

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**3D nyomtatóval előállított implantátumok
biokompatibilitási vizsgálatai**

Dr. Arany Petra

Témavezető: Dr. Kovácsné Prof. Dr. Bácskay Ildikó



DEBRECENI EGYETEM
Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2021

3D nyomtatóval előállított implantátumok biokompatibilitási vizsgálatai

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a gyógyszerészeti tudományok tudományágban

Írta: Dr. Arany Petra okleveles gyógyszerész

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszerészeti Tudományok doktori iskolája
(Farmakológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Kovácsné Prof. Dr. Bácskay Ildikó, PhD

Az értekezés bírálói:

Dr. Berkó Szilvia, PhD

Dr. Pál Szilárd, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Tószaki Árpád, MTA doktora

tagok: Dr. Berkó Szilvia, PhD

Dr. Pál Szilárd, PhD

Dr. Balogh Emese, PhD

Dr. Sovány Tamás, PhD

Az értekezés védésének (online formátumban) időpontja: 2021.06.29. 13:00 óra.

A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben a vitán részt kíván venni, úgy jelezze az arany.petra@euipar.unideb.hu e-mail címre a vitát megelőző munkanap (2021.06.28.) 20 óráig. A határidő lejártát követően technikai okok miatt már nincs lehetőség a védéshez kapcsolódni.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés és célkitűzés	4
2. Irodalmi áttekintés	5
3. Anyagok és módszerek	8
4. Eredmények	9
5. Megbeszélés	17
6. Összefoglalás	25
7. A jelöltnek az értekezés témájában született publikációinak a Kenézy Könyvtár által hitelesített listája.....	26
8. Köszönetnyilvánítás	28

1. Bevezetés és célkitűzés

A 3D nyomtatás az utóbbi néhány évtized egyik legmodernebb gyártástechnológiai eljárásává nőtte ki magát. Számos területen, így az építőiparban, az élelmiszeriparban és az egészségügyben is előszeretettel alkalmazható. A gyógyszeriparban különböző gyógyszerleadó rendszerek előállítására használják. Az első 3D nyomtatással előállított gyógyszerkészítményt (Spritam®) még 2015-ben engedélyezte az amerikai gyógyszerügyi hatóság (FDA, Food and Drug Administration), mely egy orálisan széteső tabletta és epilepsziás rohamok kezelésére alkalmazták.

Az Amerikai Egyesült Államokban évente 30 millió magisztrális gyógyszerkészítményt készítenek a beteg megfelelő terápiájának eléréséhez. Az egyéni gyógyszereléssel a beteg szükségleteinek megfelelően tudunk előállítani gyógyszerkészítményeket, így növelhetjük a hatékonyságot, csökkenthetjük az alkalmazott hatóanyag mennyiséget, minimalizálhatjuk a mellékhatásokat és növelhetjük a betegek együttműködési képességét. A 3D nyomtatási technológia (3DP) alkalmazása alternatív mód lehet a hatékony, személyre szabott hatóanyag leadó rendszerek gyors előállítására. Az egészségügyi szakszemélyzet a komplex, személyre szabott termékeket igény szerint, egy relatíve olcsó gyártási eljárással készítheti el. Ennek ellenére bizonyos limitáló tényezőket is figyelembe kell venni. Az alkalmazott hatóanyagoknak stabilnak kell lenniük a nyomtatás során, illetve bár ez egy viszonylag gyors minta előállítási lehetőség, jelenleg nem képes az ipari méretű táblattázógépek termelékenységével felvenni a versenyt.

Célunk, hogy FDM típusú 3D nyomtatással állítsunk elő különböző gyógyszerleadó rendszereket, illetve az előállított rendszerek szükséges vizsgálatait elvégezzük. Az 1. kísérletsorozatunkban a nyomtatott minták kémiai módosítása történt meg, mely során különböző kémiai oldalláncokat kapcsoltunk a különböző polimerekből előállított implantátumokhoz. A minták anyagszerkezetének és biokompatibilitásának meghatározását tűztük ki célul.

A 2. kísérletsorozatunkban a minták előállítása FDM 3D nyomtatóval történt különböző polimerekből diklofenák-nátrium hatóanyagtartalommal. Célunk az előállított minták anyagszerkezeti vizsgálata, a minták citotoxicitásának mérése, illetve a különböző polimerből előállított, illetve különböző átmérővel és kitöltöttségi százalékkal rendelkező minták kioldódási profiljának feltérképezése.

2. Irodalmi áttekintés

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 (standard tessellation language) fájlformátumot kapunk, melyet a 3D nyomtatóhoz tartozó szoftver már képes kezelni. Ezekben a programokban történhet meg a minták paramétereinek végső beállítása például méret, kitöltöttségi százalék. A nyomtatási paraméterek beállítása is itt történik meg. Ha a nyomtatás során szükségesek kiegészítő részek ahhoz, hogy biztosítsuk a megfelelő megtámasztást a nyomtatás során, azt a program automatikusan felismeri. Ezek a támasztékok a nyomtatást követően manuálisan eltávolíthatók. Ezen folyamat során egy gcode fájlformátumot kapunk, melyet a 3D nyomtató már tud kezelni. Az utolsó lépésben történik maga a nyomtatás.

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.

A gyógyszeripar, illetve számos kutatócsoport dolgozik azon, hogy 3D nyomtatással előállított gyógyszerleadó rendszerek kerüljenek forgalomba. Ennek ellenére jelenleg csak a bevezetőben említett Spritam® készítmény van forgalomban. Ehhez az előállításához egy úgynevezett ZipDose® technológiát alkalmaznak, melynek lényege, hogy az egyenletesen elosztatott por rétegeket kötőanyaggal rögzítik egymáshoz rétegről-rétegre.

A 3D nyomtatással leggyakrabban tablettákat, kapszulákat, implantátumokat, transzdermális gyógyszerleadó rendszereket (TDS) és szájban széteső filmeket formulálnak, mint speciális gyógyszerleadó rendszerek.

Hollander és szerzőtársai polidimetilsziloxánból (PDMS) prednizolon hatóanyag tartalmú módosított hatóanyagleadású tablettákat állítottak elő, ahol a minták közötti keresztkötéseket UV fény segítségével alakították ki. Egy másik kutatócsoport az FDM nyomtatáshoz szükséges filamenteket különböző cellulóz alapanyagokkal módosította. Az alkalmazott hatóanyag 30 % izoniazid volt, az előállított gyógyszerforma pedig tabletta. Számos kutatást végeznek csokoládé alapú 3D nyomtatásra, melyhez egy speciális berendezést alkalmaznak, ahol a különböző kémiai anyagok helyett csokoládé lesz a kötőanyag. Egy

kutatócsoport ibuprofen és paracetamol hatóanyagú tablettákat állított elő ezzel a módszerrel. **Khaled és szerzőtársai** egy úgynevezett 'polypill'-t hoztak létre, amely magyarul lényegében annyit jelent, hogy sok tableta található meg egyben. Egyszerre több nyomtatófejet alkalmaznak, ennek köszönhetően öt különböző hatóanyagot tartalmaz a tablettájuk különböző kompartmentekben és két egymástól független és jól definiált kioldódási profillal rendelkeznek.

Maroni és szerzőtársai több tudományos publikációban is 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.

Implantálható gyógyszerleadó rendszereket különböző módszerekkel állíthatóak elő. Az egyik esetben 3D nyomtatással állítottak elő implantátumot oszteoszarkóma kezelésére. Egy másik esetben implantálható nanogéleket állítottak elő a hosszú-távú hatás kifejtésére. Néhány kutató arra alkalmazta a nyomtatási eljárást, hogy megfelelő vázat hozzanak létre, mely a polimereken kívül a hatóanyagot is tartalmazza és csontműtétek esetében közvetlenül előállíthatóak.

Az általam vizsgált minták mindegyike szálhúzásos technológiával vagy ráolvasztásos módszerrel (FFF, Fused filament fabrication vagy FDM, Fused deposition modeling) került előállításra. Az eljárás lényege, hogy a polimerből készült filament tekercs a nyomtatófejben hő hatására megolvad, így egy polimer olvadékot kapunk, és az olvadékból alakítjuk ki a minta rétegeit a tálcán. Az FDM technológia egy szabadalom-nélküli, széleskörben elterjedt és olcsó eljárás, mely számos kutatócsoportot inspirált. További előnyei, hogy mechanikailag stabil rendszerek állíthatóak elő nagy felbontásban (30- 200 μm), melyek nem igényelnek a nyomtatás befejeződését követően mosási vagy tisztítási lépéseket.

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 önmagukban vagy módosítva (lásd antibakteriális tejsav (AntiPLA), polietilén tereftalát glikol (PETG)). Az FDM nyomtatás során számos paraméter befolyásolja a nyomtatott minta minőségét, például az alap- és hatóanyagok fizikai és kémiai tulajdonságai, a nyomtatófej, az extruder és a beállított nyomtatási paraméterek. Nagyon fontos a különböző alkalmazott nyomtatási paraméterek esetleges hatásainak vizsgálata és a kritikus nyomtatási paraméterek meghatározása a gyógyszerleadó rendszerek előállítása során. 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.

A parenterális gyógyszeres implantátumok (implantable drug delivery systems, IDDS) fogalma a Pharmacopoea Hungarica (Ph. Hg.) VIII. kiadása alapján: „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”

Az implantátumok alkalmazásának számos előnye van, ezek közé tartozik, hogymódosított hatóanyagleadás érhető el a konvencionális gyógyszerformákkal összehasonlítva. Az implantátumokkal hosszú ideig, akár évekig biztosítható a hatóanyagleadás. A beadás helyétől és módjától függően lokális vagy szisztémás hatás is biztosítható. A folyamatos, szabályozott hatóanyag leadással állandó plazmaszintet lehet elérni, mellyel jobb beteg együttműködési készség alakítható ki. Egyszerre kevesebb hatóanyag elegendő azonos válasz eléréséhez, mellyel a mellékhatások kialakulásának valószínűsége is csökken.

Néhány hátránnyal is számolnunk kell az alkalmazás során. Maga a gyógyszerforma egyszerre nagyobb mennyiségű hatóanyagot tartalmaz, 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. A termék komplex szerkezet, melyek előállítása és engedélyezése drágább, mint egy hagyományos gyógyszerforma esetében.

Az implantátumok előállítására különböző módszerek alkalmazhatóak, így a fröccsöntés (injection molding), préselés (compression molding), extrudálás (hot melt extrusion, HME), oldószer elpárologtatás (solvent casting), illetve az általunk is használt 3D nyomtatás.

3. Anyagok és módszerek

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 módosítással összefüggő funkciós csoportok feltérképezésére
 - pozitron annihilációs 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 hőáramlási 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

4. Eredmények

4.1. 1. kísérletsorozat

4.1.1. 3D nyomtatás és kémiai módosítás

A kísérleteinkhez a 3D nyomtatott mintákat a lyoni Claude Bernard egyetem 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.

A politejsav minták kémiai oldallánc módosítása különböző aminokkal történt, melyek hatását eddig egy kutatócsoport sem vizsgálta, ezért számít ez a kísérlet egyedinek. A kémiai anyagok kiválasztásakor az volt a célunk, hogy hidrofil oldalláncokat kapcsoljunk a PLA-hoz, melyek eltérő kémiai szerkezettel rendelkeznek: 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 csoporttal rendelkezik, a 2,2'-(etilén-dioxi)-dietilamin (NPEGN) egy rövid polietilén-glikol vázat tartalmaz, míg a tris-(2-aminoetil)-amin (Tris) elágazó amino csoportot tartalmaz.

4.1.2. Anyagszerkezeti vizsgálatok

4.1.2.1. Pásztázó elektronmikroszkópia

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 egyenetlen. A mosást követően a mintafelületet simábbnak láttuk. A hat oldalláncmódosított minta közül négy módosított minta esetében (PLA-BAPA, PLA-ED, PLA-Tris és PLA-NPEGN) egyenletes, lapos felszín kaptunk, egyenletesen elosztatott pórusokkal. A Tris módosulat esetében a pórusátmérő körülbelül 1 µm volt. A PLA-TET módosulat felszíne nagymértékben hasonlított a kezeletlen minta felületére, viszont a felszínen apró bemélyedések voltak láthatóak, körülbelül 100-200 nm átmérőjűek. Végül a PLA-MeNPrN 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.

4.1.2.2. Fourier transzformációs infravörös spektroszkópia (FTIR)

A fourier transzformációs infravörös spektroszkópiai elemzést Dr. Beomjoon Kim végezte el. A politejsav alapváz spektrumán 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) és a többi módosulat esetében 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 módosulatok között kialakuló kovalens kötésből származhat. Továbbá az N-H amid kötés jelenléte is bizonyítja 3300 cm^{-1} hullámhossz értéknél a módosítást. 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.

4.1.2.3. Felszíni egyenetlenség vizsgálata

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

A módosított kémiai oldalláncot tartalmazó minták esetében a felület általában sík volt, bizonyos esetekben kis gödrök és kiemelkedések voltak megfigyelhetőek, ami összhangban volt a SEM mérés során tapasztaltakkal. Nem találtak $400\text{ }\mu\text{m}$ távolságonként szisztematikusan ismétlődő felszíni egyenetlenségeket.

4.1.2.4. Pozitron annihilációs élettartam spektroszkópia

Prof. Zelkó Romána és Kazsoki Adrienn végezte el a PALS vizsgálatot. 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 alapváz szignifikánsan magasabb o-PS élettartammal rendelkezik. (****, $p < 0,0001$). 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.

4.1.2.5. Nedvesedési peremszög meghatározása

A nedvesedési peremszög meghatározását a lyoni egyetem kutatói végezték el. 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 hidrofílnak és az amino csoportok kapcsolásával nőtt a hidrofilitás mértéke. Ahogyan az várható volt, a PLA alapváz rendelkezik a legnagyobb peremszög értékekkel.

4.1.3. Biokompatibilitás

4.1.3.1. 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. Ez a módszer eltér a hagyományos MTT vizsgálattól, mert mi nem a gátló koncentrációt (IC50) mértük, hanem a sejt életképességét a negatív kontrollal (DMEM 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.

Az eredményeket a negatív, azaz a kezetlen kontrollhoz viszonyított százalékban (Co⁻) fejezzük ki. Pozitív kontrollként (Co⁺) a Triton-X 100 (10% w /v) szolubilizálószer alkalmaztunk, amely minden vizsgálati mintához viszonyítva, mindegyik vizsgálati napon szignifikáns különbségeket mutatott. Összehasonlítottuk kémiaiilag módosított minták citotoxicitási értékeit, és megállapítottuk, hogy egyik minta esetében sem csökkent szignifikánsan a sejtleletképeség a kezetlen kontrollhoz képest. Az MTT vizsgálatunk alapján a PLA-TET citotoxicitása nem csökkent 100% alá a negatív kontrollhoz képest. A PLA-ED, a PLA-BAPA, a PLA-Tris és a PLA-NPEGN sejtleletképeségi 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. Ezen szabvány alapján valamennyi mintánk citokompatibilisnek minősült.

4.1.3.2. Biofilm képződés

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. Ezen vizsgálatot Dr. Kovács Renátó végezte el. Az összes mintánk abszorbancia értéke 0,24 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. 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. Az alapján az osztályozási rendszer alapján valamennyi implantátumunk alacsony biofilm formálási képességet mutatott.

4.2. 2. kísérletsorozat

4.2.1. 3D nyomtatás

Kísérleteink során négy különböző polimert: politejsavat (PLA), antibakteriális PLA-t (Anti), 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 az alábbiakban olvasható. 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 fedő lemezt nyomtattunk ki. Ezt követően elkezdődött a tényleges mintanyomtatás, amit a megfelelő pillanatban leállítottunk, majd a hatóanyagot beleöntöttük a mintába, és az előre kinyomtatott fedőlepezt a hatóanyag tetejére helyeztük. Végül kinyomtattuk a minta felső két rétegét. Ily módon sem az extrudálás magas hőmérséklete, sem a hűtés nem zavarta a hatóanyag stabilitását és mennyiségét.

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.

4.2.2. Tömegegységesség

A mért tömeg értékek és a hatóanyagtartalom egységességének eredményei alapján 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.

4.2.3. 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.

4.2.4. Anyagszerkezeti vizsgálatok

4.2.4.1. Pásztázó elektronmikroszkópia

A minták felületét pásztázó elektronmikroszkópiával vizsgáltuk meg Budai István segítségével. A PLA, antibakteriális PLA, PETG és PMMA minták SEM képeit 50x-es nagyítással készítettük el. Elemeztük a felület megfelelőségét, és a rétegek lokalizációját és megfelelőségét a 3D nyomtatással előállított minták esetében. A PLA esetében két egymás mellé nyomtatott filament szál közötti távolság átlaga 713,67 μm ($\pm 17,72$) volt; antibakteriális PLA esetében 712,86 μm ($\pm 2,26$); a PETG esetében 704,33 μm ($\pm 12,07$), a PMMA esetében pedig 700,16 μm ($\pm 7,73$). 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 3D nyomtatott minták felületi morfológiáját és pórusszerkezetét is összehasonlítottuk közvetlenül a 3D nyomtatás után és a kioldódás vizsgálat után 20x-os nagyítással. A kioldódás vizsgálatot követően pórusok alakultak ki a felszínen, amelyek alátámasztották azt a feltételezésünket, hogy a hatóanyag felszabadulás a hatóanyag leadó nyílásokon keresztül diffúzióval történik.

4.2.4.2. Mikro komputertomográfia

A mintákat a kioldódási vizsgálat előtt és után mikro komputertomográfiával (microCT) vizsgáltuk, hogy meghatározzuk morfológiájukat. A vizsgálatokat Béres Mónika végezte el. Az Anti_16_0 minta keresztmetszeti képén a kioldódási vizsgálat előtt és után jól látható a diklofenák-nátrium lokalizációja. Csak a kioldódás vizsgálat előtt tartalmazott a minta

diklofenák-nátriumot. A kioldódási vizsgálatot követően nem történt változás a filamentumok oldalsó rétegeinek elhelyezkedésében.

A PLA_16_0 minta felső felületét elemezve a kioldódás vizsgálat előtt és után jól látható, hogy kioldódás vizsgálatot követően a minta felületén pórusok keletkeztek.

A pórusok által a mintafelületén okozott pontos különbséget 5 μm 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.

4.2.4.3. Termogravimetriás és hőáramlási 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 tömegvesztéseget figyeltünk meg, ami valószínűleg a hatóanyag felszínén megkötött víz elpárolgásának volt köszönhető. A polimer hordozókból kiöntött diklofenák por minták esetében ez nem fordult elő. A hatóanyag termogravimetriás görbéje alapján valószínű, hogy az olvadás hőbomlással járt. A hatóanyag bomlása 500 °C-ig 39 % körül volt. A hőáramlási (DSC) görbe endoterm csúcsa 289,97 °C-on van, amelyet azonnal egy exoterm csúcs követett, amikor is a diklofenák elbomlott.

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 kapott 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 esetében a termikus stabilitás 50 °C-on kisebb volt, mint a diklofenák nélküli minták esetében, 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.

4.2.4.4. Nedvesedési peremszög meghatározás

A nedvesedési peremszög értékeit mind a négyféle alkalmazott polimer esetében (PLA, PLA antibakteriális, PETG és PMMA) megmértük, diklofenák-nátrium nélkül és diklofenák-nátriummal is. 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.

4.2.4.5. 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. Valamennyi minta körülbelül 30 mg diklofenák-nátriumot tartalmazott; ezek az eredmények összhangban voltak a tömegegységesség mérés során kapott eredményekkel. A hat üregű minták (5%, 10% és 15% kitöltöttség) esetében a hatóanyag mennyiségét minden üregben megmértük. 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 minták esetében.

4.2.5. Citotoxicitás vizsgálat

Hosszú távú sejtleletképeségi 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 vizsgálatától, hogy nem a gátló koncentrációt (IC50) 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. 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 citotoxikusnak tekinthetők [106] Ezen szabvány értelmében, mind a 3D nyomtatással előállított PLA, antibakteriális PLA, PETG és PMMA minták citokompatibilisnek minősültek.

4.2.6. Kioldódás vizsgálat

A minták kioldódási profilját USP I. típusú in vitro kioldódás vizsgáló berendezéssel határoztuk meg, hogy meghatározzuk hogyan befolyásolja a kioldódási profilokat a polimer, az átmérő és a kitöltöttségi százalék változtatása.

A kioldódási profilok páronkénti összehasonlítással elemeztük: a különbözőségi faktor (f_1) és a hasonlósági faktor (f_2) számításokkal. Megállapítottuk, hogy az összes minta esetében a kioldódási profil nem hasonlónak tekinthető, azaz az összes mintának különböző kioldódási görbéje volt.

A hatóanyag felszabadulás eredményeit nullad- és elsőrendű kinetikai modellekhez illesztettük. A legjobb illeszkedés meghatározásához determinációs együtthatókat használtunk. A PLA_16_0 minta nulladrendű modellre illeszkedett. Az Anti_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. 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 Anti_19_0, Anti_22_0 és PETG_19_0 mintákat 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 előtt értékekre számítottuk ki. Az Anti_19_0 és a PETG_19_0 30 percig, míg az Anti_22_0 45 percig illeszkedtek az elsőrendű kinetikai modellre.

5. Megbeszélés

1. kísérletsorozat

Napjainkban számos tanulmány jelent meg 3D nyomtatással előállított implantátumokról, 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 vizsgálati eredmények közvetlen összehasonlítását. A kémiai módosítás, avagy funkcionálizálás előnyösen befolyásolhatja a 3D nyomtatással előállított gyógyszerek morfológiáját és citokompatibilitási tulajdonságait.

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 módosított PLA minták FTIR spektroszkópiával kapott görbéi bizonyítják az új kémiai funkciós csoportok jelenlétét, de figyelembe kell vennünk, hogy az IR sávok intenzitása gyenge lehet, ha a változás csak a felületen ment végbe. Más módszerek nem alkalmasak a felületi kovalens kötések kialakulásának bizonyítására, így kijelenthetjük, hogy az általunk választott vizsgálati módszer megfelelt a céljainknak. A módosított minták mindegyike esetén megfigyelhető a C=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. Egyértelmű bizonyíték van arra vonatkozóan, hogy a felületi topográfiai és nedvesedési jellemzők befolyásolják az implantátumok beültetésekor a makromolekuláris és sejtszintű hatásokat. A politejsav polimer észter funkciós csoportját kémiailag módosítottuk különböző elágazó és lineáris oligoamin módosulatokkal a minták

hidrofilitásának növelése és a pozitív töltés létrehozása érdekében. Habár az etilén-diamin kis méretű és vízben nagyon jól oldódó molekula, így azt várnánk, hogy lemosódik a felszínről kémiai kötés hiányában. 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 nedvesíthetőséget befolyásolja a minta felületének kémiai módosítása, amint azt a mi kísérletünk is bizonyítja. A nedvesíthetőségnek nagyon fontos szerepe lesz a minta beültetésekor, mivel meghatározza a várható biológiai eseményeket.

A pásztázó elektronmikroszkópia (SEM) 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, a különböző implantátumok viselkedésének előrejelzésére az emberi szervezetben.

A pozitron annihilációs élettartam spektroszkópiával (PALS) mért o-Ps élettartam értékei jól korrelálnak az implantátumok méretével és a felszínen lévő esetleges szerkezeti hibákkal. A módszer a polimer alapú implantátumok szupramolekuláris szerkezetét méri, amely megfelelő információt adhat a pórusméretről és a felszín porozitásáról a felületfelső 100 µm-éről nano mérettartományban.

A SEM és PALS kísérletek eredményeit összehasonlítva a PLA-ED, a PLA-TET és a PLA-Tris minták magas szabad térfogatot és számos felszíni egyenetlenséget mutattak. A PLA-ED és a PLA-Tris esetében ezek körülbelül 1 µm átmérőjűek voltak, míg a PLA-TET esetében körülbelül 100–200 nm átmérőjűek. 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 között.

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. Az MTT-teszt széles körben alkalmazott, gyors kolorimetriás módszer, amely bizonyos vegyületek in vitro citotoxicitásának mérésére alkalmas sejtvonalakon vagy primer sejteken, továbbá

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. Az MTT teszt ezen limitáló tényezője ellenére még mindig a legmegbízhatóbb és leggyorsabb teszt a citokompatibilitás megállapításához.

Kísérletünk során a mintáinkat DMEM médiumban, 37 °C-on tároltuk a 12. napig történő mintavézésig. A mintákat a médiumba helyeztük a 4., 8. és 12. napon történő mintavézésig, 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. Egyértelműen bizonyított, hogy a PLA a tárolás során tejsavvá és glikolsavvá bomlik, és különböző tényezők (pH, molekulatömeg stb.) befolyásolhatják ezt a bomlást. 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. Az MTT teszt eredményei alapján az összes PLA alapvázú mintánk citokompatibilisnek bizonyult.

A mikrobiális biofilm képződés komoly kockázati tényező lehet a beültetett implantátumok esetében, ami súlyos szövődmények kialakulását okozhatja, amely fertőzésekhez és antimikrobiális rezisztencia kialakulásához vezethet. A beültetés során bármilyen fertőzés veszélyes lehet, mivel nagyfokú gyulladást és az implantátum kilökődését eredményezheti vagy hozzájárulhat gyulladásos válasz kiváltásához, és további műtéti beavatkozásokat igényelhet fogászati implantátumok esetében. A *Candida albicans* képes biofilmet képezni az orvostechnikai eszközökön, ami az emberi szervezetben betegségek kialakulását okozhatja. A 3D nyomtatott polimer alapú minták közvetlen kémiai módosítása egy új megközelítést jelent, mivel ebben az esetben a felület ténylegesen megváltozik. Ez lehetővé teszi a mikrobiális biofilm képződés gátlását, vagy még nagyobb mértékű felületi kolonizációt eredményezhet. Érdekes módon mindkét irányú eltolódásjelentőséggel bírhat a kutatók számára. Az ilyen kémiai módosítás kulcsfontosságú pontja a reaktív észtercsoportok jelenléte a 3D nyomtatásban alkalmazott polimerekben.

A biofilm formálási készség vizsgálata szintén kötelező eleme a citokompatibilitási vizsgálatnak. A biofilm képződés akár a politejsav szerkezetét is megváltoztathatja, ami a hatóanyag felszabadulását befolyásolhatja és így súlyos mellékhatások kialakulásához vezethet. A biofilm képződési vizsgálatot *Candida albicans* SC5314 referencia izolátummal végeztük el, mivel a *Candida* fajok az egyik leggyakoribb fertőzést okozó kórokozók és más *Candida* fajok súlyos szisztémás mikózist okozhatnak, melyek 45 %-os mortalitást mutatnak. Ideális esetben a mért abszorbancia 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. 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.

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 javíthatók 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.

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. A 3D nyomtatás jelentősen felgyorsítja a tervezést mind a kutatás-fejlesztés, mind pedig az ipari léptékű előállítás során.

A 3D nyomtatási folyamathoz nehezen illeszthető be a hatóanyaggal való töltés. Kutatócsoportunk kidolgozott egy egyszerű módszert hatóanyag-tartalmú minták előállítására. Először minden mintához kinyomtattunk egy fedőlemezt, amelyet a hatóanyagot tartalmazó alsó rész tetejére helyeztünk el, majd befejeztük a 3D nyomtatást. 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. Egy kutatócsoport kísérletei esetében a hatóanyag-tartalmú filamenttel történő 3D nyomtatást követően 5 %-os hatóanyag veszteséget tapasztaltak, míg egy másik kísérletben 50 %-os hatóanyagtartalmú filamentet állítottak elő, de így a filament tulajdonságai, illetve a viselkedése a 3D nyomtatás során jelentősen megváltozhat, ami a kívánt termék tulajdonságait is jelentősen megváltoztathatja. 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 hőáramlási (DSC) elemzést alkalmaztunk az endoterm és exoterm különbségek feltérképezésére a hatóanyag esetében. 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 sterilizálhatók, ami lehetővé teszi a steril filamentek közvetlen nyomtatását, akár a műtétek alatt is.

A nedvesedési peremszög értékének meghatározása információval szolgál a minta hidrofób vagy hidrophil viselkedéséről, amit a polimer típusa is befolyásolhat. A nedvesedési peremszög meghatározása alapján a különböző polimerek különböző nedvesedési tulajdonságokkal rendelkeznek, ami befolyásolhatja a minták esetleges kilökődését a szervezetben. Az

antibakteriális PLA esetében kisebb nedvesedési peremszög értékeket kaptunk, mint a PLA minták esetében, így az antibakteriális PLA mintának nőtt a hidrofilitása. Az alacsony nedvesedési peremszög érték azt jelenti, hogy a vizsgált anyag és a víz molekulák közötti interakció nagy volt, ami a felszín magas hidrofilitásával jár.

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. 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. 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. 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 változtattunk: 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.

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. Az átmérő és a kioldódási százalék a vártnak 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. A hatóanyag kioldódása számos fizikai és kémiai paramétertől függ, amely nehezíti teszi a kioldódási profil leírását megfelelő matematikai modellel, így a mintáinkat nullad- és elsőrendű kinetikai modellel elemeztük. 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.

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. A politejsav pK_a értéke 3,84 és a hidrolízis gyorsabb, alacsonyabb vagy magasabb pH érték esetében. 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. 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 mintavézésig 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 hőáramlási, illetve Raman spektroszkópiai eredményeink megerősítenek. Az átmérő és a kitöltöttségi százalék értéke a vártak 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.

6. Összefoglalás

Az 1. kísérletsorozat eredményeképpen elmondhatjuk, hogy sikeresen állítottunk elő 3D nyomtatással alapvázakat. Egyszerre ötven mintát tudunk nyomtatni. A nyomtatott vázának 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.

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 a kívánt kioldódási profillal rendelkező minták előállítására. 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 ISO 10:993 szabvány alapján valamennyi mintánk citokompatibilisnek tekinthető, 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.

7. A jelöltnek az értekezés témájában született publikációinak a Kenézy Könyvtár által hitelesített listája



**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.



8. Köszönetnyilvánítás

Hálás köszönetet mondok Prof. Dr. Bácskay Ildikó témavezetőmnek, hogy 2015-ben még TDK hallgatóként lehetőséget adott a Gyógyszertechnológiai 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 Gyógyszertechnológiai tanszéken kísérleti tudományos munka végzésére és bármikor számíthattam a segítségére és szaktudására.

Köszönettel tartozok a Gyógyszertechnológiai 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 bíztatott.

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

A kutatás támogatói:

A kutatás a Richter Gedeon Tálermentum 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 tanulmány 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 tanulmány 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.