

3D KARKASŲ, SKIRTŲ KAULŲ REGENERACIJAI, MECHANINIŲ SAVYBIŲ TYRIMAS

Deividas MIZERAS¹, Andžela ŠEŠOK², Algirdas Vaclovas VALIULIS³,
Justinas GARGASAS⁴, Irmantas GEDZEVIČIUS⁵

Vilniaus Gedimino technikos universitetas, Vilnius, Lietuva

*El. paštas: ¹deividas.mizeras@vgtu.lt; ²andzela.sesok@vgtu.lt; ³algirdas.valiulis@vgtu.lt;
⁴justinas.gargasas@vgtu.lt; ⁵irmantas.gedzevicius@vgtu.lt*

Santrauka. Vienas didžiausių šiuolaikinės audinių inžinerijos iššūkių yra 3D karkasų, skirtų kaulinio audinio regeneracijai, sukūrimas. Iki šiol, norint atstatyti kaulo defektus, naudojami įvairūs kaulo pakaitalai (autogeniniai ir alogeniniai), kurių naudojimo galimybės jau nebeatitinka poreikių, nes reikalinga papildoma operacija, galimos komplikacijos, taip pat ribotas jų naudojimas, susijęs su etinėmis pažiūromis. Šiame darbe lyginamos 3D spausdintuvu suformuotų mikrodarinių, skirtų kaulinio audinio defektui atkurti, mechaninės savybės. Darbe pasirinktos trys skirtingos 3D karkasų mikrostruktūros: *woodpile BCC* (kiekvienas sluoksnis susideda iš lygiagrečių rąstų, kurie keičiami 90 laipsnių kampu prieš tai esančio sluoksnio atžvilgiu), *woodpile FCC* (kiekvienas sluoksnis papildomai keičiasi per pusę periodo sluoksnio, esančio prieš tai, atžvilgiu) ir *woodpile 60 deg* (besisukanti rąstų rietuvė, kiekvienas tokios gardelės sluoksnis yra pasuktas 60 laipsnių prieš tai esančio atžvilgiu). Gniuždymo ir lenkimo bandymai buvo atlikti TIRAtest 2300 universalios bandymų mašina. Buvo nustatyta, kad, taikant 60 laipsnių kampu besikeičiančią *woodpile* geometriją, galima pasiekti didžiausias mechanines vertes, kurios buvo maždaug tris kartus didesnės nei *woodpile BCC* arba *woodpile FCC* mikrostruktūros.

Reikšminiai žodžiai: 3D mikroarchitektūra, adityvi gamyba, audinių inžinerija, karkasai, mechaninės savybės, polilaktinė rūgštis.

Įvadas

Kaulinio audinio karkasai reikalingi užpildant kaulų defektus ir tuštumas, atsiradusius dėl traumų ar ligų. Pastaruoju metu kaulų karkasai pradėti naudoti odontologijoje. Dantų praradimas yra susijęs ne tik su estetinės išvaizdos pokyčiais, bet ir su kramtymo funkcijos sutrikimu, kuris sukelia greitą kaulinio audinio atrofiją. Prarastų dantų alternatyva – implantai. Tačiau praktika rodo, kad maždaug vieno iš penkių pacientų žandikaulio kaulo nepakanka implantui įsriegti, todėl reikia kaulo priauginimo operacijos. Tam tikslui neorganinės medžiagos įkomponuojamos trimačiuose polimeriniuose karkasuose.

Audinių inžinerijoje karkasai turėtų atkurti audinyje aptinkamo natyvaus užląstelinio užpildo biologines ir mechanines savybes, todėl itin svarbu parinkti tam tikrą porų dydį, elastingumą ir kitų savybių turintį karkasą.

Nors karkasai gaminami iš įvairių medžiagų ir taikomi skirtingi gamybos būdai, bendras karkasams keliamas tikslas – regeneruoti skirtingus audinius ir organus. Nepriklausomai nuo audinio tipo, projektuojant karkasą, būtina užtikrinti, kad galutinis produktas atitiktų keliamus reikalavimus.

Vienas iš svarbiausių idealių karkasų kaulinių audinių inžinerijoje kriterijų yra biologinis suderinamumas – ląstelės turi sukibti, migruoti paviršiumi ir, padedant karkasui, pradėti daugintis. Be to, po implantacijos karkasas turi sukelti nedidelę imuninės sistemos reakciją, tokiu būdu užkertant kelią uždegimų reakcijoms, kurios padidina riziką, kad karkasas bus organizmo atmetas. Dar vienas svarbus kriterijus yra biodegradacija (biologinis skaidomumas) – žinant, kad karkasas nėra skirtas naudoti kaip nuolatinis implantas, todėl turi būti biologiškai skaidomas taip, kad būtų galima ląstelėms gamintis savo tarpląsteliniam užpildui (Babensee *et al.* 1998). Šalutiniai skilimo produktai turi būti netoksiški ir gebėti pasišalinti iš organizmo nesutrikdant kitų organų veiklos.

Mechaninės karkaso savybės idealiau atveju turėtų atitikti kaulinio audinio savybes toje vietoje, kurioje jis buvo implantuotas. Todėl vienas didžiausių iššūkių gaminant karkasus yra mechaninių savybių užtikrinimas (Hutmacher *et al.* 2000). Teiginį galima pagrįsti tuo, kad dauguma medžiagų, turinčių geras mechanines savybes, neturi pakankamo akytumo: medžiagos *in vitro* tyrime demonstruojančios potencialą, *in vivo* patiria nesėkmę dėl

nepakankamos vaskuliarizacijos. Akivaizdu, kad reikia rasti tinkamą balansą tarp mechaninių savybių ir mikroarchitektūros aktyvumo. Vadinasi, struktūra turi būti aktyva ir struktūriškai susijungusių porų skersmuo turėtų būti nuo 300 iki 500 µm, tai turėtų leisti ląstelėms skverbtis į porų struktūrą, skatinti naują kaulo formavimąsi, taip pat vaskuliarizaciją. Be viso to, turi pristatyti maistines medžiagas į karkasą ir transportuoti nepageidaujamus metabolitus už karkaso ribų (Liu *et al.* 2013).

Daugumoje esamų tyrimų dėmesys buvo sutelktas į karkasų elgesio vertinimą gniuždant. Taip pat ne mažiau svarbios yra karkasų savybės lenkiant (Martinez-Vazquez *et al.* 2014).

Karkaso medžiaga ir jo degradacijos produktai negali būti toksiški ir sukelti uždegimo *in vivo*. Labai svarbų vaidmenį karkasinių audinių inžinerijoje turi mechaninės karkasų savybės: standumas ir stiprumas, *mikrostruktūros* pokyčiai (atsirandantys dėl mechaninių paviršiaus deformacijų), orientacija. Tiksliai šių veiksnių kontrolė daro didelę įtaką bendroms karkasų mechaninėms savybėms (Malinauskas *et al.* 2015).

Dažniausiai kuriami trijų tipų karkasai (Wolfe *et al.* 2011):

- 1) iš natūralios medžiagos (natūralūs polisacharidai arba baltymai – alginatas, želatina, hialurono rūgštis arba kolagenas ir kt.);
- 2) beląstelių natyvių audinių karkasai (pavyzdžiui, šlapimo pūslė);
- 3) biodegruojantys sintetiniai polimerai – poliglukolinė rūgštis (PGA), polipieno rūgštis (PLA) ir jų kopolimeras PLA/PGA (PLGA), polianhidridai, poliortoesteris, polikaprolaktonas, ir kt.

Deja, natūralių medžiagų pagrindu sukurti karkasai turi daug trūkumų, iš kurių didžiausias yra tas, kad sudėtinga sukurti erdvinę struktūrą ir ją palaikyti *in vivo*. Taip pat jų prastos mechaninės savybės ir didelis suskilimo greitis. Dėl šių minusų didelės mokslininkų pastangos buvo sutelktos į *sintetinius polimerus*. Jie yra ne tik biologiškai suderinami ir degraduojantys, bet ir turi valdomą suskilimo greitį, nuspėjamas ir atkuriamąsias mechanines savybes. Pagrindinis jų trūkumas tas, kad ne visi yra biologiškai suderinami.

Šiame darbe naudojama polilaktinė rūgštis. PLA – viena iš dažniausiai naudojamų medžiagų audinių inžinerijoje. Tai pigi sintetinė medžiaga, plačiai paplitusi, ją galima mikroformuoti 3D spausdintuvu. PLA yra linijinis alifatinis termoplastinis poliesteris, kuris lengvai biologiškai skaidomas hidroliziniiais ir fermentacijos būdais. Turi tris *stereoizomerus*: poli (L-pieno rūgštis) (PLLA), poli (D-pieno rūgštis) (PDLA) ir poli (D, L-pieno rūgštis)

(PDLLA). Tarp šių stereoizomerų, PDLLA yra ypač tinkantis karkaso gamybai (skirto kaulinio audinio regeneracijai), nes turi puikų biologinį suderinamumą *in vivo* ir gerą osteokonduktyvumą (Nair, Laurencin 2007). PLA ir PLA-polimerų mišiniai kartu su įvairiais hidrogeliais (kompozitiniai karkasai) yra sėkmingai panaudoti gaminant karkasus, skirtus kremzlės, tarpšlankstelinio disko (Richardson *et al.* 2006) ir kaulo (Haimi *et al.* 2009) audinių inžinerijoje.

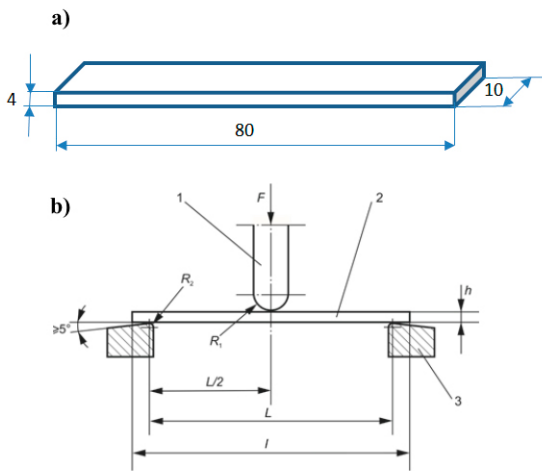
Karkasų gamybai naudojamas terminės ekstruzijos 3D spausdintuvai (angl. FFF – *fused filament fabrication*) yra adityvinės gamybos prototipinė priemonė (Malinauskas *et al.* 2014). Tai leidžia formuoti iki dešimčių mikrometrų erdvine skyra iš biologiškai sutaikomų ar net biologiškai skaidžių medžiagų. Mechaninės tokių spausdintų objektų savybės labai priklauso nuo naudojamos medžiagos charakteristikų, darinio geometrijos ir užpildymo.

Šią dieną 3D spausdinimas yra technologija, leidžianti užtikrinti nuolatinę inovacijų teikimą gamybos procese. Ši technologija yra plačiai naudojama materializuojant CAD modelius į tiksliai daiktus, kurie naudojami pramonėje ar buityje, taip pat kuriami ir karkasai, skirti naudoti medicinoje. Gamybos metodas yra paprastas ir efektyvus, todėl tinkamas naudoti kasdieną. Dabar tai įprastinė priemonė gaminant pagal užsakymą arba nestandartinius gaminius, sudarytus iš submilimetrinio dydžio elementų. Iš esmės erdvinė skiriamoji geoba yra apribota ekstruzijos antgalio (paprastai ~0,4 mm skersmens). Makrodydžio komponentai submilimetriniu tikslumu gali būti suprojektuoti ir pagaminti per trumpą laiką, naudojant mažai medžiagų ir nebrangią įrangą. 3D spausdinimas taip pat vertinamas už tai, kad tai energiją taupanti technologija.

Šiame darbe tiriamos terminės ekstruzijos būdu 3D spausdintuvu iš PLA pagamintų bandinių, turinčių skirtingas mikroarchitektūras, mechaninės savybės. Tokie formuojami dariniai galėtų padėti kaip patvarūs sintetiniai mikrostruktūrizuoti kaulų pakaitalai, skirti kaulams priauginti odontologijoje. Svarbų vaidmenį darinių mechaninėms savybėms turi standumas ir stiprumas, mikrostruktūros pokyčiai, užpildymas, vidinės geometrijos simetrija ir periodas. Šių veiksnių valdymas lemia darinių savybes.

Medžiagos ir metodai

Dariniai suformuoti iš PLA medžiagos, naudojant 15 mm/s gamybos greitį ir 50 µm sluoksnio aukštį. Tai leidžia pasiekti gerą kompromisą tarp gamybos našumo ir gautos struktūros kokybės. Šiame darbe terminės ekstruzijos 3D spausdintuvu „Ultimaker“ formuojamos *woodpile* struktūros, turinčios 1,2 mm tinklo periodą ir ~50 % struktūros užpildymo faktorių.



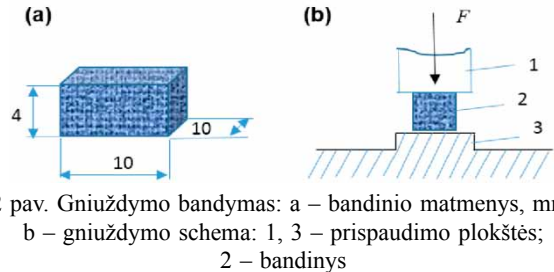
1 pav. Lenkimo bandymas: a – bandinio matmenys, mm; b – lenkimo bandymo schema: 1 – smogiamoji briauna; 2 – bandinys; 3 – atrama; L – atstumas tarp atramų, mm; R_2 – atramų suapvalinimo spindulys; R_1 – užapvalinimo spindulys; l – bandinio ilgis, mm; h – bandinio storis, mm; F – veikianti jėga, N

Fig. 1. Bending test: a – a sketch of a specimen, mm; b – schematic principle. Scheme of the bending test: 1 – a striking edge; 2 – a specimen; 3 – a support; L – the span, mm; R_1 – the radius of the striking edge; R_2 – the radius of supports; l – length of the specimen, mm; h – the thickness of the specimen, mm; F – the applied force, N

Mechaniniai plastikų bandymai turi būti atliekami griežtai vienodomis sąlygomis, kurios išdėstytos atitinkamuose standartuose. Darbe išanalizuoti plastikų mechaninių bandymų standartai (ISO 604:2002, ISO 178:2003). Gniuždymo ir lenkimo bandymai yra atlikti universalios bandymų mašina „TIRAtest 2300“ (Vokietija) su kompiuterinės jėgos ir poslinkių matavimo sistema. Taikomi metodai ir naudojama įranga buvo pasirinkti dėl jų universalumo, tikslumo ir prieinamumo. Naudojama bandymo mašina tinka bandiniams iš polimerų testuoti. Apkrovos matavimų paklaida – ne daugiau kaip $\pm 1\%$. Žingsnio poslinkio matavimo įrenginio tikslumas yra $\pm 0,5\%$. Bandiniai gniuždymui buvo paruošti pagal ISO 604:2002 rekomendacijas. Bandinių matmenys ir matavimo eiga atitinka šio standarto rekomendacijas. Pradinis karkasų aukštis buvo matuojamas mikrometru 0,01 mm. Mėginys buvo dedamas tarp dviejų standartinių kietų prispaudimo plokščių bandymo mašinoje. Apkrovos greitis – 1 mm/min. Mechaninis gniuždymo bandymas buvo pakartotas visiems bandiniams ir registruoti tirtų mėginių apkrovos/poslinkio grafikai. Lenkimo bandymai atliekami pagal standartą ISO 178:2003. Bandinių matmenys ir matavimo eiga atitinka šio standarto rekomendacijas. Pradiniai bandinių matmenys buvo matuojami mikrometru 0,01 mm. Atstumas tarp atramų – 50 mm. Atramos yra suapvalintos, suapvalinimo spindulys – 5 mm. Apkrovos greitis – 1 mm/min. Lenkimo bandymas atliekamas pagal schemą,

pateiktą 1 pav. Viena koncentruota jėga pridama bandinio viduryje. Bandymo metu matuojama jėga F_u , kurią pasiekus bandinys lūžta. Apskaičiuojamas stiprumo ribos lenkimo momentas M_u , o paskui stiprumo riba lenkiant: $\sigma_u = M_u/W_x$.

Bandinių matmenys atitinka standartų reikalavimus. Lenkimui paruošti $80 \times 10 \times 4$ mm (1 pav.), gniuždymui – $10 \times 10 \times 4$ mm bandiniai (2 pav.).

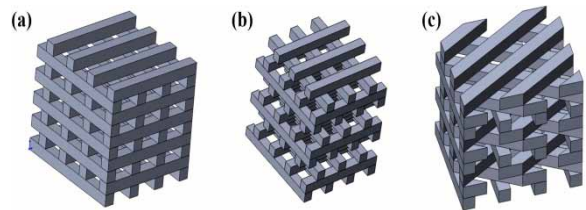


2 pav. Gniuždymo bandymas: a – bandinio matmenys, mm; b – gniuždymo schema: 1, 3 – prispaudimo plokštės; 2 – bandinys

Fig. 2. Compression test: a – a sketch of a specimen, mm; b – a compression measurements scheme: 1, 3 – compression plates; 2 – a specimen

Tiriami trijų skirtingų 3D mikroarchitektūrų bandiniai:

1) klasikinis periodinis tvarkiosios vidinės 3D architektūros darinys (FCC); 2) nepaslinktas vidinės 3D architektūros darinys (BCC); 3) besisukanti rastų rietuvė – kiekvienas tokios gardelės sluoksnis yra pasuktas 60 laipsnių prieš tai esančios atžvilgiu (60 deg) (3 pav.).

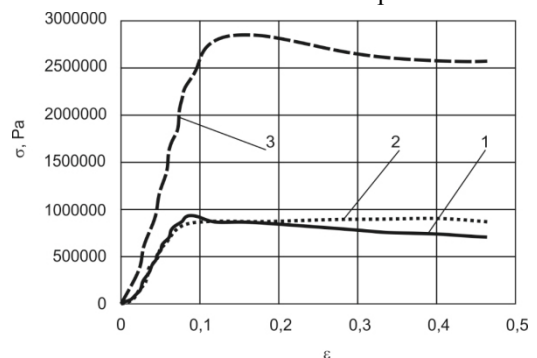


3 pav. 3D mikroarchitektūrų CAD modeliai: a – BCC; b – FCC; c – 60 deg

Fig. 3. CAD models of 3D woodpile microarchitectures: a – BCC; b – FCC; c – 60 deg

Rezultatai

Įtempių ir santykinės deformacijos diagramos pateiktos 4 pav. Mechaninio testavimo rezultatai pateikti 1 lentelėje.



4 pav. Įtempių ir santykinės deformacijos diagramos: 1 – woodpile bcc; 2 – woodpile fcc; 3 – woodpile 60 deg

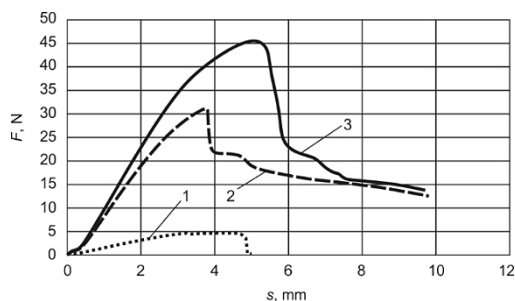
1 lentelė. Skirtingos 3D mikroarchitektūros (geometrijos) bandinių mechaninio testavimo rezultatai

Table 1. Mechanical tests results using varying 3D microarchitecture

Bandinys	Tamprumo modulis, MPa	Gniuždymo jėga, MPa	Standis, N/m
Woodpile BCC	9,2	0,92	$2,300 \cdot 10^5$
Woodpile FCC	7,8	0,88	$1,955 \cdot 10^5$
Woodpile 60 deg	23,1	2,6	$5,777 \cdot 10^5$

Mechaniniai bandymai parodė, kad didžiausia gniuždymo stiprumo riba, tamprumo moduliui ir standumui pasižymi *woodpile 60 deg* bandiniai. Tai rodo, kad spausdinimo orientacija (3D architektūra) turi įtakos mechaninėms savybėms.

Lenkimo diagrama arba veikiančios jėgos F ir bandinio įlinkio s priklausomybė pateikta 5 pav.



5 pav. Veikiančios jėgos F ir bandinio įlinkio s priklausomybė: 1 – *woodpile* BCC; 2 – *woodpile* FCC; 3 – *woodpile 60 deg*
Fig. 5. A graph of stress/deflection curve: 1 – *woodpile* BCC; 2 – *woodpile* FCC; 3 – *woodpile 60 deg*

Lenkimo bandymo rezultatai pateikti 2 lentelėje.

2 lentelė. Skirtingos 3D architektūros (geometrijos) bandinių lenkimo bandymų rezultatai

Table 2. Different 3D architecture (geometry) specimen bending test results

Bandinys	Tamprumo modulis lenkiant, MPa	Stiprumo riba lenkiant, MPa
Woodpile BCC	54,55	2,25
Woodpile FCC	380,45	14,52
Woodpile 60 deg	410,71	21,56

Mažiausią stiprumą lenkiant turi *woodpile* BCC, didžiausią – *woodpile 60 deg* bandiniai.

Išvados

Šiame darbe buvo spausdinami 3D mikrodariniai, turintys skirtingą vidinę mikroarchitektūrą ir eksperimentiškai buvo išmatuoti įtempių ir deformavimo bei apkrovos / poslinkio parametrai. Trijų skirtingų vidinių geometrijų bandiniai buvo nagrinėjami atliekant gniuždymo ir lenkimo

bandymus, leidžiančius eksperimentiškai nustatyti tamprumo modulį, stiprumo ribą ir standį. Tyrimu įrodyta, kad mikroarchitektūra gali iš esmės pakeisti galutinio karkaso mechanines savybes. Nustatyta, kad *woodpile 60 deg* geometrija turi geriausias mechanines savybes. Tokios struktūros karkaso tamprumo modulis (23,1 MPa) ir stiprumo riba (2,6 MPa) buvo maždaug tris kartus didesni nei kitų dviejų struktūrų (*woodpile* BCC tamprumo modulis – 9,2 MPa, stiprumo riba – 0,92 MPa; *woodpile* FCC tamprumo modulis – 7,8 MPa, stiprumo riba – 0,88 MPa). Taigi įrodyta, kad, dirbant su prieinama 3D spausdinimo technologija, kuri leidžia formuoti skirtingos mikroarchitektūros darinius, galima kontroliuoti mechanines tokių karkasų savybes.

Literatūra

- Babensee, J. E.; Andersonb, J. M.; McIntire, L. V.; Mikos, A. G. 1998. Host response to tissue engineered devices, *Advanced Drug Delivery Reviews* 33(1–2): 111–139. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(98\)00023-4](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(98)00023-4)
- Haimi, S.; Suuriniemi, N.; Haaparanta, A.-M., et al. 2009. Growth and osteogenic differentiation of adipose stem cells on PLA/bioactive glass and PLA/beta-TCP scaffolds, *Tissue Engineering Part A* 15(7): 1473–1480. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2008.0241>
- Hutmacher, D. W. 2000. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage, *Biomaterials* 21(24): 2529–2543. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00121-6](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00121-6)
- ISO 178:2003. *Plastics – Determination of flexural properties*. International Organization for Standardization, Geneva.
- ISO 604:2002. *Plastics – Determination of compressive properties*. International Organization for Standardization, Geneva.
- Liu, Y.; Lim, J.; Teoh, S.-H. 2013. Review: development of clinically relevant scaffolds for vascularised bone tissue engineering, *Biotechnology Advances* 31(5): 688–705. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.10.003>
- Malinauskas, M.; Rekštytė, S.; Lukoševičius, L., et al. 2014. 3D microporous scaffolds manufactured via combination of fused filament fabrication and direct laser writing ablation, *Micromachines* 5(4): 839–858. <https://doi.org/10.3390/mi5040839>
- Malinauskas, M.; Skliutas, E.; Jonušauskas, L.; Mizeras, D.; Šešok, A.; Piskarskas, A. 2015. Tailoring bulk mechanical properties of 3D printed objects of polylactic acid varying internal micro-architecture, in *Quantum Optics and Quantum Information Transfer and Processing 2015*, 13 April 2015, Prague, Czech Republic.
- Martinez-Vazquez, F.; Pajares, A.; Guiberteau, F.; Miranda, P. 2014. Effect of polymer infiltration on the flexural behavior of β -tricalcium phosphate robocast scaffolds, *Materials* 7(5): 4001–4018. <https://doi.org/10.3390/ma7054001>
- Nair, L.; Laurencin, S. I. 2007. Biodegradable polymers as biomaterials, *Progress in Polymer Science* 32(8–9): 762–798. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.05.017>
- Richardson, S. M.; Curran, J. M.; Chen, R., et al. 2006. The differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells

into chondrocyte-like cells on poly-L-lactic acid (PLLA) scaffolds, *Biomaterials* 27(22): 4069–4078.

<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.03.017>

Wolfe, P. S.; Sell, S. A.; Bowlin, G. L. 2011. Natural and synthetic scaffolds, in N. Pallua, C. V. Suschek (Eds.). *Tissue engineering*. New York: Springer, 41–67.

http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-02824-3_3

MECHANICAL PROPERTIES OF 3D SCAFFOLDS FOR BONE REGENERATION

D. Mizeras, A. Šešok, A. V. Valiulis, J. Gargasas, I. Gedzevičius

Abstract

One of the biggest challenges in modern tissue engineering is a creation 3D scaffolds for bone tissue regeneration. Until now, in order to restore bone defects are used various bone substitutes (autologous and allogeneic), however, their usage is limited because is required additional surgery, possible complications, also limited their use is associated with ethical point of view. In this work we aim to determine the mechanical properties of 3D printed PLA objects having various orientation woodpile microarchitectures. In this work we chose three different 3D microarchitectures: woodpile BCC (each layer consists of parallel logs which are rotated 90 deg every next layer), woodpile FCC (every layer is additionally shifted half of the period in respect to the previous parallel log layer) and a rotating woodpile 60 deg (each layer is rotated 60 deg in respect to the previous one). Compressive and bending tests were carried out with TIRAtest2300 universal testing machine. We found that 60 deg rotating woodpile geometry had the highest mechanical values which were approximately about 3 times higher than the BCC or FCC microstructures.

Keywords: 3D microarchitecture, additive manufacturing, tissue engineering, scaffolds, mechanical properties, polylactic acid.