzną (kształt porów, rodzaj i wielkość połączeń porów itp.) jak i zewnętrzną. Zaletą procesu jest powtarzalność produkcji podłoża [5, 9]. Na jakość wydruku mają wpływ parametry takie jak: prędkość druku, grubość warstwy, temperatura głowicy drukującej, które są definiowane za pomocą G kodu [9].

W wyniku oddziaływania zbyt wysokiej temperatury podgrzewanej platformy drukarki może nastąpić nadtopienie powierzchni drukowanego elementu, bezpośrednio kontaktującego się z podgrzewaną platformą [8]. Ponadto możliwe jest powstawanie defektów na wydrukach w postaci nierównomiernej grubości nakładanych warstw, pęcherzy powietrza oraz nadlewów materiału. Podczas druku materiału występuje zjawisko skurczu, które również ma wpływ na jakość powstającego wydruku. Wszystkie te niepożądane zjawiska wpływają na ostateczną mikrostrukturę powierzchni podłoża.

Celem pracy jest określenie możliwości zastosowania komputerowej analizy i przetwarzania obrazu do oceny mikrostruktury podłoża wytworzonych metodą druku 3D.

Wytworzone rusztowania oceniono przy pomocy mikroskopu optycznego i steroskopowego, wyposażonych w specjalistyczne oprogramowanie, pozwalające na szczegółową analizę obrazów otrzymanych z kamery mikroskopowej. Wylimitowanie z obrazu elementów nieistotnych oraz uwypuklenie interesujących cech pozwoliło na dokonanie pomiarów poszukiwanych parametrów analizowanej mikrostruktury.

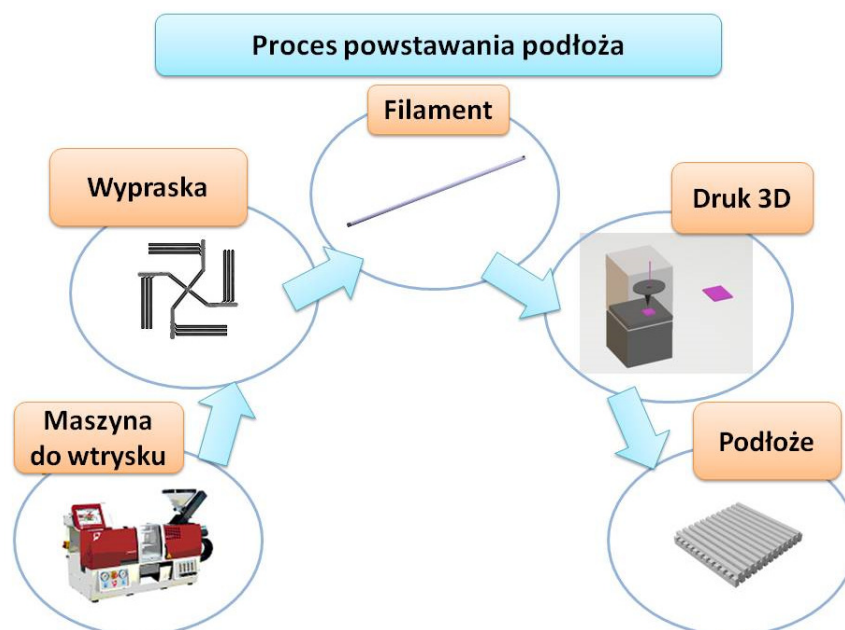
2. Materiały i metody

2.1. Materiały

W badaniach wykorzystano polimer: Poly- ϵ -kaprolacton (PCL) o masie cząsteczkowej 80 kDa, w formie granulek, firmy Sigma Aldrich oraz Grafen płatkowy (GNP), w formie proszku, również firmy Sigma Aldrich. W procesie wtrysku wykorzystywano zarówno czysty PCL, jak również jego mieszanę z grafenem płatkowym (0,2 g GNP/40 g PCL).

2.2. Technologia wtrysku

Zastosowano własny filament, wytworzony w technologii wtrysku (Rysunek 2). Do produkcji filamentu, wykorzystano w pełni hydrauliczną wtryskarkę Babyplast 6/10P (Rambaldi Group). Temperatura uplastyczniania dla czystego polikaprolaktonu wynosiła 210 °C. Temperatura w dyszy wynosiła 190 °C. W przypadku mieszanki polikaprolakton/grafen temperatura plastyfikacji była taka sama jak dla czystego PCL, a temperatura dyszy była wyższa o 10 °C. Wartości temperatury dobrano tak, aby uzyskać odpowiednią płynność mieszanki, umożliwiającą jej wtryskiwanie do formy.



Rysunek 2. Schemat procesu powstawania podłoża

2.3. Druk przestrzenny FDM

Do wykonania rusztowań wykorzystano drukarkę Anet A8 Prusa i3. Rozdzielczość drukarki wynosiła 0,1-0,3 mm. Rusztowania zostały zamodelowane przy użyciu oprogramowania komputerowego (CAD), wyeksportowane do pliku .stl, a następnie wytworzone przy zastosowaniu technologii druku przestrzennego FDM (Fused Deposition Modeling). Temperatura dyszy drukarki dla czystego PCL wynosiła 170 °C, a temperatura platformy produkcyjnej (stołu) 50 °C dla pierwszej warstwy i 20 °C dla pozostałych warstw. W przypadku próbek PCL+GRAFEN temperatura ekstrudera wynosiła 190 °C, a temperatura stołu 50 °C dla wszystkich warstw. Podgrzany stół pozwolił na lepszą przyczepność materiału do platformy produkcyjnej, chroniąc model przed odkształceniem.

2.4. Metody Badań

Ocena i analiza makro- i mikrostruktury wytworzonych podłoży

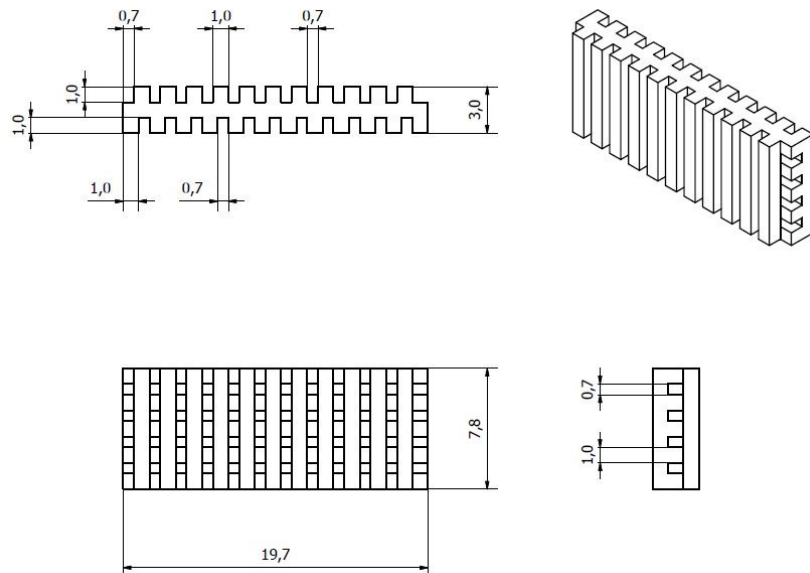
Badania mikrostruktury mają na celu analizę dokładności wykonania podłoży w odniesieniu do zaprojektowanych modeli, dokładności ułożenia ścieżek i określenia odległości między nimi, a także ocenę powierzchni wytworzonych elementów, dotyczącą rozmieszczenia dodatków dodawanych do polimerów podczas procesu wtrysku oraz ewentualnych błędów powstałych podczas procesu druku 3D.

Wytworzone próbki fotografowano przy użyciu aparatu cyfrowego Samsung F1.8, w celu przeprowadzenia badań makroskopowych wydrukowanych podłoży.

Mikrostrukturę gotowych rusztowań PCL i PCL/GNP, uzyskanych metodą druku przestrzennego z filamentu w postaci patyczków, analizowano za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (Nova NanoSEM 200, FEI), mikroskopu stereoskopowego i optycznego firmy OPTA-TECH, wyposażonych w CMOS 3camera oraz oprogramowania OptaViewIS i ImageJ.

3. Wyniki i dyskusja

Zaprojektowane trójwymiarowe podłoże składa się z trzech warstw, każdej o wysokości i szerokości 1 mm, ułożonych na przemian pod kątem 90°. Odległość między ścieżkami wynosi 0,7 mm. Model zaprojektowanych podłoży przedstawiono na rysunku 3.

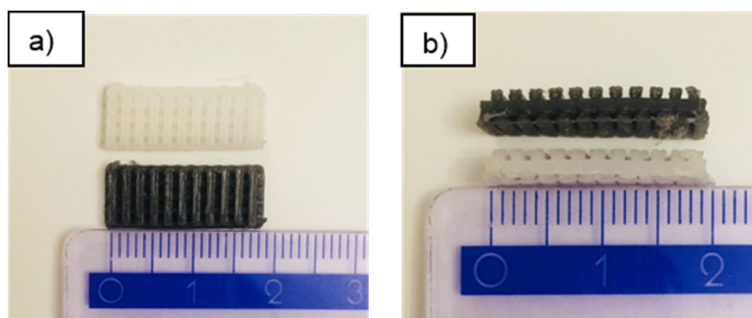


Rysunek 3. Model podłoża, przedstawiający jego strukturę i przekroje

Po wydrukowaniu, podłoża zostały poddane wnikliwym badaniom makroskopowym i mikroskopowym.

3.1. Analiza makroskopowa

Na rysunku 4 przedstawiono zdjęcia wydrukowanych próbek z czystego PCL oraz z PCL modyfikowanego grafenem. Analiza makroskopowa wykazała, że otrzymane próbki są zgodne z modelem. Widok przekroju poprzecznego ukazuje nadtopienie materiału, kontaktującego z platformą produkcyjną.



Rysunek 4. Zdjęcia makroskopowe podłoży wytworzonych z czystego PCL (biała próbka) oraz PCL_GRAF (czarna próbka)

Wydrukowane próbki zmierzono przy pomocy suwmiarki. Dokonano trzech pomiarów długości, szerokości i grubości na podstawie, których obliczono wartość średnią i odchylenie standardowe. Uzyskane wartości zestawiono w Tabeli 1 razem z wartościami dla zaprojektowanego modelu.

Tabela. 1 Wymiary modelu podłoża oraz wydrukowanych próbek PCL i PCL+GRAF

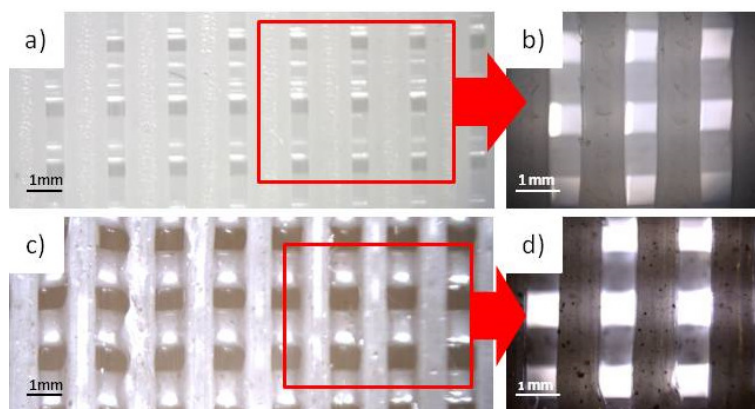
	Długość [mm]			Szerokość [mm]			Grubość [mm]		
Model podłoża	19,7			7,8			3,0		
Próbka PCL	19,5	19,6	19,4	7,7	7,5	7,5	2,5	2,85	2,95
	19,5 ± 0,1			7,56 ± 0,12			2,76 ± 0,24		
Próbka PCL_GRAF	19,6	19,6	19,5	7,5	7,8	7,5	3,0	3,0	2,9
	19,56 ± 0,06			7,6 ± 0,17			2,96 ± 0,06		

Przeprowadzone pomiary wykazały zmniejszenie wymiarów wydrukowanych próbek w odniesieniu do założonych wartości modelu wirtualnego.

3.2. Analiza mikroskopowa

Próbki poddano obserwacji mikroskopowej przy użyciu mikroskopu optycznego i stereoskopowego. Mikrostrukturę wydrukowanych próbek przedstawiono na rysunku 5.

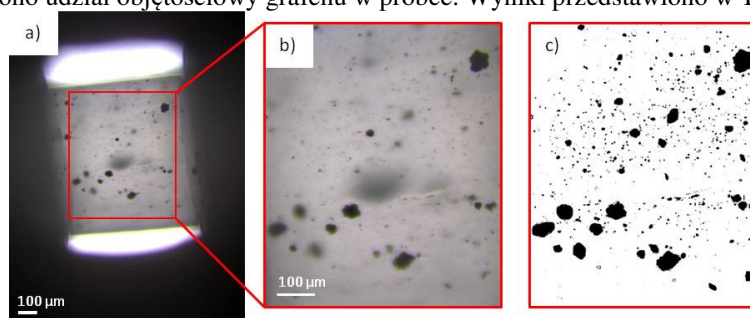
Na podstawie zdjęć mikroskopowych można zaobserwować porowatą mikrostrukturę podłoża o wielkości porów mniejszej niż założone w modelu. Na powierzchni próbki PCL_GRAF widać liczne aglomeraty proszku grafenu, co oznacza, że proszek został wbudowany i stanowi integralną część podłoża. Próbka PCL ma gładką i jednolitą powierzchnię.



Rysunek 5. Mikrostruktura wytworzonych podłoży z czystego PCL przy powiększeniu 30x (a) i 40x (b) oraz podłoży z PCL_GRAF przy powiększeniu 30x (c) i 40x (d)

3.3. Komputerowa analiza obrazu

Przeprowadzono komputerową analizę obrazu, na podstawie zdjęć mikroskopowych próbek PCL_GRAF (Rysunek 6). Na podstawie uzyskanych obrazów binarnych obliczono udział objętościowy grafenu w próbce. Wyniki przedstawiono w Tabeli 2.



Rysunek 6. Komputerowa analiza obrazu próbki PCL_GRAF (a,b), otrzymany obraz binarny (c)

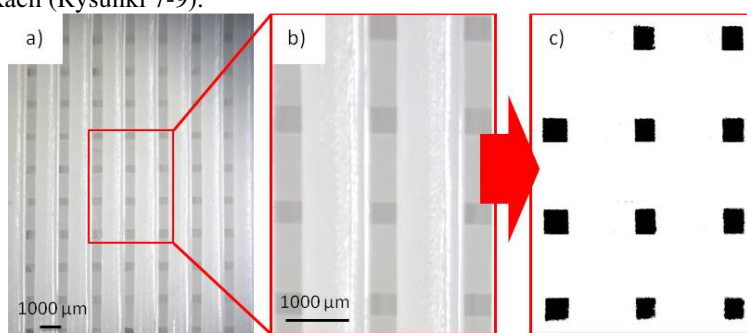
Tabela 2. Udział objętościowy grafenu w wydrukowanej próbce PCL_GRAF na podstawie analizy zdjęć mikroskopowych (badania wstępne).

Próbka PCL_GRAF	
Pomiar 1	32,92%
Pomiar 2	21,99%
Pomiar 3	15,98%
Pomiar 4	12,81%
Pomiar 5	20,61%
Średnia	20,86 % ± 8%

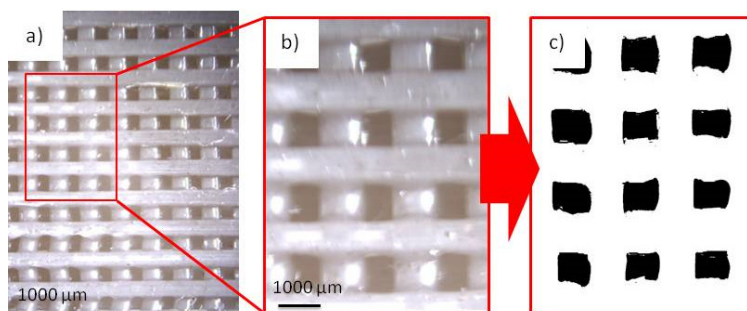
Udział objętościowy grafenu w próbce PCL_GRAF wykonany na podstawie analizy 5 zdjęć mikroskopowych wynosi około 21 ± 8 %. Zaobserwowano mniejsze i większe

skupiska proszku grafenu. W celu weryfikacji otrzymanych wyników w dalszych etapach pracy przeprowadzona zostanie wnikliwa analiza większej ilości obrazów mikroskopowych.

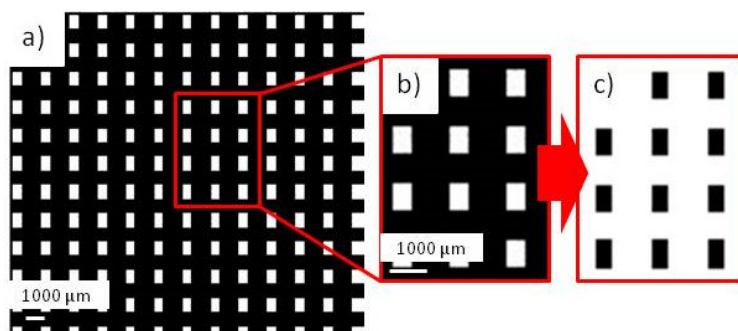
W celu określenia udziału objętościowego porów w wydrukowanych podłożach wykonano komputerową analizę obrazu dla próbek PCL, PCL_GRAF oraz modelu podłoża (jako materiału referencyjnego). Uzyskane obrazy przedstawiono na rysunkach (Rysunki 7-9).



Rysunek 7. Fragment rusztowania wykonanego z PCL (a) powiększenie zaznaczonego obszaru (b), otrzymany obraz binarny (c)



Rysunek 8. Fragment rusztowania wykonanego z PCL_GRAF (a) powiększenie zaznaczonego obszaru (b), otrzymany obraz binarny (c)



Rysunek 9. Model podłoża (a) powiększenie zaznaczonego obszaru (b), otrzymany obraz binarny (c)

Po przeprowadzeniu komputerowej analizy obrazu, określono udział objętościowy porów dla każdej z próbek (Tabela 3). Uzyskane wyniki dotyczące wydrukowanych podłoży porównano z wynikami odnoszącymi się do założonego modelu podłoża.

Tabela 3. Udział objętościowy porów na podstawie mikrostruktury wydrukowanych podłoży PCL i PCL_GRAF.

	Próbka PCL	Próbka PCL_GRAF	Model podłoża
Pomiar 1	8,6 %	23,2 %	13,7 %
Pomiar 2	9,5 %	22,0 %	15,2 %
Pomiar 3	7,6 %	27,9 %	17,8 %
Pomiar 4	7,2 %	31,8 %	17,5 %
Pomiar 5	10,5 %	21,9 %	16,6 %
Średnia	8,3 % ± 1,2 %	25,4 % ± 3,9 %	16,2 ± 1,7 %

Z obliczeń przeprowadzonych przy wykorzystaniu programu Image J wynika, że udział objętościowy porów jest największy dla próbki PCL_GRAF i wynosi około 25 ± 4 %. W przypadku próbki PCL udział objętościowy porów jest mniejszy niż porów występujących w modelu podłoża i wynosi 8 ± 1 %. Uzyskane wyniki mogą być z jednej strony wynikiem skurczu, któremu ulegają podłoża podczas druku 3D. Grafen jest materiałem o dużym przewodnictwie cieplnym, w związku z tym skurcz nadrukowanych ścieżek może być znacznie większy niż w przypadku innych materiałów i tym samym udział objętościowy porów w materiale znacznie wzrasta w porównaniu do zaprojektowanego modelu. Z drugiej strony uzyskane wyniki mogą być obarczone dużym błędem wynikającym z wykonania obrazu binarnego. Światło oświetlające próbkę jest załamywane na wszelkich nierównościach badanego materiału. Załamywanie światła powoduje, że program może zaznaczyć (podczas wykonywania obrazów binarnych ze zdjęć mikroskopowych), większe lub mniejsze pory niż te, które występują w rzeczywistości w badanym materiale, a niedokładny obrys porów wynikający z załamania światła może powodować znaczne zwiększenie lub zmniejszenie liczonego udziału objętościowego porów. W celu wyeliminowania wspomnianych błędów komputerowa analiza obrazu powinna zostać przeprowadzona na większej liczbie obrazów mikroskopowych badanych próbek.

4. Wnioski

Przeprowadzone badania miały na celu ocenę mikrostruktury wydrukowanych w technologii druku 3D rusztowań, w odniesieniu do mikrostruktury wcześniej zaprojektowanego modelu. Analiza makroskopowa ujawniła wystąpienie zjawiska nadtopienia pierwszej warstwy materiału, co może świadczyć o zbyt wysokiej wartości temperatury platformy produkcyjnej. Wykazano, że zjawisko skurczu występujące podczas druku ma wpływ na zmniejszenie wymiarów podłoża w stosunku do założonych wymiarów modelu. Na podstawie obrazów binarnych obliczono udział objętościowy porów. Analiza komputerowa potwierdziła

występowanie zjawiska skurczu, widoczne zwłaszcza w przypadku próbek modyfikowanych grafenem.

Technologia druku 3D jest odpowiednią metodą do wytwarzania porowatych podłoży dla inżynierii tkankowej. Zaletą tej metody jest możliwość dokładnego zaprojektowania kształtu przyszłego podłoża, o preferowanej architekturze powierzchni oraz uzyskanie powtarzalności podczas produkcji podłoża. Istotną rolę odgrywa dobór parametrów druku do danego materiału. Wiedza uzyskana na temat wielkości skurczu modyfikowanego grafenem materiału, pozwoli na dokładniejsze projektowanie podłoży z wykorzystaniem tego materiału już na etapie tworzenia wirtualnego modelu podłoża.

PODZIĘKOWANIA: Badania finansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach projektu badawczego pt. „Warstwowe podłoża wspomagające rekonstrukcję chrząstek nosa wytwarzane metodą druku przestrzennego i elektroprzędzenia” nr 2015/18/E/ST5/00189 (Sonata Bis 5).

Szczególne podziękowania dla Pana dr Łukasza Więclawa, za cenne rady i pomoc przy analizie obrazu.

LITERATURA

1. GROLIK M.: Inżynieria tkankowa – nowe narzędzie w rekonstrukcji tkanek. Zeszyty Naukowe Towarzystwa Doktorantów UJ Nauki Ścisłe, Nr 3 (2/2011).
2. KRUK A., GADOMSKA-GAJADHUR A., RUŚKOWSKI P.: Zastosowanie bioresorbowalnych rusztowań w inżynierii tkankowej
3. GIL-CASTELL O., BADIA J.D., RIBES-GREUS A.: Tailored electrospun nanofibrous polycaprolactone/gelatin scaffolds into an acid hydrolytic solvent system. *European Polymer Journal* 101, 273-281 (2018).
4. DZIADEK M., CHOLEWA-KOWALSKA K.: Wybrane metody otrzymywania porowatych rusztowań w inżynierii tkankowej. *Inżynieria Biomedyczna*. Vol. 20, nr.4, 192-202 (2014).
5. OSTROWSKA B.: Inżynieria wytwarzania bioimplantów z zastosowaniem druku 3D dla medycyny regeneracyjnej. *Inżynieria Biomedyczna*. 19-46 (2016)
6. RAJZER I., KUROWSKA A., JABŁOŃSKI A., JATTEAU S., ŚLIWKA M., ZIĄBKA M., MENASZEK E.: Layered gelatin/PLLA scaffolds fabricated by electrospinning and 3D printing- for nasal cartilages and subchondral bone re construction. *Materials and Design* 155, 297–30 (2018).
7. BOSE S., VAHABZADEH S., BANDYOPADHYAY A.: Bone tissue engineering using 3D printing. *Materials Today*, Volume 16, Number 12 (2013).
8. MAZURKIEWICZ A.: Analiza jakości wydruku elementu z termoplastu abs wykonanego w technologii FDM. *Autobusy* nr.6 956-960 (2017).
9. TURNBULL G., CLARKE J., PICARD F., B, RICHES P., JIA L., HAN F., LI B., SHU W.: 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. *Bioactive Materials* 3, 278-314 (2018).