Проекционная стереолитография биосовместимых полимерных структур

Дж. Й. Джен, А. Н. Коновалов, В. К. Попов, Ю. Л. Ченг, Р. Шафикова

Исследованы процессы трехмерной печати пористых матричных структур для тканевой инженерии из биосовместимых полимеров методом проекционной стереолитографии. Определены пороговые значения доз излучения видимого диапазона, необходимые для устойчивой фотополимеризации жидких композиций на основе олигокарбонатметакрилата и полиэтиленгликоль диакрилата. Оптимизация параметров процесса стереолитографии позволила достичь пространственного разрешения трехмерной печати полимерных матриксов вплоть до 200 мкм. Методами оптической и сканирующей электронной микроскопии исследована внутренняя структура и морфология поверхности полученных образцов, а также проведен анализ соответствия их архитектуры исходным компьютерным моделям.

Ключевые слова: фотополимеризация, проекционная стереолитография, биосовместимые полимеры, трехмерная печать, матриксы для тканеинженерных конструкций.

Введение

Разработка новых материалов и методов для прецизионного изготовления индивидуальных имплантатов и матричных структур (матриксов) для тканевой инженерии на основе данных рентгеновской или ядерной магнитно-резонансной (ЯМР) томографии является сегодня одним из приоритетных направлений современного биомедицинского материаловедения, во многом определяющего успех решения широкого спектра задач реконструктивной хирургии и регенеративной медицины [1]. Максимальное приближение химического состава, биомеханических свойств, структуры, размеров и формы имплантата или матрикса к аналогичным характеристикам замещаемого ими дефекта обеспечивает их оптимальное "биологическое" поведение в зоне имплантации и эффективную регенерацию требуемых типов нативной ткани. Важнейшим элементом архитектуры матриксов для тканеинженерных конструкций является система взаимосвязанных пор определенного размера и количества [2].

В настоящее время наибольших успехов в решении проблемы изготовления таких биомедицинских изделий удалось достичь при использовании синтетических жидких, твердых и гидрогелевых поли-

мерных композиций с помощью, так называемых, аддитивных технологий (или технологий трехмерной печати), базирующихся на послойном синтезе твердых копий 3D компьютерных образов. Эти технологии позволяют оперативно и с высокой точностью (порядка 0,1 мм) изготавливать объемные структуры практически любой сложности на основе их CAD/CAM (Computer-Aided Design/Computer-Aided Manufacturing) данных [3].

Лазерная стереолитография (ЛС) является сегодня одной их наиболее развитых технологий аддитивного производства, широко используемых в различных областях науки, техники и биомедицины [4]. Она основана на процессах полимеризации обширного класса фотополимеризующихся композиций (ФПК), инициируемых с помощью различных видов лазерного излучения. Основными преимуществами ЛС являются высокое пространственное разрешение (~0,1 мм), точность воспроизведения и скорость изготовления изделий, а также большой выбор различных ФПК и оборудования для создания на их основе твердотельных объектов по их 3D компьютерным моделям [5].

В последние годы все большее развитие в мире получает новый метод стереолитографии, базирующийся на идее проекционного формирования

трехмерных структур, который в англоязычной литературе называется Direct Light Processing (или Digital Light Projection) — DLP [6]. DLP как и ЛС, относится к фотополимеризационным методам 3D печати, где объект создаётся из фоточувствительного материала путём его послойной полимеризации под воздействием УФ излучения. Метод DLP основан на световом проецировании на поверхность жидкой ФПК двумерного изображения (маски) для каждого индивидуального слоя изготавливаемого объекта. Для получения такого изображения, как правило, используют специальные матрицы из микрозеркал (Digital Micromirror Device — DMD), либо проекционные LCD (Liquid Crystal Display) матрицы.

В качестве источников излучения в DLP процессах сегодня применяют обычные цифровые мультимедийные проекторы, что существенно (в десятки раз) снижает себестоимость таких 3D принтеров по сравнению с традиционными лазерными стереолитографами. В отличие от лазерных установок, сканирующих поверхность полимеризуемого материала излучением одного или нескольких лазеров, DLP принтеры проецируют изображение для целого слоя до затвердевания ФПК, после чего наносится новый слой материала и проецируется изображение нового слоя цифровой модели. Основной проблемой DLP 3D печати сегодня является ограниченный выбор эффективных фотоинициаторов и, как следствие этого, ФПК для излучения видимого диапазона, определяемого, используемыми мультимедийными проекторами.

Цель настоящей работы — разработка и исследование процессов трехмерной печати пористых матричных структур для тканевой инженерии из биосовместимых ФПК методами проекционной стереолитографии с использованием как DMD, так и LCD матриц.

Материалы и методы

В качестве исходного олигомера для проекционной стереолитографии биостабильных матриксов-носителей для клеточных культур методом DLP с помощью DMD чипа использовали разработанную и исследованную нами ранее [7] биосовместимую композицию на основе олигокарбонатметакрилата — ОКМ-2 ("Репер-НН", Нижний Новгород) и 2 масс.% кетона Михлера (Sigma-Aldrich), который применяли в качестве фотоинициатора (рис. 1).

Для формирования биодеградируемых гидрогелевых 3D матриксов использовали полиэтиленгликоль диакрилат (ПЭГ-ДА) [8] с молекулярной

Рис. 1. Структурные формулы: a — олигокарбонатметакрилата, δ — кетона Михлера, ϵ — полиэтиленгликоль диакрилата, ϵ — фотоинициатора ТРО.

массой $M_{\rm w}=700$, (Sigma-Aldrich) (рис. 1*в*). Для инициирования процесса его фотополимеризации использовали фотоинициатор TPO $\rm C_{22}H_{21}O_{2}P$, Diphenyl (2,4,6-trimethylbenzoyl)-phosphine oxide (рис. 1*г*) (Chembridge International Corp.), имеющий полосы поглощения в области длин волн 320 – 420 нм (рис. 2).

В наших экспериментах по проекционной стереолитографии матриксов-носителей для тканевой инженерии из биосовместимых фотополимери-

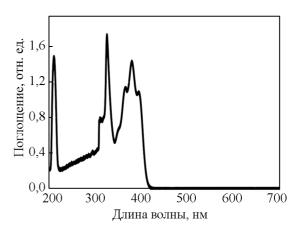


Рис. 2. Спектр поглощения фотоинициатора ТРО.

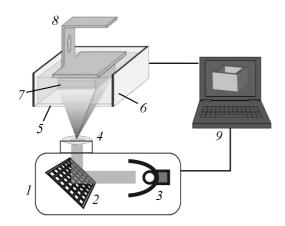


Рис. 3. Схема экспериментальной установки для формирования 3-х мерных структур методом проекционной трёхмерной печати: 1 — DLP проектор; 2 — DMD матрица; 3 — ртутная лампа; 4 — объектив для фокусировки изображения-маски; 5 — прозрачное окно дна контейнера; 6 — контейнер с фотополимеризующейся композицией; 7 — полимеризовавшиеся слои формируемой трёхмерной модели; 8 — рабочая платформа; 9 — компьютер.

зуемых композиций методом DLP мы использовали разработанную нами установку на базе 3D принтера B9Creator (производства "B9Creations LLC", США) (рис. 3). В качестве проекционного устройства, позволяющего получать четкое изображение отдельного слоя, применяли мультимедийный проектор I на основе чипа DMD 2 с разрешением 1920×1080 (производство "Texas Instruments", США). Для освещения DMD матрицы использовали ртутную лампу 3, излучающую в ближнем ультрафиолетовом и видимом диапазоне длин волн.

Проекционную печать матриксов-носителей для тканевой инженерии в наших экспериментах проводили согласно следующему алгоритму. В прямоугольный контейнер 6 (содержащий перемещаемую по оси Z рабочую платформу 8) с оптически прозрачным дном 5 наливали жидкую ФПК. Затем рабочую платформу погружали в контейнер с ФПК так, чтобы расстояние между поверхностью платформы и его дном-окном составляло величину, равную толщине слоя печати ($\sim 50-200$ мкм). Проецирование изображения индивидуального слоя осуществляли снизу через дно с помощью DMD проектора 1. При этом оптическая система 4 была настроена так, чтобы фокусировка излучения обеспечивала размер одного пикселя изображения не более 50 мкм. При облучении слоя ФПК изображением, формируемым DMD матрицей, в течение определенного промежутка времени происходила полимеризация и прикрепление этого слоя 7 к платформе в тех местах, где была засветка. После этого платформу поднимали на расстояние, равное толщине следующего слоя, и поверхность дна контейнера заполняли новой порцией жидкой ФПК. Затем происходило проецирование изображения следующего слоя и весь процесс повторялся циклически и последовательно до полного завершения печати всего трехмерного объекта. Управление всей работой 3D принтера (формирование изображения-маски для каждого слоя изготавливаемого объекта, вертикальное перемещение платформы на определенную величину с заданной скоростью и др.) осуществляли с помощью персонального компьютера 9.

Изучение морфологии поверхности и внутренней структуры полученных матриксов проводили методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) на микроскопе LEO 1450 (Карл Цейс, Германия). Для этого исследуемый образец, наклеивали на проводящую (углеродную) клейкую ленту, на которую затем методом плазменного напыления наносили тонкую ($\sim 0.05-0.1$ мкм) пленку золота, обеспечивающую требуемую электропроводность его поверхности.

Результаты и их обсуждение

Для отработки процесса трехмерной проекционной печати биосовместимых полимерных матриксов была создана компьютерная 3D модель (в STL формате (stereolithography)) решётчатого диска, имеющего сложную внутреннюю структуру, диаметром 7 мм и высотой 2,2 мм (рис. 4а). Внутренние перемычки имели диаметр 390 мкм. Исходную STL модель разбивали на слои заданной толщины, составлявшие серию изображений-масок, которые затем последовательно проецировали на поверхность жидких ФПК. Экспериментально исследованы возможности формирования такой 3-х мерной конструкции при толщине отдельного слоя от 50 до 100 мкм и продолжительности его экспозиции от 8 до 30 с.

Для повышения эффективности полимеризации ФПК в схеме использования коммерческого DMD мультимедийного проектора принтера В9Сгеатог был удален один из его светофильтров, отсекавший излучение с длинами волн короче 420 нм. Это позволило расширить спектральный диапазон излучения проектора в УФ область спектра вплоть до 380 нм (рис. 5), что, в свою очередь, ускорило время отверждения одного слоя ФПК (толщиной порядка 100 мкм) на основе ОКМ-2 более чем в три раза.

На рис. 46 и 4в приведены фотографии напечатанных матриксов из биосовместимых ФПК на

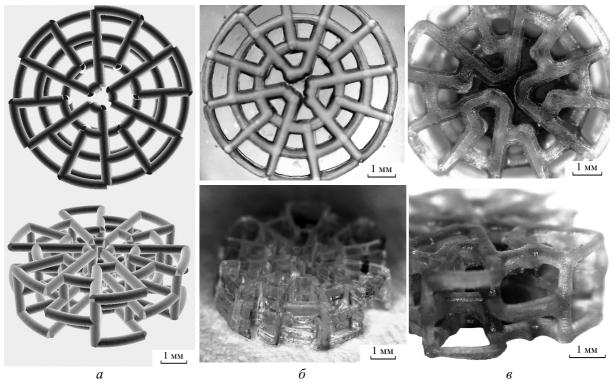


Рис. 4. Компьютерная 3D модель полимерного матрикса для проекционной 3D печати (a); фотографии 3D матриксов из биосовместимых: $\delta - \Pi \exists \Gamma \exists A$, $\delta - OKM$ -2, полученных методом 3D проекционной печати (виды сверху и сбоку); толщина одного слоя 55 мкм; время экспозиции: $\delta - \Pi \exists \Gamma \exists A - 10$ с, $\delta - OKM$ -2 – 17 с.

основе ОКМ-2 и ПЭГ-ДА, соответственно, а на рис. 6 показано СЭМ изображение последнего. Полученные образцы имели решетчатую структуру соответствующую исходной модели, моделирующую межклеточный матрикс. Образцы имели конечную высоту $2,2\pm0,1$ мм, а их диаметр составил $7,1\pm0,2$ мм. Это с высокой точностью (±200 мкм) соответствует их

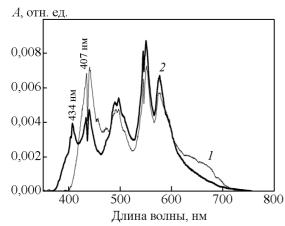


Рис. 5. Оптические спектры излучения лампы на выходе объектива DLP проектора: 1— спектр излучения при наличии светофильтра; 2— спектр без светофильтра; пик поглощения на длине волны 407 нм; пик поглощения на длине волны 434 нм.

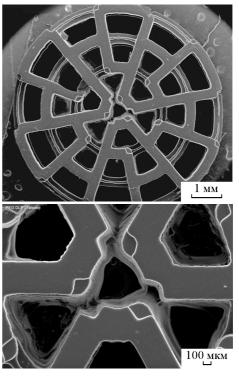


Рис. 6. СЭМ изображения 3D матриксов из биосовместимого ПЭГ-ДА, полученных методом 3D проекционной печати.

исходной компьютерной 3D модели (рис. 4). При этом диаметр внутренних перемычек для модели из $\Pi \Im \Gamma$ -ДА составлял 400 ± 20 мкм. Для образцов, полученных из ОКМ-2, толщина внутренних перемычек в плоскости ХУ находилась в диапазоне 360-600 мкм, а в вертикальном направлении их толщина лежала в пределах 360 - 700 мкм. Также поверхность полученных образцов имеет характерную периодическую структуру в направлении вертикальной оси Z, связанную послойным формированием 3-х мерного объекта. Отметим, что наилучший (с точки зрения как скорости формирования отдельного слоя, так и всего объекта в целом, а также соответствия его архитектуры исходной 3D компьютерной модели) результат по 3D печати матриксов был достигнут нами с применением биосовместимой композиции на основе ПЭГ-ДА. Этот результат, на наш взгляд, обусловлен тем, что фотоинициатор ТРО более эффективно (по сравнению с кетоном Михлера) поглощает излучение лампы проектора и стимулирует процесс радикальной полимеризации ПЭГ-ДА.

Выводы

Исследованы процессы формирования пористых матриксов для тканевой инженерии из биосовместимых ФПК на основе олигокарбонатметакрилата и полиэтиленгликоль диакрилата методом проекционной трехмерной печати.

Методами оптической и сканирующей электронной микроскопии исследована внутренняя структура и морфология поверхности полученных матриксов, а также проведен анализ соответствия их архитектуры исходным 3D компьютерным моделям.

Показано, что изготовленные методом DLP экспериментальные образцы полимерных структур с высокой точностью соответствуют изначальной сложной модели решётчатого диска.

Полученные результаты позволяют рассчитывать на то, что с помощью разработанного нами метода можно создавать биосовместимые трехмерные матриксы на основе ПЭГ-ДА и ОКМ-2 существенно более сложной архитектоники.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (грант № 14-25-00055, в части разработки экспериментальных подходов к трехмерной проекционной печати биосовместимых матриксов) и Российского Фонда Фундаментальных Исследований (проект № 14-02-92010 ННС_а, в части разработки новых ФПК для DLP).

Литература

- Atala A. Engineering organs. Curr. Opin. Biotechnol., 2009, v. 20, p. 575 – 592.
- 2. Попов В.К. Имплантаты в заместительной и регенеративной медицине костных тканей. В кн.: Биосовместимые материалы, под ред. В.И. Севастьянова и М.П.Кирпичникова. М.: МИА, 2011, с. 253 294.
- 3. Mota C., Puppi D., Chiellini F., Chiellini E. Additive manufacturing techniques for the production of tissue engineering constructs. J. Tissue Eng. Regen. Med., 2012, v. 9, p. 174 190.
- 4. Ferry P.W., Feijen J., Grijpma D.W. A review on stereolithography and its applications in biomedical engineering. Biomaterials, 2010, v. 31, p. 6121 6130.
- 5. Попов В.К., Евсеев А.В., Антонов Е.Н., Баграташвили В.Н., Коновалов А.Н., Панченко В.Я., Барри Дж.Дж., Уитакер М.Дж., Хоудл С.М. Лазерные технологии изготовления индивидуальных имплантатов и матриц для тканевой инженерии. Оптический Журнал, 2007, v. 74, p. 636 640.
- Gauvin R., Chen Y.C., Lee J.W., Soman P., Zorlutuna P., Nichol J.W., Bae H., Chen S., Khademhosseini A. Microfabrication of complex porous tissue engineering scaffolds using 3D projection stereolithography. Biomaterials, 2012, v. 33, p. 3824 – 3834.
- Popov V.K., Evseev A.V., et al. Laser stereolithography and supercritical fluid processing for custom-designed implant fabrication. J.Mater.Science: Mater.Med., 2004, v. 15, p. 123 – 128
- 8. Fairbanks B.D., Schwartz M.P., Bowman C.N., Anseth K.S. Photoinitiated polymerization of PEG-diacrylate with lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate: polymerization rate and cytocompatibility. Biomaterials, 2009, v. 30, p. 6702 6707.

References

- Atala A. Engineering organs. Curr. Opin. Biotechnol. 2009, vol. 20, pp. 575 – 592.
- Popov V.K. Implantaty v zamestitel'noy i regenerativnoy meditsine kostnykh tkaney [Implants in regenerative and replacement medicine of bone tissue]. In book: Biosovmestimye materialy [Biocompatible materials] ed. V.I. Sevastyanov, M.P. Kirpichnikov, 2011, Moscow, MIA Publ., pp. 253 – 294.
- 3. Mota C., Puppi D., Chiellini F., Chiellini E. Additive manufacturing techniques for the production of tissue engineering constructs. J. Tissue Eng. Regen. Med., 2012, vol. 9, pp. 174 190.
- 4. Ferry P.W., Feijen J., Grijpma D.W. A review on stereolithography and its applications in biomedical engineering. Biomaterials, 2010, vol. 31, pp. 6121 6130.
- Popov V.K., Evseev A.V., Antonov E.N., Bagratashvili V.N., Konovalov A.N., Panchenko V.Ya., Barry J.J., Whitaker M.J., Howdle S.M. Lazernye tekhnologii izgotovleniya individual'nykh implantatov i matrits dlya tkanevoy inzhenerii [Laser technology manufacturing of individual

- implants and matrices for tissue engineering]. *Opticheskiy Zhurnal Optical Journal*, 2007, vol.74, pp. 636 640.
- 6. Gauvin R., Chen Y.C., Lee J.W., Soman P., Zorlutuna P., Nichol J.W., Bae H., Chen S., Khademhosseini A. Microfabrication of complex porous tissue engineering scaffolds using 3D projection stereolithography. Biomaterials 2012, vol. 33, pp. 3824 3834.
- 7. Popov V.K., Evseev A.V., et al. Laser stereolithography and supercritical fluid processing for custom-designed implant fabrication. J.Mater.Science: Mater.Med., 2004, vol. 15, pp. 123 128.
- 8. Fairbanks B.D., Schwartz M.P., Bowman C.N., Anseth K.S. Photoinitiated polymerization of PEG-diacrylate with lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate: polymerization rate and cytocompatibility. Biomaterials, 2009, vol. 30, pp. 6702 6707.

Статья поступила в редакцию 27.01.2016 г.

Дж. Й. Джен — Национальный Тайваньский университет науки и технологии, Факультет Инженерии (г. Тайбэй, Тайвань, Килунг роад, 43, секция 4), профессор механической инженерии, декан, специалист в технологиях быстрого прототепирования, лазерной обработки материалов. E-mail: jeng@mail.ntust.edu.tw.

Коновалов Алексей Николаевич — Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем лазерных и информационных технологий Российской Академии Наук (142190, г. Москва, г. Троицк, Пионерская 2), кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник, специалист в области лазерных и аддитивных технологий. E-mail: alex_konov@mail.ru.

Попов Владимир Карпович — Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем лазерных и информационных технологий РАН (г. Троицк, Московская область), доктор физико-математических наук, заведующий лабораторией, специалист в области лазерных, аддитивных и сверхкритических флюидных технологий. E-mail: popov@laser.ru.

Ю.-Л.Ченг — Национальный Тайваньский университет науки и технологии, Факультет Инженерии (г. Тайбэй, Тайвань, Килунг роад, 43, секция 4), доцент, специалист в области быстрого прототепирования, прецизионного машиностроения, тканевой инженерии. E-mail: ylcheng@mail.ntust.edu.tw.

Шафикова Римма — Национальный Тайваньский университет науки и технологии, Факультет Инженерии (г. Тайбэй, Тайвань, Килунг роад, 43, секция 4), аспирант, специалист в области быстрого прототепирования. E-mail: rimmashaf@gmail.com.

Projection stereolithography of biocompatible polymer structures

Jeng-Ywan Jeng, A. N. Konovalov, V. K. Popov, Yih-Lin Cheng, R. Shafikova

The processes of porous matrix structures for tissue engineering 3D printed from biocompatible polymers by projection stereolithography have been studied. The threshold dozes of visible irradiation needed for sustainable photopolymerisation of liquid compositions based on olygocarbonatedimethacrylate and polyethylene glycol diacrylate were determined. Optimization of stereolithography process parameters enabled to achieve the spatial resolution of polymer matrix 3D printing up to the value of ca. 200 µm. Internal structure and surface morphology of fabricated samples were studied by optical and scanning electron microscopy, as well, as their correspondence to the initial computer models.

Keywords: photopolymerisation, projection stereolithography, biocompatible polymers, 3D printing, matrixes for tissue engineering constructions.

Jeng-Ywan Jeng — National Taiwan University of Science and Technology, college of Engineering (43 Keelung Road, Section 4, Taipei, Taiwan), Professor-Mechanical Engineering, Dean of college of Engineering, Research Field: OptoMechatronics, Rapid Prototyping, Rapid Tooling, Laser Material Processing. E-mail: jeng@mail.ntust.edu.tw.

Konovalov Alexey — Institute on Laser and Information Technologies (Russian Academy of Science, Pionerskaya 2, Troitsk, Moscow Region 142190, Russia), PhD., senior research fellow, Research Field: Lasers and Rapid Prototyping. E-mail: alex konov@mail.ru.

Popov Vladimir — Institute on Laser and Information Technologies (Russian Academy of Science, Pionerskaya 2, Troitsk, Moscow Region 142190, Russia), DrSci (PhysMath), head of the laboratory., Research Field: lasers, rapid prototyping and supercritical fluids technologies. E-mail: popov@laser.ru.

Yih-Lin Cheng — National Taiwan University of Science and Technology, college of Engineering (43 Keelung Road, Section 4, Taipei, Taiwan), Associate Professor, Research Field: Rapid Prototyping, Precision Manufacturing, Tissue Engineering, Micro Underwater Vehicles. E-mail: ylcheng@mail.ntust.edu.tw.

Shafikova Rimma — National Taiwan University of Science and Technology, college of Engineering (43 Keelung Road, Section 4, Taipei, Taiwan), graduate student, Research Field: Rapid Prototyping. E-mail: rimmashaf@gmail.com.