

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**3D nyomtatóval előállított implantátumok
biokompatibilitási vizsgálatai**

Dr. Arany Petra

Témavezető: Dr. Kovácsné Prof. Dr. Bácskay Ildikó



DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2021

Tartalomjegyzék

1.	RÖVIDÍTÉSEK	6
2.	BEVEZETÉS	9
3.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	11
3.1.	3D nyomtatás.....	11
3.1.1.	Elméleti alapok.....	11
3.1.2.	Típusai	11
3.1.3.	Korlátozó tényezők	14
3.1.4.	Alkalmazhatóság	15
3.1.5.	FDM nyomtatás.....	18
3.1.5.1.	Polimer filamentek	18
3.1.5.1.1.	Politejsav (PLA).....	18
3.1.5.1.2.	Antibakteriális politejsav (AntiPLA).....	19
3.1.5.1.3.	Polietilén tereftalát (PET)	19
3.1.5.1.4.	Polietilén tereftalát glikol (PETG).....	19
3.1.5.1.5.	Polimetil metakrilát (PMMA).....	19
3.1.5.1.6.	Nylon.....	19
3.1.5.2.	Nyomtatási paraméterek.....	20
3.2.	Implantátumok	21
3.2.1.	Elméleti alapok.....	21
3.2.2.	Előállítási lehetőségek.....	21
3.2.3.	Alkalmazás a gyógyászatban.....	22
3.2.3.1.	Szubkután beültethető rendszerek	22
3.2.3.1.1.	Szilárd implantátumok.....	23
3.2.3.1.2.	Folyamatos szubkután inzulinleadás.....	24
3.2.3.1.3.	In situ képződő implantátumok.....	24
3.2.3.2.	Intravaginális	25
3.2.3.3.	Intraoculáris.....	25
3.2.3.4.	Ortopédiában alkalmazható implantátumok.....	25
4.	CÉLKITŰZÉS.....	27
5.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	29
5.1.	Anyagok	29
5.1.1.	3D nyomtatáshoz felhasznált anyagok.....	29
5.1.1.1.	1. kísérletsorozat.....	29

5.1.1.2.	2. kísérletsorozat.....	29
5.1.2.	Kémiai módosításhoz felhasznált anyagok	30
5.1.3.	Diklofenák nátrium	30
5.2.	Módszerek	32
5.2.1.	1. kísérletsorozat.....	32
5.2.1.1.	3D nyomtatás.....	32
5.2.1.2.	Kémiai oldallánc módosítás	32
5.2.1.3.	Anyagszerkezeti vizsgálatok	33
5.2.1.3.1.	Pásztázó elektronmikroszkópia (SEM).....	33
5.2.1.3.2.	Fourier transzformációs infravörös spektroszkópia (FTIR)	33
5.2.1.3.3.	Felületi egyenetlenség vizsgálata	33
5.2.1.3.4.	Pozitron annihilációs élettartam spektroszkópia (PALS)	33
5.2.1.3.5.	Nedvesedési peremszög meghatározás	34
5.2.1.4.	Sterilizés	34
5.2.1.5.	Biokompatibilitás	34
5.2.1.5.1.	Sejt passzálás	34
5.2.1.5.2.	MTT teszt.....	35
5.2.1.5.3.	Kristályibolya teszt	35
5.2.1.6.	Statisztikai elemzés	36
5.2.2.	2. kísérletsorozat.....	36
5.2.2.1.	3D nyomtatás.....	36
5.2.2.2.	Tömegegységesség.....	37
5.2.2.3.	PLA degradáció.....	37
5.2.2.4.	Anyagszerkezeti vizsgálatok	38
5.2.2.4.1.	Pásztázó elektronmikroszkópia (SEM).....	38
5.2.2.4.2.	Mikro komputertomográfia (MicroCT)	38
5.2.2.4.3.	Termogravimetriás (TG) és differenciális pásztázó kalorimetriai (DSC) elemzés	38
5.2.2.4.4.	Nedvesedési peremszög meghatározás	39
5.2.2.4.5.	Raman spektroszkópia	39
5.2.2.5.	Sterilizés	39
5.2.2.6.	Citotoxicitás	39
5.2.2.7.	Kioldódás vizsgálat	39
5.2.2.8.	Statisztikai elemzés	40

6.	EREDMÉNYEK	41
6.1.	1. kísérletsorozat.....	41
6.1.1.	3D nyomtatás és kémiai módosítás	41
6.1.2.	Anyagszerkezeti vizsgálatok	42
6.1.2.1.1.	Pásztázó elektronmikroszkópia (SEM).....	42
6.1.2.1.2.	Fourier transzformációs infravörös spektroszkópia (FTIR)	43
6.1.2.1.3.	Felszíni egyenetlenség vizsgálata	46
6.1.2.1.4.	Pozitron annihilációs élettartam spektroszkópia (PALS)	48
6.1.2.1.5.	Nedvesedési peremszög meghatározás	49
6.1.3.	Biokompatibilitás	50
6.1.3.1.	MTT teszt	50
6.1.3.2.	Kristályibolya teszt.....	52
6.2.	2. kísérletsorozat.....	53
6.2.1.	3D nyomtatás.....	53
6.2.2.	Tömegegységesség.....	55
6.2.3.	PLA degradáció	56
6.2.4.	Anyagszerkezeti vizsgálatok	57
6.2.4.1.1.	Pásztázó elektronmikroszkópia (SEM).....	57
6.2.4.1.2.	Mikro komputertomográfia (MicroCT)	59
6.2.4.1.3.	Termogravimetriás (TG) és differenciális pásztázó kalorimetriai (DSC) elemzés	61
6.2.4.1.4.	Nedvesedési peremszög meghatározás	64
6.2.4.1.5.	Raman spektroszkópia	64
6.2.5.	Citotoxicitás vizsgálata	66
6.2.6.	Kioldódás vizsgálat	68
7.	MEGBESZÉLÉS.....	77
7.1.	1. kísérletsorozat.....	77
7.2.	2. kísérletsorozat.....	82
8.	ÖSSZEFOGLALÁS.....	86
9.	SUMMARY	88
10.	IRODALOMJEGYZÉK.....	90
10.1.	Az értekezésben hivatkozott közlemények jegyzéke	90
10.2.	A jelölt saját közleményeinek a Kenézy Élettudományi Könyvtár által ellenőrzött jegyzéke	107

11. ÁBRAJEGYZÉK	109
12. TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE	111
13. TÁRGYSZAVAK	112
14. KEY WORDS	112
15. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	113
FÜGGELÉK.....	115

1. Rövidítések

3D	három dimenzió (three dimensional)
ABS	akrilnitril-butadién-sztirol
ALD	atomréteg lerakódás (atomic layer deposition)
Anti PLA	antibakteriális politejsav (antibacterial polylactic acid)
ATR	csillapított teljes visszaverődés (attenuated total reflection)
BAPA	bisz(aminopropil)-amin (bis(aminopropyl)amine)
BJ	kötőanyag kilövellés (binder jetting)
CaCo-2	bél adenokarcinóma 2 (colon adenocarcinoma 2)
CCD	töltéshez kapcsolt eszköz (charge-coupled device)
CSII enfusion)	folyamatos szubkután inzulin infúzió (continuous subcutaneous insulin infusion)
DLP	digitális fényvezérlés (digital light processing)
DMD	digitális mikrotükör eszköz (digital micromirror device)
DMEM	Dulbecco által módosított Eagle médium (Dulbecco's modified eagle medium)
DSC	differenciális pásztázó kalorimetria (differential scanning calorimetry)
ECACC Cultures)	európai sejtkultúra gyűjtemény (European Collection of Authenticated Cell Cultures)
ED	etilén-diamin (ethylene diamine)
EDS	energiadiszperzív spektrometria (energy dispersive spectrometry)
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EVA	etilénvinilacetát
FBS	magzati szarvasmarha szérum (fetal bovine serum)
FDA	Amerikai gyógyszerügyi hatóság (Food and Drug Administration)
FE-SEM microscopy)	téremissziós pásztázó elektronmikroszkóp (field emission scanning electron microscopy)
FDM	ráolvasztásos módszer (fused deposition modeling)
FFF	szálhúzásos technológia (fused filament fabrication)
FTIR	Fourier transzformációs infravörös spektroszkópia (Fourier transform infrared spectroscopy)
GMP	helyes előállítási gyakorlat (good manufacturing practice)

HME	forró olvadék extrudálás (hot melt extrusion)
IDDS	parenterális gyógyszeres implantátumok (implantable drug delivery systems)
ISO	Nemzetközi Szabványügyi Szervezet (International Organization of Standardization)
LDH	laktát dehidrogenáz
LOM	réteges gyártás (laminated object manufacturing)
microCT	mikro komputertomográfia (micro computed tomography)
MJ	anyagkilövellés (material jetting)
MRI	mágnesesrezonancia vizsgálat (magnetic resonance imaging)
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2H-tetrazólium-bromid (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide)
NMePrN	N-metil-1,3-propán-diamin (N-methyl-1,3-propanediamine)
NPEGN	2,2'-etiléndioxi-dietilamin (2,2' (ethylenedioxy)diethylamine)
OGYÉI	Országos Gyógyszerészeti és Élelmezés-egészségügyi Intézet
PALS	pozitron annihilációs élettartam spektroszkópia (positron annihilation lifetime spectroscopy)
PBS	foszfát pufferelt sóoldat (phosphate buffered saline)
PCL	polikaprolakton
PET	polietilén-tereftalát (polyethylene terephthalate)
PETG	polietilén-tereftalát-glikol (polyethylene terephthalate glycol)
Ph. Eur.	Európai Gyógyszerkönyv
Ph. Hg.	Magyar Gyógyszerkönyv
PLA	politejsav (polylactic acid)
PLS	legkisebb négyzetek (partial least squares)
PMMA	polimetil-metakrilát (poly(methyl methacrylate))
p-Ps	pozitrónium hármassállapot (positronium triplet state)
RPMI	Roswell Park Emlékintézet (Roswell Park Memorial Institute)
RT-CES	valós idejű sejt elektronikus érzékelő (real-time cell electronic sensing)
Rz	felszíni egyenetlenség átlagos mérete (average depth of roughness parameter)
SBF	szimulált testfolyadék (simulated body fluid)
SD	szórás érték (standard deviation)
SLA	sztereolitográfia (stereolithography apparatus)

SLS	szelektív lézer szinterezés (selective laser sintering)
stl	standard tesszellációs nyelv (standard tessellation language)
TET	trietilén-tetramin (triethylenetetramine)
TG	termogravimetria (thermogravimetry)
TPU	termoplasztikus poliuretán (thermoplastic polyurethane)
Tris	tris(2-aminoetil)-amin (tris(2-aminoethyl) amine)

2. Bevezetés

A 3D nyomtatás az utóbbi néhány évtized egyik legmodernebb gyártástechnológiai eljárásává nőtte ki magát. Számos területen, így az építészetben, az élelmiszeriparban és az egészségügyben is széles körben alkalmazható.

A technológia gyors fejlődésével a fogyasztói társadalom számára is megfizethetővé váltak a nyomtatók, így akár a saját otthonunkban is alkalmazhatjuk. Vannak kifejezetten a fogyasztók számára kifejlesztett, olcsón elérhető, otthon összeszerelhető változatok is. A nyomtatáshoz szükséges stl fájlok pedig számos weboldaltól ingyenesen letölthetők. [1]

Az építőiparban komplett házszerkezetek is előállíthatók így, amely egy olcsó alternatívát biztosíthat a hagyományos építkezési módszerrel szemben. Speciális, nagyméretű nyomtatókkal helyben vagy gyártóhelyiségben is történhet a gyártás, majd a 3D nyomtatott részek későbbi összeszerelésével fel is építhető egy ház. [2]

Az élelmiszeriparban számos ötlettel álltak elő ennek a modern technikának az alkalmazására, a kutatók szerint lehetséges az élelmiszerek nyomtatása is. A módszer lényege, hogy távolról is elérhető lenne a 3D nyomtató például számítógépről vagy telefonról, így a nyomtatást az okos eszközünkről elindítva kész lehetne a vacsoránk, mire hazaérnénk. Az űripár számára is megoldást kínálhat a nemzetközi űrállomásokon történő élelmiszer gyártására. [3] Egy kutatócsoport például a szükséges alapanyagokból 3D nyomtatással állított elő csokoládét figyelembe véve a reológiai megfelelőséget. [4]

A természettudományok, azon belül a kémiai tudományok területén is számos felhasználási területe van a 3D nyomtatásnak. A különböző szintézisfolyamatok automatikusan vezérelhetők például robot technika segítségével. [5] **Glatzel és szerzőtársai** rámutatnak arra, hogy ezzel a technológiával előállított antibakteriális tesztek nagymértékben segíthetik a kutatók munkáját és új laboratóriumi protokollok kialakulását is. [6]

Az egészségügyi felhasználást az irodalmi áttekintés szakaszban fogom részletezni a széleskörű alkalmazhatóság miatt, de fontosnak tartom megemlíteni a munkánk alapját képező két kiemelkedő gondolatot. Az egyik az első 3D nyomtatással előállított gyógyszerkészítmény (Spritam®) engedélyezése. A másik pedig a személyre szabott gyógyszerelés fontossága, mivel a kutatásunk célja egyéni gyógyszerleadó rendszerek előállítása és az alkalmazhatóság feltérképezése.

Az Amerikai Egyesült Államokban évente 30 millió darab magisztrális gyógyszerkészítményt készítenek, kezdve az egyedi ízesítésű folyékony gyógyszerformáktól a tetrakainos nyalókákön át, egészen az egyedileg előállított szilárd gyógyszerleadó rendszerekig

a beteg megfelelő, egyénre szabott terápiájának eléréséhez. [7] Az egyéni gyógyszereléssel a beteg szükségleteinek megfelelően tudunk előállítani gyógyszerkészítményeket, így növelhetjük a hatékonyságukat és a páciensek együttműködési képességét is, ugyanakkor csökkenthetjük az alkalmazott hatóanyag mennyiségét és minimalizálhatjuk az esetleges mellékhatások kialakulását. [8] A 3D nyomtatási technológia alkalmazása alternatív mód lehet a hatékony, személyre szabott hatóanyag leadó rendszerek gyors előállítására. [9] Az egészségügyi szakszemélyzet a komplex, személyre szabott gyógyszerhordozó rendszert az egyén szükségleteinek megfelelően, egy relatíve olcsó gyártási eljárással készítheti el. [10]

3. Irodalmi áttekintés

3.1. 3D nyomtatás

3.1.1. Elméleti alapok

A 3D nyomtatási eljárás lényegében egy összefoglaló név és számos szinonimája van, ilyen a gyors prototipizálás, szilárd anyag mentes gyártás és az additív gyártás.

Maga a nyomtatás digitális tervrajz alapján rétegről-rétegre történő eljárást jelent. Az első lépés a tervezés, amely során 3D tervező programokban (például Rhinoceros, Google Sketchup) a kívánt mintát digitálisan megtervezik, mely eredményeképpen egy stl fájlformátumot kapunk. Ezt az stl fájlformátumot a 3D nyomtatóhoz tartozó szoftver már képes értelmezni. Ezekben a programokban történhet meg a minták paramétereinek végső meghatározása például méret, kitöltöttségi százalék, stb. A nyomtatási paraméterek beállítása is itt történik meg. Ha a nyomtatás során szükségesek kiegészítő részek ahhoz, hogy biztosítsuk a megfelelő megtámasztást, azt a program automatikusan felismeri. Ezek a támasztékok a nyomtatást követően manuálisan eltávolíthatóak. Ezen folyamat során egy gcode fájlformátumot kapunk, melyet a 3D nyomtató már tud kezelni. Az utolsó lépésben történik maga a nyomtatás. [11]

A 3D nyomtatás egy automatizált, alacsony üzemeltetési költségű gyártás, mellyel komplex, egyénre szabott termékek állíthatóak elő. Ezáltal biztosítható a megfelelő gyógyszeradagolás egy komplex gyógyszerleadó rendszerben, amely következtében nőhet az adherencia, a gyógyszerbiztonság és a beteg együttműködési készsége. [9]

3.1.2. Típusai

Számos különböző típusa létezik a 3D nyomtatásnak, melyek működési elvük alapján csoportokba sorolhatóak, azon belül pedig a megszilárdítás alapján alcsoportokra oszthatók. (1. táblázat)

3D nyomtatás csoportosítása	Működési elv	Megszilárdítás alapja	Példa
	Kádas fotopolimerizáció	Lézerrel megszilárdított rendszer	Sztereolitográfia (SLA, Stereolithography apparatus)

		Visszaverődő lézerrel megszilárdított rendszer	Digitális fényvezérlés (DLP, Digital light processing)
	Anyag extrúzió	Tálcán történő lehűlés által szilárdul meg	Szálhúzásos technológia (FDM, Fused deposition modeling)
	Anyag kilövellés	UV fénnel történő megszilárdítás	Anyagkilövellés (MJ, Material jetting)
	Kötőanyag kilövellés	Kötőanyag által szilárdul meg	Kötőanyag kilövellés (BJ, binder jetting)
	Porágy összeolvasztás	Lézerrel összeolvasztott rendszer	Szelektív lézer szinterezés (SLS, Selective laser sintering)
	Sávós rétegződés	Lézerrel összeolvasztott rendszer	Réteges gyártás (LOM, Laminated object manufacturing)

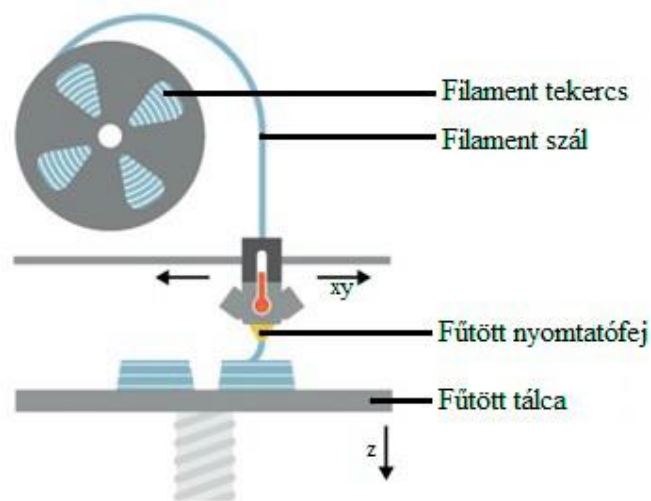
1. táblázat – A 3D nyomtatás csoportosítása. A csoportosítás működési elv alapján történt, bizonyos típusok pedig alcsoportokra oszthatóak attól függően, hogy a minta megszilárdítása hogyan történik. Mindegyik csoportra egy-egy példát is megadtam magyar és angol névvel egyaránt.

Sztereolitográfia (SLA, Stereolithography apparatus) során a fényérzékeny folyadékgyanta felső rétegét UV fénnel világítják meg, mely hatására megtörténik a polimerizáció. A folyadékgyantába egy mozgó tálca merül, erre a tálcára történik az újabb és újabb rétegek kialakítása. Ha elkészül a termék, eltávolítják a felesleges gyantát és az esetleges támasztékokat. Az SLA nyomtatás előnyei hogy, nagy nyomtatási pontossággal és magas felbontással rendelkezik, a termék felszíne sima és magas minőségű, relatíve elég gyors és olcsó maga a berendezés. Néhány hátrányt is figyelembe kell vennünk, így az alapanyagok

drágaságát, a megfelelő folyadékgyanta eltávolítást, illetve a minden esetben szükséges tisztítási lépést. [12]

A **digitális fényvezérlés** (DLP, Digital light processing) működési elve nagyban hasonlít az SLA-hoz, a különbség az, hogy az UV fényt először egy digitális mikrotükörre (digital micromirror device, DMD) irányítják, ami innen tükröződik a fényérzékeny alapanyag felszínére, így még tovább csökkentve az előállítási időtartamot. [13]

Szálhúzásos technológia vagy ráolvasztásos módszer (FFF, Fused filament fabrication vagy FDM, Fused deposition modeling) során polimerből készült filament tekercset alkalmazunk, mely a nyomtatófejben hő hatására megolvad, így egy polimer olvadékot kapunk, amiből kialakítjuk a rétegeket a tálcán. Az általam vizsgált minták is ilyen módszerrel kerültek előállításra. (1.ábra) [14]



1. ábra - A szálhúzás elvén működő 3D nyomtató vázlata

Az **anyagkilövellésen** (MJ, Material jetting) alapuló eljárás során fotopolimert vagy viaszt, cseppek formájában adagolják a nyomtatófejből, ami az UV fény besugárzását követően szilárdul meg a tálcán, így megkapva a kívánt terméket. A módszer nagy előnye, hogy szimultán több nyomtatófejet lehet használni, így egyszerre több alapanyagból előállítva kapunk egy komplex tulajdonságokkal rendelkező terméket. Azonban ez az egyik legdrágább 3D nyomtatási technológia. [15]

A **kötőanyag kilövellés** (BJ, Binder jetting) esetén, egy tálcában található a por alapanyag, melyre különböző fúvókákból juttatják rá a megolvasztott kötőanyagot a minta egy rétegének kialakítására, majd a tálca folyamatos süllyedésével lehetővé válik a rétegről-rétegre történő előállítás. Fémnyomtatásra is alkalmazható ez az eljárás, de a nyomtatási pontosság növelése érdekében még további fejlesztések szükségesek.[16]

Szelektív lézer szinterezés (SLS, Selective laser sintering) során a tálcán por formában található meg a polimerrészecskékből álló alapanyag, melyet adott rétegben megolvasztanak és rétegekben való szinterezéssel, lézer segítségével szilárdítanak meg. A már kialakított részre újabb réteg port visznek fel, megolvasztják és megszilárdítják, így felépítve a kívánt terméket. A nyomtatást követően a megmaradó portól pedig megtisztítják a mintát. Ezzel a gyártási technológiával kiemelkedő az előállítás minősége és tartós termékeket kaphatunk. [17]

Réteges gyártás (LOM, Laminated object manufacturing) esetében egy polimer alapú fóliát speciális pengével vagy lézerrel vágnak méretre rétegről-rétegre, így előállítva a három dimenziós terméket. [18]

A korábban részletezett típusok mindegyike használható polimerekkel, de ezen felül számos eljárás létezik fémnyomtatásra is, mely nem képezi részét a disszertációnak. A 3D nyomtatási módszer kiválasztásakor figyelembe kell vennünk az alapanyag és a hatóanyag tulajdonságait, az elérhető technológiát, a nyomtatást követően esetlegesen felmerülő lépéseket, a nyomtatási tulajdonságokat és a szükséges nyomtatási minőséget. [19]

3.1.3. Korlátozó tényezők

A 3D nyomtatási technológiák nagy része nem egészségügyi előállításra lett kifejlesztve, így számos korlátozó tényezővel kell számolnunk. Bizonyos nyomtató berendezések mint például az SLS még mindig nagyon költségesek. Bár ez egy viszonylag gyors előállítási lehetőség, jelenleg nem képes az ipari méretű tablettázógépek termelékenységével felvenni a versenyt. A nyomtatást követően szükséges utómunkálatok pedig lelassíthatják a minták előállítási idejét, például SLS, SLA és BJ nyomtatás során.

A 3D nyomtatott termékek fizikai megjelenése nagyon eltérő lehet a választott nyomtatási eljárástól függően. Bizonyos nyomtatási módszerek egyenetlen vagy rögös felszínt eredményezhetnek, amely nem elfogadható gyógyszerleadó rendszerek előállításakor. A nem megfelelő felszín, nem megfelelő hatóanyagfelszabadulást eredményezhet, ami a beteg együttműködési készségének csökkenését vonhatja maga után. A porágy alapú nyomtatás során pedig megváltozhat a minta mechanikai erőssége, ami magas törékenységhez és kis keménységhez vezethet. [20]

A hatóanyag stabilitását több tényező is befolyásolhatja, így a lézerek vagy nagy energiájú berendezések használata, melyek a hatóanyag esetleges bomlását okozhatják. Számos eljárás során használnak folyadékgyantát, különböző oldószereket, kereszt-kötődésű polimereket, melyek mind-mind befolyásolhatják a hatóanyag fizikai, kémiai tulajdonságait vagy akár a felszabadulását. Az alkalmazott hatóanyagoknak stabilnak kell lenniük a nyomtatás során, ami

nagy hőstabilitást (akár 270 °C), különböző oldószerekkel szembeni és térhálósodó polimerekkel való stabilitást és UV fénnnyel szembeni stabilitását jelent. [11] Továbbá néhány nyomtatási módszer, így az SLA és SLS olyan alapanyagokat használ fel, amelyek egészségre gyakorolt komplex hatása ismeretlen. A legtöbb engedélyezett folyadékgyantának és fotopolimerizációs iniciátornak lehet káros, esetleg karcinogén hatása, amely akadályozhatja ezen technológiák alkalmazását gyógyszerleadó rendszerek előállítására. Az esetleges káros hatások miatt is kiemelkedően fontos a biokompatibilitás vizsgálata, melyet a GMP is megkövetel, mivel a készítmény nem engedélyezhető, ha bármilyen toxikus hatással rendelkezik. [20]

3.1.4. Alkalmazhatóság

A 3D nyomtatási technikának számos alkalmazhatósági területe van az egészségügyben, amelyeket a teljesség igénye nélkül foglalkozok össze, mivel hetente jelennek meg újabb és újabb neves publikációk, melyek megjelenését a koronavírus járvány még inkább felgyorsította.

Az orvostudományban a 3D nyomtatás számos területen elősegítheti a kutatók és az orvosok munkáját. Az előállított termékek támogatják a személyre szabott orvoslás és terápia fejlődését, elterjedését. [21] A 3D nyomtatás az orvosi területeken az anatómiailag megfelelő prototípusok megtervezésére irányul, különféle képalkotó technikák például mágnesesrezonancia vizsgálat (MRI), komputertomográfia (CT) stb. képeinek felhasználásával. Ezekkel a módszerekkel kapott felvételeket átalakítják a 3D nyomtató számára értelmezhető fájlformátumokká és így történik meg az anatómiai minták nyomtatása polimerekből. [22] Ez az innovatív módszer a különböző műtéteket megelőzően is jelentős potenciált hordoz magában, hiszen a beteg adott szerve kinyomtatható műanyagból, melyet az orvos és a stábja tud elemezni a beavatkozás előtt, így megkönnyítve a munkájukat és javítva a műtéti kimenetelt. Az egyetemi oktatás részeként is kitűnően alkalmazható a különböző gyakorlatok keretein belül, például az anatómiai struktúrák elemzéséhez, egy páciens esetismertetéséhez vagy a műtéti protokollok gyakorlásához.

A sebészetben nagy hatékonysággal alkalmazhatóak anatómiai modellek, sebészeti sínek és sablonok, öntőminták és polimer implantátumok előállítására, melyek nagy segítséget nyújthatnak a komplex anatómia/morfológia megértésében, testreszabott implantátumok létrehozásában vagy műtéti folyamatok során történő egyedi minta tervezésben. [23]

A fogászat területén is széleskörű a felhasználása. 3D nyomtatással előállíthatók többek között fúróvezetők fogászati implantátumok beültetéséhez, modellek fogpótláshoz,

fogszabályozáshoz és műtéthez, beültetésre szánt fogászati implantátumok, valamint implantátumok és fogak helyreállításához szükséges vázak. [24]

Az ortopédiai műtéteknél kiemelkedő jelentőségűnek bizonyultak az anatómiai modellek, melyeket széleskörűen lehet felhasználni és új lehetőségeket nyitottak meg a betegellátás területén. A műtéti beavatkozások során legfőképpen a csípőprotézis beültetésénél, illetve a koponya rekonstrukciós műtéteknél alkalmazzák. Nagy előnye, hogy elősegíti a műtét tervezését, a műtét folyamatát és így növelheti a műtét sikerességét. [25]

Az első 3D nyomtatással előállított alsó állkapocscsontot 2012-ben egy 83 éves hölgynek ültették be Hollandiában. Az előállításához fémnyomtatást alkalmaztak, mely során titánium port olvasztottak össze. Egy milliméter vastagság eléréséhez 33 réteget nyomtattak. Ugyancsak Hollandiában 2014-ben egy 22 éves női beteg esetében a koponyacsont pótlása egy 3D nyomtatóval előállított mintával történt. [26]

Az ortopédiai műtétek csoportján belül a sebészeti sínek jól alkalmazhatóak gerinc, arc, állcsont és térdműtéteknél. Kiemelkedően kedvező eredményeket tapasztaltak térdműtétek esetén, ahol a beavatkozást követő lábadozási idő jóval kisebb volt. A sínek alkalmazásával csökkenthető a műtéti idő és javítható a műtéti kimenetel. [27]

Az öntőformák kiválóan alkalmazhatóak a csípőprotézisek tervezése során, illetve koponya és fülészeti műtéteknél. A minta a beteg komputertomográfiai (CT) képe alapján kerül kialakításra és nyomtatásra, majd a kinyomtatott mintát behelyezik valamilyen rugalmas, megszilárduló polimert tartalmazó edénybe. Ezáltal egy negatív öntőformát kapnak, melybe a műtét során kiönthető a pozitív minta, például csontcementből. Ezen módszer alkalmazásával is csökkenthető a műtéti idő és nagymértékben növelhető az esztétikusság. [28]

Az utóbbi néhány évben nagymértékben nőtt a 3D nyomtatással előállított betegspecifikus kezelést biztosító tudományos eredmények száma. A kutatások egy része a bio 3D nyomtatásra fókuszál, amelyhez speciális 3D nyomtató és anyagok szükségesek. Olyan élő szövetek vagy szervek előállítása a céljuk, mely alkalmas lehet a sérült vagy károsodott szövetek pótlására vagy regenerálására. Ebben az esetben a nyomtatási folyamat során élő sejteket, növekedési faktorokat vagy valamilyen más biológiai anyagot kell kinyomtatni. [29] **Kacarevic és szerzőtársai** megemlítenek különböző biológiai termékeket, így bőrmodelleket vagy akár a humánhoz hasonló fül modelleket, melyek a minta nyomtatását követően implantálásra kerülhetnek a humán szervezetbe [30]

A gyógyszeripar, illetve számos kutatócsoport dolgozik azon, hogy 3D nyomtatással előállított gyógyszerleadó rendszerek kerüljenek forgalomba. Az amerikai gyógyszerügyi hatóság (FDA, Food and Drug Administration) 2015-ben engedélyezte az első így előállított

gyógyszerkészítményt, mely hatóanyagként 500, 750 vagy 1000 mg levétiracetámot tartalmaz. A gyógyszerforma szájban dezintegrálódó tabletta, így epilepsziás rohamok kezelésére alkalmazható a gyors hatóanyag felszabadulásnak és a pregasztrikus felszívódásnak köszönhetően. [31] A Spritam® előállításához egy úgynevezett ZipDose® technológiát alkalmaznak, melynek lényege, hogy az egyenletesen eloszlalt por rétegeket kötőanyaggal rögzítik egymáshoz rétegről-rétegre. [26]

A gyógyszeriparban különböző gyógyszerleadó rendszerek előállítására használják. [32] A 3D nyomtatással leggyakrabban tablettákat, kapszulákat, implantátumokat, transzdermális gyógyszerleadó rendszereket (TDS) és szájban széteső filmeket formulálnak, mint speciális gyógyszerleadó rendszerek. [33]

Hollander és szerzőtársai polidimetilsziloxánból (PDMS) prednizolon hatóanyag-tartalmú módosított hatóanyagleadású tablettákat állítottak elő, ahol a PDMS közötti keresztkötéseket UV fény segítségével alakították ki. [34] Egy másik kutatócsoport az FDM nyomtatáshoz szükséges filamenteket különböző cellulóz alapanyagokkal módosította.. Az alkalmazott hatóanyag 30 % izoniazid volt, az előállított gyógyszerforma pedig tabletta. [35] Számos kutatást végeznek csokoládé alapú 3D nyomtatásra, melyhez egy speciális berendezést alkalmaznak, ahol a különböző kémiai anyagok helyett csokoládé lesz a kötőanyag. Gyermekgyógyászati alkalmazásra ibuprofen és paracetamol hatóanyagú tablettákat állítottak elő ezzel a módszerrel. [36] **Khaled és szerzőtársai** egy úgynevezett 'polypill'-t hoztak létre, amely magyarul lényegében annyit jelent, hogy sok tabletta található meg egyben. Egyszerre több nyomtatófejet alkalmaztak, ennek köszönhetően öt különböző hatóanyagot tartalmazott a tablettájuk különböző kompartmentekben és két egymástól független, jól definiált kioldódási profillal rendelkeztek. [37]

Maroni és szerzőtársai kutatásaikban foglalkoztak kapszulák 3D nyomtatással történő előállításával. Az egyik publikációjukban 600 és 1200 μm -es falvastagságú két kompartmentes kapszulákat állítottak elő 3D nyomtatással, amelyeket sárga és kék festékkel, mint modell hatóanyaggal töltöttek meg. Lényegében a falvastagság hatását vizsgálták a kioldódási profilra. [38]

Implantálható gyógyszerleadó rendszerek különböző módszerekkel állíthatók elő. Az egyik esetben, 3D nyomtatással állítottak elő implantátumot oszteoszarkóma kezelésére. [39] Egy másik esetben, implantálható nanogéleket készítettek hosszú-távú hatás kifejtésére. [40] Néhány kutató arra alkalmazta a nyomtatási eljárást, hogy megfelelő implantálható gyógyszerleadó rendszereket hozzanak létre, amely a polimereken kívül a hatóanyagot is tartalmazza és csontműtétek esetében közvetlenül elállíthatók. [41]

3.1.5. FDM nyomtatás

Az egyik leggyakrabban alkalmazott 3D nyomtatási eljárás az FDM alapú nyomtatási technológia, melyet még az 1980-as években alkotott meg Scott Crump. [32] A művelet során a megolvasztott polimer filamentet rétegről-rétegre nyomtatjuk ki egy tálcára. [42] Az FDM nyomtatás egy szabadalom-nélküli, széleskörben elterjedt és olcsó eljárás, mely számos kutatócsoportot inspirált az egészségügyi ellátórendszerben és a gyógyszeriparban is gyógyszerleadó rendszerek előállítására. [43][44] További előnyei, hogy mechanikailag stabil rendszerek állíthatók elő nagy felbontásban (30- 200 μm), melyek nem igényelnek a nyomtatás befejezése után mosási vagy tisztítási lépéseket. [45]

A kutatócsoportok jelentős része a hatóanyag tartalmú filamenteket forró olvadék extrudálással (hot-melt extrusion, HME) állítja elő, majd ezeket használják fel a 3D nyomtatás során. [46] Az FDM típusú nyomtatók csak termostabilis hatóanyagok direkt nyomtatását teszik lehetővé, a magas nyomtatási hőmérséklet (120 $^{\circ}\text{C}$ -tól kezdve 270 $^{\circ}\text{C}$ -ig) miatt. [8] Egy kutatócsoport módosított polividon granulátum tartalmú filamentet használt a hőmérséklet csökkentésére, mely során a ramipril (olvadáspontja 109 $^{\circ}\text{C}$) extrudálták polividon granulátumokkal. [47] Azt is megvizsgálták, hogy segédanyagok hozzáadásával számottevően csökkenthető-e a nyomtatási hőmérséklet, de az így elért legalacsonyabb érték 165 $^{\circ}\text{C}$ volt. [48] Habár számos kutatócsoport dolgozik a magas nyomtatási hőmérséklet kiküszöbölésén, a legígéretesebb megoldás az, ha külön kerül kinyomtatásra egy gyógyszerhordozó rendszer, amelybe bármilyen típusú hatóanyag inkorporálható.

3.1.5.1. Polimer filamentek

Az FDM nyomtatáshoz számos gyártó kínál a kereskedelmi forgalomban filamenteket, így többek között politejsav (PLA), polietilén tereftalát (PET), polimetil metakrilát (PMMA), nylon, polikaprolakton (PCL), akrilnitril-butadién-sztirol (ABS) vagy termoplasztikus poliuretán (TPU) alapanyagokat. A filamentek önmagukban vagy módosítva (lásd antibakteriális tejsav (AntiPLA), polietilén tereftalát glikol (PETG)) is elérhetőek. Ebben a fejezetben a kereskedelmi forgalomban kapható leggyakoribb filamenteket jellemzem. [18]

A megfelelő polimer kiválasztásakor számos tényezőt figyelembe kell vennünk. Többek között pl. a hatóanyag hőmérsékleti stabilitását, valamint az előállítani kívánt gyógyszerleadó rendszer által kifejtendő hatás időtartamát. [14]

3.1.5.1.1. Politejsav (PLA)

A PLA filamenteket széles körben alkalmazzák megfelelő citokompatibilitási és biodegradábilis tulajdonságaik miatt. [49]. Hővel jól formálhatóak, megfelelő mechanikai

tulajdonságokkal rendelkeznek [50] [51], de a rigidségét és a törékenységet mindenképpen figyelembe kell vennünk. [52].

3.1.5.1.2. Antibakteriális politejsav (AntiPLA)

A PLA filament egyik módosulata az antibakteriális PLA, amely ugyancsak elérhető a kereskedelmi forgalomban és a polimer szálban egyenletesen elosztatott ezüst nanorészecskéknek köszönhetően antibakteriális tulajdonsága van. [49]

3.1.5.1.3. Polietilén tereftalát (PET)

A PET filament megfelelő biokompatibilitással rendelkező, nem biodegradábilis polimer. [53] Számos területen alkalmazzák, de a felhasználását korlátozhatja a polimer rigidsége. A magas nyomtatási hőmérséklet következtében (250 °C), pedig kristályszerkezeti változásokkal is számolnunk kell. [54]

3.1.5.1.4. Polietilén tereftalát glikol (PETG)

A PET glikol módosulata (PETG) is egy gyakran használt filament, melynek magas a szakítószilárdsága és nagymértékben ellenáll a kémiai anyagoknak. Nem-biodegradábilis, olcsó és üveg-szerű átlátszó polimer, amely kiküszöböli a PET kristályszerkezeti problémáját. [50] Annak ellenére, hogy a PETG érzékenyebb az UV fény általi sérülésre és nem lehet autoklávval sterilizálni, ez előnyei jelentősebbek ezeknél a hátrányoknál. [55]

3.1.5.1.5. Polimetil metakrilát (PMMA)

A polimetil metakrilát (PMMA) filament egy kereskedelmi forgalomban kapható, relatíve olcsó, hőhatásra könnyen formázható, nem-biodegradábilis, nem toxikus, inert polimer. [56] A PMMA-t hatóanyaggal kombinálva gyöngy vagy szivacsformájában gyakran alkalmazzák ortopédiai műtétek során, mivel a humán szervezettel kompatibilis szövetpótlónak tekinthető. [57]

3.1.5.1.6. Nylon

A nylon vagy másnéven poliamid filamentek nem-biodegradábilis, nagy erősségű és hőmérsékleti változásoknak ellenálló polimerek, melyek nagyon könnyűek a többi típushoz viszonyítva. [58] A poliamidok kiváló hőformálási képességgel, illetve mechanikai és kopási tulajdonságokkal rendelkeznek. [59]

3.1.5.2. Nyomtatási paraméterek

Mint minden 3D nyomtatás során, így az általunk alkalmazott módszernél is számos paraméter befolyásolhatja a nyomtatott minta minőségét, például az alap- és hatóanyagok fizikai és kémiai tulajdonágai, a nyomtatófej, az extruder és a beállított nyomtatási paraméterek. [60] Nagyon fontos a különböző alkalmazott nyomtatási beállítások esetleges hatásainak vizsgálata, [61] azon belül is a kritikus paraméterek meghatározása a gyógyszerleadó rendszerek előállítása során. [62] Két különböző kutatócsoport is vizsgálta 3D nyomtatott kapszulák és módosított hatóanyagleadású tabletták esetében a falvastagság és a kioldódási profil kapcsolatát. Azt állapították meg, hogy a falvastagságnak, mint nyomtatási paraméternek nagyon fontos hatása van a kioldódási profilra. [63] [64]

Mint más előállítási módszernél az FDM nyomtatásnál is számolnunk kell tipikus minőségi problémákkal, ilyen a minta oldalának fodrozódása, amit az x-y tengely mentén történő vibráció okoz. Minőségi hibát eredményezhet a minta dőlése az x vagy y tengely irányába. A hőtágulás, a minta vetemedése vagy összehúzódása is a termék torzulását okozhatja. A rétegek elválását a rétegek kötődésének hiánya okozza. A minta alaprétegeinek eltolódása a végtermék nem-megfelelőségét eredményezi, illetve a porozitás elvesztése pedig a váz összeesését idézheti elő. [11]

3.2. Implantátumok

3.2.1. Elméleti alapok

A Pharmacopoea Hungarica (Ph. Hg.) VIII. kiadása alapján a parenterális gyógyszeres implantátumok (implantable drug delivery systems, IDDS) fogalma: „A parenterális gyógyszeres implantátumok parenterális beültetésre szánt, alkalmas méretű és formájú, szilárd, steril készítmények, amelyek hosszú időn keresztül, folyamatosan adják le hatóanyagukat. Az implantátumok egyenként csomagolva, steril tartályokban kerülnek forgalomba” [65]

Az implantátumok alkalmazásának számos előnye van, ezek közé tartozik, hogy módosított hatóanyagleadás érhető el a konvencionális gyógyszerformákkal összehasonlítva. [66] Az implantátumokkal hosszú ideig, akár évekig biztosítható a hatóanyagleadás. A beadás helyétől és módjától függően lokális vagy szisztémás hatás is biztosítható. A folyamatos, szabályozott hatóanyagleadással állandó plazmaszintet lehet elérni, mellyel jobb beteg együttműködési készség alakítható ki. Egyszerre kevesebb hatóanyag elegendő azonos hatás eléréséhez, mellyel az esetleges mellékhatások kialakulásának a valószínűsége is lecsökken. Az implantálható gyógyszerleadó rendszerek esetében számos lehetőség van a módosított hatóanyagleadás kinetikájának befolyásolására és így a megfelelő hatóanyag felszabadulás eléréséhez. [67]

Néhány hátránnyal is számolnunk kell az alkalmazás során. Maga a gyógyszerforma egyszerre nagyobb mennyiségű hatóanyagot tartalmazhat, mint a napi maximális dózis, így nem megfelelő hatóanyag felszabadulás esetén toxicitást okozhat. A beültetés helyén bőrpír, fájdalomérzés, súlyosabb esetben anafilaxiás reakció alakulhat ki. A beültetés és az esetleges eltávolítás kisebb sebészeti beavatkozásnak minősül, illetve csak szakszemélyzet végezheti el nem-biodegradábilis polimerek esetén. A termékek komplex struktúrájuk, amelyek előállítása és engedélyeztetése drágább, mint egy hagyományos gyógyszerforma esetén.[68]

3.2.2. Előállítási lehetőségek

Az implantátumok előállítására különböző módszerek alkalmazhatóak, így a fröccsöntés (injection molding), préselés (compression molding), forró olvadék extrudálás (hot melt extrusion, HME), oldószer elpárologtatás (solvent casting), illetve az általunk is használt 3D nyomtatás. Mivel a 3D nyomtatást egy teljes fejezetben részleteztem, így ebben a fejezetben csak a hagyományos, legfontosabb gyártástechnológiákat mutatom be. [69]

A **fröccsöntés** során a termoplasztikus polimert (például politejsav vagy politejsav-koglikolát) megolvasztják és adott üregű szerszámba injektálják, ahol hagyják megszilárdulni. A módszer gyors és sokoldalú, lényegében folyamatos gyártástechnológiának tekinthető és a

léptéknövelés is könnyű, amihez csak a berendezés méretének és a szerszámok mennyiségének a megváltoztatása szükséges. [70]

A **préselés** során az alsó szerszámba helyezik a hatóanyagot is tartalmazó termoplasztikus polimer granulátumot, majd a felső szerszám préseléssel kialakítja az ennek megfelelő formát. A préselést követően az alsó szerszámból kilökik a mintát, amely már kész is az alkalmazásra. A módszer előnye, hogy nem szükséges sem magas hőmérséklet, sem pedig oldószer alkalmazása és szélesebb körű hatóanyag csoporttal alkalmazható. Hátrányaként említhető meg, hogy ezzel a módszerrel általában rövidebb hatóanyagfelszabadulású minták állíthatók elő, így utólag szükséges lehet módosított hatóanyag felszabadulást biztosító bevonattal ellátni. [69]

Az **extrudálás** során a polimert granulátum vagy pellet-, a hatóanyagot por-, illetve oldat formájában juttatják be az adagolón át az extrúziós csigára. A csiga nyomja keresztül a polimert az extruder fűtött zónáin, ahol a hő és a súrlódás hatására megolvad, majd egy szerszámon keresztülhaladva nyeri el a kívánt formát pl. szál, lap. A módszerrel termoplasztikus polimerek alkalmazhatóak. A módszer előnye, hogy nagy hatékonyságú, oldószermentesen alkalmazható, folyamatos gyártástechnológiai eljárás, ahol könnyen biztosítható a léptéknövelés. A kutatócsoportok előszeretettel alkalmazzák ezt a technológiát kis vízdékonysággal rendelkező hatóanyagok formulálása során. Hátrányaként említhető, hogy csak olyan hatóanyagokkal alkalmazható, mely az adott extrúziós hőmérsékleten stabil marad, például a politejsav esetében 180 °C-os az extrúziós hőmérséklet. Ezzel a módszerrel állítják elő a Zoladex®, a Suprefact Depot® és az Implanon® implantátumokat. [71]

Oldószer elpárologtatás (solvent casting) esetén a polimert az oldószerében feloldják (politejsav esetében tetrahidrofurán, acetón, kloroform), majd egy szalagra adagolják, ahonnan az oldószer elpárologtatják és megkapják a polimer filmet vagy szalagot. Ugyan ez egy régóta alkalmazott gyártástechnológiai eljárás, az alkalmazásának gátat szabhat az esetlegesen visszamaradó szerves oldószerek toxikus vagy káros hatása. [72]

3.2.3. Alkalmazás a gyógyászatban

Az alkalmazás helye szerint csoportosíthatóak az implantátumok, mely alapján megkülönböztethetünk szubkután beültethető rendszereket, intravaginális, intraartikuláris vagy csontműtéteknél alkalmazható, illetve intraoculáris implantátumokat.

3.2.3.1. Szubkután beültethető rendszerek

A szubkután beültethető rendszereket a bőr alá ültetik be, ilyen típusúak a szilárd implantátumok, a folyamatos szubkután inzulin infúzió (Continuous Subcutaneous Insulin

Enfusion, CSII) biztosító hordozható pumpák, illetve az in situ képződő implantátumok (in situ forming device).

3.2.3.1.1. Szilárd implantátumok

A szilárd implantátumok esetében elkülöníthetünk fogamzásgátlásra alkalmazott, prosztatarák kezelésére használt, függőségről való leszokáshoz rendelt, illetve agytumorban alkalmazható implantátumokat.

A fogamzásgátló implantátumokat a felkar belső részére ültetik be, egy speciális tű segítségével. A beültetés körülbelül 15 percet vesz igénybe, és a beültetett implantátumtól függően egy évtől akár öt évig biztosítja a folyamatos hatóanyag-leadást. A hatékonysága 99,95 %-os. További előnye, hogy szoptatás alatt is alkalmazható. Legfontosabb hátránya, hogy nem véd a szexuálisan terjedő betegségek ellen, illetve drága fogamzásgátló módszernek számít. Mellékhatásként jelentkezhet a beültetést követően fájdalom, irritáció vagy viszketés, illetve testsúlygyarapodást, akne kialakulását, fejfájást vagy amenorrhéát okozhat. Az FDA által engedélyezett fogamzásgátló implantátumokat az alábbi táblázatban foglaltam össze. (2.táblázat) [73]

Készítmény	Norplant® (FDA kivonta a forgalomból)	Norplant 2®	Jadelle®	Implanon®	Capronor®
Biodegradabilitás	Nem-biodegradábilis				Biodegradábilis
Hatóanyag	36 mg levonorgestrel/rúd (216 mg összesen)		75 mg levonorgestrel/rúd	68 mg etonogestrel/rúd	levonorgestrel
Polimer típusa	Szilikon		Elasztomer	EVA	PCL
Beültetendő implantátum mennyiség	6 db	2 db	2 db	1 db	1 db
Hatástartam	5 év	3 év	5 év	3 év	1 év

2.táblázat – Fogamzásgátló implantátumok jellemzése Kleiner és munkatársai szerint [73]

A prosztatarák kezelésére is alkalmaznak szilárd implantátumokat. A Suprefact Depo® implantátum esetében két vagy három havonta ültetnek be három steril rudat a felkar belső részébe. Az implantátum buserelin hatóanyagot tartalmaz, amelyet előrehaladott prosztatarák

kezelésére alkalmaznak. A hatóanyag poli-laktid-ko-glikolát hordozóban van elosztatva 75:25 mólarányban. A Reseligo® és Zoladex Depot® 3,6 mg és 10,8 mg implantátum goserelin hatóanyagot tartalmaznak, melyet prosztata karcinóma, emlő karcinóma, endometriózis, endometrium elvékonyítás, méhüregi fibroidok kezelésére és asszisztált megtermékenyítéshez alkalmaznak. A hatóanyag poli-laktát-ko-glikolát vagy politejsav polimer mátrixban van diszpergálva, amit extrudálással állítanak elő. [74]

A gyógyszerfüggőségről való leszokás terápiájára az FDA 2016-ban engedélyezte a Probuphine®-t (buprenorfin), melyet ópiát függőségről való leszokás esetében, mint fenntartó terápia alkalmaznak. Egyszerre négy darab, polietilén-vinilacetát hordozóban elosztatott buprenorfin implantátumot ültetnek be, mely 6 hónapon keresztül folyamatosan biztosítja a hatóanyagleadást. [75]

A Gliadel®-t (carmustine) még 1996-ban engedélyezte az FDA gliómák kezelésére. A hatóanyagot biodegradábilis polianhidrid korongok (1.45 cm átmérőjű és 1 mm vastag) tartalmazzák. A rosszindulatú daganat eltávolításakor közvetlenül az agykamrába helyezik, hogy lokálisan fejtsse ki a hatását. [76]

3.2.3.1.2. Folyamatos szubkután inzulinleadás

Folyamatos szubkután inzulin infúzió (Continuous Subcutaneous Insulin Enfusion, CSII) biztosítanak a hordozható pumpák, amelyek az endogén inzulin felszabadulást utánozzák, étkezéskor a szükséges, nagyobb mennyiségű inzulin, míg az étkezések között állandó, kisebb mennyiség szabadul fel, így stabilizálva a beteg vércukorszintjét. Az inzulin pumpát a testre erősítik és infúziós szereléken át szárnyas tűvel juttatják a bőr alá a szükséges mennyiségű inzulint. Előnye a nagy flexibilitás és a minimális szűrőszám, ezen felül az inzulinadagolás folyamatos, így az összinzulin igény és a vércukor ingadozásis csökken, így a hypoglycaemiák száma is leredukálódik. Az elfogyasztott szénhidrát mennyiség is rugalmasabb, mint a hagyományos inzulinok esetében. A beteg életminősége számottevően javul a flexibilitás növekedése miatt. Az alkalmazásának hátránya a készülékek magas ára és a folyamatos viselés okozta kellemetlenségérzés. A hátrányai ellenére a gyermekgyógyászatban széles körben elterjedt, mivel biztosítható egy gyermek számára a megfelelő inzulinszint a nap folyamán. [77]

3.2.3.1.3. In situ képződő implantátumok

Az in situ képződő implantátumok (In Situ Forming Devices, ISFD) a befecskendezés helyén gélesednek vagy megszilárdulnak, majd meghatározott idő elteltével lebomlanak a szervezetben. A hatóanyagleadás sebessége a polimerek összetételével és molekulatömegével változtatható. A depó képzés mechanizmusa alapján négy alcsoportra oszthatók:

termoplasztikus polimer, keresztterhálósodó polimer, kicsapódó polimer vagy hőérzékeny gél. [78] Például az Oncogel® paklitaxel hatóanyagot tartalmaz, mely hosszú távú hatóanyag felszabadulást biztosít a kezelés során. [79]

3.2.3.2. Intravaginális

A jelenleg forgalomban lévő hüvelygyűrűkkel, három héten keresztül tudják biztosítani a folyamatos hatóanyag-leadást. A hatóanyag felszívódása a hüvely nyálkahártyáján keresztül történik. A NuvaRing® fogamzásgátló hüvelygyűrű 11,7 mg etonogesztrelt és 2,7 mg etinilösztradiolt tartalmaz. A hüvelyben alkalmazott gyógyszerleadó rendszerből 24 óránként átlagosan 0,120 mg etonogesztrel és 0,015 mg etinilösztadiol szabadul fel egy 3 hetes periódus alatt. A gyűrű előállításához etilénvinil-acetát kopolimert használnak, mely 54 mm külső és 40 mm belső átmérőjű, hajlékony, színtelen és sima felületű gyógyszerleadó rendszer. [73]

3.2.3.3. Intraoculáris

Az első szemészetben alkalmazott implantátumot még az 1970-es években engedélyezte az FDA (jelenleg már alkalmazzák) Ocusert® inzeret néven, mely hatóanyagként pilokarpint tartalmazott és glaucoma kezelésére használták. Diffúzió alapuló, membránszabályozott, nulladrendű kinetikával rendelkező gyógyszerleadó rendszert állítottak elő, melyből hét napon keresztül történt a hatóanyag leadása. Nem-biodegradábilis, polietilén-vinil-acetátot használtak polimerként, a hatóanyagot pedig alginát gélben oszlatták el. [73]

Jelenleg Magyarországon az Ozurdex® intravitrealis implantátum van forgalomban, mely dexamethason hatóanyagtartalmú és a makuláris ödéma csökkentésére alkalmazzák. Az implantátumot polilaktid-ko-glikozidból állították elő, pálcika alakú és színtelen, amely egy speciális applikátorral szakemberek által kerül beültetésre az üvegtestbe, a beültetést 4-6 hónaponként kell megismételni. [80]

3.2.3.4. Ortopédiában alkalmazható implantátumok

Az ortopédiai műtétek során is kiemelkedő jelentősége van az implantátumok alkalmazásának. Az antibiotikum tartalmú implantátumokból (például kollagén-gentamicin szivacs vagy PMMA-gentamicin gyöngyök) több hétig tartó, folyamatos hatóanyag felszabadulás biztosítható a műtétet követően, lokálisan a csont környezetében, ami csökkenti a műtéti szövődmények kialakulásának valószínűségét. Ilyen például a kollagén-gentamicin szivacs, amely biodegradábilis, azaz a szervezetben lebomlik, nincs szükség újabb sebészeti beavatkozásra, illetve a PMMA-gentamicin gyöngy, mely nem-biodegradábilis, így újabb

beavatkozásra lesz szükség az eltávolításához. Ezen implantátumok esetében szövődményként osteomielitis alakulhat ki, vagy fém implantátumok esetében metallózis. [81]

3.2.3.5. Fogászati implantátumok

A fogászati implantátumok alkalmazása egy régóta alkalmazott fogászati eljárás, melyet évente több százezer betegen végeznek el világszerte. [82] A fogászati implantátumok előállításához és a beültetés sikerességéhez kiemelkedően fontos a felszíni egyenetlenség és a megfelelő geometria, mely implantátumok jelenleg elfogadott standard eljárásként az állkapocshoz csavarral rögzítettek. A fogászati implantátumok csontcementből, titániumból vagy valamilyen alkalmas polimerből (például poli(éter-éter-keton)-ból) kerülnek előállításra. [24] A 3D nyomtatással lehetőség nyílt hibrid rendszerek előállítására, mely kiküszöböli az egyes alapanyagok hátrányait, így létrehozva az eddigi rigid struktúrákból egy hosszútávon alkalmazható, betegek által könnyen viselhető implantátumot. [83]

4. Célkitűzés

A PhD értekezésem céljából tűztük ki, hogy FDM típusú 3D nyomtatással állítsunk elő különböző gyógyszerleadó rendszereket, illetve az előállított rendszerek megfelelő vizsgálatait elvégezzük.

1. kísérlet sorozat	3D nyomtatás		Laurent Mollet, Prof. Anthony W. Coleman
	Kémiai módosítás		
	Anyagszerkezeti vizsgálatok	Pásztázó elektronmikroszkópia	Florent Perret
		Fourier transzformációs infravörös spektroszkópia	Beomjoon Kim
		Felszíni egyenetlenség vizsgálata	Prof. Anthony W. Coleman
		Pozitron annihilációs élettartam spektroszkópia	Prof. Zelkó Romána, Dr. Kazsoki Adrienn
		Nedvesedési peremszög meghatározás	Prof. Anthony W. Coleman
	Sterilizés		
	Biokompatibilitás	MTT teszt	
		Kristályibolya teszt	Dr. Kovács Renátó
2. kísérlet sorozat	3D nyomtatás		Dr. Papp Ildikó, Dr. Zichar Mariann
	Tömegegységesség		
	PLA degradáció		
	Anyagszerkezeti vizsgálatok	Pásztázó elektronmikroszkópia	Dr. Budai István
		Mikro komputertomográfia	Béres Mónika
		Termogravimetria/ Hőáramlás	Ifj. Dr. Regdon Géza
		Nedvesedési peremszög	
		Raman spektroszkópia	Dr. Elek János, Csontos Máté
	Sterilizés		
	Citotoxicitás	MTT teszt	
	Kioldódás vizsgálat		

3.táblázat – A kutatás során alkalmazott kísérletek sematikus ábrázolása, az utolsó oszlopban feltüntetésre kerültek a társszerzőkkel elvégzett kísérletek.

Az 1. kísérletsorozatunkban a minták kémiai módosítása történt, mely során különböző kémiai oldalláncokat kapcsoltunk a különböző polimerekből előállított implantátumokhoz, így célunk volt:

- a minták anyagszerkezetének vizsgálata:
 - pásztázó elektronmikroszkópiás és felszíni egyenetlenség vizsgálata a felszíni tulajdonságok meghatározásához
 - Fourier transzformációs infravörös spektroszkópiai vizsgálat a kémiai módosításról
 - pozitron annihilation élettartam spektroszkópiai vizsgálat a minták felszínén lévő szabad térfogat meghatározására
 - nedvesedési peremszög meghatározása a minták nedvesedéséről ad információt, ami fontos az esetleges kilökődés szempontjából
- a minták biokompatibilitásának vizsgálata:
 - módosított MTT teszttel a 4., 8. és 12. napon, illetve 1, 2 és 3 hónap esetében a mintákból esetlegesen kioldódó xenobiotikumok sejtkárosító hatásának feltérképezésére
 - biofilm képződésének vizsgálata a minták felszínén *Candida albicans* SC5314 referencia izolátum által

A 2. kísérletsorozatunkban a minták előállítása FDM 3D nyomtatóval történt különböző polimerekből diklofenák-nátrium hatóanyagtartalommal:

- a minták anyagszerkezetének vizsgálata:
 - pásztázó elektronmikroszkópiai és mikro komputertomográfiai elemzés a felszíni tulajdonságok meghatározásához és a belső 3D struktúra feltérképezésére
 - termogravimetriás és differenciális pásztázó kalorimetriai vizsgálatok elvégzése a stabilitás és bomlás feltérképezésére
 - Raman spektroszkópia a különböző kitöltöttségi mintázattal rendelkező minták hatóanyagtartalmának elhelyezkedésének vizsgálatára
- a minták citotoxicitási vizsgálata MTT teszttel
- a minták kioldódásának vizsgálata, a minták hatóanyag kioldódási profiljának feltérképezésére

5. Anyagok és módszerek

5.1. Anyagok

5.1.1. 3D nyomtatáshoz felhasznált anyagok

5.1.1.1. 1. kísérletsorozat

A 3D nyomtatáshoz politejsav (PLA), filamentet használtunk fel, melyet a MakerShop Le Mans-tól (Le Mans, Franciaország) vásároltuk, és száraz, fénytől elzárt körülmények között, szobahőmérsékleten tároltuk. A kereskedelmi forgalomban elérhető filament átmérője 2,85 mm. A nyomtatáshoz felhasznált filament fizikai tulajdonságait a 4. táblázat tartalmazza. A tulajdonságokról szóló eredményeket a MakerShop Le Mas Kft. biztosította.

Tulajdonságok	Módszer	PLA
Fajsúly (g/cm ³)	D792	1,17
Lágyulási hőmérséklet 0.45 MPa (°C)	D790	50
Üvegesedési hőmérséklet (°C)	D3418	54
Szakító szilárdság (Mpa)	ISO 527	39
Nyúlás (%)	ISO 527	6,00

4. táblázat – A felhasznált politejsav filament tulajdonságai

5.1.1.2. 2. kísérletsorozat

A kísérletekhez felhasznált polimereket: politejsav (polylactic acid, PLA), antibakteriális politejsav (antibacterial polylactic acid, Anti PLA), polietilén-tereftalát-glikol (polyethylene terephthalate glycol, PETG) és polimetil-metakrilát (poly(methyl methacrylate), PMMA) a Philament Kft.-től vásároltuk meg. A kereskedelmi forgalomban elérhető filamentek átmérője 1,75 mm. A nyomtatáshoz felhasznált filamentek fizikai tulajdonságait az 5. táblázat tartalmazza, míg a 3D nyomtatás utáni mérési eredményeket a 6. táblázat. A jellemzést a Philament Kft. (Szigetszentmiklós, Magyarország) szolgáltatta.

Tulajdonságok	Módszer	PLA	PLA antibakteriális	PETG	PMMA
Fajsúly (g/cm ³)	D792	1.24	1.24	1.29	1.17
Lágyulási hőmérséklet 0.45 MPa (°C)	D790	55	80-90	68	106
Üvegesedési hőmérséklet (°C)	D3418	55-60	55-60	80	105

3D nyomtatóval előállított implantátumok biokompatibilitási vizsgálatai

Szakító szilárdság (Mpa)	ISO 527	60	66	53	90
Nyúlás (%)	ISO 527	6,00	3,31	4,01	15,0
Rugalmassági modulus (Mpa)	ISO 527	3800	4400	2040	2900
Izod ütőszilárdság (bemetszett) (kJ/m ²)	ISO 180	16	118	4,5	6,4

5. táblázat – A felhasznált filamentek tulajdonságai

Tulajdonságok	Módszer	PLA	PLA antibakteriális	PETG	PMMA
Szakító szilárdság (Mpa)	ISO 527	31,6	33,0	43,0	83,0
Rugalmassági modulus (Mpa)	ISO 527	1800	2300	2800	3200
Izod ütőszilárdság (bemetszett) (kJ/m ²)	ISO 180	2,6	3,8	9,4	2,0

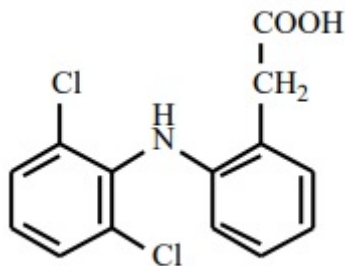
6. táblázat – A nyomtatott filament szálak 3D nyomtatást követően mért tulajdonságai

5.1.2. Kémiai módosításhoz felhasznált anyagok

Az etilén-diamin (ethylene diamine, ED), trietilén-tetramin (triethylenetetramine, TET), N-metil-1,3-propán-diamin (*N*-methyl-1,3-propanediamine, NMePrN), 2,2'-etiléndioxi-dietilamin (2,2' (ethylenedioxy)diethylamine, NPEGN) és tris(2-aminoetil)-amin (tris(2-aminoethyl) amine, Tris) vegyszereket a Sigma-Aldrich Kft.-től (Budapest, Magyarország) vásároltuk meg. A bisz(aminopropil)-amin (bis(aminopropyl)amine, BAPA), vegyszert a Molar Kft.-től (Halásztelek, Magyarország) vásároltuk meg. Minden vegyszert az előírásoknak megfelelő körülmények között tároltunk és hígítás nélkül alkalmaztunk. Az ioncserélt vizet Millipore berendezés (Merck Millipore Direct-Q 5 UV, Millipore SAS, Merck Kft. Budapest, Magyarország) felhasználásával állítottuk elő.

5.1.3. Diklofenák nátrium

A diklofenák-nátriumsót a Tokyo Chemical Industry Co.-tól (Oxford, Anglia) származott. A diklofenák nátrium Ph. Eur. 10. kiadásának megfelelő tisztaságú. Hivatalos neve diclofenacum natricum. A Ph. Hg. VIII. kiadásának II. kötete alapján fehér vagy enyhén sárgás, kristályos por. Kissé nedvszívó. Vízben mérsékleten, metanolban bőségesen oldódik, míg alkoholban oldódik.



2. ábra – A diklofenák szerkezeti képlete

Hatásmechanizmusának alapja a ciklooxygenáz (COX) enzim gátlása. A COX-2 gátlásán alapszik a nem-szteroid gyulladáscsökkentő, illetve a láz- és fájdalomcsillapító hatás, míg a COX-1 enzim gátlása felelős az ulcerogén mellékhatás kialakulásáért. A diklofenák-nátrium lokális vagy szisztémás hatás kifejtésére is képes az alkalmazott gyógyszerformától és az alkalmazás helyétől függően például végbélkúp, kapszula, tabletta vagy injekció formájában. [84] A diklofenák-nátrium implantálható gyógyszerleadó rendszerként is használható lokálisan a gyulladásos válasz csökkentésére és az esetleges kilökődés meggátlására. [85]

A diklofenák-nátrium a biofarmáciai klasszifikációs rendszerben (BSC) II-es csoportba tartozik és számos kutatócsoport használja gyógyszerleadó rendszerként a kioldódási profil meghatározásához. A diklofenák-nátrium könnyen mérhető UV-VIS spektrofotometriával a jó vízdékonyságának és a semleges pH-jának köszönhetően. [86]

A diklofenák-nátrium orális adagolást követően gyorsan abszorbeálódik a gasztrointesztinális traktuson keresztül és a felszívódott hatóanyag nagyon erősen kötődik humán szérum fehérjékhez, elsősorban albuminhoz (>99,5 %), mely egy gyorsan lejárású folyamat. [87] A szisztémás vérkeringésbe a felszívódott vegyület körülbelül 60 %-a jut be a máj first pass metabolizmusa miatt. A biotranszformáció során aromás hidroxiláció és konjugáció történik. A vegyület körülbelül 65 %-a a vizelettel ürül ki a szervezetből, nagyrészt metabolitként vagy konjugátumként, míg nagyon kis mennyiségben változatlan formában. Felezési ideje körülbelül 1 óra intravénás, míg 2 óra orális adagolást követően. [88]

5.2. Módszerek

A két kísérletsorozathoz tartozó módszereket csoportosítva írtam le.

5.2.1. 1. kísérletsorozat

5.2.1.1. 3D nyomtatás

A minták 3D objektumként való tervezéséhez Inventor programot használtunk. A kísérleti minták előállítása 2,85 mm-es filamentből történt. [89] A 3D nyomtatáshoz Lulzbot Taz 5 vagy Lulzbot Mini 3D nyomtatót használtunk. (Aleph Objects Inc, Loveland, CO, USA). A nyomtatási paraméterek a 7. táblázatban találhatóak. A minták átmérője 14 mm, a vastagságuk 3 mm volt. A Lulzbot Mini nyomtatón egyszerre 25 mintát, míg a Lulzbot Taz 3D nyomtatón egyszerre 50 mintát tudtunk előállítani. [18]

3D nyomtató	Lulzbot Mini	Lulzbot Taz 5
Filament típusa	PLA	PLA
Gyártó	Maker Shop France	Maker Shop France
Filament átmérő [mm]	2,85	2,85
Nyomtatófej átmérő [μm]	350	350
Kitöltöttségi százalék [%]	100	100
Extrudálási hőmérséklet [°C]	215	215
Tálca hőmérséklet [°C]	60	60
Rétegvastagság [μm]	50	75
Nyomtatási sebesség [mm/s]	50	50

7. táblázat - A 3D nyomtatáshoz használt nyomtatási paraméterek a két Lulzbot 3D nyomtató esetében

5.2.1.2. Kémiai oldallánc módosítás

Az alkalmazott amidációs reagenszek: etilén-diamin (ED), trietilén-tetramin (TET), N-metil-1,3-propán-diamin (NMePrN), bisz(aminopropil)-amin (BAPA), 2,2 '(etilén-dioxi)-dietilamin (NPEGN), tris (2-aminoetil)-amin (Tris), aminomethán szulfocianid (aminomethane sulfocianid, AMS) és 5'-monofoszfát-monohidrát (5'-monophosphate monohydrate, AMP). Minden reagensből összesen 1000 ml 1 M-os oldatot készítettünk desztillált vízben történő elegyítéssel vagy feloldással. Egyéb segédanyagokat nem adtunk hozzá, mivel az adenzin-monofoszfát (AMP) alkalmazásával végzett előzetes kísérletek során tiszta funkcionálisizáció történt a fentebb említett oldószer alkalmazásával és az alkalmazott kísérleti körülmények között. [90]

A 3D nyomtatott mintákat egy főzőpohárba helyeztük és hozzáadtunk 100 ml reagens oldatot, ez a módszer lehetővé teszi alacsony illékonyságú reagensek alkalmazásával, zárt, vizes körülmények között történő kémiai oldallánc módosítást. A főzőpoharakat lezártuk és mozgó inkubátorban 24 órán át 20 °C-on kevertettük. A mintákat ezután kivettük, és ötször mostuk 50 ml desztillált vízzel. Végül az implantátumokat szobahőmérsékleten, pormentes körülmények között szárítottuk 24 órán keresztül. A mintákat a felhasználásig légmentesen záródó centrifugacsövekben tároltuk. [91]

5.2.1.3. Anyagszerkezeti vizsgálatok

5.2.1.3.1. Pásztázó elektronmikroszkópia (SEM)

A SEM felvételeket FE-SEM S-5000 téremissziós pásztázó elektronmikroszkóppal (field emission scanning electron microscopy) (Hitachi Ltd., Tokió, Japán) készítettük el. A vizsgálat előtt a minták felszínére 4 nm palládium lett elhelyezve atomi rétegleválasztással (atomic layer deposition, ALD) és az így kapott mintákat egy éjszakán át vákuumban tartottuk a vizsgálatok elvégzése előtt. [51]

5.2.1.3.2. Fourier transzformációs infravörös spektroszkópia (FTIR)

Az 1. kísérletsorozatban kémiai módosítással előállított PLA minták Fourier transzformációs infravörös (Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR) spektrumát szobahőmérsékleten rögzítettük IRAffinity-1S FTIR spektrométerrel (Shimadzu Corporation, Kiotó, Japán) 600–4000 cm^{-1} hullámszám-tartományban. A méréshez csillapított teljes visszaverődés (attenuated total reflection, ATR) modult (Miracle 10) alkalmaztunk, míg a spektrumrögzítőt átviteli (%) módban alkalmaztuk. [92]

5.2.1.3.3. Felszíni egyenetlenség vizsgálata

Az 1. kísérletsorozattal előállított mintákat megvizsgáltuk a felszíni egyenetlenség szempontjából is. A kísérlethez VHX 6000 optikai mikroszkópot (Keyence Corporation, Jonage, Franciaország) használtunk, a képeket a mikroszkóphoz tartozó belső szoftverrel átalakítottuk, hogy a kapott vonalprofilokat összehasonlíthatóvá tegyük. [93]

5.2.1.3.4. Pozitron annihilációs élettartam spektroszkópia (PALS)

A mintákat pozitron annihilációs élettartam spektroszkópiával (positron annihilation lifetime spectroscopy, PALS) is megvizsgáltuk (Budapest, Magyarország). A vizsgálatához hordozó nélküli $^{22}\text{NaCl}$ -ből készült pozitron forrást használtunk, melynek aktivitása 106 Bq körül volt. A mintákat két nagyon vékony Kapton® fólia közé zártuk. A pozitron forrást két

vizsgálati minta közé helyeztük el. A spektrumot BaF² / XP2020Q detektorokon és Ortec® elektronikán alapuló gyors – gyors egybeesési rendszerrel mértük. Minden mintából három párhuzamos spektrumot vettünk fel. A spektrumokat a RESOLUTION számítógépes szoftverrel értékeltük ki. Mindegyik minta esetében három fő komponenszt találtunk, és a leghosszabb komponenszt, mint pozitronium hármassállapot (pozitronium triplet state, o-Ps) azonosítottuk. [94]

5.2.1.3.5. Nedvesedési peremszög meghatározás

A nedvesedési peremszög mérését Krüss goniométer (Krüss GmbH., Hamburg, Németország) segítségével végeztük el DSA3 szoftver segítségével. Mindegyik minta felszínére 10 µl desztillált vizet pipettáztunk, és a csepp alakjáról felvételt készítettünk. A nedvesedési peremszög értékeit a mérőműszer saját Krüss szoftverének segítségével határoztuk meg. A méréseket minden kísérleti minta esetében minimum tízszer hajtottuk végre, és az eredményeket átlagoltuk. [95]

5.2.1.4. Sterilizálás

A mintákat 70%-os etanolban áztattuk 12 óra hosszáig lamináris légáramú boxban. Ezután steril mull-lapra helyeztük a mintákat és UV fénnel sterilizáltuk 2 órán keresztül, majd megfordítottuk és a másik oldalát is 2 óráig hagytuk így. [96]

5.2.1.5. Biokompatibilitás

5.2.1.5.1. Sejt passzálás

A kísérleteimet colon adenocarcinoma 2 (Caco-2) sejtvonalon végeztem el, melyet az európai sejt kultúra gyűjteményből kaptunk (ECACC, No.86010202, London, Anglia). A sejtek passzálását laminár boxban végeztem el. A munka megkezdése előtt 20 percig UV lámpát alkalmaztam, a felületek fertőtlenítésére pedig 70%-os etanolt. A sejtekről óvatosan eltávolítottam az elhasznált médiumot, majd steril PBS-sel (foszfáttal puffereelt sóoldat) lemostam a sejteket. 4 ml 0,05%-os tripszin-EDTA (etilén-diamin-tetraecetsav) oldattal inkubáltam a sejteket a 37 °C -os 5 v/v% -os CO₂ inkubátorban, amíg a sejtek fel nem váltak a flaska aljáról, de maximum 10 percig. Ezt követően a flaska tartalmát 10 ml-re kiegészítettem DMEM (Dulbecco's modified eagle medium: 3,7 g/l nátrium-hidrogén-karbonát, 10 v/v% hő-inaktivált magzati szarvasmarha szérum (FBS, fetal bovine serum), 1 v/v% nem-esszenciális aminosav oldat, 1 v/v% L-glutamin, 100 NE/ml penicillin, 100 µg/ml sztreptomycin) médiummal, majd homogenizáltam, a flaska tartalmát centrifugacsőbe tettem és 6 percig 1100 g-n 24 °C-on centrifugáltam. Eközben mikroszkóp alatt megszámláltam a sejteket. A

lecentrifugált sejtekről óvatosan leszívtam a felülúszót és 10 ml friss médiummal szuszpendáltam a sejteket. Az 1 vagy 2 millió sejtet tartalmazó, kiszámolt térfogatú sejtszuspenziót új flaskába (ThermoFisher®, Waltham, MA, USA) mértem és kiegészítettem a flaska tartalmát 10 ml-re DMEM médiummal. A flaskát szignáltam, mikroszkóp alatt ellenőriztem a sejtek jelenlétét és végül inkubátorba helyeztem a flaskát. Három-négy nap múlva médiumot cseréltem a sejteken, majd hét nap múlva passzáltam a sejteket a monolayer kialakulását követően. A citotoxicitás vizsgálatához 20 és 40 közötti passzázs számú sejteket használtam fel. [97]

5.2.1.5.2. MTT teszt

Az MTT teszthez lapos aljú, 96-os plattere szélesztettem $1 \cdot 10^4$ vagy $3 \cdot 10^4$ sejt/lyuk sejtszuspenziót. A vizsgálatához a steril mintákat 2 ml DMEM médiumot tartalmazó centrifugacsőbe tettem a 4., 8. és 12. napi vizsgálatig, ezeket a mintákat 37 °C-on tároltam sejtinkubátorban.

A vizsgálat elvégzése laminár boxban történt, a munka megkezdése előtt 20 percig UV lámpát használtam, míg a felületfertőtlenítéshez 70%-os etanolt. Először mikroszkóppal ellenőriztem a platen a monolayer megfelelőségét, majd a sejtekről óvatosan leszívtam az elhasználtmédiumot. 200-200 µl/lyuk steril PBS-sel mostam a sejteket, majd újra ellenőriztem a sejteket. Ezt követte a minta felvitele: 200 µl minta/lyuk, mindegyik mintából három párhuzamos minta felvitele. A 10 v/v% Triton-X oldat a pozitív kontroll, mivel ez biztosan elpusztítja az élő sejteket, szolubilizáló tulajdonsága miatt. A DMEM médium pedig a negatív kontroll, amely azonos körülmények között volt tárolva, mint a vizsgálati minták. 37 °C-on 30 percig inkubáltam a sejteket az oldatokkal, ezzel egyidejűleg pótoltam a centrifugacsövekből a felhasznált mennyiségű DMEM médiumot. Eltávolítottam a teszt oldatokat a sejtekről és PBS-sel mostam a sejteket. Ezt követően 100 µl 5 mg/ml MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) - PBS (1:9) oldatot mértem a sejtekre és 37 °C-on 3 óráig inkubáltam. Az inkubációt követően, leszívtam az MTT festéket tartalmazó oldatot és a sejteket 100 µl sósav-izopropanol oldattal (izopropanol: 1.0 N sósav = 25:1) szuszpendáltam. Végezetül Fluostar Optima microplate reader (ThermoFisher®, Waltham, MA, USA) spektrofotométerrel mértem a minták abszorbanciáját. A sejtéletképességi százalék a negatív kontrollhoz viszonyítva van kifejezve. [98]

5.2.1.5.3. Kristályibolya teszt

A kristályibolya festési módszerrel történő vizsgálatához laminár boxban dolgoztunk. Fiziológias sóoldatban, centrifugálással elkészítettük a *Candida albicans* SC5314 referencia

izolátumot. a sejtuszuszenzió 10^6 gomba/ml tartalmú. 500 μ l referencia izolátumot kiegészítettük 10 ml-re RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 tápfolyadékkal. A steril implantátumokat egyenként 12-es plate-re helyeztük steril csipesszel, majd 1 ml-t mértünk az elkészített oldatból mindegyik implantátumra és 37 °C-os 5 v/v% CO₂ tartalmú inkubátorba tettük 24 órára. [99] A 24 óra elteltével háromszor mostuk az implantátumokat fiziológiás sóoldattal. Ezt követően új 12-es plate-be tettük a mintákat és 1-1 ml 0,1%-os kristályibolya oldattal inkubáltuk 10-15 percig. Ezt követte egy újabb mosási lépés háromszor 5 ml fiziológiás sóoldattal. Új plate-be tettük az implantátumokat és 1-1 ml 30 %-os ecetsavval inkubáltuk az implantátumokat 10-15 percig. Mindegyik oldatból kétszer 100 μ l-t mértünk 96-os platebe és mértük az abszorbanciát 540 nm-en Anthos HTII spektrofotométerrel. (Anthos, Salzburg, Ausztria) [100]

Három párhuzamos mérést végeztünk a pontosabb eredmény meghatározásához. Ezeket átlagolva kaptuk meg a biofilm képződési képességet. Továbbá mértük az implantátum minták önmagukban történő, gomba izolátum nélküli kristályibolya kötődését is, mely eredményt kivontuk a kapott biofilm formálási készségből.

5.2.1.6. Statisztikai elemzés

Az adatokat a GraphPad Prism (7.0 verzió; GraphPad Software Inc., Kalifornia, CA, USA) segítségével elemeztük. A minták átlagát és $\pm$ szórás értékeit (standard deviation, SD) számítottuk ki a mérési adatokból. A mintacsoportok összehasonlításához egyirányú ANOVA tesztet végeztünk a STATISTICA program 13.2 verziójában (Statsoft Hungary Kft., Budapest, Magyarország), 95%-os konfidencia szinten; az eredményeket szignifikánsnak tekintettük $p < 0,05$ -nél. Ha a módszer leírása máshogy nem említi, akkor a kísérletet három párhuzamos mintán hajtottuk végre, és legalább háromszor megismételtük. [101]

5.2.2. 2. kísérletsorozat

5.2.2.1. 3D nyomtatás

A minták digitális modelljeit a SolidWorks program (Dassault Systemes, Párizs, Franciaország) felhasználásával terveztük meg az stl (standard tessellation language) fájl formátumhoz. [102] Mindegyik nyomtatott minta 2,4 mm magas, de három különböző értéket alkalmaztunk átmérőként: 16, 19 és 22 mm. Mivel a hatóanyag kioldódása főleg a minták felső és alsó felületén keresztül történik, az átmérőket úgy választottuk meg, hogy a növekedés 150, illetve 200%-os legyen. [103] A minták összes többi tulajdonságát a 3D nyomtatóhoz tartozó szoftverben állítottuk be, jelen esetben a Slicer Prusa Edition-t használtuk. A minták kitöltöttségi százalék értékeit: 0, 5, 10 és 15%, a nyomtatott héjak számát: 1, a felső és alsó

rétegek számát pedig: 2-re állítottuk be. Egy nyomtatás során egyszerre 10 minta volt nyomtatható a Prusa i3 MK2 nyomtatóval (Prusa, Prága, Csehország), melyet a kísérleteinkhez használtunk. A 3D nyomtatási folyamat során alkalmazott tulajdonságokat az alábbi, 8. táblázat foglalja össze. [104]

Filament Típusa	PLA	Antibakteriális PLA	PETG	PMMA
Filament átmérő [mm]	1,75	1,75	1,75	1,75
Nyomtatófej átmérő [μm]	400	400	400	400
Kitöltöttségi százalék [%]	0, 5, 10, 15	0, 5, 10, 15	0, 5, 10, 15	0, 5, 10, 15
Nyomtatási hőmérséklet [°C]	215	215	250	270
Tálca hőmérséklet [°C]	60	60	90	110
Rétegvastagság [μm]	200	200	200	200

8. táblázat - A 3D nyomtatáshoz használt paraméterek a Prusa i3 MK2 nyomtató esetében

5.2.2.2. Tömegegységesség és hatóanyagtartalom meghatározása

Minden egyes kísérleti minta tömegét lemértük a nyomtatást követően, melyből átlagot számítottunk. Ezután a mintákat összetörtük a hatóanyagtartalom egységességének meghatározása céljából. A mintákat egyenként oldottuk 100 ml desztillált vízben, és 60 percig kevertük. A hatóanyagmennyiségét UV spektrofotometriával határoztuk meg ThermoScientific™ Multiskan™ GO mikroplate spektrofotométerrel (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) 276 nm hullámhosszon. [105]

5.2.2.3. PLA degradáció

Az in vitro degradáció vizsgálatához a PLA és antibakteriális PLA filamentből készült mintákat szimulált testfolyadékban (simulated body fluid, SBF) inkubáltuk 37 °C-on, 10 fordulat/perc keverés mellett, 8 hétig. (Heidolph Inkubátor 1000 és Polymax 1040, Heidolph GmbH, Schwabach, Németország). Az SBF oldatot 0,353 g NaHCO₃, 0,224 g KCl, 7,995 g NaCl, 0,305 g MgCl₂ * 6 H₂O, 0,228 g K₂HPO₄ * 3 H₂O, 0,071 g Na₂SO₄ és 0,227 g CaCl₂ feloldásával egy liter desztillált vízben készítettük el. [106] A pH-t 7,4-re állítottuk be Tris-HCl-dal. A degradáció teszthez három párhuzamos mintát tettünk 20 ml SBF-oldatba. Heti időközönként a mintákat desztillált vízzel mostuk és az inkubátorban 60 °C-on szárítottuk. A súlyt MettlerToledo AX105 DeltaRange analitikai mérleggel (Columbus, OH, USA) mértük, majd kiszámítottuk az átlagot. Az inkubációs közeget minden héten friss (pH = 7,4) SBF-oldattal helyettesítettük. [107]

5.2.2.4. Anyagszerkezeti vizsgálatok

5.2.2.4.1. Pásztázó elektronmikroszkópia (SEM)

A pásztázó elektronmikroszkópiás felvételeket Hitachi Tabletop Microscope 3030 (TM3030) (Hitachi, Tokió, Japán) készülékkel készítettük el. A SEM vizsgálat előtt porlasztott arany bevonat került a minták felületére, hogy elkerüljük a minták feltöltődését és megolvadását. A méréshez vákuumot és alacsony gyorsítófeszültséget alkalmaztunk. Az általunk használt TM3030 mikroszkópban az alkalmazott detektor egy energiadiszperzív spektrometria (energy dispersive spectrometry, EDS). A SEM képekhez különböző nagyításokat alkalmaztunk. [108]

5.2.2.4.2. Mikro komputertomográfia (MicroCT)

A mikro komputertomográfiai (microCT) méréshez SkyScan 1272 (Bruker, Kontich, Belgium) berendezést használtunk. A mérés során alkalmazott paraméterek a következők voltak: pixel méret 5 μm ; mátrixméret 2688 x 4032 (sorok x oszlopok); feszültség 50 kV; áram 200 μA ; a forgás léptéke (deg) 0,200. Siktér és geometriai korrekciót is alkalmaztunk. A minta vizsgálatát követően SkyScan NRecon szoftvert (2.0.4.2. verzió) használtunk a keresztmetszeti képek elemzéséhez, mely során utóigazítás, az úgynevezett „beam-hardening” korrekciója, az esetlegesen keletkezett gyűrű alakú képződmények korrekciója („ring artefact correction”) és simítás történt. A háromdimenziós ábrák megjelenítéséhez CTvox szoftvert használtunk (Bruker, Kontich, Belgium). [108]

A minták közötti pontos különbséget ImageJ szoftverrel számítottuk ki (Madison, WI, USA). A méréshez három párhuzamos felszíni metszetet vizsgáltunk meg 5 μm -es pixel mérettel. Az eredeti microCT képeket 8 bites szürkeárnyaltos képekké alakítottuk át, mellyel minden pixelhez tartozó színinformációt átalakítottunk fekete-fehérre. Ezután kijelöltük a minta felszínét és a szoftver automatikusan értékelte a filament százalékos arányát. [109]

5.2.2.4.3. Termogravimetriás (TG) és differenciális pásztázó kalorimetriai (DSC) elemzés

A minták termogravimetriás (thermogravimetric, TG) és differenciális pásztázó kalorimetriai (differential scanning analysis, DSC) vizsgálatát Mettler-Toledo TGA/DSC1 berendezéssel végeztük el (Mettler-Toledo GmbH, Colombus, OH, USA)). Minden vizsgálati mintából 40 μl térfogatnyi mennyiséget zárható alumínium hengerbe helyeztünk. Az alkalmazott hőmérsékleti tartomány 25-500 $^{\circ}\text{C}$, míg a felfűtés léptéke 10 $^{\circ}\text{C}/\text{perc}$ volt. A mintákat nitrogén atmoszférában vizsgáltuk (sejt gáz: 50 ml/perc, módszer gáz: 70 ml/perc). A kapott TG/DSC görbék kiértékelése STAR^e programmal történt (Mettler-Toledo GmbH, Colombus, OH, USA)). [110]

5.2.2.4.4. Nedvesedési peremszög meghatározás

A 2. kísérletsorozatban használt módszer megegyezik a korábban ismertetett 5.2.1.3.5. Nedvesedési peremszög meghatározása módszerrel.

5.2.2.4.5. Raman spektroszkópia

A 2. kísérletsorozatban előállított PLA_16_0, PLA_16_5, PLA_16_10 és PLA_16_15 minták hatóanyag mennyiségét Raman spektroszkópiával határoztuk meg. A PLA_16_0 mintának csak egy ürege van, de a többi mintának hat belső ürege van, különböző kitöltöttségi százalékokkal (5, 10 és 15%). Először egy lyukat fúrtunk egy-egy üreg fölé, kis átmérőjű ($d < 0,5$ cm) fúróval. Ezután a kinyert hatóanyagot 4-4 ml 96 %-os etanolban oldottuk. A hatóanyag mennyiségének meghatározásához hétpontos kalibrációs görbét készítettünk 0,1 mg/ml és 15 mg/ml közötti koncentrációtartományban. A Raman spektroszkópiai mérést Wasatch Photonics WP-785-R-SR_1-50 berendezéssel (Morrisville, NC, USA) végeztük el. A Raman-spektrumokat kvarc küvettában határoztuk meg, 1 cm-es optikai úthosszat alkalmazva. A detektor töltéshez kapcsolt eszköz (charge-coupled device, CCD) volt, a detektor hőmérséklete 10 °C, a lézersugár hullámhossza 785 nm, az integrációs idő 500 ms és a letapogatási idő 32 s. A spektrumokat többváltozós regressziós modellezéssel elemeztük a legkisebb négyzetek (Partial Least Squares, PLS) módszerének elve alapján CAMO Unscrambler X 10.5.1 verziójú szoftverben (Oslo, Norvégia). A diklofenák-nátrium mennyiségét minden üregben, a kalibrációs görbe segítségével határoztuk meg.[111]

5.2.2.5. Sterilezés

A 2. kísérletsorozatban használt módszer megegyezik a korábban ismertetett 5.2.1.4. Sterilezés módszerrel.

5.2.2.6. Citotoxicitás

A 2. kísérletsorozatban használt módszer megegyezik a korábban ismertetett 5.2.1.5.1. Sejt passzálás és 5.2.1.5.2. MTT teszt módszerrel. [96]

5.2.2.7. Kioldódás vizsgálat

A diklofenák-nátrium hatóanyagtartalmú minták esetében a kioldódás vizsgálatához USP I. típusú (forgókosaras) Erweka DT 800 kioldódás vizsgáló készüléket alkalmaztunk, automatikus mintavevő rendszerrel (Ismatec IPC) (Erweka GmbH, Langen, Németország). 900 ml 1,0 M foszfátpuffer oldatú kioldóközeget (pH 7,4) használtunk a kísérleteinkhez. A forgási sebességet 100 fordulat/perc, a hőmérsékletet 37 °C-ra állítottuk be. Minden mintát a

forgókosárba helyeztünk. Minden mérési időpontnál 3 ml mintát vettünk. A mintákat 0,083; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 2; 4; 6; 8; 12; 14; 16; 18; 20 és 24 órákor vettük le az automatikus mintavevő segítségével. [16] A kioldódó diklofenák koncentrációját UV spektrofotometriával határoztuk meg ThermoScientific™ Multiskan™ GO mikroplate spektrofotométerrel (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) 276 nm hullámhosszon. Az összes mintát az összes mérési ponton 96 lyukú UV-Star® mikroplate-be pipettáztuk (Greiner Bio-One Kft., Mosonmagyaróvár, Magyarország), és az abszorbanciát 276 nm-en mértük. A kioldódási kísérleteket hat párhuzamos mintán végeztük el. [112]

5.2.2.8. Statisztikai elemzés

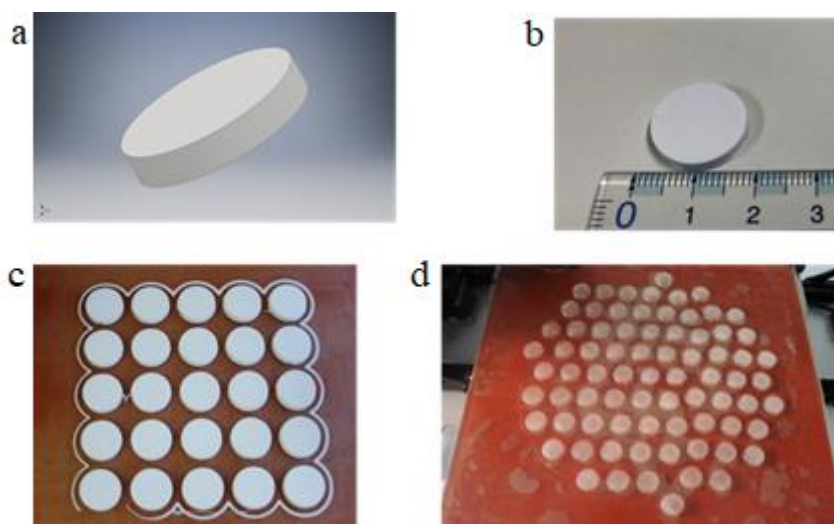
Az adatokat a GraphPad Prism (7.0 verzió; GraphPad Software Inc., Kalifornia, CA, USA) segítségével elemeztük, a minták átlagát és $\pm$ szórás értékeit (standard deviation, SD) is meghatároztuk. A mintacsoportok összehasonlításához egyirányú ANOVA tesztet végeztünk el, 95 %-os konfidencia szinten; az eredményeket szignifikánsnak tekintettük $p < 0,05$ -nél. A Design-Expert® szoftver 10.0 verzióját (Stat-Ease Int., Minneapolis, MN, USA) használtuk a történeti statisztikai adatok elemzéséhez ANOVA tesztel a kioldódási vizsgálatok esetében. Ha a módszer leírása máshogy nem említi, akkor a kísérletet három párhuzamos mintán hajtottuk végre és legalább háromszor megismételtük. [101]

6. Eredmények

6.1. 1. kísérletsorozat

6.1.1. 3D nyomtatás és kémiai módosítás

A kísérleteinkhez a 3D nyomtatott mintákat a lyoni Claude Bernard egyetemen állították elő. A nyomtatáshoz politejsav filamentet alkalmaztak, melyet a 215 °C-ra felmelegített 0,4 mm átmérőjű nyomtatófejen keresztül nyomtattak. A nyomtatott rétegek vastagsága 50 és 75 μm között változott. A minták kitöltöttségi százaléka 100% volt, mely megfelelő porozitást biztosít a nyomtatott szálak közötti kisméretű üregeknek köszönhetően, illetve megfelelő mechanikai szilárdságot, így a kémiai módosításhoz használt oldószerek nem jutnak be a minta belsejébe. A nyomtatott minták átmérője 14 mm, míg a magassága 3 mm, amint az a 3. ábrán is látható.

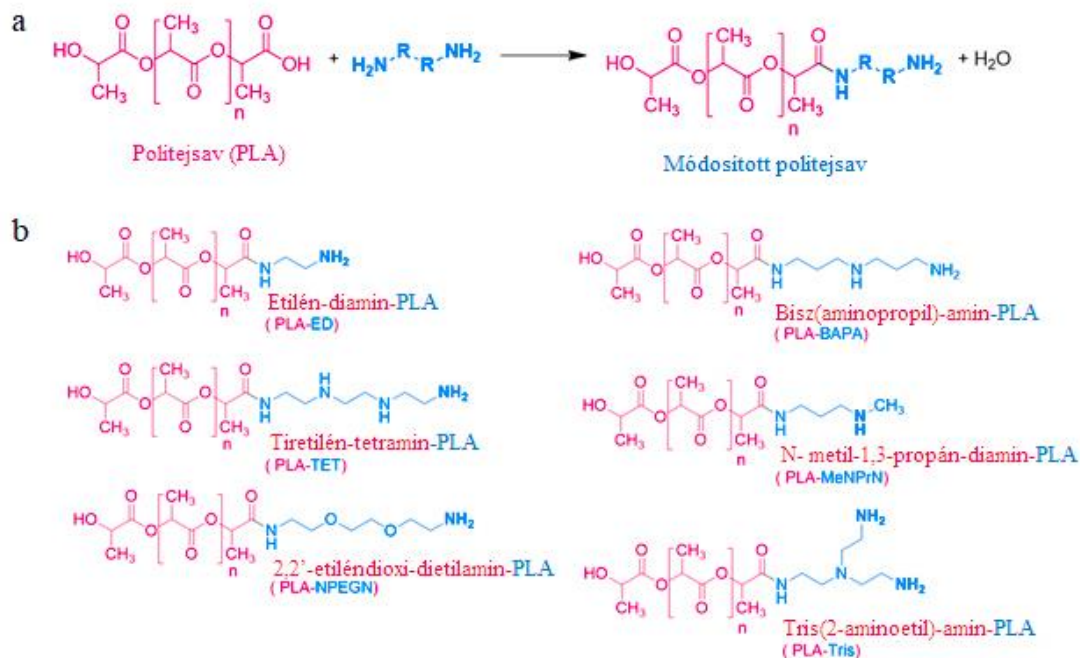


3. ábra - A nyomtatott minták a) A megtervezett minta stl (standard tessellation language) file formátumban b) A nyomtatott minta átmérője 14 mm c) A Lulzbot Mini nyomtatón egyszerre 25 mintát tudtunk nyomtatni d) A Lulzbot Taz 5 nyomtatón egyszerre 50 mintát tudtunk nyomtatni.

A politejsav minták kémiai oldallánc módosítása különböző aminokkal történt, melyek hatását eddig egy kutatócsoport sem vizsgálta, ezért számít ez a kísérlet újdonságnak. A felszínmódosításhoz használt kémiai reakciók elve a 4. ábrán a) látható, illetve a módosulatok szerkezeti képlete is. (4. ábra b))

A kémiai anyagok kiválasztásakor az volt a szempont, hogy hidrofíl oldalláncokat kapcsoljunk a PLA-hoz, melyeknek eltérő a természete: az etilén-diamin (ED) rövid szénláncú primer amin fejcsoporttal, a trietilén-tetramin (TET) és a bisz(aminopropil)-amin (BAPA)

oligoamin csoporttal rendelkezik, az N-metil-1,3-propán-diamin (NMePrN) rövid szénláncú szekunder amin csoportot, a 2,2'-(etilén-dioxi)-dietilamin (NPEGN) egy rövid polietilén-glikol vázat, míg a tris (2-aminoetil)-amin (Tris) elágazó amino csoportot tartalmaz.

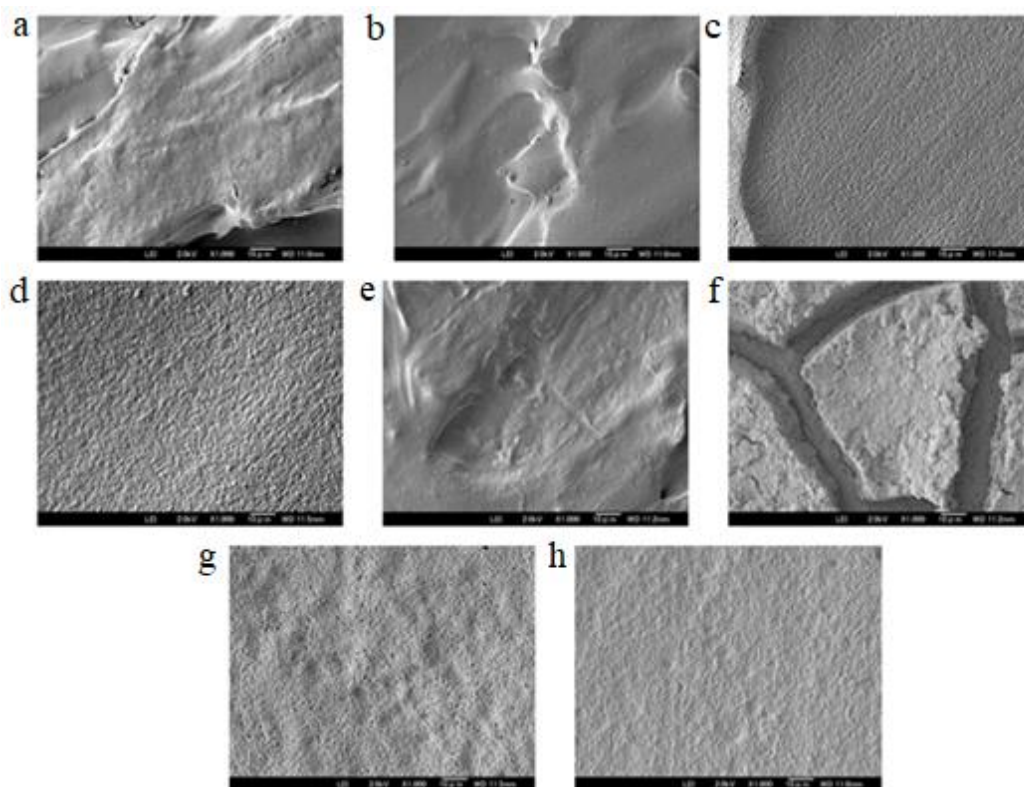


4. ábra - A kémiai módosítás reakcióegyenlete a) és a kémiai oldalláncmódosítással kapott anyagok kémiai szerkezete b).

6.1.2. Anyagszerkezeti vizsgálatok

6.1.2.1.1. Pásztázó elektronmikroszkópia (SEM)

Az alapváz és a kémiai módosítással kapott minták felületét pásztázó elektronmikroszkóppal teszteltük a lyoni Claude Bernard Egyetemen. Vizsgálatunk során a politejsav (PLA) minta esetében mind a kezeletlen felület, mind az ioncserélt vízzel mosott felület egyenletlen. A mosást követően a mintafelületet simábbnak láttuk. Az alábbi 5. ábrán látható hat oldalláncmódosított minta közül négy módosított minta esetében c) PLA-BAPA, d) PLA-ED, g) PLA-Tris és h) PLA-NPEGN) egyenletes, lapos felszínűt kaptunk, egyenletesen eloszlott pórusokkal. A Tris módosulat esetében g) a pórusátmérő körülbelül 1 μm volt. A PLA-TET módosulat e) felszíne nagymértékben hasonlított a kezeletlen minta felületére, viszont a felszínen apró bemélyedések voltak láthatóak, körülbelül 100-200 nm átmérőjűek. Végül a PLA-MeNPrN f) módosított felület esetében a felszínen jéghegy-szerű struktúrák láthatóak, melyek felülete sík. A SEM ábrák megerősítik, hogy a 3D nyomtatott oldalláncmódosított PLA minták felülete megváltozott.

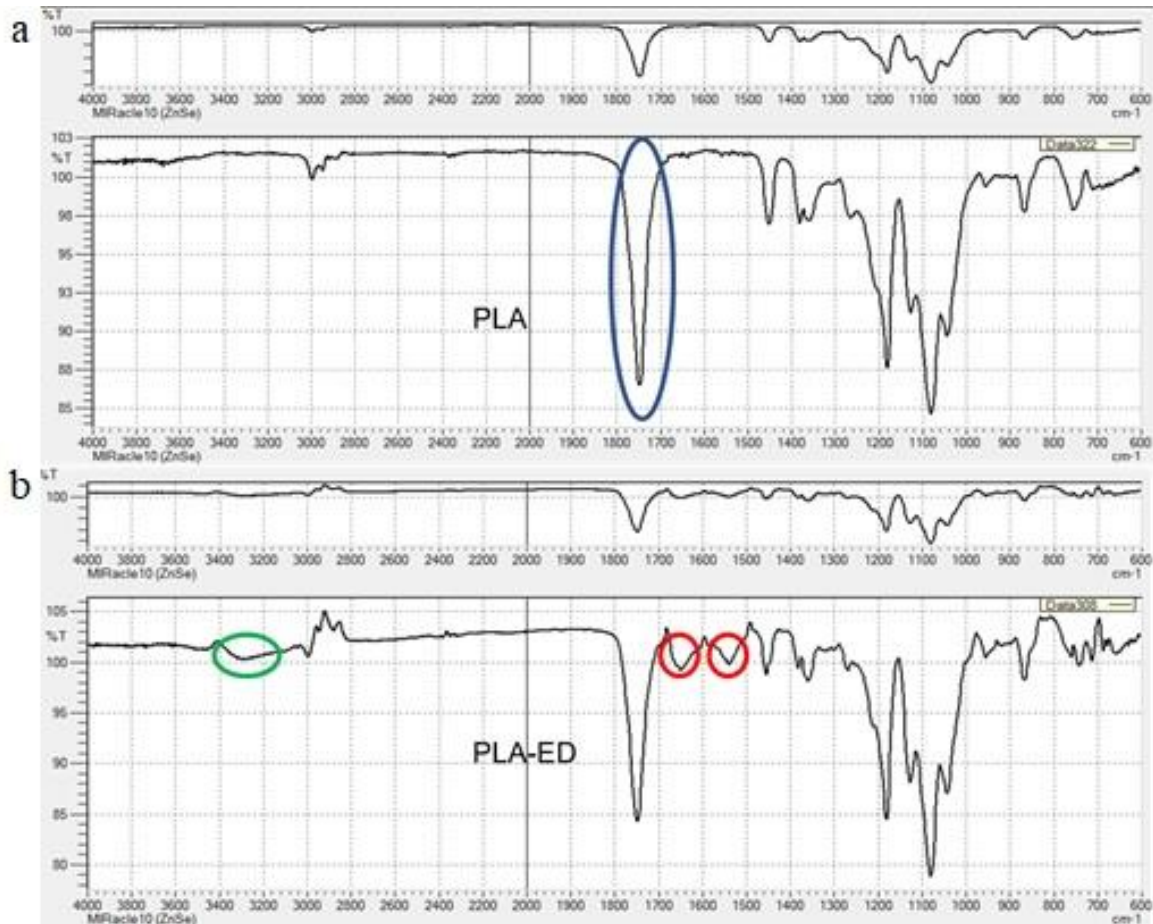


5. ábra - A mintáink pásztázó elektronmikroszkópiai (SEM) ábrái. Az ábrákon jól látható a felszíni morfológia és a pórusok szerkezete. A nagyítás $\times 1000$, a skála 90 μm . a) PLA kezelés nélkül, b) PLA vizes mosást követően, c) PLA-BAPA, d) PLA-ED, e) PLA-TET, f) PLA-MeNprN, g) PLA-Tris és h) PLA-NPEGN.

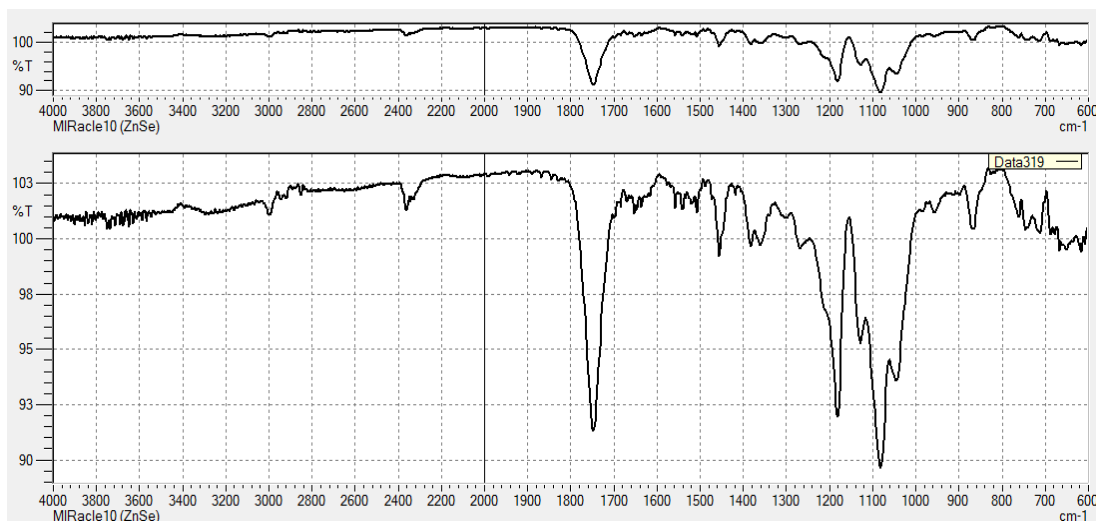
6.1.2.1.2. Fourier transzformációs infravörös spektroszkópia (FTIR)

A fourier transzformációs infravörös spektroszkópiai elemzést Dr. Beomjoon Kim végezte el. A vizsgálat során kapott spektrumok az alábbi (6 – 11 ábra) ábrákon láthatóak. Az eredményeinket a politejsav és az etiléndiamin módosulat ábráján (6. ábra) keresztül mutatom be, míg a többi módosulat FTIR spektruma a 7-11. ábrákon látható.

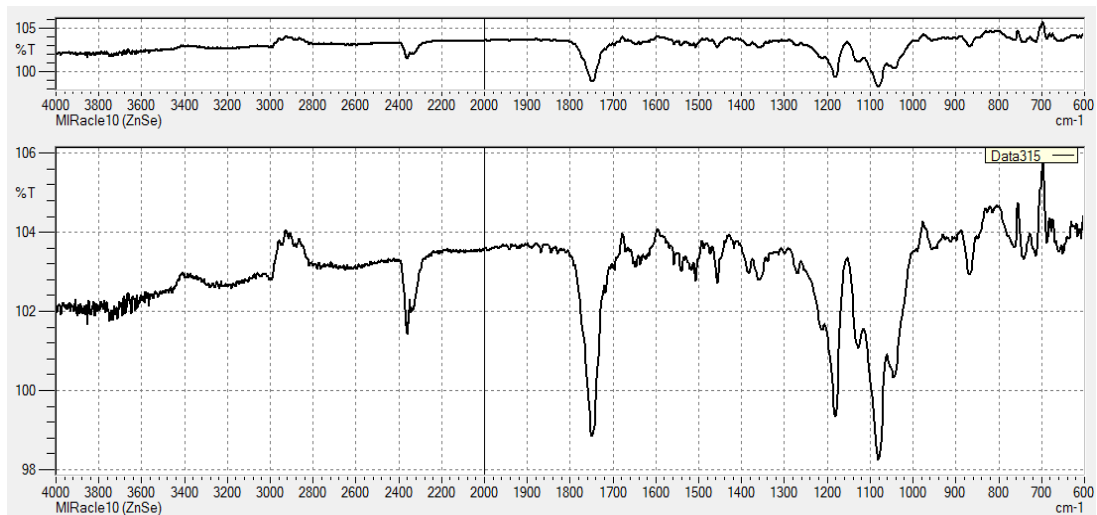
A politejsav alapváz spektrumán (6. ábra a)) megfigyelhető egy gyenge C–H kötés 3000 cm^{-1} hullámhossz értéknél és egy erős C=O észter kötés 1750 cm^{-1} hullámhossz értéknél. Az etiléndiamin (PLA-ED) esetében (6. ábra b)) a fentiekén túl még megfigyelhető C=O amid kötés 1550 cm^{-1} and 1650 cm^{-1} hullámhossz értékek között. Az amid kötés jelenléte csak a PLA polimer és az etilén-diamin módosulat között kialakuló kovalens kötésből származhat. Továbbá az N-H amid kötés jelenléte is bizonyítja 3300 cm^{-1} hullámhossz értéknél. Ahogyan az várható volt, a módosítás miatt kialakuló kötésekhez tartozó intenzitás értékek kisebbek, mint az észter kötésé, mivel a módosítás csak a felszínen történik meg.



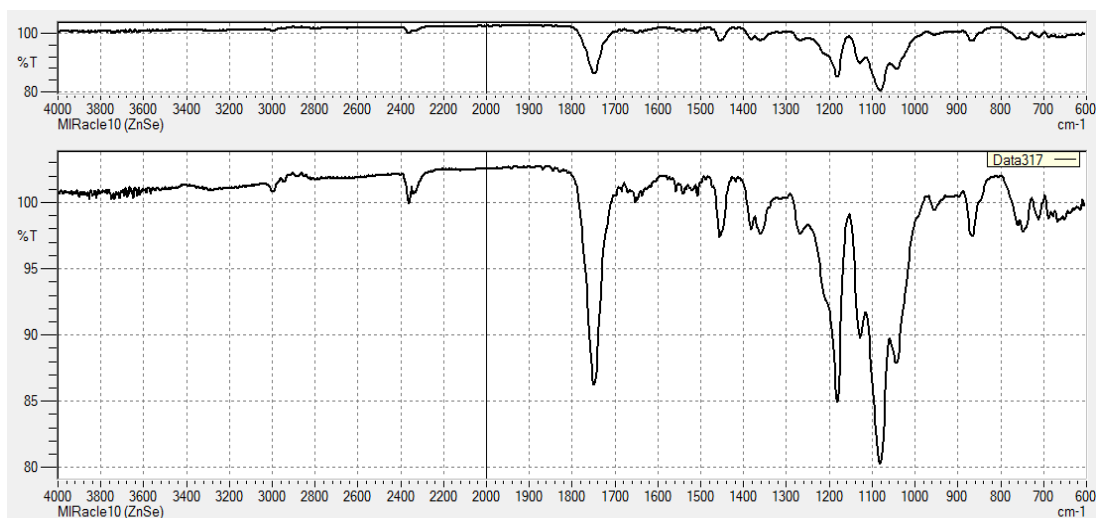
6. ábra - A politejsav alapváz (a) PLA) és az etilén-diamin módosulat (b) PLA-ED) FTIR spektruma. A C=O észter kötés kékkel van kijelölve, a C=O amid kötések piros körrel, és az N-H amid kötés zölddel van kijelölve. A C=O észter kötés kisebb intenzitású jelenlétéből, illetve a C=O amid kötések és az N-H amid kötés megjelenéséből arra tudunk következtetni, hogy az amid funkcionális reakció megtörtént és kovalens kötéssel történt az oldalláncok kötődése.



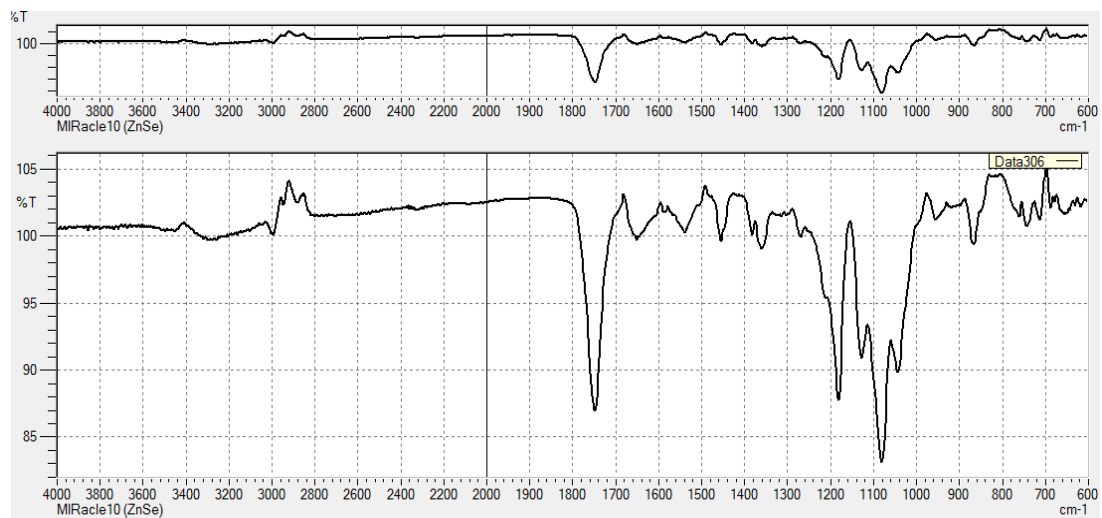
7. ábra - A bisz(aminopropil)-amin módosulat (PLA-BAPA) FTIR spektruma.



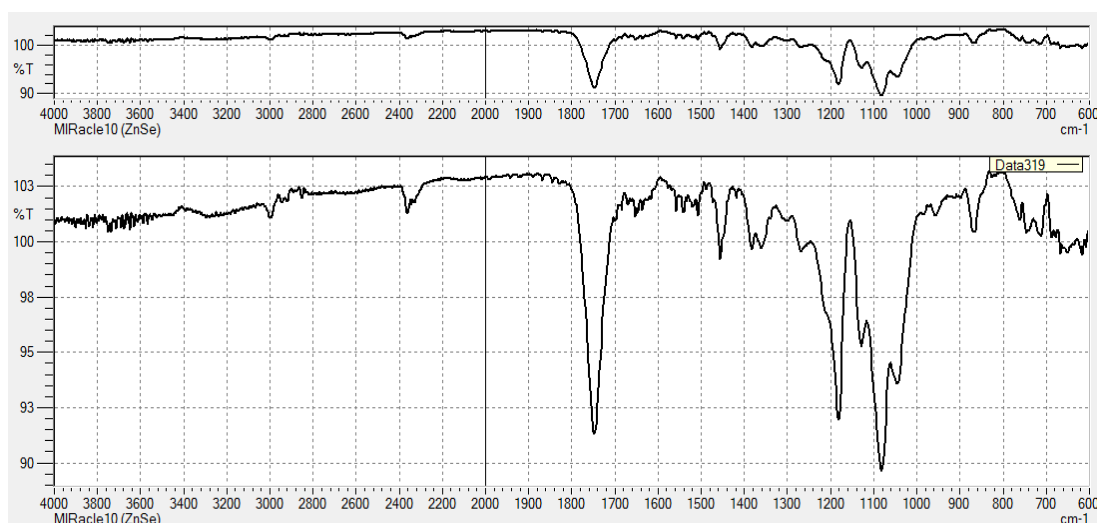
8. ábra - A trietilén-tetramin módosulat (PLA-TET) FTIR spektruma.



9. ábra - Az N- metil-1,3-propán-diamin módosulat (PLA-MeNprN) FTIR spektruma.



10. ábra - A tris(2-aminoetil)-amin módosulat (PLA-Tris) FTIR spektruma.

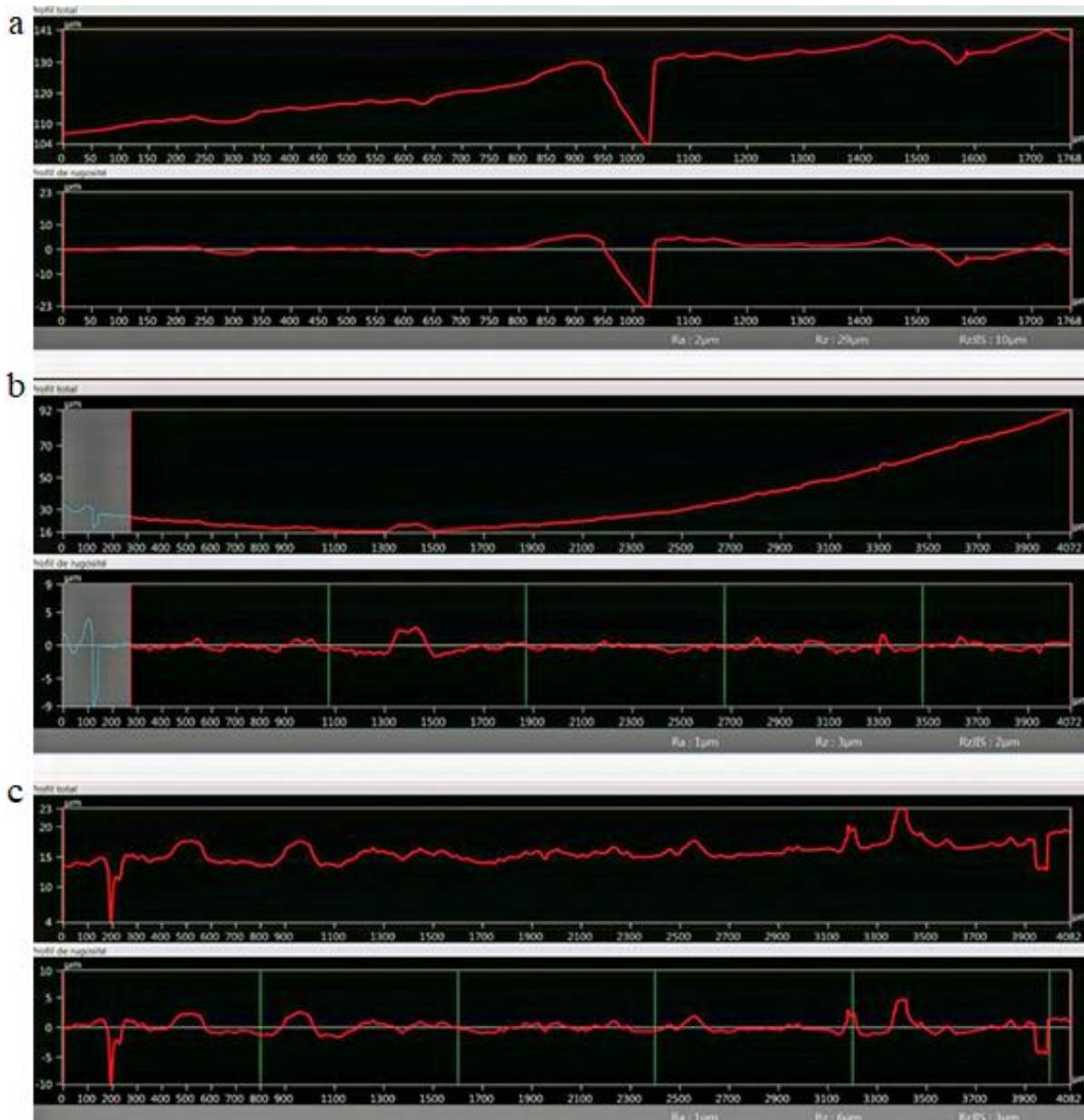


11. ábra - A 2,2'-etiléndioxi-dietilamin módosulat (PLA-NPEGN) FTIR spektruma.

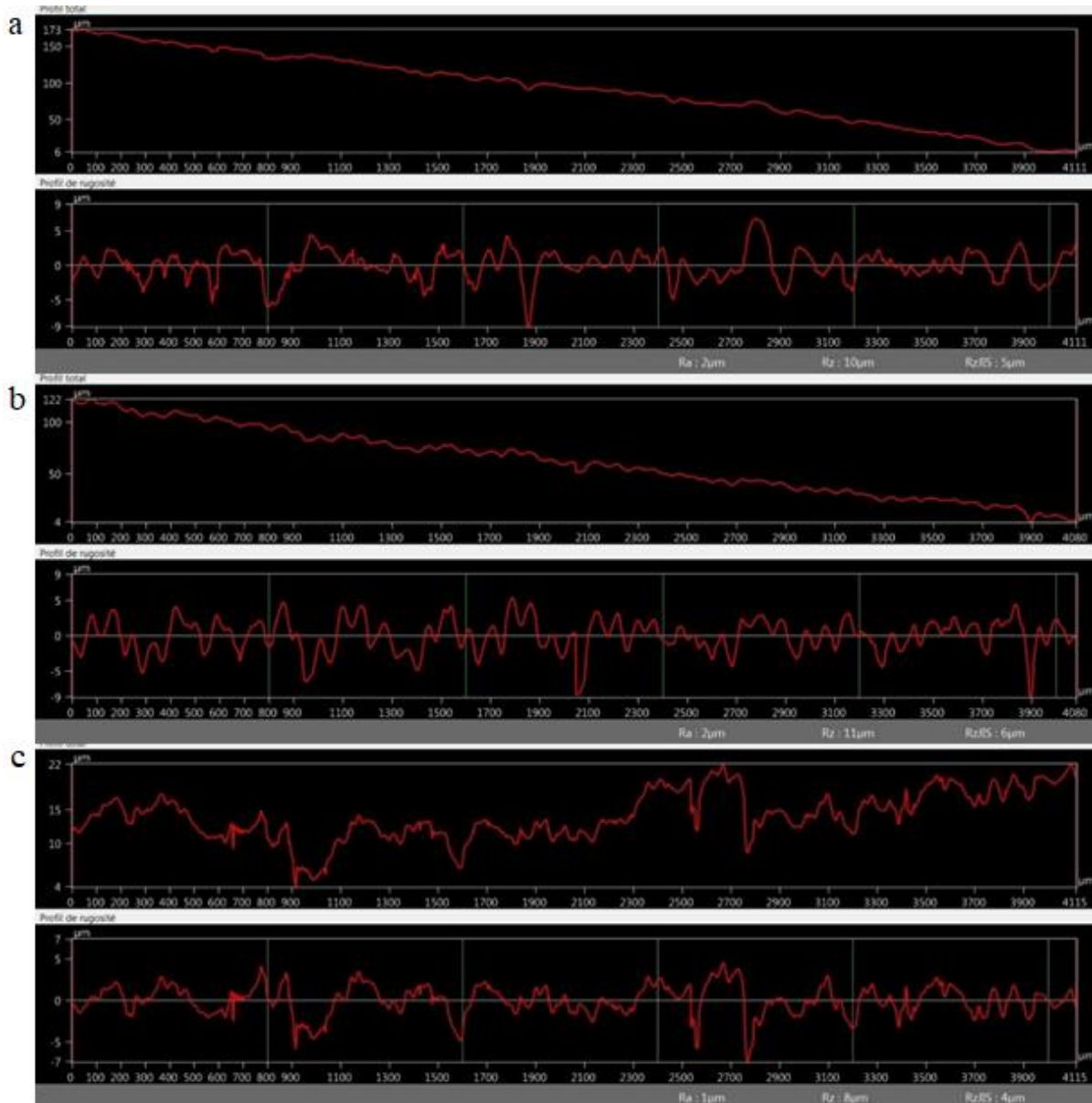
6.1.2.1.3. Felszíni egyenetlenség vizsgálata

A 12. ábrán láthatók a PLA alapváz, a PLA-ED módosulat és a PLA-NPEGN módosulat felszíni egyenetlenség vizsgálattal kapott eredményei, melyet a lyoni egyetem kutatói biztosítottak. A spektrumokat a Keyence VHX 6000 optikai mikroszkóphoz tartozó képfeldolgozó programmal kaptuk meg. A felszíni egyenetlenség átlagos mérete (Average Depth of Roughness Parameter, Rz) a PLA minta esetében 29 μm , a PLA-ED módosulat esetében 3 μm , míg a PLA-NPEGN módosulat esetében 6 μm . A PLA alapváz felszíni egyenetlenség értékei abból adódnak, hogy a 3D nyomtatás során egy-egy húzott szál között 20 μm -es üreg van és 400 μm -enként kismértékű csökkenés tapasztalható a filamentből adódóan, ami viszont minden esetben kisebb volt, mint 5 μm .

A módosított kémiai oldalláncot tartalmazó minták esetében a felület általában sík volt (12. és 13. ábra), bizonyos esetekben kis gödrök és kiemelkedések voltak megfigyelhetőek, ami összhangban volt a SEM mérés során tapasztaltakkal. Nem találtak 400 μm távolságonként szisztematikusan ismétlődő felszíni egyenetlenségeket.



12. ábra - A PLA alapváz (a)), a PLA-ED módosulat (b)) és a PLA-NPEGN módosulat (c)) felszíni egyenetlenség vizsgálatának eredményei. A PLA alapváz 1768 μm hosszúságban volt vizsgálva, a PLA-ED 4082 μm hosszúságban, míg a PLA-NPEGN 4082 μm -ben. A felszíni egyenetlenség átlagos mérete (Average Depth of Roughness Parameter, R_z) a PLA minta esetében 29 μm , a PLA-ED módosulat esetében 3 μm , míg a PLA-NPEGN módosulat esetében 6 μm .

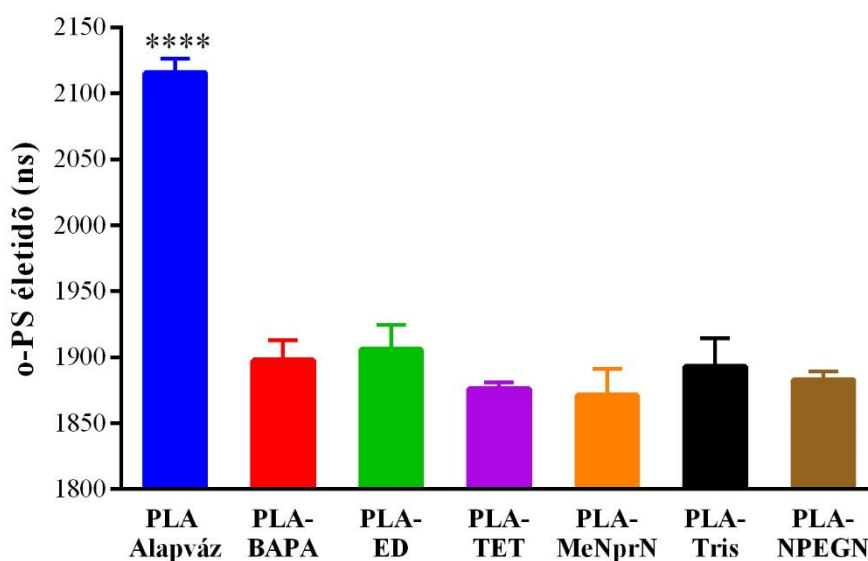


13. ábra - A PLA-MeNprN módosulat (a)), a PLA-BAPA módosulat (b)) és a PLA-Tris módosulat (c)) felszíni egyenetlenség vizsgálatának eredményei. A PLA-MeNprN módosulat 4111 μm hosszúságban volt vizsgálva, a PLA-BAPA 4080 μm hosszúságban, míg a PLA-Tris 4115 μm -ben. A felszíni egyenetlenség átlagos mérete (Average Depth of Roughness Parameter, Rz) a PLA-MeNprN módosulat esetében 10 μm , a PLA-BAPA módosulat esetében 11 μm , míg a PLA-Tris módosulat esetében 8 μm .

6.1.2.1.4. Pozitron annihilációs élettartam spektroszkópia (PALS)

A 14. ábrán látható a Prof. Zelkó Romána és Kazsoki Adrienn által elvégzett PALS vizsgálat eredménye, melyen láthatók a PLA alapváz és a módosított minták átlagos diszkrét o-PS élettartam értékei. A magasabb élettartam értékek nagyobb szabad térfogatot jeleznek a

polimer láncok között, illetve a nyomtatás során a filament szálak között fennmaradó teret. Az eredmények alapján mindegyik módosított alapvázat tartalmazó minta hasonló o-Ps élettartammal rendelkezik, míg a PLA alapváznak szignifikánsan magasabb o-PS élettartam ideje van. (****, $p < 0,0001$). Az eredményeink alapján a PLA-ED és a PLA-Tris módosulatok tartalmazzák a legtöbb szabad térfogatot a felszínen, míg a PLA-MeNprN módosulat esetében a legkevesebbet. Mindez azzal magyarázható, hogy a módosítással az aminok beépülnek a polimer szálakba, ami kisebb szabad térfogatot eredményez a polimer szálak molekulái között.

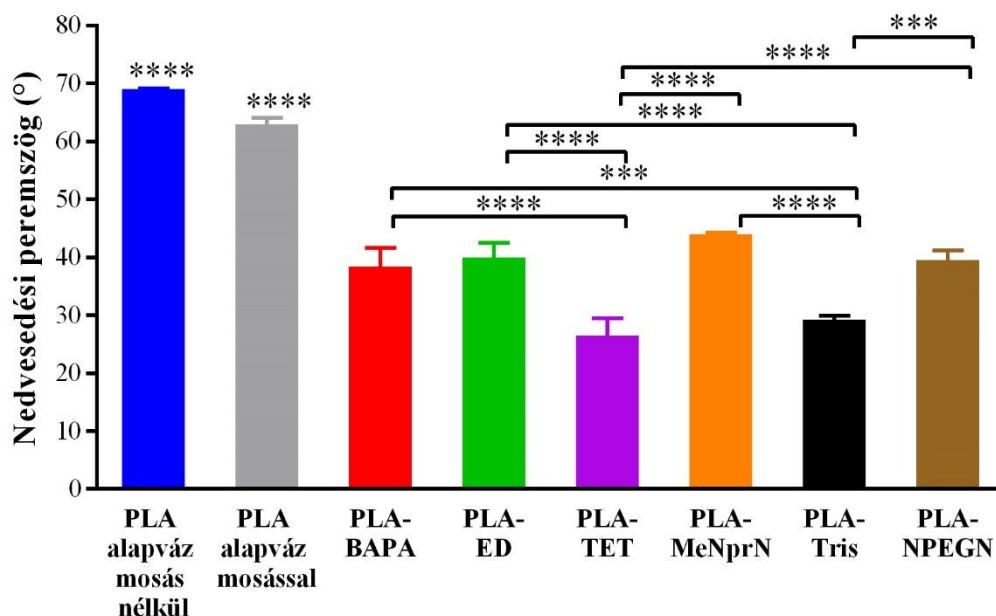


14. ábra - A vizsgálati minták PALS vizsgálattal kapott átlag diszkrét o-Ps életideje. Minél magasabb az o-Ps élettartam, annál nagyobb a szabadterefogatú üregek száma az adott vizsgálati minta esetében. A PLA alapváz o-Ps élettartama szignifikánsan különbözik (****) a módosított alapvázak o-Ps élettartamától, viszont a módosított minták esetében nem találtunk szignifikáns különbséget. Az értékek átlagként vannak feltüntetve a szórásértékekkel. A hibaszáv a szórást jelöli ($\pm$ SD); a **** pedig a szignifikáns különbség értéket $p < 0,0001$. A kísérleteket három párhuzamos mintán végeztük el.

6.1.2.1.5. Nedvesedési peremszög meghatározás

A nedvesedési peremszög meghatározását a lyoni egyetem kutatói végezték el, a vizsgálat során kapott peremszög értékek az alábbi 15. ábrán láthatóak. A peremszög értékek alapján felállítható egy csökkenő sorrend: PLA alapváz mosás nélkül = PLA alapváz vízzel mosva > PLA-MeNprN > PLA-ED > PLA-NPEGN > PLA-BAPA > PLA-Tris > PLA-TET. A nedvesedési peremszög értékek a minták esetében $26,5 \pm 3,0^\circ$ és $69 \pm 0,1^\circ$ értékek között

változtak, amely azt bizonyítja, hogy mindegyik minta hidrofíli és az amino csoportok kapcsolásával nőtt a hidrofilitás mértéke. Ahogyan az várható volt, a PLA alapváz rendelkezik a legnagyobb peremszög értékekkel.



15. ábra - A nedvesedési peremszög értékei (°) a PLA alapváz és a kémiai módosulatok esetében. A peremszög értékek alapján felállítható egy csökkenő sorrend: PLA alapváz mosás nélkül ($69 \pm 0,1^\circ$) = PLA alapváz vízzel mosva ($69 \pm 0,1^\circ$) > PLA-McNprN ($45 \pm 1,3^\circ$) > PLA-ED ($41 \pm 0,3^\circ$) > PLA-NPEGN ($40 \pm 1,1^\circ$) > PLA-BAPA ($39 \pm 0,5^\circ$) > PLA-Tris ($30 \pm 1,2^\circ$) > PLA-TET ($26,5 \pm 3,0^\circ$). Az értékek átlagként vannak feltüntetve a szórásértékekkel. A PLA alapváz mosás nélkül és mosással szignifikánsan különbözik a módosulatoktól. A PLA-TET és a PLA-Tris módosulatok peremszög értékei pedig szignifikánsan kisebbek, mint a többi módosulaté. Általánosságban elmondható, hogy a 90° -tól kisebb peremszög értékekkel rendelkező minták megfelelő nedvesedésűnek tekinthetők. A hibásáv a szórást jelöli ($\pm$ SD); a *, **, *** és **** pedig a szignifikáns különbség értéket $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ és $p < 0,0001$. A kísérleteket három párhuzamos mintán végeztük el.

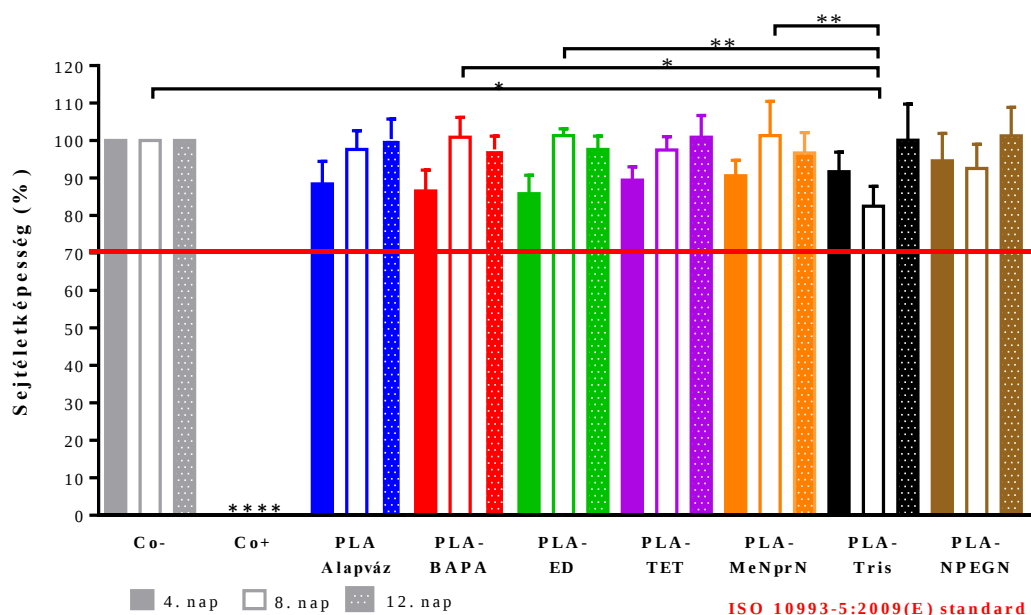
6.1.3. Biokompatibilitás

6.1.3.1. MTT teszt

Hosszútávú sejtleletképeségi tesztet alkalmaztunk a politejsav alapvázú minták citokompatibilitásának meghatározásáról. A mintákat négy, nyolc és tizenkét napig áztattuk

DMEM médiumot tartalmazó centrifugacsőben, majd az adott vizsgálati napon a Caco-2 sejteket ezzel a médiummal kezeltük. [113] [114] Ez a módszer eltér a hagyományos MTT vizsgálattól, mert mi nem a gátló koncentrációt (IC_{50}) mértük, hanem a sejt életképességét a negatív kontrollal (DMME médium) történő összehasonlítással számítottuk ki. Kinnari, illetve Chessa kísérleteiben a Caco-2 sejtvonal még mindig a referencia alapot képviseli az ortopédiai és mellimplantátumok citotoxicitási vizsgálata során. A Caco-2 sejtvonal a bélnyálkahártyát modellezi le, mivel számos tulajdonsága megegyezik az érett enterocitával. [115],[116].

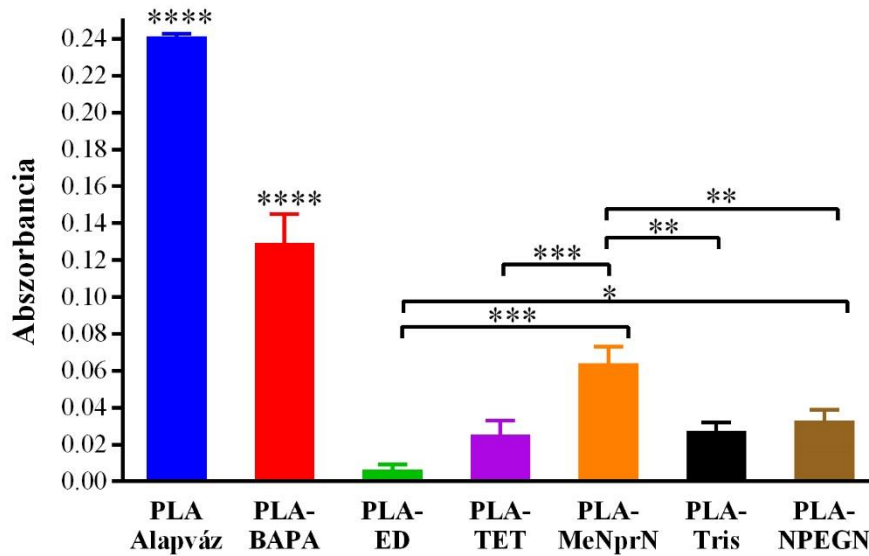
Az eredményeket a negatív, azaz a kezletlen kontrollhoz viszonyított százalékban (Co-) fejezzük ki. Pozitív kontrollként (Co+) a Triton-X 100 (10% w /v) szolubilizálószer alkalmaztuk, amely minden vizsgálati mintához viszonyítva, mindegyik vizsgálati napon szignifikáns különbségeket mutatott. Összehasonlítottuk a kémiaailag módosított minták citotoxicitási értékeit, és megállapítottuk, hogy a 4. és 12. vizsgálatnap esetében egyik minta esetében sem csökkent szignifikánsan a sejtéletképesség a kezletlen kontrollhoz képest (16. ábra). Míg a 8. napon mért PLA-Tris minta esetében szignifikáns (*) a különbség a kontroll csoporthoz és a PLA-BAPA módosulattal összehasonlítva, illetve szignifikáns (**) a különbség a PLA-ED és PLA-MeNprN mintákkal összehasonlítva. A PLA-ED, a PLA-BAPA, a PLA-Tris és a PLA-NPEGN sejtéletképességi értékei még a hosszabb ideig tartó expozíció esetében is meghaladták a 90 %-t. Az ISO 10993-5: 2009 (E) szabvány alapján, ha a sejtek relatív életképessége meghaladja a 70 % -t a kontroll csoporthoz képest (100%), az anyagok nem citotoxikusnak tekinthetők [117]. Ezen szabvány alapján valamennyi mintánk citokompatibilisnek minősült.



16. ábra - A PLA alapváz és a kémiai módosulatok hosszútávú citotoxicitás vizsgálatának eredményei. Az MTT tesztet Caco-2 sejtvonalon végeztük el, a 4., 8. és 12. napon. A sejtleletképeség százalékos értéke a negatív kontrollhoz (Co-) viszonyítva van megadva. Pozitív kontrollként (Co+) Triton-X 100 (10 % w/v) szolubilizálószer alkalmaztunk, mely minden esetben szignifikáns (****) különbséget mutatott. A vizsgálati mintákat a negatív kontrollal összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy egyik minta sejtleletképesége sem különbözik szignifikánsan. Az értékek átlagként vannak feltüntetve a szórásértékekkel. A hibásáv a szórás jelöli ($\pm$ SD); a *, ** és **** pedig a szignifikáns különbség értéket $p < 0.05$, $p < 0.01$ és $p < 0.0001$. A kísérleteket három párhuzamos mintán végeztük el.

6.1.3.2. Kristályibolya teszt

Kísérleteink azon alapultak, hogy a minták felszínén kialakult biofilm kristályibolya festéssel vizualizálható és mérhető az abszorbanciája. A mért abszorbancia értékek korreláltak az implantátumok felszínén keletkező biofilm mennyiségével [99] [118]. Ezen vizsgálatot együtt végeztem Dr. Kovács Renátóval. Az összes mintánk abszorbancia értéke 0,25 alatt volt. A PLA alapváz és a PLA-BAPA módosulat szignifikánsan magasabb abszorbancia eredményt mutatott, mint a többi módosulat. A PLA-MeNprN abszorbanciája magasabb, mint 0,05, de a PLA-TET, PLA-Tris, PLA-NPEGN és PLA-ED abszorbanciája alacsonyabb, mint 0,05. A többi mintához képest a PLA-ED módosulat eredményezte a legkisebb abszorbancia értéket. (17. ábra). Marcos-Zambrano és munkatársai osztályozása szerint alacsony biofilm formálási képességet jelent a 0,44 alatti abszorbancia érték, közepes biofilm formálási képességet 0,44–1,17 abszorbancia érték között, míg magas biofilm formálási képességet 1,17 feletti abszorbancia értékek esetében. Ez alapján az osztályozási rendszer alapján valamennyi implantátum alacsony biofilm formálási képességet mutatott [119].



17. ábra - A biofilm formálási készség eredményei a különböző módosulatok esetében. A legmagasabb mért abszorbancia értékünk 0,24 volt. A PLA alapváz és a PLA-BAPA módosulat szignifikánsan magasabb abszorbancia eredményt mutatott, mint a többi módosulat. A PLA-MeNprN abszorbanciája magasabb, mint 0,05, de a PLA-TET, PLA-Tris, PLA-NPEGN és PLA-ED abszorbanciája alacsonyabb, mint 0,05. Az értékek átlagként vannak feltüntetve a szórásértékekkel. A hibasáv a szórást jelöli ($\pm$ SD); a *, **, *** és **** pedig a szignifikáns különbség értéket $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ és $p < 0.0001$. A kísérleteket három párhuzamos mintán végeztük el.

6.2. 2. kísérletsorozat

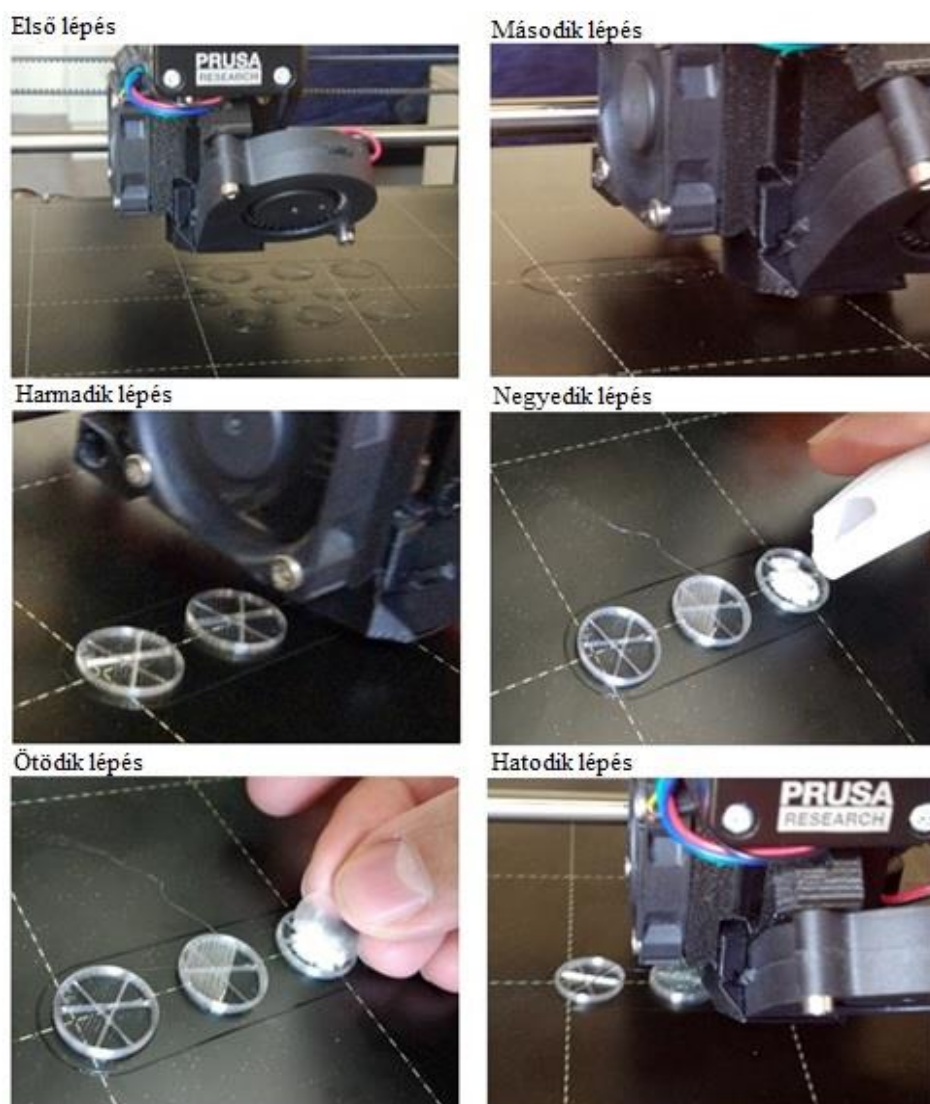
6.2.1. 3D nyomtatás

Kísérleteink során négy különböző polimert: politejsavat (PLA), antibakteriális PLA-t (AntiPLA), polietilén-tereftalát-glikolt (PETG) és poli (metil-metakrilátot) (PMMA) használtunk a 3D nyomtatáshoz. A minta vastagsága 2,4 mm, átmérője 16, 19 vagy 22 mm volt. A kitöltöttségi százalék 0%, 5%, 10% vagy 15% volt.

A részletes nyomtatási eljárást a 18. ábra mutatja be. Először a filament szálakat a kívánt nyomtatási hőmérsékletre megolvasztottuk a nyomtatófejben. A PLA és az antibakteriális PLA esetében a nyomtatási hőmérséklet 215 °C volt; a PETG-t 250 °C-on, a PMMA-t pedig 270 °C-on nyomtattuk ki a Debreceni Egyetem Informatikai Karán. A kutatócsoportunk kidolgozott egy egyszerű módszert a hatóanyag tartalmú minták előállítására úgy, hogy a hatóanyag stabilitását ne befolyásoljuk, ezért a nyomtatás első lépéseként egy fedőlemezt nyomtattunk ki.

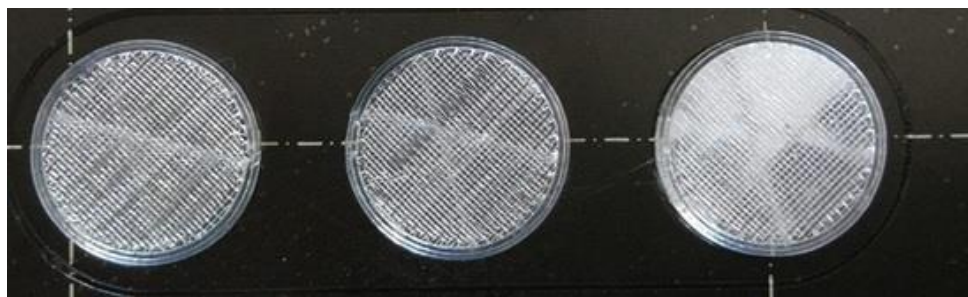
(18. ábra, első lépés). Ezt követően elkezdődött a tényleges mintanyomtatás, amit a megfelelő pillanatban leállítottunk (18. ábra, második és harmadik lépés), majd a hatóanyagot beleöntöttük a mintába (18. ábra, negyedik lépés), és az előre kinyomtatott fedőlemezt a hatóanyag tetejére helyeztük (18. ábra, ötödik lépés). Végül kinyomtatattuk a minta felső két rétegét (18. ábra, hatodik lépés). Ily módon sem az extrudálás magas hőmérséklete, sem a hűtés nem zavarta a hatóanyag stabilitását és mennyiségét. A nyomtatott mintákat a 19. ábra mutatja be.

A minták elnevezése az alkalmazott polimer (pl. PLA), a minta átmérője (pl. 16) és végül a minta kitöltöttségi százaléka (pl. 0) alapján történt; ebben az esetben a minta neve PLA_16_0.



18. ábra - A 3D nyomtatás lépésről-lépésre történő bemutatása. A képek a szemléltetés miatt készültek, így csak három minta látható a képen és csak egy mintába történt a hatóanyag bejuttatása. Első lépés: Először az egyrétegű fedőlemez nyomtatása történik meg, melynek kör alakja van és meghatározott átmérője. A

fedőlemez magassága 0,2 mm, ami pontosan egy nyomtatási rétegnek felel meg. Második lépés: A minta nyomtatás kezdete és az első néhány réteg nyomtatása. Harmadik lépés: Néhány réteg nyomtatása után már látható a kitöltöttségi százalék által létrehozott mintázat. A rétegek sorrendje a következő: két alapréteg (kontúr és 100 %-os kitöltöttségi százalék), öt réteg kontúr és jelen esetben 5 %-os belső kitöltöttségi százalékkal és három réteg kitöltöttségi százalék nélkül. Negyedik lépés: Miután a három kitöltöttségi százalék nélküli réteg nyomtatása megtörtént, megállítjuk a nyomtatást, így a diklofenák-nátrium hatóanyagot betöltjük a mintába. Ötödik lépés: A hatóanyagot lefedjük az előre kinyomtatott fedőlemezzel. Hatodik lépés: Két felső réteg nyomtatása, ami lezárja a mintát.



19. ábra - A nyomtatott minták ábrája. Ebben az esetben csak a jobb szélső minta tartalmaz hatóanyagot.

6.2.2. Tömegegységesség

A mért tömeg értékek és a hatóanyagtartalom egységességének eredményei a 9. táblázatban láthatóak. A minták átlagos tömege (mg) a polimertől függ, és nőtt az átmérő és a kitöltöttségi százalék növekedésével. A mintákat ~ 30 mg diklofenák-nátrium sóval töltöttük meg.

Minta	Tömeg		Hatóanyag mennyiség	
	Átlag (mg)	±SD	Átlag (mg)	±SD
PLA_16_0	346,93	5,39	29,45	0,89
PLA_19_0	476,44	2,74	29,87	0,75
PLA_22_0	608,79	1,45	29,60	0,83
PLA_22_5	635,87	1,65	29,94	0,47
PLA_22_10	646,04	4,81	29,75	0,73
PLA_22_15	690,85	5,34	29,86	0,86
AntiPLA_16_0	344,08	4,00	29,53	0,92
AntiPLA_19_0	468,19	3,48	29,78	1,0

3D nyomtatóval előállított implantátumok biokompatibilitási vizsgálatai

AntiPLA_22_0	617,77	3,74	29,56	0,82
PETG_16_0	354,17	2,40	29,72	0,45
PETG_19_0	513,55	0,54	29,99	0,67
PETG_22_0	648,54	1,86	29,68	0,81
PMMA_16_0	366,49	3,61	29,66	0,36
PMMA_19_0	527,96	2,57	29,53	0,63
PMMA_22_0	615,87	2,84	29,91	0,78

9. táblázat - A minták átlagos tömege (mg) a szórás értékekkel (standard deviation, SD) és az átlagos hatóanyag tartalom (mg) értékei a szórás értékekkel (SD). A politejsav (PLA), az antibakteriális PLA (AntiPLA), polietilén-tereftalát-glikol (PETG) és poli-(metil-metakrilát) (PMMA) mintákat vizsgáltuk meg különböző átmérő (16, 19 vagy 22 mm) és kitöltöttségi százalék értékekkel (0%, 5%, 10% vagy 15%). A minták elnevezése az alkalmazott polimer (pl. PLA), a minta átmérője (pl. 16) és végül a minta kitöltöttségi százaléka (pl. 0) alapján történt; ebben az esetben a minta neve PLA_16_0.

6.2.3. PLA degradáció

Mivel a PLA és az antibakteriális PLA biológiailag lebomló polimerek, így a minták esetleges degradációját pH=7,4, 37 °C hőmérsékleten határoztuk meg. A bomlást tömegméréssel határoztuk meg, de a vizsgálati időszak alatt a vizsgálati minták esetében nem kezdődött meg a minták bomlása. A minták átlagos tömege (mg) és a szórásértékek ($\pm$ SD) a 10. táblázatban találhatóak. Az első oszlopban a minták tömege látható közvetlenül a nyomtatás után diklofenák nélkül, míg a többi oszlopban az 1., 2., 4., 6. és 8. hetet követően mért tömeg értékek.

Minta	Mért tömeg (mg) $\pm$ SD					
	Kiindulás	1.hét	2. hét	4.hét	6. hét	8. hét
PLA_16_0	315,44	315,32	314,82	314,59	315,93	314,75
	$\pm$ 0,57	$\pm$ 0,42	$\pm$ 0,22	$\pm$ 0,84	$\pm$ 1,34	$\pm$ 0,56
PLA_19_0	446,87	446,47	446,53	446,43	445,86	445,42
	$\pm$ 0,98	$\pm$ 0,88	$\pm$ 1,18	$\pm$ 0,58	$\pm$ 0,18	$\pm$ 0,76
PLA_22_0	576,96	577,05	576,37	577,04	577,04	576,53
	$\pm$ 1,45	$\pm$ 0,72	$\pm$ 0,48	$\pm$ 0,33	$\pm$ 0,33	$\pm$ 0,18
PLA_22_5	603,65	602,72	602,27	603,74	602,72	603,52
	$\pm$ 0,12	$\pm$ 0,27	$\pm$ 0,34	$\pm$ 0,37	$\pm$ 1,05	$\pm$ 1,05

3D nyomtatóval előállított implantátumok biokompatibilitási vizsgálatai

PLA_22_10	615,98 ± 2,41	615,49 ± 0,38	615,92 ± 1,58	615,63 ± 0,81	615,07 ± 0,23	615,07 ± 0,45
PLA_22_15	660,57 ± 1,34	659,59 ± 1,14	660,39 ± 0,56	659,79 ± 0,34	660,82 ± 1,54	660,03 ± 0,72
AntiPLA_16_0	313,82 ± 1,21	312,28 ± 0,51	313,03 ± 0,93	313,75 ± 0,63	312,34 ± 0,25	312,06 ± 0,57
AntiPLA_19_0	437,19 ± 0,97	436,97 ± 0,84	437,03 ± 0,14	436,13 ± 0,59	436,94 ± 0,37	437,42 ± 0,70
AntiPLA_22_0	586,82 ± 0,75	586,42 ± 0,55	585,97 ± 1,25	585,36 ± 0,74	586,22 ± 1,16	586,34 ± 0,04

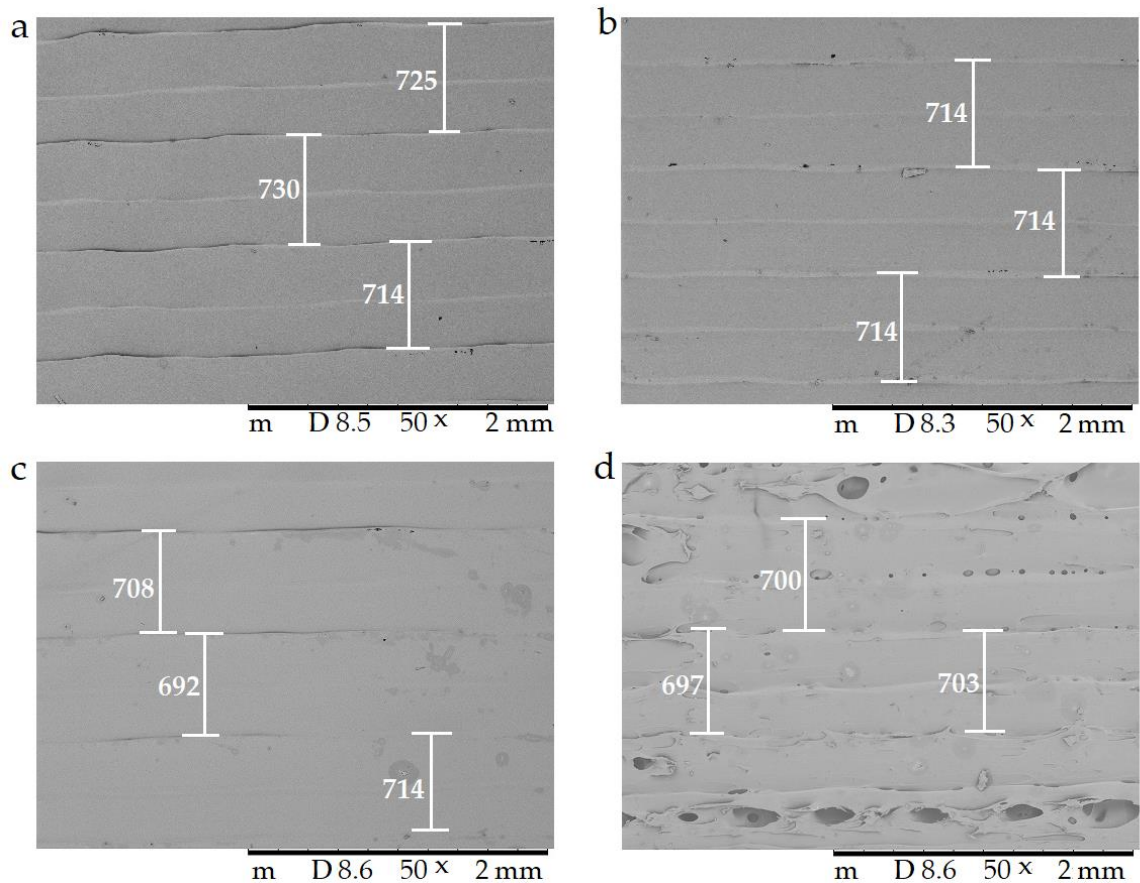
10. táblázat - A degradáció teszt eredményei a politejsav (PLA) és antibakteriális PLA (AntiPLA) minták esetében különböző átmérő (16, 19 vagy 22 mm) és kitöltöttségi százaléktételek esetében (0%, 5%, 10% vagy 15%). A minták átlagos tömege (mg) és a szórásértékek ($\pm$ SD) vannak feltüntetve közvetlenül a nyomtatás után diklofenák nélkül, míg a többi oszlopban az 1., 2., 4., 6. és 8. hetet követően mért tömeg értékek. A vizsgálati perióduson belül a minták bomlása nem kezdődött meg.

6.2.4. Anyagszerkezeti vizsgálatok

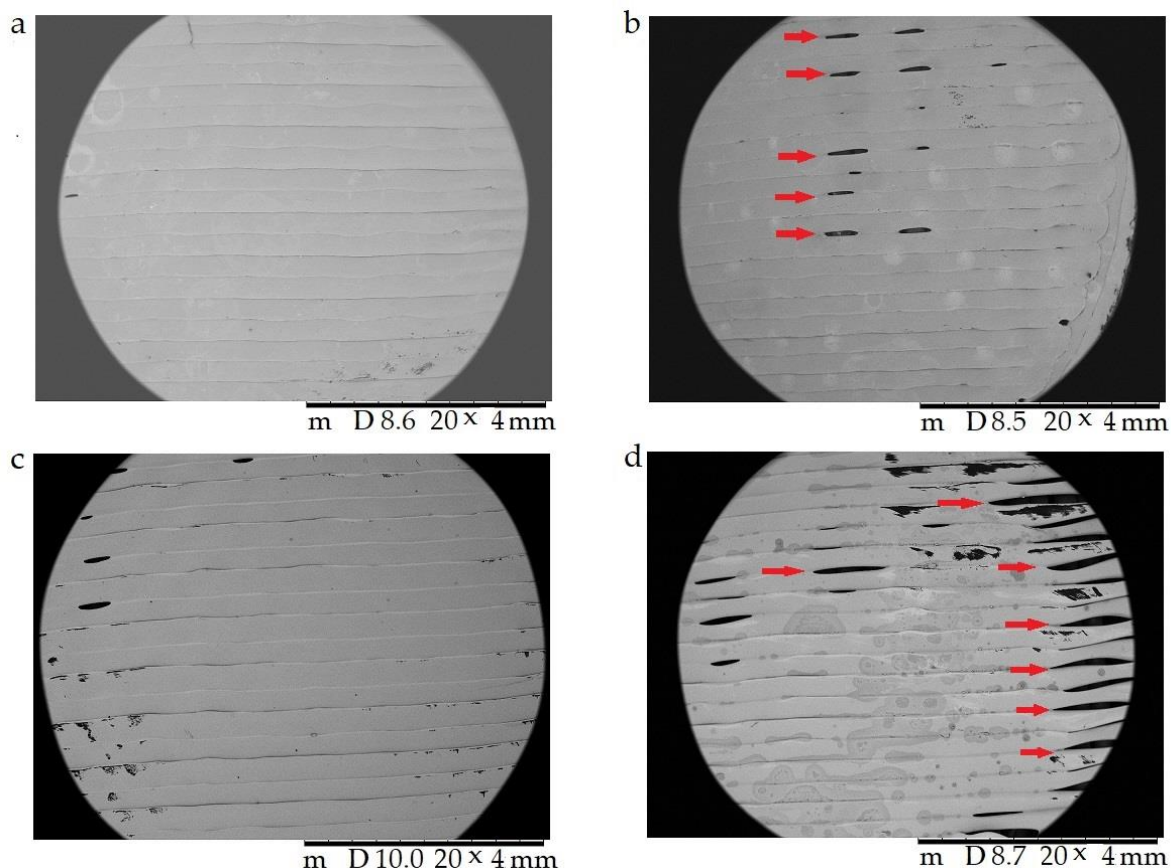
6.2.4.1.1. Pásztázó elektronmikroszkópia (SEM)

A minták felületét pásztázó elektronmikroszkópiával vizsgáltuk meg Budai István segítségével. A PLA, antibakteriális PLA, PETG és PMMA minták SEM képeit (20. ábra) 50x-es nagyítással készítettük el. Elemeztük a felület megfelelőségét, és a rétegek lokalizációját, megfelelőségét a 3D nyomtatással előállított minták esetében. Az ábrán két egymás mellé nyomtatott filament szál közötti távolságot fehér vonalak jelölik. A PLA esetében az átlag $713,67 \mu\text{m}$ ($\pm 17,72$) volt; antibakteriális PLA esetében $712,86 \mu\text{m}$ ($\pm 2,26$); a PETG esetében $704,33 \mu\text{m}$ ($\pm 12,07$), a PMMA esetében pedig $700,16 \mu\text{m}$ ($\pm 7,73$). A PLA, az antibakteriális PLA és a PETG sima felületűek voltak, a PMMA-nak azonban egyenetlen volt a felülete, a síktól néhány apró eltéréssel.

A 21. ábrán a 3D nyomtatott minták felületi morfológiáját és pórusszerkezetét hasonlítottuk össze közvetlenül a 3D nyomtatás után (a, c) és a kioldódás vizsgálat után (b, d) 20-szoros nagyítással. A b) és d) ábrán piros nyilak jelölik a kioldódás vizsgálat után kialakult pórusokat, amelyek alátámasztották azt a feltételezésünket, hogy a hatóanyag felszabadulás a hatóanyag leadó nyílásokon keresztül diffúzióval történik.



20. ábra - A 3D nyomtatással előállított minták felszíni elemzését Dr. Budai István végezte el pásztázóelektronmikroszkópiával. A nagyítás 50x, a lépték μm-ben van megadva, a rétegvastagságot pedig fehér vonallal jelöltük. a) Politejsav (PLA_22_0); b) antibakteriális politejsav (AntiPLA_22_0); c) polietilén-tereftalát-glikol (PETG_22_0); d) poli(metil-metakrilát) (PMMA_22_0).



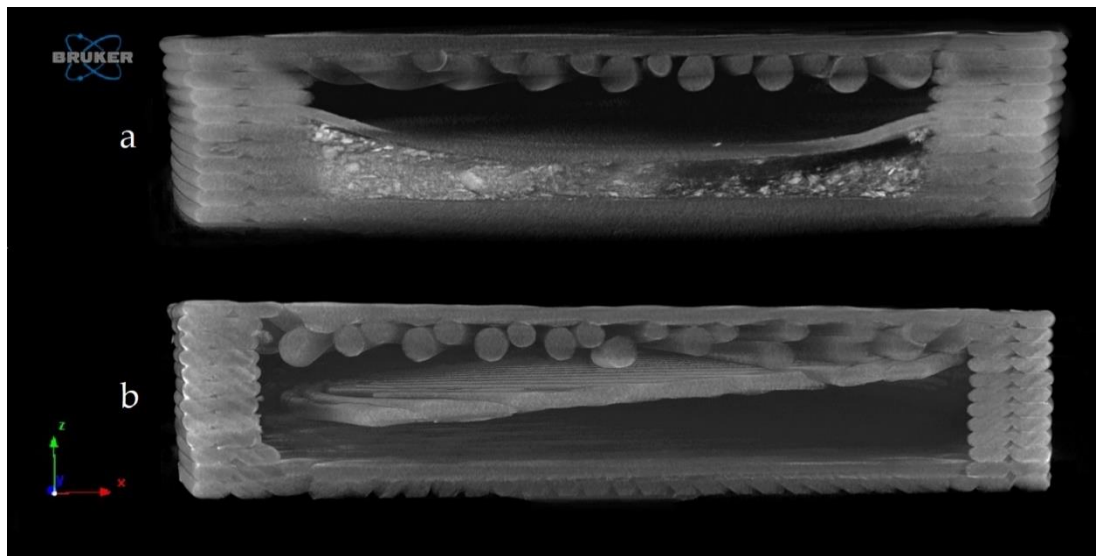
21. ábra - A felszíni morfológia és a pórusok szerkezetének elemzése pásztázó elektronmikroszkópiával Dr. Budai István által. A minták elemzése közvetlenül a 3D nyomtatás után (a, c) és a kioldódás vizsgálat után (b, d) 20-szoros nagyítással történt. a) Antibakteriális politejsav (AntiPLA_22_0) minta a 3D nyomtatás után; b) AntiPLA_22_0 a kioldódás vizsgálatot követően; c) polietilén-tereftalát-glikol (PETG_22_0) minta a nyomtatás után; d) PETG_22_0 a kioldódás vizsgálatot követően. A b) és d) ábrán piros nyilak jelölik a kioldódás vizsgálatot követően kialakult pórusokat.

6.2.4.1.2. Mikro komputertomográfia (MicroCT)

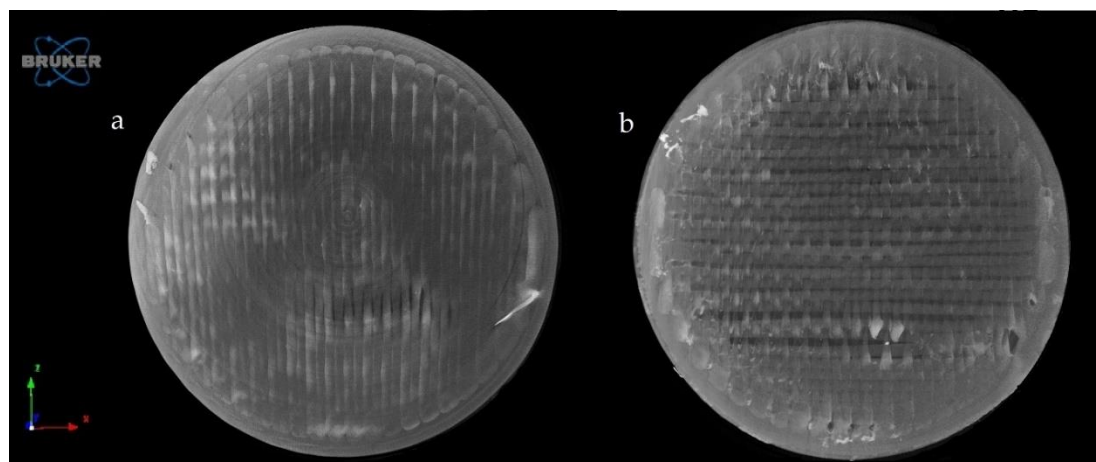
A mintákat a kioldódási vizsgálat előtt és után mikro komputertomográfiával (microCT) vizsgáltuk, hogy meghatározzuk morfológiájukat. A vizsgálatokat Béres Mónikával végeztük el. A 22. ábra az AntiPLA_16_0 mintát mutatja a kioldódási vizsgálat előtt a) és b) után. A diklofenák-nátrium lokalizációja jól látható a kioldódási vizsgálat előtt. A kioldódási vizsgálatot követően nem történt változás a filamentumok oldalsó rétegeinek elhelyezkedésében.

A 23. ábra a PLA_16_0 minta felső felületét mutatja be a kioldódás vizsgálat előtt (a) és (b) után. Jól látható, hogy kioldódás vizsgálatot követően készített felvételen a minta felületén pórusok keletkeztek.

A pórusok által a mintafelületén okozott pontos különbséget $5\text{ }\mu\text{m}$ képpont méretű felület alapján számoltuk ki (három párhuzamos szelet alapján). Megvizsgáltuk a filament kitöltöttségének százalékos arányát. A kioldódás vizsgálat előtti PLA_16_0 minta esetében 94,06% felszíni terület volt, míg a kioldódás vizsgálat után 87,95%. Azaz a kioldódás vizsgálat után 6,11% -kal több pórus volt a minta felületén.



22. ábra - Mikro komputertomográfiai ábra függőleges metszete az AntiPLA_16_0 mintáról a kioldódás vizsgálatot megelőzően a) illetve azt követően b). Az ábra pixel mérete $5\text{ }\mu\text{m}$.



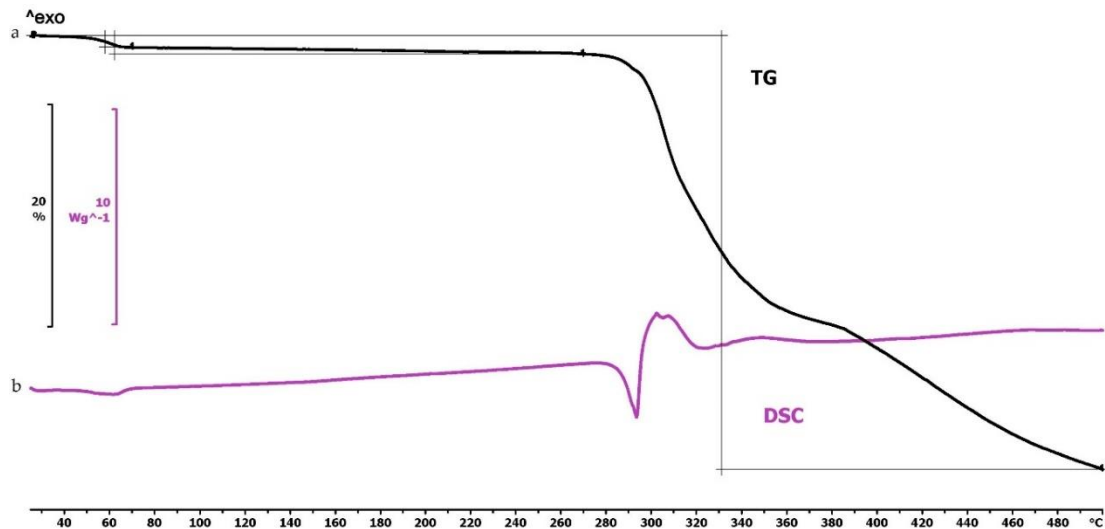
23. ábra - Mikro komputertomográfiai ábra a PLA_16_0 minta felső felületéről a kioldódás vizsgálatot megelőzően a) illetve azt követően b). Az ábra pixel mérete $5\text{ }\mu\text{m}$.

6.2.4.1.3. Termogravimetriás (TG) és differenciális pásztázó kalorimetriai (DSC) elemzés

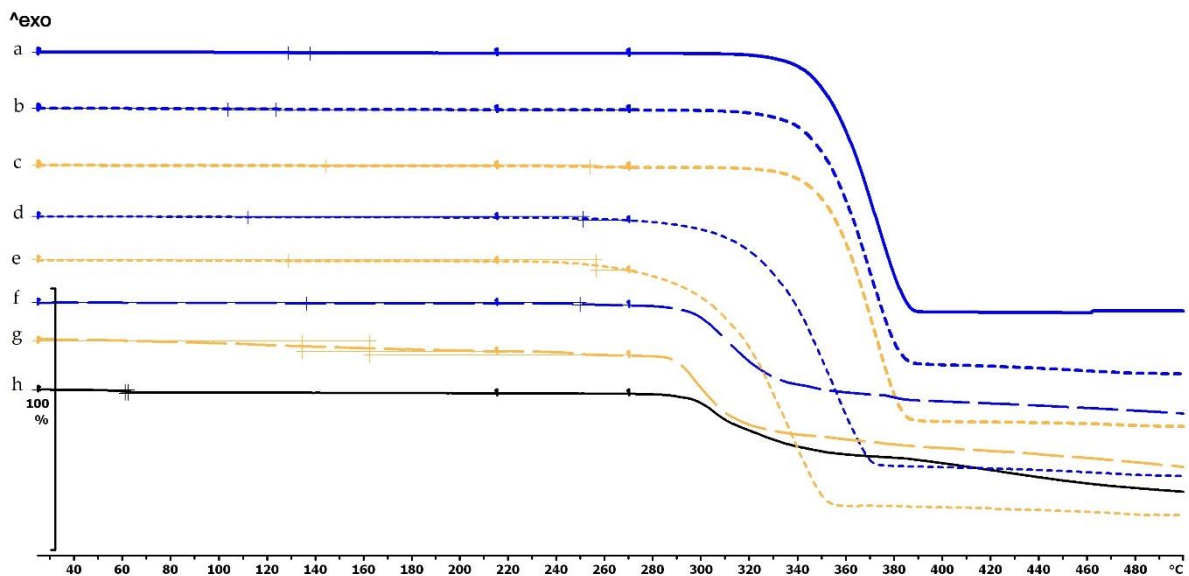
A diklofenák-nátrium termogravimetriás görbéje termikus stabilitást mutatott 280 °C-ig, így kijelenthetjük, hogy az alkalmazott hatóanyag stabil az alkalmazott nyomtatási hőmérsékleteken. 100 °C alatt kevesebb, mint 1% -os tömegveszteséget figyeltek meg, ami valószínűleg a hatóanyag felszínén megkötött víz elpárolgásának volt köszönhető. A polimer hordozókból kiöntött diklofenák por minták esetében ez nem fordult elő (25. ábra f), 26. ábra d) és 27. ábra d) görbéje). A hatóanyag termogravimetriás görbéje alapján valószínű, hogy az olvadás hőbomlással járt. A hatóanyag bomlása 500 °C-ig 39 % körül volt. A differenciális pásztázó kalorimetriai (DSC) görbe endoterm csúcsa 289,97 °C-on látható, amelyet azonnal egy exoterm csúcs követett, amikor is a diklofenák elbomlott (24. ábra).

A PLA, antibakteriális PLA, PETG és PMMA minták termogravimetriás elemzését közvetlenül a filament szálakon, diklofenák nélküli nyomtatott mintákon és diklofenák hatóanyagot tartalmazó nyomtatott mintákon végeztük, de az utóbbi mintákból a hatóanyagot a vizsgálat előtt kiöntöttük (polimer váz). A 25-27. ábrákon láthatóak a diklofenák, mint hatóanyag görbéi (fekete színnel jelölve), illetve a polimer vázából származó diklofenák por görbéi. A görbék alapján kijelenthetjük, hogy a hatóanyag és az összes filament stabil volt a 3D nyomtatási hőmérsékleten; kémiai bomlás vagy változás jeleit nem észleltük 270 °C alatt. Mind a négy polimer termikusan stabilnak tekinthető, de a polimerek a hőmérsékleti tartomány alapján csoportosíthatók: a PLA és az antibakteriális PLA maximális stabilitási értéke 280 °C, a PETG 400 °C-ig, a PMMA pedig 340 °C-ig stabil. Megállapíthatjuk, hogy az alkalmazott nyomtatási hőmérsékleteken (PLA – 215 °C, PETG – 250 °C és PMMA – 270 °C) az összes polimerünk stabil volt.

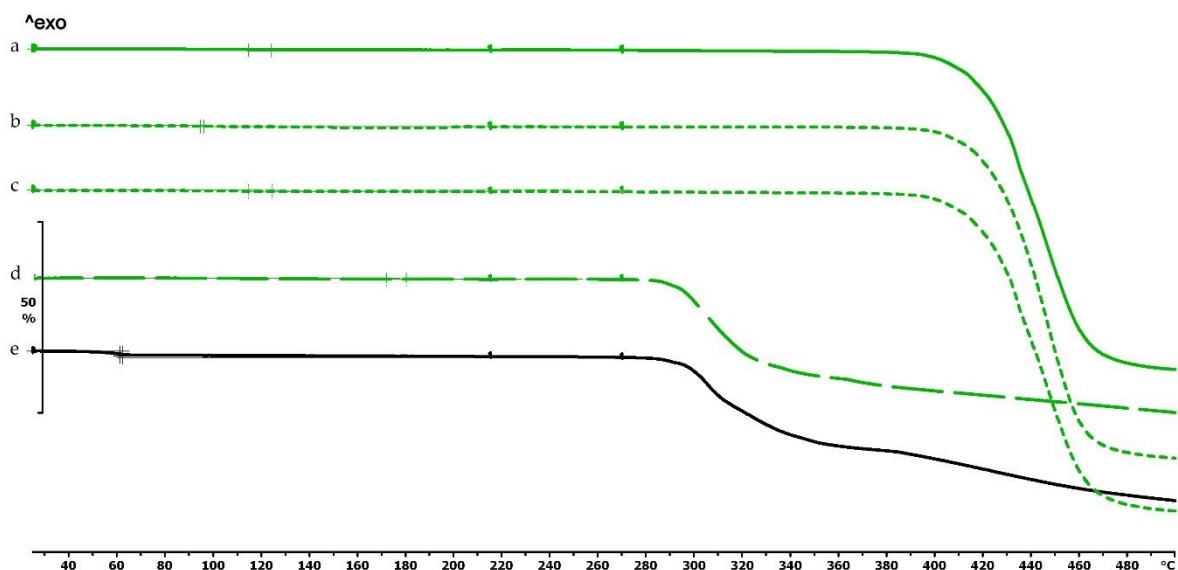
A PLA és antibakteriális PLA polimer vázak (25. ábra d, e görbe) esetében a termikus stabilitás 50 °C-on kisebb volt, mint a diklofenák nélküli minták esetében (25. ábra b, c görbe), ennek ellenére ezek a minták még mindig stabilnak tekinthetők, mert a nyomtatási hőmérséklet 215 °C volt. A PETG és PMMA polimerminták nem mutattak hasonló változást; a termikus stabilitás nem változott diklofenák-nátriummal vagy anélkül (26. és 27. ábra).



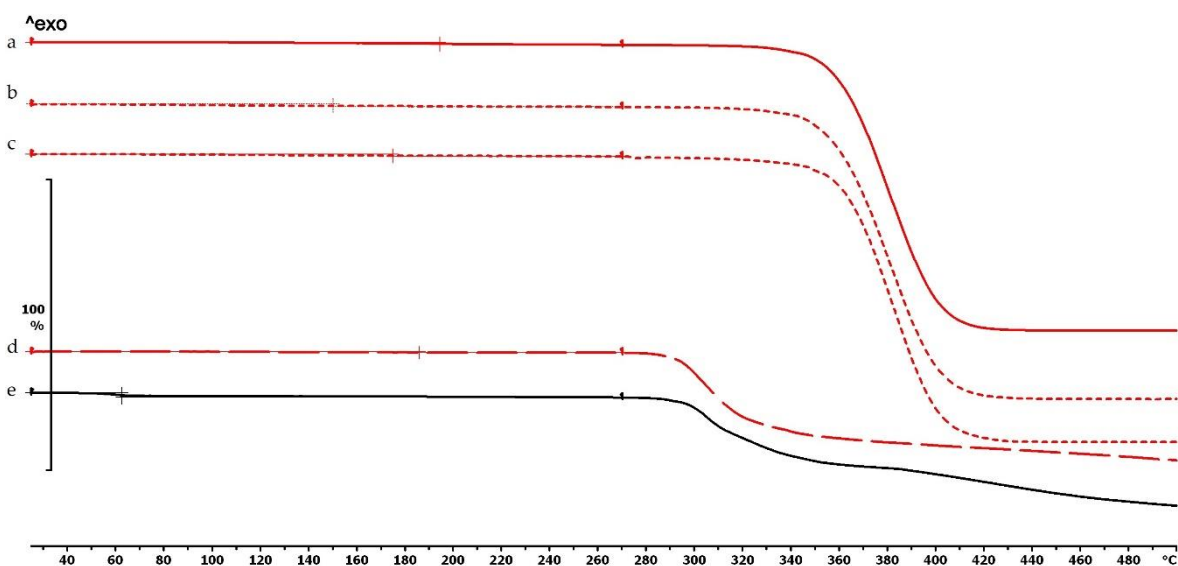
24. ábra - A diklofenák-nátrium termogravimetriás (TG) és differenciális pásztázó kalorimetriai (DSC) elemzése. A vizsgálatot ifj. Dr. Regdon Géza végezte el. a) termogravimetriás (thermogravimetric, TG) görbe; b) differenciális pásztázó kalorimetriai (Differential Scanning Analysis, DSC) görbe. A hőmérsékleti tulajdonságok elemzése 25 és 500 °C között történt.



25. ábra - A PLA és antibakteriális PLA minták termogravimetriás görbéi. A vizsgálatot ifj. Dr. Regdon Géza végezte el. a) PLA filament; b) PLA_{19_0} hatóanyag nélkül; c) AntiPLA_{19_0} hatóanyag nélkül; d) PLA_{19_0} polimer váz a hatóanyag kiöntését követően; e) AntiPLA_{19_0} polimer váz a hatóanyag kiöntését követően; f) diklofenák por a (d) mintából; g) diklofenák por az (e) mintából; h) diklofenák-nátrium por. A hőmérsékleti tulajdonságok elemzése 25 és 500 °C között történt.



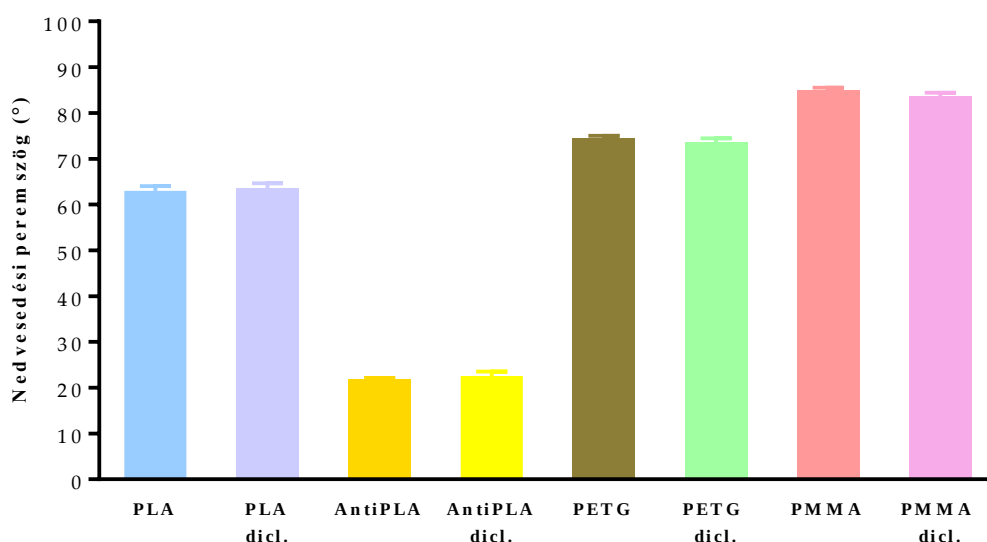
26 ábra - A PETG minták termogravimetriás görbéi. A vizsgálatot ifj. Dr. Regdon Géza végezte el. a) PETG filament; b) PETG_19_0 hatóanyag nélkül; c) PETG_19_0 polimer váz a hatóanyag kiöntését követően; d) diklofenák por a (c) mintából; e) diklofenák-nátrium por. A hőmérsékleti tulajdonságok elemzése 25 és 500 °C között történt.



27 ábra - A PMMA minták termogravimetriás görbéi. A vizsgálatot ifj. Dr. Regdon Géza végezte el. a) PMMA filament; b) PMMA_19_0 hatóanyag nélkül; c) PMMA_19_0 polimer váz a hatóanyag kiöntését követően; d) diklofenák por a (c) mintából; e) diklofenák-nátrium por. A hőmérsékleti tulajdonságok elemzése 25 és 500 °C között történt.

6.2.4.1.4. Nedvesedési peremszög meghatározás

A meghatározott nedvesedési peremszög értékek a 28. ábrán láthatóak. A nedvesedési peremszög értékeit mind a négyféle alkalmazott polimer esetében (PLA, PLA antibakteriális, PETG és PMMA) megmértük, diklofenák-nátrium nélkül és diklofenák-nátriummal is (az ábrán dicl. rövidítéssel jelölve). A különböző polimerek eltérő nedvesedési peremszög értékekkel rendelkeztek: PLA 63°, antibakteriális PLA 22°, PETG 74° és PMMA 84° körül. Érdekes módon az antibakteriális PLA minták nedvesedési peremszög értékei csaknem harmadára csökkentek a PLA nedvesedési peremszög értékeihez képest, a filamentumban elosztatott antibakteriális nanorészecskék miatt.



28. ábra - A PLA, Antibakteriális PLA (AntiPLA), PETG és PMMA minták nedvesedési peremszög (°) értékei diklofenák nélkül és diklofenák-nátriummal (dicl.). Az adatok átlagként vannak feltüntetve a szórásértékekkel együtt ($\pm$ SD). A kísérleteket három párhuzamos mintán végeztük el.

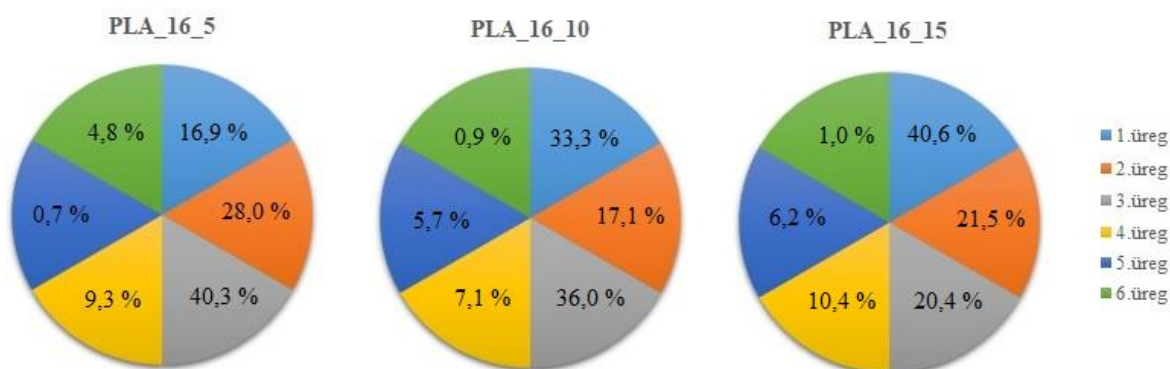
6.2.4.1.5. Raman spektroszkópia

A Raman spektroszkópiai mérést azzal a céllal végeztük el, hogy meghatározzuk a diklofenák-nátrium eloszlását az 5%, 10% és 15%-os kitöltöttséggel rendelkező minták hat üregén belül. Ezekhez a mérésekhez 16 mm átmérőjű és 0%, 5%, 10% vagy 15% kitöltöttségi százalékkal rendelkező politejsav mintákat használtunk. A 0% -os kitöltéssel rendelkező mintának csak egy ürege volt, ezért ebben az esetben a hatóanyag teljes mennyiségét határoztuk meg. A PLA_16_5, PLA_16_10 és PLA_16_15 minták esetében a diklofenák mennyiségét minden üregben a kalibrációs görbe felhasználásával határoztuk meg. A hatóanyag

menyiségét az egyes üregekben a 11. táblázat tartalmazza milligrammban megadva. Valamennyi minta körülbelül 30 mg diklofenák-nátriumot tartalmazott; ezek az eredmények összhangban voltak a tömegegységesség méréseivel (9. táblázat). A 29. ábrán a hatüregű mintákat (5%, 10% és 15% kitöltöttség) és a hatóanyag mennyiségét minden üregben jelöltük. Ezen eredmények alapján a teljes hatóanyag mennyiség körülbelül 75%-a az 1., 2. és 3. üregben volt a PLA_16_5, PLA_16_10 és PLA_16_15 mintákban.

Minta	A mért hatóanyag mennyiség az adott üregben (mg $\pm$ SD)					A diklofenák össz. tömege (mg)	
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	
PLA_16_0	28,04 $\pm$ 0,15	-	-	-	-	-	28,04 $\pm$ 0,15
PLA_16_5	4,73 $\pm$ 0,04	7,87 $\pm$ 0,18	11,32 $\pm$ 0,71	2,61 $\pm$ 0,31	0,19 $\pm$ 0,005	1,34 $\pm$ 0,09	28,06 $\pm$ 0,22
PLA_16_10	10,89 $\pm$ 0,22	5,58 $\pm$ 0,16	11,76 $\pm$ 0,29	2,32 $\pm$ 0,17	1,87 $\pm$ 0,04	0,29 $\pm$ 0,13	32,71 $\pm$ 0,17
PLA_16_15	12,12 $\pm$ 0,10	6,41 $\pm$ 0,05	6,08 $\pm$ 0,004	3,10 $\pm$ 0,14	1,85 $\pm$ 0,20	0,29 $\pm$ 0,31	29,85 $\pm$ 0,13

11. táblázat - Négy különböző kitöltöttségi százalékkal rendelkező minta diklofenák-nátrium tartalma. A politejsav minták eltérő kitöltöttségi százaléktételekkel rendelkeznek: 0%, 5%, 10% és 15%. A 0%-os minta egy belső üreggel, míg a többi minta hat belső üreggel rendelkezik. Mindegyik minta esetében a teljes hatóanyagmennyiséget, míg az 5%, 10% és 15%-os minták esetében az üregeken belüli hatóanyag eloszlást is meghatároztuk (mg). Az eredmények átlagként vannak feltüntetve a szórásértékekkel együtt ($\pm$ SD). A kísérleteket három párhuzamos mintán végeztük el, $n = 3$. A vizsgálatot Dr. Elek János és Csontos Máté végezte el.



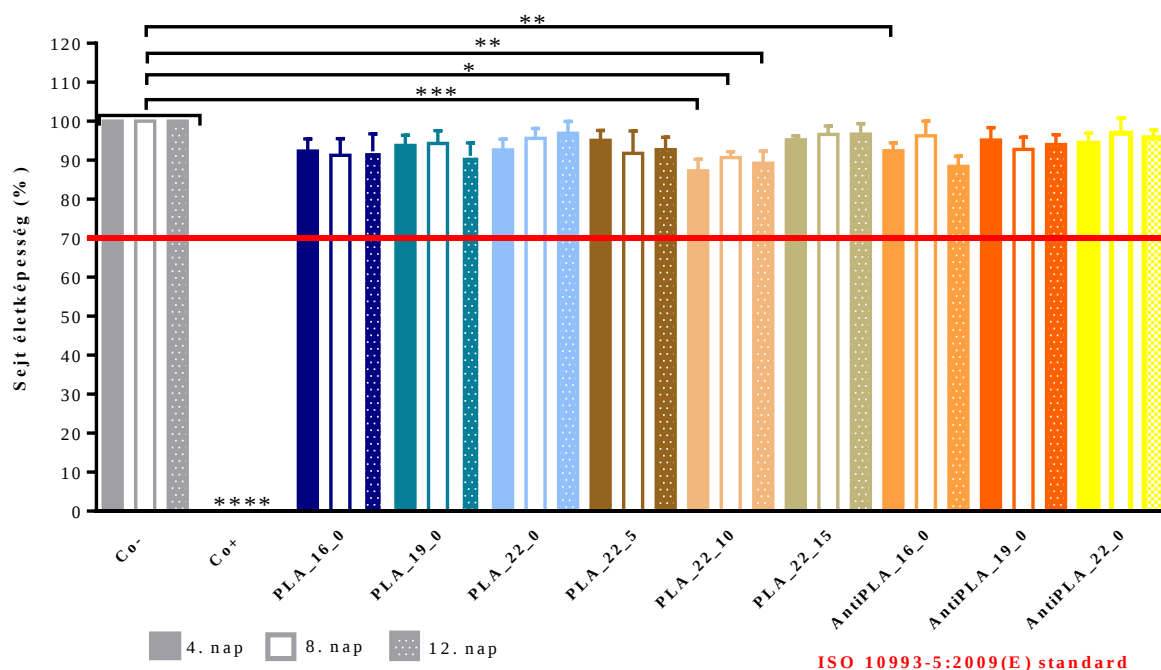
29. ábra - A diklofenák-nátrium eloszlása a különböző üregekben (1-6) a PLA_16_5, PLA_16_10 és PLA_16_15 minták esetében. A PLA_16_5 és PLA_16_10 esetében a legtöbb hatóanyag a 3-as számú üregben található, míg a

PLA_16_15 minta esetében az 1-es üregben, de a hatóanyag 75 %-a az 1-3 üregekben található meg mindegyik minta esetében. A szórás értékeket a 11. táblázat tartalmazza. A vizsgálatot Dr. Elek János és Csontos Máté végezte el.

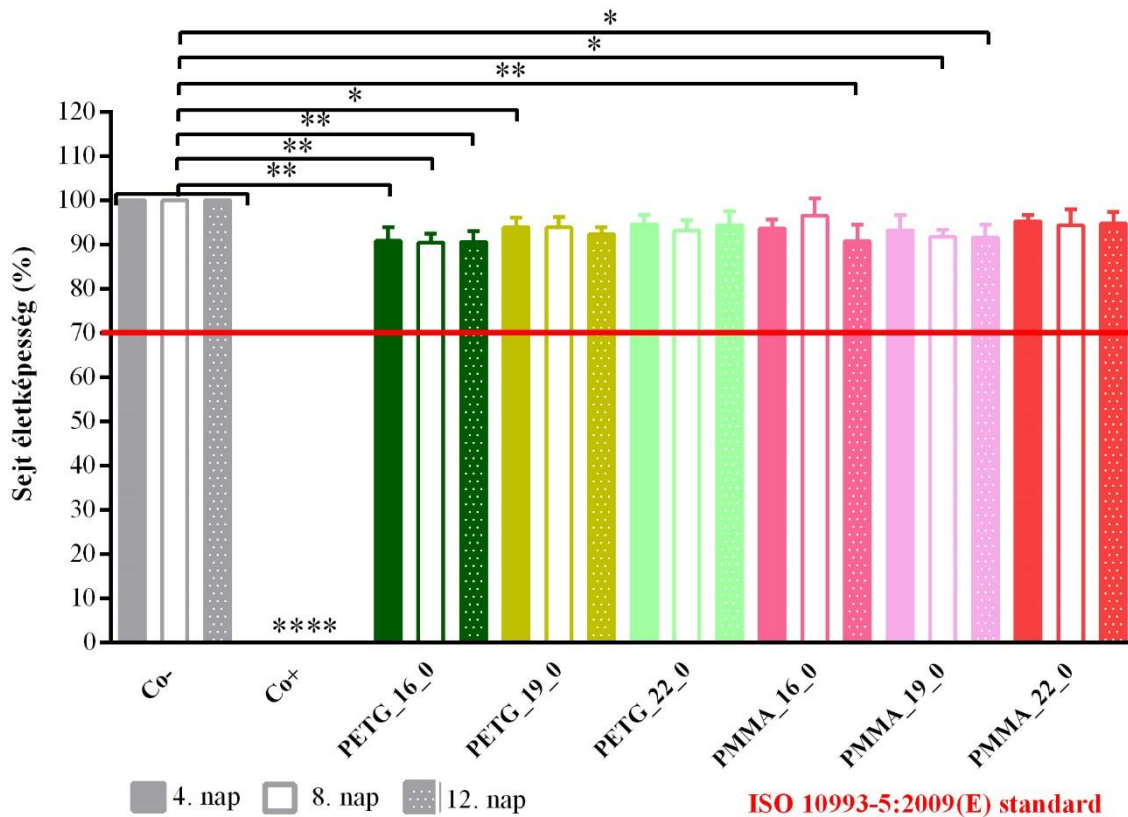
6.2.5. Citotoxicitás vizsgálata

Hosszú távú sejtelétképességi vizsgálatot végeztünk, hogy információkat nyerjünk a 3D nyomtatással előállított minták citokompatibilitásáról. A mintákat 4, 8 és 12 napig inkubáltuk sejtenyészítő médiumban, és a Caco-2 sejtek által képzett monolayert ezzel a médiummal kezeltük annak megállapítására, hogy a mintából bármilyen xenobiotikum kioldódott-e. Ez a módszer abban különbözött a hagyományos MTT vizsgálattól, hogy nem a gátló koncentrációt (IC_{50}) mértük, hanem a sejt életképességet a kezeletlen, negatív kontroll (DMME médium) összehasonlításával számítottuk ki. Ezt a módszert az ISO szabvánnyal összhangban került kidolgozásra.

Az eredményeket a negatív vagy kezeletlen kontrollhoz (Co-) viszonyítva fejeztük ki. (30. ábra és 31. ábra) Pozitív kontrollként (Co+) Triton X-100 (10% w / v) szolubilizálószerrel használtunk, amely szignifikáns különbséget mutat a többi vizsgált mintához képest. Az ISO 10993-5: 2009 (E) szabvány alapján, ha a sejtek relatív életképessége meghaladja a 70 %-ot a kontroll csoporthoz képest (100%), az anyagok nem citotoxikusak. [120] Ezen szabvány értelmében, mind a 3D nyomtatással előállított PLA, antibakteriális PLA, PETG és PMMA minták citokompatibilisnek minősültek.



30. ábra - A hosszú távú MTT teszt eredményei a PLA és antibakteriális PLA (AntiPLA) minták esetében. Az MTT tesztet Caco-2 sejtvonalon végeztük el, a 4., 8. és 12. napon. A sejtleletkéesség százalékos értéke a negatív kontrollhoz (Co-) viszonyítva van megadva. Pozitív kontrollként (Co+) Triton-X 100 (10 % w/v) szolubilizálószer alkalmaztunk, mely minden esetben szignifikáns (****) különbséget mutatott. A vizsgálati mintákat a negatív kontrollal összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy egyik minta sejtleletkéessége sem különbözik szignifikánsan. Az értékek átlagként vannak feltüntetve a szórásértékekkel. A hibaszáv a szórás jelöli ($\pm$ SD); a *, **, *** és **** pedig a szignifikáns különbség értéket $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ és $p < 0.0001$. A kísérleteket három párhuzamos mintán végeztük el.



31. ábra - A hosszú távú MTT teszt eredményei a PETG és PMMA minták esetében. Az MTT tesztet Caco-2 sejtvonalon végeztük el, a 4., 8. és 12. napon. A sejtleletkéesség százalékos értéke a negatív kontrollhoz (Co-) viszonyítva van megadva. Pozitív kontrollként (Co+) Triton-X 100 (10 % w/v) szolubilizálószer alkalmaztunk, mely minden esetben szignifikáns (****) különbséget mutatott. A vizsgálati mintákat a negatív kontrollal összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy egyik

minta sejtéletképessége sem különbözik szignifikánsan. Az értékek átlagként vannak feltüntetve a szórásértékekkel. A hibasáv a szórást jelöli ($\pm$ SD); a *,** és **** pedig a szignifikáns különbség értéket $p < 0.05$, $p < 0,01$ és $p < 0,0001$. A kísérleteket három párhuzamos mintán végeztük el.

6.2.6. Kioldódás vizsgálat

A minták kioldódási profilját egy USP I. típusú in vitro kioldódás vizsgáló berendezéssel mértem meg, hogy meghatározzuk hogyan befolyásolja a kioldódási profilokat a polimer, az átmérő és a kitöltöttségi százalék változtatása. Kiszámítottuk a minták diffúziós sebességét ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) és a fluxus értékeit ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$) is (12. táblázat). A PLA, az antibakteriális PLA, a PETG- és a PMMA minták diffúziós sebességét két időintervallumra osztottuk: 0-2 órára, illetve 2-24 órára a koncentráció és idő értékek alapján. A fluxus értékét a koncentráció és az időadatok, illetve a minták felülete alapján számoltuk ki (16 mm minta esetében $5,23\text{ cm}^2$; 19 mm mintánál $7,10\text{ cm}^2$; és 22 mm minta esetében $9,3\text{ cm}^2$). Ezek az eredmények a kioldódott hatóanyag mennyiséget jelentik a felszínen keresztül. Az első 2 órán belül a mintáink különböző diffúziós sebességgel jellemezhetők, 2 és 24 óra között pedig plató fázis áll be.

A kioldódott hatóanyag mennyiség (%) minden mintavételi időpont esetében a szórás értékekkel együtt ($\pm$ SD) megtalálhatóak a függelékben, de a kioldódott hatóanyag mennyiség (%) 2 óránál és 24 óránál megtalálható a 12. táblázatban is. 2 óra elteltével a kioldódott hatóanyag mennyiség 16 % és 97 % között változott. A PMMA_19_0 minta esetében már 2 óra elteltével kioldódott a maximális hatóanyag mennyiség. A vizsgálat 24. órájában azt tapasztaltuk, hogy a kioldódott hatóanyag mennyiség a polimer, az átmérő és a kitöltöttségi százalék függvényében 50 % és 90 % között változik. A PETG_19_0 és a PMMA_22_0 esetében a hatóanyag kioldódás 99,49 % és 99,48 % voltak, míg a PLA_22_10 esetében csak 51,26 %-a oldódott ki a teljes hatóanyag mennyiségnek 24 óra alatt.

Minden minta kioldódott hatóanyag százalék értékét egymintás t-próbával elemeztük 2 és 24 óra esetében. Az F teszt minden esetben nem szignifikáns eredményt mutatott. A t-próba eredményi a 12. táblázatban találhatóak. A PETG_16_0 és a PMMA_19_0 minták esetében az eredmények statisztikailag nem szignifikáns különbséget mutatnak, mivel a hatóanyag kioldódás már a 2 órás mérési pontnál elérte a plató fázist. (A részletes kioldódott hatóanyag százalék értékek a függelékben találhatóak.)

Minta	Diffúzió sebesség ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)		Flux ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$)		Kioldódott hatóanyag százalék (%)		t-próba
	Átlag 0–2 h	Átlag 2–24 h	0–2 h	2–24 h	2 h	24 h	2 h vs. 24 h
PLA_16_0	2,57	1,08	0,49	0,21	16,64	90,12	****
PLA_19_0	13,00	0,21	1,83	0,03	80,04	93,33	*
PLA_22_0	21,70	0,25	2,33	0,03	82,95	97,31	**
PLA_22_5	10,15	0,25	1,09	0,03	55,66	70,85	****
PLA_22_10	4,26	0,33	0,46	0,04	31,61	51,26	***
PLA_22_15	10,07	0,36	1,08	0,04	66,73	87,53	***
AntiPLA_16_0	7,42	0,85	1,42	0,16	48,61	97,48	****
AntiPLA_19_0	19,63	0,18	2,76	0,02	60,71	71,34	***
AntiPLA_22_0	31,15	0,19	3,35	0,02	86,47	95,73	***
PETG_16_0	9,43	0,06	1,80	0,01	55,65	59,96	ns
PETG_19_0	28,62	0,08	4,03	0,01	94,22	99,49	***
PETG_22_0	7,76	0,40	0,83	0,04	57,70	79,77	****
PMMA_16_0	17,56	0,26	3,36	0,05	81,38	96,39	****
PMMA_19_0	17,18	0,00	2,42	0,00	97,23	97,14	ns
PMMA_22_0	21,77	0,12	2,34	0,01	92,95	99,48	*

12 táblázat - Diffúzió sebesség, flux, kioldódott hatóanyag százalék és t-próba eredmények a PLA, antibakteriális PLA, PETG és PMMA minták esetében. A diffúzió sebesség átlagát 0–2 óra és 2–24 óra között számítottuk ki a minta koncentrációjából a megfelelő mintavételi időpontban. A flux számításához a diffúzió sebesség eredményeit a minták felületéhez viszonyítottuk (16, 19 vagy 22 mm), így jellemezve a felszínen keresztüli kioldódott hatóanyag mennyiséget. A kioldódott hatóanyag mennyiség (%) 2 és 24 órás eredményei szintén megtalálhatók a táblázatban, a többi mintavételi idő eredménye pedig a függelékben, a szórás eredményekkel együtt. A minták t-próbájának eredményei is megtalálhatóak a táblázatban. Ehhez a számításhoz minden minta kioldódott hatóanyag mennyiségét 2 és 24 óra időpontban t-próbával elemeztük. Az F teszt minden esetben nem szignifikáns volt. *, **, *** és **** statisztikailag szignifikáns különbségeket jeleznek, ahol $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ és $p < 0,0001$.

A kioldódási profilok páronkénti összehasonlítási eredményei a 13. táblázatban találhatóak: a különbözőségi faktor (f1) és a hasonlósági faktor (f2) számítások eredményei. Megállapítottuk, hogy az összes minta esetében a kioldódási profil nem hasonlónak tekinthető, azaz az összes mintának különböző kioldódási görbéje volt.

Páronkénti összehasonlítás				
Minta 1	vs.	Minta 2	f1	f2 (%)
PLA_16_0		PLA_19_0	51,47	17,47
PLA_16_0		PLA_22_0	56,63	14,22
PLA_19_0		PLA_22_0	10,63	48,21
PLA_22_0		PLA_22_5	32,87	27,41
PLA_22_0		PLA_22_10	57,25	15,32
PLA_22_0		PLA_22_15	18,68	38,61
PLA_22_5		PLA_22_10	36,31	33,58
PLA_22_5		PLA_22_15	23,87	40,79
PLA_22_10		PLA_22_15	90,20	22,55
AntiPLA_16_0		AntiPLA_19_0	42,81	26,82
AntiPLA_16_0		AntiPLA_22_0	26,55	22,85
AntiPLA_19_0		AntiPLA_22_0	28,31	29,51
PETG_16_0		PETG_19_0	47,87	15,46
PETG_16_0		PETG_22_0	19,98	42,03
PETG_19_0		PETG_22_0	60,80	18,49
PMMA_16_0		PMMA_19_0	9,21	51,12
PMMA_16_0		PMMA_22_0	11,16	47,93
PMMA_19_0		PMMA_22_0	7,07	51,33
PLA_16_0		AntiPLA_16_0	46,36	21,26
PLA_16_0		PETG_16_0	39,89	30,54
PLA_16_0		PMMA_16_0	53,23	16,39
AntiPLA_16_0		PETG_16_0	40,30	29,59
AntiPLA_16_0		PMMA_16_0	14,56	35,43
PETG_16_0		PMMA_16_0	34,99	26,13
PLA_19_0		AntiPLA_19_0	37,73	30,33
PLA_19_0		PETG_19_0	22,72	26,15
PLA_19_0		PMMA_19_0	10,82	46,70

AntiPLA_19_0	PETG_19_0	34,04	23,19
AntiPLA_19_0	PMMA_19_0	37,22	24,35
PETG_19_0	PMMA_19_0	18,02	28,65
PLA_22_0	AntiPLA_22_0	13,01	40,53
PLA_22_0	PETG_22_0	39,05	30,36
PLA_22_0	PMMA_22_0	5,85	61,29
AntiPLA_22_0	PETG_22_0	47,96	22,59
AntiPLA_22_0	PMMA_22_0	15,28	39,93
PETG_22_0	PMMA_22_0	31,10	26,85

13. táblázat - A kioldódási profilok páronkénti összehasonlítási eredményei: a különbözőségi faktor (f1) és a hasonlósági faktor (f2) számítások eredményei.

A hatóanyag felszabadulás eredményeit nullad- és elsőrendű kinetikai modellekhez illesztettük (14. táblázat). A legjobb illeszkedés meghatározásához determinációs együtthatókat használtunk. A PLA_16_0 minta nulladrendű modellre illeszkedett, melyet alátámaszt a kioldódási görbe lineáris alakja. (32. ábra) Az AntiPLA_16_0 minta elsőrendű kinetikát követett, a korrelációs együttható magasabb, mint 0,93. A számításokból kiderült, hogy a többi minta sem a nulla, sem az elsőrendű modellhez nem illeszthető a 0 és 24 óra közötti kioldódási eredmények összehasonlításakor, mivel a korrelációs együtthatók kisebbek voltak, mint 0,90. Az elemzésünk újabb szakaszában a kioldódott hatóanyag mennyiséget ugyanarra a kinetikai modellre illesztettük, de csak a 0–2 órán belüli eredményeket. A PLA_19_0, PLA_22_0, PLA_22_5, PLA_22_10, PLA_22_15, PMMA_16_0, PMMA_19_0 és PMMA_22_0 az első 2 óra alatt nulladrendű kinetikát követett, míg a PETG_16_0 és a PETG_22_0 jobban illeszkedik az elsőrendű kinetikai modellhez. Az AntiPLA_19_0, AntiPLA_22_0 és PETG_19_0 mintákat (a táblázatban *-gal jelöltük) a kioldódási görbék lefutása alapján vizsgáltuk. Először meghatároztuk az utolsó időpontot, mielőtt a görbe elérte a plató fázist, és a kinetikai modelleket csak az ezt megelőző időpont előtti értékekre számítottuk ki. Az AntiPLA_19_0 és a PETG_19_0 30 percig, míg az AntiPLA_22_0 45 percig illeszkedtek az elsőrendű kinetikai modellre.

Minta	Nullad rendű	Első rendű	Nullad rendű	Első rendű	* Nullad rendű	* Első rendű
	0–24 h	0–24 h	0–2 h	0–2 h	0–X h	0–X h
PLA_16_0	0,98	0,85	0,98	0,97	-	-

PLA_19_0	0,56	0,71	0,98	0,99	-	-
PLA_22_0	0,52	0,72	0,89	0,98	-	-
PLA_22_5	0,60	0,68	0,97	0,99	-	-
PLA_22_10	0,68	0,71	0,93	0,94	-	-
PLA_22_15	0,61	0,73	0,98	0,99	-	-
AntiPLA_16_0	0,73	0,93	0,97	0,94	-	-
* AntiPLA_19_0	0,43	0,60	0,65	0,68	0,91	1,00
* AntiPLA_22_0	0,36	0,65	0,64	0,80	0,85	0,98
PETG_16_0	0,51	0,49	0,99	0,97	-	-
* PETG_19_0	0,29	0,67	0,60	0,77	0,95	1,00
PETG_22_0	0,61	0,67	0,98	0,97	-	-
PMMA_16_0	0,54	0,80	0,88	0,90	-	-
PMMA_19_0	0,45	0,40	0,93	0,95	-	-
PMMA_22_0	0,47	0,45	0,90	0,98	-	-

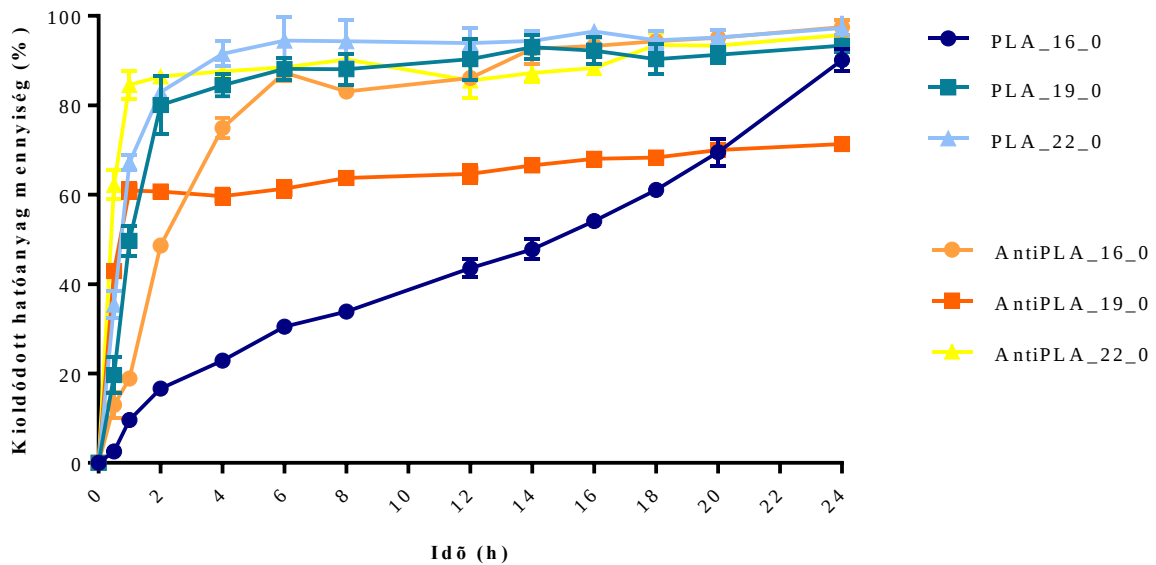
14. táblázat - A 3D nyomtatott minták kinetikai elemzése. A hatóanyag felszabadulás adatait nullad- és elsőrendű kinetikai modellhez illesztettük 0-24 óra, 0-2 óra és 0- X óra hosszát. A *-gal jelölt minták olyan eredményeket mutatnak be, amelyek nem jellemezhetők 0–24 vagy 0–2 időintervallum esetében sem nulladrendű, sem pedig elsőrendű kinetikával. Ezen minták esetében meghatároztuk azt az időpontot, ahol a plató fázis elkezdődik és addig illesztettük a kinetikai modellhez. A AntiPLA_19_0 és a PETG_19_0 esetén X = 0,5 óra, míg az AntiPLA_22_0 esetében X = 0,75 óra.

A kioldódott hatóanyag mennyiséget (%) az idő függvényében ábrázoltuk a politejsav (PLA), az antibakteriális PLA (AntiPLA) (32. ábra), a polietilén-tereftalát-glikol (PETG) és a poli (metil-metakrilát) (PMMA) minták esetében (33. ábra). A különböző kitöltöttségi százalékkal rendelkező PLA minták kioldódási görbéje (PLA_22_0, PLA_22_5, PLA_22_10 és PLA_22_15) a 34. ábrán található. Az eredmények átlagként vannak feltüntetve a szórás értékekkel együtt ($\pm$ SD), a vizsgálati mintaszám három ($n = 3$).

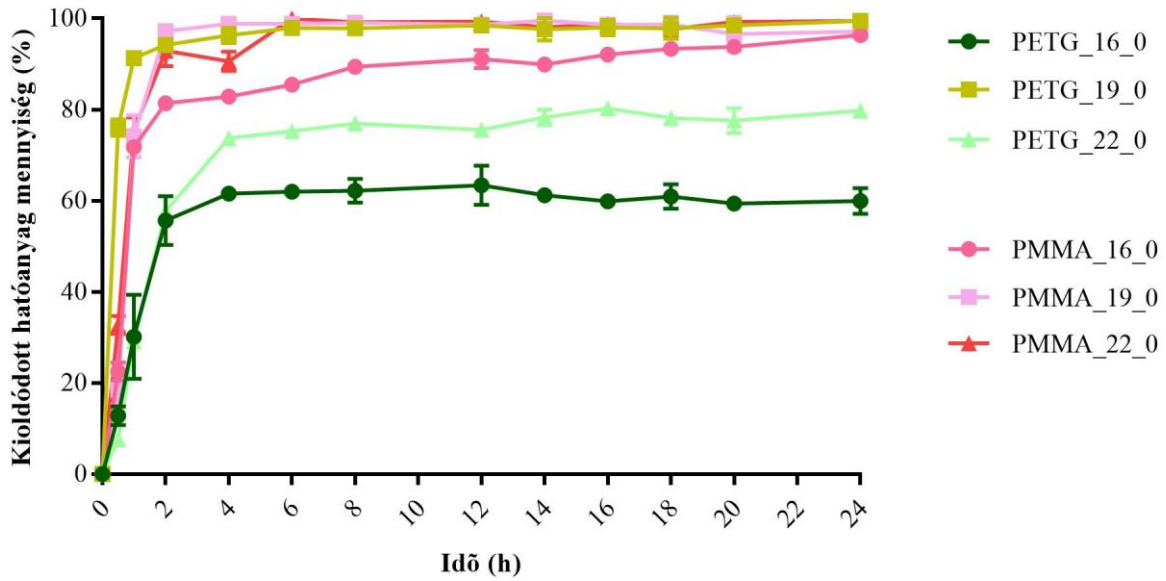
A Design-Expert® szoftver (Stat-Ease Int.) felhasználásával történeti statisztikai adatok elemzését végeztük el, hogy meghatározzuk az átmérő és a kitöltöttségi százalék hatását a kioldódási profilokra. A 35. ábrán a PLA minták háromdimenziós diagramja látható a 24 órás kioldódási időpont esetében. A három tengely a kitöltöttségi százalékot (%), a kioldódott hatóanyag mennyiséget (%) és a minta átmérőjét (mm) jelenti. A legtöbb hatóanyag a 0 %-os kitöltöttségi százalékkal rendelkező mintákból szabadult fel. Minél nagyobb a minta átmérője, annál nagyobb a kioldódott hatóanyag mennyisége. Érdekes módon a kioldódott hatóanyag mennyiség nagyobb volt 0 % és 15 % kitöltöttségi százalék értéknél, de a legalacsonyabb

kioldódási értéket 9% körül becsülték. Ugyanezen eredmények 2D diagramja a 36. ábrán látható.

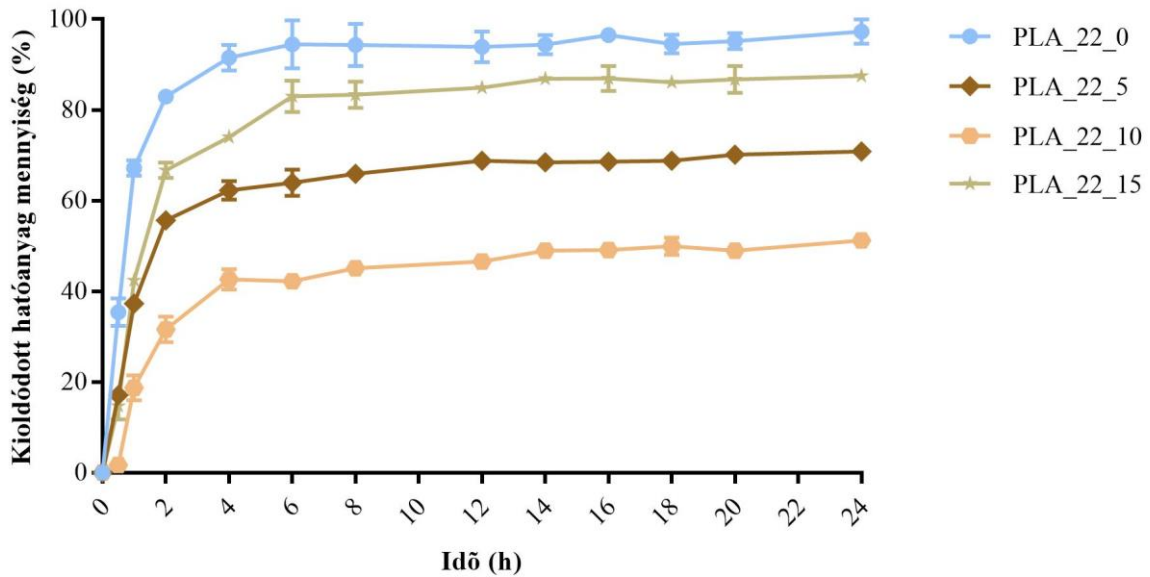
Az átmérő és a kitöltöttségi százalék változtatásának a várthoz hasonló hatása van a kioldódási görbékre. A kioldódás gyorsabb volt az átmérő növekedésével, a nagyobb hatóanyag leadó felület és így a nagyobb mennyiségű hatóanyag leadó pórus kialakulása miatt. A hatóanyag felszabadulása a mintákból lelassulhat, ha a kitöltöttségi százalék értéke nagyobb, mint 0 % azaz 5 %, 10 % vagy 15%-ra módosul.



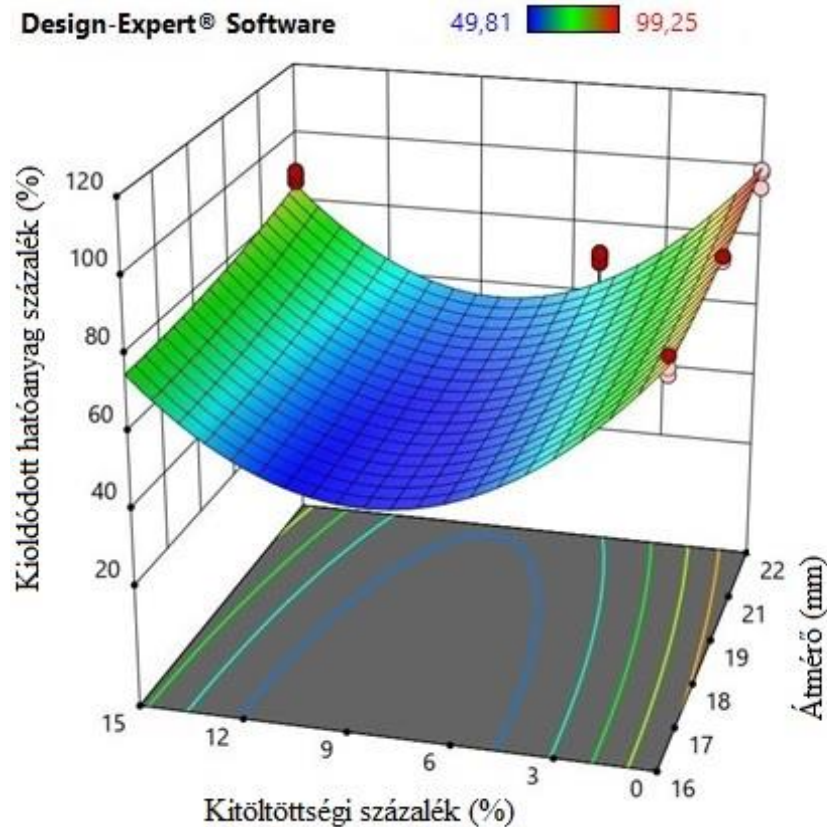
32. ábra - A kioldódott hatóanyag mennyiség (%) az idő függvényében ábrázolva a politejsav (PLA), az antibakteriális PLA (AntiPLA) minták esetében. Az eredmények átlagként vannak feltüntetve a szórás értékekkel együtt ($\pm$ SD), a vizsgálati mintaszám három ($n = 3$).



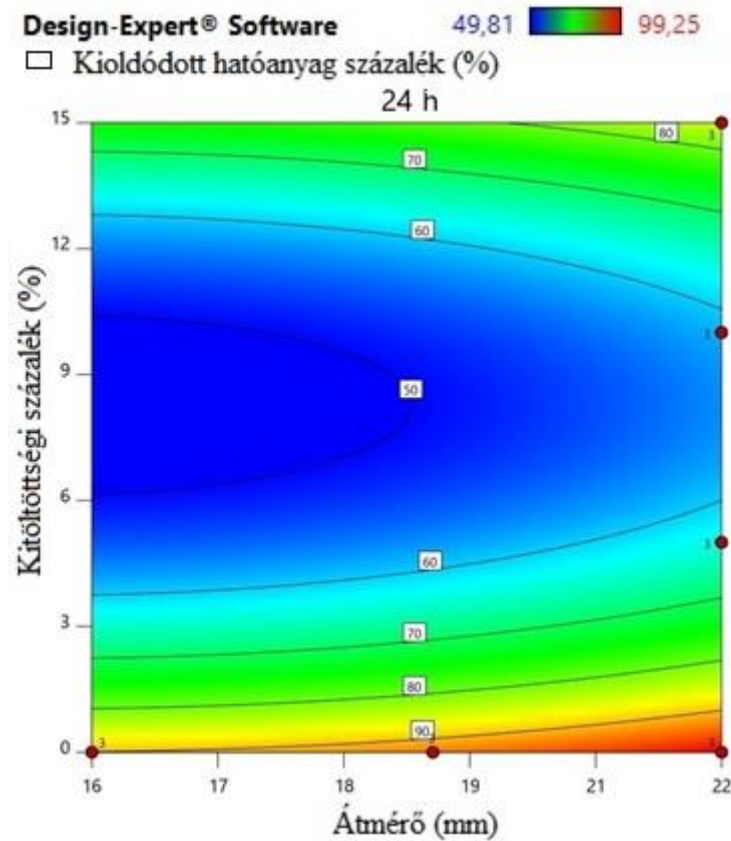
33. ábra - A kioldódott hatóanyag mennyiség (%) az idő függvényében ábrázolva a polietilén-tereftalát-glikol (PETG) és a poli (metil-metakrilát) (PMMA) minták esetében. Az eredmények átlagként vannak feltüntetve a szórás értékekkel együtt ($\pm$ SD), a vizsgálati mintaszám három ($n = 3$).



34. ábra - A kioldódott hatóanyag mennyiség (%) az idő függvényében ábrázolva az eltérő kitöltöttségi százalékkal rendelkező PLA minták esetében. Az eredmények átlagként vannak feltüntetve a szórás értékekkel együtt ($\pm$ SD), a vizsgálati mintaszám három ($n = 3$).



35. ábra - A politejsav (PLA) minták háromdimenziós (3D) diagramja a 24 órás kioldódott hatóanyag mennyiség (%) esetében. A diagramot Design-Expert® szoftverrel készítettük el. Az X tengely a kitöltöttségi százalékot (%), az Y tengely a kioldódott hatóanyag mennyiséget (%), míg a Z tengely a minta átmérőjét (mm) jelenti. A piros körök az előre jelzett érték feletti pontokat, a rózsaszín körök pedig az előre jelzett érték alatti pontokat jelölik. A jobb felső sarokban a kioldódott hatóanyag mennyisége (%) látható, ahol a kioldódott hatóanyag mennyisége más színnel van ellátva. Kék színnel a kioldódás 49,81 %-nál kezdődik, piros színnel pedig 99,25 % kioldódott hatóanyag mennyiségnél végződik.



36. ábra - A politejsav (PLA) minták kétdimenziós (2D) diagramja a 24 órás kioldódott hatóanyag mennyiség (%) esetében. A kitöltöttségi százalék (%) értéke az átmérő (mm) függvényében van ábrázolva. A piros körök az előre jelzett érték feletti pontokat jelölik, míg a “3” azt a minta számot, ami az előre jelzett érték felett van. A fekete négyzetben lévő számok pedig a kioldódott hatóanyag százalékot (%) jelölik.

7. Megbeszélés

7.1. 1. kísérletsorozat

Napjainkban az egészségügyi felhasználási célú 3D nyomtatási technológiák elsősorban a bionyomtatásra, a fogászati alkalmazásra, az ortopédiai alkalmazásra és a módosított hatóanyagleadású orális gyógyszerleadó rendszerek fejlesztésére összpontosítanak. [121]

Számos tanulmány jelent meg 3D nyomtatással előállított implantátumokról és gyógyszerformákról, azonban a kémiai szerkezet, a szerkezeti paraméterek és a citokompatibilitási tulajdonságok közötti összefüggéseket még nem vizsgálták. Vizsgálatunk célja az volt, hogy kapcsolatot találjunk a fent említett paraméterek között a kémiailag módosított politejsav alapú 3D nyomtatott minták esetén. Különböző amino oldalláncokat kapcsoltunk a politejsav alapvázhoz a nyomtatást követő kémiai módosítás során azért, hogy amid funkciós csoportokat hozzunk létre a nyomtatott minták felületén.

Az FDM nyomtatott mintákat úgy terveztük meg, hogy a fizikai, kémiai és in vitro biológiai tulajdonságokat minél szélesebb körben megvizsgáljuk. A vizsgálatainkat egy adott geometriájú mintán végeztük el változtatások nélkül, melynek előnye az volt, hogy kizártuk az eltérő geometriából eredő hatásokat, és lehetővé tette a teszt eredmények közvetlen összehasonlítását. A kémiai módosítás, avagy funkcionálizálás előnyösen befolyásolhatja a 3D nyomtatással előállított gyógyszerek morfológiáját és citokompatibilitási tulajdonságait. Az oldallánc módosításai eltérő felületi tulajdonságokat eredményezhetnek. [122] Thire és munkatársai nemrégiben publikálták, hogy a PLA minták felszínére polidopamint abszorbeáltak, ez a felületi abszorpció lehetővé teheti a kémiai és biológiai tulajdonságok módosítását a 3D nyomtatással előállított alapvázaknak. [109] A mi esetünkben a kinyomtatott alapvázak kémiai módosításának oka az volt, hogy növeljük a kedvező felületi tulajdonságokat és a politejsav biokompatibilitását.

A minták szerkezeti tulajdonságait pásztázó elektronmikroszkópiával (SEM), Fourier transzformációs infravörös (FTIR) spektroszkópiával, felszíni egyenetlenség vizsgálatával, pozitron annihilációs élettartam spektroszkópiával (PALS) és nedvesedési peremszög meghatározással elemeztük. A minták citokompatibilitásának vizsgálatához Caco-2 sejteken hosszú távú MTT tesztet, míg a biofilm képződésének vizsgálatát *Candida albicans* referencia izolátum alkalmazásával végeztük el.

A kinyomtatott és módosított PLA minták anyagszerkezeti jellemzésére rendelkezésre álló módszerek közül az FTIR spektroszkópiával kapott görbék bizonyíthatják az új kémiai funkciós csoportok jelenlétét, de az IR sávok intenzitása gyenge lehet, ha a változás csak a felületen ment

végbe. Ugyan más módszerek is képesek kimutatni az amid csoport képződését, de egyik sem alkalmazható a felületi módosítások detektálására, például a ^{13}C -NMR nem mutatná ki a szénatomot kevesebb, mint 0,1 % esetén. [123] Míg más módszerek nem alkalmasak a kovalens kötések kialakulásának bizonyítására, így kijelenthetjük, hogy az általunk választott vizsgálati módszer megfelelt a céljainknak. A módosított minták mindegyike esetén megfigyelhető a $\text{C}=\text{O}$ amid kötés 1550 cm^{-1} and 1650 cm^{-1} hullámhossz értékek között, ami csak az alapváz és a bekötődő oldallánc között kialakuló kovalens kötésből származhat.

A nedvesedési peremszög meghatározással kapott eredmények információt nyújtanak a felület hidrofilitásáról és hidrofobicitásáról, és ha korrelálnak az FTIR spektroszkópiával kapott eredményekkel, akkor lehetővé teszik a felület kémiai módosításának gyors jellemzését. Egyértelmű bizonyíték van arra vonatkozóan, hogy a felületi topográfiai és nedvesedési jellemzők befolyásolják az implantátumok beültetésekor a makromolekuláris és sejtszintű hatásokat. [124] A politejsav polimer észter funkciós csoportját kémiailag módosítottuk különböző elágazó és lineáris oligoamin módosulatokkal a minták hidrofilitásának növelése és a pozitív töltés létrehozása érdekében. Ezeket a hidrofil felületmódosításokat nedvesedési peremszög méréssel igazoltuk, ami Song és munkatársainak munkája alapján döntő fontosságú, mivel a minták hidrofil-hidrofób karakterisztikáját befolyásolhatja a kémiai módosítás. [125] Habár az etilén-diamin kis méretű és vízben nagyon jól oldódó molekula, így azt várnánk, hogy lemosódik a felszínről, ha nem alakul ki kémiai kötés. A kísérleti eredményeink alapján ez nem így történt, mivel a nedvesedési peremszög az intenzív mosás után is állandó értéket mutatott, azaz az etilén-diamin a felszínhez kémiai kötésen keresztül kapcsolódott. A nedvesíthetőségnek nagyon fontos szerepe lesz a minta beültetésekor, mivel meghatározza a várható biológiai eseményeket. [124] A nedvesíthetőséget befolyásolja a minta felületének kémiai módosítása, amint azt a mi munkánk, Nasrin és munkatársainak, illetve Mi és munkatársainak kísérletei is bizonyítják. [51] [52] Bizonyíték van a nedvesedési peremszög pH függésére is, de a módszer még nem teljesen bizonyított. [126]

A pásztázó elektronmikroszkópia megfelelő módszer a felszíni egyenetlenség, a porozitás és pórusméret jellemzésére, annak ellenére, hogy a felületi elemzés eredménye több paramétertől függhet (például az alkalmazott szűrőktől, a kiértékelt területektől). A különböző implantátumok felületének mikro, szubmikro és nano mérettartományban történő értékelése kötelezően elvégzendő vizsgálat. Mindazonáltal csak néhány standardizált módszer létezik az implantátumok felületének megfelelő meghatározására [124], bár a különböző implantátumok viselkedésének előrejelzése az emberi szervezetben elengedhetetlen.

A pozitron annihilációs élettartam spektroszkópiával mért o-Ps élettartam értékei jól korrelálnak az implantátumok méretével és a felszínen lévő esetleges szerkezeti hibákkal. [127] A pozitron annihilációs spektroszkópia (PALS) a polimer alapú implantátumok szupramolekuláris szerkezetét méri, amely megfelelő információt adhat a pórusméretről és a felszín porozitásáról. A felületnek körülbelül a felső 100 μm -e vizsgálható ezzel a módszerrel, és az eltérések nano mérettartományban láthatóak. Ez a módszer Einstein egyik alapelvén alapszik, és a detektált o-Ps élettartam-értékek összefüggésben vannak a minták felszínén lévő szabad térfogattal. [114]

A PALS és SEM kísérletek eredményeit összehasonlítva a PLA-ED, a PLA-TET és a PLA-Tris mind magas szabad térfogatot és számos felszíni egyenetlenség jelenlétét mutatta. A PLA-ED és a PLA-Tris esetében ezek körülbelül 1 μm átmérőjűek voltak, míg a PLA-TET esetében körülbelül 100–200 nm átmérőjűek voltak. Az MeNprN módosulat esetében azonban kevés egyenetlenség volt a minta felszínén, míg a szabad térfogat értéke jelentősen csökkent. Az eredményeink alapján közvetlen összefüggés mutatkozott a PALS által mért szabad térfogat és a SEM által megfigyelt esetleges egyenetlenségek megfigyelése között.

Ahhoz, hogy egy 3D nyomtatott implantátum forgalomba kerülhessen meg kell felelnie a különböző hatóságok által meghatározott összes szabványnak és előírásnak. [128] A biokompatibilitás vizsgálata az implantálható gyógyszerleadó rendszerek kötelező vizsgálata. Az ISO 10993-5 szabvány meghatározza a szükséges citotoxicitási vizsgálat paramétereit. A fő követelmény az érintkezés időtartama: korlátozott expozíció esetén az időtartam kevesebb, mint 24 óra, hosszantartó expozíció esetén pedig 1–30 napos vizsgálat szükséges. A 30 napnál hosszabb behatási idők hosszú távú tanulmányokat igényelnek. [129] A Caco-2 sejteket főleg folytonos sejtréteggént használják, nem pedig mint elkülönülő sejteket, annak ellenére, hogy számos vizsgálat esetében még a teljes integritás elérése előtt végzik el a vizsgálatot, például a végpont vagy a nem invazív sejtleletképeségi módszerek esetében (MTT-teszt, laktát dehidrogenáz (LDH) teszt, valós idejű sejt elektronikus érzékelő (RT-CES) stb.). [130] Az MTT-teszt széles körben alkalmazott, gyors kolorimetriás módszer, amely bizonyos vegyületek in vitro citotoxicitásának mérésére alkalmas sejtvonalakon vagy primer sejteken. Általában 96 lyukú plateken végezzük el, így nagy áteresztőképességű módszer, amely nem igényel sejtszámolást. Évtizedekig úgy gondolták, hogy az alkalmazott MTT festék a mitokondriumban alakul át, azonban az utóbbi években kételyek merültek fel a formazán-só képződés mitokondriális lokalizációjával kapcsolatban. [131]

A kutatócsoportok eddigi ismeretei alapján a politejsav jó biokompatibilitási készségű és hidrolitikusan lebomló polimer. [125] Mintáinkat DMEM médiumban, 37 °C-on tároltuk a 12.

napig történő mintavégzésig. A mintákat a médiumba helyeztük a 4., 8. és 12. napon történő mintavégzésig, annak felderítésére, hogy kioldódik-e bármilyen xenobiotikum a módosulatokból vagy a polimer vázból. A Caco-2 sejtekkel történő inkubációs periódus 30 perc volt. A citotoxicitási tesztet az ISO 10993-5 szabvánnyal összhangban végezzük el, de az alkalmazott inkubációs periódus rövidebb volt. [117] Egyértelműen bizonyított, hogy a PLA a tárolás során tejsavvá és glikolsavvá bomlik, és különböző tényezők (pH, molekulatömeg stb.) befolyásolhatják ezt a bomlást. [132] Számos tanulmány foglalkozott a PLA polimerek bomlásával, így vizsgálatunk fő hangsúlya nem a PLA degradáció vizsgálata volt, hanem a DMEM médiumban tárolt módosított PLA minták citotoxikus és biofilm képződésének hatása, amely közegekben a minták lebomolhatnak. Az in vitro citotoxicitási vizsgálatok képviselik az első szűrőt a citokompatibilitás értékeléséhez, mivel ezek a vizsgálatok érzékenyek, hatékonyan alkalmazhatók és jól reprodukálható módszerek. [133] Az MTT teszt rendkívül hatékony módszer, mivel csak az élő sejtek képesek átalakítani az MTT festéket mitokondriális enzimjeik segítségével. Egy kutatócsoport megállapította, hogy a formazán-só kialakulása a sejtek metabolikus képességétől és a mitokondriumok számától függ. [131] Az MTT teszt ezen limitáló tényezője ellenére még mindig a legmegbízhatóbb és leggyorsabb teszt a citokompatibilitás megállapításához. [134] Egy kutatócsoport ugyan azt állapította meg, hogy a politejsav alapú minták beültetése gyulladásos reakciót válthat ki [135], de egy másik kutatócsoport rámutatott arra, hogy ezek a mellékhatások rendkívül ritkák. [136] Az MTT teszt eredményei alapján az összes PLA mintánk citokompatibilisnek bizonyult.

A mikrobiális biofilm képződés komoly kockázati tényező lehet a beültetett implantátumok esetében, ami megjósolhatatlan szövődményeket okozhat. [137] Egy korábbi cikkben elemezték a felületi módosítás és az antimikrobiális tulajdonságok közötti kapcsolatot. A 3D nyomtatott polimer alapú minták közvetlen kémiai módosítása egy új megközelítést jelent, mivel ebben az esetben a felület ténylegesen megváltozik és nem a gyakran alkalmazott bevonás műveletét használja fel, mely alkalmazása limitált. [138] A mikrobiális biofilm képződés hozzájárulhat gyulladásos válasz kiváltásához, és további műtéti beavatkozásokat igényelhet, például fogászati implantátumok esetében. A *Candida albicans* képes biofilmet képezni az orvostechikai eszközökön, ami az emberi szervezetben betegségek kialakulását okozhatja. [139] A mi kísérletünkben kémiai módosítás alkalmazása lehetővé teszi a mikrobiális biofilm képződés gátlását, vagy még nagyobb mértékű felületi kolonizációt eredményezhet. Érdekes módon mind a biofilm képződés gátlása, mind a fokozása jelentőséggel bírhat a kutatók számára. Az ilyen kémiai módosítás kulcsfontosságú pontja a reaktív észtercsoportok jelenléte a 3D nyomtatásban alkalmazott polimerekben. A politejsav

(PLA) és a polietilén-tereftalát (PET) észter vázú polimerek, míg a poli-(metil-metakrilát) (PMMA) észter funkciós csoporttal rendelkezik.

A biofilm formálási készség vizsgálata szintén kötelező eleme a citokompatibilitási vizsgálatnak. [140] A biofilm képződés hosszú távú beültetésnél súlyos szövődmények kialakulását okozhatja, amely fertőzésekhez és antimikrobiális rezisztencia kialakulásához vezethet. [99] A beültetés során bármilyen fertőzés veszélyes lehet, mivel nagyfokú gyulladást és az implantátum kilökődését eredményezheti. A biofilm képződés akár a politejsav szerkezetét is megváltoztathatja, ami a hatóanyag felszabadulását befolyásolhatja és így súlyos mellékhatások kialakulásához vezethet. [135] A biofilm képződési vizsgálatot *Candida albicans* SC5314 referencia izolátummal végeztük el, mivel a *Candida* fajok az egyik leggyakoribb fertőzést okozó kórokozók [99] és más *Candida* fajok súlyos szisztémás mikózist okozhatnak, melyek 45 %-os mortalitást mutatnak. [141]. Ideális esetben a mért abszorbanca érték nulla, ami azt jelenti, hogy egyáltalán nem keletkezik a minta felszínén biofilm. A biofilm formálási készség kiértékeléséhez használt klasszifikációs rendszer alapján mindegyik mintánk alacsony biofilm formálási készségűnek tekinthető. [119] A mi kutatásunk esetében az oligoamin funkciós csoportok kapcsolása a politejsav alapvázhhoz kedvezőbb antimikrobiális tulajdonságokat eredményezett anélkül, hogy megváltoztattuk volna a politejsav kedvező fizikai tulajdonságait. Egy kutatócsoport, kísérleteihez antimikrobiális hatóanyagot használt, ami ugyan megfelelő tulajdonságokat eredményezett, de lecsökkentette a politejsav minta mechanikai megfelelőségét. [142]

Az alkalmazott 3D nyomtatási eljárással gyorsan és egyszerűen állíthatóak elő a mintáink. Elmondhatjuk, hogy a kémiai módosítással a politejsav vázhoz kapcsolt amid funkciós csoportok kedvezően változtatják meg a politejsav minták anyagszerkezeti tulajdonságait. Alacsony biofilm formálási készség és kedvező citokompatibilitási tulajdonságok jellemzik a mintákat még hosszan tartó expozíció esetén is. Kapcsolat mutatható ki a módosulat típusa és a létrejövő tulajdonságok között. Összességében a politejsav, mint 3D nyomtatáshoz használt filament, tulajdonságai nagymértékben javíthatóak a kémiai módosítással. Ezek az implantátumok nagy lehetőséget biztosítanak a különböző antimikrobiális hatóanyagok beépítésére. Eredményeink alapján a PLA-ED, a PLA-Tris és a PLA-TET minták rendelkeznek a legkedvezőbb anyagszerkezeti és antimikrobiális tulajdonságokkal. Ezért ezek a minták további in vivo és/vagy humán vizsgálatokra küldhetők.

7.2. 2. kísérletsorozat

A kísérleteink során az FDM nyomtatáshoz PLA, antibakteriális PLA, PETG és PMMA kereskedelmi forgalomban kapható filamenteket használtunk fel, amely lehetővé teszi a gyors gyártást. Az implantálható gyógyszerleadó rendszerek különböző mintáit nyomtattuk ki 16, 19 vagy 22 mm átmérővel és 0 %, 5 %, 10 % vagy 15 %-os kitöltöttségi százalékkal. A kísérleteink célja az volt, hogy bizonyítsuk az FDM alkalmazhatóságát, mint alkalmas, egyénre szabott gyógyszerleadó rendszert a műtétek során. Néhány szerző arról számolt be, hogy a személyre szabott gyógyszeres kezelés kiváló megoldást jelent a megfelelő egészségügyi ellátás eléréséhez. A hatóanyagokat a megfelelő mennyiségben és a megfelelő időben lehet bejuttatni a humán szervezetbe. [143]

A 3D nyomtatás jelentősen felgyorsítja a tervezést mind a kutatás-fejlesztés, mind pedig az ipari léptékű előállítás során. [144] Egy kutatócsoport szerint az implantátumok előállításához használt anyagok fizikai és kémiai tulajdonságai jelentősen befolyásolják az implantátum alkalmazhatóságát, például a kioldódási profilt vagy a biodegradáció idejét. [145] Az implantálható gyógyszerleadó rendszerek esetében is különböző dizájnokat terveztek meg és állítottak elő a kutatók. Az egyik kutatócsoport egy lövedék alakú implantálható rendszert állított elő porózus szerkezettel, mely szabályozott citoxán felszabadulásra képes. [146] Egy másik kísérletben üreges rendszereket hoztak létre egy soklépéses előállítási folyamat során, amely három különböző polimert igényelt. Először egy politejsav alapvázat nyomtattak, amely adott mennyiségű polivinil alkohol polimer üreget tartalmazott. Az ibuprofént, mint modell hatóanyagot manuálisan juttatták be. Végül a mintát bevonták egy polikaprolakton polimerrel. [69]

A 3D nyomtatási folyamathoz nehezen illeszthető be a hatóanyaggal való töltés. Kutatócsoportunk kidolgozott egy egyszerű módszert a minták hatóanyaggal történő töltésére. Először minden mintához kinyomtattunk egy fedőlemezt, amelyet a hatóanyagot tartalmazó alsó rész tetejére helyeztünk el, majd befejeztük a 3D nyomtatást a felső rész kinyomtatásával. Így elkerülhető a hatóanyag esetleges bomlása a magas nyomtatási hőmérséklet (210–270 °C) miatt és a nyomtatás során alkalmazott ventilláció következtében történő hatóanyag veszteség is. [136] Egy kutatócsoport kísérletei esetében a polivinil alkohollal történő 3D nyomtatást követően 5 %-os hatóanyag veszteséget tapasztaltak, ami jóval magasabb, mint a gyógyszeriparban elfogadott maximum 1%-os hatóanyag veszteség. [147] Egy másik kísérletben 50 %-os hatóanyagtartalmú filamentet állítottak elő, de a kutatók kijelentették, hogy a filament hatóanyagtartalmának növelésével a filament tulajdonságai, illetve a viselkedése a 3D nyomtatás során jelentősen megváltozhat, ami a kívánt termék tulajdonságait is jelentősen

megváltoztathatja. [148] A munkámban megfelelő a 3D nyomtatás, mely során sem a hatóanyag stabilitása, sem pedig a hatóanyag mennyisége nem befolyásolt. Mivel az általunk előállított gyógyszerforma egy implantálható gyógyszerleadó rendszer, így a hatóanyag közvetlenül felhasználható az azonnali minta nyomtatás során, majd a kapott gyógyszerleadó rendszer felhasználható a műtétek során.

Termogravimetriás elemzést alkalmaztunk a minták hővel szembeni stabilitásának feltérképezésére 25 és 500 °C között, a polimer filamentek, a hatóanyag, a hatóanyag tartalmú és hatóanyag nélküli nyomtatott minták esetében. Míg differenciális pásztázó kalorimetriai (DSC) elemzést alkalmaztunk az endoterm és exoterm különbségek feltérképezésére a hatóanyag esetében. [149] [150] A termogravimetriás elemzés eredményeképpen megállapíthatjuk, hogy a diklofenák-nátrium 280 °C-ig stabil és a diklofenák tartalmú mintáink stabilak voltak a 3D nyomtatás során. Az eredményeink alapján nem volt kémiai változásnak jele 270 °C alatt a polimerek esetében. Mindegyik alkalmazott polimer hőstabilisnak tekinthető. Ezen eredmények alapján ezek a polimerek hősterilizációval is sterilizálhatóak, ami lehetővé teszi a steril filamentek közvetlen nyomtatását, akár a műtétek alatt is. [151]

A nedvesedési peremszög értékének meghatározása információval szolgál a minta hidrofób vagy hidrophil viselkedéséről, amit a polimer típusa is befolyásolhat. [152] A nedvesedési peremszög meghatározása alapján a PLA, antibakteriális PLA, PETG és PMMA polimerek különböző nedvesedési tulajdonságokkal rendelkeznek, ami befolyásolhatja a minták esetleges kilökődését a szervezetben. [125] Az antibakteriális PLA esetében kisebb nedvesedési peremszög értékeket kaptunk, mint a PLA minták esetében, így az antibakteriális PLA mintának nőtt a hidrophilitása. Az alacsony nedvesedési peremszög érték azt jelenti, hogy a vizsgált anyag és a víz molekulák közötti interakció nagy volt, ami a felszín magas hidrophilitásával jár. [95]

A Raman spektroszkópia egy széles körben alkalmazható karakterizációs eljárás. A mi esetünkben Raman spektroszkópiával határoztuk meg a különböző kitöltöttségi százalékkal rendelkező minták esetében a diklofenák-nátrium elhelyezkedését az üregeken belül. [153] Eredményeink alapján a minták 30 mg diklofenák-nátrium sót tartalmaztak, ami összhangban van a tömegegységesség során kapott eredményekkel. A hatóanyag eloszlása esetén pedig a hatóanyag 70 %-a három üregben helyezkedik el a PLA_16_5, PLA_16_10 és PLA_16_15 minták esetében.

A minták anyagszerkezetét pásztázó elektronmikroszkópiával elemeztük (SEM) a kioldódás vizsgálat előtt illetve után, annak feltérképezésére, hogyan változik a polimer porozitása és hogyan változik a pórusméret a kioldódás következtében. [154] A 3D nyomtatást követően a minták felszíne egyenletes, nincsenek pórusok a felszínen, viszont a kioldódást

követően pórusok keletkeztek a minták felszínén, ami alapján a hatóanyag felszabadulása diffúzióval történt, rezervoár rendszerből.

A mikro komputertomográfia (mikro CT) módszer széleskörben alkalmazható a minták három dimenzióban történő megjelenítéséhez, mely lehetővé teszi a porozitás és a belső szerkezet feltérképezését is. [155] A mikro CT eredmények megerősítették a SEM vizsgálatokkal kapott eredményeket, azaz a minta felszínén pórusok keletkeztek, melynek a mennyiségét is meghatároztuk és a felszínen a kioldódást követően 6,11 %-nyi pórus keletkezett.

A kioldódás vizsgálat során három különböző paramétert határoztunk meg: a polimer típusát (PLA, antibakteriális PLA, PETG vagy PMMA), a minta átmérőjét (16, 19 vagy 22 mm) és a kitöltöttségi százalék értékét (0%, 5%, 10% vagy 15%) annak feltérképezésére, hogyan befolyásolja a diklofenák-nátrium, mint modell hatóanyag kioldódási profilját. [104]

Az átmérő növekedésével gyorsabb lesz a hatóanyag kioldódása, amivel nagyobb az alsó és a felső felület, ahol a pórusok képződhetnek és így megtörténhet a hatóanyag leadás. A PLA_16_0, PLA_19_0 és PLA_22_0 minták esetében az átmérő növelésével gyorsabb volt a hatóanyag leadása. A minta belső kitöltöttségi százalékának növelésével is befolyásolható a hatóanyag kioldódása. A kísérleti eredményeink alapján a 0 %-os belső kitöltöttségi százalékkal rendelkező minta esetében volt a leggyorsabb, mivel nem volt az alsó és felső oldallal érintkezési pontja. Míg a kitöltöttségi százalék értékének növelése (5%, 10% vagy 15%) nem mutatott konstans hatást a kioldódási profilra. Az FDM típusú 3D nyomtatással létrehozott minták alsó és felső része nem zárja le hermetikusan a minta belső részét és befolyásolhatja a mintából történő hatóanyag kioldódást. [156] Az átmérő és a kioldódási százalék a vártak megfelelő módon befolyásolja a kioldódási profilt. A polimer típusának változtatása nem befolyásolja szignifikánsan a kioldódási profilokat, habár az eredmények alapján a PMMA alapvázú mintákból oldódik ki a legnagyobb mennyiségű hatóanyag 24 óra elteltével.

Számos kutatócsoport foglalkozott már a 3D nyomtatással előállított mintákból történő hatóanyag kioldódással és arra az eredményre jutottak, hogy a kioldódás történhet a polimer vázon keresztül, mint rezervoár rendszerből. [157] A hatóanyag kioldódása a mintából számos fizikai és kémiai paramétertől függ, amely nehezíti a kioldódási profil leírását megfelelő matematikai modellel, [158] így a mintáinkat nullad- és elsőrendű kinetikai modellel elemeztük. [159] A kísérletünkben a PLA_16_0, a PETG_16_0 és a PETG_22_0 minták nulladrendű kinetikával, míg a többi minta elsőrendű kinetikával írható le. Az eredményeink alapján az előállított implantátumok mikrostruktúrájában történő változások szignifikánsan befolyásolhatják a hatóanyag kioldódását. A kutatócsoportoknak olyan implantátumokat kell

megtervezniük, ami lecsökkenti ezen változásokat, így olyan gyógyszerleadó rendszereket létrehozva, amellyel megfelelő in vitro/in vivo korreláció érhető el. [160]

A PLA és az antibakteriális PLA biodegradábilis polimerek, így a degradációt nyolc héten keresztül vizsgáltuk pH = 7,4; 37 °C-on tömegméréssel. A vizes közegben történő hidrolitikus bomlás számos tényezőtől függ. [161] A politejsav pK_a értéke 3,84 [162] és a hidrolízis gyorsabb, alacsonyabb vagy magasabb pH érték esetében. [163] Néhány kutató megvizsgálta a bomlást, változó pH-t alkalmazva (1,5, 4,5 vagy 7,4) 65 °C-on. Eredményeik alapján a bomlás függ a polimer molekulatömegétől, az alkalmazott hőmérséklettől vagy pH-tól. [164] Méréseink szerint a nyolc hét alatt 37 °C-on, 7,4-es pH értéken nem kezdődött meg a minták bomlása.

A minta biokompatibilitási tulajdonságait hosszú távú MTT citotoxicitási vizsgálattal elemeztük. Az MTT vizsgálat elméleti alapjai megegyeznek az 1. kísérletsorozatban leírtakkal. Az MTT vizsgálatot az ISO 10:993 standard értelmében végeztük el, ami meghatározza az alkalmazható sejtszámot a plate-ben, az inkubálási időtartamot és a pozitív kontroll típusát. Kísérletünkben az ISO standardhoz képest rövidebb inkubálási időtartamot alkalmaztunk. A steril mintáinkat DMEM médiumban tároltuk a 4., 8. és 12. napig történő mintavégzésig annak a megállapítására, hogy kioldódik-e bármilyen xenobiotikum a mintából. A hosszú távú MTT teszt alapján az ISO 10993:5 standard értelmében, mindegyik mintánk citokompatibilisnek tekinthető.

Tizenkét eltérő mintát állítottunk elő FDM típusú 3D nyomtatással négy különböző polimerből, három átmérő és négy kitöltöttségi százalék értékekkel. A speciális mintatervezésnek köszönhetően a minták bármilyen típusú hatóanyaggal megtölthetők, anélkül, hogy a magas nyomtatási hőmérséklet befolyásolná a hatóanyag stabilitását vagy a ventilláció befolyásolná a minta mennyiségét, amit a termogravimetriás és differenciális pásztázó kalorimetriai, illetve Raman spektroszkópiai eredményeink megerősítenek. Az átmérő és a kitöltöttségi százalék értéke a vártan megfelelően befolyásolja a minta kioldódási profilját. A SEM és mikro CT vizsgálati eredmények megerősítik, hogy a hatóanyag kioldódása a minták felszínén keresztül történik pórusokon keresztül diffúzióval, rezervoár rendszerből. Az MTT teszt alapján mindegyik mintánk citokompatibilisnek tekinthető minimum 12 napig. A kísérlet eredményeként a PLA és az antibakteriális PLA alkalmas további vizsgálatokra, mint implantálható gyógyszerleadó rendszer.

8. Összefoglalás

Az 1. kísérletsorozat eredményeképpen elmondhatjuk, hogy sikeresen állítottunk elő 3D nyomtatással alapvázakat. Egyszerre ötven mintát tudunk nyomtatni. A nyomtatott vázaknak sikeres volt a kémiai oldallánc módosítása, melyet az anyagszerkezeti vizsgálatok megerősítenek. Az FTIR spektrumok pedig bizonyítják, hogy kovalens kötés alakul ki az amin csoportok és a politejsav alapváz észter csoportja között. Az MTT teszt eredményeképpen kijelenthetjük, hogy az előállított minták nem citotoxikusak, mindegyik minta megfelelőnek tekinthető a 12 napig történő mintavételig. A kémiai módosítás eredményeképpen a *Candida albicans* referencia izolátum általi biofilm formálási készség kisebb lett. Az in vitro biokompatibilitási (MTT és biofilm formálási készség) vizsgálatok alapján kijelenthetjük, hogy a citotoxicitás megállapításához több mint egy vizsgálat elvégzése szükséges, a megfelelő következtetés levonásához. Habár, a citotoxicitási eredmények önmagukban nem feltétlenül jelzik előre az in vivo citotoxicitást, de más kísérletekkel együtt elvégezve (nedvesedési peremszög, PALS és SEM eredmények) megbecsülhetőek az in vivo kompatibilitási adatok. Ezt a munkát kiterjesztettük más funkciós csoportokra is, beleértve az anionos funkciócsoportokat és más polimer filamenteket is vizsgáltunk mint például a PET vagy a PMMA.

A 2. kísérletsorozat során olyan implantálható gyógyszerleadó rendszerek előállítását tűztük ki célul, amely FDM 3D nyomtatással történik és bármely hatóanyag közvetlenül inkorporálható a rendszerbe. Az előállítás során elkerüljük mind a magas nyomtatási hőmérséklet (215–270 °C) általi hatóanyagbomlást, mind a ventilláció által okozott hatóanyag veszteséget, amit a TG/DSC görbék megerősítenek.

Az FDM technológia felhasználható 3D nyomtatással előállított implantálható gyógyszerleadó rendszerek előállítására a kívánt kioldódási profillal. A minta méretének és a beállított nyomtatási paramétereknek fontos szerepe van a kioldódási profil optimalizálásában. A hatóanyag kioldódása a minták felső és alsó felszínén lévő pórusokon keresztül történik, amit a SEM és a micro CT felvételek is megerősítenek. A méret növelésével a felület is nő és így a kioldódás is gyorsabb a megnövekedett pórusszám miatt. A kioldódási profil a kitöltöttségi százalék változtatásával is módosítható.

Az implantálható gyógyszerleadó rendszerek esetén a citotoxicitás vizsgálata kötelezően elvégzendő vizsgálat. Valamennyi minta az ISO 10:993 szabvány alapján citokompatibilisnek tekinthetők, ezek az eredmények jól megbecsülik az in vivo adatokat, ezért ezek a minták megfelelőek lehetnek a további in vivo és /vagy humán vizsgálatokhoz.

A PLA, az antibakteriális PLA, a PETG és a PMMA polimerek egyaránt alkalmazhatóak gyógyszerleadó rendszerek előállítására, de a PLA és az antibakteriális PLA a legmegfelelőbb a műtétek során létrehozható minták előállítására. Az általunk kifejlesztett nyomtatási módszer könnyen használható a műtéti beavatkozások során. A műtét során az egyénre szabott gyógyszereket azonnal elő lehet állítani és a hatóanyagok (például gyulladáscsökkentők vagy antibiotikumok) legmegfelelőbb kombinációját a betegágy mellett közvetlenül lehet előállítani.

9. Summary

In conclusion it is stated that we have successfully printed 3D printed samples. One batch consists of 50 samples. The 3D printed samples have been chemically modified at the surface by various amine functional groups. The material structure experiments confirm the modification on the surface. The FTIR graphics certify that the samples connected to the polylactic acid through a covalent bond. The samples can be considered as biocompatible. The biofilm formation of the *Candida albicans* is reduced by the chemical modification. Based on the biocompatibility tests (MTT and biofilm formation tests), it can be concluded that more than one assay should be used to determine cytotoxicity. Cytotoxicity data alone are not necessarily predictive of the in vivo response but can be completed with other experiments (contact angle, PALS and SEM experiments) and the in vivo compatibility data may be estimated. This work is being extended to other modifications and other polymers such as PET or PMMA.

In the second experiments the implantable drug delivery systems have been manufactured by FDM 3D printing. The process does not require hot-melt extrusion and the active pharmaceutical ingredients (APIs) can be directly printed. Throughout the manufacturing, the high printing temperature (215–270 °C) do not affect the APIs stability and the ventilation do not affect the amount of the API, which is confirmed by the TG/DSC investigations.

FDM technology can be used for the manufacturing of 3D printed implantable drug delivery systems with the required dissolution profile. The design of the sample and the printing parameters have an important role to optimize the dissolution profile. The API is dissolved through the pores in the upper and lower surfaces of the samples, as confirmed by the SEM and micro CT images. If the size is increased, the surface area is higher and the dissolution is faster due to the higher number of pores. The dissolution profile can be modified by the infill percentage as well.

Cytotoxicity measurements are compulsory experiments through the manufacturing of the implantable drug delivery systems. All samples are considered cytocompatible based on the ISO 10:993 standard and these results give a good prediction of the in vivo data. Therefore, these samples can be selected for further in vivo and/or human studies.

PLA, antibacterial PLA, PETG, and PMMA polymers are all applicable for the manufacture of drug delivery systems, but PLA and antibacterial PLA are selected as the most appropriate implantable systems. The printing technique is developed by us and can be easily applied during surgical interventions. Personalized medications can be immediately

manufactured in the operating room during the surgery and the most appropriate combination of APIs (for example anti-inflammatories or antibiotics) can be prepared right at the patient's bedside.

10. Irodalomjegyzék

10.1. Az értekezésben hivatkozott közlemények jegyzéke

1. Pîrjan, A.; Petroşanu, D.-M. THE IMPACT OF 3D PRINTING TECHNOLOGY ON THE SOCIETY AND ECONOMY. *J. Inf. Syst. Oper. Manag.* **2014**, 7, 360–370.
2. Alkhalidi, A.; Hatuqay, D. Energy efficient 3D printed buildings: Material and techniques selection worldwide study. *J. Build. Eng.* **2020**, 30, 101286.
3. Sandeep, B.; Kannan, T.T.M.; Chandradass, J.; Ganesan, M.; Rajan, A.J. Materials Today : Proceedings Scope of 3D printing in manufacturing industries-A review. *Mater. Today Proc.* **2021**, 1–5.
4. Mantihal, S.; Kobun, R.; Lee, B.B. 3D food printing of as the new way of preparing food: A review. *Int. J. Gastron. Food Sci.* **2020**, 22, 100260.
5. Kitson, P.J.; Glatzel, S.; Cronin, L. The digital code driven autonomous synthesis of ibuprofen automated in a 3D-printer-based robot. *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, 12, 2776–2783.
6. Glatzel, S.; Hezwani, M.; Kitson, P.J.; Gromski, P.S.; Schürer, S.; Cronin, L. A Portable 3D Printer System for the Diagnosis and Treatment of Multidrug-Resistant Bacteria. *Chem* **2016**, 1, 494–504.
7. Pietrzak, K.; Isreb, A.; Alhnan, M.A. A flexible-dose dispenser for immediate and extended release 3D printed tablets. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2015**, 96, 380–387.
8. Khaled, S.A.; Alexander, M.R.; Irvine, D.J.; Wildman, R.D.; Wallace, M.J.; Sharpe, S.; Yoo, J.; Roberts, C.J. Extrusion 3D Printing of Paracetamol Tablets from a Single Formulation with Tunable Release Profiles Through Control of Tablet Geometry. *AAPS PharmSciTech* **2018**, 19, 3403–3413.
9. Ursan, I.; Chiu, L.; Pierce, A. Three-dimensional drug printing: A structured review. *J. Am. Pharm. Assoc.* **2013**, 53, 136–144.
10. Chia, H.N.; Wu, B.M. Recent advances in 3D printing of biomaterials. *J. Biol. Eng.* **2015**, 9, 1–14.

11. Norman, J.; Madurawe, R.D.; Moore, C.M.V.; Khan, M.A.; Khairuzzaman, A. A new chapter in pharmaceutical manufacturing: 3D-printed drug products. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2017**, *108*, 39–50.
12. Mukhtarkhanov, M.; Perveen, A.; Talamona, D. Application of stereolithography based 3D printing technology in investment casting. *Micromachines* **2020**, *11*.
13. Kadry, H.; Wadnap, S.; Xu, C.; Ahsan, F. Digital light processing (DLP)3D-printing technology and photoreactive polymers in fabrication of modified-release tablets. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2019**, *135*, 60–67.
14. Pereira, G.G.; Figueiredo, S.; Fernandes, A.I.; Pinto, J.F. Polymer selection for hot-melt extrusion coupled to fused deposition modelling in pharmaceuticals. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 1–63.
15. Kessler, A.; Hickel, R.; Reymus, M. 3D printing in dentistry-state of the art. *Oper. Dent.* **2020**, *45*, 30–40.
16. María Ángeles, C.-S.; Ana Isabel, Fernández-Abia; Janik, P.; Barreiro, P.R.-G.; Joaquín, B. Towards Functional Parts by Binder Jetting Calcium-Sulphate with Thermal Treatment Post-Processing. *Materials (Basel)*. **2020**, *13*, 17.
17. Zeng, Z.; Deng, X.; Cui, J.; Jiang, H.; Yan, S.; Peng, B. Improvement on selective laser sintering and post-processing of polystyrene. *Polymers (Basel)*. **2019**, *11*.
18. Stansbury, J.W.; Idacavage, M.J. 3D printing with polymers: Challenges among expanding options and opportunities. *Dent. Mater.* **2016**, *32*, 54–64.
19. Gokuldoss, P.K.; Kolla, S.; Eckert, J. Additive manufacturing processes: Selective laser melting, electron beam melting and binder jetting-selection guidelines. *Materials (Basel)*. **2017**, *10*.
20. Okafor-Muo, O.L.; Hassanin, H.; Kayyali, R.; ElShaer, A. 3D Printing of Solid Oral Dosage Forms: Numerous Challenges With Unique Opportunities. *J. Pharm. Sci.* **2020**, *109*, 3535–3550.
21. Kiraly, L. Three-dimensional modelling and three-dimensional printing in pediatric and congenital cardiac surgery. *Transl Pediatr* **2018**, *7*, 129–138.

22. Aldaadaa, A.; Owji, N.; Knowles, J. Three-dimensional Printing in Maxillofacial Surgery : Hype versus Reality. *J. Tissue Eng* **2018**, 1–5.
23. Martelli, N.; Serrano, C.; Van Den Brink, H.; Pineau, J.; Prognon, P.; Borget, I.; El Batti, S. Advantages and disadvantages of 3-dimensional printing in surgery: A systematic review. *Surg. (United States)* **2016**, 159, 1485–1500.
24. Dawood, A.; Marti, B.M.; Sauret-Jackson, V.; Darwood, A. 3D printing in dentistry. *Br. Dent. J.* **2015**, 219, 521–529.
25. Tack, P.; Victor, J.; Gemmel, P.; Annemans, L. 3D-printing techniques in a medical setting: A systematic literature review. *Biomed. Eng. Online* **2016**, 15, 1–21.
26. Abdul, B.; Gaisford, S. *3D Printing of Pharmaceuticals*; Springer, 2018;
27. Weidert, S.; Andress, S.; Suero, E.; Becker, C.; Hartel, M.; Behle, M.; Willy, C. 3D printing in orthopedic and trauma surgery education and training: Possibilities and fields of application. *Unfallchirurg* **2019**, 122, 444–451.
28. Barrios-Muriel, J.; Romero-Sánchez, F.; Alonso-Sánchez, F.J.; Salgado, D.R. Advances in orthotic and prosthetic manufacturing: A technology review. *Materials (Basel)*. **2020**, 13.
29. Mok, S.W.; Nizak, R.; Fu, S.C.; Ho, K.W.K.; Qin, L.; Saris, D.B.F.; Chan, K.M.; Malda, J. From the printer: Potential of three-dimensional printing for orthopaedic applications. *J. Orthop. Transl.* **2016**, 6, 42–49.
30. Kačarević, Ž.P.; Rider, P.M.; Alkildani, S.; Retnasingh, S.; Smeets, R.; Jung, O.; Ivanišević, Z.; Barbeck, M. An introduction to 3D bioprinting: Possibilities, challenges and future aspects. *Materials (Basel)*. **2018**, 11.
31. Li, Z.; Jia, S.; Xiong, Z.; Long, Q.; Yan, S.; Hao, F.; Liu, J.; Yuan, Z. 3D-printed scaffolds with calcified layer for osteochondral tissue engineering. *J. Biosci. Bioeng.* **2018**, xx, 1–8.
32. Azad, M.A.; Olawuni, D.; Kimbell, G.; Badruddoza, A.Z.M.; Hossain, M.S.; Sultana, T. *Polymers for extrusion-based 3D printing of pharmaceuticals: A holistic materials–process perspective*; 2020; Vol. 12; ISBN 1336285370.

33. Beg, S.; Almalki, W.H.; Malik, A.; Farhan, M.; Aatif, M.; Rahman, Z.; Alruwaili, N.K.; Alrobaian, M.; Tarique, M.; Rahman, M. 3D printing for drug delivery and biomedical applications. *Drug Discov. Today* **2020**, *25*, 1668–1681.
34. Holländer, J.; Hakala, R.; Suominen, J.; Moritz, N.; Yliruusi, J.; Sandler, N. 3D printed UV light cured polydimethylsiloxane devices for drug delivery. *Int. J. Pharm.* **2018**, *544*, 433–442.
35. Öblom, H.; Zhang, J.; Pimparade, M.; Speer, I.; Preis, M.; Repka, M.; Sandler, N. 3D-Printed Isoniazid Tablets for the Treatment and Prevention of Tuberculosis—Personalized Dosing and Drug Release. *AAPS PharmSciTech* **2019**, *20*, 1–13.
36. Karavasili, C.; Gkaragkounis, A.; Moschakis, T.; Ritzoulis, C.; Fatouros, D.G. Pediatric-friendly chocolate-based dosage forms for the oral administration of both hydrophilic and lipophilic drugs fabricated with extrusion-based 3D printing. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2020**, *147*, 105291.
37. Khaled, S.A.; Burley, J.C.; Alexander, M.R.; Yang, J.; Roberts, C.J. 3D printing of five-in-one dose combination polypill with defined immediate and sustained release profiles. *J. Control. Release* **2015**, *217*, 308–314.
38. Maroni, A.; Melocchi, A.; Parietti, F.; Foppoli, A.; Zema, L.; Gazzaniga, A. 3D printed multi-compartment capsular devices for two-pulse oral drug delivery. *J. Control. Release* **2017**, *268*, 10–18.
39. Wang, Y.; Sun, L.; Mei, Z.; Zhang, F.; He, M.; Fletcher, C.; Wang, F.; Yang, J.; Bi, D.; Jiang, Y.; et al. 3D printed biodegradable implants as an individualized drug delivery system for local chemotherapy of osteosarcoma. *Mater. Des.* **2020**, *186*, 108336.
40. Cho, H.; Jammalamadaka, U.; Tappa, K. Nanogels for pharmaceutical and biomedical applications and their fabrication using 3D printing technologies. *Materials (Basel)*. **2018**, *11*.
41. Lim, S.H.; Kathuria, H.; Tan, J.J.Y.; Kang, L. 3D printed drug delivery and testing systems — a passing fad or the future? *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2018**, *132*, 139–168.
42. Wu, H.; Sulkis, M.; Driver, J.; Saade-Castillo, A.; Thompson, A.; Koo, J.H. Multi-

- functional ULTEM™1010 composite filaments for additive manufacturing using Fused Filament Fabrication (FFF). *Addit. Manuf.* **2018**, 24, 298–306.
43. Li, G.; Zhao, J.; Wu, W.; Jiang, J.; Wang, B.; Jiang, H.; Fuh, J.Y.H. Effect of ultrasonic vibration on mechanical properties of 3D printing non-crystalline and semi-crystalline polymers. *Materials (Basel)*. **2018**, 11.
 44. Awad, A.; Trenfield, S.J.; Gaisford, S.; Basit, A.W. 3D printed medicines: A new branch of digital healthcare. *Int. J. Pharm.* **2018**, 548, 586–596.
 45. Sadia, M.; Sośnicka, A.; Arafat, B.; Isreb, A.; Ahmed, W.; Kelarakis, A.; Alhnan, M.A. Adaptation of pharmaceutical excipients to FDM 3D printing for the fabrication of patient-tailored immediate release tablets. *Int. J. Pharm.* **2016**, 513, 659–668.
 46. Tan, D.K.; Maniruzzaman, M.; Nokhodchi, A. Advanced pharmaceutical applications of hot-melt extrusion coupled with fused deposition modelling (FDM) 3D printing for personalised drug delivery. *Pharmaceutics* **2018**, 10.
 47. Kollamaram, G.; Croker, D.M.; Walker, G.M.; Goyanes, A.; Basit, A.W.; Gaisford, S. Low temperature fused deposition modeling (FDM) 3D printing of thermolabile drugs. *Int. J. Pharm.* **2018**, 545, 144–152.
 48. Coppola, B.; Cappetti, N.; Maio, L. Di; Scarfato, P.; Incarnato, L. 3D printing of PLA/clay nanocomposites: Influence of printing temperature on printed samples properties. *Materials (Basel)*. **2018**, 11, 1–17.
 49. Xu, X.; Yang, Q.; Wang, Y.; Yu, H.; Chen, X.; Jing, X. Biodegradable electrospun poly(l-lactide) fibers containing antibacterial silver nanoparticles. *Eur. Polym. J.* **2006**, 42, 2081–2087.
 50. Gao, M.; Sun, L.; Guo, Y.; Shi, J.; Zhang, J. Modification of polyethylene terephthalate (PET) films surface with gradient roughness and homogenous surface chemistry by dielectric barrier discharge plasma. *Chem. Phys. Lett.* **2017**, 689, 179–184.
 51. Nasrin, R.; Biswas, S.; Rashid, T.U.; Afrin, S.; Jahan, R.A.; Haque, P.; Rahman, M.M. Preparation of Chitin-PLA laminated composite for implantable application. *Bioact. Mater.* **2017**, 2, 199–207.

52. Mi, H.Y.; Salick, M.R.; Jing, X.; Jacques, B.R.; Crone, W.C.; Peng, X.F.; Turng, L.S. Characterization of thermoplastic polyurethane/polylactic acid (TPU/PLA) tissue engineering scaffolds fabricated by microcellular injection molding. *Mater. Sci. Eng. C* **2013**, *33*, 4767–4776.
53. Đuranović, M.; Obeid, S.; Madžarević, M.; Cvijić, S.; Ibrić, S. Paracetamol extended release FDM 3D printlets: Evaluation of formulation variables on printability and drug release. *Int. J. Pharm.* **2020**.
54. He, X.; Zhou, X.; Jia, K.; Zhang, D.; Shou, H.; Liu, X. Incorporation of polyethylene glycol into polyethylene terephthalate towards blue emitting co-polyester. *Mater. Lett.* **2016**, *182*, 367–371.
55. Durgashyam, K.; Indra Reddy, M.; Balakrishna, A.; Satyanarayana, K. Experimental investigation on mechanical properties of PETG material processed by fused deposition modeling method. *Mater. Today Proc.* **2019**, *18*, 2052–2059.
56. Ridwan-Pramana, A.; Marcián, P.; Borák, L.; Narra, N.; Forouzanfar, T.; Wolff, J. Structural and mechanical implications of PMMA implant shape and interface geometry in cranioplasty - A finite element study. *J. Cranio-Maxillofacial Surg.* **2016**, *44*, 34–44.
57. Sadhasivam, B.; Ramamoorthy, D.; Dhamodharan, R. Scale-up of non-toxic poly(butylene adipate-co-terephthalate)-Chitin based nanocomposite articles by injection moulding and 3D printing. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**.
58. Aslanzadeh, S.; Saghlatoon, H.; Honari, M.M.; Mirzavand, R.; Montemagno, C.; Mousavi, P. Investigation on electrical and mechanical properties of 3D printed nylon 6 for RF/microwave electronics applications. *Addit. Manuf.* **2018**, *21*, 69–75.
59. Jelena, V.; Andrej, D.; Mirjam, L.; Barbara, S.; Nataša Celan, K.; Ivan, J.; Matic, Š.; Gregor Žitko; 3, N.V. de V. 3 and M.C.~ Characterization of Polyamide 6/Multilayer Graphene Nanoplatelet Composite Textile Filaments Obtained Via In Situ Polymerization and Melt Spinning. *Polymers (Basel)*. **2020**, *12*, 1–19.
60. Pérez, M.; Medina-Sánchez, G.; García-Collado, A.; Gupta, M.; Carou, D. Surface quality enhancement of fused deposition modeling (FDM) printed samples based on the selection of critical printing parameters. *Materials (Basel)*. **2018**, *11*.

61. Chacón, J.M.; Caminero, M.A.; García-Plaza, E.; Núñez, P.J. Additive manufacturing of PLA structures using fused deposition modelling: Effect of process parameters on mechanical properties and their optimal selection. *Mater. Des.* **2017**, *124*, 143–157.
62. Zidan, A.; Alayoubi, A.; Asfari, S.; Coburn, J.; Ghammraoui, B.; Cruz, C.N.; Ashraf, M. Development of mechanistic models to identify critical formulation and process variables of pastes for 3D printing of modified release tablets. *Int. J. Pharm.* **2019**, *555*, 109–123.
63. Maroni, A.; Melocchi, A.; Parietti, F.; Foppoli, A.; Zema, L.; Gazzaniga, A. 3D printed multi-compartment capsular devices for two-pulse oral drug delivery. *J. Control. Release* **2017**, *268*, 10–18.
64. Okwuosa, T.C.; Pereira, B.C.; Arafat, B.; Cieszyńska, M.; Isreb, A.; Alhnan, M.A. Fabricating a Shell-Core Delayed Release Tablet Using Dual FDM 3D Printing for Patient-Centred Therapy. *Pharm. Res.* **2017**, *34*, 427–437.
65. *Magyar Gyógyszerkönyv Pharmacopoea Hungarica VIII.*; 2006;
66. Dévay, A.; Antal, I. *A gyógyszeres terápia biofarmáciai alapjai*; Medicina Könyvkiadó Zrt., 2009;
67. Pons-Faudoa, F.P.; Ballerini, A.; Sakamoto, J.; Grattoni, A. Advanced implantable drug delivery technologies: transforming the clinical landscape of therapeutics for chronic diseases. *Biomed. Microdevices* **2019**, *21*.
68. Czernicki, M.; Sinovich, G.; Mihaylov, I.; Nejad, B.; Kunnumpurath, S.; Kodumudi, G.; Vadivelu, N. Intrathecal drug delivery for chronic pain management-scope, limitations and future. *J. Clin. Monit. Comput.* **2015**, *29*, 241–249.
69. Stewart, S.A.; Domínguez-Robles, J.; Donnelly, R.F.; Larrañeta, E. Implantable polymeric drug delivery devices: Classification, manufacture, materials, and clinical applications. *Polymers (Basel)*. **2018**, *10*.
70. Major, I.; McConville, C. Hot Melt Extruded and Injection Moulded Dosage Forms: Recent Research and Patents. *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.* **2015**, *9*, 194–200.
71. Tiwari, R. V.; Patil, H.; Repka, M.A. Contribution of hot-melt extrusion technology to

- advance drug delivery in the 21st century. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2016**, *13*, 451–464.
72. De Mohac, L.M.; Caruana, R.; Cavallaro, G.; Giammona, G.; Licciardi, M. Spray-Drying, Solvent-Casting and Freeze-Drying Techniques: a Comparative Study on their Suitability for the Enhancement of Drug Dissolution Rates. *Pharm. Res.* **2020**, *37*, 1–11.
73. Kleiner, L.W.; Wright, J.C.; Wang, Y. Evolution of implantable and insertable drug delivery systems. *J. Control. Release* **2014**, *181*, 1–10.
74. Mitchell, H. Goserelin ('Zoladex') - Offering patients more choice in early breast cancer. *Eur. J. Oncol. Nurs.* **2004**, *8*.
75. Lorman, W.J. Pharmacology update: Probuphine: the long-acting buprenorphine implant. *J. Addict. Nurs.* **2019**, *30*, 123–124.
76. Ashby, L.S.; Smith, K.A.; Stea, B. Gliadel wafer implantation combined with standard radiotherapy and concurrent followed by adjuvant temozolomide for treatment of newly diagnosed high-grade glioma: A systematic literature review. *World J. Surg. Oncol.* **2016**, *14*, 1–15.
77. Vanderhoek, S.M.; Wolf, R.M. Use of continuous subcutaneous insulin infusion (CSII) therapy in pediatric diabetes patients in the perioperative period. *Paediatr. Anaesth.* **2019**, *29*, 901–906.
78. Cohn, D.; Sloutski, A.; Elyashiv, A.; Varma, V.B.; Ramanujan, R. In Situ Generated Medical Devices. *Adv. Healthc. Mater.* **2019**, *8*, 1–29.
79. Liow, S.S.; Dou, Q.; Kai, D.; Karim, A.A.; Zhang, K.; Xu, F.; Loh, X.J. Thermogels: In Situ Gelling Biomaterial. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2016**, *2*, 295–316.
80. Massa, H.; Georgoudis, P.; Panos, G.D. Dexamethasone intravitreal implant (OZURDEX®) for macular edema secondary to noninfectious uveitis: A review of the literature. *Ther. Deliv.* **2019**, *10*, 343–351.
81. Cheng, C.K.; Wang, X.H.; Luan, Y.C.; Zhang, N.Z.; Liu, B.L.; Ma, X.Y.; Nie, M.D. Challenges of pre-clinical testing in orthopedic implant development. *Med. Eng. Phys.* **2019**, *72*, 49–54.

82. Refojo, M.F. *Application of Materials in Medicine and Dentistry: Ophthalmologic Applications*; 1996; ISBN 0125824602.
83. Silva, M.; Felismina, R.; Mateus, A.; Parreira, P.; Malça, C. Application of a Hybrid Additive Manufacturing Methodology to Produce a Metal/Polymer Customized Dental Implant. *Procedia Manuf.* **2017**, *12*, 150–155.
84. Eleftheriadis, G.K.; Monou, P.K.; Bouropoulos, N.; Fatouros, D.G. In vitro evaluation of 2D-printed edible films for the buccal delivery of diclofenac sodium. *Materials (Basel)*. **2018**, *11*, 1–14.
85. Ji, H.B.; Kim, S.N.; Lee, S.H.; Huh, B.K.; Shin, B.H.; Lee, C.; Cho, Y.C.; Heo, C.Y.; Choy, Y. Bin Soft implantable device with drug-diffusion channels for the controlled release of diclofenac. *J. Control. Release* **2020**, *318*, 176–184.
86. Speer, I.; Lenhart, V.; Preis, M.; Breitzkreutz, J. Prolonged release from orodispersible films by incorporation of diclofenac-loaded micropellets. *Int. J. Pharm.* **2019**, *554*, 149–160.
87. Van Der Marel, C.D.; Anderson, B.J.; Rømsing, J.; Jacqz-Aigrain, E.; Tibboel, D. Diclofenac and metabolite pharmacokinetics in children. *Paediatr. Anaesth.* **2004**, *14*, 443–451.
88. Tang, W. The Metabolism of Diclofenac - Enzymology and Toxicology Perspectives. *Curr. Drug Metab.* **2005**, *4*, 319–329.
89. Gomaa, Y.A.; Garland, M.J.; McInnes, F.J.; Donnelly, R.F.; El-Khordagui, L.K.; Wilson, C.G. Microneedle/nanoencapsulation-mediated transdermal delivery: Mechanistic insights. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2014**, *86*, 145–155.
90. Tauran, Y.; Tarhan, M.C.; Mollet, L.; Gerves, J.B.; Fujit, H.; Collard, D.; Perret, F.; Desbrosses, M.; Leon, D. Elucidating the mechanism of the considerable mechanical stiffening of DNA induced by the couple Zn^{2+} + /. *Sci Rep* **2018**, 4–11.
91. Haddad, T.; Noel, S.; Liberelle, B.; El Ayoubi, R.; Ajji, A.; De Crescenzo, G. Fabrication and surface modification of poly lactic acid (PLA) scaffolds with epidermal growth factor for neural tissue engineering. *Biomatter* **2016**, *6*, e1231276 1-12.

92. Yildirimer, L.; Seifalian, A.M.; Butler, P.E. Surface and mechanical analysis of explanted Poly Implant Prosthèse silicone breast implants. *Br. J. Surg.* **2013**, *100*, 761–767.
93. Shalabi, M.M.; Gortemaker, A.; Van't Hof, M.A.; Jansen, J.A.; Creugers, N.H.J. Implant surface roughness and bone healing: A systematic review. *J. Dent. Res.* **2006**, *85*, 496–500.
94. Kazsoki, A.; Szabó, P.; Süvegh, K.; Vörös, T.; Zelkó, R. Macro- and microstructural tracking of ageing-related changes of papaverine hydrochloride-loaded electrospun nanofibrous buccal sheets. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2017**, *143*, 62–67.
95. Tham, C.Y.; Abdul Hamid, Z.A.; Ahmad, Z.; Ismail, H. Surface Modification of Poly(lactic acid) (PLA) via Alkaline Hydrolysis Degradation. *Adv. Mater. Res.* **2014**, *970*, 324–327.
96. Seyednejad, H.; Gawlitta, D.; Kuiper, R. V.; De Bruin, A.; Van Nostrum, C.F.; Vermonden, T.; Dhert, W.J.A.; Hennink, W.E. In vivo biocompatibility and biodegradation of 3D-printed porous scaffolds based on a hydroxyl-functionalized poly(ϵ -caprolactone). *Biomaterials* **2012**, *33*, 4309–4318.
97. Nemes, D.; Ujhelyi, Z.; Arany, P.; Peto, A.; Feher, P.; Varadi, J.; Fenyvesi, F.; Vecsernyes, M.; BacsKay, I. Biocompatibility investigation of different pharmaceutical excipients used in liquid dosage forms. *Pharmazie* **2018**, *73*, 16–18.
98. Ujhelyi, Z.; Fenyvesi, F.; Váradi, J.; Fehér, P.; Kiss, T.; Veszélka, S.; Deli, M.; Vecsernyés, M.; Bácskay, I. Evaluation of cytotoxicity of surfactants used in self-micro emulsifying drug delivery systems and their effects on paracellular transport in Caco-2 cell monolayer. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2012**, *47*, 564–573.
99. Pierce, C.G.; Uppuluri, P.; Tristan, A.R.; Jr, F.L.W.; Ramage, G.; Lopez-ribo, J.L. A simple and reproducible 96 well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nat Protoc* **2009**, *3*, 1494–1500.
100. O'Toole, G.A. Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *J Vis Exp* **2011**, 10–11.
101. Arany, P.; Róka, E.; Mollet, L.; Coleman, A.W.; Perret, F.; Kim, B.; Kovács, R.;

- Kazsoki, A.; Zelkó, R.; Gesztelyi, R.; et al. Fused Deposition Modeling 3D Printing: Test Platforms for Evaluating Post-Fabrication Chemical Modifications and In-Vitro Biological Properties. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, 277–300.
102. Wortelen, B.; Unni, A.; Rieger, J.W.; Lüdtke, A.; Osterloh, J. *Cognitive Infocommunications, Theory and Applications*; Springer International Publishing, 2019; Vol. 13; ISBN 978-3-319-95995-5.
 103. Zichar, M.; Papp, I. Interaction Between 3D Printing and Geometry Studies. In *Proceedings of the ICGG 2018 - Proceedings of the 18th International Conference on Geometry and Graphics*; Cocchiarella, L., Ed.; Springer International Publishing: Cham, 2018; pp. 1177–1190.
 104. Mohseni, M.; Hutmacher, D.W.; Castro, N.J. Independent evaluation of medical-grade bioresorbable filaments for fused deposition modelling/fused filament fabrication of tissue engineered constructs. *Polymers (Basel)*. **2018**, *10*.
 105. Khaled, S.A.; Burley, J.C.; Alexander, M.R.; Yang, J.; Roberts, C.J. 3D printing of tablets containing multiple drugs with defined release profiles. *Int. J. Pharm.* **2015**, *494*, 643–650.
 106. Kang, Y.; Yao, Y.; Yin, G.; Huang, Z.; Liao, X.; Xu, X.; Zhao, G. A study on the in vitro degradation properties of poly(l-lactic acid)/ β -tricalcium phosphate(PLLA/ β -TCP) scaffold under dynamic loading. *Med. Eng. Phys.* **2009**, *31*, 589–594.
 107. Luo, W.; Yu, B.; Xiao, D.; Zhang, M.; Wu, X.; Li, G. Biomimetic superhydrophobic hollowed-out pyramid surface based on self-assembly. *Materials (Basel)*. **2018**, *11*, 1–12.
 108. Vasvári, G.; Haimhoffer, Á.; Horváth, L.; Budai, I.; Trencsényi, G.; Béresová, M.; Dobónagy, C.; Váradi, J.; Bácskay, I.; Ujhelyi, Z.; et al. Development and Characterisation of Gastroretentive Solid Dosage Form Based on Melt Foaming. *AAPS PharmSciTech* **2019**, *20*, 1–11.
 109. Tarasco, M.; Cordelières, F.P.; Cancela, M.L.; Laizé, V. ZFBONE: An ImageJ toolset for semi-automatic analysis of zebrafish bone structures. *Bone* **2020**, *138*, 115480.

110. Regdon, G.; Hegyesi, D.; Pintye-Hódi, K. Thermal study of ethyl cellulose coating films used for modified release (MR) dosage forms. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2012**, *108*, 347–352.
111. Mazurek, S.; Szostak, R. Quantitative determination of diclofenac sodium in solid dosage forms by FT-Raman spectroscopy. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2008**, *48*, 814–821.
112. Goyanes, A.; Buanz, A.B.M.; Basit, A.W.; Gaisford, S. Fused-filament 3D printing (3DP) for fabrication of tablets. *Int. J. Pharm.* **2014**, *476*, 88–92.
113. Wang, J.; Witte, F.; Xi, T.; Zheng, Y.; Yang, K.; Yang, Y.; Zhao, D.; Meng, J.; Li, Y.; Li, W.; et al. Recommendation for modifying current cytotoxicity testing standards for biodegradable magnesium-based materials. *Acta Biomater.* **2015**, *21*, 237–249.
114. Shiraishi, R.; Hirayama, N. Cytotoxicity associated with prolonged room temperature storage of serum and proposed methods for reduction of cytotoxicity. *J. Virol. Methods* **2015**, *225*, 16–22.
115. Kinnari, T.J.; Soininen, A.; Esteban, J.; Zamora, N.; Alakoski, E.; Kouri, V.P.; Lappalainen, R.; Kontinen, Y.T.; Gomez-Barrena, E.; Tiainen, V.M. Adhesion of staphylococcal and Caco-2 cells on diamond-like carbon polymer hybrid coating. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **2008**, *86*, 760–768.
116. Chessa, D.; Ganau, G.; Spiga, L.; Bulla, A.; Mazzarello, V.; Campus, G.V.; Rubino, S. Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis Virulence Strains as Causative Agents of Persistent Infections in Breast Implants. *PLoS One* **2016**, *11*, e0146668 1-15.
117. International Organization for Standardization Geneva Switzerland B. *ISO/EN 10993-5 Biol. Eval. Med. devices - Part 5 Tests Cytotox. Vitro. methods* **2009**, *Edition 3*, 34.
118. Chandra, J.; Kuhn, D.M.; Mukherjee, P.K.; Hoyer, L.L.; McCormick, T.; Ghannoum, M.A.; Mahmoud, a; Cormick, T.M.C.; Ghannoum, M.A.; Mitchell, J.S.F. and A.P. Genetic Control of Candida Albicans Biofilm Development. *Natl. Review Microbiol.* **2001**, *9*, 109–118.
119. Marcos-Zambrano, L.J.; Escribano, P.; Bouza, E.; Guinea, J. Production of biofilm by Candida and non-Candida spp. isolates causing fungemia: Comparison of biomass

- production and metabolic activity and development of cut-off points. *Int. J. Med. Microbiol.* **2014**, *304*, 1192–1198.
120. Standard, I. Iso 10093-10:2010. **2010**, 2010.
 121. Boetker, J.; Water, J.J.; Aho, J.; Arnfast, L.; Bohr, A.; Rantanen, J. Modifying release characteristics from 3D printed drug-eluting products. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2016**, *90*, 47–52.
 122. Jackson, R.J.; Patrick, P.S.; Page, K.; Powell, M.J.; Lythgoe, M.F.; Miodownik, M.A.; Parkin, I.P.; Carmalt, C.J.; Kalber, T.L.; Bear, J.C. Chemically Treated 3D Printed Polymer Scaffolds for Biomineral Formation. *ACS Omega* **2018**, *3*, 4342–4351.
 123. Wishart, D.S.; Bigam, C.G.; Yao, J.; Abildgaard, F.; Dyson, H.J.; Oldfield, E.; Markley, J.L.; Sykes, B.D. ^1H , ^{13}C and ^{15}N chemical shift referencing in biomolecular NMR. *J. Biomol. NMR* **1995**, *6*, 135–140.
 124. Rupp, F.; Liang, L.; Geis-Gerstorfer, J.; Scheideler, L.; Hüttig, F. Surface characteristics of dental implants: A review. *Dent. Mater.* **2018**, *34*, 40–57.
 125. Song, F.; Ma, L.; Fan, J.; Chen, Q.; Zhang, L.; Li, B.Q. Wetting behaviors of a nano-droplet on a rough solid substrate under perpendicular electric field. *Nanomaterials* **2018**, *8*, 1–12.
 126. Holmes-Farley, S.R.; Reamey, R.H.; McCarthy, T.J.; Deutch, J.; Whitesides, G.M. Acid-base behavior of carboxylic acid groups covalently attached at the surface of polyethylene: The usefulness of contact angle in following the ionization of surface functionality. *Langmuir* **1985**, *1*, 725–740.
 127. Pach, K.; Filipecki, J.; Golis, E.; Yousef, E.S.; Boyko, V. Measurements of Defect Structures by Positron Annihilation Lifetime Spectroscopy of the Tellurite Glass $70\text{TeO}_2\text{-}5\text{XO-}10\text{P}_2\text{O}_5\text{-}10\text{ZnO-}5\text{PbF}_2$ (X = Mg, Bi $_2$, Ti) Doped with Ions of the Rare Earth Element Er³⁺. *Nanoscale Res. Lett.* **2017**, *12*, 10–13.
 128. Morrison, R.J.; Kashlan, K.N.; Flanagan, C.L.; Wright, J.K.; Green, G.E.; Hollister, S.J.; Weatherwax, K.J. Regulatory Considerations in the Design and Manufacturing of

- Implantable 3D-Printed Medical Devices. *Clin. Transl. Sci.* **2015**, *8*, 594–600.
129. Pizzoferrato, A.; Ciapetti, G.; Stea, S.; Cenni, E.; Arciola, C.R.; Granchi, D.; Savarino, L. Cell culture methods for testing biocompatibility. *Clin. Mater.* **1994**, *15*, 173–190.
130. Sambuy, Y.; De Angelis, I.; Ranaldi, G.; Scarino, M.L.; Stammati, A.; Zucco, F. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol. Toxicol.* **2005**, *21*, 1–26.
131. van Tonder, A.; Joubert, A.M.; Cromarty, A.D. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Res. Notes* **2015**, *8*, 47–57.
132. Wurm, M.C.; Möst, T.; Bergauer, B.; Rietzel, D.; Neukam, F.W.; Cifuentes, S.C.; von Wilmowsky, C. In-vitro evaluation of Polylactic acid (PLA) manufactured by fused deposition modeling. *J. Biol. Eng.* **2017**, *11*, 1–9.
133. Johnson, H.J.H.J.; Northup, S.J.S.J.; Darby, T.D.T.D.; 7 Biocompatibility test procedures for materials evaluation in vitro. II. Objective methods of toxicity assessment. *J. Biomed. Mater. Res.* **1984**, *19*, 489–508.
134. Gaucher, S.; Jarraya, M. Technical note: comparison of the PrestoBlue and LDH release assays with the MTT assay for skin viability assessment. *Cell Tissue Bank.* **2015**, *16*, 325–329.
135. Ramot, Y.; Haim-Zada, M.; Domb, A.J.; Nyska, A. Biocompatibility and safety of PLA and its copolymers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *107*, 153–162.
136. Silva, D. da; Kaduri, M.; Poley, M.; Adir, O.; Krinsky, N.; Shainsky-Roitman, J.; Schroeder, A. Biocompatibility, biodegradation and excretion of polylactic acid (PLA) in medical implants and theranostic systems. *Chem. Eng. J.* **2018**, *340*, 9–14.
137. Galdiero, M.; Larocca, F.; Iovene, M.R.; Francesca, M.; Pieretti, G.; D’Orlando, V.; Franci, G.; Ferraro, G.; D’Andrea, F.; Nicoletti, G.F. Microbial Evaluation in Capsular Contracture of Breast Implants. *Plast. Reconstr. Surg.* **2018**, *141*, 23–30.
138. Vargas-Alfredo, N.; Dorronsoro, A.; Cortajarena, A.L.; Rodríguez-Hernández, J.

- Antimicrobial 3D Porous Scaffolds Prepared by Additive Manufacturing and Breath Figures. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 37454–37462.
139. Salari, S.; Sadat Seddighi, N.; Ghasemi Nejad Almani, P. Evaluation of biofilm formation ability in different *Candida* strains and anti-biofilm effects of Fe₃O₄-NPs compared with Fluconazole: An in vitro study. *J. Mycol. Med.* **2018**, *28*, 23–28.
140. Yang, Y.; Yang, S.; Wang, Y.; Yu, Z.; Ao, H.; Zhang, H.; Qin, L.; Guillaume, O.; Eglin, D.; Richards, R.G.; et al. Anti-infective efficacy, cytocompatibility and biocompatibility of a 3D-printed osteoconductive composite scaffold functionalized with quaternized chitosan. *Acta Biomater.* **2016**, *46*, 112–128.
141. Antinori, S.; Milazzo, L.; Sollima, S.; Galli, M.; Corbellino, M. Candidemia and invasive candidiasis in adults: A narrative review. *Eur. J. Intern. Med.* **2016**, *34*, 21–28.
142. Tappa, K.; Jammalamadaka, U.; Weisman, J.; Ballard, D.; Wolford, D.; Pascual-Garrido, C.; Wolford, L.; Woodard, P.; Mills, D. 3D Printing Custom Bioactive and Absorbable Surgical Screws, Pins, and Bone Plates for Localized Drug Delivery. *J. Funct. Biomater.* **2019**, *10*, 1–13.
143. Aquino, R.P.; Barile, S.; Grasso, A.; Saviano, M. Envisioning smart and sustainable healthcare: 3D Printing technologies for personalized medication. *Futures* **2018**, *103*, 35–50.
144. Sommer, A.C.; Blumenthal, E.Z. Implementations of 3D printing in ophthalmology. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **2019**, *257*, 1815–1822.
145. Ahmed, K.K.; Tamer, M.A.; Ghareeb, M.M.; Salem, A.K. Recent Advances in Polymeric Implants. *AAPS PharmSciTech* **2019**, *20*.
146. Yang, N.; Chen, H.; Han, H.; Shen, Y.; Gu, S.; He, Y.; Guo, S. 3D printing and coating to fabricate a hollow bullet-shaped implant with porous surface for controlled cytotoxin release. *Int. J. Pharm.* **2018**, *552*, 91–98.
147. Goyanes, A.; Wang, J.; Buanz, A.; Martínez-Pacheco, R.; Telford, R.; Gaisford, S.; Basit, A.W. 3D Printing of Medicines: Engineering Novel Oral Devices with Unique Design and Drug Release Characteristics. *Mol. Pharm.* **2015**, *12*, 4077–4084.

148. Tidau, M.; Kwade, A.; Finke, J.H. Influence of high, disperse api load on properties along the fused-layer modeling process chain of solid dosage forms. *Pharmaceutics* **2019**, *11*.
149. Ortíz-Palacios, J.; Rodríguez-Alba, E.; Avelar, M.; Martínez, A.; Del Pilar Carreón-Castro, M.; Rivera, E. Synthesis and characterization of novel dendrons bearing amino-nitro-substituted azobenzene units and oligo(ethylene glycol) spacers: Thermal, optical properties, langmuir blodgett films and liquid-crystalline behaviour. *Molecules* **2013**, *18*, 1502–1527.
150. Esposito Corcione, C.; Gervaso, F.; Scalera, F.; Padmanabhan, S.K.; Madaghiele, M.; Montagna, F.; Sannino, A.; Licciulli, A.; Maffezzoli, A. Highly loaded hydroxyapatite microsphere/ PLA porous scaffolds obtained by fused deposition modelling. *Ceram. Int.* **2018**, *45*, 2803–2810.
151. Vasvári, G.; Csontos, B.; Sovány, T.; Regdon, G.; Bényei, A.; Váradi, J.; Bácskay, I.; Ujhelyi, Z.; Fehér, P.; Sinka, D.; et al. Development and Characterisation of Modified Release Hard Gelatin Capsules, Based on In Situ Lipid Matrix Formation. *AAPS PharmSciTech* **2018**, *19*, 3165–3176.
152. Li, X.; Wang, Y.; Wang, Z.; Qi, Y.; Li, L.; Zhang, P.; Chen, X.; Huang, Y. Composite PLA/PEG/nHA/Dexamethasone Scaffold Prepared by 3D Printing for Bone Regeneration. *Macromol. Biosci.* **2018**, *18*, 1–11.
153. Timea Frosch, Elisabeth Wyrwich, Di Yan, Juergon Popp, T.F. Fiber-Array-Based Raman Hyperspectral Imaging for Simultaneous, Chemically-Selective Monitoring of Particle Size and Shape of Active Ingredients in Analgesic Tablets. *Molecules* **2019**, *24*, 1–15.
154. Yang, Y.; Yang, S.; Wang, Y.; Yu, Z.; Ao, H.; Zhang, H.; Qin, L.; Guillaume, O.; Eglin, D.; Richards, R.G.; et al. Anti-infective efficacy, cytocompatibility and biocompatibility of a 3D-printed osteoconductive composite scaffold functionalized with quaternized chitosan. *Acta Biomater.* **2016**, *46*, 112–128.
155. du Plessis, A.; Sperling, P.; Beerlink, A.; Tshabalala, L.; Hoosain, S.; Mathe, N.; le Roux, S.G. Standard method for microCT-based additive manufacturing quality control 2: Density measurement. *MethodsX* **2018**, *5*, 1117–1123.

156. Alhnan, M.A.; Okwuosa, T.C.; Sadia, M.; Wan, K.W.; Ahmed, W.; Arafat, B. Emergence of 3D Printed Dosage Forms: Opportunities and Challenges. *Pharm. Res.* **2016**, *33*, 1817–1832.
157. Sevim, K.; Pan, J. A model for hydrolytic degradation and erosion of biodegradable polymers. *Acta Biomater.* **2018**, *66*, 192–199.
158. Wójcik-Pastuszka, D.; Krzak, J.; Macikowski, B.; Berkowski, R.; Osiński, B.; Musiał, W. Evaluation of the release kinetics of a pharmacologically active substance from model intra-articular implants replacing the cruciate ligaments of the knee. *Materials (Basel)*. **2019**, *12*.
159. Samaha, D.; Shehayeb, R.; Kyriacos, S. Modeling and comparison of dissolution profiles of diltiazem modified-release formulations. *Dissolution Technol.* **2009**, *16*, 41–46.
160. Solorio, L.; Exner, A.A. Effect of the Subcutaneous Environment on Phase-Sensitive in Situ-Forming Implant Drug Release, Degradation, and Microstructure. *J. Pharm. Sci.* **2015**, *104*, 4322–4328.
161. Elsaywy, M.A.; Kim, K.H.; Park, J.W.; Deep, A. Hydrolytic degradation of polylactic acid (PLA) and its composites. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2017**, *79*, 1346–1352.
162. Eyal, A.M.; Canari, R. pH Dependence of Carboxylic and Mineral Acid Extraction by Amine-Based Extractants: Effects of pKa, Amine Basicity, and Diluent Properties. *Ind. Eng. Chem. Res.* **1995**, *34*, 1789–1798.
163. Göpferich, A. Mechanisms of polymer degradation and erosion¹. *Biomater. Silver Jubil. Compend.* **1996**, *17*, 117–128.
164. Schliecker, G.; Schmidt, C.; Fuchs, S.; Kissel, T. Characterization of a homologous series of D,L-lactic acid oligomers; a mechanistic study on the degradation kinetics in vitro. *Biomaterials* **2003**, *24*, 3835–3844.

10.2. A jelölt saját közleményeinek a Kenézy Élettudományi Könyvtár által ellenőrzött jegyzéke



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/18/2021.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Arany Petra

Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Arany, P.**, Papp, I., Bodroginé Zichar, M., Csontos, M., Elek, J., Regdon, G., Budai, I., Béres, M., Gesztelyi, R., Fehér, P., Ujhelyi, Z., Vasvári, G., Haimhoffer, Á., Fenyvesi, F., Váradi, J., Vecsernyés, M., Bácskay, I.: In Vitro Tests of FDM 3D-Printed Diclofenac Sodium-Containing Implants.
Molecules. 25 (24), 1-31, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules25245889>
IF: 3.267 (2019)
2. **Arany, P.**, Róka, E., Mollet, L., Coleman, A. W., Perret, F., Kim, B., Kovács, R. L., Kazsoki, A., Zelkó, R., Gesztelyi, R., Ujhelyi, Z., Fehér, P., Váradi, J., Fenyvesi, F., Vecsernyés, M., Bácskay, I.: Fused Deposition Modeling 3D Printing: Test Platforms for Evaluating Post-Fabrication Chemical Modifications and In-Vitro Biological Properties.
Pharmaceutics. 11 (6), 1-23, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics11060277>
IF: 4.421





**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

További közlemények

3. Nemes, D., Ujhelyi, Z., **Arany, P.**, Pető, Á., Fehér, P., Váradi, J., Fenyvesi, F., Vecsernyés, M.,
Bácskay, I.: Biocompatibility investigation of different pharmaceutical excipients used in liquid
dosage forms.
Pharmazie. 73 (1), 16-18, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1691/ph.2018.7098>
IF: 0.82
4. Ujhelyi, Z., Vecsernyés, M., Fehér, P., Kósa, D., **Arany, P.**, Nemes, D., Sinka, D. Z., Vasvári, G.,
Fenyvesi, F., Váradi, J., Bácskay, I.: Physico-chemical characterization of self-emulsifying
drug delivery systems.
Drug Discovery Today: Technologies. 27, 81-86, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ddtec.2018.06.005>

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 8,508

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
7,688**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai
ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján
elvégezte.

Debrecen, 2021.01.12.



11. Ábrajegyzék

- 1.ábra - A szálhúzás elvén működő 3D nyomtató vázlata (saját ábra).
- 2.ábra - A diklofenák szerkezeti képlete (Ph. Hg. VIII. kiadás, II. kötet 1693. oldal).
- 3.ábra - A nyomtatott minták (saját ábra).
- 4.ábra - A kémiai módosítás reakcióegyenlete a) és a kémiai oldalláncmódosítással kapott anyagok kémiai szerkezete b)) (saját ábra).
- 5.ábra - A mintáink pásztázó elektronmikroszkópiai (SEM) ábrái (saját ábra).
- 6.ábra - A politejsav alapváz (a) PLA) és az etilén-diamin módosulat (b) PLA-ED) FTIR spektruma (saját ábra).
- 7.ábra - A bisz(aminopropil)-amin módosulat (PLA-BAPA) FTIR spektruma (saját ábra).
- 8.ábra - A trietilén-tetramin módosulat (PLA-TET) FTIR spektruma (saját ábra).
- 9.ábra – Az N- metil-1,3-propán-diamin módosulat (PLA-MeNprN) FTIR spektruma (saját ábra).
- 10.ábra – A tris(2-aminoetil)-amin módosulat (PLA-Tris) FTIR spektruma (saját ábra).
11. ábra - A 2,2'-etiléndioxi-dietilamin módosulat (PLA-NPEGN) FTIR spektruma (saját ábra).
- 12.ábra - A PLA alapváz (a)), a PLA-ED módosulat (b)) és a PLA-NPEGN módosulat (c)) felszíni egyenetlenség vizsgálatának eredményei (saját ábra).
- 13.ábra - A PLA-MeNprN módosulat (a)), a PLA-BAPA módosulat (b)) és a PLA-Tris módosulat (c)) felszíni egyenetlenség vizsgálatának eredményei (saját ábra).
- 14.ábra - A vizsgálati minták PALS vizsgálattal kapott átlag diszkrét o-Ps életideje (saját ábra).
- 15.ábra - A nedvesedési peremszög értékei (°) a PLA alapváz és a kémiai módosulatok esetében (saját ábra).
- 16.ábra - A PLA alapváz és a kémiai módosulatok hosszútávú citotoxicitás vizsgálatának eredményei (saját ábra).
- 17.ábra - A biofilm formálási készség eredményei a különböző módosulatok esetében (saját ábra).
- 18.ábra - A 3D nyomtatás lépésről-lépésre történő bemutatása (saját ábra).
- 19.ábra - A nyomtatott minták ábrája (saját ábra).
- 20.ábra - A 3D nyomtatással előállított minták felszíni elemzése (saját ábra).
- 21.ábra - A felszíni morfológia és a pórusok szerkezetének elemzése (saját ábra).
- 22.ábra - Mikro komputertomográfiai ábra függőleges metszete az AntiPLA_16_0 mintáról a kioldódás vizsgálatot megelőzően a) illetve azt követően b) (saját ábra).

- 23.ábra - Mikro komputertomográfiai ábra a PLA_16_0 minta felső felszínéről a kioldódás vizsgálatot megelőzően a) illetve azt követően b) (saját ábra).
- 24.ábra – A diklofenák-nátrium termogravimetriás (TG) és differenciális pásztázó kalorimetriai (DSC) elemzése (saját ábra).
- 25.ábra – A PLA és antibakteriális PLA minták termogravimetriás görbéi (saját ábra).
- 26.ábra – A PETG minták termogravimetriás görbéi (saját ábra).
- 27.ábra – A PMMA minták termogravimetriás görbéi (saját ábra).
- 28.ábra - A PLA, Antibakteriális PLA (AntiPLA), PETG és PMMA minták nedvesedési peremszög (°) értékei diklofenák nélkül és diklofenák-nátriummal (dicl.) (saját ábra).
- 29.ábra - A diklofenák-nátrium eloszlása a különböző üregekben (1-6) a PLA_16_5, PLA_16_10 és PLA_16_15 minták esetében (saját ábra).
- 30.ábra - A hosszú távú MTT teszt eredményei a PLA és antibakteriális PLA (AntiPLA) minták esetében (saját ábra).
- 31.ábra - A hosszú távú MTT teszt eredményei a PETG és PMMA minták esetében (saját ábra).
- 32.ábra - A kioldódott hatóanyag mennyiség (%) az idő függvényében ábrázolva a politejsav (PLA), az antibakteriális PLA (AntiPLA) minták esetében (saját ábra).
- 33.ábra - A kioldódott hatóanyag mennyiség (%) az idő függvényében ábrázolva a polietilén-tereftalát-glikol (PETG) és a poli (metil-metakrilát) (PMMA) minták esetében (saját ábra).
- 34.ábra - A kioldódott hatóanyag mennyiség (%) az idő függvényében ábrázolva az eltérő kitöltöttségi százalékkal rendelkező PLA minták esetében (saját ábra).
- 35.ábra - A politejsav (PLA) minták háromdimenziós (3D) diagramja a 24 órás kioldódott hatóanyag mennyiség (%) esetében (saját ábra).
- 36.ábra - A politejsav (PLA) minták kétdimenziós (2D) diagramja a 24 órás kioldódott hatóanyag mennyiség (%) esetében (saját ábra).

12. Táblázatok jegyzéke

1. táblázat – A 3D nyomtatás csoportosítása (saját táblázat).
2. táblázat - Fogamzásgátló implantátumok jellemzése Kleiner és munkatársai alapján (saját táblázat).
3. táblázat - A kutatás során alkalmazott kísérletek sematikus ábrázolása(saját táblázat).
4. táblázat - A felhasznált politejsav filament tulajdonságai (saját táblázat).
5. táblázat - A felhasznált filamentek tulajdonságai (saját táblázat).
6. táblázat - A nyomtatott filament szálak 3D nyomtatást követően mért tulajdonságai (saját táblázat).
7. táblázat - A 3D nyomtatáshoz használt nyomtatási paraméterek a két Lulzbot 3D nyomtató esetében (saját táblázat).
8. táblázat - A 3D nyomtatáshoz használt paraméterek a Prusa i3 MK2 nyomtató esetében (saját táblázat).
9. táblázat - A minták átlagos tömege (mg) a szórás értékekkel (standard deviation, SD) és az átlagos hatóanyag tartalom (mg) értékei a szórás értékekkel (SD) (saját táblázat).
10. táblázat - A degradáció teszt eredményei a politejsav (PLA) és antibakteriális PLA (AntiPLA) minták esetében különböző átmérő (16, 19 vagy 22 mm) és kitöltöttségi százaléktételek esetében (0%, 5%, 10% vagy 15%) (saját táblázat).
11. táblázat - Négy különböző kitöltöttségi százalékkal rendelkező minta diklofenák-nátrium tartalma (saját táblázat).
12. táblázat - Diffúzió sebesség, flux, kioldódott hatóanyag százalék és t-próba eredmények a PLA, antibakteriális PLA, PETG és PMMA minták esetében (saját táblázat).
13. táblázat - A kioldódási profilok páronkénti összehasonlítási eredményei: a különbözőségi faktor (f1) és a hasonlósági faktor (f2) számítások eredményei (saját táblázat).
14. táblázat - A 3D nyomtatott minták kinetikai elemzése (saját táblázat).

13. Tárgyszavak

3D nyomtatás, FDM, implantátum, egyéni gyógyszerelés, biokompatibilitási, citotoxicitás, MTT-teszt, biofilm formálás, kristályibolya teszt, kioldódási vizsgálat

14. Key words

3D printing, FDM, implant, personalized medication, biocompatibility, cytotoxicity, MTT assay, biofilm formation, crystal violet assay, dissolution test

15. Köszönetnyilvánítás

Hálás köszönetet mondok Prof. Dr. Bácskay Ildikó témavezetőmnek, hogy 2015-ben még TDK hallgatóként lehetőséget adott a Gyógyszertechológiai tanszéken kísérleti munka végzésére és azóta is folyamatosan segített és támogatott. Köszönöm, hogy lehetővé tette a munkám megírását, témavezetése alatt bármikor számíthattam tanácsaira, ötleteire és szaktudására.

Köszönetet mondok Prof. Dr. Vecsernyés Miklós Dékán Úrnak, hogy lehetőséget biztosított a Gyógyszertechológiai tanszéken kísérleti tudományos munka végzésére és bármikor számíthattam a segítségére és szaktudására.

Köszönettel tartozok a Gyógyszertechológiai Tanszék munkatársainak, Dr. Fenyvesi Ferencnek, Dr. Váradi Juditnak, Dr. Ujhelyi Zoltánnak, Dr. Fehér Pálmának, Dr. Vasvári Gábornak, Dr. Réti-Nagy Katalinnak, Dr. Nemes Dánielnek, Dr. Sinka Dávidnak, Dr. Rusznyák Ágnesnek, Dr. Pető Ágotának, Dr. Kósa Dórának, Dr. Haimhoffer Ádámnak, Dr. Józsa Lizának, Pardi Sándornénak, Horányiné Körei Máriának, Szilágyi Erikának, Nagyné Vaszily Máriának, Lakatos Szilviának, Sipos Szilviának, Nagy Tündének, Bátoriné Pataki Brigittának, amiért munkájukkal és szakmai támogatásukkal hozzájárultak eredményeimhez.

Köszönetet mondok Dr. Róka Eszternek az MTT sejtéletképességi vizsgálatok elméleti alapjainak megértésében és gyakorlatának elsajátításában.

Köszönetet mondok Dr. Kovács Renátónak, aki lehetővé tette a biofilmképzési vizsgálatok elvégzését, illetve segítette a munkámat nélkülözhetetlen szakmai tanácsaival. Köszönetet mondok a Mikrobiológiai tanszék valamennyi munkatársának, akik a kísérleti munka során felvetődött gyakorlati problémák megoldásában segítségemre voltak.

Köszönetet mondok Dr. Anthony W. Coleman Professzornak, Dr. Florent Perretnek, Dr. Laurent Molletnek a lyoni Claude Bernard Egyetem, Kémiai és biokémiai tanszék munkatársainak az implantátumok előállításáért, az anyagszerkezeti vizsgálatok egy részének elvégzéséért és a számos fontos szakmai tanácsukért. Köszönetet mondok társkutatójuknak Dr. Beomjoon Kimnek az FTIR vizsgálatok elvégzéséért.

Köszönetet mondok Dr. Zelkó Romána Professzor asszonynak és Dr. Kzsoki Adriennek a PALS vizsgálatok elvégzéséért és a közös publikációnk megjelenéséhez nyújtott támogatásukat.

Köszönetet mondok Dr. Gesztelyi Rudolfnak a statisztikai elemzésekben nyújtott segítségéért.

Köszönettel tartozok Bodroginé Dr. Zichar Mariannak és Dr. Papp Ildikónak a 3D nyomtatott mintáink előállításáért, a sok-sok segítségükért és hasznos tanácsaikért.

Köszönetet mondok Dr. Elek János és Csontos Máté segítségéért a Raman spektroszkópiai mérés elvégzéséhez, illetve a kioldódásvizsgálatokhoz szükséges statisztikai elemzések elvégzéséhez a Design-Expert ® szoftver segítségével.

Köszönetet mondok Dr. Budai Istvánnak a SEM mérések gyors és precíz elkészítéséhez.

Köszönettel tartozok Székelyhídi Csabának, aki mindig őszintén, önzetlenül támogatott és biztatott.

Végül, de nem utolsó sorban, óriási hálával tartozok Családomnak, akik kitartóan támogatnak és segítenek egész életemben.

Függelék

A kutatás támogatói:

A kutatás a Richter Gedeon Tálerum Alapítvány támogatásával valósult meg (1103 Budapest, Gyömrői út 19-21.)

A kutatás az EFOP-3.6.1-16-2016-00022 és EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 pályázat keretében valósult meg. A projekt társfinanszírozója az Európai Szociális Alap.

A disszertáció alapjául szolgáló kutatást az Innovációs és Technológiai Minisztérium által meghirdetett Felsőoktatási Intézményi Kiválósági Program NKFIH-1150-6/2019 számon támogatta, a Debreceni Egyetem Terápiás fejlesztés tématerületi programja keretében.

A disszertáció alapjául szolgáló kutatást az Innovációs és Technológiai Minisztérium által meghirdetett Tématerületi Kiválósági Program (TKP2020-IKA-04) támogatta.

Az Innovációs és Technológiai Minisztérium ÚNKP-20-3 kódszámú Új Nemzeti Kiválósági Programjának a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból finanszírozott szakmai támogatásával készült.

A disszertáció elkészítését a GINOP-2.3.3-15-2016-00021 számú "Gyógyszertechnológiai K+F fejlesztése a Debreceni Egyetemen" című projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósult meg.

A disszertáció elkészítését a GINOP-2.3.4-15-2020-00008 számú projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósult meg.

A kioldódott hatóanyag százalékos értékek minden mintavételi időpont esetében:

AntiPLA_19_0	AntiPLA_16_0		PLA_22_15		PLA_22_10		PLA_22_5		PLA_22_0		PLA_19_0		PLA_16_0		Minta
Kiold (%)	±SD	Kiold (%)	±SD	Kiold (%)	±SD	Kiold (%)	±SD	Kiold (%)	±SD	Kiold (%)	±SD	Kiold (%)	±SD	Kiold (%)	Minta vétel (h)
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17,97	3,37	5,70	0,13	0,59	0,12	0,13	1,02	3,59	6,07	20,23	1,24	3,46	0,34	0,55	0,083
30,03	4,23	8,02	1,54	6,94	0,30	0,46	1,30	11,97	3,81	24,45	0,89	11,55	0,40	2,59	0,25
42,96	2,94	13,01	2,98	14,74	0,71	1,72	1,22	17,12	3,07	35,44	3,95	19,68	0,34	2,55	0,5
56,85	2,54	16,39	2,37	29,32	1,47	6,31	2,26	26,21	3,14	49,04	10,96	35,66	0,46	5,40	0,75
60,96	1,26	18,91	1,40	42,43	2,75	18,75	1,66	37,27	1,73	67,22	3,37	49,66	0,88	9,60	1
60,71	1,41	48,61	1,72	66,73	2,83	31,61	0,43	55,67	1,24	82,95	6,51	80,04	0,92	16,65	2
59,66	2,25	74,90	1,38	73,99	2,28	42,65	2,05	62,30	2,80	91,53	2,48	84,50	1,02	22,90	4
61,34	1,82	87,33	3,48	82,99	1,66	42,22	2,89	63,94	5,32	94,45	2,40	88,14	1,55	30,49	6
63,76	0,33	83,09	2,94	83,33	0,76	45,08	1,45	65,89	4,67	94,37	3,52	88,06	1,19	33,85	8
64,64	0,85	86,11	1,40	84,91	1,64	46,60	0,35	68,79	3,43	93,90	4,52	90,30	1,96	43,60	12
66,55	3,30	92,63	1,60	86,87	1,61	48,95	0,42	68,44	2,09	94,42	2,72	92,98	2,20	47,82	14
68,03	1,30	93,28	2,78	86,94	1,20	49,14	0,46	68,61	0,62	96,53	2,91	92,26	1,09	54,09	16
68,35	0,78	94,37	1,09	86,08	1,91	49,95	1,33	68,79	2,06	94,54	3,26	90,35	1,55	61,10	18
69,98	1,67	95,09	2,94	86,74	0,94	48,95	1,59	70,17	1,76	95,15	1,82	91,29	3,05	69,49	20
71,34	1,70	97,48	1,56	87,53	1,50	51,26	1,46	70,85	2,72	97,31	0,70	93,33	2,42	90,12	24

3D nyomtatóval előállított implantátumok biokompatibilitási vizsgálatai

PMMA_22_0		PMMA_19_0		PMMA_16_0		PETG_22_0		PETG_19_0		PETG_16_0		AntiPLA_22_0	
±SD	Kiold (%)	±SD	Kiold (%)	±SD	Kiold (%)	±SD	Kiold (%)	±SD	Kiold (%)	±SD	Kiold (%)	±SD	Kiold (%)
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,84	14,10	0,71	3,54	1,17	7,67	0,50	1,72	4,97	20,91	3,19	5,79	4,78	36,50
1,47	26,57	1,03	9,86	1,31	14,54	1,11	3,57	2,79	53,48	1,31	8,51	3,21	46,67
2,02	32,76	3,25	18,54	2,00	22,51	0,84	7,69	1,86	76,07	2,06	12,83	3,26	62,22
3,08	57,01	6,32	38,28	12,42	37,04	1,62	18,17	1,35	90,47	4,42	18,58	3,42	77,44
2,99	75,32	4,62	74,17	0,83	71,80	1,10	29,23	0,83	91,29	9,25	30,12	3,10	84,59
3,41	92,95	1,10	97,23	0,43	81,38	0,88	57,70	0,43	94,22	5,32	55,65	1,17	86,47
2,15	90,60	0,61	98,83	0,56	82,85	1,55	73,75	1,69	96,33	0,95	61,55	0,96	87,60
1,49	99,96	0,87	98,87	0,88	85,44	1,06	75,29	1,52	97,94	1,42	61,97	0,37	88,51
2,42	99,19	0,99	99,07	0,81	89,45	1,01	76,96	0,52	97,86	2,63	62,23	1,20	90,30
0,38	99,30	1,21	98,63	1,99	91,09	1,66	75,59	0,99	98,48	4,29	63,41	3,86	85,56
1,78	98,05	0,57	99,53	1,58	89,89	1,71	78,30	2,43	97,64	1,22	61,24	2,01	87,23
0,24	98,85	0,41	98,64	1,46	92,07	1,26	80,25	1,70	98,03	1,63	59,89	1,35	88,35
0,50	97,67	1,66	98,68	1,17	93,36	1,25	78,16	2,30	97,82	2,70	60,96	2,73	93,47
0,55	99,28	3,74	96,59	1,22	93,80	2,78	77,59	1,16	98,49	1,18	59,40	1,74	93,34
0,38	99,49	1,37	97,14	1,14	96,39	1,36	79,77	0,57	99,49	2,81	59,96	0,89	95,73

A kioldódott hatóanyag százalék (Kiold %) értéke minden mintavételi időpont (h) esetében, a szórásértékekkel (±SD).