

Факултет инжењерских наука Универзитета у Крагујевцу



Назив студијског програма: Машинско инжењерство

Ниво студија: Основне академске студије

Модул: Производно машинство

Предмет: Мерење, контрола и квалитет

Број индекса: 29/2017

Нина М. Бусарац

Утицајни параметри на квалитет 3Д биоштампе

завршни рад

Комисија за преглед и одбрану:

1. др Фатима Живић, доцент - ментор

2. _____

3. _____

Датум
одбране: _____

Оцена: _____

У оквиру овог завршног рада кандидат треба да направи преглед техника биопринтинга и доступних биоматеријала, укаже на утицајне параметре, на практичном примеру биопринтинга желатина.

Препоручена литература:

- [1] He Y, Yang F, Zhao H, et al. (2016) Research on the printability of hydrogels in 3D bioprinting. Sci Rep. 2016;6:29977. doi:10.1038/srep29977
- [2] Wang X, Ao Q, Tian X, et al. (2017) Gelatin-Based Hydrogels for Organ 3D Bioprinting. Polymers. 9(9). doi: 10.3390/polym9090401.

Крагујевац, 15.8.2020.

Ментор:

др Фатима Живић, доцент

Abstract

Quality and resolution of the bioprint, as well as cell viability, greatly depend on a number of parameters. Lack of standardized parameters and limitations in current methods of 3D bioprinting necessitate further research and development in this field. Herein some of the printing parameters are discussed and a parameter optimisation index is presented. Influence of said parameters on the print is shown on an example of gelatin-based hydrogel structure, printed using Tissue Scribe bioprinter. This document also gives an overview of currently available bioinks, with an accent on gelatin-based hydrogels.

Keywords: 3D bioprinting, bioinks, gelatin, hydrogels, printing parameters

Резиме

Квалитет и резолуција штампе, као и одрживост ћелија, у процесу биопрентинга, умногоме зависе од бројних параметара. Недостатак стандардизације параметара и ограничења у тренутним методама 3Д биопрентинга захтевају даље истраживање и проналаске на овом пољу. У овом раду дискутовани су неки од прентинг параметара и презентован је индекс оптимизације параметара. На примеру структуре од хидрогела на бази желатина, која је одштампана на Tissue Scribe биопрентеру, показан је утицај поменутих параметара. Овај рад, такође, даје преглед тренутно доступних биоматеријала, са акцентом на хидрогелове на бази желатина.

Кључне речи: 3Д биопрентинг, биоматеријали, желатин, хидрогел, параметри штампе

Садржај

Abstract	3
Резиме	3
1. Увод	6
1.1. 3Д штампа меких материјала	6
1.2. Класичан биопринтинг и биопринтинг са ћелијама	6
2. 3Д биопринтинг	8
2.1. Врсте и особине биопринтера	8
2.2. 3Д биопринтинг технологије	10
2.2.1. Увод у технологије биопринтинга – брза израда прототипова	10
2.2.2. Класификација 3Д биопринтинг технологија	10
2.2.3. Напредне биопринтинг технологије	13
2.3. Материјали у примени	15
2.3.1. Хидрогелови на бази природних полимера	17
2.3.2. Хидрогелови на бази синтетичких полимера	27
2.3.3. Композитни хидрогелови	30
2.3.4. Супрамолекуларни хидрогелови	32
2.3.5. Хидрогелови са одзивом на стимулансе	32
2.4. Уређај за 3Д штампу меких материјала – биопринтер	32
2.4.1. Елементи и кретања	32
2.5 Ограничења технологије биопринтинга	41
2.5.1. Ограничен избор комерцијално доступних биопринтера	41
2.5.2. Дизајн кертрица и млазнице	42
2.5.3. Величина и брзина биопринтера	43
2.5.4. Недостатак пуне аутоматизације	44
2.5.5. Висока цена биопринтинга	44
2.5.6. Ниска резолуција процеса	45
2.5.7. Недостатак компатибилних биоинк материјала	46
2.5.8. Напредак у истраживању биопринтинга и инжењеринга ткива	46
2.5.9. Ограничена клиничка примена	46
3. Оптимизација параметара биопринтинга	47

3.1. Индекс оптимизације параметара	47
3.1.1. Ограничења примене индекса оптимизације параметара	50
3.2. Пинтабилност хидрогела	50
3.2.1. Пинтинг једнодимензионалних структура	51
3.2.2. Пинтинг решеткастог скафолда	52
3.2.3. Пинтинг тродимензионалних структура.....	53
4. 3Д биопинтинг желатина – практичан рад у лабораторији.....	54
4.1. Резултати	54
4.2. Дискусија	55
5. Закључак.....	56
Литература	58

1. Увод

1.1. 3Д штампа меких материјала

Аддитивна производња, односно 3Д штампа, представља могућност да се виртуелни 3Д CAD модели трансформишу у физичке објекте, додавањем материјала слој по слој, што је разликује од конвенционалних технологија. Од зачетка ове технологије, достигнути су велики напретци у разумевању процеса 3Д штампе, као и односа креираног објекта са његовим компонентама, структуром, својствима и применама. У односу на конвенционалне технологије, 3Д штампа је флексибилнија, са мање шкарта – што је може учинити исплативом, а такође, пружа могућност израде делова сложене геометрије.

Употреба хидрогелова као материјала је једна од најизводљивијих врста 3Д штампе, што је довело до брзог напретка на пољу развоја биомедицинских материјала на бази хидрогелова. Примена ових материјала се може наћи у областима инжењеринга ткива, регенеративној медицини, истраживању канцера, ин витро проучавању болести, проверавању лекова итд.

Са тенденцијом убрзаног старења популације и све дужим очекиваним трајањем живота створила се повећана потражња за пресађивањем ткива и органа, а самим тим и за синтетичким биоматеријалима који имају велики потенцијал да замене, опораве или регенеришу изгубљено, повређено или оболело ткиво и органе. Од нове генерације материјала се очекује да буду биоапсорбујући, биоактивни и механички робустни.

Скафолди са порозном 3Д структуром су обећавајућа стратегија у области инжењеринга ткива и регенеративне медицине. Они омогућавају раст ћелија и транспорт материја, за олакшано формирање ткива и биодеградацију материјала. Понашање ћелија у скафолду се може регулисати одабиром материјала, као и физичким и хемијским својствима мреже хидрогела. Значајни успех је постигнут у дизајнирању хидрогелова на бази алгината и желатина, али мањак разноврсности материјала претставља и даље један од највећих проблема. Додатно, формулације хидрогелова са ћелијама су још оскудније (Li et al. 2020).

1.2. Класичан биопринтинг и биопринтинг са ћелијама

Тродимензионална штампа је отворила револуционарну еру у дизајну и развоју медицинских производа и широко се користи у производњи анатомски тачних скафолда израђених по мери. Ова технологија се карактерише поновљивошћу и високом тачношћу на микро скали. Различите технике 3Д штампе, као што су екструзија материјала, фузија

прашкастог слоја, брызгање везивног средства и фотополимеризација, користе се за производњу биолошки инертних конструкција, замењујући притом немедицинске материјале са биокompatibilним и биоресорбативним материјалима, као што су синтетички и природни полимери, керамички материјали или, скорије развијени биоразградиви метали. Адаптирањем 3Д принтинга за инжењеринг ткива добија се могућност брзе производње скафолда контролисане порозности и унутрашње структуре, подесивим механичким и структурним карактеристикама, као и могућношћу достављања лекова или протеинских молекула за појачање ћелијског одговора.

Упркос својим предностима у биопроизводњи анатомски тачних скафолда, 3Д принтинг инертних материјала у инжењерингу ткива суочава се са неколико ограничења приликом генерисања сложених ткива и органа за трансплантацију и друге примене. Прво, ручно додавање ћелија скафолду са микроструктуром је непрецизно. Јако је изазовно ручно наношење (сејање) ћелија, у циљу рекапитулације, односно имитирања, комплексних конфигурација разних врста ћелија у природним ткивима и органима. Додатно, у случају високе густине ћелија, сејање ћелија није тривијално јер може доћи до тога да се ћелије само закаче за површину скафолда и не пенетрирају у матрикс. Скафолд биоматеријала заузима велику запремину у простору, што спречава ћелије да се довољно шире и множе. Такође, потребна је васкуларизација ткива и органа како би ћелије добијале кисеоник и биле одрживе и функционалне, али креирање таквих мрежа, употребом конвенционалних 3Д принтинг технологија је изазовно. Из ових потешкоћа произишло је развијање 3Д биопринтинг технологија, где су ћелије обложене и тако се штампају у жељене облике и шаблоне, чиме се олакшавају хетероцелуларне интеракције присутне у изворним (природним) ткивима и органима. Треба напоменути да неки аутори под појмом „биопринтинг“ подразумевају само биопринтинг са ћелијама, али у овом раду се под тим појмом подразумева свака 3Д штампа меких материјала.

Биопринтинг је први пут демонстриран 1988. године, као технологија ћелијског писања, методом микро-позиционирања биолошких материјала као што су колаген и гликопротеин фибронектин. Том приликом је коришћен Хјулет-Пакард (HP) инкџет принтер и графички плотер за позиционирање ћелија. Године 1999. процесом ласерског биопринтинга је показано да се ћелије могу наносити тродимензионално, чиме се биомиметички развија ткиво аналогно комплексној анатомији. Модификовањем HP инкџет принтера, 2003. године, успешно је започет биопринтинг на бази инкџета. Оснивањем првог института у САД-у у области 3Д принтинга и адитивне производње (The National Additive Manufacturing Innovation Institute), употреба 3Д принтера у биолошким истраживањима је ескалирала и постигнут је огроман напредак. Касније је уследила комерцијализација ових технологија широм света. Нове генерације биопринтера теже ка производњи већих ткива и, ултимативно, штампању целих органа (Ozbolat et al. 2017).

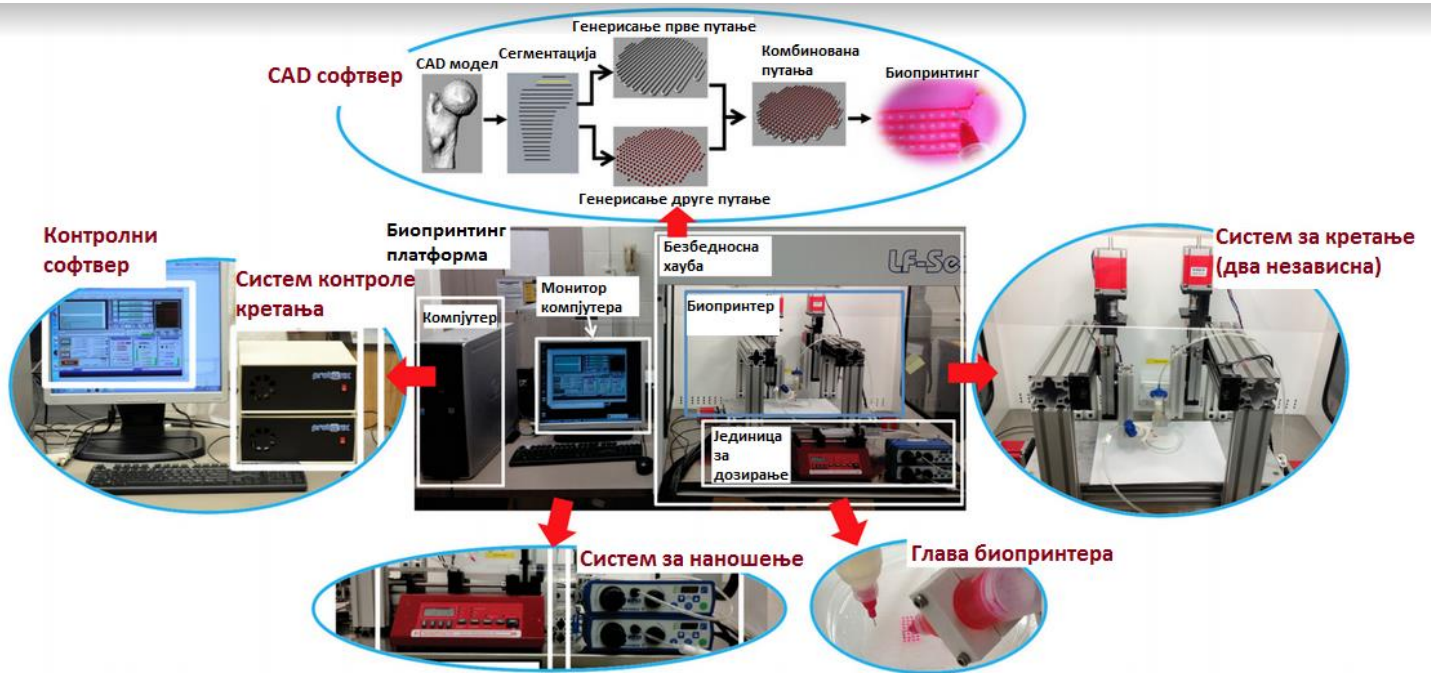
2. 3Д биопринтинг

2.1. Врсте и особине биопринтера

Према модалитету биопринтинга, биопринтери се могу класификовати под три главне групе, које укључују биопринтере на бази: екструзије, капљица или ласера. Екструзиони биопринтер користи механички или пнеуматски систем да наноси ћелије у форми филамента, док капљични биопринтер користи термални, пијезо или акустични механизам да наноси капљице ћелијске суспензије са високом пропушношћу. Ласерски биопринтери, са друге стране, користе ласерску енергију за наношење ћелија са донора на примаоца, без потребе за млазницом. Идеалан биопринтер требало би да поседује следеће могућности:

- Висок степен слободе кретања, који омогућава наношење биоинк раствора на непланарне површине. Ово је пресудно за прелазак биопринтера на клиничку примену и употребу за наношење ћелија у биолошко место лезије (оштећења).
- Висока резолуција и тачност, које омогућавају наношење биоинк раствора са довољном тачношћу да симулирају ћелије у изворном ткиву.
- Велика брзина кретања, која омогућава брзу израду конструкција ткива и органа људског обима за клиничку трансплантацију и фармацеутска истраживања.
- Могућност рада са различитим биоинковима истовремено, како би се омогућила израда хетероцелуларних ткива, која имитирају изворно ткиво.
- Лакоћа коришћења, која омогућава да оператери са минимумом способности и искуства рукују биопринтером.
- Компактна величина, која омогућава постављање под стандардну безбедносну хаубу за биопринтинг у стерилним условима.
- Лакоћа стерилизације, која омогућава оператеру да одржи стерилне услове у току процеса.
- Могућност потпуне аутоматизације, која олакшава биопринтинг конструкција ткива и органа без интервенције корисника.
- Приступачност цене, која омогућава истраживачима да приуше инструментацију за истраживање нових области.
- Свестраност, која омогућава оператеру да модификује и прошири инструментацију за вишенаменску употребу.

Не поседују сви биопринтери горепоменуте способности, јер је већина биопринтера предвиђена само за базична истраживања. У типичном биопринтинг процесу CAD софтвер генерише план путање алата за системе аутоматизованог кретања и наношења. Систем за кретање омогућава биопринтеру кретања по x, y, и z оси, док систем за наношење (пнеуматски, механички или флуидни) контролише тачност наношења биоматеријала. Најчешће примењиван модалитет биопринтинга је на бази екструзије. Један такав систем и његове компоненте се могу видети на слици 1. Други модалитети могу имати и другачије конфигурације од наведених (Ozbolat et al. 2017).



Слика 1 Компоненте биопринтера на бази екструзије

2.2. 3Д биопринтинг технологије

Тродимензионални биопринтинг је процес стварања шаблона ћелија у ограниченом простору, коришћењем 3Д биопринтинг технологија, при чему се води рачуна о очувању функција и одрживости ћелије. Велика предност 3Д биопринтинг технологија у „производњи органа“ је коришћење хетерогених врста ћелија или стем ћелија заједно са другим биоматеријалима, у циљу поправке, замене или обнове оштећених или отказалих органа. Од свих 3Д биопринтинг технологија, издваја се биопринтинг на бази екструзије са више млазница, као моћни алат за производњу васкуларизованих органа са хијерархијским унутрашњим/спољашњим структурама и вишеструким физиолошким функцијама, који имају потенцијал да се широко користе у многим областима биомедицине, као што је регенеративна медицина, скрининг за лекове итд.

2.2.1. Увод у технологије биопринтинга – брза израда прототипова

Брза израда прототипова (енг. Rapid Prototyping, RP) је технологија настала 1980их и која користи разне методе примене CAD модела за добијање 3Д објеката. Ове методе се базирају на идеји додавања материјала слој по слој, како би се добио 3Д објекат. Кроз историју јављали су се разни називи за RP технологије, као што су: адитивна производња (енг. additive manufacturing, AM), чврста израда слободних облика (енг. solid freeform fabrication, SFF), производња повећањем материјала (енг. increasing material manufacturing, IMM), стереолитографија (енг. stereolithography, SLA) и слојевита израда (енг. layered manufacturing, LM). У скорије време, све више се израђује 3Д штампом, а у неким областима и 3Д биопринтингом, као што су медицинско инжењерство и инжењеринг ткива. Биопринтинг технологије, према CAD моделу, штампају живе ћелије заједно са биоматеријалима, као што су полимери и фактори раста, по базичном принципу RP технологија, који се своди на састављање слојева материјала по инструкцијама CAD фајлова (Wang et al. 2017).

2.2.2. Класификација 3Д биопринтинг технологија

Као што је већ поменуто, биопринтери се могу поделити на инструменте, који раде на бази: екструзије, капљица или ласера (Ozbolat et al. 2017). Према другим ауторима (He et al. 2020), биопринтинг технологије се, према различитим принципима штампања, могу класификовати у три групе: технологије на бази екструзије, технологије на бази капљица и технологије на бази фотосушења. Биопринтинг на бази екструзије истискује континуално

влакно хидрогела, чиме се формира структура; биопринтинг на бази капљица генерише капљице, као основну јединицу биопроизводње; биопринтинг на бази фотосушења користи карактеристике материјала осетљивих на светлост да сложи 3Д модел слој по слој. Различити приступи показују различите карактеристике и захтевају специфичне материјале.

2.2.2.1. Биопринтинг на бази екструзије

Биопринтинг на бази екструзије је тренутно најшире примењен метод, погодан за велики опсег биокомпатабилних материјала. Биоматеријали са уграђеним ћелијама се наносе кроз отвор млазнице у виду континуалног филамента, помоћу екструзионог система, који може бити пнеуматски, клипни или са вијком. Комплексне 3Д структуре се добијају додавањем слојева на постојећу подлогу.

За ову технологију биопринтинга се најчешће бирају материјали осетљиви на температуру или са својствима стањивања услед смицања (својством тиксотропије). Материјали чија се вискозност налази у рангу од 30 до 6×10^7 mPa/s су се показали као компатибилни са биопринтерима на бази екструзије. Структуре добијене штампањем материјала веће вискозности лакше задржавају облик, али, са друге стране, материјали мање вискозности су повољнији за функције и одржавање ћелија. Биопринтинг на бази екструзије је погодан за штампање са више материјала у колаборацији на истој структури. Ипак, резолуција је око 200 μm , што представља ограничење, јер је тешко постићи тачно имитирање структуре ткива. Осим тога, сила смицања током екструзије вискозних биоматеријала може довести до оштећења ћелија.

2.2.2.2. Биопринтинг на бази капљица

Код биопринтинга на бази екструзије основна јединица производње је влакно, односно филамент, а код биопринтинга на бази капљица то је појединачна капљица. На основу различитих принципа формирања капљица, биопринтинг на бази капљица се може грубо поделити на: електрохидродинамички џетинг (енг. electrohydrodynamic jetting, EHJ), инкџет биопринтинг и ласерски потпомогнут биопринтинг (енг. laser-assisted bioprinting, LAB).

EHJ користи електрично поље са високим напонам да извуче капљице из отвора млазнице. Варирање напона утиче на величину капљице – већи напон даје мање капљице. Применом ове технологије не долази до великог притиска током екструзије биоматеријала кроз млазницу, што би негативно утицало на ћелије. EHJ је погодан за биопринтинг са

материјалима код којих је велики однос тежине и запремине и код којих је концентрација ћелија велика. Ова метода има предности, као што су: ниска цена, висока ефикасност, висока прецизност, управљивост позицијом наношења материјала и мало оштећење ћелија. Има и своје недостатке: деформација сложених конструкција услед електричне акумулације, као и компликована контрола процеса и тешко паковање већег броја слојева, услед чињенице да је интензитет електричног поља повезан са висином одштампане структуре.

Инкџет биопринтинг користи физичке карактеристике материјала, као што су: вискозност, густина и површински напон, како би наслањао микросфере на субстрат (примајућу подлогу). Може се даље класификовати као континуални инкџет (енг. continuous inkjet, CIJ) и капљица-на-захтев (енг. drop-on-demand, DOD) инкџет биопринтинг. DOD инкџет биопринтинг, који укључује термални и пиезоелектрични инкџет биопринтинг, чешће је коришћен у области инжењеринга ткива. Предности инкџет биопринтинга су приступачност цене и могућност прецизне контроле биоматеријала, (висока прецизност штампе). Ипак, ова техника има своја ограничења, укључујући: запушавање млазнице приликом употребе материјала који садрже ћелије и значајно оштећење ћелија приликом процеса, што утиче на њихову функционалност. Додатно, ова техника има ограничен опсег доступних биоматеријала, а посебно концентрованих биоматеријала. Још један проблем је што је млазница код инкџета склона оштећењима.

LAB је безконтактни биопринтинг приступ, који не користи млазницу. Карактерише га прецизно наношење биоинк капљица. LAB техника обухвата директно писање ласерским навођењем (енг. laser-guidance direct writing, LGDW) и ласерски индуковано прослеђивање (енг. laser-induced forward transfer, LIFT). LGDW користи оптику да здружи ћелије са субстратом, док LIFT шаље биоматеријал ка примајућем слоју, помоћу локалног, ласерски индукованог испаравања слоја премазаног биоматеријалом. Пошто нема млазнице, LAB нема ни проблем са запушавањем млазнице и показује поузданост. Због мање величине капљица, у односу на инкџет биопринтинг, LAB достиже вишу резолуцију штампе. Употреба LAB технологије је ограничена због неколико недостатака. На пример: није лако контролисати равномерност (униформност) слоја премаза са биоматеријалом, ручна замена премаза је неефикасна, процес подешавања и контроле је напоран, не постоји могућност израде сложених структура, мањак комерцијализованих уређаја итд.

2.2.2.3. Биопринтинг на бази фотосушења

Биопринтинг на бази фотосушења примењује очвршћавање фото-осетљивих полимера, како би се формирала конструкција под прецизно контролисаном светлошћу.

Ову технологију карактеришу велика прецизност и брзина. Аутори (He et al. 2020), ову технологију, даље, према различитим начинима скенирања светлости, класификују на стереолитографију (енг. stereolithography, SLA) и принтинг на бази пројекције (енг. projection-based printing, digital light processing, DLP).

Код SLA технике, за биопринтинг сваког слоја ласер скенира 2Д шему, тако што пролази кроз њену путању тачку по тачку. Када се један слој осуши, платформа се спушта за висину слоја, и тако док се не добије читава структура. DLP, за разлику од SLA, фотокрослинкује читав слој одједном, а не тачку по тачку. Процес штампе може се категоризовати као одоздо на горе или одозго на доле. DLP има већу брзину штампе, а промену 2Д шаблона за сваки слој постиже коришћењем дигиталног микроогледала (енг. digital micromirror device, DMD). Биопринтинг на бази фотосушења има предности, као што су: систем без млазнице и висока резолуција; док су му недостаци: неидеална густина и униформност ћелија, излагање ултраљубичастим зрацима и токсични фотоиницијатори, који могу утицати на ћелијску активност, као и недостатак компатабилних биоматеријала (He et al. 2020).

2.2.3. Напредне биопринтинг технологије

Од свих доступних 3Д биопринтинг технологија, због своје широке интеграције и аутоматизације, биопринтинг на бази екструзије је највише напредовао на разним пољима биоинжењеринга. Вишемлазне екструзионе технологије имају велике јединствене могућности биомедицинске примене, као што су: ресторација оштећених или отказалих органа, патолошко моделирање органа, дијагностика болести органа и тестови ефикасности лекова.

Ћелије су први пут обложене биоразградивим хидрогелом на бази желатина, 2004. године, и биопринтоване у 3Д структуру са каналима за нутријенте и продукте метаболизма. Након тога је успостављен протокол за 3Д биопринтинг органа са вишеструким полимерним крослинкингом и матичним ћелијама у унапред предвиђеној структури. Матичне ћелије масног ткива су, помоћу технологије биопринтинга, убачене у ендотелно и масно ткиво, што се не би могло реализовати помоћу других технологија тог периода.

Први биопринтовани орган, тј. преваскуларизовано јетрено ткиво, израђен је 2007. коришћењем екструзионим биопринтером са две млазнице. То је, такође, први пут да су различити типови ћелија, матичне ћелије масног ткива и хепатоцити (ћелије ткива јетре), сложени заједно у велико васкуларизовано ткиво, са једноосно разгранатим васкуларним системом. Биопринтинг је први пут успешно комбинован са техником криопрезервације 2009. године, како би се складиштило и очувало направљено ткиво. Ово може у великој

мери уштедети мануелни рад, материјалне ресурсе и финансијске трошкове у областима производње људских органа. Први хидрогел на бази желатина са ћелијама и синтетичким полимерним системом је 2013. принтован у хијерархијску конструкцију са предвиђеним васкуларним шаблоном и имплантиран у живи организам. Касније, 2014. године, развијен је компликованији орган са више од три врсте ћелија помоћу комбинованог вишемлазног 3Д биопринтера, што је био дугоочекивани пробој на пољу биомедицине.

Биопринтери на бази екструзије се користе и у друге сврхе, не само за производњу органа, као на пример, за скрининг лекова. Један од великих проблема у проналажењу лека за метаболички синдром (МС, скуп фактора ризика, који се јавља као последица инсулинске резистенције и абнормалног накупљања и функције масног ткива) је мањак ин витро модела који обухватају комплексне карактеристике ове болести. Многе физиолошке и патолошке карактеристике МС-а се могу истражити ин vivo мултицелуларним 3Д конструкцијама (Wang et al. 2017).

2.2.3.1. Коаксијални биопринтинг

Коаксијални биопринтинг је, од како се појавила 2015, све више и више популарна метода биопринтинга на бази екструзије, посебно у областима васкуларизације (израде крвних судова). Највећа предност коаксијалног биопринтинга је могућност израде тубуларних структура. Хидрогелови са одличном биокомапабилношћу најчешће поседују недовољну механичку чврстоћу, што се, донекле, може решити језграстим структурама, помоћу коаксијалног биопринтинга. Материјал језгра би осигурао биокомпатабилност, док материјал омотача пружа механичку чврстоћу, или обрнуто.

2.2.3.2. Принтинг на бази пројекције

Као што је већ помињано, принтинг на бази пројекције, DLP, користи фотосензитивне биоматеријале, као што је GelMA хидрогел, који се излаже светлости одређене таласне дужине. DLP има изузетну брзину, јер је време израде слоја једнако, независно од сложености облика и структуре. DLP је, такође, поузданији и има бољу резолуцију од инкјета и биопринтинга на бази екструзије, што даје конструкције са бољим структурним интегритетом и механичким способностима. Не постоји опасност од запушавања млазнице, као ни од оштећења ћелија услед смицања.

2.2.3.3. Уграђени биопринтинг

Уграђени биопринтинг (енг. Embedded bioprinting) омогућава антигравитационо слободно формирање 3Д конструкција у носећој купки на бази гела, која ће после процеса принтинга бити уклоњена, како би се, затим, добили модели жељених облика, са каналима. Штавише, методом уграђеног биопринтинга, 2019. године је постигнута израда делова људског срца на разним скалама, од капиlara до целог органа (He et al. 2020).

2.3. Материјали у примени

Адитивна производња омогућава да се материјали и ћелије наносе са добром тачношћу и релативно малим ограничењима по питању форме, што дозвољава производњу на захтев. Како би производња била ефикасна, неопходни су биоматеријали напредног дизајна уз одређене карактеристике, на пример: склоност стањивању услед смицања (тиксотропија), биофункционалност, одзив на стимулансе, самомонтажа, електрична проводљивост или контролисано ослобађање терапијских супстанци. Такође, материјал мора да задовољи одређена физичка ограничења дефинисана технологијом, као што су: вискозност, течљивост, стопа самозацељења и кинетика гелирања. Додатни параметри потичу од циљане примене. На пример, у инжењерингу ткива, материјал би требало да буде компатибилан са ћелијама, док је за доставу лекова битно контролисано ослобађање терапије.

До сада су из области инжењеринга материјала већ произишли многи материјали прилагођени одређеној адитивној технологији или биомедицинској примени. Ипак, на овом пољу недостају прилагодљиве стратегије да се олакша и убрза дизајн нових материјала са могућношћу да одговоре на различите потребе, без значајног модификовања формулације материјала.

Материјали за 3Д биопринтинг би требало да испољавају течење услед смицања током екструзије, затим брзо поновно формирање и задржавање облика. Дакле, атрактивна класа биоматеријала су сложени флуиди, базирани на полимерима или колоидним састојцима, који показују висок степен стањивања услед смицања (вискозно течење при дејству смицајних сила) и самозацељење (враћање вискозности на ниво пре стањења услед смицања) (Guzzi et al. 2019). Полимерни хидрогел је 3Д крослинкована мрежа флексибилних полимерних ланаца, која садржи велику количину воде, али задржава карактеристике чврстог тела. 3Д мрежа омогућава задржавање течности како би се формирала геласта фаза, а течност унутар ње спречава колапс полимерне мреже, што пружа карактеристике налик на оне код меких ткива. Током сол-гел процеса, у тачки гела,

полимерни сол или раствор може нагло да се промени од вискозне течности до чврсте фазе – хидрогела.

Разни полимери се употребљавају за прављење хидрогелова, укључујући природне и синтетичке. На основу типа крослинкинга хидрогелови могу бити физички (физички крослинкинг) и хемијски (хемијски крослинкинг и крослинкинг радијацијом). Методе физичког крослинкинга су загревање/хлађење полимерног раствора, јонска интеракција, циклус замрзавања и одмрзавања, комплексна коацервација (одвајање две течне фазе, где једна има већу концентрацију колоида) и везивање водоника. Метода хемијског крослинкинга је реакција са функционалним групама (ОН, COOH, NH₂, исл.), док се за крослинкинг радијацијом користе гама зраци, рендгенски зраци, електронски сноп исл (Li et al. 2020).

У табели 1. се налазе неки од материјала и њихове цене. У овом раду ћемо се бавити штампањем и испитивањем узорака од желатина. Цене изражене у доларима су преузете са сајта www.alibaba.com, 15. маја 2020.

Табела 1. Преглед материјала који се најчешће користе за биопринтинг и који су комерцијално доступни на тржишту

Материјал	Оквирна цена	Произвођач
Хитозан	\$22,00 - \$32,00 /kg	Qingdao Greentech Biochemicals Trading Co., Ltd.
Целулоза (HEC)	\$2,50-\$4,20/kg	Shandong Mike Water Treatment Technology Co., Ltd.
Целулоза (CMC)	790,00 RSD/kg	Milex Co.
Гелан гума	\$2,30-\$17,80/kg	Shandong Zhi Shang Chemical Co., Ltd.
Хијалуронска киселина	\$36,00-\$45,00 /ml	Shandong Runxin Biotechnology Co., Ltd.
Колаген	\$21,20-\$29,00/kg	Xi'an Natural-Field Bio-technique Co., Ltd.
Желатин	1.220,00 RSD /kg	VEGA ADM DOO
PEG 400	\$2,00 - \$5,00/kg	Shandong Natural Micron Pharm Tech Co., Ltd.
PVA	\$100,00/kg	Shandong Zhi Shang Chemical Co., Ltd.

2.3.1. Хидрогелови на бази природних полимера

Природни полимери се другачије називају биополимери, јер потичу од организама као што су животиње, биљке и бактерије. У њих спадају полисахариди (шећери), гликозаминогликани (ГАГ) и полипептиди (протеини). Гликозаминогликани природно имају могућност да покрију површину еукариотске ћелије и, у комбинацији са разним протеинима, формирају ванћелијски матрикс, што као резултат има одличну биокомпатабилност. Неки од природних полимера су: агароза, алгинат, карагенан, метилцелулоза, хитозан, декстран, гелан гума, хондроитин сулфат, пектин, хепарин, хијалуронска киселина, кератан сулфат, албумин, казеин, колаген, еластин, фибрин, желатин, свила итд.

2.3.1.1. Агароза

Агароза је линеарни полисахарид који се може наћи у црвеним алгама. Раствара се у води на температурама изнад 65 °C и може да се гелира на температурама од 17 °C до 40 °C. Гелирана агароза је стабилна и не бубри на константној температури, нити се враћа у течност, до температуре од 65 °C. Механизам гелирања агарозе почива на формирању интермолекуларних водоничних веза након хлађења. Вискоеластичне карактеристике хидрогелова на бази агарозе зависе од молекуларне масе и концентрације раствора. Модул еластичности добијеног гела може бити од 1 kPa до неколико хиљада kPa.

Примена се може наћи у областима:

- регенерације ткива (хрскавице, рожњаче, глеђи, нерава),
- лечења канцера јајника,
- имуноинжењеринга,
- система доставе лекова, фактора раста и гена.

2.3.1.2. Алгинат

Алгинат је линеарни полисахарид растворљив у води, који се добија из смеђих алги и бактерија. Генерално се сматра за безбедан и биокомпатибилан материјал и може да се гелира под благим условима, што га чини добрим за инкапсулацију (облагање) ћелија. На рН вредностима испод 3, алгинат сам прелази у кисели гел, путем формирања интермолекуларних водоничних веза. Алгинат, такође, може формирати хидрогел путем кооперативног везивања са двовалентним и тровалентним катјонима као што су Ca^{2+} , Mg^{2+} ,

Sr^{2+} , Ba^{2+} или Al^{3+} , који могу да реагују са карбоксилном групом у шећерима. Вискозност раствора алгината и крутост гела зависе од концентрације полимера и расподеле молекуларне масе. Хидрогелови на бази алгината споро деградирају, губећи двовалентне јоне (који прелазе у околину), што доводи до промене механичких карактеристика током времена.

Примењује се у областима:

- регенерације ткива (коштаног, хрскавице, миокардиалног, нервног),
- инкапсулације и трансплантације ћелија,
- зарастање рана,
- система доставе лекова, протеина, фактора раста, гена, ћелија,
- лечења канцера јажника.

2.3.1.3. Карагенан

Карагенан је линеарни полисахарид, који се екстрахује из црвених алги. Може да се раствара у води. Постоје изомери κ -, ι - и λ -карагенан. Изомери κ -карагенан и ι -карагенан могу да формирају термореверзибилне хидрогелове након хлађења врелог воденог раствора, који садржи разне соли. Овај процес може трајати сатима, на температури преласка раствора у гел. Чврстоћа хидрогела на бази карагенана у многоме зависи од концентрације карагенана, као и типа и концентрације катјона. Претерана концентрација катјона (преко 0.2 mol/L) може ослабити хидрогел. Катјон K^+ чини гел крутим и еластичним, када су у питању хидрогелови на бази κ -карагенана, док се код ι -карагенана повољна својства добијају када, од катјона, највећу концентрацију има Ca^{2+} . Најчвршће хидрогелове формира κ -карагенан.

Примењује се у:

- регенерацији коштаног ткива и хрскавице,
- системима за доставу лекова и фактора раста.

2.3.1.4. Целулоза

Целулоза је најзаступљенији полисахарид у природи, екстрахован из биљака, природних влакана или бактерија. Хидрогелови на бази целулозе се могу добити од природног раствора целулозе помоћу водоничних веза. Целулоза није растворљива у води и другим уобичајеним растварачима, зато је проналажење одговарајућег растварача главни

задатак за добијање ових хидрогелова. Међутим, постоје деривати целулозе који се растварају у води, као што су метилцелулоза (МС), карбоксиметилцелулоза (СМС), хидроксипропил метилцелулоза (НРМС), етилцелулоза (ЕС), карбоксиетилцелулоза (СЕС) и хидроксиетилцелулоза (НЕС), који се користе за добијање хидрогелова физичким и хемијским крослинкингом. МС је семифлексибилни линеарни ланац полисахарида. Препозната је као прехранбени адитив од стране Управе за храну и лекове САД-а. Метилцелулоза може да се гелира из воденог раствора загревањем или додавањем соли.

Примењује се у:

- регенерацији ткива (хрскавице, možданог, миокардиалног, нервног, јетре),
- инкапсулацији и трансплантацији ћелија,
- системима доставе лекова и ензима.

2.3.1.5. Хитозан

Хитозан је линеарни полисахарид, структурно сличан гликозаминогликанима. Добија се из хитина. Генерално је нерастворљив у неутралним условима, али се лако раствара у присуству киселине, због протонације (додавања протона атому) слободних амино група на глюкозамину. У међувремену, многи деривати хитозана су направљени са побољшаном растворљивошћу и могућношћу процесовања. Метални катјони могу се адсорбовати на амино групе хитозана кроз хелацију (врста јонске везе), у неутралним условима. Хитозан је одобрен као нетоксичан за оралну примену код људи, од стране Управе за храну и лекове САД-а и добро је истражен за разне примене у биомедицини. Хитозан може да формира хидрогел путем различитих метода јонског и хемијског крослинкинга.

Примењује се у:

- регенерацији ткива (коштаног, хрскавице, крвних судова, нерава, миокардиалног, јетре, интервертебралних дискова),
- инкапсулацији и трансплантацији ћелија,
- системима доставе лекова, протеина, фактора раста, гена, антибиотика,
- зарастање рана,
- лечењу канцера плућа и јетре,
- имуноинжењерингу.

2.3.1.6. Декстран

Декстран се од сахарозе добија помоћу бактерија или се хемијски синтетише. То је полисахарид са одређеним степеном рачвања, који је добро растворљив у води. Клинички је коришћен већ више од 5 деценија за повећање запремине плазме, подстицање периферног протока и против тромбозе. Декстран има одличну стабилност током пролонгираног складиштења под благим киселим и базним условима. Присуство велике количине хидроксилних група омогућава дериватизацију и накнадни физички и хемијски крослинкинг и добијање хидрогела.

Може се применити за:

- регенерацију ткива (хрскавице, коже, крвних судова, нерава),
- инкапсулацију и трансплантацију ћелија,
- системе за доставу лекова, протеина, фактора раста, липосома, антибиотика, ћелија,
- зарастање рана,
- лечење канцера дојке.

2.3.1.7. Гелан гума

Гелан гуму производе бактерије аеробичном ферментацијом. Гелан гума је линеарни екстрацелуларни полисахарид (егзополисахарид), добро растворљив у води. Може да се подвргне термално реверзибилној транзицији из завојнице у двоструки хеликс, а скуп таквих молекула формира „зоне спајања“. Овај конформациони прелаз је предуслов за гелирање. Температура прелаза је око 30 °C и на њу јако утиче, не само концентрација гелан гуме, него и присуство катјона у воденом раствору. Гелирање у води може да се изазове катјонима (алкалних и земноалкалних метала, тетраметиламонијумом Me_4N^+) или без додатних соли, али са повећаном концентрацијом полимера. Када се додају катјони, гелирање гелан гуме зависи од идентитета катјона, али и од концентрације јона. Генерално, хидрогел на бази гелан гуме се може добити са концентрацијом од само 0.04 до 0.05 % (w/v) у воденом раствору. По додавању двовалентних катјона, овај садржај се може даље смањити. Ови хидрогелови су јако бистри, чак и са садржајем шећера 15%. Тачка топљења хидрогела може бити или изнад или испод 100 °C, што дозвољава и дизајн хидрогела резистентног на повишене температуре и хидрогела који је течан током производње. Гелан гума има добру компатабилност са другим гумама и полимерима и може се лако мешати са њима. Поред основне гелан гуме, постоје 3 модификована типа:

1. делимично деацетилисана гелан гума, од које се добијају термореверзибилни хидрогелови, који нису крти и прилично су мекани и еластични;

2. високо деацетилисана гелан гума, од које се добијају чврсти и крти хидрогелови;
3. јако бистра гелан гума.

Може се применити за:

- регенерацију ткива (хрскавице, костију, крвних судова, масног ткива, нерава, интервертебралних дискова, кичмене мождине),
- инкапсулацију ћелија,
- системе за доставу лекова, протеина, пептида, антибиотика и ензима.

2.3.1.8. Хондроитин сулфат

Хондроитин сулфат, главна компонента агрекана, је линеарни гликозаминогликан растворљив у води, који се ковалентно везује за протеине, чиме настају протеоглигани, којима је богата зглобна хрскавица. Хондроитин сулфат може да стимулише метаболички одговор ткива хрскавице. Може да игра велику улогу у развојним процесима и да буде укључен у ћелијско препознавање, повезивање компоненти ванћелијског матрикса за гликопротеине на омотачу ћелије и интрацелуларне сигналне функције разних фактора раста. Из тог разлога, хондроитин сулфат је широко истражен обећавајући биоматеријал за биомедицинске примене. Хидрогелови на бази хондроитин сулфата се могу добити физичким и хемијским крослинкингом.

Може се применити за:

- регенерацију ткива (хрскавице, костију, нерава, кичмене мождине),
- системе за доставу лекова, фактора раста, антибиотика, гена, протеина,
- зарастање рана,
- третирање артритиса.

2.3.1.9. Хепарин

Хепарин, који се налази у мастоцитима (ћелије везивног ткива), је линеарни високо сулфонирани гликозаминогликан, који има претежно спиралну структуру. Има највећу густину негативног наелектрисања од познатих биолошких макромолекула, због свог високог садржаја негативно наелектрисаних сулфо и карбоксилних група. Хепарин може да се везује за факторе раста, ензиме, протеине крвне плазме и протеине ванћелијског матрикса. Од свог открића, хепарин се широко клинички примењује као антикоагулант. Модификација биоматеријала хепарином се обимно спроводи за смањење тромбогености и

достављање лекова. Системи за достављање на бази хепарина су се показали повољно за достављање лекова на бази протеина, на пример фактори раста. Осим за модификацију биоматеријала, хепарин се у скорије време користи и за формирање хидрогелова. Његова способност везивања за катјонске полимере и базне пептиде подстиче саомонтажу хидрогела.

Може се применити за:

- регенерацију ткива (хрскавице, костију, јетре, крвних судова, бубрега),
- инкапсулацију ћелија,
- системе за доставу лекова, фактора раста, протеина,
- зарастање рана,
- лечење канцера (дојке, модели тумора),
- имуноинжењеринг.

2.3.1.10. Хијалуронска киселина

Хијалуронска киселина (хијалурон) је линеарни несулфонирани гликозаминогликан, који се може наћи у скоро сваком ткиву у кичмењацима. У телу, хијалуронска киселина се може деградирати слободним радикалима или ензимом хијалуронидазом, након чега се подвргава ендоцитози (уношење у ћелију) и лизозомалном варењу. Хијалуронска киселина је активно укључена у многе важне биолошке процесе, као што су: регулисање ћелијске миграције, пролиферација, диференцијација, ангиогенеза (раст нових крвних судова из постојећих) и организација ванћелијског матрикса. Хијалуронска киселина је круцијална за метастазу (ширење канцера из једног органа на друге), инфламацију, зарастање рана и обнављање ткива. Хијалуронска киселина и њени деривати се користе већ деценијама као медицински производи и све више су препознати као важни саставни део производње функционалних биоматеријала за инжењеринг ткива и регенеративну медицину.

Може се применити за:

- регенерацију ткива (хрскавице, коштаног, миокардиалног, интервертебралних дискова, јетре, нерава, мрежњаче, кичмене мождине),
- системе за доставу ћелија, лекова, гена, фактора раста, протеина,
- третирање артритиса,
- зарастање рана,
- лечење канцера (тироидне жлезде, модели тумора).

2.3.1.11. Колаген

Колаген је јако заступљен протеин у сисарима и морским организмима. Налази се у костима, кожи, тетивама, рожњачи, лигаментима, цревима, крвним судовима и сачињава трећину укупног садржаја протеина у људском телу. Ова влакнаста протеинска структура састоји се од десностраног троструког хеликса, који чине три паралелна левострана полипептидна ланца. Структура колагена показује повољне механичке карактеристике. Колаген је, углавном, растворљив у киселим воденим растворима и може бити процесиран у различите форме, на пример: прах, листови, тубе, пена, сунђер, хидрогел. Колаген је преовлађујућа компонента ванћелијског матрикса и одржава његов структурни и биолошки интегритет. Стога, биоматеријали на бази колагена могу створити микроокружење које имитира ванћелијски матрикс, што је повољно за промовисање разних функција ћелије, као што су: адхезија, миграција, ширење, пролиферација, диференцијација итд. Развијене су разне методе крослинкинга како би се оптимизовале карактеристике за широк спектар биомедицинских примена.

Може се применити за:

- регенерацију ткива (хрскавице, кичме, мозга, јетре, нерава, бубрега, миокардиалног, коже, тетива, крвних судова),
- системе за доставу лекова, фактора раста, пептида, протеина, антибиотика,
- зарастање рана,
- лечење канцера (модел тумора).

2.3.1.12. Желатин

Желатин је класа протеинских супстанци, које се добијају из протеина колагена путем топлотне денатурације и процедура парцијалне хидролизе, након чега задржава биоактивне секвенце колагена, што омогућава промовисање функција ћелије, као што су: адхезија, миграција, пролиферација и диференцијација. Не само што је безбедан за прехранбену употребу, желатин је широко примењен у фармацеутској индустрији и областима инжењеринга ткива и регенеративне медицине. Желатин може да формира физички хидрогел на температури испод 27 °C, али није стабилан на телесној температури, због реверзибилне термалне гелације, што се може превазићи различитим хемијским модификацијама и стратегијама ковалентног крослинкинга.

Може се применити за:

- регенерацију ткива (кости, хрскавице, рожњаче, мрежњаче, миокардиалног, коже),

- системе за доставу лекова, гена, фактора раста, пептида, протеина,
- лечење канцера (желуца, модели тумора) (Li et al. 2020).

2.3.1.12.1. Порекло желатина

Желатин је биоразградив полипептид добијен парцијалном хидролизом колагена, влакнастог протеина, који се претежно налази у везивним ткивима. Важна функција колагена је одржавање интегритета везивних ткива, као што су кости, хрскавице, рођаче, крвни судови, тетиве, лигаменти и дентин. Постоји око 16 типова колагена у људском телу, а најзаступљенији су Тип I, II и III (колаген I, II и III), који чине од 80 до 90% колагена у телу. Тип I се најчешће састоји од три спирална полипептидна ланца – структура троструког хеликса.

2.3.1.12.2. Карактеристике желатина

Желатин је мешавина полипептида, у којој су око 20 врста аминокиселина повезане пептидним везама. Постоји неколико врста желатина различитог састава, у зависности од извора колагена и методе хидролизе. На пример, желатин добијен од сисара (свињски и говеђи) се у последњих неколико деценија широко експлоатише у регенеративној медицини. Ове врсте желатина имају полипептидне структуре налик људским. Насупрот томе, рибљи желатин има значајно нижу тачку топљења, нижу температуру гелирања, нижу термалну стабилност и вишу вискозност.

Процес хидролизе колагена I може се класификовати у три групе: физички, хемијски и ензимски. Прелажење колагена I у желатин може се описати у три фазе: предтретман сировог материјала, екстракција желатина и пречишћавање и/или сушење производа. Просечна дужина и молекуларна маса полипептида желатина зависе од порекла сировине, параметара процеса хидролизе (нпр. рН, температура и време) и методе предтретмана. Између индивидуалних ланаца желатина постоје јаке нековалентне интеракције као што су Ван дер Валс-ове силе, водоничне везе, као и електростатичке и хидрофобичне интеракције.

2.3.1.12.3. Карактеристике хидрогелова на бази желатина

За разлику од колагена I, који је растворљив у slabим киселинама, желатин је природни полимер растворљив у води, који може апсорбовати 5 до 10 пута своје тежине у

води. На повишеним температурама брзина растварања се повећава. Раствор желатина се понаша амфотерно (може реаговати и као киселина и као база), због присуства алкалних аминокиселина и киселинских функционалних група. Наелектрисање раствора желатина варира зависно од протокола третмана коришћеног за екстракцију желатина, што раствору желатина даје различите изоелектричне тачке (рН вредности на којима су амфотерни молекули неутрално наелектрисани).

Понашање раствора желатина зависи од неколико фактора, као што су: температура, рН вредност, концентрација и метод припреме. Типична карактеристика раствора желатина је способност гелирања на ниским температурама (око 20–30 °C), дакле, хлађењем се добија хидрогел. Приликом процеса сол-гел транзиције стварају се водонична, електростатична и хидрофобична веза, које се загревањем могу лако раставити – што хидрогелове на бази желатина чини термореверзибилним (термо-осетљивим), што омогућава да се контролисано штампа и слаже на основу CAD модела.

2.3.1.12.4. Хидрогелови на бази желатина за 3Д биопринтинг

Хидрогелови на бази желатина могу се штампати или као жртвовани (сакрифицијални) биоинк, који служи за креирање пора или канала, или као чврста конструкција у коју се смештају ћелије. Технологије 3Д штампе на бази екструзије напредовале су у коришћењу хидрогелова на бази желатина за производњу чврстих 3Д структура са бројним физичким, хемијским, материјалним, биолошким, физиолошким и клиничким функцијама. Мале промене у саставу хидрогела могу значајно да утичу на крајње карактеристике штампаног објекта.

Као што је већ поменуто, тачка топљења желатина је око 28 °C. Специјална термореверзибилна карактеристика хидрогелова на бази желатина је веома важна за технологију 3Д биопринтинга органа екструзијом хидрогела.

Пре процеса екструзије, помешају се ћелије и други биоматеријали (укључујући и биоактивне агенте), затим се штампају 3Д структуре са претходно дефинисаним унутрашњим и спољашњим тополошким карактеристикама. Постоји више фактора који одређују хидрогел за штампање, међу којима су механичке карактеристике хидрогела на бази желатина, које одређују да ли се одштампаном конструкцијом може исправно баратати ин витро и/или стабилно имплантирати ин vivo.

Генерално гледано, механичке карактеристике физички крослинкованих хидрогелова на бази желатина зависе умногоме од концентрације примарног раствора желатина. Затезна чврстоћа желатина, као термо-осетљивог полимера, нагло се смањује када се температура повећа изнад 28 °C. Крутост раствора желатина зависи од

температуре, али и од концентрације, рН вредности, присуства било каквих адитива, молекуларне структуре, вискозности и средње молекуларне масе. Стварање хидрогелова на бази желатина је процес физичког крослинковања. Механичке карактеристике физички крослинкованог хидрогела на бази желатина су јако слабе.

Истражени су разни приступи побољшања механичке чврстине и структурне стабилности, пре, током и након процеса 3Д биопрентинга. Један од ефективних приступа је физичко мешање. На пример, мешање желатина са метакрилатом (чиме се добија метакриламид/ желатин, GelMA), ефективно побољшава вискозност композитног (или хибридног) хидрогела. Повећан садржај желатина или GelMA побољшава принтабилност хибридних хидрогелова алгинат/ желатин или алгинат/ GelMA. Фотополимеризација GelMA са фотоиницијатором растворљивим у води и УВ-светлошћу може значајно повећати механичку чврстоћу композитних хидрогелова и тачност облика 3Д штампаних конструкција. GelMA хибридни хидрогелови су употребљени за 3Д биопрентинг костију, хрскавице, коже и крвних судова.

Други ефективни приступ је хемијско или биохемијско (ензимско) крослинковање полимерних ланаца. Полипептидни ланци молекула желатина могу се хемијски или биохемијски крослинковати, како би формирали веће макромолекуле. За ензимски крослинкинг користе се ензими тирозиназа и трансфераза, као и катализатор, на неутралној рН вредности и благим температурама. Од хемијских агената за крослинкинг хидрогелова на бази желатина користе се: алдехиди (нпр. глутаралдехид или глицералдехид), генипин, полиепоксиди и изоцијанати. Након хемијског крослинковања формирају се ковалентне везе, које обезбеђују релативно стабилну 3Д конструкцију. Међутим, неки хемијски агенти (или реагенси), као што су алдехиди, токсични су за ћелије. Потребан је опрез приликом употребе токсичних реагенаса са ћелијама, чак и ако су ћелије уграђене у хидрогел. Даље, треба бити свестан да велике количине токсичних реагенаса, као што су молекули глутаралдехида, глицералдехида и изоцијаната, могу бити ослобођени у телу и изазвати нежељене реакције током ин виво деградације хемијски крослинкованих хидрогелова на бази желатина (Wang et al. 2017).

2.3.1.13. Свила

Свила је важна класа протеинских материјала, широко коришћених од античких времена. Извори свиле укључују свилене бубе и пауке (паукова свила), који су обимно проучавани да би се разјаснио њихов процесни механизам и тако експлоатисале њихове карактеристике. Свила добијена од свилених буба се претежно састоји од протеина серицина и фиброина, што је показало велики потенцијал за широку примену у областима инжењеринга ткива и регенеративне медицине. Фиброин свиле добијен од свилених буба

је лако доступан протеин. Паукова мрежа (паучина) је направљена од композитне свиле, која углавном садржи два главна ампулатна спидроина (MaSp1 и MaSp2). Механичка жилавост влакна свиле је супериорна у односу на било које синтетичко влакно, које је тренутно доступно, укључујући Кевлар. Такође, паукова свила има највећу жилавост од свих типова свиле. Ипак, прикупљање спидроина је непрактично и изостаје својствена биоактивност, што су ограничења природне паукове свиле. Како би се ово превазишло, истраживачи су фокусирани на рекомбинантне протеине паукове свиле и полипептиде који су налик на свилу. Протеини свиле се могу обрадити како би се формирали хидрогелови, сунђери, пене, мреже, порозни скафолди, филмови/превлаке, као и влакна за различите биомедицинске примене.

Свила се може применити у областима:

- регенерације ткива (коштаног, хрскавице, грлића материце, интервертебралних дискова, панкреаса, нерава, крвних судова),
- система за доставу лекова, антибиотика, антитела, гена, фактора раста, протеина,
- зарастања рана,
- лечења канцера (дојке, глиобластома, неуробластома, модели тумора).

2.3.2. Хидрогелови на бази синтетичких полимера

Према типу методе синтетисања, синтетички полимерни хидрогелови могу да се поделе на:

1. хомополимерне хидрогелове, који се састоје од крослинкованих мрежа од једне врсте хидрофилног мономера,
2. кополимерни хидрогелови, који су створени крослинковањем два комономера (укључујући један хидрофилни),
3. мултиполимерни хидрогелови, који су формирано реакцијом три или више комономера,
4. интерпенетрантни полимерни хидрогелови, који настају формирањем првобитне мреже, а затим бубрењем других мономера, чиме се ствара нова мрежа.

2.3.2.1. Полиакриламид

Полиакриламидни (РААм) хидрогел се може синтетисати коришћењем мономера акриламида (ААм) у воденом раствору са додатком N,N'-метиленбисакриламида (МВААм, агент за крослинковање), амонијум персулфата (APS, фото/термални

иницијатор) и N,N,N',N'-тетраметилетилендиамин (TEMED, акцелератор крослинковања). PAAm хидрогел игра важну улогу у биомедицини у проучавању ћелијских механизма, као и пластичној и естетској хирургији, на пример филери меких ткива и материјали за аугментацију.

Области примене:

- системи за доставу лекова,
- зарастање рана,
- корекције лица,
- јонски сензори ,
- истегљива и компресибилна електроника,
- актуатори и вештачки мишићи.

2.3.2.2. Поли (N -изопропилакриламид)

Поли (N -изопропилакриламид) (PNIPAAm) је хемијски изомер поли-леуцина, који има поларну пептидну групу у бочном ланцу, а не у главном ланцу. PNIPAAm је најистраженији синтетички одзивни полимер, који трпи оштру транзицију завојница-глобула у воденом раствору на 32 °C (доња критична температура раствора), где долази до преласка из хидрофилног стања (испод доње критичне температуре раствора) у хидрофобно стање (изнад доње критичне температуре раствора). Када се водени раствор PNIPAAm загрева до температуре од 32 °C, полимер се таложи и јавља се фазно раздвајање. Тиме настаје двофазни систем, где глобуле полимера нису растворљиве у води. Ова температурно изазвана сол-гел транзиција је реверзибилни процес, према томе, формира се термореверзибилни/термоодзивни PNIPAAm хидрогел, што доводи и до термохромних, фотохромних и магнетохромних карактеристика. Доња критична температура раствора (32 °C) PNIPAAm хомополимера је јако близу људске телесне температуре (37 °C). Такође, доња критична температура раствора се може подешавати додавањем комомера, како би се постигла жељена температура, која може бити изнад или испод људске телесне температуре. Ово чини материјале на бази PNIPAAm полимера нарочито погодним у биомедицини.

2.3.2.3. Натријум полиакрилат

Натријум полиакрилат (акрилни полимер натријумске соли), натријумова со полиакрилне киселине (PAA) је анјонски полиелектролит са негативно наелектрисаним

карбоксилним групама у главном ланцу. Има широку примену у потрошачким производима, на пример козметика, пелене за бебе, производи за личну негу. Овај полимер може да упије количину воде чак 100–1000 пута већу од сопствене масе. Из тог разлога се користи за прављење суперупијајућих полимера.

2.3.2.4. Поли(етилен гликол)

Поли(етилен гликол) (PEG), познат и као поли(етилен оксид) (PEO), је један од најбиокомпатабилнијих и широко примењених синтетичких полимерних хидрогелова у медицини и биомедицини. PEG је веома хидрофилни полимер, који није разградив хидролизом и има високу растворљивости у води и многим органским растварачима. Познат је по својој одличној биокомпатабилности, јер је ефективно одбојан и према протеинској адсорпцији и ћелијској адхезији. Пошто PEG може да претрпи само одређени метаболизам у људском телу, цели полимерни ланци се пречишћавају кроз бубреге (молекулска маса <30 ku) или, напослетку, кроз јетру (>30 ku). Дакле, углавном, само полимери са молекулском масом <50 ku се сматрају применљивим у инжењерингу ткива и регенеративној медицини, да би се осигурало њихово комплетно избацивање из људског организма. Приликом сушења, PEG лако формира кристале. Тачка топљења зависи од молекулске масе ланца. На пример, на собној температури PEG 400 је вискозна течност, док су PEG 2000 и PEG 6000 материјали у чврстом стању, са тачкама топљења око 40 °C и 60 °C, респективно. Тачка топљења и температура стакластог прелаза су прилагодљиве код PEG мешавина са кополимера. Ова врста ефекта пластификације код PEG-а се може употребити за подешавање механичких карактеристика полимерних биоматеријала на људској телесној температури. Неки од широко коришћених хидрогелова базираних на PEG дериватима укључују: поли(етилен гликол) моноакрилат (PEGA), поли (етилен гликол) диакрилат (PEGDA), поли (етилен гликол) метакрилат (PEGMA) и поли(етилен гликол) диметакрилат (PEGDMA). Хидрогелови на бази PEG-а играју важну улогу у биомедицини.

Области примене:

- регенерација ткива (коштаног, масног, хрскавице, нервног, мишићног, рожњаче, бубрега, крвних судова),
- инкапсулација и експанзија ћелија,
- системи за доставу лекова, цитокина, протеина, фактора раста,
- зарастање рана,
- лечење канцера (модел тумора),
- биосензори.

2.3.2.5. Поли(винил алкохол)

Поли(винил алкохол) (PVA) је углавном синтетисан полимеризацијом винил ацетата. Његова хемијска структура је релативно једноставна. PVA је линеарни полимер, растворљив у води, хемијски инертан у многим органским растварачима и оптички транспарентан у области УВ светла. За широк спектар биомедицинских примена PVA се мора крослинковати у хидрогел. Могу се користити методе физичког, хемијског и крослинкинг радијацијом. На пример, PVA хидрогел се може произвести наизменичним циклусима замрзавања и одмрзавања, услед стварања кристала, што се сматра за најпожељнији приступ прављења PVA хидрогела без употребе токсичних хемијских агената за крослинковање. Третман замрзавања и одмрзавања чини да PVA раствор брзо кристалише и формира хидрогелну мрежу. Повећањем броја циклуса замрзавања и одмрзавања (старењем), додатна кристализација појачава првобитну мрежу PVA хидрогела. Овако физички крослинковани PVA хидрогел, еластичан и гумен по природи, има већу механичку чврстоћу од хидрогелова формираних хемијским крослинковањем и крослинковањем радијацијом. PVA хидрогелови имају добре механичке карактеристике и способност задржавања воде и омогућавају дуготрајно влажно окружење.

Области примене:

- регенерација ткива (коштано, хрскавица, менискус, нерви, крвни судови, гласне жице),
- системи за доставу лекова, гена, фактора раста, протеина,
- зарастање рана.

2.3.3. Композитни хидрогелови

Највећи недостатак једнокомпонентних природних или синтетичких хидрогелова је мањак чврстоће. Такви хидрогелови су механички слаби, фрагилни и крти. Дакле, одржавање и унапређење механичког интегритета је кључно питање у погледу материјала базираних на хидрогеловима, који се примењују у биомедицини. Са друге стране, суштински, људска ткива су композитни материјали који поседују анизотропне карактеристике и који се ослањају на улоге и структуре разних компоненти ткива, као што су колаген, еластин, кератин, хидроксиапатит итд. Да би се хидрогеловима заменила, опоравила или регенерисала ткива домаћина, хидрогелни материјали би требало истовремено да поседују одговарајући модул еластичности и чврстоћу. Ово се може постићи коришћењем стратегије композитних хидрогелова. Кроз штеловање пропорција и размештаја ојачавајуће фазе, карактеристике композитних хидрогелова могу се подесити да буду одговарајуће за механичке и физиолошке захтеве различитих ткива домаћина.

2.3.3.1. Полимерни композитни хидрогелови

Интерпенетрантне полимерне мреже (IPN) су јединствене „легуре“ крослинкованих полимера, међу којима је најмање једна мрежа синтетисана у присуству друге мреже. Мреже се држе заједно само помоћу трајног међусобног тополошког задирања, без ковалентних веза. Дакле, није могуће раздвојити их без раскидања самих мрежа. Интерпенетрантне полимерне мреже се могу поделити на:

1. секвенцијалне IPN хидрогелове, где се једна мрежа полимеризује и формира у присуству другог набубеног хидрогела,
2. истовремене IPN хидрогелове, где се мономери оба хидрогела мешају и синтетишу истовремено, али независно и не ометајући се међусобно.

Када једна мрежа садржи некрослинковани линеарни полимер, то је семи- IPN хидрогел, у супротном је комплетни IPN хидрогел.

Механички ојачани хидрогелови са дуплом мрежом (DN хидрогелови) су јединствени IPN хидрогелови, који показују импресивно нелинеарно повећање чврстоће и привлаче све већу пажњу у областима замене ткива, посебно за ткива која треба да имају носивост. DN хидрогелови имају добру жилавост, јачину на кидање, отпорност на хабање и висок садржај воде. У овим хидрогеловима, прва мрежа је чврсто јонски крослинкован хидрогел, која представља крути и крхки костур испреплетан другом мрежом, која је лабаво крослинкован неутрални хидрогел (меки и дуктилни полимер). Како би се постигла висока механичка чврстоћа, потребно је препарацију извршити тим редоследом.

2.3.3.2. Нанокмполитни хидрогелови

Органско-неоргански хибриди су свеprisутни у природи, као што су кости, зуби, седеф. Они се састоје од биомакромолекула (протеина) и неорганских наноматеријала (минерала). Недовољна чврстоћа полимерних хидрогелова је ограничила њихову примену. Како би се превазишло ово уско грло развијени су нанокмполитни хидрогелови, инспирисани природним материјалима. Нанокмполитни хидрогелови су механички ојачани материјали са широким спектром употребе на различитим пољима, као што су електроника, оптика, магнетизам, сензори и биомедицина. Нанокмполитни хидрогелови су 3Д органско-неоргански хибридни нанокмполити, формирани физичким или хемијским крослинкингом полимерних мрежа у воденом раствору заједно са функционалним неорганским наноматеријалима уграђеним у матрице.

2.3.4. Супрамолекуларни хидрогелови

Супрамолекуларна хемија се бави слабирм везама изван самих молекула, па су онда супрамолекуларни хидрогелови материјали крослинковани реверзибилним нековалентним супрамолекуларним интеракцијама, као што су π - π стекинг (нековалентна интеракција ароматичних прстенова), водонично везивање, метална координација, јонске интеракције и хидрофобичне интеракције. Супрамолекуларни хидрогелови могу да показују врло интересантне и значајне карактеристике, које потичу од њихове динамичне природе, на пример: биоадхезивност, самозацељење, одзив на стимулансе, адаптивност и молекулско препознавање. Добар пример је супрамолекуларни хидрогел на бази циклодекстрина са додатком модификоване хијалуронске киселине.

2.3.5. Хидрогелови са одзивом на стимулансе

Хидрогелови са одзивом на стимулансе су полимерне мреже са могућношћу активног одговора на широк распон стимуланаса из окружења, који могу бити светлосни, температурни, механички, али и ензими, глукоза, рН вредност итд. Један пример је термосензитивни хидрогел, који може да трпи реверзибилну сол-гел транзицију као одговор на промену температуре. То су, на пример: агароза, желатин, PNIPAAm, итд (Li et al. 2020).

2.4. Уређај за 3Д штампу меких материјала – биопринтер

2.4.1. Елементи и кретања

За штампање узорака од желатина користићемо уређај Tissue Scribe од произвођача 3D Cultures. Овај штампач користи софтвер отвореног кода (енг. open source software) и Г-код. Уређај има једну главу и користи стандардни шприц запремине 10 ml, са или без навоја на врху, у зависности од чега се бирају и игле. Овај уређај се може користити за штампање узорака од различитих материјала, као што су: желатин, алгинат, хитозан, колаген итд. Ограничење приликом избора материјала представља вискозност материјала. Велика вискозност материјала у комбинацији са малим пречником отвора игле може довести до отежаног штампања. Управљање се врши помоћу Г-кода, при чему датотеке Г-кода могу бити складиштене на microSD картици или на повезаном рачунару (USB

конекција). На слици 2 се могу видети: 1 – степ мотор, 2 – вијак Ø8mm, 3 – шприц 10 ml, на који делује притискивач, 4 – загрејана платформа, 5 – интерактивне контроле.



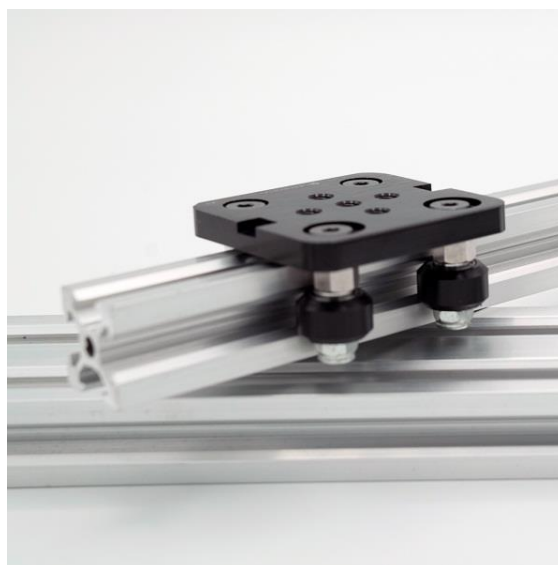
Слика 2 Основни елементи биопринтера Tissue Scribe

2.4.1.1. Транслаторна кретања

Одговарајући елементи све три осе координатног система биопринтера врше транслаторно кретање, како би млазницу, тј. отвор игле довели у тренутне координате прописане Г-кодом. Путање овог транслаторног кретања физички представљају линеарни елементи, који су, у случају овог уређаја, глатке линеарне шипке. Поред линеарних шипки, у конструкцијама 3Д штампача се могу видети и линеарне шине. Такве шине имају профилисане бочне стране, у које належу куглице, помоћу којих се носач креће на шинама (слика 3). Класична варијанта шина се прави од челика, али шине могу бити у виду алуминијумских профила, по којима се крећу точкови одговарајуће геометрије (слика 4) (Florian 2020).

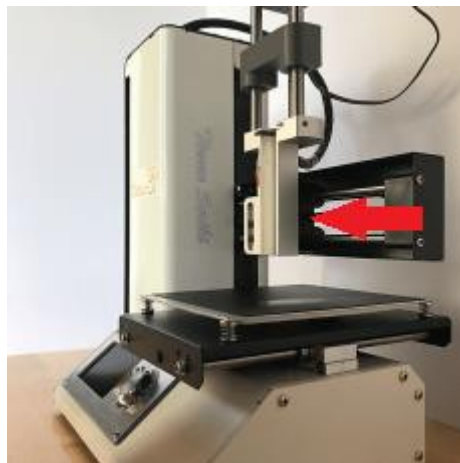


Слика 3 Шине са профилисаним бочним странама



Слика 4 Алуминијумски профили одговарајуће геометрије

У случају глатких шипки, неопходно је користити их у пару, како би кретање имало један степен слободе. У случају шина, кретање већ има само један степен слободе – носач се може померати само дуж профилисане шине, што није случај и са шипком кружног попречног пресека. Лежајеви се крећу дуж шипке, али се и okreћу око ње – дакле, постоје два степена слободе. Један степен слободе се елиминише додавањем паралелне шипке, па када се носач креће дуж обе нема ротације носача (Florjan 2020). Ово илуструје слика 5, на којој се види монтирани носач са цилиндричним прорезом за шприц.



Слика 5 Носач са цилиндричним прорезом за шприц

Овај носач се налази на X оси и задужен је за кретање шприца, а поред њега постоји још један, на Y оси, задужен за кретање платформе. Носачи на X и Y оси су погођени на исти начин – каишем, док је притискивач, на Z оси, погођен вијком. То су две врсте трансмисије присутне у овом уређају. Конструкција са зупчастим каишем има са једне стране степ мотор (тј. каишник који прихвата степ мотор), а са супротне каишник, који затеже каиш. Каишници морају да одговарају каишу по кораку, профилу и ширини. На каишу се налази и торзиона спирална опруга, која му додаје еластичности поред ограничења затезањем – „меко“ подешавање преко крутости опруге. Такође, опруга пригушује спољашње вибрације од разних извора.

Друга варијанта трансмисије је са вијком, по коме се креће навртка, а заједно са њом и притискивач. Изнад вијка се налази степ мотор, који се може видети на слици 2. Када би навртци била дозвољена ротација, обртала би се заједно са вијком, не би се транслаторно подизала нити спуштала. Међутим, навртка је смештена у притискивачу, са којим се креће по Z оси и не ротира. Ова конструкција се користи за Z осу јер нема тенденцију да падне под дејством гравитације, већ стоји у месту и када мотор не ради. Такође, вијак и навртка дају тачније кретање од каиша и каишника, али су спорији и скупљи. (Florian 2020).

2.4.1.2. Гранични прекидачи

Биопринтер, као и класични 3Д принтери, мора имати референтну локацију у односу на коју ће се одређивати тренутна позиција и даље кретање. Ова локација је координатни почетак (0,0,0), тј. минимум све три осе. Када се укључи напајање, принтер налази ове минимуме процесом нулирања, односно враћања у почетни положај, што се може постићи постављањем сензора на сваку осу, који се активирају када носач дође до

минимума. Ови сензори се зову гранични прекидачи. Постоје механички, оптички, магнетни и гранични прекидачи осетљиви на силу.

Механички се најчешће користе због једноставности и ниске цене (Florian 2020). Биопринтер, који описујемо у овом раду такође користи механичке граничне прекидаче, а на следећој слици је приказана позиција сензора на моделу принтера Monoprice Select Mini 3D Printer, који му је по конструкцији јако сличан.



Слика 6 Позиција сензора на моделу принтера Monoprice Select Mini 3D Printer

Механички прекидачи имају металну руку и опругу, као на слици 7. Када носач удари у металну руку, притисне се прекидач и отвара или затвара струјно коло, зависно од тога да ли је прекидач повезан да буде затворен или отворен у нормалном стању. Микроконтролер осети промену у том струјном колу и престане да окреће мотор.



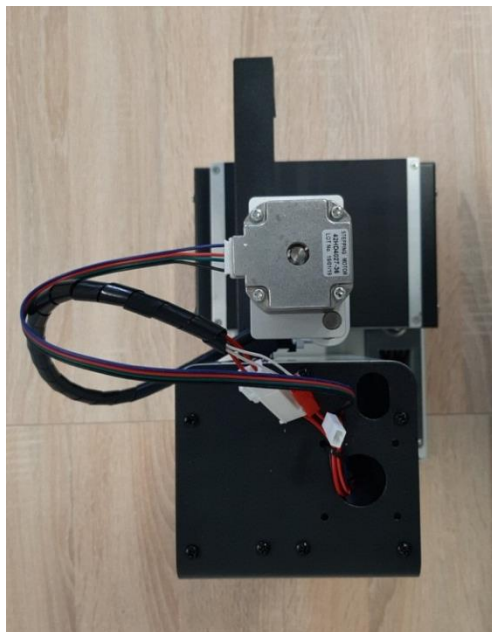
Слика 7 Механички прекидачи

Оптички имају светлећу диоду (LED) и фототранзистор и детектују обструкције на путањи светлости од диоде до транзистора. Безконтактни су, као и магнетни, који раде на принципу Холовог ефекта, тј. Холовог напона, који настаје када се полупроводник кроз

који тече струја унесе у магнетно поље. Гранични прекидачи осетљиви на силу су отпорници који мењају отпор приликом дејства силе. Као и код механичких, потребан им је физички контакт (Florian 2020).

2.4.1.3. Степ мотори

Степ мотор, или корачни мотор, је врста мотора, који се често користи у роботизи. Унутар степ мотора су два сета калемова (статор) постављених око озубљене осовине са трајним магнетом (ротор). Оба сета калемова припадају по једној фази, а сваки калем који припада истој фази ствара магнетно поље истог поларитета (Devijer 2011). Предност корачних мотора, у односу на моторе једносмерне струје, када су у питању 3Д штампачи, је позната позиција, односно број обртаја мотора. Број обртаја DC мотора не би био познат без употребе енкодера, док за степ мотор није потребан екстерни уређај. Кад се на степ мотор доведе струја/напајање он се не окреће слободно, већ има драјвер степ мотора, који секвенцијално шаље променљиву количину струје на жице степ мотора. Резултат тога је корачно обртање осовине мотора. Због довољно велике брзине, окретање може да делује континуално иако се састоји из појединачних корака. Хибридни корачни мотори комбинују дизајн са трајним магнетима и променљивим отпором и деле се на: униполарне и биполарне. Контролисање биполарних корачних мотора је компликованије, поготово са микростепингом, али униполарни мотори дају мањи обртни момент за исту величину мотора (Devijer 2011). Степ мотор који се види на слици 1. је биполаран, што се може препознати по томе што има 4 жице, док униполарни имају 5 или више жица. Следећа слика представља поглед поменутог мотора одозго.



Слика 8 Поглед мотора одозго

Величина корака зависи од броја зуба ротора, а сваки корак ротира осовину мотора за одређени број степени. За мотор ознаке NEMA 17 је то $1,8^\circ$ - значи, 200 корака чине пун круг. NEMA (енг. The National Electrical Manufacturers Association) 17 је ознака која би одговарала овом мотору. Степ мотор може да се окрене за цео корак или део корака, што се назива микростепинг.

Мана степ мотора је што троше струју независно од оптерећења, зато коришћење мотора веће снаге него што је неопходна није пожељно. Мотори NEMA 17 су најзаступљенији из разлога што имају добар однос између потрошње струје и снаге (Florian 2020).

2.4.1.4. Драјвер степ мотора

Драјвери степ мотора конвертују сигнале контролера у ротацију мотора, шаљући променљиву количину струје фазама мотора. Прво, софтвер познат као „слајсер“ претвара STL датотеку у Г-код. Када микроконтролер прочита Г-код, он одређује позицију млазнице и који степ мотори треба да се помере, да се дође до те позиције. Ту информацију даје драјверима степ мотора, кроз струјне импулсе (Florian 2020).

2.4.1.5. Микростепинг

Дељењем корака степ мотора на ситније кораке повећава се резолуција позиције осовине мотора. Микростепинг се постиже тако што драјвер степ мотора постепено преноси струју између две фазе, уместо да једноставно укључује и искључује фазе. Најчешће се корак дели на шеснаестине. Микростепинг повећава тачност и даје тиши рад штампачу (Florian 2020).

2.4.1.6. Елементи за бризгање

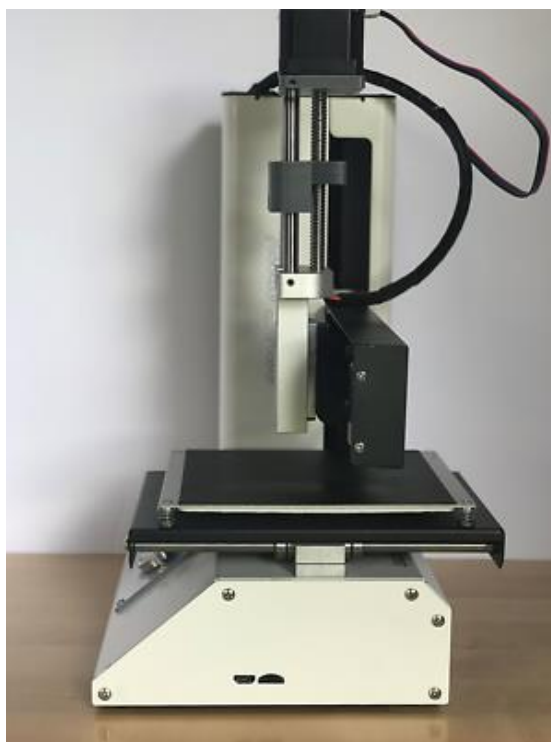
Оно што је млазница (енг. nozzle) код FDM (енг. fused deposition modeling) или FFF (енг. fused filament fabrication) принтера, то је код овог биопринтера шприц, са или без игле. Коришћењем игле, смањује се пречник отвора, кроз који излази материјал, а самим тим повећава резолуција штампаног дела. Игле се најчешће праве од нерђајућег челика. Шприц се налази у носачу посебног облика, који може да прими само шприцеве од 10 ml (као на слици 9). Носач шприца се загрева, што се може мерити термистором, где постоји аналогија са загревањем металног врућег краја код FDM принтера. Загрејани материјал се истискује дејством силе притискивача, који има улогу сличну погону екструдера код 3Д принтера који раде са пластичним филаментом.



Слика 9 Шприц у носачу посебног облика

2.4.1.7. Платформа

Платформа за штампање се, у ствари, састоји од две платформе – доње, која је везана за Y осу и горње, која је монтирана на доњу, помоћу 4 опруге превучене преко 4 вијка, тако да се може лако подешавати, јер горња платформа мора бити нивелисана (Devijer 2011) (на слици 10 се виде 2 од 4 вијка). Делови штампани на биопринтеру се најчешће штампају у Петријевој шољи, која се поставља на платформу за штампање, а не директно на платформи. Величина платформе знатно утиче на максималну величину штампаног дела. Такође, неопходно је да ширина платформе одговара дужини X осе.



Слика 10 Платформа за штампање

Ако постоји опасност од кривљења, односно витоперења дела услед неравномерне брзине хлађења, платформа се може загревати, помоћу елемента смештеног испод платформе. Неравномерно хлађење доводи до неравномерног стезања дела, што се манифестује подизањем угла штампаног дела од платформе. Кривљење није само естетски непожељно, утиче и на димензије дела (Florian 2020). Температура платформе се може мерити термистором, који се повезује на матичну плочу.

2.4.1.8. Матична плоча

Матична плоча овог биопринтера се налази испод платформе и не види споља. Све компоненте електронике су повезане на матичну плочу, на којој се налази и микроконтролер. Посао микроконтролера је извршавање команди кода. Микроконтролер говори драјверима степ мотора када и у ком смеру да помере моторе, али, такође, слуша и одговара на разне инпуте као што су измерене температуре или стање граничних прекидача. Одлучујући фактори приликом одабира матичне плоче су број компоненти као што су степ мотори, сензори, грејачи исл (Florian 2020).

2.4.1.9. Управљачки софтвер

Управљачки софтвер (енг. firmware) преводи садржај Г-кода у електричне сигнале, који активирају или деактивирају компоненте 3Д принтера. Када добије команду од Г-кода, рачуна на ком растојању се сваки од носача налази од захтеване позиције. Након одређивања смерова и растојања, микроконтролер шаље импулсе драјверима степ мотора. Да би претходно наведени редослед догађаја функционисао, неопходно је да управљачки софтвер разуме тачну конфигурацију принтера. Конфигурационе променљиве се налазе у специфичној датотеци за конфигурацију. Значајне информације за конфигурацију су: број екструдера, загревање платформе, локација граничних прекидача, трансмисија (пут који пређу носачи за један обртај мотора), максимална запремина штампаног дела, смер обртања мотора, максимална брзина мотора итд (Florian 2020).

2.5 Ограничења технологије биопринтинга

Упркос побољшањима у процесу биопринтинга, најновијим напретцима у технологијама биопринтинга и броју биопринтера представљених на тржишту, ове технологије и даље показују мноштво слабости. Ови проблеми морају бити решени, како би биопринтинг постао робустна и приступачна опција за израду функционалних ткива и будуће клиничке примене.

2.5.1. Ограничен избор комерцијално доступних биопринтера

Упркос великом напретку у комерцијализацији биопринтера, напори су у великој мери ограничени на биопринтере на бази екструзије са мало пажње посвећене на друге

технологије биопринтинга. Тренутно доступни биопринтери базирани на екструзији су прилично слични један другом, са малим варијацијама у њиховој функционалности и могућностима као што су: напредна аутоматизација у замени кертрица, могућност аутоматског пуњења и истискивања биоинка и различите софтверске могућности у погледу система за кретање. Иако је на тржишту велики избор инкјет принтера, већина њих је опремљена млазницом малог отвора, што није погодно за штампање ћелија сисара, које су просечног пречника 20–25 μm . Поред комерцијално доступних биопринтера, комерцијални 3Д принтери са архитектуром отвореног кода такође су корисни за истраживаче, јер неке истраживачке групе радије прилагођавају своје биопринтере на основу крајње употребе.

2.5.2. Дизајн кертрица и млазнице

Тренутне технологије имају проблем са дизајном кертрица и млазнице, јер је за успех биопринтинг процеса важно ефикасно пуњење и истискивање раствора биоматеријала. Многе верзије кертрица дозвољавају оператеру да унесе биоматеријал пре почетка процеса биопринтинга. Генерално гледано, ћелије држане у хидрогелу дужи временски период пре процеса биопринтинга имају лошу одрживост. NovoGen MMXTM биопринтер, приказан на слици 11, је превазишао овај проблем коришћењем система за наношење материјала са могућношћу аспирације (усисавања), који омогућава оператеру да унесе раствор у пипету аутоматски, помоћу механизма под притиском. Иако ово пружа побољшане услове за термореверзибилне материјале (нпр. агарозу) и делимичну флексибилност оператеру, систем се може лако запустити, посебно током процеса аспирације, чиме се ограничава примена на биоматеријале ниже вискозности (Ozbolat et al. 2017).



Слика 11 NovoGen MMX™ биопринтер

Поред функције аутоматског пуњења, млазница би требало да минимизира оштећења ћелија, као и да омогући високу резолуцију биопринтинга. Дакле, нови дизајн и избор материјала би требало да ублаже смицајни напон који се јавља. Направљена су побољшања у виду облагања млазнице стаклом или керамиком, као и дизајна у облику купе (Taylor cone). Иновативни приступи без млазнице, такође, могу служити за превазилажење ових проблема. Само ласерске и акустичне биопринтинг технологије имају конфигурације без млазнице, које олакшавају доставу ћелија без њиховог излагања смицајном напону.

2.5.3. Величина и брзина биопринтера

Генерално, сви биопринтери су дизајнирани да производе мале структуре, а заузимају велике радне просторе, што представља велики проблем у биопринтингу ткива – одржавање стерилности током процеса биопринтинга. Обрнуто томе, постоје биопринтери који су јако компактни, али не дозвољавају интервенцију оператера по потреби. Још једна од главних брига је брзина биопринтинга, како процедуре могу трајати сатима када се узму у обзир клинички релевантне димензије и број слојева, неопходних за конструкцију ткива. Овај проблем је још израженији у модалитетима на бази ласера или капљица, него код биопринтинга на бази екструзије. Такође, 3Д штампа меких материјала може бити проблематична, јер материјали, као што је хидрогел, не задржавају свој облик и подложни су отицању (натицању), избочењима и савијању током времена. Према томе, време

биопринтинга мора да се минимизира како би се превазишли ови типови проблема. Једно од могућих решења је повећање броја рука (тј. манипулатора) биопринтера, тзв. Multi-Arm BioPrinter концепт или коришћењем низа млазница закачених на једну руку, раздвојених на дистанцу приближну жељеној порозности, са могућношћу ротирања око z осе, како би штампале по x или y оси.

2.5.4. Недостатак пуне аутоматизације

Један од најбитнијих аспеката овог недостатка јесу сировине које се користе за 3Д штампу. На пример, материјали који се користе за класичну 3Д штампу су пластике, керамике и метали, који су, генерално гледано, у чврстом стању и пре и после процеса 3Д штампе и јако су стабилни. Насупрот томе, биоматеријали који се користе у биопринтинг процесима су у гел или сол-гел форми, које није лако обликовати у високој резолуцији и који не задржавају своју првобитну форму. Током процеса биопринтинга облик гела може лако колабирати, отећи или дехидрирати. Када се примени предвиђени план путање, проблеми могу настати ако је ниво штампања виши од горње површине конструкције (млазница се налази превише високо) или ако млазница долази у контакт са штампаним материјалом (млазница је превише ниско), што као резултат може имати деформисану конструкцију. У овом случају процес биопринтинга мора да почне из почетка. Овај проблем је још приметнији ако се штампа са више врста биоматеријала. Постоје процеси мониторинга, који се користе за детектовање висине биопринтоване конструкције и који информичу биопринтер у стварном времену. Упркос овим побољшаним технологијама, грешке се могу умножавати и утицати на свеукупни квалитет производа.

Широко примењени биоинк материјали, као што су алгинат и Pluronic F-127 имају способност побољшане биопринтабилности, али не промовишу раст и пролиферацију (множење) ћелија, зато се мање користе. Велики напори се улажу у развијање и евалуацију нових биоматеријала. Као резултат тога, мало је стандардизације у процесу биопринтинга и скоро сви биопринтери захтевају велику количину времена корисника за оптимизацију процеса.

2.5.5. Висока цена биопринтинга

Једна од лимитација биопринтинга је висока цена уређаја и процеса. Биопринтинг живих ћелија је скуп, поготово код приступа без скафолда, који захтева значајан број ћелија (реда 100 милиона ћелија) за генерисање узорка који је могуће штампати. Експанзија ћелијске културе захтева неколико месеци као и значајну конзумацију

реагенаса. Додатно, пошто је количина биоматеријала са ћелијском културом мала – оператер нема велику маргину за грешке у процесу биопринтинга. Укратко, експериментација у биопринтингу је изазовна, дуготрајна и скупа.

Такође, цена биопринтера је проблем јер је технологија и даље у зачетку, али, као што се то десило са класичним 3Д принтерима, највероватније ће доћи до пада цене. Тренутно, већина висококвалитетних, високоаутоматизованих и високорезолуционих биопринтера се налази у распону цена од 150 до 200 хиљада долара. Биопринтери на бази ласера нису комерцијално доступни, али систем може бити састављен за више стотина хиљада долара, зависно од способности. Приступачни инкџет биопринтер се може добити модификацијом комерцијално доступних инкџет принтера, али овакви биопринтери не подржавају штампање живих ћелија. Скупљи системи су комерцијално доступни за биолошке примене за 20 до 70 хиљада долара зависно од броја глава, резолуције и система аутоматизације. Настао је велики број стартап компанија, које би пружиле исплативе и приступачне биопринтере за истраживање и индустријску употребу. На пример, приступачни биопринтер са две главе и са могућношћу термалног и фотокрослинкинга се налази у ценовном рангу од 5.000 до 10.000 долара, али квалитет, резолуција и способност рада ових биопринтера су инфериорни у односу на карактеристике скупљих инструмената. Ипак, ови биопринтери се користе као алат за обуку истраживача.

2.5.6. Ниска резолуција процеса

Резолуција технологије биопринтинга је тренутно највећа препрека биопринтингу високо дефинисаних структура. Висока резолуција се не може добити у конструкцијама добијеним биопринтингом, због ограничења као што су нестабилност биоматеријала на бази хидрогелова и ограничења у величини млазнице, због проблема са запушавањем. Генерално гледано, процеси на бази ласера и капљица имају већу резолуцију од процеса на бази екструзије, који се најчешће користи. Највиша резолуција која је постигнута са биопринтером на бази екструзије износи 100 μm . Новије технологије, које омогућавају високе резолуције, користе материјале са микрочестицама, који се понашају као Бингамова пластика, тј. понашају се као чврсто тело у статичким условима под ниским смицајним напоном, а као вискозна течност под високим смицајним напоном. Уз помоћ ове способности, одштампани су скафолди високе резолуције за развијање разгранатих васкуларних конструкција и комплексних срчаних конструкција.

2.5.7. Недостатак компатибилних бионик материјала

Пошто изворна ткива и органи имају хетероцелуларну архитектуру, биоматеријали предвиђени за биопринтинг ткива требало би да подрже раст и диференцијацију различитих врста ћелија. Ипак, већина тренутно доступних материјала на бази хидрогелова нема такву карактеристику. Пошто свака врста ћелија захтева различити биоматеријал, оптимизација биоматеријала је изазовна. Додатно, биопринтабилност хидрогелова зависи од њихове способности да се стањују при смицању. Висока вискозност је пожељна са аспекта механичког и структурног интегритета, али не подржава одрживост и пролиферацију ћелија. Такође, хидрогелови не подржавају међусобни контакт ћелија, ако су ћелије имобилисане и изоловане једна од друге. Дакле, бионикови без скафолда могу бити корисни за штампање физиолошки релевантних ткива, али припрема, руковање и култивација ових конструкција може бити напорна и скупа.

2.5.8. Напредак у истраживању биопринтинга и инжењеринга ткива

Напредак у технологијама биопринтера зависи од прогреса у областима биопринтинга, биоматеријала и инжењеринга ткива. Напреднији биопринтинг процеси, који су практични са израду функционалних ткива, су пресудни за комерцијализацију ових технологија. Иако је много посла урађено на пољу биопринтинга, већина није циљала да створи функционална ткива, процењене су једино одрживост и краткорочна функционалност. Већина радова у овој области је ограничена на приступе базиране на скафолдима, који немају одговарајућу биомимикрију, док са друге стране, приступи без скафолда немају механички интегритет и крутост. Дакле, нове технологије су неопходне како би се створили модели, који су и механички и биолошки релевантни.

2.5.9. Ограничена клиничка примена

Велика већина напора у истраживању биопринтинга је уложена у области науке и малог броја тестирања на животињама. Преклиничка истраживања су круцијална за клиничку примену технологије, што ће, на послетку, захтевати да се биопринтинг технологије и њима добијена ткива и органи регулишу од стране Управе за храну и лекове (FDA), што захтева дугачак процес одобрења. Управе за храну и лекове (FDA) тренутно нема класификацију за биопринтере и њима добијена ткива. Због овог проблема, предузећа која се баве биопринтерима преферирају да производе инструменте који су више комерцијализовани (за тестирање лекова). Још једна препрека је мањак ткива која су

клинички релевантних величина и функција. Тренутни приступ је ограничен на мала ткива и моделе органа, због недостатка васкуларизације од артерија и вена па све до капилара. Додатно, постоје етичка, социјална и регулаторна питања, која се тичу трансплантације ткива и органа добијених биопринтигом, као и проблеми механичке чврстоће и стабилности ткива, дугорочне функционалности у телу, имуног одбацивања, урезивање и инервација са ткивима и органима домаћина (Ozbolat et al. 2017).

3. Оптимизација параметара биопринтинга

Битне карактеристике тродимензионалног биопринтинга су одрживост ћелија и геометријска тачност, које обе зависе од карактеристика одабраног биоматеријала и на њих утичу параметри биопринтинга. У параметре штампе спадају: температура млазнице, време трајања процеса, притисак под којим се наноси материјал, брзина штампе и пречник отвора млазнице. Сви ови параметри директно утичу на прецизност и тачност наношења биоматеријала. Ови параметри, такође, директно утичу на одрживост ћелија, јер они одређују смицајне силе у биоматеријалу у току процеса биопринтинга. Повећање пречника млазнице смањује смицајни напон, чиме смањује оштећење ћелија, али се зато смањује и резолуција. Повећање притиска има сличан ефекат као и смањење пречника млазнице, што има још већи негативан утицај на ћелије.

Дакле, приликом биопринтинга са хидрогеловима, потребно је много напора да се утврде оптимални параметри, који су потребни да се осигура успешан принтинг. Једноставна метода процене резултата различитих параметара, као и стандардизована мерења за упоређивање тачности и разумевање грешака, потребни су, као и у свим другим пољима истраживања (Webb, Doyle 2017).

3.1. Индекс оптимизације параметара

Веза између тачности и смицајног напона и њено разумевање, су јако важни за оптимизацију параметара принтинга. Тачност је директан резултат геометрије линија добијених биопринтигом и одређује се експериментално. Међутим, смицајни напон се везује за динамику флуида хидрогела, који тече кроз танку млазницу (проток кроз цев), а пожељно је да вредност смицајног напона у току процеса буде ниска. Дакле, из механике флуида знамо да смицајни напон у течности, која тече кроз праву цев, зависи од притиска, при чему повећање притиска изазива повећање смицајног напона. Са друге стране,

повећање пречника млазнице смањује градиент брзине и тиме смањује смицајни напон. Ове релације су основа процеса одабира параметара за биопринтинг.

Ови параметри су употребљени за развијање индекса оптимизације параметара (Webb, Doyle 2017). Индекс оптимизације параметара, IOP, тежи да максимално повећа тачност, T , и да доведе теоријски смицајни напон, τ , на минималну вредност, кроз континуални процес оптимизације. IOP се рачуна према формули:

$$IOP = T \cdot \frac{1}{\tau} \quad (1)$$

Тачност је обрнуто пропорционална дебљини линије, d_l .

$$T \sim \frac{1}{d_l} \quad (2)$$

Пошто се τ не може лако добити експериментално, може се минимизирати само подешавањем релација параметара. Дакле, најмања вредност τ се добија смањивањем притиска и повећањем пречника млазнице.

$$\tau \sim \frac{1}{p} \cdot D \quad (3)$$

$$\tau \sim \frac{D}{p} \quad (4)$$

Мера млазнице, односно промер игле, (енг. gauge), D_g је величина обрнуто пропорционална пречнику млазнице. Одатле следи:

$$\tau \sim \frac{1}{D_g \cdot p} \quad (5)$$

Дакле, у низу експеримената, користећи исти биоматеријал, IOP се може изразити као:

$$IOP = \frac{1}{d_l \cdot D_g \cdot p} \quad (6)$$

IOP одређеног биоматеријала се може нормализовати преко низа параметара принтинга, релативно максималном IOP из низа експеримената.

$$IOP_p = \frac{IOP_p}{IOP_{MAX,n}} \quad (7)$$

Где p у индексу означава појединачни сет параметара, а MAX, n означава експериментално одређени максимум, где је n је број тестираних комбинација параметара. Максимални нормализовани IOP је у корелацији са сетом параметара, који даје максималну тачност уз минимални теоријски смицајни напон (Webb, Doyle 2017).

Под претпоставком да је раствор у шприцу идеалан нестишљив флуид, можемо да применимо Бернулијеву једначину, која гласи:

$$P + \frac{1}{2}\rho v^2 + \rho gh = const \quad (8)$$

где је:

P -апсолутни притисак,

ρ -густина раствора,

v -брзина течности,

g -гравитационо убрзање и

h -висина.

или:

$$P_1 + \frac{1}{2}\rho v_1^2 + \rho gh_1 = P_2 + \frac{1}{2}\rho v_2^2 + \rho gh_2, \quad (9)$$

где 1 у индексу означава да се ради о вредностима величина на месту где је течност у додиру са клипом (притискивачем) шприца, а 2 у индексу означава место где течност напушта врх игле.

Како је познато да је притисак на излазу из врха шприца, односно врха игле, једнак атмосферском притиску и да се за референтну раван може узети било која раван ($h_1 = 0, h_2 - h_1 = h$), следи:

$$p + \frac{1}{2}\rho v_1^2 = \frac{1}{2}\rho v_2^2 + \rho gh. \quad (10)$$

Из једначине континуитета за нестишљиве флуиде, $A_1 \cdot v_1 = A_2 \cdot v_2$, следи:

$$v_2 = \frac{A_1 \cdot v_1}{A_2}. \quad (11)$$

Где је површина A_1 површина чела клипа, односно површина попречног пресека шприца (без дебљине шприца), која се може израчунати мерењем унутрашњег пречника шприца (нпр. помичним кљунастим мерилом), ако пречник није већ познат. Површина A_2 је површина попречног пресека игле, која се може израчунати помоћу пречника отвора игле, који је наведен од стране произвођача.

Брзина v_1 је једнака брзини клипа шприца, која се може одредити мерењем, на пример, за које време се клип спустио од једне маркације на скали шприца до следеће. Како је потребно да биоштампа буде уједначена, брзина исискивања је константна, што не треба мешати са брзином кретања шприца/млазнице у простору.

Висина h је позната величина – збир дужине игле и висине до оне маркације на скали шприца до које се пуни материјал, што се унапред задаје према предвиђеној количини материјала за штампу.

Густина раствора у шприцу ρ се, такође, може измерити. Маса раствора једнака је разлици масе пуног и празног шприца, док се запремина читава са самог шприца.

Преостаје само да се из једначине одреди притисак p , и унесе у једначину за ИОР.

3.1.1. Ограничења примене индекса оптимизације параметара

Постоје ограничења индекса оптимизације параметара, зато што се предпоставља да се температура одржава на константној вредности током процеса принтинга, што није неразумно, али је тешко постићи без стриктне контроле. Промена температуре утиче на резултате штампања и на тачност. Такође, претпостављено је да се течност креће кроз прав цилиндар, што значи да се индекс оптимизације параметара не може применити у случају млазнице коничног облика. У коничним млазницама, теоријски смицајни напон није константан дуж млазнице на константном притиску, што би, на неки начин, морало да се узме у обзир у индексу (Webb, Doyle 2017).

3.2. Принтабилност хидрогела

Појам принтабилности хидрогела се односи на везу између јако важних параметара биопринтинга, као што су: притисак, брзина истискивања (енг. feedrate), евентуално и размак од млазнице до платформе; и квалитета структуре добијене принтингом. На принтабилност хидрогела и резолуцију утичу: дифузија хидрогела у пресеку укрштених линија, деформација услед гравитације, неуниформна екструзија услед промене брзине

штампе, као и колапс и фузија суседних слојева, што може довести до нагомилавања грешака по вертикали и, у најгорем случају, неуспешног штампања. Даље ће бити описан утицај параметара на 1Д, 2Д и 3Д структуре.

3.2.1. Принтинг једнодимензионалних структура

Притисак приликом екструзије, је најважнији параметар за линијске структуре, јер одређује аутпут екструзије и директно утиче на ширину добијене линије. Притисак би требало да буде већи од површинског напона материјала у млазници. Вискозност одабраног биоматеријала највише утиче на потребан притисак. Мали притисци не могу истиснути материјал, док је превелики притисак узрок нестабилне екструзије, налик на џетинг.

Брзина истискивања материјала утиче на ширину линије – ширина линије се смањује са повећањем брзине истискивања материјала, што је последица претераног стањења услед смицања. Са порастом вредности брзине истискивања, линија се стањује до пуцања, односно прекида линије. Ширина линије требало би да буде једнака пречнику млазнице, али то у пракси није случај, јер долази до експанзије (ширења) линије након екструзије. Јако је важно да брзина истискивања материјала одговара притиску.

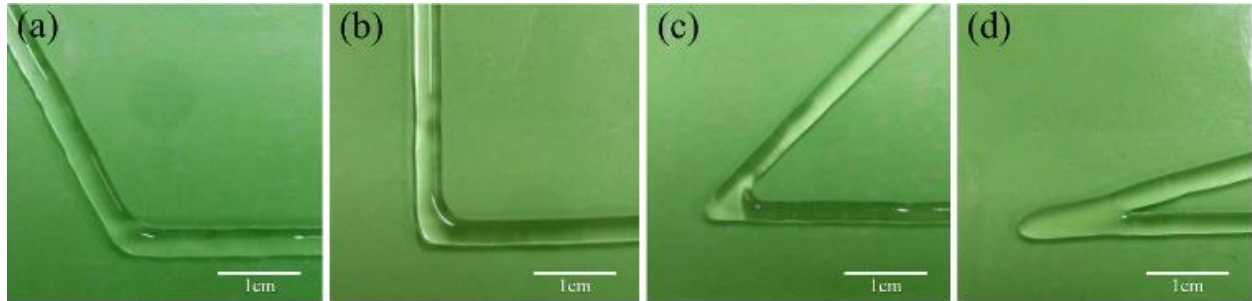
Размак од млазнице до платформе, принтинг дистанца, такође, утиче на ширину линије. Експериментално је показано да се повећањем принтинг дистанце повећава и ширина линије (He et al. 2016).

3.2.1.1. Оштри углови

Када се у једнодимензионалној структури јављају оштри углови долази до проблема са преклапањем, а најгори квалитет се добија у случају врло оштрих углова, што се може видети на сликама 12 (c) и 12 (d) (He et al. 2016). На местима где је дошло до преклапања налази се већа количина истиснутог материјала, што доводи до неједнакости у висини. Ако се ради о тродимензионалној структури, грешка у висини ће се акумулирати са сваком слојем, до отказа.

Две стратегије су могуће, како би се избегао овај проблем. Прва метода је избегавање оштрих углова приликом генерисања путање млазнице. Ипак, ако то није могуће, друга метода је смањивање брзине екструзије у спорној области упола. Ако се

екструзија врши помоћу мотора, брзина екструзије се може лако контролисати преко брзине мотора.



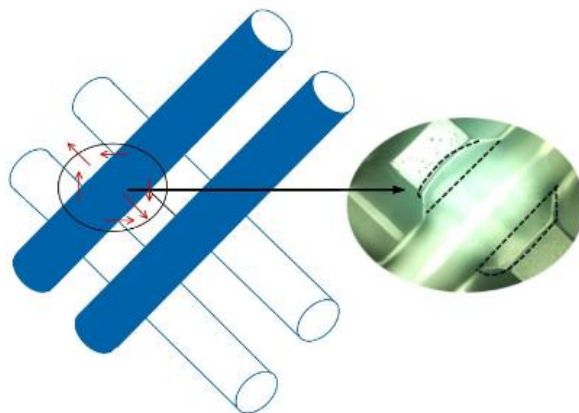
Слика 12 Преклапања код различитих углова, (a) тупи, (b) прави, (c) оштри, (d) јако мали угао

3.2.2. Принтинг решеткастог скафолда

Решеткасте структуре су широко примењене код разних типова скафолда. Као и код принтинга линија, и на принтинг решеткастих структура утичу брзина истискивања материјала, принтинг дистанца и притисак. Поред ових параметара, на квалитет добијене решетке утичу и размак између линија, као и површина у пресеку линија. Променљива која описује степен дифузије се може израчунати као:

$$\varphi = \frac{A_{Rt} - A_{Re}}{A_{Rt}} \cdot 100\%,$$

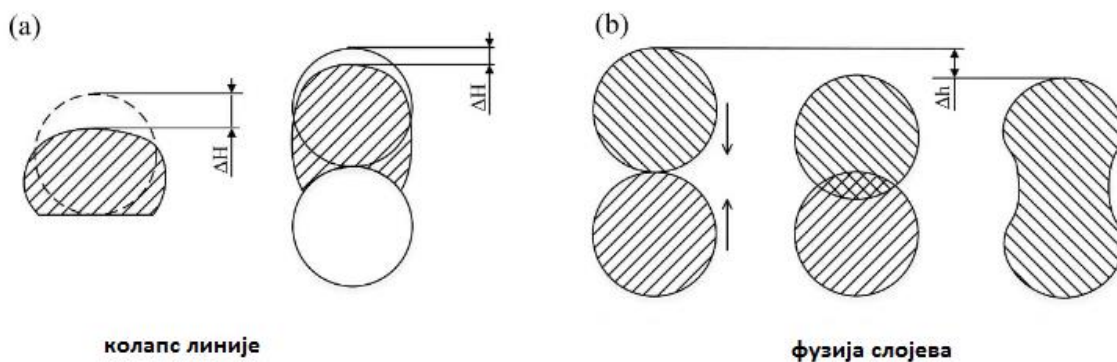
где је A_{Rt} површина ћелије решетке у теорији, која је правоугаоног облика, а A_{Re} експериментално добијена површина ћелије решетке, која се може описати као правоугаоник заобљених ивица. Повећањем растојања између правих линија, степен дифузије опада – долази до мањег заобљења углова. У пресеку линија хидрогела долази до преклапања услед гравитације, као на слици 13 (He et al. 2016).



Слика 13 Преклапање хидрогела

3.2.3. Принтинг тродимензионалних структура

Код 3Д структура висина слоја се не може одредити на основу висине линије првог слоја, као што је то могуће код 2Д структура где је то, уједно, и једини слој. Како је ширина линије шири од пречника млазнице, што је већ поменуто, одатле се може закључити да је онда висина линије мања од теоријске вредности (долази до спљоштавања или колапса линије, услед гравитације). Осим колапса линије, на висину слоја 3Д структуре, утиче и фузија (стапање) слојева. Смањење висине слоја услед фузије, Δh , је веће од смањења висине услед колапса линије, ΔH , као на слици 14 (He et al. 2016). На фузију утиче време између наношења два суседна слоја и температура хлађења. Код принтинга конструкција клинички релевантних величина, грешка висине услед колапса и фузије се мора узети у обзир.



Слика 14 Смањење висине услед (a) колапса линије, (b) фузије слојева

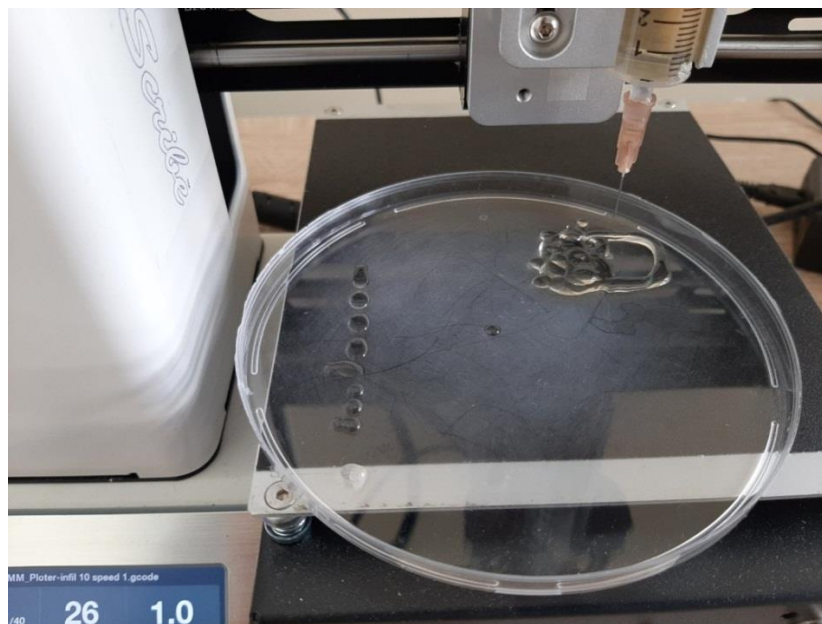
4. 3Д биопринтинг желатина – практичан рад у лабораторији

4.1. Резултати

Експеримент је изведен на 3Д биопринтеру Tissue Scribe, описаном у поглављу „Уређај за 3Д штампу меких материјала - биопринтер“. Узорци су штампани од хидрогела на бази желатина. Смеша за хидрогел је размере 15 gr желатина на 100 ml воде. Желатин, прехранбеног квалитета, помешан је са водом на собној температури, а затим је смеша загрејана на 45°C. За истискивање материјала коришћен је медицински шприц запремине 10 ml и стерилне игле ознака 25G (наранџаста, називног пречника 0,5 mm) и 26G (смеђа, називног пречника 0,45 mm), као на сликама 15 и 16. Г – код је добијен уз помоћ тзв. слајсера – софтвера отвореног кода, Cura. Температура платформе за штампање је подешена на собну, док је температура материјала у шприцу 37°C.



Слика 15 Штампање са иглом 25G



Слика 16 Штампање са иглом 26G

4.2. Дискусија

Поновљеним пробама се температура материјала од 37°C показала као оптимална температура за ову врсту биоматеријала. Хидрогелови на вишим температурама нису имали довољно времена да очврсну, тј. да се одигра сол – гел трансформација, пре штампања следећег слоја. Са друге стране, на нижим температурама, дошло би до претераног хлађења хидрогела у шприцу, што би изазвало проблем са запушавањем у игли и самим тим онемогућило даљи биопринтинг.

Приликом штампања иницијалне линије, иглом 26G, запажа се да је дошло до неравномерног наношења хидрогела, односно прекидања линије (слика 16). То указује на чињеницу да притисак у шприцу није био довољно велики да савлада површински напон капљице, као и да овај материјал нема погодна својства за биопринтинг на бази екструзије. Приликом рада са иглом 25G, узастопне капљице су падале довољном брзином да се постигне изглед континуалне линије (слика 17). Како би се избегло формирање капљица и добио континуални филамент, потребно је да материјал има довољно низак површински напон или довољно велику вискозност, што значи да успех штампе умногоме зависи од саме природе материјала и да ли материјал показује реолошко својство тиксотропије. Насупрот тиксотропичним, материјали који показују својство реопексије нису погодни за биопринтинг на бази екструзије, јер се вискозност оваквих материјала повећава током времена под дејством смицајних напона (Morgan 2020).



Слика 17 Континуална линија

У оба случаја, величина капљице хидрогела је значајно већа од димензије пречника игле, што је разлог неприхватљиво лоше резолуције резултата, што се може приписати неодговарајућем односу вискозности и пречника игле. Лошој резолуцији такође је допринела и, већ поменута, појава колапса линије. Интересантно, до фузије слојева тродимензионалног узорка није дошло. Напротив, након штампања било је могуће одвојити други од првог слоја 3Д структуре. Ово може бити последица превелике принтинг дистанце, која је допринела додатном хлађењу капљице у ваздуху. Такође, током процеса штампе, запажено је клизање капљица другог слоја по површини првог слоја, а потом хлађење и задржавање на погрешном месту (не на месту предвиђеном Г – кодом), што је узрок врло изражене дисторзије облика узорака.

5. Закључак

Много је напретка постигнуто на пољу адитивне производње и, конкретно, 3Д биопринтинга у последњих пар деценија. Развијене су и, и даље се непрекидно развијају, нове методе производње ткива и органа за трансплантацију и биомедицинска истраживања. Ипак, постоји потреба за развијањем нових технологија и нових

биокомпатабилних материјала, како би се брже и поузданије израђивала ткива клинички релевантних величина, са мнођжштвом врста ћелија и комплексном васкуларизацијом.

Морају се решити како практична, тако и правна и етичка питања, како би се 3Д принтинг технологије у будућности више користиле клинички и биле комерцијално доступне. Такође, недостатак стандардизације и утврђених протокола, код технологија које су још увек у фази развоја, за истраживаче значи јако напоран и дуготрајан посао оптимизације параметара на појединачном уређају са конкретним биоматеријалом. Потребно је додатно истраживање утицајних параметара и њихових односа на квалитет и резолуцију штампе, као и на одрживост и пролиферацију ћелија – што је ултимативни циљ имитације структуре ткива и органа.

Литература

Devijer S (2011), Building Your Own 3D Printer. https://www.academia.edu/download/39970071/Building_Your_Own_3D_Printer.pdf.

Пристапљено 16. маја 2020.

Florian D (2020) How to Build a 3D Printer. <https://www.drdflo.com/pages/Guides/How-to-Build-a-3D-Printer/FFF.html>. Пристапљено 16. маја 2020.

Guzzi EA, Bovone G, Tibbit MW (2019) Universal Nanocarrier Ink Platform for Biomaterials Additive Manufacturing. *Small* 15(51): 1905421 doi:10.1002/sml.201905421

Li J, Wu C, Chu PK, Gelinsky M (2020) 3D printing of hydrogels: Rational design strategies and emerging biomedical applications. *Materials Science and Engineering R* 140: 100543. doi:10.1016/j.mser.2020.100543

Wang X, Ao Q, Tian X, et al. (2017) Gelatin-Based Hydrogels for Organ 3D Bioprinting. *Polymers*. 9(9). doi: 10.3390/polym9090401.

Ozbolat IT, Moncal KK, Gudapati H (2017) Evaluation of bioprinter technologies. *Additive Manufacturing*. 13:179-200. doi: 10.1016/j.addma.2016.10.003

He Y, Gu Z, Xie M, et al. (2020) Why choose 3D bioprinting? Part II: methods and bioprinters. *Bio-des. Manuf.* 3, 1–4 doi: 10.1007/s42242-020-00064-w

Webb B, Doyle BJ (2017) Parameter optimization for 3D bioprinting of hydrogels. *Bioprinting*. 8:8-12. doi: 10.1016/j.bprint.2017.09.001

He Y, Yang F, Zhao H, et al. (2016) Research on the printability of hydrogels in 3D bioprinting. *Sci Rep*. 2016;6:29977. doi:10.1038/srep29977

Morgan FLC, Moroni L, Baker MB (2020) Dynamic Bioinks to Advance Bioprinting. *Adv Healthc Mater*. 9(15):e1901798. doi:10.1002/adhm.201901798