

Медицински университет
„Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна Факултет
по медицина
Катедра „Анатомия, хистология и ембриология“

Д-р Петър Стаматов Вълчанов

**МОДЕЛИРАНЕ И 3D ПРИНТИРАНЕ НА
МОРФОЛОГИЧНО ДОСТОВЕРНА КОСТНА
МАТРИЦА**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд

за присъждане на научна и образователна степен „Доктор“

Научна специалност

03.01.02 „Анатомия, хистология и цитология“

Направление

7.1. Медицина

Научни ръководители: доц.

Стоян Павлов, д.м. доц. Трифон

Червенков, д.м.

Варна, 2023

Дисертационният труд съдържа 115 страници и е онагледен с 15 таблици и 42 фигури. Библиографската справка включва 371 литературни източника на латиница. Дисертационният труд е обсъден и насочен за официална защита от катедрен съвет на Катедрата по анатомия и клетъчна биология при Медицински университет – Варна.

НАУЧНО ЖУРИ

Външни членове:

1. Проф. д-р Лазар Желев Славов, д.м.
2. Доц. д-р Николай Димитров Димитров, д.м.
3. Проф. д-р Пепа Косева Атанасова-Хрисчева, д.м.

Резервен външен член:

Доц. д-р Димитринка Йорданова Атанасова-Димитрова, д.н.

Вътрешни членове:

1. Доц. д-р Трифон Георгиев Червенков, д.м.
2. Проф. Инж. Кристина Станимирова Близнакова, д.н.

Резервен вътрешен член:

Доц. Инж. Живко Борисов Близнаков, д.н.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на, от, в аудитория на МУ „Проф. д-р Параскев Стоянов“ гр. Варна на открито заседание на научното жури. Материалите по дисертацията са на разположение в библиотеката на МУ – гр. Варна.

СЪДЪРЖАНИЕ

Съкращения, използвани в текста	5
Въведение	6
Глава 1. Цел и задачи	
Глава 2. Материал и Методи	13
2.1. Описание на методите по изпълнението на Изследване 1: Създаване на методика за генериране, изработване, валидация и качествен контрол на изградени чрез триизмерен печат модели, които да отразяват с висока точност и прецизност пространствените свойства на костта като орган	13
2.2. Описание на методите по изпълнението на Изследване 2: Създаване на методика за генериране, изработване и използване в клинични условия на пациент-специфични персонализирани модели за предоперативно планиране на сложни ортопедични операции в областта на таза и изследване на клиничната им ефикасност	25
2.3. Описание на методите по изпълнението на Изследване 3: Създаване на биомастило за екструдирало 3D принтиране на матрици, които пресъздават биологичните, хистологични и рентгенологични свойства на костта като тъкан	28
2.4. Описание на методите по изпълнението на Изследване 4: Създаване на физически антропоморфен образен фантом чрез VbV методика за триизмерен печат и анализиране на неговата рентгенологична достоверност	38
Глава 3. Резултати	45
3.1. Резултати за Изследване 1: Създаване на методика за генериране, изработване, валидация и качествен контрол на изградени чрез триизмерен печат модели, които да отразяват с висока точност и прецизност пространствените свойства на костта като орган	45
3.2. Резултати за Изследване 2: Създаване на методика за генериране, изработване и използване в клинични условия на пациент-специфични персонализирани модели за предоперативно планиране на сложни ортопедични операции в областта на таза и изследване на клиничната им ефикасност	56

3.3. Резултати за Изследване 3: Създаване на биомасило за екструдирало 3D принтиране на матрици, които пресъздават биологичните, хистологични и рентгенологични свойства на костта като тъкан	58
3.4. Резултати за Изследване 4: Създаване на физически антропоморфен образен фантом чрез VbV методика за триизмерен печат и анализиране на неговата рентгенологична достоверност	69
Глава 4. Дискусия	74
4.1. Антропоморфни 3D принтирани модели	74
4.2. Създаване на методика за генериране, изработване и използване в клинични условия на пациент-специфични персонализирани модели за предоперативно планиране на сложни ортопедични операции в областта на таза и изследване на клиничната им ефикасност	81
4.3. Създаване на биомасило за екструдирало 3D принтиране на матрици, които пресъздават биологичните, хистологични и рентгенологични свойства на костта като тъкан	83
4.4. Изработване на антропоморфен фантом чрез VbV 3D принтиране	88
Изводи	90
Справка за приносите на дисертационния труд	91
Публикации във връзка с дисертационния труд	92
Научни доклади и съобщения, изнесени на научни конференции, конгреси и симпозиуми	93
Благодарност и финансиране	94
Библиография	95

СЪКРАЩЕНИЯ, ИЗПОЛЗВАНИ В ТЕКСТА

(изброени по азбучен ред):

На латиница

3D	T
ABS	A
BMP 2	Bone morphogenetic protein 2

CAD	C
CNC	Computer numerical control
DLP	Digital Light Processing
FDM	Fused Deposition Modeling
FGF	Fibroblast growth factor
FRESH	Freeform reversible embedding of suspended hydrogels
hAECs	H
ILGF	Insulin-like growth factor
iPSCs	Induced pluripotent stem cells
kVp	Kilovoltage peak
MSCs	Mesenchymal stem cell
PCL	Polycaprolactone
PEEK	Polyetheretherketone
PEI	Polyethyleneimine
PLA	Polylactic acid
SDS10	Syringe deposition system 10 ml
SLA	Stereolithography
SLS	S
TGF	Transforming growth factor beta
VbV	Voxel by voxel

На български език

КЛКТ	Конично лъчева компютърна томография
КТ	Компютърна томография
ПЕТ	Позитронно-емисионна
ХЕ	Хаунсфийлдови единици
УВ	Ултравioletов
ЯМР	Ядрено-магнитен резонанс

ВЪВЕДЕНИЕ

Аддитивното производство (триизмерен печат; 3D принтиране) е авангардна технология, която позволява точното изработване на материален обект по компютърен 3D модел чрез управляван от компютър робот (3D принтер). Тази технология има множество приложения в различни отрасли на науката и техниката, като нейната бързина и прецизност я правят особено привлекателна за медицината [1]. Чрез 3D -печат могат да се изработват обучителни и тренировъчни

модели, медицински и научен инструментариум, временни и постоянни импланти, еталонни модели за разработване на медицински устройства и научни експерименти, както и физически образни фантоми. Голяма популярност придобиха предоперативните модели за хирургично планиране, които представляват реплики на фрактури, аортни аневризми, тумори, съдови малформации и др. Те дават на хирурзите възможността да получат подробна информация за патологията, която ще лекуват, както и дори да тренират и планират оперативния достъп и операцията върху модела [2]. Особена форма на триизмерен печат е изработката на модели с биологични материали и живи клетки –3D биопринтиране, което позволява производството на триизмерни клетъчни култури и тъканни модели (биоскафолди) [3], както и дори по-прости в морфологично отношение органи. Възможно е също да се изработват в лабораторни условия сложни микроциркуляционни устройства, които да позволят съчетаването на няколко тримерни клетъчни култури и изучаването в детайли на взаимоотношенията между отделните клетъчни елементи в пространствено контролиран модел на тъкан (тъкан-върху-чип) или орган (орган- върху-чип) [4]. През последните години бяха изработени триизмерни биоматрици (биоскелети) на външно ухо [5], трахея [6], миокард [7], роговица [8], черен дроб [9], кожа [10], кост [11] и др., както и орган-върху-чип устройства на лимфен възел [12], яйчници [13], бъбрек [14], панкреас [15] и др. Част от тези устройства бяха успешно имплантирани на експериментални животни. До момента са 3D принтирани и имплантирани на пациенти различни импланти от синтетични материали като кости, стави, различни стентове, лекарство-доставящи устройства и др., но единственият биопринтиран и успешно имплантиран на човек орган е пикочен мехур [16].

Причината за това е в точността и структурата на изработените модели – докато външните размери на моделите са сравнително точни, то тяхната вътрешна структура не следва достатъчно добре морфологичните особености на тъканите и органите, което като резултат прави бипринтираните модели неприложими като източник на тъкани и органи за нуждите на трансплантологията [17]. Също така в структурно отношение предоперативните модели не са достатъчно реалистични, за да позволят пълноценното им използване за

тренировъчни модели. От една страна, технологичните възможности на 3D принтирането не позволяват изработването на структури с размер под 50 микрона с конвенционалните 3D принтери и се изискват специализирани устройства, достъпът до които е затруднен [18]. От друга, 3D моделирането на CAD моделите е изключително сложно и трудоемко, поради което малко специалисти са в състояние да изработят достатъчно качествен 3D модел.

По отношение на остеологията и ортопедията 3D принтирането показва огромен потенциал. Чрез специализирани софтуерни програми за хирургично планиране е възможно да се генерира дизайнът на различни импланти, които да бъдат изработени от пластмаси, метали и композитни материали и да бъдат имплантирани на пациент [19]. До момента са изработени множество подобни продукти – черепен покрив [20], гръдна кост [21], ребро [22], колянна и тазобедрена става [23], различни фиксатори и персонализирани импланти за остеосинтеза [24] и др. Особено обещаващо е използването на т.нар. високотемпературни суперпластмаси (PEEK, PEK, PEI и др.), чиято якост, здравина, устойчивост и биосъвместимост ги прави привлекателни за изработване на ортопедични продукти [25]. Правени са експерименти и с различни биологични материали, но до момента не е създадена сертифицирана биоактивна костнозаместваща субстанция, която да позволява изграждането на пълноценен костен имплант [26]. Изработването на такъв би създадо нови възможности за лечението на тежки многофрагментни и нестабилни фрактури, особено такива, свързани с повишен риск от асептична некроза [27].

В настоящия труд са разгледани методите за триизмерен печат, използвани за изграждането на модели, представящи три основни аспекта на костната тъкан:

- **Макроскопски:** Представя костта като макроскопски орган и разглежда методите за изработването чрез 3D принтиране на модел на кост с максимална точност и минимално отклонение с обекта-първоизточник.
- **Микроскопски:** Представя костта на тъканно (хистологично) ниво като съвкупност от полимери, изграждащи екстацелуларен матрикс, който може да бъде изработен лесно и с голяма точност

чрез 3D принтиране, може да бъде оцветяван със стандартни хистологични протоколи и има достоверни рентгенологични свойства като тъкан-еквивалентен материал, представляващ костната тъкан.

- **Рентгенологичен:** Представа костта като рентгено-позитивен обект, който показва сходно разпределение на своята атомна плътност като това на костната тъкан и може да бъде успешно използван като антропоморфен образен фантом.

Разгледаните методи стоят в основата на авангардни направления на съвременната наука като персонализираната имплантология, регенеративната медицина и рентгенологията. Те представляват неделима част от работния процес в приложения като:

Персонализирани модели за оперативно планиране:

Представяват медицински устройства, използвани за планиране на операции, свързани с метална остеоинтеграция при различни фрактури. Те са проектирани за конкретен пациент по точни антропологични данни, получени чрез образни изследвания. За проектирането на тези устройства е необходимо изграждането на точни модели на засегнатите кости, с минимално отклонение между модела и обекта-първоизточник. Посочените модели са основна стъпка при проектирането на персонализирани импланти и протези, поради което генерирането на точни анатомични модели е от първостепенно значение за изработването и сертифицирането на медицински устройства, отговарящи на съвременните изисквания за качество. Описани са проблемите, свързани с изграждането, анализа и качествения им контрол, както и клиничното им използване за планиране на ортопедични операции.

Биоматрици и 3D клетъчни култури: Представяват триизмерни порьозни конструкции, изработени от полимери с биологични свойства, сходни с тези на костната тъкан. Използват се за култивиране на клетки в ин витро условия до получаването на пълноценна синтетична тъкан. Описан е алгоритъмът за изграждане на биоматрица за изграждането на такива конструкции и проблемите, свързани с тяхното 3D принтиране като солидни обекти и визуализирането на структурата им чрез хистологичен и рентгенологичен анализ.

Антропоморфни образни фантоми. Представяват медицински устройства с антропоморфна структура и рентгенологични свойства, сходни с тези на костната тъкан. Разгледана е нова методика, базирана на триизмерен печат, за изграждането на такива устройства и проблемите, свързани с тяхната изработка и анализ.

Поради огромното си научно и практическо значение тези три технологии са използвани за възпроизвеждането на костната структура с максимална точност и прецизност. Разгледани са причините за възникване на грешки при посочените методи, които кумулират и могат да доведат до значителни отклонения спрямо оригиналната структура, което да доведе до незадоволителни резултати при тяхното приложение, както и пътищата за тяхната оптимизация. Съществуващите процедури за качествен контрол са тромави, трудоемки и изискват значителни познания, за да бъдат прилагани. Това е един от най-значимите проблеми в медицинското 3D моделиране и 3D принтиране и разрешаването му може значително да спомогне развитието на 3D технологиите в медицината.

ГЛАВА 1. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия труд е създаване на стандартизиран подход от методики за моделиране, изработване и валидиране на морфологично достоверни модели, които отразяват с висока степен на достоверност пространствените, биологични и рентгенологични свойства на костната тъкан. Чрез проведените експерименти е изследвана точността и надеждността на тези методики, както и факторите, които биха им оказали положително или отрицателно влияние. Описани са евентуалните проблеми, свързани с приложението им, както и методите за качествен контрол, които биха спомогнали за избягването им. Определянето на оптималните параметри на посочените методики би подобрило значително надеждността им при тяхното използване, както и би направило възможно създаването на мултимодален пространствено-биологично-рентгенологичен модел за комплексно изучаване, диагностика и лечение на костната тъкан.

За постигане на тази цел извършихме четири изследвания.

Изследване 1: Създаване на методика за генериране, изработване, валидация и качествен контрол на изградени чрез триизмерен печат модели, които да отразяват с висока точност и прецизност пространствените свойства на костта като орган.

Задачи на Изследване 1:

- Определяне на пространствената точност на физически антропоморфни модели, генерирани чрез сегментиране на образни изследвания и изработени чрез FDM 3D принтиране.
- Дефиниране на методика за генериране на такива модели, базирана на софтуер с отворен достъп.
- Определяне на значението на нивото на образование и опит на участниците в изследването за адекватното събиране на морфологични данни.
- Изследване на морфологична точност на получените модели чрез методика за качествен контрол, базирана на кадавърно проучване.
- Изследване на влиянието на термалната деформация на използваните материали върху морфологичната точност на получените модели.

Изследване 2: Генериране, изработване и клинично приложение на пациент-специфични персонализирани модели за предоперативно планиране на сложни ортопедични операции в областта на таза и изследване на клиничната им ефикасност.

Задачи на Изследване 2:

- Изготвяне на методика за генериране, изработване чрез триизмерен печат и валидация на пациент-специфични персонализирани модели за предоперативно планиране.
- Проучване върху ефикасността на пациент-специфичните персонализирани модели за предоперативното планиране при пациенти с тежки ацетабуларни фрактури.

Изследване 3: Създаване на биомастило за екструдирало 3D принтиране на матрици, които пресъздават биологичните, хистологични и рентгенологични свойства на костта като тъкан.

Задачи на Изследване 3:

- Изготвяне и адаптиране на наносиликатен хидрогел с оптимални физико-химични качества, който да се използва за инжекционно екстудирало 3D принтиране.
- Изработване на тестови обекти чрез 3D принтиране и определяне на техните пространствени свойства.
- Създаване на методика за хистологичен анализ на получените обекти.
- КТ сканиране и анализ на 3D принтирани скафолди и определяне на техните радиологични свойства.

Изследване 4: Създаване на физически антропоморфен образен фантом чрез VbV методика за триизмерен печат и анализиране на неговата рентгенологична достоверност.

Задачи на Изследване 4:

- Изработване на антропоморфен физически образен фантом чрез voxel-by-voxel (VbV) FDM 3D принтиране с тъкан-еквивалентни материали по методика, използваща специализиран генератор, управляван от изображения g-code генератор и модифициран FDM 3D принтер, разработени от MORPHE.
- Определяне на разпределението на Хаунсфийлдовите единици (HU) в различните участъци на фантома и сравняването му с това при обекта-първоизточник чрез специализиран софтуер за радиометричен анализ.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

2.1. Описание на методите по изпълнението на Изследване 1: Създаване на методика за генериране, изработване, валидация и качествен контрол на изградени чрез триизмерен печат модели, които да отразяват с висока точност и прецизност пространствените свойства на костта като орган

2.1.1. *Описание на експериментите*

Целта на Изследване 1 е да се създаде методика, която преобразува сканирана чрез КТ кост във физически обект, който отразява с висока точност и прецизност пространствените свойства на костта като макроскопски орган. След това е необходимо да се изчисли достоверността на получените обекти и надеждността на методиката чрез определяне на статистически показатели, които отразяват до каква степен полученият обект-копие се различава от обекта-първоизточник. За постигането на тази цел беше разработена методика, базирана на софтуер с отворен достъп, чиито точност и ефикасност бяха изследвани чрез проучване, основано на линейни измервания върху трупни обекти (кадавърно проучване), тъй като то представлява златният стандарт в изследванията на човешката морфология.

2.1.2. *Костни препарати и маркери*

Бяха използвани три сухи препарата от humerus от остеологичната сбирка на катедрата по анатомия и клетъчна биология, МУ-Варна, изготвени по стандартната методика, приета в Катедрата: почистване на меките тъкани, термична мацерация в чешмяна вода при температура 80–90°C за една-две седмици, механично премахване на остатъчните меки тъкани, миене, обезмасляване в лек (медицински) бензин, сушене. Върху всяка тях на морфологично идентични участъци бяха прикрепени чрез цианакрилатно лепило шест пластмасови маркера – конусообразни обекти от полиетилен с дължина 25 mm, който при КТ сканиране има средни стойности на ХЕ от –107 до –87, което ги

прави достатъчно добре видими за морфометрично изследване. Бяха поставени маркери на всяка кост в следните локации:

- Проксимални епифизи: Tuberculum majus et minus.
- Дистални епифизи: Epicondylus lateralis et medialis.
- Диафиза: По средата между проксималната и дистална епифиза латерално и медиално.

Маркерите са рентген-позитивни и присъстват както върху натуралните кости, така и върху DICOM датасетовите, 3D моделите, 3D принтираните модели със и без термална компенсация. Така извършващият измерването получава ясни и недвусмислени ориентирни точки, което уеднаквява подхода за измерване между различните измерители и значително би редуцирало човешката грешка и увеличило прецизността на измерването. Между маркерите бяха определени три напречни и шест надлъжни дистанции, означени съответно като T1–T3 за напречните и L1–L6 за надлъжните.

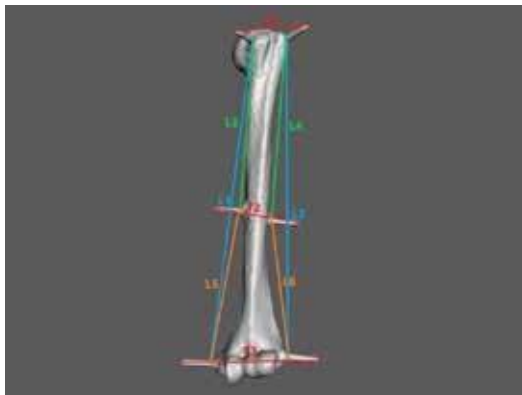
Табл. 1: Дистанции, измервани в изследването

	Дистанция	Точки на измерване
T1	Проксимална напречна дистанция	Върхове на Проксимален епифизарен маркер, медиално и латерално
T2	Диафизарна напречна дистанция	Връх на Диафизарен маркер, медиално и латерално
T3	Дистална напречна дистанция	Връх на Дистален епифизарен маркер, медиално и латерално
L1	Медиална обща надлъжна дистанция	Основа на Проксимален епифизарен маркер, медиално – Основа на Дистален епифизарен маркер, медиално
L2	Латерална обща надлъжна дистанция	Основа на Проксимален епифизарен маркер, латерално – Основа на Дистален епифизарен маркер, латерално
L3	Медиална проксимална надлъжна дистанция	Основа на Проксимален епифизарен маркер, медиално – Основа на Диафизарен маркер, медиално

L4	Латерална проксимална надлъжна дистанция	Основа на Проксимален епифизарен маркер, латерално – Основа на Диафизарен маркер, латерално
L5	Медиална дистална надлъжна дистанция	Основа на Диафизарен маркер- медиално, Основа на Дистален епифизарен маркер – медиално
L6	Латерална дистална надлъжна дистанция	Основа на Диафизарен маркер, латерално, Основа на Дистален епифизарен маркер, латерално



Фиг. 1: Три човешки раменни кости с разположени върху тях морфометрични маркери



Фиг. 2: Измервани дистанции: Напречни дистанции T1, 2 и 3 (в червено); Общи надлъжни дистанции L1 и 2 (в синьо); Проксимални

надлъжни дистанции L3 и 4 (в зелено); Дистални надлъжни
дистанции

L5 и 6 (в оранжево)

2.1.3. КТ сканиране на натуралните кости

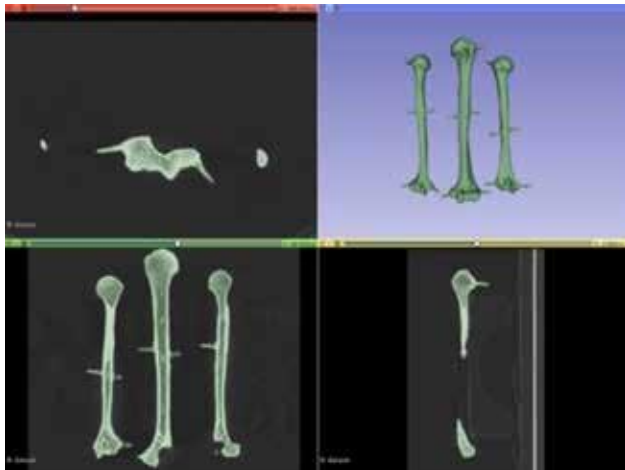
Натуралните кости с прикрепените маркери бяха сканирани с КТ скенер SOMATOM Force в МБАЛ „Св.Марина“ – гр. Варна. Използван беше протокол HeadStandart с дебелина на срезове 0,5 мм, отстояние между срезове 0,5 мм и 120 kVp. Изследването беше експортирано като DICOM датасет с размер на вокселите от $0,51 \times 0,51 \times 0,50$ мм.



Фиг. 3: Фронтална равнинна реконструкция на сканираните кости.
КТ, 120 kVp, $0,51 \times 0,51 \times 0,50$ mm³

2.1.4. Методика за сегментиране и 3D моделиране на DICOM датасета

За сегментиране на DICOM датасета бе използван Slicer 3D [28]. Това представлява софтуер за медицинска информатика и анализ на изображения с отворен код, включващ множество модули за импортиране, регистриране, анализ и обработка на серии от изображения, повърхностно и обемно изобразяване, сегментация и трансформация в 3D модели и др.



Фиг. 4: Сегментации на трите кости в трите равнини

Датасетът беше импортиран чрез модула DICOM. Чрез модула Volumes беше деактивирано интерполирането на слайдовете, което позволи точно визуализиране на отделните воксели със съответните им стойности в Хаунсфийлдови единици. Чрез Resample scalar volume модула е възможно да се увеличи или намали размерът на вокселите, но в случая това не беше необходимо, тъй като настоящият размер ($0,51 \times 0,51 \times 0,50$ мм) беше достатъчен за точното сегментиране на датасета. Чрез модула Segment editor датасета беше сегментиран. Използвани бяха инструментите Threshold при стойности от -200 до $+2777$ Хаунсфийлдови единици. Това позволи точното сегментиране на костите и прикрепените към тях маркери. Чрез модула Segmentations получената сегментация, включваща трите сканирани хумеруса с прикрепените към тях маркери, беше конвертирана в **начален 3D модел**. Той беше експортиран като STL файл.

2.1.4.1. За 3D моделиране беше използван Autodesk Meshmixer [29] – софтуер за повърхностно моделиране и скулптуриране на полигонни 3D модели. Той съчетава различни четки за скулптуриране (заглаждане, изравняване, изтриване, замяна и др.), възможности за добавяне и манипулация на различни примитивни и сложни форми, ретопологични функции за оптимизиране на полигонната структура и гъстота,

функции за анализ на стабилността на полигонната мрежа, както и за оптимизиране на 3D моделите за 3D принтиране. За разлика от някои безплатни програми като Blender и Meshlab, както и някои комерсиални като Pixologic Zbrush и Rhinoceros, Meshmixer се отличава със своята лекота и леснота за ползване, което позволява качествена 3D обработка дори и от непрофесионалисти.

Началният 3D модел беше импортиран в Autodesk Meshmixer. Полигонните мрежи, представляващи трите изследвани хумеруса, бяха отделени. Несвързаните с повърхността на изследваните кости полигонни мрежи бяха отстранени. Артефактите, останали от масата за КТ сканиране, бяха отстранени. Повърхността на костите беше изгладена с четка Bubble Smooth. Полигонната структура беше оптимизирана чрез операция Remesh, алгоритъм Adaptive density. Полигонната гъстота беше намалена до 850000 полигона за трите кости. Получените три полигонни мрежи бяха обединени и експортирани като **междинен 3D модел** в STL формат.

2.1.4.2. Валидация на 3D моделите

Като техника за валидация беше използвана визуална ревизия в Slicer 3D. **Междинният 3D модел** беше импортиран чрез модула Add Data. Чрез модула Segmentations импортираният междинен 3D модел беше конвертиран като сегментация. Получената сегментация беше внимателно разгледана и сравнена за всяка една от получените кости. Наличните артефакти бяха коригирани чрез модула Segment editor, използвайки селективни Paint и Erase инструменти с цел изолиране на повърхност със стойности от -700 до $+2777$ Хаунсфийлдови единици. Валидираните сегментации бяха конвертирани като 3D модели чрез Segmentations модула и експортирани в STL формат като **краен 3D модел**. При валидацията не бяха констатирани артефакти.

2.1.5. Изчисляване на термалната компенсация на материала, използван за 3D принтиране

За изработване на 3D принтираните модели беше използван филament от Натурална PLA поради сравнително ниската му термална

деформация (между 0,2 и 0,4%). За постигането на добра точност при 3D принтиране беше необходимо изследването на термалната контракция на конкретния материал, използван в експеримента. За целта беше 3D принтиран калибрационен куб със стени 20×20×20 мм. Чрез дигитален шублер бяха измерени стените му, отговарящи на X, Y и Z осите. Чрез получените стойности беше изчислена средната термална деформация като процентна разлика между желание и постигнатите размери за трите оси. Размерите на моделите с термална компенсация бяха увеличени със съответния процент, за да може след изстиването на полимера да се получат по-точни крайни размери.

Съответните стойности бяха $X = 19,96$ мм, $Y = 19,97$ мм $Z = 19,98$ мм, като средната стойност беше изчислена на 19,97 мм. Температурната компенсация беше изчислена на 0,2%. С толкова трябва да бъдат увеличени размерите на всяка отделна кост, за да се компенсира термалната контракция (свиването) на полимера.

2.1.6. Генериране на g-code и 3D принтиране на моделите

За генериране на g-code (слайсинг) беше използван PrusaSlicer [30] – софтуер с отворен достъп, разработен от Prusa Research, базиран на Slic3r. Програмата конвертира 3D модел в g-code за принтиране с FDM 3D принтер.

Крайният 3D модел беше импортиран в Prusaslicer, костите бяха разделени на отделни обекти, след което бяха разрязани на няколко фрагмента по дългата ос на костите. Беше зададена дебелина на слоя от 0,150 mm, два периметъра, 15% гироиден инфил, подпорен материал за маркерите и профил за работа с Natural PLA при температура на екструдирание 210°C, а температура на работната основа 60°C.

G-code беше експортиран при мащаб 1:1 (без термална компенсация), както и при мащаб 1:1.002 (с термална компенсация). Получените два кода бяха използвани за принтирането на шест модела на кости, три без термална компенсация и три със.



Фиг. 5: Трите 3D принтирани модела преди постпроцесинг

За 3D принтирането беше използван Prusa MK3S 3D принтер. Общото време за принтиране на моделите беше 63 часа. След завършване на принтирането отделните фрагменти бяха залепени с цианакрилатно лепило и моделите на кости бяха завършени.



Фиг. 6: Завършени 3D принтирани модели

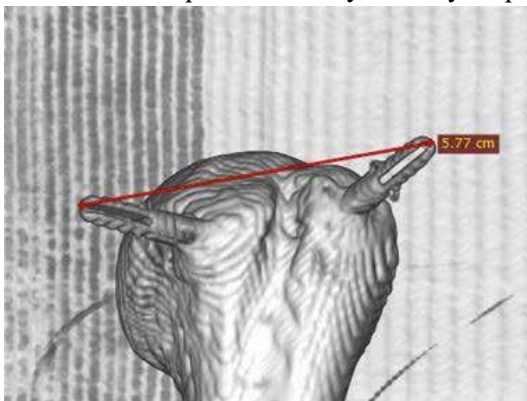
2.1.7. Методика за качествен контрол

2.1.7.1. Оценители и извършване на измерванията

За извършване на измерванията бяха определени трима оценители – специалист по анатомия, хистология и цитология, и двама студенти по медицина. Те бяха обучени кои дистанции трябва да бъдат измерени, как да използват мануалния шублер и модула за Volume rendering на Radiant Dicom Viewer. Бяха им раздадени таблици за попълване на резултатите.



Фиг. 7: Измервания с мануален шублер



Фиг. 8: Измервания с Volume rendering модул

Оценителите извършиха измервания на дистанции X1–X9 с мануалния шублер върху натуралните кости, 3D принтираните модели без термична компенсация и върху тези със. След това чрез модула за Volume rendering на Radiant Dicom Viewer извършиха измервания на същите дистанции X1–X9 върху DICOM датасета. Измерванията бяха

извършени по три пъти за оценител, в три последователни дни. Получените резултати бяха въведени в Excel таблица и анализирани.

2.1.7.2. Статистически анализ – общи статистически индикатори за оценка на точността на измерване

Беше създадена Excel таблица, съдържащи отделни колони за всяка кост, всеки оценител и всяка дистанция. Измерените стойности бяха въведени съответно за Натуралната кост (Bone), 3D принтирания модел без температурна компенсация (3D-), 3D принтирания модел със температурна компенсация (3D+) и за Обемната реконструкция (VR). Беше изчислена средната стойност на всяка измервана дистанция върху Bone, VR, 3D- и 3D+.

Бяха изчислени следните статистически индикатори:

- Средно отклонение (Average Bias, AB) – Изчислява се като усреднена стойност от разликата между всяко измерване за VR, 3D- или 3D+ и кореспондиращата средна дистанция, измерена върху костта. Ако моделът е морфологично точен, то AB би следвало да бъде нула, независимо от индивидуалната стойност на всяко отделно измерване. Ако средните размери на модела са по-големи или по-малки от референтните размери на костта, то стойността ще е положителна или отрицателна. Измерва се в mm.
- Нормализирано отклонение (Weighted bias, WB) – Изчислява се като съотношение между средното отклонение (в μm) и кореспондиращата средна стойност за съответната дистанция (в mm), измерена върху костта („истинска” стойност). Обобщава прецизността на модела в $\mu\text{m}/\text{mm}$, като демонстрира как се променят стойностите на средното отклонение на един милиметър от референтната дистанция (измерена върху костта). При прецизно измерване и липса на системна грешка трябва да се колебае около 0 $\mu\text{m}/\text{mm}$. Ясно показва, ако има системно отклонение при измерването на определени дистанции в посока „плюс” или „минус”.
- Нормализирана абсолютна грешка (Weighted absolute error, WAE) – Изчислява се като абсолютната стойност на разликата

между всяко измерване и кореспондиращата референтна стойност, измерена върху костта, се раздели на средната Bone дистанция. Този индикатор обобщава общата точност на модела, т.е. средно колко измерванията на изследвания модел биха се различавали за определена мерна единица от референтната дистанция, независимо от това дали разликата е положителна или отрицателна. Отражава обобщената величина на случайните грешки в измерванията на мерна единица от референтната дистанция в интервала на доверителност на изследването.

Всички индикатори бяха изчислени при интервал на доверителност от 95%.

2.1.7.3. Статистически анализ – отклонения между мануалните и компютърни методи за измерване на костта.

За анализиране на Методите на изследване, Дистанциите за измерване и самите Оценители и връзките между тях, бяха използвани линейни статистически модели от типа:

$$y = 0 + 1x_1 + \dots + nx_n +,$$

където y е зависима променлива, $x_1 - x_n$ са независими променливи, a – грешка, източник на случайна вариация.

Бяха изследвани ефектите на три независими фактора – Метод за измерване (**Method**), Оценител (**Rater**) и вид измервана дистанция (напречна или надлъжна; **Distance**) върху двата показателя за точност – Нормализирано средно отклонение (**WB**) и Нормализирана абсолютна грешка (**WAE**).

За всеки показател за отклоненията от базовата истина (усредненото измерване на съответната дистанция върху костните препарати) бяха тествани четири различни хипотетични модела:

Първи модел: Модел с пълно взаимодействие между трите фактора – Разглежда дали и как зависят показателите за точност от Метод, Оценител и Дистанция (коя дистанция е мерена). Моделът е пълен, защото включва и техните взаимодействия, тоест дали различните оценители мерят точно и дали точността им се променя, когато мерят по различен метод и различен тип дистанция.

$$Y \sim \text{Method} * \text{Rater} * \text{Distance}$$

Втори модел: Пълен модел без взаимодействие между трите фактора – проверява хипотезата, че точността на оценителя е независима от точността на метода или мерената дистанция, а всеки фактор влияе по един и същи начин върху относителното отклонение, независимо от другите фактори.

$$Y \sim \text{Method} + \text{Rater} + \text{Distance}$$

Трети модел: Редуциран модел – Видът дистанция е изключена от независимите променливи, тоест показателите за точност са моделирани само като резултат от самостоятелните ефекти и взаимодействията на **Method** и **Rater**.

$$Y \sim \text{Method} * \text{Rater}$$

Четвърти модел: Редуциран модел 3 без взаимодействие между – **Method** и **Rater**. Проверява хипотезата, че точността на оценителя е независима от точността на метода.

$$Y \sim \text{Method} + \text{Rater}$$

От описаните модели за статистически анализ беше избран моделът с най-малка прогностична грешка, оценена чрез информационния критерий на Aikake (AIC). Ефектите на факторите в избраните модели бяха допълнително анализирани с ANOVA, а характерът на статистически значимите ефекти допълнително изяснен с post hoc сравнения. Регресионният и post hoc анализите бяха извършени в R language and environment for statistical computing and graphing v. 4.3.0 и с помощта на библиотеките tidyverse, MASS, car, emmeans. Вероятността за допускане на статистическа грешка от първи тип (**p**) за всички статистически показатели е изчислена и представена като точна цифра. За статистическа значимост беше подбран праг на вероятност за статистическа грешка от първи тип $p \leq 0.05$.

2.2. Описание на методите по изпълнението на Изследване 2: Създаване на методика за генериране, изработване и използване в клинични условия на пациент-специфични персонализирани модели за предоперативно планиране на сложни ортопедични операции в областта на таза и изследване на клиничната им ефикасност

Ретроспективно кохортно проучване, първо ниво, беше проведено от септември 2018 до декември 2021 г. в Катедрата по ортопедия и травматология към МУ – Варна. В проучването бяха включени пациенти с комплексни ацетабуларни фрактури, разделени на две групи: (1) Конвенционална група, състояща се от 10 мъже и 2 жени, и (2) планирана с 3D принтиране група, състояща се от 9 мъже и 1 жена. Пациентите от втора група бяха планирани за операция чрез модели, произведени по описаната методика за сегментация и 3D принтиране. Фрактурите на пациентите бяха класирани по класификацията на Judet-Letournel, базирана на стандартни радиографии и КТ томографии. Двете групи включваха пациенти с ацетабуларни фрактури тип задна колона – задна стена, напречна фрактура – задна стена двуколонни фрактури. Пациенти с прости фрактури и такива с време между фрактурата и операцията, по-дълго от 2 седмици, не бяха включени.

За проучването бяха генерирани 3D модели от КТ сканирания с дебелина на среза от 1.0 до 1.5 мм. Датасетовите бяха предадени в DICOM формат, включващи серии с прозорци за кости и меки тъкани. Всички воксели със стойности на HE от 150 или повече бяха сегментирани чрез Slicer 3D и експортирани в STL формат. Моделите бяха допълнително обработени с Autodesk Meshmixer за отстраняване на артефактите и импортирани отново в Slicer 3D за валидиране на тяхната достоверност. След като моделите преминаха успешно методиката за качествен контрол, те бяха подготвени за 3D принтиране. Те бяха изработени на принтер Prusa MK3S с няколко цвята натурална и копринена PLA. Дебелината на слоя беше 0,150 мм, с 15% гироиден инфил, 4 външни периметъра и допълнително разположен подпорен материал за неосигурените структури от моделите. В зависимост от размерите на моделите самото 3D принтиране отне между 48 и 54 ч. за всеки един от тях.



Фиг. 9: Асемблиран 3D принтиран модел на сложна мултифрагментна ацетабуларна фрактура за предхирургично планиране

Така получените предоперативни модели представляваха съвкупност от фрактурни фрагменти в различен цвят. След сглобяването им те предоставиха 360° визуализация върху размера и структурата на таза на пациентите, позволявайки по този начин ясно определяне на типа на фрактурата, формата и разположението на фрагментите. Беше определен алгоритъмът за постигане на оптималната фрактурна редукция и нуждата от използването на специализирани инструменти по време на операцията. Беше извършено предоперативно контуриране на имплантите, селекция на оптимална конфигурация от плаки, избор на оптимална дължина на болтовете и тяхната посока на въвеждане в костта. Интраоперативно нуждата от допълнително наместване на имплантите беше минимална.



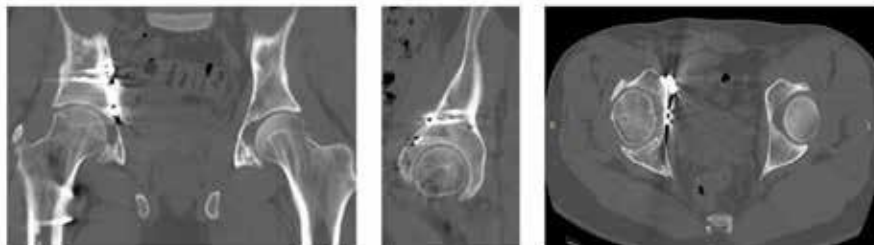
Фиг. 10: Валидиране на алгоритъма за постигане на оптималната фрактурна редукция и нуждата от използването на специализирани инструменти по време на операцията

В зависимост от типа на фрактурата и в двете групи бяха използвани като хирургични достъпи преден интрапелвичен модифициран достъп по Stoppa (в някои случаи с добавяне на латерален прозорец чрез илиоингвинален достъп) и заден достъп по Kocher–Langenbeck. Интраоперативно, фрактурната редукция беше оценена рентгенографски чрез предно-задна и коса проекция по Judet. Беше извършено следоперативно КТ сканиране за оценяване на ставната структура и позицията на плаките и болтовете.



Фиг. 11: Селекция на плака и контуриране на имплантите

Анатомичната редукция на фрактурата се смяташе за постигната, когато артикуларната повърхност беше възстановена с точност до 2 мм. Бяха използвани 3,5 мм титаниеви пелвични плаки в комбинация с $\frac{1}{3}$ тубуларни титаниеви плаки (DePuy Synthes, Zuchwil, Switzerland). При няколко пациенти с особено тежки увреждания на квадрилатералната повърхност беше използвана специално проектирана Омега плака (Medin, Nové Město, Czech Republic).



Фиг. 12: Постоперативно КТ сканиране за определяне на анатомичната редукция на фрактурата и валидиране на правилното позициониране на имплантите

Между изследваните групи бяха сравнявани следните характеристики:

- Качество на редукцията – добра (по-малко или равно на 2 мм изместване) и задоволителна (повече от 2 мм изместване).
- Функционално оценяване – модифицирана скала на Merle d'Aubigne–Postel.
- Оперативно време.
- Кръвозагуба.

- Брой интраоперативни рентгенографии.
- Усложнения.

Беше извършен статистически анализ на получените резултати и бяха определени средно отклонение, медиана и диапазон, както и бяха извършени Mann–Whitney, Wilcoxon Signed-Rank, и Chi Square тестове за определяне на значителни статистически разлики между изследваните групи. Статистическият анализ беше извършен при интервал на доверителност от 95%.

2.3. Описание на методите по изпълнението на Изследване 3: Създаване на биомасило за екструдирало 3D принтиране на матрици, които пресъздават биологичните, хистологични и рентгенологични свойства на костта като тъкан

2.3.1. Описание на експериментите

Целта на Изследване 3 е създаването на рецепта за биомасило за екструдирало 3D принтиране, което притежава повишен остеогенен потенциал, може да се оформя чрез 3D печат в сложни триизмерни обекти, в състояние е да премине в стабилен обект чрез йонна полимеризация, може да се оцветява със стандартни хистологични протоколи и притежава рентгенологични свойства, сходни с тези на костната тъкан. Основата на рецептата е композитен хидрогел, съдържащ два полизахарида (алгинат и метилцелулоза) и наносиликатна глина (лапонит). За изпълнение на тази цел бяха изпълнени няколко задачи, заложи в експеримента. Първо беше определена контролна рецепта, чрез която да се определят основните свойства на гела и която да се използва с референтна цел в процеса на оптимизиране на физико-химичните му свойства. С основната рецепта бяха извършени проби за полимеризация, оцветяване и 3D принтиране, които в следващите етапи от експеримента да служат за референтни цели. След това беше създадена рецепта, която да задоволява физико-химичните и полимеризационни изисквания на биомасилото. С получената рецепта бяха 3D принтирани серия от триизмерни обекти с висока пространствена сложност, необходима за изработването на триизмерни тъканни матрици. Получените матрици бяха сканирани с

клиничен КТ и дентален КЛКТ, след което бяха определени рентгенологичните му свойства. Накрая от тях бяха изготвени хистологични препарати, оцветени със стандартни протоколи.

2.3.2. Рецепта за хидрогел

2.3.2.1. Основна рецепта (Модификация 1):

Използвана е рецепта, съдържаща натриев алгинат, метилцелулоза и лапонит по методика на Ahlfeld et al. Рецептата съдържа 3w/v% от всяко съединение, разтворени в дейонизирана вода. За синтезирането на 10 ml хидрогел (едно зареждане на модулаторното устройство на 3D принтера) бяха използвани:

- 0,3 г Alginic acid sodium salt from brown algae, middle viscosity, Sigma-Aldrich
- 0,3 г Methyl Cellulose, viscosity 4,000cP, 2 % in H₂O(20 C)(lit.); Sigma-Aldrich
- 0,3 г Laponite RD; БУК
- 10 мл дейонизирана вода CHROMASOLV™ Plus, for HPLC; Honeywell

Използваните реактиви алгинат, метилцелулоза и лапонит са в прахообразен вид. Бяха претеглени съответните количества и поставени заедно в контейнер. За постигане на оптимално разтваряне на съставките на хидрогела беше използвано накапване с абсолютен алкохол чрез гутатор до получаване на каша и след това разбъркване в дестилирана вода чрез хомогенизатор за 10 мин до разсейване на преципитатите и получаването на бистър, тиксотропен хидрогел. След разбъркването полученият хидрогел беше съхраняван за 24 часа при 4°C и зареден в спринцовки от 10 ml. Въздушните мехури в хидрогела бяха елиминирани чрез центрофугиране на 3000 rpm за 1 мин.

2.3.2.2. Модификации на основната рецепта

Поради незадоволителните качества на Модификация 1 и ниската точност на обектите, принтирани с нея, беше изготвена нова модификация с повишена концентрация на основните съставки.

Табл. 2: Обемни части на основните съставки в изследваните рецепти

	Алгинат w/v%	Метилцелулоза w/v%	Лапонит w/v%
--	--------------	--------------------	--------------

Модификация 1	3	3	3
Модификация 2	5	5	6

2.3.2.3. Подобряване на йонната полимеризация (крослинкинг) на основната рецепта

От основната рецепта бяха изготвени три модификации, като към основните компоненти на рецептата бяха добавени Na_2SO_4 , цитрат и NaH_2PO_4 . Посочените адитиви имат за цел да променят температурата за оптимална полимеризация от 60 на 36°C и да ускорят настъпването ѝ.

- Модификация 1.1: Основна рецепта плюс 0,322 г Na_2SO_4 , 0,0045 г NaH_2PO_4 и 0,009 г натриев цитрат.
- Модификация 1.2: Основна рецепта плюс 0,322 г Na_2SO_4
- Модификация 1.3: Основна рецепта плюс 0,0045 г NaH_2PO_4 и 0,009 г натриев цитрат.

Табл. 3: Допълнителни съставки в модификациите на основната рецепта за подобряване на йонната полимеризация

	Na_2SO_4 0,322 г	NaH_2PO_4 0,0045 г	Na цитрат 0,009 г
Модификация 1.0	–	–	–
Модификация 1.1	+	+	+
Модификация 1.2	+	–	–
Модификация 1.3	–	+	+

Посочените адитиви за всяка модификация бяха разтворени в 10 мл дейонизирана вода и разбъркана за 2 мин при 36°C с магнитна бъркалка.

Полученият разтвор беше използван за приготвяне на хидрогел по аналогичен на Модификация 1.0 начин. След синтезирането на 10 мл хидрогел по всяка модификация бяха заредени 10 мл спринцовки.

За допълнителната полимеризация (крослинкинг) на използвания в експеримента хидрогел беше използвана йонна полимеризация с Ca^{2+} йонни чрез потапяне в разтвор на CaCl_2 с концентрация 100 mmol/l за

20 мин. Посоченият разтвор беше синтезиран чрез разтваряне на 1.1 гр. CaCl_2 в 100 ml дейонизирана вода за 2 мин. чрез разбъркване с магнитна бъркалка при 36°C.

Получените по четирите модификации хидрогелове бяха екструдирани чрез 10 ml спринцовка в четириъгълни формички, които бяха означени като M1.0, M1.1, M1.2 и M1.3. Формичките с хидрогел бяха потопени в контейнер, съдържащ разтвор на CaCl_2 . Контейнерът беше инкубиран в термостат при 36°C за 20 мин. След това формичките бяха отстранени от контейнера с разтвор, бяха прехвърлени във влажна камера и оставени за 24 часа в термостат при 36°C.

След завършване на процеса на полимеризация блокчетата от хидрогел във формичките бяха изследвани чрез механичен натиск за определяне на рецептата с оптимална полимеризация.

2.3.3. 3D принтиране на хидрогел

За експеримента беше използван 3D принтер Hyrel 3D Hydra 16A, оборудван с модулarna глава SDS10. Принтерът е със стабилен coreXY дизайн, линейни оси и може да бъде оборудван да работи едновременно с до 10 различни модулари устройства. Машината разполага с енкложър, който осигурява постоянни условия на средата. Модулarnата глава SDS10 представлява инжекционен екструдер, който е оборудван с 10 ml спринцовка. Хидрогелът се зарежда в спринцовката, след което започва да се упражнява контролиран натиск върху буталото ѝ, в резултат на което материалът се екструдира през нейната игла. Диаметърът на иглата и силата, упражнявана върху буталото на спринцовката, определят количеството и скоростта на екстудирание на хидрогел, който съответно се нанася слой по слой във петри паничка, поставена върху работната основа на 3D принтера. Принтираният слой може да бъде подложен на допълнителна обработка (йонна или фотополимеризация) по време на принтирането (чрез накапване/осветяване) или след завършването му.



Фиг. 13: 3D принтер Hyrel 3D Hydra 16A, използван в изследването

- За тази част от експеримента беше използван хидрогел, получен по Модификация 1 и 2, заредени в 10 мл спринцовки и монтирани върху SDS10 инжекционен екструдер.
- Първоначално беше тествано екструдирането на филament през монтирана плоска игла с диаметър 0,5 мм. Беше наблюдавана скоростта и равномерността на екстудиране, наличието на смущения (свръх екстудиране/недостатъчно екстудиране) и спонтанно изтичане на хидрогел от иглата.
- Беше определена система за отвеждане на модуларната глава в центъра на петри паничка чрез редактиране на g-code в софтуера на машината, Repatrel.
- 3D моделите за Тест 1 бяха генерирани чрез Autodesk Meshmixer.
- 3D моделите за Тест 2 и 3 бяха генерирани чрез Autodesk Fusion 360.

Тест 1: Прости геометрични фигури

- Калибрационни квадрати: Бяха изработени четири калибрационни квадрата с височина 1 мм и стени съответно 40, 30, 22 и 10 мм. От всеки един от тях беше принтиран 1 слой. Бяха измерени размерите на страните им и качеството на

изработването им. Полученият модел беше изграден с хидрогел по Модификация 1.

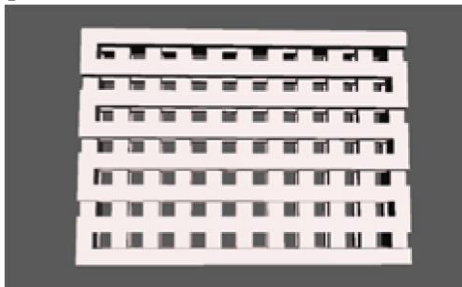
- Калибрационен куб и калибрационен цилиндър: Бяха подготвени тестови 3D модели, представляващи куб със стени $20 \times 20 \times 20$ мм и цилиндър с диаметър 20 мм и височина 20 мм. Получените модели бяха изградени с хидрогел по Модификация 1.

Тест 2: Четириъгълен скафолд

Беше подготвен модел на скафолд с размери $42 \times 30 \times 8$ mm, съдържащ кръстосващи се периметри с ширина 2 мм и височина 2 мм, образуващи квадратна мрежа с размер на порите от 2×2 мм. Същият модел беше изграден и с размери $42 \times 30 \times 4$ мм чрез намаляване на височината от 8 на 4 мм. Получените два модела бяха генерирани с Autodesk Fusion360 и принтирани с хидрогел по Модификация 2.

Първият модел беше принтиран два пъти и готовите обекти бяха означени като Матрица 1 и Матрица 4.

Вторият модел беше принтиран веднъж и готовият обект беше означен като Матрица 2.

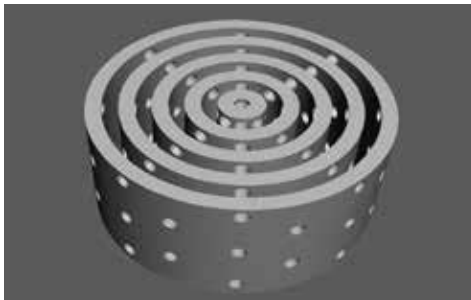


Фиг. 14: 3D модел на четириъгълен скафолд

Тест 3: Модел на Хаверзова система

Беше подготвен модел на остеон (Хаверзова система), състоящ се от централен канал с диаметър 1.5 мм, представляващ Хаверзовия канал, около който бяха разположени пет концентрично разположени пластинки, представляващи ламините с дебелина 1.5 мм и разстояния между тях 1.5 мм. Бяха разположени радиално разположени канали,

представляващи Волкмановите канали с диаметър 1.5 мм, които започваха от централния и преминаваха през концентричните пластини, достигайки външността на структурата. Получената структура беше с цилиндрична форма, диаметър 28.5 мм и височина 10 мм. Полученият модел беше генериран с Autodesk Fusion360 и принтиран с хидрогел по Модификация 2. Готовият обект беше означен като Матрица 3.



Фиг. 15: 3D модел на Хаверцова система

За тестовете бяха използвани следните параметри за 3D принтиране:

- Дебелина на слоя: 0.5 мм за Тест 1, 2 и 3; 0.4 за Тест 4 и 5
- Дебелина на екструдираната нишка: 0.8 мм
- Дебелина на иглата: 0.838 мм (18G).
- Скорост: 10 мм/с за Тест 1 и 2; 5 мм/с за Тест 3, 4 и 5
- Брой периметри: 4
- За генериране на g-code беше използван Slic3r за всички тестове

3D принтираните модели, използвани впоследствие за рентгенологично сканиране и хистологични препарати, са следните:

Табл. 4: 3D принтирани обекти, използвани за хистологичен и рентгенологичен анализ

	тип на модела	размери	хидрогел
Матрица 1	Четириъгълен скафолд	42×30×8 мм	Модификация 2
Матрица 2	Четириъгълен скафолд	42×30×4 мм	Модификация 2
Матрица 3	Хаверцова система	28.5×10 мм	Модификация 2

Матрица 4	Четириъгълен скафолд	42×30×8 мм	Модификация 2
-----------	----------------------	------------	---------------

2.3.4. Фиксиране, нарязване и изготвяне на хистологични препарати

За изпълнението на тази част от експеримента беше използван хидрогел, получен по Модификация 1.2 и Модификация 2, които бяха полимеризирани при различна температура и за различно време в опит за дефиниране на оптималните параметри за работа с хидрогела.

Модификация 1.2: Бяха синтезирани 10 мл хидрогел по съответната методика, след което бяха заредени в 10 мл спринцовка и екструдирани в хистологично блокче. Полученото блокче беше полимеризирано при 36°C в термостат за 20 мин в разтвор на CaCl₂ с концентрация 100 mmol/l. След полимеризирането блокчето престоя за 24 часа при 36°C. След завършване на полимеризацията пробата беше отстранена от блокчето, замразена в криостат при -20°C и нарязания с микротом на срезове с дебелина 15 микрона. От тях бяха изготвени хистологични препарати, които бяха оцветени с Hemalaun-Eosin и Cresyl violet.



Фиг. 16: Полимеризиране на блокче в разтвор на CaCl₂

Модификация 2: Бяха синтезирани 10 мл хидрогел по съответната методика, след което бяха заредени в 10 мл спринцовка и 3D принтирано като Тестов модел 5. Получената матрица беше полимеризирана при стайна температура за 10 мин в разтвор на CaCl₂ с концентрация 100 mmol/l. След полимеризирането блокчето престоя за 24 часа при 4°C.

След завършване на полимеризацията от намиращия се във формичките хидрогел беше замразен в криостат при -20°C и нарязан с микротом на срезове с дебелина 15 микрона. От тях бяха изготвени 7 хистологични препарата, които бяха фиксирани чрез накапване с формалин в хоризонтална позиция, за да се избегне прекомерна екстракция на гела. Последващите оцветявания също бяха извършени чрез накапване в хоризонтална позиция. След фиксирането на препаратите бяха използвани следните протоколи:

Стандартен протокол за Hemalaun-Eosin:

- Рехидратация в дестилирана вода за 10 мин.
- Оцветяване в Hemalaun за 5 мин.
- Фиксация и посиняване на оцветяването с Hemalaun в обикновена вода.
- Оцветяване с Eosin.
- Дехидратация, почистване с ксилол и покриване. Оцветяване с Cresyl violet:
- Рехидратация в дестилирана вода за 10 мин.
- Оцветяване за 1 до 5 мин в 0.5% разтвор на крезил виолет.
- Диференциация в 1.5% оцетна киселина и 90% етанол.
- Дехидратация, почистване с Ксилол и покриване.

Diff Quik е комерсиален вариант на оцветяването по Wright.

- В нашия експеримент ние пропуснахме първата стъпка: фиксиране с метанол.
- Рехидратация в дестилирана вода за 10 мин.
- Оцветяване с буфериран разтвор на Methylene blue и Azure A (оцветяване за ядра).
- Оцветяване с буфериран Eosin Y (контрастно оцветяване).
- Дехидратация, почистване с ксилол и покриване на препаратите.

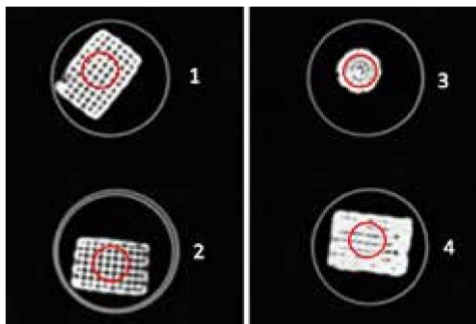
2.3.5. КТ сканиране на 3D принтирани матрици, изработени с хидрогел

За изследването на 3D принтираните матрици ние използвахме Матрица 1, 2, 3 и 4, които бяха сканирани при следните параметри:

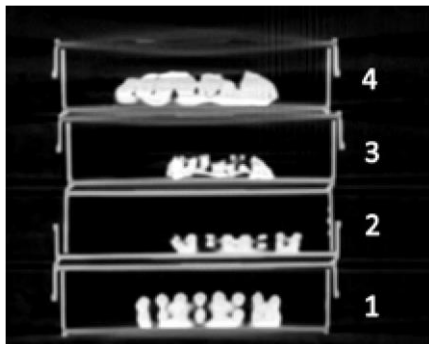
- Сканиране с компютърен томограф Siemens SOMATOM Force, дебелина на срежите от 0.5 мм, енергия 140 kVp и размер на вокселите $0.5 \times 0.5 \times 0.5$ мм.

- Сканиране с дентален Конично-лъчев компютърен томограф, дебелина на срезите 0.2 мм, енергия 96 kVp и размер на вокселите 0.2×0.2×0.2 мм.
- По време на сканирането принтираните матрици бяха разположени в контейнери от PMMA за редуциране на артефактите при сканирането им.
- За сравнение на рентгенологичните качества на хидрогела беше използван сух човешки калканеус, който беше сканиран с компютърен томограф Siemens SOMATOM Force, дебелина на срезите от 1 мм, енергия 120 kVp, размер на вокселите от 0.24×0.24×1 мм.

Получените датасетове бяха експортирани в DICOM формат и рентгенологичният им анализ беше извършен с Fiji [31]. От сканираните матрици бяха подбрани еднакви по размер, кръгли региони на интерес (ROI), след което бяха извършени измервания на стойностите на вокселите в Хаунсфийлдови единици (ХЕ) в три последователни среза за всеки от изследваните обекти. Бяха определени средните стойности на ХЕ с минимум, максимум и стандартно отклонение.



Фиг. 17: Срезове от сканираните с КТ тестови обекти Матрица 1, 2, 3 и 4. В тях са разположени ROI (региони на интерес), които бяха използвани за измерване на стойностите на вокселите в HU



Фиг. 18: Срезове от сканираните с КЛКТ тестови обекти
Матрица 1, 2, 3 и 4

От човешкия калканеус беше избран в коронарната равнина регион, разположен близо до кубиталната ставна повърхност с цел да се избегне триъгълникът на Ward (зона в калканеуса с ниска плътност на костното вещество, разположени между основните трабекуларни снопове). Беше определен ROI в трабекуларната кост със същите размери като при матриците и бяха извършени измервания на HE в три последователни среза с определяне на средни, минимални и максимални стойности на HE, както и статистическото отклонение.



Фиг. 19: Изображение на изследвания калканеус (дясно) и срез, получен при неговото КТ сканиране, заедно с ROI, използван за измерване на стойностите на вокселите в HU. Регионът на интерес беше поставен в предната част на петната кост, далече от триъгълника на Ward, в който се наблюдава ниска плътност на костните гредички. Получените стойности бяха визуализирани с графики

2.4. Описание на методите по изпълнението на Изследване 4: Създаване на физически антропоморфен образен фантом

чрез VbV методика за триизмерен печат и анализиране на неговата рентгенологична достоверност

2.4.1. Описание на експериментите: За експериментите беше използван КТ датасет, получен при сканирането на три сухи човешки раменни кости

А) (VbV) FDM 3D принтиране с тъкан-еквивалентни материали по иновативна методика, използваща експериментален генератор на g-code и модифициран FDM 3D принтер.

Изработване на физически образен фантом от проксималната епифиза на Хумерус 2 от тъкан-еквивалентни материали по две методики:

- Методика 1: Фантом, изработен с един материал – композит PLA + 50% теракота.
- Методика 2: Фантом, изработен с два материала – композит PLA + 50% теракота и чист PLA.

Б) Определяне на разпределението на Хаунсфийлдовите единици в различните участъци на фантома и сравняването му с това при обекта-първоизточник чрез специализиран софтуер за радиометричен анализ.

- КТ сканиране на получените фантоми при същите параметри на сканиране като естествените кости.
- Подбор на приблизително съответстващи си изображения от датасета, получен при сканирането на натуралните кости, фантома от Методика 1 и от Методика 2.
- Разделяне на получените изображения на 150 региона на интерес за всяко от трите изображения и определяне на средна, максимална и минимална стойност на Хаунсфийлдовите единици (HE), както и стандартно отклонение за всеки регион чрез софтуер за радиомичен анализ.
- Изготвяне на линеен профил през средата на обекта в изображението за всеки един от трите случая. Трите профила са комбинирани в една графика, демонстрираща приликите и разликите в стойностите на HE за трите обекта.

2.4.2. Voxel by Voxel (VbV) 3D принтиране

При нормални условия FDM 3D принтирането използва разтопена полимерна нишка, която се екструдира с постоянна скорост и количество, изграждайки по този начин физически обект с предварително зададена плътност и структура на пълнещия материал (infill). По този начин се упражнява ограничен контрол върху вътрешните параметри на получения обект, което е недостатъчно за получаването на качествен и функционален физически образен фантом. Съществува вариация на FDM 3D принтирането, наречена Voxel by Voxel (воксел по воксел, VbV) метод, при която КТ датасет се преобразува във физически обект, като във всяка точка на изграждания обект се екструдира различно количество полимер, което се определя от стойностите на HE в отделните воксели на образното изследване. Полученият обект има разпределение на плътността в отделните си участъци, което отговаря на това при обекта-първоизточник. Ако бъде изработен с тъкан-еквивалентни материали, то той ще симулира както физическите, така и радиологичните свойства на първоизточника. Тази технология е разработена от Никифорос Окалидис, изследовател към МУ-Варна и създател на стартап, наречен Морфе.



Фиг. 20: Модифициран Morphe 3D принтер

За изработването на изследваните обекти беше използван модифициран 3D принтер Geeentech Volcano хотенд, медно охлаждащо блокче и усилен (high torque) екструдер с два стъпкови мотора и съотношение на подаващите зъбчати колела от 3:1. Посочените модификации бяха нужни поради характеристиката на един от използваните материали – композит с високо процентно съдържание на

инертни вещества, което го прави изключително труден за принтиране със стандартен FDM 3D принтер.



Фиг. 21: Morphe 3D принтер в процес на модификация
2.4.3. Материали

За изследването бяха използвани два вида материали:

- Композит PLA + 50% гравиметрични теракотни частици (Formfutura StoneFil™ Terracotta filament, диаметър на нишката 1,75 mm).
- PLA (Formfutura EasyFil PLA, диаметър на нишката 1,75 mm).

Материал 1 представлява композит с високо процентно съдържание на инертни вещества, което го прави изключително труден за принтиране със стандартен FDM 3D принтер, което наложи модификациите на използвания в експеримента. В комбинация тези материали имат електронна плътност и коефициент на затихване на рентгеновите лъчи, много близък до този на костта, поради което бяха избрани за експеримента като тъкан-еквивалентни материали. Материал 1 беше под формата на ригидна и силно чуплива нишка с диаметър 1,75 мм, завита около картонена ролка с тегло 500 гр. Работата с него изисква повишено внимание поради риска от счупване на нишката и нужда от повторно зареждане. Ако подобен инцидент остане незабелязан, той може да доведе до провалено принтиране, което обикновено трае 8 и повече часа.

Материал 2 съдържа 100% полимлечна киселина и е синтезиран по специална формула, която позволява улеснено и плавно принтиране, както и добра адхезия между отделните слоеве. Този материал има за цел да компенсира трудностите, свързани с материал 1, както и да намали стойностите на HE до нива, близки до физиологичните.

2.4.4. Софтуер за 3D принтиране

Беше използван специализиран, Matlab базиран софтуер, позволяващ конвертиране на стойностите от определен воксел от датасет (Хаунсфийлдови единици или стойности на Сивата скала) в определено количество екструдирани материал, депозирано в определени координати в работното поле на принтера. По този начин воксели, които имат ниски стойности, ще бъдат принтирани с малко количество материал, а такива с високи стойности – с по-голямо. Като резултат се получава обект, чиито радиометрични показатели наподобяват тези на оригинално сканирания. За изработването на фантомите бяха подбрани 156 последователни среза от проксималната епифиза на Хумерус 2, сканиран по време на изпълнението на Изследване 1. Изображенията бяха заредени в софтуера и бяха зададени параметри, позволяващи преобразуването на вокселните стойности, изразени в стойности на Сивата скала.

2.4.5. 3D принтиране на фантомите

При изработването на фантома по Методика 1 беше използван един вид филament – полимлечна киселина с 50% съдържание на гравиметрични (с еднаква големина) теракотни частици под формата на композит. Посоченият материал (кремаво-червеникава ригидна нишка), беше зареден в екструдера на принтера и екструдирани през дюзата на работната глава. След това беше започнато и самото принтиране, което продължи осем часа, под непрекъснат надзор. През това време нишката се счупи три пъти, което наложи повторното ѝ зареждане в екструдера.



Фиг. 22: Изработване на фантом по Методика 1

Изпълнението на Методика 2 беше значително по-сложно, тъй като тя включва едновременното използване на два вида материал – този от Методика 1, съчетан с филament, съдържащ 100% полимлечна киселина. Съчетанието от материали е изключително трудно за работа, което прави изпълнението на Методика 2 сложно и с висок риск от провал. Посочените материали се зареждат в два отделни екструдера, които задвижват нишката към работната глава. Там последователно се принтират двата материала – полага се един слой от Материал 1 и върху него още един слой от Материал 2. Най-рисков е моментът на смяна на материалите, когато се случват повечето инциденти. Принтирането по тази методика е значително по-продължително и под постоянен надзор. Изработването на фантома отне 12 часа и бе придружено от множество счупвания на нишката с последващо повторно зареждане.



Фиг. 23: Изработване на фантом по Методика 2

2.4.6. КТ сканиране на фантомите

Получените по Методика 1 и 2 фантоми бяха сканирани с КТ скенер SOMATOM Force в МБАЛ „Св. Марина“ – гр. Варна. Използван беше протокол ThoraxStandart с дебелина на срезове 0,5 мм, отстояние между срезове 0,5 мм и 120 kVp. Изследването беше експортирано като DICOM датасет с размер на вокселите от 0,51×0,51×050 мм. По този начин бяха получени три датасета:

Натурални кости (получен при изпълнението на Изследване 1).

Фантом по Методика 1.

Фантом по Методика 2.

Посочените датасетове бяха използвани в следващите стъпки от експеримента.



Фиг. 24: КТ Сканиране на фантом по Методика 1

2.4.7. *Анализиране на получените данни*

За анализиране на трите датасета беше използван специализиран софтуер, разработен от екипа на доц. Кристина Близнакова, който е базиран на MATLAB и позволява зареждане на медицински и симулирани изображения с последващ избор на региони на интерес за анализ и сравнение. Софтуерът позволява полуавтоматична сегментация на зарежданите изображения и автоматизирано определяне на 23 числени и качествени радиомични показателя с минимални, максимални и средни стойности.

За изследването беше подбран по един съответстващ си слайс от оригиналната кост, от фантома по Методика 1 и от фантома по Методика 2. Бяха извършени два вида анализ:

- При първия анализ бяха разположени припокриващи се с 20% региони на интерес върху обекта в слайса (по около 150 региона на интерес за всеки от трите обекта) и за всеки един от тях бяха определени средната, максимална и минимална стойност (изразени в HE) за всеки регион, както и стандартно отклонение. На базата на получените средни стойности бяха направени хистограми, демонстриращи разпределението на стойностите.
- При втория анализ беше направен линеен профил през средата на обекта в изображението за всеки един от трите обекта. Трите профила бяха комбинирани в една графика, демонстрираща

ясно приликите и разликите в стойностите на HE за трите обекта.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛТАТИ

3.1. Резултати за Изследване 1: Създаване на методика за генериране, изработване, валидация и качествен контрол на изградени чрез триизмерен печат модели, които да отразяват с висока точност и прецизност пространствените свойства на костта като орган

Създаването и триизмерното печатане на анатомични костни модели с висока морфологична достоверност е от изключително значение за голяма част от научните терапевтични приложения на медицинското 3D принтиране. Точността и прецизността на изработка е основен въпрос при изработката на редица медицински устройства като антропоморфни фантоми, модели за предоперативно планиране, персонализирани медицински устройства и импланти. Грешката при създаването на модели чрез сканиране, сегментация, моделиране и 3D принтиране е кумулативна и зависи от всички етапи от работния процес, поради което познаването на тези стъпки и тяхната оптимизация е важен въпрос за съвременната бионаука. Без надеждна процедура за валидация и качествен контрол възникват редица рискове, свързани с ефикасността на използваните модели, използването на които може да доведе до нежелани ефекти вместо желаните положителни. Разработената от мен методика за генериране и изработване на изградени чрез триизмерен печат анатомични модели е в състояние да постигне много добра точност, която беше изследвана и валидирана чрез кадавърно проучване – златния стандарт в дигиталната антропометрия. Резултатите от Изследване 2, което беше изпълнено със същия работен процес като клиничен proof of concept експеримент, който демонстрира високата пространствена точност и добрата клинична ефективност на тази лесна, достъпна и евтина методика. Базирана на софтуер с отворен достъп, нисък клас 3D принтери и евтини материали, тя дава мощен инструмент в ръцете на морфолозите, рентгенолозите и клиничните анатоми за изучаването и терапията на костта като макроскопски орган. Водещо при тази технология е нивото

на компетентност на използващите я – за разлика от популярните комерсиални D2P (DICOM to print) програми, които са базирани на автоматизирани deep learning алгоритми, за ефективността на представената методика е нужна значителна компетентност в редица технически и биологични науки. Високата цена на комерсиалните програми обаче поставя бариера пред редица изследователи, ограничени във финансово отношение, тъй като самият софтуер и работният процес, който се извършва с него, се класифицира като медицинско устройство и е необходимо да бъде тестван и сертифициран съгласно европейското законодателство, което води и до високата му цена.

За изпълнението на това изследване беше нужно изграждането на методики за:

- Сегментиране на КТ датасетове.
- Тяхното преобразуване в дигитални 3D модели.
- Изграждането им като физически обекти чрез триизмерен печат.
- Методика за качествен контрол, който да докаже тяхната точност.

Тези отделни методики са част от цялостен работен процес, чиято точност и достоверност е представена и валидирана в тази глава.

3.1.1. Дефиниране на методика за генериране на модели, базирана на софтуер с отворен достъп

Методиката за изграждането на 3D модели е базирана на софтуер с отворен достъп (Slicer 3D, Autodesk Meshmixer, Prusa Slicer), който се оказва достатъчно точен и лесен за използване, за да позволи изграждането на продукт, който е съизмерим по качество с този, произведен с професионален, комерсиален софтуер. Правилното ѝ приложение изисква притежаването на известен опит, който може да бъде натрупан чрез целенасочено обучение. Методиката е базирана на полуавтоматичната сегментация – процес, който до голяма степен е управляван от медицинския специалист и изисква правилното използване на няколко различни програми, всяка от които с различни инструменти за обработка. Необходимо е целият процес да бъде повторен многократно, докато моделите натрупа достатъчно опит, за да постигне качество, съизмеримо с професионалните програми.

Поради всичко това, на този етап не е възможно сертифицирането на програмите с отворен код за професионалното производство на медицински изделия, тъй като възможностите на софтуера не струват нищо без експертизата на ползващия го.

3.1.2. Определяне на общите статистически индикатори

Данните от морфологичните измервания на костите, 3D принтираните модели и датасета бяха въведени в таблица. След това бяха изчислени изследваните статистически показатели при интервал на доверителност от 95%.

Средното отклонение (AB) между дистанциите върху натуралните кости и тези, измерени чрез Обемна реконструкция (VR), беше -3.24 ± 1.13 mm. **Нормализираната разлика (WB)** беше -24.35 ± 9.1 $\mu\text{m}/\text{mm}$, а **Нормализираната абсолютна грешка (WAE)** беше 25.93 ± 8.85 $\mu\text{m}/\text{mm}$. Точното използване на измервателните инструменти, налични в модула за Обемна реконструкция, изискват значителен опит в рентгенологията, поради което в клинични условия се извършват от специалистите по образна диагностика. Този тип измервания са свързани със значителна грешка, която се дължи на ъгъла между измервания обект и полето на наблюдение, управлявано от оценителя. За да повишат своята точност, рентгенолозите извършват измерванията в двуизмерните равнини, а модульта за Обемна реконструкция служи за бързо демонстриране на анатомичните особености на пациента и за потвърждаване на получените чрез 2D измервания резултати чрез сравняване на стойностите от 3D.

Средното отклонение (AB) между дистанциите върху натуралните кости и тези, измерени върху 3D принтирания модел без термална компенсация (3D-), беше 0.11 ± 0.27 mm. **Нормализираната разлика (WB)** беше -1.89 ± 4.68 $\mu\text{m}/\text{mm}$, а **Нормализираната абсолютна грешка (WAE)** беше 7.85 ± 4.35 $\mu\text{m}/\text{mm}$.

Средното отклонение (AB) между дистанциите върху натуралните кости и тези, измерени върху 3D принтирания модел с термална компенсация (3D+), беше 0.19 ± 0.28 mm. **Нормализираната разлика (WB)** беше -1.61 ± 4.98 $\mu\text{m}/\text{mm}$, а **Нормализираната абсолютна грешка (WAE)** беше 8 ± 4.65 $\mu\text{m}/\text{mm}$.



Фиг. 25: Стойности на АВ при VR, 3D– и 3D+.



Фиг. 26: Стойности на WB при VR, 3D– и 3D+



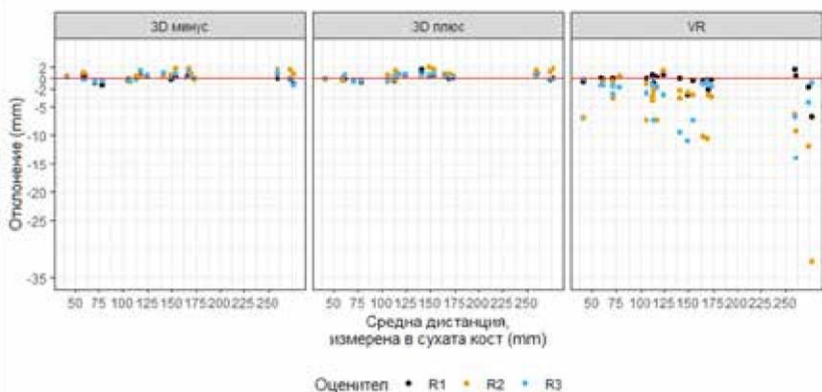
Фиг. 27: Стойности на WAE при VR, 3D– и 3D+ Табл. 5:
Стойности на АВ, WB и WAE при VR, 3D– и 3D+

	VR	3D-	3D+

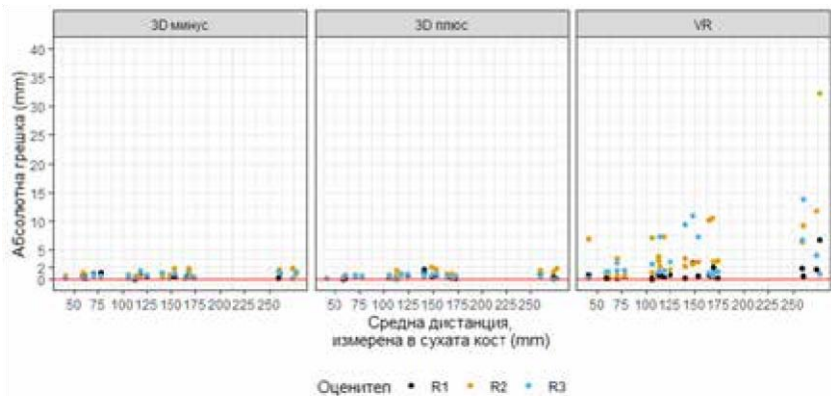
Средна разлика (AB)	-3.24±1.13 mm	0,11±0.27 mm	0.19±0.28 mm
Нормализирана разлика (WB)	-24.35±9.1 $\mu\text{m}/\text{mm}$	-1.89±4.68 $\mu\text{m}/\text{mm}$	-1.61±4.98 $\mu\text{m}/\text{mm}$
Нормализирана абсолютна грешка (WAE)	25.93±8.85 $\mu\text{m}/\text{mm}$	7.85±4.35 $\mu\text{m}/\text{mm}$	8±4.65 $\mu\text{m}/\text{mm}$

3.1.3. Анализ върху точността на методите за измерване. 3D принтираните модели са значително по-точен инструмент за морфологични изследвания от Обемната реконструкция

И трите общи статистически показатели показват значително по-висока точност при линейните измервания с шублер, отколкото при VR метода. Тази закономерност се наблюдава при всички оценители – както при Оценители 2 и 3, които са студенти по медицина, така и при Оценител 1, който е с по-висока професионална квалификация.



Фиг. 28: Графика на отклоненията спрямо средните дистанции, измерени върху костта (Диаграма на остатъците). При Метод VR е налице съществена вариабилност в отклоненията спрямо реалната измерена дистанция на костта, и то предимно при Оценители 2 и 3. Червената линия е на нулевото ниво – нормално отклоненията от реалното измерване трябва да са равномерно разпределени от двете страни на нулевата линия



Фиг. 29: Представяне на абсолютната грешка спрямо реалната измерена дистанция на костта. Неточността е съществена само във $VT = R$ и то при оценител 2 и 3

Измерванията с модула за Обемна реконструкция са свързани със значителна грешка, която се дължи на ъгъла между измервания обект и полето на наблюдение, управлявано от оценителя. Поради тази причина в Клиничната рентгенология единствено измерванията, извършени в двуизмерните равнини, се смятат за релевантни, а модулет за Обемна реконструкция служи като инструмент за валидиране на получените в трите класически равнини или чрез мултипланарна реконструкция измервания, както и като демонстративен инструмент за бърза визуализация на анатомичните особености на пациента. Снемането на точни измервания отнема години обучение на рентгенолозите и изисква значителен личен опит и умения.

3.1.4. Анализ върху Оценителите. Опитът и образованието на оценителите е от значение за точността на измерванията

Редуцираният модел с взаимодействие между факторите **Method** и **Rater** най-добре отговаря на наблюдаваните отклонения. За оценка на точността (по оценител, метод и тип дистанция) чрез индивидуалните измервания беше избран чрез критерия AIC следният модел:

Табл. 6: Определяне на модел за изследване чрез показателя AIC

Модел	Y= WB	Y= WAE
Y ~ Method*Rater*Distance	1944.706	1926.222
Y ~ Method + Rater + Distance	1902.313	1876.471
Y ~ Method*Rater	1891.159	1861.712
Y ~ Method + Rater	1927.726	1888.585

Y ~ Method*Rater: Той представлява редуциран модел с изключена дистанция от независимите променливи – относителното отклонение е моделирано само като резултат от самостоятелните ефекти и взаимодействията на Метод и Оценител.

Табл. 7: ANOVA анализ върху взаимодействието между Метод и Оценител за показателя Нормализирана разлика (WB)

Anova Table (Type III tests)				
Response: relative_bias				
	Sum Sq	Df	F value	Pr (> F)
(Intercept)	3	1	0.0097	0.9216
Method	367	3	0.3689	0.7755
Rater	539	2	0.8122	0.4442
Method:Rater	38805	6	19.4782	< 2e-16 ***
Residuals	294851	888		
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1				

ANOVA показва, че единственият фактор, който статистически значимо повлиява показателя Нормализирана разлика, е взаимодействието между Метод и Оценител ($F(6/888) = 19.48$; $p < 2 \cdot 10^{(-16)}$). Казано с други думи, единственият фактор от значение за прецизността на измерванията е доколко правилно всеки отделен Оценител използва метода за измерване.

Конкретните зависимости могат да се изследват, като се разгледат средните относителни отклонения по оценители и метод. Ако

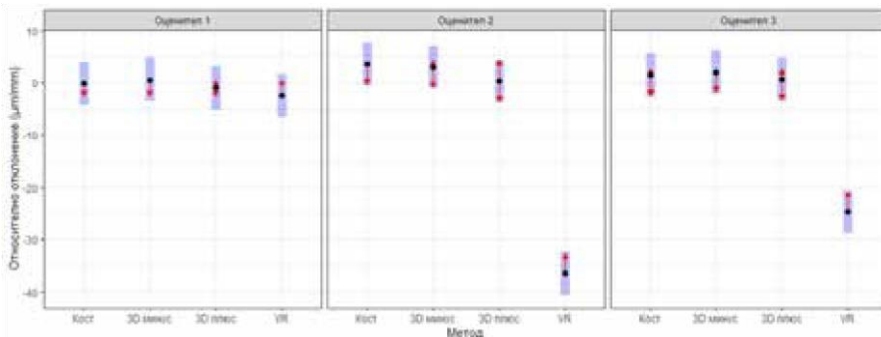
отклонението е статистически значимо различно от 0, това означава, че този оценител системно гречи при измерването, правено върху определен модел на костта (Метод: VR, 3D минус или 3D плюс):

Табл. 8: Средни относителни отклонения по Оценители и Метод за показателя Нормализирана разлика (WB)

Rater = R1:							
Method	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL	t.ratio	p.value
3Dminus	-0.207	2.1	888	-4.337	3.92	-0.098	0.9216
3Dplus	0.534	2.1	888	-3.595	4.66	0.254	0.7996
Bone	-0.960	2.1	888	-5.090	3.17	-0.456	0.6482
VR	-2.457	2.1	888	-6.586	1.67	-1.168	0.2433
Rater = R2:							
Method	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL	t.ratio	p.value
3Dminus	3.574	2.1	888	-0.556	7.70	1.698	0.0898
3Dplus	2.956	2.1	888	-1.174	7.09	1.405	0.1604
Bone	0.306	2.1	888	-3.823	4.44	0.146	0.8842
VR	-36.488	2.1	888	-40.618	-32.36	-17.341	<.0001
Rater = R3:							
Method	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL	t.ratio	p.value
3Dminus	1.425	2.1	888	-2.704	5.55	0.677	0.4983
3Dplus	2.033	2.1	888	-2.097	6.16	0.966	0.3342
Bone	0.654	2.1	888	-3.476	4.78	0.311	0.7561
VR	-24.638	2.1	888	-28.767	-20.51	-11.709	<.0001
Confidence level used: 0.95							

В ANOVA анализа се вижда ясно, че Оценител 2 (R2) и Оценител 3 (R3), които са студенти по медицина, обучени за изследването, системно мерят дистанциите на VR на костта като по-малки, като грешката, която допускат, е от порядъка на $-36.5 \mu\text{m}/\text{mm}$ при R2 ($-40.6 - 32.4 \mu\text{m}/\text{mm}$; $p < 0.001$) и $-24.6 \mu\text{m}/\text{mm}$ при R2 ($-28.8 - -20.5 \mu\text{m}/\text{mm}$;

$p < 0.001$). Оценител 1, който е специалист-анатом с опит в 3D морфометрията, допуска при VR измерванията значително по-малка грешка от $-2.45 \mu\text{m}/\text{mm}$ ($-6.6 - 1.7$; $p = 0.2433$), което се обяснява със значително по-доброто владение на методите, опита в работата с 3D сегментация и 3D принтиране, както и с нивото на образование. Същото си личи и когато изобразим средните отклонения в интервала им на доверителност (Фиг. 30).



Фиг. 30: Изобразяване на средните отклонения в интервала им на доверителност. На фигурата черните точки са средните относителни отклонения, сините колонки обхващат интервалите на доверителност при $p = 0.05$, а червените стрелки указват интервала на доверителност на разликите между различните групи (ако червените стрелки се припокриват, разликата не е значима)

Резултатите за Нормализирана абсолютна грешка са аналогични.

Табл. 9: ANOVA анализ върху взаимодействието между Метод и Оценител за показателя Нормализирана абсолютна грешка (WAE)

Anova Table (Type III tests)				
Response: relative_abs_error				
	Sum Sq	Df	F value	Pr (>F)
(Intercept)	457	1	2.0900	0.1497
Method	36	2	0.0833	0.9201
Rater	55	2	0.1266	0.8811
Method:Rater	7925	4	9.0530	8.871e-07 ***

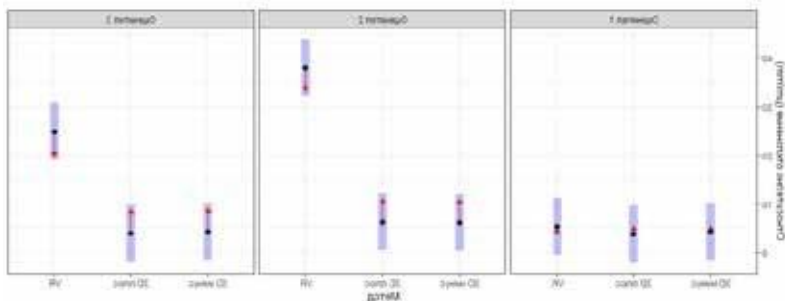
Residuals	47269	216		
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1				

ANOVA показва, че единственият фактор, който статистически значимо повлиява Нормализирана абсолютна грешка, е взаимодействието между Метод и Оценител ($F(4/216) = 9.0530$; $p = 8.871 \cdot 10^{(-7)}$)

Конкретните зависимости могат да се изследват, като се разгледат средните относителни отклонения по оценители и метод. Ако отклонението е статистически значимо различно от 0, това означава, че този оценител системно греша при измерването, правено върху определен модел на костта (Метод: VR, 3D минус или 3D плус).

Табл. 11: Средни относителни отклонения по Оценители и Метод за показателя Нормализирана абсолютна грешка (WAE)

Rater = R1:							
Method	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL	t.ratio	p.value
3Dminus	4.28	2.96	216	-1.554	10.11	1.446	0.1497
3Dplus	3.77	2.96	216	-2.059	9.60	1.275	0.2036
VR	5.44	2.96	216	-0.394	11.27	1.838	0.0675
Rater = R2:							
Method	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL	t.ratio	p.value
3Dminus	6.10	2.96	216	0.268	11.93	2.062	0.0404
3Dplus	6.24	2.96	216	0.406	12.07	2.108	0.0362
VR	38.07	2.96	216	32.234	43.90	12.866	<.0001
Rater = R3:							
Method	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL	t.ratio	p.value
3Dminus	4.28	2.96	216	-1.556	10.11	1.445	0.1498
3Dplus	4.02	2.96	216	-1.814	9.85	1.358	0.1759
VR	24.80	2.96	216	18.972	30.64	8.384	<.0001



Фиг. 31: Изобразяване на средните отклонения в интервала им на доверителност. На фигурата черните точки са средните относителни отклонения, сините колонки обхващат интервалите на доверителност при $p = 0.05$, а червените стрелки указват интервала на доверителност на разликите между различните групи (ако червените стрелки се припокриват, разликата не е значима)

По отношение на взаимоотношенията между Оценител и Метод при отчитане на показателя Нормализираната абсолютна грешка наблюдаваме сходни взаимоотношения – оценител 2 (R2) и оценител 3 (R3) системно мерят дистанциите на VR неточно, като грешката, която допускат е от порядъка на $38.1 \mu\text{m}/\text{mm}$ при R2 ($32.234 - 43.90 \mu\text{m}/\text{mm}$; $p < 0.001$) и $24.8 \mu\text{m}/\text{mm}$ при R3 ($18.972 - 30.64 \mu\text{m}/\text{mm}$; $p < 0.001$).

3.1.5. Термалната деформация на използвания материал (полимлечна киселина) играе незначителна роля за морфологичната точност на моделите

Термалната деформация е важен показател в характеристиката на полимерите, която може да доведе до значителни отклонения между желаните и постигнатите чрез триизмерен печат размери на изработваните обекти. Това е сериозен недостатък, който трябва да се има предвид при избора на материали за принтиране. Всеки полимер има специфична термална деформация, като при някои от тях тя е значително по-малка, отколкото при други. Също така, композитните полимерни материали показват по-ниска деформация, но техните

допълнителни качества зависят от използваната рецепта и фирмата-производител, което прави използването им непредсказуемо. От чистите полимери полимлечната киселина е лесно достъпна, евтина, принтира се лесно и термалната ѝ деформация между 0.2 и 0.4%, което я прави един от най-привлекателните материали на избор за изработването на модели с висока пространствена точност. Посочените съображения доведоха до избора на този материал, който беше използван както за настоящия експеримент, така и за изработването на модели за предоперативно планиране.

Класическата техника за компенсирание на термалната деформация е 3D принтирането на 3D модел на калибрационен куб със стени 2 cm, измерване на физическия модел, сравняване на получените със желаните размери и изчисляване на стойността на термалната деформация в проценти, специфична за конкретния материал, 3D принтер и g-code генератор. Тази техника е много ефективна при принтирането на материали с висока термална деформация като ABS и TPU.

Получените стойности от калибрационния куб бяха $X = 19,96$ mm $Y = 19,97$ mm и $Z = 19,98$ mm, като средната стойност беше изчислена на 19,97 mm. Температурната компенсация беше изчислена на 0,2%. С толкова трябва бяха увеличени размерите на всеки отделен модел, за да се компенсира термалната контракция (свиването) на полимера.

Посочените в табл. 5 резултати ясно демонстрират липсата на сигнификантна разлика и в трите показателя между 3D- и 3D+. За това допринася изборът на материал – полимлечна киселина. Този материал показва минимална термална деформация, която може да бъде избегната в значителна степен чрез използването на FDM принтер с нагреваема основа и специално покритие за по-добра адхезия с принтирания обект. Поради това промяната в размера на модела (рескейлването) с цел компенсация на свиването на материала след изстиване при използваната система за принтиране (Prusa MK3S) не е нужно.

3.2. Резултати за Изследване 2: Създаване на методика за генериране, изработване и използване в клинични условия на пациент-специфични персонализирани

модели за предоперативно планиране на сложни ортопедични операции в областта на таза и изследване на клиничната им ефикасност

Ацетабуларните фрактури са един от най-тежките типове травми, засягащи таза, тъй като често са свързани със загуба на тазова стабилност и наличието на множество костни фрактурни фрагменти в непосредствена близост до важни структури в малкия таз. Те се получават при тежки катастрофи и лечението им е свързано с повишен риск поради множеството съпътстващи здравословни проблеми от други органи и системи. След получаването на такава фрактура е необходимо пациентът да бъде подложен поне една седмица на противошоково лечение, за да е в състояние да преживее операцията. Металната остеосинтеза е най-добрият метод на лечение, но дори да бъде извършена от най-добрите оперативни екипи, е свързана с риск от 50% фрагментите да не зарастнат правилно и да се получи разминаване между тях, по-голямо от 2 mm – състояние, наричано от ортопедите незадоволителна редукция на фрактурата. Правилният избор на достъп, импланти и инструменти е от ключово значение за успеха на ортопедичните операции, поради което отделянето на достатъчно време за планиране на операциите увеличава значително техния успех. Авангарден метод на предоперативно планиране са анатомичните 3D модели – достоверни и както демонстрирахме в предната глава – точни копия на естествените кости, даващи на ортопедите физически модел в реален модел, върху който да планират операциите си. В тази глава са представени резултатите от използването на тези модели.

Между изследваните групи се отбелязаха сигнификантни разлики при показателите Оперативно време, Кръвозагуба и Интраоперативни Rö графии в полза на планираната с 3D принтирани модели. Резултатите от модифицираната скала на Merle d'Aubigne-Postel в периода на проследяване също беше сигнификантно по-добър при планираната с 3D принтирани модели група ($p = 0.03$). Подобряването на тези резултати значително намалява интра- и постоперативния риск за пациента, който присъства на всяка една операция.

Табл. 11: Основни изследвани показатели при Група 1 (планирана конвенционално) и Група 2 (планирана чрез 3D принтирани модели)

Показател	Група	Общо	Средно отклонение	Медиана	Диапазон	р-стойност
Възраст	1	50.9	11.6	54	27–65	0.74
	2	49.1	11.2	54	26–64	
Време между травма и операция	1	7.5	2.4	7	5–8	0.89
	2	7.8	2.8	7	5–9	
Оперативно време (мин.)	1	252.5	30.2	240	220–300	< 0.01
	2	193.5	25.0	195	150–240	
Кръвозагуба (мл.)	1	837.5	68.0	835	780–980	< 0.01
	2	665.0	52.7	690	580–720	
Интраоперативни Rö графии	1	68.5	6.7	65	58–80	< 0.01
	2	25.9	5.8	24.5	20–36	
Период на проследяване	1	17.6	0.7	18	17–19	0.78
	2	17.1	5.2	17	8–24	
Оценка по Merle d'Aubigne–Postelo	1	13.1	1.7	14	10–15	0.03
	2	14.7	1.8	15	12–17	

По отношение на качеството на фрактурната редукция 50% от пациентите от контролната група отбелязаха добра, а 50% – задоволителна редукция. При планираната с 3D принтирани модели група 80% от пациентите демонстрираха добра, а 20% задоволителна редукция. Разликата между групите обаче не беше сигнификантна ($p = 0.14$) и трябва да се анализират резултатите от повече оперативни случаи.

Постхирургична инфекция се разви при 1 пациент от планираната с 3D принтирани модели група и при двама от контролната група. Вторичен артрит поради аваскуларна некроза разви един пациент от контролната група. Други усложнения като увреждане на нерви, хетеротопична осификация или загуба на редукция не бяха отбелязани в нито една от изследваните групи.

3.3. Резултати за Изследване 3: Създаване на биомасило за екструдирашо 3D принтиране на матрици, които пресъздават биологичните, хистологични и рентгенологични свойства на костта като тъкан

3.3.1. Изготвяне на методика за производството на наносиликатен хидрогел с оптимални физико-химични качества

3D принтирането на оптимални по форма и качество модели с добра повтораемост е от изключително важно значение за постигането на функционално пълноценни триизмерни тъканни матрици. Грешки и артефакти по време на принтирането биха довели до загуба на вътрешната порьозност на модела, която позволява достъпа на хранителната среда и в най-дълбоките участъци от скафолда. Загубата на порьозност би довела до формирането на некротични ядра в скафолда, което в крайна степен би сложило край на експериментите с него. Грешките при принтиране могат да се дължат на самият 3D принтер или на ниското качество на материалите, които се използват с него. Поради тези причини, постигането на биомасило с оптимални качества беше от първостепенно значение при изпълнението на Изследване 3.

3.3.1.1. Правилното разтваряне на използваните материали е от значение за качествата на получения хидрогел

За способността на биомасилата, базирани на хидрогелове, да бъдат оформени чрез триизмерен печат в сложни пространствено-контролирани фигури, са от значение както видът и качеството на съставките, така и доколко хомогенен е самият гел. Зле приготвеният, съдържащ преципитати и въздушни мехурчета хидрогел ще бъде оформен при 3D принтиране във физически обекти с множество грешки и артефакти, които няма да задоволят изискванията за качество, нужни за успешното му приложение. Поради това оптималното приготвяне на биомасилото в голяма степен определя успешната работа с него.

За приготвянето на хидрогел с добри качества е от голямо значение степента на химическа чистота на използваната в рецептата

дестилирана вода. Наличната в лабораторията вода, пречистена със стандартен дестилатор, предизвика образуването на неразтворими преципитати със съставките на гела, което налага използването на дейонизирана вода с висока степен на чистота.

За доброто разтваряне на съставките на хидрогела 98% етилов алкохол беше накапван с гутатор до получаване на каша и последващото ѝ разбъркване с хомогенизатор.

Полученият с дестилирана вода с висока степен на чистота хидрогел беше бистър, тиксотропен и с добра вискозност. След синтезирането си хидрогелът беше зареден в 10 мл спринцовки и съхраняван за 24 часа при 4°C до своето узряване. След това спринцовките с хидрогел бяха центрофугирани за 1 мин при 3000 rpm. След центрофугирането в хидрогела липсваха преципитати и въздушни мехурчета, екструдираше се лесно и без запушване на спринцовката. Екструдираше се мека нишка от хидрогел с постоянен диаметър, която беше в състояние при нанасяне да образува различни геометрични форми. При охлаждане гелът увеличаваше своята вискозност, а при загряване я намаляваше.

След зареждане в SDS 10 екструдера на наличния принтер Hyrel 3D Hydra 16A хидрогелът се екструдираше равномерно и с постоянна скорост. При неактивен екструдер отделни капки хидрогел изтичаха през иглата на устройството, без да предизвикват значително замърсяване на работната повърхност.

3.3.1.2. Включването на натриев сулфат към основната рецепта подобрява полемиризационните свойства на хидрогела при 36°C

Полимеризационните свойства на биоматрицата са от ключово значение за постигането на стабилни, неразтворими физически обекти със сложна триизмерна структура, подходящи за използване като биоматрица. Добрата полимеризация осигурява възможност за продължителна употреба на биоскафолда и запазва проходими вътрешните пространства в него, което е изключително важно за поддържането на жизнените процеси на клетките – както тези, разположени в периферията, така и тези, разположени в центъра на матрицата. Наличието на неперфузирани участъци в нея може до

доведе до развитието на корови некрози, които в крайна сметка водят до провал на експеримента.

От получените по описаната в 3.2.2.3 методика Модификация 1.0 и Модификация 1.2 показаха най-добри полимеризационни свойства – полимеризираният във формичките хидрогел по Модификация 1.2 беше най-стабилен и с най-добри механични свойства. Допълнително свойство беше подобрената му екструзия през спринцовката при температура от 36°C.

Хидрогелът, добит по Модификация 2, показва много добри полимеризационни свойства, независимо от наличието на допълнителни съставки и беше определен като оптимален. Не беше необходимо допълнителното добавяне на съставки, подобряващи полимеризацията.

3.3.1.2. Увеличаването на обемните части на съставките на хидрогела значително подобрява неговата способност за 3D принтиране

За да се подобрят качествата на разработваната рецепта за биомасило беше синтезирана Модификация 2, в която основните съставки на хидрогела (алгинат, метилцелулоза и лапонит) са увеличени значително. По време на синтезирането му повишената концентрация на съставките (прахообразни консумативи) значително затрудни получаването на качествен хидрогел, но накапването с 98% етилов алкохол и последващо разбъркване с хомогенизатор се оказва ефективна методика за постигането на бистро и хомогенно биомасило. Полученият хидрогел показва отлична йонна полимеризация с CaCl_2 , без да са необходими допълнителни мерки като модифициране с Na_2SO_4 . В последвалите тестове за 3D принтиране, получените с Модификация 2 обекти показаха отлични пространствени свойства, значително превъзхождащи тези, получени с Модификация 1.

Алгинатът и метилцелулозата образуват заедно мрежа от преплитачи се влакна, свързани помежду си чрез калциеви йони. Лапонитът от своя страна запълва пространствата между сноповете от полизахаридни влакна и полярните му наносиликатни кристали и образува структура „кула от карти“, която допълнително увеличава стабилността на получената структура и служи като подпорен материал

за полимерите. Увеличаването на обемните съставки на полизахаридите увеличава гъстотата на преплитащите се влакна, а увеличаването на наносиликата увеличава както стабилността на структурата, така и нейния атомен номер, от който зависи радиологичната ѝ плътност, условията за дифузия на вещества като система за пренос на медикаменти, както и полярните нанокристали осигуряват центрове за свързване на клетки при инокулиране на структурата.

3.3.2. Изработване на тестови обекти чрез 3D принтиране и определяне на техните пространствени свойства

Тест 1 – Калибрационни квадрати, Калибрационен куб и Калибрационен цилиндър

Калибрационни квадрати – Първият тест беше извършен с Модификация 1 като основна рецепта, използвана с референтни цели. Гелът беше с нисък вискозитет, изтичаше спонтанно през спринцовката и даваше множество артефакти по време на принт. Размерите на получените обектите бяха с около 5% по-големи от очакваните, а самата им форма – деформирана и нестабилна. Принтирането на втори слой беше невъзможно. Хидрогелът беше нестабилен и не можеше да запази формата си продължително време. Обливането с разтвор на CaCl_2 след приключване на принтирането не беше в състояние да полимеризира принтираните структури в стабилни обекти с постоянни размери.

Таб. 12: Калибрационни квадрати – очаквани и измерени размери

	Очакван размер (мм)	Измерен размер (мм)
Квадрат 1	10	10,5
Квадрат 2	20	21
Квадрат 3	30	31.5
Квадрат 4	40	42



Фиг. 32: Калибрационни квадрати, изработени с Модификация 1

Калибрационен куб и Калибрационен цилиндър – Поведението на Модификация 1 беше сходно с това при изработването на квадратите – хидрогелът изтичаше спонтанно, замърсяваше работната основа, оставяше множество артефакти. За подобряване на стабилността на принтирания обект принтираният периметър беше заливан с разтвор на CaCl_2 . Полимеризацията по време на принт даде очаквания си ефект, първият слой беше екструдирани качествено и с очаквани размери. При започването на втори слой обектът започна да губи пространствените си свойства и образува структура с овоидна форма. Получените обекти бързо губеха формата си, дори след йонна полимеризация.



Фиг. 33: Калибрационен куб и калибрационен цилиндър, изработени с Модификация 1. По време на 3D принтирането обектите са обливани с разтвор на CaCl_2 за подобряване на стабилността им

За да могат да се използват за изработване на биоматрици, биоматилата трябва да са в състояние да се изработват чрез триизмерен печат като триизмерни, порьозни и стабилни структури, което не беше постигнато с Модификация 1. Посредствените резултати от Тест 1 бяха определени като незадоволителни, поради което в 62

последващите тестове за 3D принтиране беше използвана Модификация 2, която поради увеличените обемни части на основните съставки и подобрената технология на синтезиране има значително по-добри качества и позволява изграждане на по-сложни структури.

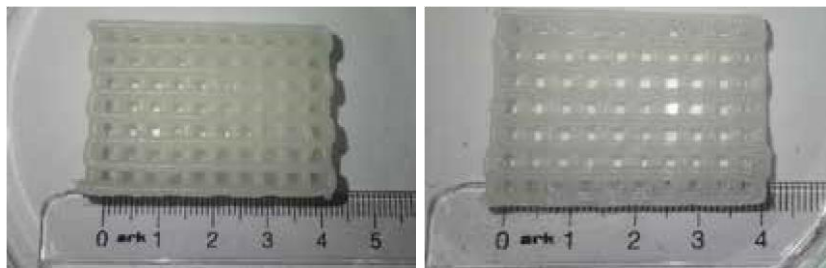
Тест 2: Сложен скафолд

В Тест 2 и Тест 3 беше използвана Модификация 2. Поведението на хидрогела беше значително по-добро от този по Модификация 1. Моделите бяха изработени с висока пространствена прецизност и беше възможно изграждането на сложна триизмерна матрица, изградена от последователни кръстосващи се периметри, изградена от множество слоеве. Съдържащите се в модела мостове и висящи участъци бяха стабилни и добре осигурени. Размерите на порите отговаряха на очакваните.

Обектът Матрица 2 (четириъгълен скафолд с височина 4 мм) демонстрира по-добра пространствена точност в сравнение с Матрица 1 и Матрица 4. Това се дължи на по-ниската височина на модела, което позволява отпечатване с по-малък брой слоеве с по-малко количество материал в периметрите. Ограниченият брой слоеве значително намалява риска от получаване на артефакти по време на принтиране и прави модела по-точен.

След полимеризация с CaCl_2 3D принтираните обектите запазиха пространствените си свойства. След съхраняване във влажна камера при 4°C за 4 дни, те запазиха структурата си и не показаха деформация. Те запазиха качествата си в продължение на две седмици, по време на което бяха извършени рентгенологичните и хистологичните им изследвания. Скафолд 4 беше запазен за определяне на трайността на гела и съхраняван продължително време в петри, поставено в хладилник при 4°C . След един месец съхранение по матрицата започнаха да се появяват зеленикави и кафяви петна, които в началото на втория месец покриваха по-голямата част от нея, разположени основно в централната ѝ част. Въпреки петната скафолдът беше запазил пространствената си структура, проходимостта на порите и стабилността си. След втория месец, скафолдът беше изхвърлен.

Резултатите от Тест 2 бяха определени като отлични и бяха отново потвърдени в Тест 3.

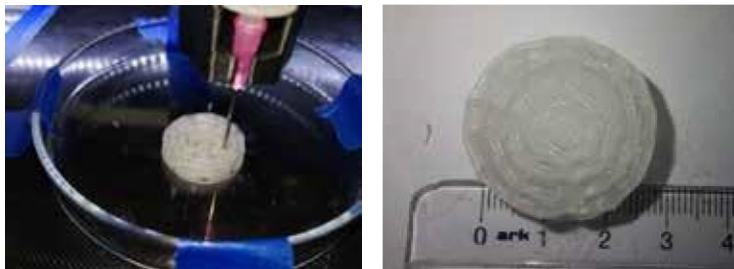


Фиг. 34: Четириъгълен скафолд с височина 8 мм (вляво) и 4 мм (вдясно), изработени с Модификация 2

Тест 3: Модел на Хаверзова система

Моделът беше изработен с висока пространствена точност, стабилни и осигурени мостове и висящи участъци и проходими за течности вътрешни канали. Заоблените форми, които по принцип представляват проблем за много 3D принтери, бяха изработени с висока точност. При изработването на горните слоеве на модела екструдирещото устройство започна да извършва след завършването на всеки слой движение в радиална посока, отговарящо на позицията на шева на съответния слой. Всеки 3D принтиран слой има шев, в който крайната точка на движение на екструдера се среща с началната. Обикновено при работа с разтопяема полимерна нишка позицията на шева не представлява проблем, но при екструдирещото принтиране и двата използвани g-code генератора (Slic3r и Cura) включиха нежеланата команда в генерирания g-code. При това нежелано движение се нарушава структурата на слоя и се създава артефакт.

След полимеризация с CaCl_2 обектът премина в солидна структура без деформации, елементите му запазиха размерите си, а вътрешните канали – своята проходимост. След съхраняване във влажна камера при 4°C за 4 дни, обекта запази структурата си и не показа деформация. Последващите експерименти (КТ сканиране и хистологични препарати), бяха извършени с матрица, 3D принтирана с Модификация 2.



Фиг. 35: Модел на Хаверзова система, изработен с Модификация 2

Табл. 13: Обобщение на резултатите от тестовото 3D принтиране: Модификация 2 показва Отлични резултати по всички изследвани критерии и задоволи целите на изследването

	w/v %	Вискозитет	Стабилност	Полимеризация с CaCl ₂	3D Принтеруемост
Модификация 1	3/3/3	Нисък	Ниска	Ниска	Ниска
Модификация 2	5/5/6	Висок	Отлична	Отлична	Отлична

Биомастилото по Модификация 2 успешно изпълнява поставените в Задача 1 и 2 на Изследване 2 цели относно изготвянето на методика за производството на наносиликатен хидрогел с оптимални физико-химични качества, които да се използват за инжекционно екструдирало 3D принтиране и изработване на тестови обекти чрез 3D принтиране и определяне на техните пространствени свойства.

3.3.3. Създаване на методика за хистологичен анализ на получените обекти

3.3.3.1. Общи характеристики на получените препарати

Хистологични препарати бяха изготвени и изследвани за две рецепти (Модификация 1 и Модификация 2). Хидрогелът е изключително труден за фиксиране, рязане на микротом и оцветяване, тъй като поради ниската си стабилност лесно се деформира, накъсва и разпада при самото рязане и под въздействие на използваните реактиви. Това е особено изразено при Модификация 1, която изисква множество

опити до постигането на приемливи резултати. При Модификация 2 поради по-добрите полимеризационни свойства и по-добрата пространствена точност на готовия обект, тези затруднения не представляват проблем, пробите са по-стабилни и лесни за работа.

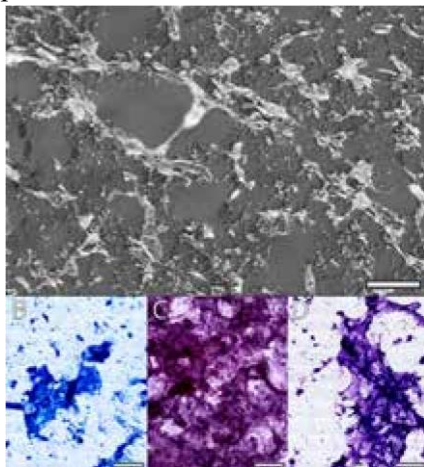
При оцветяването си структурата на гела се визуализира като снопове от пресичащи се помежду си влакна на макромолекулите на хидрогела, които формират порьозна мрежеста макроструктура с диаметър на порите в диапазона между 100 и 500 мкм. Това означава, че сам по себе си хидрогелът представлява порьозна структура, което обуславя лесното дифундиране на различни биологично активни вещества – качество, което е от изключително важно значение за триизмерните тъканни култури.

По време на приготвянето на препаратите гелът е частично извлечен от тях. Това, което остава, е люспеста субстанция, която се оцветява с различна сила от базofilните багрила, използвани в протоколите. Предполагаме, че това е ефект в резултат от лапонита, който играе ролята на Мордант (свързващ агент за багрилата). При оцветяването с крезил виолет се оцветява гелът, несъдържащ лапонит (който няма люспеста структура), което може да е частично компенсирано с увеличаване на времето за диференциация на оцветяването.

3.3.3.2. Фиксирането с формалин и удълженото измиване на препаратите редуцира фоновото оцветяване чрез частична екстракция на хидрогела и прави възможно провеждането на цитологичен анализ. При оцветяването хидрогелът реагира силно както със Хемалаун и Еозин, така и с Крезил-виолет. Това причинява силно фоново оцветяване, особено изразено при нефиксираните препарати, което би направило последващ цитологичен анализ невъзможен. Най-важното условие за анализ на препарата е възможността за идентифициране и броене на структури от интерес (клетки и екстрацелуларен матрикс) в зрителното поле и без редукция на фона получената от препарата информация няма да е достатъчно надеждна. За да се намали фоновото оцветяване, е нужно да бъде извлечен част от лапонита от препарата. При препаратите, които бяха предварително фиксирани с формалин, хидрогелът е частично

денатуриран и извлечен от препаратата, което намалява фоновото оцветяване и предоставя по-добри условия за оцветяването на клетъчните елементи. Този процес може допълнително да бъде подобрен чрез удължена рехидратация на препаратите (удължено миене по време на фазите на приготвяне на препаратите). Модификация 2 показва по-добра стабилност при фиксиране, рязане и оцветяване, а преплитачи се полизахаридни макромолекули на хидрогела се визуализират добре и ясно се наблюдава тяхната структура.

3.3.3.3. При оцветяването с хемалаун предварителната обработка с цитрат или хелиращи агенти допълнително редуцира фоновото оцветяване. При оцветяване с Хемалаун-Еозин хидрогелът реагира силно и с двете багрила, но след предварителна подготовка с 25% EDTA или 1% Оцетна киселина, багрилото Хемалаун беше потиснато и препаратът се оцвети само с Еозин.

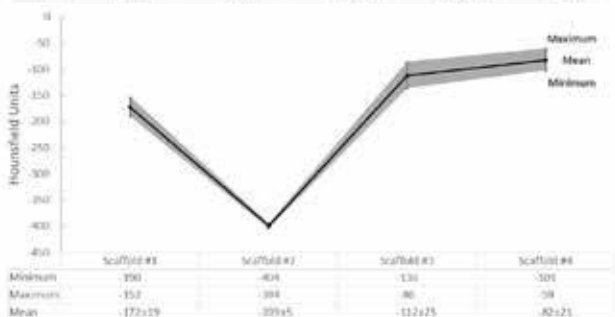
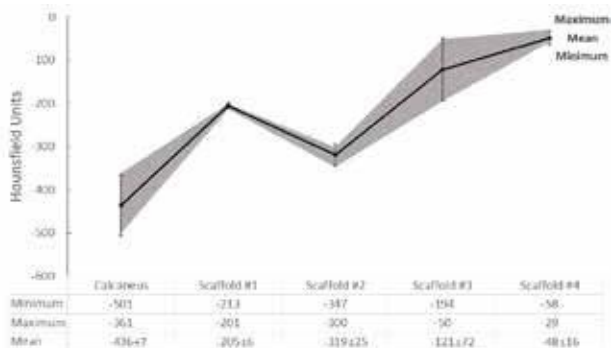


Фиг. 36: Микроскопско изображение на полимеризирана матрица от хидрогел. Свързани мозаечни изображения от наблюдения в тъмно поле на неочветения хидрогел (А), и наблюдения в светло поле на: Оцветяване с Диф Куик (В), Хемалаун-Еозин С и Крезил виолет (D).
Размерът на маркера за дължина е 250 мкм.

3.3.4. КТ сканиране и анализ на 3D принтирани скафолди и определяне на техните радиологични свойства

Средната стойност на Матрица 2 (Средна стойност от -319 ХЕ) е най-близка до тази на костта (-436 ХЕ). Наблюдава се значима разлика в стойностите между Матрица 2 и естествената кост, което се дължи в голяма степен на състоянието на костта при нейното сканиране – сканираният препарат е сух и мацериран, докато при жив човек те биха били запълнени с костен мозък и биха дали различни стойности.

Тази тенденция се запазва и при КЛКТ сканиране, при което Матрица 2 отбелязва най-ниски стойности (средна стойност от -399 ХЕ), по-високи. Това е свързано със структурата на Матрица 2 – обектът е по-нисък и с по-висока степен на порьозност от останалите, което води до по-ниска концентрация на хидрогела в скафолда. Въпреки, че в изследването петната кост не беше сканирана с КЛКТ, ние бихме могли спокойно да предположим, че средната стойност на Матрица 2 е най-близо до тази на естествената кост.



Фиг. 37: Разпределение на стойностите на ХЕ при КТ (горе)
и КЛКТ (долу)

Наблюдава се ясно изразена разлика между средните стойности на ХЕ, получени чрез клиничен КТ и дентален КЛКТ. Тези разлики са очаквани и се дължат на различията в геометрията на сканиране, алгоритмите за реконструкция, по-ниската енергия и дебелина на срезите, използвана при КЛКТ.

Посочените резултати са обещаващи и могат да позволят достигане на още по-близки стойности чрез промяна в концентрацията на лапонита, който като наносиликатна глина има висока атомна плътност и ще даде по-високи средни стойности на ХЕ. Сходните рентгенологични свойства на синтезирания дават възможността да се създаде матрица, съдържаща живи клетки, която при своето развитие да покаже сходна динамика с тази на развиващата се костна тъкан. Такова устройство, в качеството си на радиологично-биологичен фантом, предоставя неочаквани възможности на съвременната биомедицина, отразявайки рентгенологичните свойства на съдържащ костни клетки конструктор в динамика при физиологични и патологични условия като модел на различни заболявания на костната тъкан. Сканирането е извършено с клиничен КТ и дентален КЛКТ, които имат сравнително ниска разделителна способност, сравнени с микро КТ скенерите, които достигат дебелина на среза от 50 μm . Необходимо е експериментът да се повтори отново, като се използва скенер с висока резолюция, който категорично да потвърди тъкан-еквивалентните свойства с костната тъкан на синтезирания хидрогел.

3.4. Резултати за Изследване 4: Създаване на физически антропоморфен образен фантом чрез VbV методика за тризмерен печат и анализиране на неговата рентгенологична достоверност

3.4.1. Задача 3.1.: Изработване на антропоморфен физически образен фантом чрез voxel-by-voxel (VbV) FDM 3D принтиране с тъкан-еквивалентни материали по методика, използваща специализиран генератор

**управляван от изображения на g-code
генератор и модифициран FDM 3D
принтер, разработени от MORPHE**

За изпълнението на тази задача е използван композит, съдържащ 50% полимлечна киселина и 50% теракотни гравиметрични частици, даваща подобна на глина текстура на изработените с този материал обекти. Материалът представлява ригидна, лесно чуплива нишка и изисква специален подсилен екструдер за качествена работа. Гравиметричните теракотни частици имат значително по-висока атомна плътност от PLA, като в комбинация 3D принтираните обекти имат средни стойности в XE, близки до тези на костната тъкан, тоест материалът поглъща рентгенови лъчи по сходен модел с костта. Това качество прави този материал доста обещаващ за изработването на костни фантоми. Проблемът на стандартните генератори за g-code е, че вътрешното пространство на обекта (пространството между външните обвивки на модела) е запълнено с материал, оформен по стандартна структура (запълващ материал, infill), който доста се различава от вътрешната структура на естествената кост. Съществува специален генератор на g-code, който директно преобразува средните стойности на определен воксел от датасет в точно дефинирано количество екструдирани материал. Този тип технология се нарича voxel-by-voxel (VbV) и на този етап все още е в процес на развитие.

За изработването на тестовите обекти е използван FDM 3D принтер, допълнително модифициран с усилен екструдер с два последователни стъпкови мотори, който да позволи правилното екструдирани на трудния, ригиден композитен материал. Принтерът е допълнително модифициран с втори екструдер, който позволява работа с още един, стандартен термополимер.

При изпълнението на тази задача бяха изработени два фантома по две различни методики, като при първата обектът е изграден само от композит PLA/теракота. При втория обект се редуват един слой PLA/теракота с последователен слой от PLA с улеснено екструдирани (EasyFil PLA), като целта е да се осигури по-добра адхезия между слоевете и да се намали общата атомна плътност на обекта, като по този начин при сканиране с КТ да се намалят средните стойности на XE във вокселите му. Самата процедура по 3D принтирането на обектите беше

много проблемна поради чупливия и труден материал, като обектите трябваше да се започват отначало няколко пъти, до получаването на приемливи фантоми. Хардуерът и софтуерът за VbV 3D принтиране има множество проблеми, които водят до честата поява на артефакти и добрата повтораемост не е осигурена. Въпреки работата по него, която все още продължава, това продължава да е една не особено надеждна технология. Въпреки всички проблеми, след множество повторни опити, обектите бяха изработени с приемливо качество за последващи експерименти.

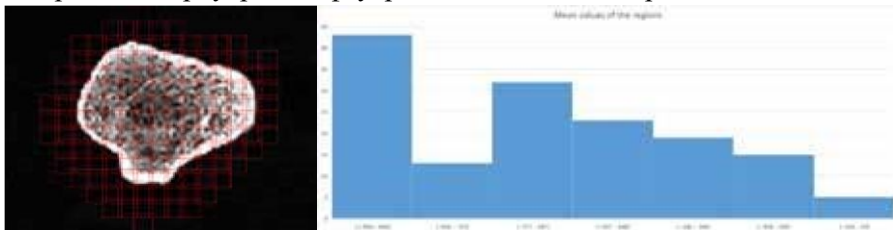
- Фантом по Методика 1: Полученият обект е кремавочервен на цвят, повърхността има керамична текстура, самия обект е трошлив и нестабилен. Трябва да се полагат специални мерки по време на транспортирането, за да се избегнат допълнителни увреждания по обекта.
- Фантом по Методика 2: Полученият обект е черен на цвят, с отделни кремавочервени линии. Повърхността е с полимерна текстура, обектът е стабилен и нетрошлив. Не са необходими допълнителни мерки за безопасно транспортиране и дори при изпускане на пода обектът остава здрав.

При принтирането на фантома по Методика 2 се получи зона на хипер екструдирание по средата на фантома, която се отрази на резултатите от последващия анализ. Подобни артефакти се получават при неравномерно разпределение на температурата в хотенда и за да се избегнат подобни проблеми в бъдеще, беше осигурен меден хотенд с подобреното ѝ разпределение.

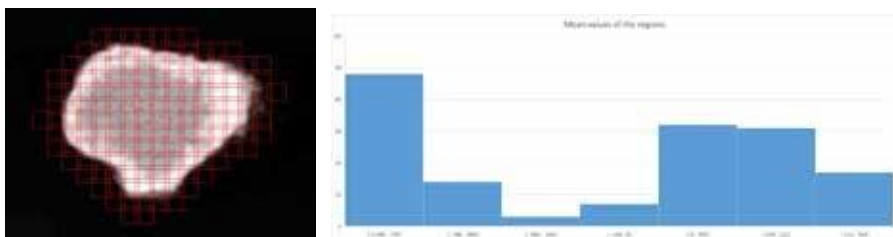
3.4.2. Определяне на разпределението на Хаунсфийлдовите единици в различните участъци на датасет Натурална кост

И при двата тестови обекта се наблюдава ясно изразена разлика в разпределението на стойностите на ХЕ в хистограмата, което поставя под въпрос надеждността на технологията за VbV триизмерен печат на фантоми, представящи костната тъкан. Една от вероятните причини за получените резултати е използваната система за кодиране на

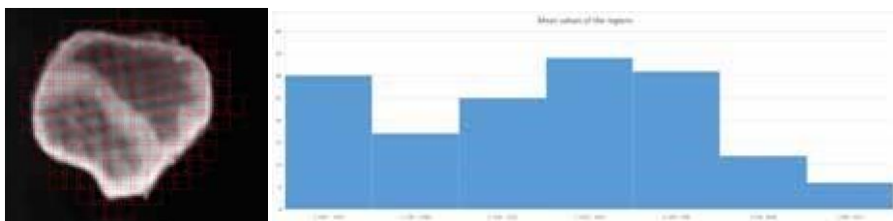
информацията – при изработване на фантомите бяха използвани стойности от Сивата скала, а при анализа на изображенията бяха използвани Хаунсфийлдови единици. Тази разлика в използваните стойности може да доведе до значителни отклонения в резултатите, което налага експериментът да бъде повторен отново, с най-новата версия на хардуера и софтуера, изготвени от Morphe.



Фиг. 38: Изображение от датасет Натурална кост, разделено на 150 региона на интерес, и хистограма, отразяваща разпределението на стойностите на ХЕ



Фиг. 39: Изображение от датасет Фантом Методика 1, разделено на 150 региона на интерес и хистограма, отразяваща разпределението на стойностите на ХЕ. Разпределението в различните региони от фантома по Методика 2 се различават значително от тези на датасет Натурална кост



Фиг. 40: Изображение от датасет Фантом Методика 2, разделено на

150 региона на интерес и хистограма, отразяваща разпределението на стойностите на ХЕ. Разпределението в различните региони от фантома по Методика 2 се различава значително от тези на датасет атурална кост

3.4.3. Създаване на линеен профил за трите обекта, графично визуализиране и сравняване на получените резултати

Линейните профили на фантомите по Методика 1 и Методика 2 не съвпадат с този на Натуралната кост, но показват общ модел на разпределение – оформя се периферна част с по-високи стойности, отговаряща на Кортикалната кост и централно плато с флукуации, отговарящо на Спонгиозната кост. Линейният профил на фантома по Методика 2 беше значително по-близък до този на Натуралната кост както по отношение на периферната част (кортикалната кост), така и по отношение на централното плато (спонгиозната кост), като в случая трябва да се абстрахираме от получения по време на принтиране хипер екструдирани артефакт. Фантомът по Методика 2 беше определен като по-ефикасен и предстоят последващи изследвания на методиката за получаването му след приключване на дисертацията.



Фиг. 41: Линеен профил през Натурална кост (а), Фантом методика 1 (б) и Фантом методика 2 (в)



Фиг. 42: Разпределение на стойностите на HE в трите обекта. Оформя се периферна част с по-високи стойности, отговаряща на Кортикалната кост и централно плато с флукутации, отговарящо на Спонгиозната кост

ГЛАВА 4. ДИСКУСИЯ

4.1. Антропоморфни 3D принтирани модели

4.1.1. Антропоморфните 3D принтирани модели са точен инструмент за морфологични изследвания и могат да бъдат генерирани с висока точност както чрез лицензиран софтуер, така и чрез такъв с отворен достъп

До момента са проведени множество изследвания върху морфологичната точност на антропоморфните 3D принтирани модели чрез линейни измервания върху трупни обекти (кадавърни изследвания). Използвани са КТ датасетове с висока точност (1.5 мм или по-малка дебелина на слоя), в повечето случаи на мандибула или къси кости. За сегментацията на изображенията е използван както софтуер с отворен достъп (Slicer 3D, InVesalius), така и комерсиален (Materialize Mimix, Carl Zeiss Zeiss Calypso, Pixmeo OsiriX и др.). Изображенията са обработвани от специалисти-рентгенолози.

Изследвани са различни технологии за 3D принтиране, които могат да се обобщят като FDM, Polyjet, Binder jet, SLS и SLA, чрез които са били изработени обекти-реплики на реални кости, след което както принтираните обекти, така и обектите-първоизточници са били измерени чрез мануални методи и сравнени с цел да се установи грешката при работния процес. Като универсален показател за точността на технологията, е използвано Средното отклонение в мм. като лесен за изчисляване и информативен показател. За измерване е използван шублер или координатна измервателна машина (СММ), като точни и надеждни инструменти за получаване на морфометрични данни.

Табл. 14: Изследвания върху морфологичната точност на антропоморфните 3D принтирани модели чрез линейни измервания върху трупни обекти

Технология	КТ дебелина на слоя (мм)	3D принтер	Софтуер за сегментация	Инструмент за измерване	Средно отклонение (mm)	Средно отклонение (%)	Автор
FDM	0.62	Makerbot Replicator 2	AnalyzeDirect Analyze	Шублер	0.18	0.69	Ogden et al. [324]
FDM	1.0	3D Systems CubeX	Pixmeo OsiriX	Шублер	0.21	0.44	Petrovic et al. [325]
FDM	0.5	Up Plus 2	Medicim Maxilim	СММ	0.37	3.76	Mascherbauer et al. [326]
FDM	0.5	Prusa MK3S	Slicer 3D	Шублер	0.11+/27	N/A	Valchanov et al. [327]
Polyjet	1.5	Stratasys Objet Eden 350V	Carl Zeiss Zeiss Calypso	СММ	0.20	0.12	Salmi et al. [328]
Binder jet	1.5	3D Systems ZPrinter 450	Carl Zeiss Zeiss Calypso	СММ	0.44-0.80	0.38-0.69	Salmi et al. [329]
Binder jet	0.5	3D Systems ZPrinter 310	InVesalius	Шублер	1.07	2.10	Silva et al. [329]

Binder jet	0.5	Mcor Technologies Matrix 300+	Medicim Maxilim	CMM	0.36	1.87	Olszew et al. [330]
SLS	1.0	EOS GmbH EOSINT P 395	Pixmeo OsiriX	Шублер	0.16	0.30	Petrovic et al. [325]
SLS	1.5	EOS GmbH EOSINT P 800	Carl Zeiss Zeiss Calypso	CMM	0.93	0.79	Salmi et al. [32]
SLS	0.5	3D Systems DTM Sinterstation 2000	InVesalius	Шублер	0.89	2.10	Silva et al. [329]
SLA	1.25	3D Systems Viper 2si	Materialise NV	Шублер	0.23	0.08	Nizam et al. [33]
SLA	1	3D Systems SLA 5000	CyberMed	Шублер	0.62	0.56	Choi et al. [332]

4.1.2. FDM е технология на първи избор, а полимлечната киселина – подходящият материал за изработването на антропоморфни 3D моделина кости

FDM е технологията за 3D принтиране, която е най-достъпна, евтина и може да постигне много добра точност на печат – дебелина на слоя до 50 μm , с 3D принтер на цена под 1000 лв. и консуматив, струващ 30 лв. за килограм. Някоя друга технология за триизмерен печат не може да се конкурира в това отношение с FDM. За разлика от останалите технологии за триизмерен печат, които изискват промишлени или лабораторни условия за нормална работа (токсични изпарения, промишлен ток, инсталация с инертни газове за газов лазер и др.), FDM може да се използва при всякакви условия. Чрез правилен подбор на термополимерите за работа е възможно да се произведат обекти с високо качество, ниска цена и специални свойства като устойчивост на влага и химикали, термоустойчивост, увеличена механична здравина, магнитни свойства и дори електропроводимост, които произхождат от използвания материал. Термополимерите и в частност PLA могат да се смесват с различни допълнителни вещества като композити, което дава огромни възможности за изработването на

разнообразни инструменти, устройства и пособия със специфично предназначение. Поради всички тези причини, използването на този тип триизмерен печат за антропоморфни модели представлява голям интерес за морфологията. При цитираните изследвания, независимо от използваната технология, отчетените резултати в цитираните изследвания са много добри и генерираните модели биха били достатъчно качествени за клинични приложения като предоперативно планиране. FDM показва много добри резултати между 0.18 и 0.37 мм, които са на нивото на висок клас технологии като SLS (от 0.16 до 0.93) и SLA (от 0.23 до 0.85). Преимущество на FDM е високата достъпност и ниската цена, които я правят технология на първи избор за изработване на антропоморфни 3D принтирани модели. Особено подходящ материал за печатането на костни модели е Полимлечната киселина и свързаните с нея композити. Те комбинират тъкан-еквивалентни с костната тъкан механични показатели и рентгенологични свойства, които се съчетават с леснотата на 3D принтиране, високата пространствена точност и ниската термална деформация. Полиетеретеркетоните, в частност PEEK, показват по-добри показатели в механично отношение, но цената му от 1000 евро за един килограм го правят достъпен само за големите научни центрове. Поради всички тези аргументи, FDM е технология на първи избор, а полимлечната киселина – подходящият материал за изработването на антропоморфни 3D модели на кости.

4.1.3. Средното отклонение отразява сумарната грешка, натрупана във всички етапи на изработването на антропоморфните 3D принтирани модели

Изработването на един антропоморфен 3D принтиран модел включва няколко етапа, като при всеки един от тях е възможна минимална грешка. Грешката от всички етапи – от сканирането на обекта-първоизточник до неговото изработване и измерване, се обобщава в Средното отклонение като универсален индикатор за морфологичната точност на използвания метод показател, използван в качествения контрол на получените обекти.

При изработването на модели за предоперативно планиране за конкретен пациент най-често се използва клиничен КТ с не особено добро качество. За да се получи добър датасет, е необходимо да се ползват определени параметри за сканиране, които се различават от рутинно използваните протоколи. Това е особено голям проблем при работата с фрактури, съдържащи метални обекти. Металът създава артефакти, които влошават значително качеството на изображенията и възможността за генерирането на точни модели. Ако обаче образното изследване се обработи с алгоритъм за редукция на метални артефакти, каквито има инсталирани в КТ томографския софтуер на големите болници, металните артефакти ще бъдат отстранени и ще е възможно сегментирането и 3D принтирането на точен модел. Това е особено ценно при ацетабуларните рефрактури, при които поставените на предходни операции импланти правят генерирането на точен модел много трудно.

При 3D сегментацията и конвертирането ѝ в 3D модел се получава допустима грешка от ± 1 воксел.

Получените чрез 3D сегментация и 3D принтиране модели са със средно отклонение под 1 мм, което е достатъчно добро качество за тяхното използване като инструменти за предоперативно планиране. Въпреки това, този параметър трябва да бъде определян за всяка използвана методика, с цел определяне на нейната надеждност и доколко е подходяща за използване в клинични условия.

4.1.4. Софтуерът с отворен достъп може да постигне резултати със същото качество и достоверност като комерсиалния, стига да се използва от изследовател с високо ниво на образование и опит

Качествени антропоморфни 3D принтирани модели могат да бъдат изградени с всеки софтуер, било то с отворен достъп или комерсиален, стига използващият го да е с достатъчно високо ниво на компетентност. Резултатите от Изследване 1 и 2 доказват недвусмислено това. Комерсиалните компютърни програми, използвани в професионални условия за генерирането на персонализирани медицински устройства като модели за предоперативно планиране, трейнъри, помощни

средства, хирургични водачи и постоянни импланти, притежават редица автоматизирани алгоритми, генерирани чрез машинно обучение и позволяващи бързото и точно генериране на повърхностни модели на кости и костни фрагменти и постигането на анатомична редуция (разместването между отделните фрагменти на фрактурата е под 2 mm) чрез виртуална репозиция. По своята същност този работен процес е разработен по същия начин като методиката, използваща полуавтоматична сегментация – определени програмни инструменти се използват многократно върху различни серийни изображения, докато се развие опитът, нужен за генерирането на точни модели. Разликата е, че обработката на данни ще отнеме на човек стотици часове, докато на компютърните алгоритми, непритежаващи възможностите на човешкия ум, ще отнеме хиляди. За разлика от хората обаче, машините нямат нужда от почивка и могат да се обучават непрекъснато, генерирайки автоматизирани алгоритми за генериране на анатомични модели и медицински устройства чрез машинно обучение. Този процес може да бъде значително ускорен чрез увеличаването на изчислителната мощ на машините или чрез използването на суперкомпютър. След като са генерирани, тези алгоритми могат да бъдат интегрирани в определена програма, която да извършва моделирането с висока повторяемост, като всеки път качеството е идентично, независимо от нивото на образование на моделиста, който ги използва.

Върху репонираните виртуални фрагменти е възможно директното проектиране на медицинските устройства и тяхното тестване чрез разнообразни виртуални симулационни средства. Тези програми позволяват на медицински специалисти и биомедицински инженери да генерират и изработват бързо с комерсиални цели сложни медицински изделия, без да притежават задълбочените технически познания на учените. Този тип софтуер подлежи на задълбочена сертификация чрез тестване в референтна лаборатория, определена от съответната контролираща организация – FDA или Европейската комисия.

4.1.5. Точни измервания могат да бъдат постигнати с физически инструменти дори от неспециалисти

Антропологични измервания могат да бъдат извършени чрез физически инструменти като шублер или координатна измервателна машина или чрез дигитални като Обемна реконструкция и Дигитална фотография. Това се потвърждава от получените резултати при статистическия анализ – ANOVA показва, че единственият фактор, който статистически значимо повлиява относителното отклонение, е взаимодействието между Метод и Оценител. С други думи, единственият фактор от значение за прецизността на измерванията е доколко правилно всеки отделен оценител използва метода за измерване, което корелира с нивото на образование и опит. Въпреки това, докато при измерванията, извършени с модула за Обемна реконструкция, е налице съществена вариабилност в отклоненията спрямо реалната измерена дистанция на костта, то при физическите измервания с шублер, извършени върху 3D принтираните модели със или без термална компенсация, вариабилността е минимална. Освен това измерванията с модула за Обемна реконструкция са свързани със значителна грешка, която се дължи на ъгъла между измервания обект и полето на наблюдение, управлявано от оценителя. Изводът е, че за точното използване на дигиталните е необходимо високо ниво на образование, докато с физическите дори Неспециалист може да извърши сравнително точни измервания. Това прави модула за Обемна реконструкция ненадежден инструмент за измерване, а за получаването на достоверни резултати е необходимо използването на надеждни, физически измервания като тези с шублер или линейна измервателна медицина. Трябва да се има предвид, че не са изследвани други дигитални инструменти за линейни измервания като повърхностното 3D сканиране и дигиталната фотография, които имат различен принцип на действие, основаващ се на тригонометрия и анализ на индивидуални двуизмерни изображения, а не на използваната при Обемната реконструкция 3D визуализация на серия от последователни изображения. Тези закономерности трябва да се взимат под внимание при подготвянето на морфологични изследвания, свързани с извършването на линейни измервания.

4.1.6. Използването на полимлечната киселина като достъпен и качествен материал с минимална термална деформация водят до получаването на по-достовърни модели

Термална деформация: При загряване термополимерите увеличават своя обем поради ускореното движение на техните молекули (термална експанзия), докато при изстиване те съответно се свиват (термална контракция) [41]. При различните термопластмаси тази термална деформация е различно изразена и варира от 0,2–0,4% при PLA до 1,4–4% при високоплътния полиетилен. Това създава известни затруднения, свързани с точността на 3D принтираните модели – те са с по-малки размери от тези на CAD модела. Този проблем може да бъде компенсиран в голяма степен чрез 3D принтиране на калибрационни модели, изчисляване на термалната контракция на материала, от който са изработени, и увеличаване размерите на 3D принтирания модел със съответния процент, изчислен за желания материал. Тъй като термалната деформация е различна за различните материали, тя трябва да бъде изчислявана за всеки един от тях. Чрез добавяне на различни адитиви се получават композитни материали с по-слабо изразена термална деформация, което е причина повечето комерсиални филаменти да представляват композити от няколко различни полимера [42]. Полимлечната киселина се отличава с ниска термална конфигурация от 0.2 до 0.4%, която е значително по-добра от тази на някои масово използвани материали за 3D принтиране като ABS (от 0.7 до 1.6%) и PETG (от 0.3 до 0.8%). PLA може да бъде оцветявана в разнообразни цветове, принтира се лесно и е сравнително здрава. Освен това е най-популярният материал за FDM триизмерен печат и е на изключително ниска цена, което я прави достъпна дори за най-ограничените във финансово отношение научни екипи. Това прави полимлечната киселина материал на първи избор за изработването на антропоморфни 3D модели. Резултатите от Изследване 1 не показват съществени разлика в статистическа между моделите с термална компенсация и тези без, което до голяма степен се дължи именно на качествата на материала.

4.1.7. Пътища за подобрене на качеството на антропоморфните 3D принтирани модели

Като следващ етап в изработването на антропоморфни 3D принтирани модели с висока точност следва приложението на висок клас полуавтоматизиран софтуер за сегментация и последваща 3D обработка, който ще бъде изследван по същата методика, описана в настоящия труд, а неговата точност ще бъде сравнена със софтуера със свободен достъп, който използвахме в настоящия експеримент. Посоченото изследване цели да установи в каква степен високият клас софтуер превъзхожда този със свободен достъп при получаването на надеждни антропоморфни 3D принтирани модели с висока точност за морфометрични изследвания, както и терапевтични приложения като предоперативно планиране и разработване на персонализирани титаниеви импланти.

4.2. Създаване на методика за генериране, изработване и използване в клинични условия на пациент-специфични персонализирани модели за предоперативно планиране на сложни ортопедични операции в областта на таза и изследване на клиничната им ефикасност

Чрез предоперативно планиране е възможно планирането и извършването на сложни и уникални операции, съобразени с индивидуалната морфология и вариации на конкретния пациент, извършени с индивидуализирани импланти и устройства с висока ефективност. Предхирургичното планиране е особено ефикасно при хирургични специалности, които използват множество и скъпи медицински импланти и консумативи като оперативната ортопедия [43], кардио-васкуларната хирургия и инервенционалната кардиология [44], лапароскопска хирургия [45], оперативна гинекология [46], неврохирургия и др. В някои случаи на предоперативно планиране е възможно изработеният персонализиран 3D модел да бъде използван от екипа за трениране на съответната процедура [47], за валидиране и премоделиране на използваните импланти и консумативи, които след стерилизиране да бъдат използвани върху самия пациент. При директен контакт между импланта и 3D модела съществува риска от

контаминацията му с патогенни микроорганизми, които да инфектират оперативната рана и да предизвикат сериозни постоперативни усложнения за пациента. Това е особено опасно при преמודелирането на плаки за метална остеосинтеза в ортопедията и фенестрирани стент-графтове в съдовата хирургия, чиято бактериална контаминация може да предизвика тромбоза, сепсис и мултиорганни усложнения. Поради тази причина, най-ефикасният сценарий е 3D моделите, предвидени за директен контакт с импланти, да бъдат стерилизирани, а самото преמודелиране на имплантите да бъде извършено в операционната зала.

От важно значение е също самият материал, от който е изработен 3D моделът, да бъде годен за стерилизация, без това да води до неговата деформация и до отделянето на токсични продукти, които да замърсят импланта. Съществуват редица материали, сертифицирани за стерилизация и използване за преמודелиране на импланти, като всеки от тях има различен стерилизационен метод, подходящ за него. Полимлечната киселина като материал, обсъждан обширно в дисертацията, може да бъде стерилизиран чрез плазмена стерилизация с водороден пероксид или гама-стерилизация ефикасно и без риск от контаминация на преמודелирания имплант. Възможно е да се използва обикновен FDM 3D принтер, разположен в стерилна камера, който при съблюдаване на изискванията за чистота допълнително да редуцира риска от попадане на бактерии във оперативната рана. Методиката е все още в период на развитие, но тя дава възможност да се произведат импланти с висока степен на персонализираност чрез евтина и достъпна методика. Нивото на компетентност на екипа, произвеждащ 3D моделите, трябва да е на достатъчно високо ниво, което може да бъде постигнато с допълнително обучение или създаване на мултидисциплинарен екип. Тя дава качествено нови възможности на хирурзите, като същевременно увеличава ефективността на оперативното лечение, намалява риска от усложнения и значително редуцира цената му.

До момента завършването на настоящия труд съм генерирал чрез 3D сегментация и след това съм изработил с триизмерен печат десетки модели, използвани за планиране на различни операции на глезена, колянната и тазобедрената стави, които са били успешно в реални

клинични условия с много добър резултат. Особено ефективни бяха предоперативните модели за отворени съдово хирургични операции на абдоминални и торакоабдоминални аневризми, които дават на хирурга цялостен поглед върху хирургичното поле и позволяват определянето на оптимален хирургичен прозорец дори при много тежки случаи с усложнения. След над 20 модела, изработени за клиниката по съдова хирургия към Аджибадем Сити Клиник, София, предоперативните модели доказаха своята ефективност и предстои да бъдат описани като кейс-репорти и клинични проучвания.

4.3. Създаване на биомасило за екструдирателно 3D принтиране на матрици, които пресъздават биологичните, хистологични и рентгенологични свойства на костта като тъкан

4.3.1. Правилното разбъркване на съставките и недопускането на преципитати е от ключово значение за получаването на биомасило с добри качества

При приготвянето на композитен хидрогел като биомасило, съставките са в прахообразна форма и трябва да бъдат разбъркани във вода до получаването на хомогенен гел. Наличието на преципитати и въздушни мехурчета в гела води до влошаване на качеството на печат и появата на редица артефакти по готовия обект, които да го направят неизползваем. Затова правилното разбъркване на съставките на гела е абсолютно условие за успешното му 3D принтиране. При директно разбъркване получаването на преципитати в гела е неизбежно, независимо колко дълго и при каква температура се извършва то. Получените преципитати влошават както оптичните, така и физичните качества на биомасилото. Тяхното получаване е особено изразено при по-големи обемни части от полимерните компоненти на гела. За да се избегне този проблем, е възможно предварителната обработка на полимерните съставки с абсолютен алкохол, който се подава с гутатор до получаване на хомогенна каша. Алкохолът се изпарява и не присъства в получения гел, но съставките на гела са образували хомогенна каша, в която липсват неразтворени частици или

преципитати. Получената каша се поставя в загрята до 50 градуса вода, след което се разбърква мануално или с хомогенизатор. След получаването на хидрогела е възможно отстраняването на въздушните мехурчета в него чрез центрофугиране на ниски обороти за 1 мин. Полученият гел е с много добри свойства и може да се използва за принтирането на комплексни триизмерни физически обекти.

4.3.2. Повишаването на концентрацията на полимерните съставки в рецептата на композитен хидрогел повишава значително качеството на 3D принтиране с него

При директното инжекционно екструдирание на хидрогел е от съществено значение неговият вискозитет. Лапонитът представлява множество полярни дискове, които разтворени във вода, образуват структура тип „къща от карти“ [48]. Това позволява постигане на по-добра точност при принтиране, без да се променят особено физико-химичните свойства на хидрогела. При увеличаване на полизахаридните съставки алгинат и метилцелулоза се получава значително по-вискозен хидрогел, който се 3D принтира с по-добро качество, но изисква увеличаване на силата, която трябва да развие стъпковият мотор на екструдера по време на принтиране. Инжекционният екструдер е в състояние да работи с ниско и средно вискозни хидрогелове, но високовискозните могат да го повредят. Затова добавянето на лапонит към биомастилото позволява по-добро качество на принтиране дори при по-ниска концентрация на полизахаридните съставки.

4.3.3. Повишаването на концентрацията на полимерните съставки в рецептата на композитен хидрогел подобрява значително полимеризационните му свойства

При нисък вискозитет на хидрогела, респективно ниска концентрация на полизахаридните компоненти, йонната полимеризация с CaCl_2 води до промяна в пространствените свойства на принтирания обект – той се деформира и не дава възможност за

запазване на постигнатата чрез принтиране форма. Повишаването на концентрацията на полимерните компоненти, респективно използването на средно вискозен гел, води до бърза и качествена йонна полимеризация, която не само не деформира принтирания обект, но значително увеличава неговата стабилност, здравина и дълготрайност. Полученият полимеризиран обект остава здрав и стабилен продължително време, стига да се съхранява в среда с висока влажност. Поради този факт, при използването на хидрогел със средна вискозност, допълнителното модифициране на рецептата за подобряване на крослинкинга не е необходимо.

4.3.4. Частичната екстракция на хидрогел от хистологичен препарат чрез фиксиране с формалин и удължена рехидратация редуцират фоновото оцветяване и подобряват условията за хистологичен анализ

При оцветяване на хидрогела лапонитът играе ролята на Мордант, който образува химически връзки с багрилото, използвано за оцветяване, което води до значително фонов оцветяване. Освен това самият лапонит се визуализира като люспеста субстанция, променяща значително флуоресцентните свойства на съдържащия го хидрогел. Частична екстракция на лапонита от хидрогела може да бъде постигната чрез фиксиране чрез накапване с формалин, както и чрез удължена фаза на рехидратация непосредствено преди оцветяването на препарата. Това води до значително редуциране на фоновото оцветяване, което подобрява условията за наблюдение на клетки и цитологичен анализ.

4.3.5. Рентгенологичните свойства на хидрогела могат да бъдат променени чрез коригиране на концентрацията на лапонит

Поглъщането на рентгенови лъчи от определен материал зависи от неговата атомна маса и атомна плътност – колкото по-големи са те, толкова по-висока ще е стойността на вокселите в ХЕ. 3D принтираните матрици показаха като цяло по-високи средни стойности на ХЕ от

натуралната кост. Това се дължи в значителна степен от химичните свойства на лапонит – той е изграден от кристали, съдържащи литий, натрий, магнезий и силиций, които поради по-високата си атомна плътност, поглъщат рентгеновите лъчи по-добре от полимерните съставки на гела и допринасят за по-високата радиологична плътност на хидрогела, респективно по-високи стойности на ХЕ. Промяна в концентрацията на лапонит би увеличила или намалила рентгенологичната плътност на съдържащия го хидрогел значително повече от промяна в полизахаридните му съставки, което може да се използва за прецизиране на формулата и постигане на хидрогел с висока радиологична достоверност.

Например използването на композитен PLA филament, съдържащ железни наночастици, може при 3D принтиране да пресъздаде структура със сходни стойности на Хаунсфийлдовите единици като кортикалната кост [49], гипс-съдържащ композит може да пресъздаде костните структури в торакса [50], а мед-съдържащите композити да се използват като болус-фантом в радиотерапията [51]. Съдържанието на използваните композитни смеси може да бъде изчислено чрез физическата плътност, ефективния атомен номер и електронната плътност на използваните материали, а точното съотношение между използваните материали – чрез КТ сканиране на калибрационни кубове-фантоми и анализ на хистограмата на получените датасетове [52].

4.3.6. Полученият композитен наносиликатен хидрогел е обещаващ тъкан-еквивалентен материал за изработването чрез 3D принтиране на антропоморфни фантоми за комплексни изследвания върху трабекуларната костна тъкан

Полизахаридно-наносиликатните композитни хидрогелове са добре проучен клас материали, които са подходяща среда за развитието на различни клетки на съединителната тъкан. Наносиликатът лапонит е особено обещаващ за изработването на биоматрици, които

стимулират остеогенната диференциация на мезенхимни стволови клетки дори когато в хранителната среда отсъстват сигнални молекули, директно стимулиращи костообразуващите сигнални пътища. Miao et al. синтезират композитен хидрогел, съдържащ два полимера (10 w/v% желатин и 1 w/v% алгинат) и 2 w/v% лапонит, които използват като биомастило за директно екструдирало 3D принтиране на биоматрици (четириъгълни скафолди) [345]. В биомастилото екипът включва добити от костен мозък мезенхимни стволови клетки, които след полимеризация с CaCl_2 се оказват енкапсулирани в мрежата от полимерни влакна. След инкубация при 37 °C и 5% CO_2 в хранителна среда α -MEM, обогатена единствено с 10% FBS, последвалите изследвания категорично установяват повишена пролиферация и остеогенна диференциация на клетките, свързана с активиране на сигналната система фосфоинозитид-3-киназа/Акт (PI3K/ Akt) [346].

Повишеният остеогенен потенциал на използвания хидрогел е съчетан с добри възможности за директно екструдирало 3D принтиране и възможността за изработване на сложни порьозни триизмерни обекти с нужните качества да послужат като биоматрици за тъканно инженерство на костна тъкан.

Всеки един хидрогел, използван за изграждането на биоматрици, трябва да съдържа свързващи групи, които да обезпечат адхезията [347] на използваните за култивиране клетки. Обикновено това се постига с добавяне към рецептата на фибронектин [348] и ламинин [349] или RGD мотиви [350]. Екипът на Gaharwar et al. използва хидрогел, съдържащ полиетилен оксид и лапонит, върху които култивират миши проosteобласти [351]. Установява се много добра адхезия, разпространение и пролиферация на заселените клетки, както и повишена активност на алкална фосфатаза и изразена *in vitro* минерализация. Посочените ефекти се засилват с повишаване концентрацията на наносиликата, като полярните кристали на лапонита играят ролята за свързващи центрове за култивираните върху гела клетки.

В проведените от нас експерименти използваният хидрогел показва добри възможности за оцветяване със стандартни хистологични протоколи и рентгенологични свойства (средна стойност в ХЕ), близки до тези на спонгиозната костна тъкан. Тези качества,

съчетани с подобрените биологични свойства и добрата 3D принтеруемост, предоставят чудесни условия за използването на биомасилото като тъкан-еквивалентен материал за изработването на мултимодални антропоморфни фантоми, които да послужат за комплексни изследвания в динамика на различни физиологични и патологични процеси, протичащи в костната тъкан, както и тяхното отражение върху рентгенологичните ѝ свойства. Това отваря нови възможности за генерирането на подобрени рентгенологични протоколи за различни специфични и редки заболявания, както и онкологични заболявания, свързани с костната тъкан. Посочените антропоморфни фантоми биха могли да послужат и като опитен модел за тестване на различни терапевтични методики, базирани на електрически и лъчисти енергийни фактори, които биха могли да бъдат директно изпробвани върху 3D принтирана костна матрица, а ефектите им върху клетъчната популация биха могли да бъдат изследвани с оцветителни, хистохимични, имунофлуоресцентни и пр. методака. Затова изследванията ни върху качествата на получения хидрогел ще продължат и след приключването на настоящия труд.

4.4. Изработване на антропоморфен фантом чрез VbV 3D принтиране

При проведения радиологичен анализ бе отчетена значителна разлика в разпределението на ХЕ между обекта-първоизточник (проксимален хумерус) и получените антропоморфни образни фантоми. Тази разлика се дължи основно на две причини:

- По време на изследването VbV технологията беше в процес на разработване както в софтуерно, така и в хардуерно отношение. Освен това използваният за изработването на образните фантоми материал (композит, съдържащ термополимер и инертен материал) беше много труден за работа. 3D принтирането на обектите беше придружено с множество инциденти като късане на полимерна нишка или свръхекструдирание на материал, което доведе до появата на множество дискретни артефакти, променящи в известна степен разпределението на ХЕ, даващо като резултат известна разлика

с обекта-първоизточник. В последните две години технологията претърпя значително развитие и в голяма степен получаването на дефекти, свързани с технологията, беше елиминирано.

- При сегментирането и подготовката на датасета за 3D принтиране, експерименталният MATLAB базиран софтуер не беше в състояние да импортира изображенията в DICOM формат. Това се дължеше на софтуерен бъг, който беше отстранен в процеса на разработване. За да се импортират изображенията, беше нужно да се преобразуват в JPEG формат, като при сегментацията и принтирането на обектите бяха използвани стойности от Сивата скала, а не ХЕ. По време на рентгенологичния анализ бяха използвани ХЕ вместо стойности на Сивата скала, което доведе до известна разлика между обекта-първоизточник и получените фантоми.

За да оценим адекватно възможностите на VbV 3D принтирането за изработването на антропоморфни образни фантоми, е нужно изследването да бъде повторено с нов тестов обект, хардуерно обновен 3D принтер и подобрена версия на софтуера. За да получим ясни и убедителни резултати, ние планираме да приложим следните мерки:

В предстоящия експеримент ще използваме човешки калканеус, от който ще бъде изработен фантом по Методика 2, чиито рентгенологични свойства ще бъдат сравнени с тези на обекта-първоизточник чрез същата методика за анализ, използвана в описания в настоящия труд методика. Изборът на петната кост за обект на изследването е продиктуван от специфичното разпределение на спонгиозното костно вещество в нея – в централната част на костта се локализира зона на ниска плътност на костното вещество, разположена между основните снопове от костни гредички. Тази зона се нарича неутрален триъгълник на Ward и представлява важна особеност, определяща спецификите на различните травматични увреждания на петната кост. Ние желаем да установим в каква степен този триъгълник ще бъде възпроизведен в получения образен фантом.

Импортираният датасет ще бъде в DICOM формат, за да няма разминаване между използваните за принтиране и анализ стойности за интерпретация на изображенията.

Чрез посочените мерки ще допълним описаните в настоящия труд резултати в процеса на разработване и изследване на тази нова технология за 3D принтиране.

ИЗВОДИ

1. Антропоморфните 3D принтирани модели са точен инструмент за морфологични изследвания и могат да бъдат генерирани чрез софтуер с отворен достъп. Изработени от термополимери като PLA, те показват висока пространствена точност и незначителна термална деформация.
2. Пациент-специфичните персонализирани модели са ефикасен инструмент за предоперативно планиране на сложни ортопедични операции в областта на таза.
3. Наносиликатните хидрогелове демонстрират отлични физико-химични, хистологични и рентгенологични свойства и могат да бъдат формирани точно и надеждно във физически обекти със сложна триизмерна структура чрез инжекционно екструдирало 3D принтиране.
4. Изработените чрез VbV 3D принтиране антропоморфни образни фантоми показват по-висока рентгенологична плътност от естествената кост, но линейният им профил показва обща тенденция в разпределението на стойностите на HE с тази на естествената кост.

СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Разработена е методика за генериране на анатомични модели от КТ изображения, тяхното изработване като антропоморфни 3D принтирани модели и валидирането им чрез кадавърна методика за качествен контрол.
2. Посочените антропоморфни 3D принтирани модели са успешно използвани за предоперативно планиране на сложни ортопедични операции.
3. Разработена е рецепта за биомастило с биологични и рентгенологични свойства, близки до тези на костната тъкан,

подходящо за изработването на сложни триизмерни обекти чрез инжекционно екструдиращо 3D принтиране.

4. Изследвани са стандартни хистологични протоколи за оцветяване на сложни триизмерни обекти, произведени с разработването биомасило.
5. Изследван е алгоритъм за рентгенологичен анализ на сложни триизмерни обекти, произведени с разработването биомасило.
6. Използвана е иновационна методика за VbV 3D принтиране на образни фантоми, симулиращи костната тъкан, и са изследвани техните рентгенологични свойства, сравнени с тези на костната тъкан.

ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Valchanov PS; 3D Printing in medicine-principles, applications and challenges; Scripta Scientifica Vox Studentium 1 (1), 18-22; 2017/12/6
2. Valchanov P, Pavlov S, Chervenkov T. „Composite hydrogels and their application for 3D Bioprinting in the Regenerative medicine”, IEEE, 2020 International Conference on Biomedical Innovations and Applications (BIA), Page 25–28, 2020/9/24.
3. Valchanov P. and S. Pavlov, „High Fidelity Anthropomorphic 3D Printed Models – Accuracy, Precision and Quality Control,“ 2022 E-Health and Bioengineering Conference (EHB), Iasi, Romania, 2022, pp. 1–4

НАУЧНИ ДОКЛАДИ И СЪОБЩЕНИЯ, ИЗНЕСЕНИ НА НАУЧНИ КОНФЕРЕНЦИИ, КОНГРЕСИ И СИМПОЗИУМИ

1. XXIV National congress of the Bulgarian Anatomical Society – May 31 – June 02, 2019, Stara Zagora, Bulgaria
2. 5th Magnetic Resonance Balkan Outreach, Sofia, Bulgaria, 12–14 September 2019
3. 2020 International Conference on Biomedical Innovations and Applications (BIA)
4. VIII Национална конференция с международно участие „Морфологични дни“ 10–12 юни 2022 г.
5. IEEE International Conference on e-Health and Bioengineering; ENB 2022 – 10-th Edition; 17–19 November 2022, Hybrid Conference, Iasi – Romania;
6. XV Национален Конгрес на Българската ортопедична и травматологична асоциация; 29 септември – 02 октомври 2022 г., гр. Бургас.

БЛАГОДАРНОСТ И ФИНАНСИРАНЕ

Благодаря на научните си ръководители доц. Стоян Павлов и доц. Трифон Червенков за тяхната подкрепа и безценни съвети по време на съвместната ни работа в тази авангардна трудна и недокрай проучена област на науката.

Благодаря на проф. Кристина Близнакова, доц. Живко Близнаков, инж. Николай Дуков, инж. Никифорос Окалидис и целия екип на MORPHE за тяхното техническо и методично съдействие при изграждането на рентгенологични фантоми с VbV 3D принтиране.

Благодаря на д-р Андреас Контни и инж. Николай Дуков за техническата им помощ при 3D принтирането на биомастилото.

Благодаря на всички колеги от Катедрата по анатомия и клетъчна биология на Медицински университет – Варна за тяхното търпение и подкрепа по време на работата по дисертацията ми.

Благодаря на Галина Ангелова, техническия организатор на Каредрата, за нейната помощ да се справя с безкрайната документация.

Благодаря на екипа на хистологичната лаборатория към Катедрата за помоща при приготвянето на хистологичните препарати.

Благодаря на студентите Ивайло Димитров и Антъни Саджан за морфологичните измервания.

Благодаря на проф. Антон Тончев за това, че направи целия този труд възможен, наемайки ме на работа в Катедрата.

Благодаря на всички, които не ми попречиха да завърша своята дисертация.

Проучванията, описани в този труд, бяха финансирани от следните проекти:

Проект по Фонд „Наука“ № 19027 „Биопринтиране и морфологичен анализ на 3D матрица за биосинтетични импланти с повишен остеогенен потенциал“ – Конкурсна сесия 2019 г.

Проект „Физически антропоморфни модели на млечни жлези и технология за тяхното производство“ (Physical breast anthropomorphic models and technology for their production (PHENOMENO)); ръководител доц. д-р инж. Кристина Близнакова – финансиран с грант № 101008020 по дейности “Marie Skłodowska-Curie “ на Програма за изследвания и иновации на Европейския Съюз „Хоризонт 2020“.

БИБЛИОГРАФИЯ

- [1] V. M. Vaz and L. Kumar, „3D Printing as a Promising Tool in Personalized Medicine“, AAPS PharmSciTech, vol. 22, no. 1, p. 49, Jan. 2021, doi: 10.1208/s12249-020-01905-8.
- [2] A. Ganguli *et al.*, „3D printing for preoperative planning and surgical training: a review“, *Biomedical Microdevices*, vol. 20, no. 3, p. 65, Sep. 2018, doi: 10.1007/s10544-018-0301-9.
- [3] S. Naahidi *et al.*, „Biocompatibility of hydrogel-based scaffolds for tissue engineering applications“, *Biotechnology Advances*, vol. 35, no. 5, pp. 530–544, Sep. 2017, doi: 10.1016/j.biotechadv.2017.05.006.
- [4] H.-G. Yi, H. Lee, and D.-W. Cho, „3D Printing of Organs-On-Chips“, *Bioengineering*, vol. 4, no. 4, Jan. 2017, doi: 10.3390/bioengineering4010010.

- [5] J. S. Lee, J. M. Hong, J. W. Jung, J. H. Shim, J. H. Oh, and D. W. Cho, „3D printing of composite tissue with complex shape applied to ear regeneration“, *Biofabrication*, vol. 6, no. 2, 2014, doi: 10.1088/17585082/6/2/024103.
- [6] S. W. Bae *et al.*, „3D bioprinted artificial trachea with epithelial cells and chondrogenic-differentiated bone marrow-derived mesenchymal stem cells“, *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 19, no. 6, Jun. 2018, doi: 10.3390/ijms19061624.
- [7] C. S. Ong *et al.*, „3D and 4D bioprinting of the myocardium: Current approaches, challenges, and future prospects“, *BioMed Research International*, vol. 2018, Apr. 2018, doi: 10.1155/2018/6497242.
- [8] A. Isaacson, S. Swioklo, and C. J. Connon, „3D bioprinting of a corneal stroma equivalent“, *Experimental Eye Research*, vol. 173, pp. 188–193, Aug. 2018, doi: 10.1016/j.exer.2018.05.010.
- [9] N. Mori, Y. Akagi, Y. Imai, Y. Takayama, and Y. S. Kida, „Fabrication of Perfusible Vascular Channels and Capillaries in 3D Liver-like Tissue“, *Scientific Reports*, vol. 10, no. 1, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41598-02062286-3.
- [10] F. Zhou *et al.*, „Rapid printing of bio-inspired 3D tissue constructs for skin regeneration“, *Biomaterials*, vol. 258, p. 120287, Nov. 2020, doi: 10.1016/j.biomaterials.2020.120287.
- [11] T. Genova, I. Roato, M. Carossa, C. Motta, D. Cavagnetto, and F. Mussano, „Advances on bone substitutes through 3d bioprinting“, *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 21, no. 19, pp. 1–28, Oct. 2020, doi: 10.3390/ijms21197012.
- [12] N. Hallfors *et al.*, „Multi-compartment lymph-node-on-a-chip enables measurement of immune cell motility in response to drugs“, *Bioengineering*, vol. 8, no. 2, pp. 1–15, Feb. 2021, doi: 10.3390/bioengineering8020019.
- [13] S.-R. Park *et al.*, „Development of a novel dual reproductive organ on a chip: recapitulating bidirectional endocrine crosstalk between the uterine endometrium and the ovary“, *Biofabrication*, vol. 13, no. 1, Jan. 2021, doi: 10.1088/1758-5090/abbd29.
- [14] S. Kim and S. Takayama, „Organ-on-a-chip and the kidney“, *Kidney Research and Clinical Practice*, vol. 34, no. 3, pp. 165–169, Sep. 2015, doi: 10.1016/j.krcp.2015.08.001.

- [15] A. Essaouiba *et al.*, „Development of a pancreas-liver organ-on-chip coculture model for organ-to-organ interaction studies“, *Biochemical Engineering Journal*, vol. 164, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.bej.2020.107783.
- [16] A. Atala, S. B. Bauer, S. Soker, J. J. Yoo, and A. B. Retik, „Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty“, *www.thelancet.com*, vol. 367, 2006, doi: 10.1016/S0140.
- [17] S. V. Murphy and A. Atala, „3D bioprinting of tissues and organs“, *Nature Biotechnology*, vol. 32, no. 8, Aug. 2014, doi: 10.1038/nbt.2958.
- [18] M. Mao *et al.*, „The Emerging Frontiers and Applications of High-Resolution 3D Printing“, *Micromachines*, vol. 8, no. 4, p. 113, Apr. 2017, doi: 10.3390/mi8040113.
- [19] A. E. M. Eltorai, E. Nguyen, and A. H. Daniels, „Three-Dimensional Printing in Orthopedic Surgery“, *Orthopedics*, vol. 38, no. 11, Nov. 2015, doi: 10.3928/01477447-20151016-05.
- [20] M. LoPresti, B. Daniels, E. P. Buchanan, L. Monson, and S. Lam, „Virtual surgical planning and 3D printing in repeat calvarial vault reconstruction for craniosynostosis: technical note“, *Journal of Neurosurgery: Pediatrics*, vol. 19, no. 4, Apr. 2017, doi: 10.3171/2016.10.PEDS16301.
- [21] A. Dzian, J. Živčák, R. Penciak, and R. Hudák, „Implantation of a 3D-printed titanium sternum in a patient with a sternal tumor“, *World Journal of Surgical Oncology*, vol. 16, no. 1, Dec. 2018, doi: 10.1186/s12957-0181315-8.
- [22] J. Kang *et al.*, „Custom design and biomechanical analysis of 3D-printed PEEK rib prostheses“, *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, vol. 17, no. 4, Aug. 2018, doi: 10.1007/s10237-018-1015-x.
- [23] V. Patel *et al.*, „Minimally invasive lateral transiliac sacroiliac joint fusion using 3D-printed triangular titanium implants“, *Medical Devices: Evidence and Research*, vol. Volume 12, May 2019, doi: 10.2147/MDER.S205812.
- [24] Z. Jing *et al.*, „Functionalization of 3D-printed titanium alloy orthopedic implants: a literature review“, *Biomedical Materials*, vol. 15, no. 5, Aug. 2020, doi: 10.1088/1748-605X/ab9078.
- [25] A. Haleem and M. Javaid, „Polyether ether ketone (PEEK) and its 3D printed implants applications in medical field: An overview“, *Clinical Epidemiology and Global Health*, vol. 7, no. 4, Dec. 2019, doi: 10.1016/j.cegh.2019.01.003.
- [26] R. Masaeli, K. Zandsalimi, M. Rasoulboroujeni, and L. Tayebi, „Challenges in Three-Dimensional Printing of Bone Substitutes“, *Tissue*

Engineering Part B: Reviews, vol. 25, no. 5, Oct. 2019, doi: 10.1089/ten.teb.2018.0381.

- [27] M. duo Mu *et al.*, „Three dimension printing talar prostheses for total replacement in talar necrosis and collapse“, *International Orthopaedics*, vol. 45, no. 9, pp. 2313–2321, Sep. 2021, doi: 10.1007/s00264-021-04992-9.
- [28] R. Kikinis, S. D. Pieper, and K. G. Vosburgh, „3D Slicer: A Platform for Subject-Specific Image Analysis, Visualization, and Clinical Support“, in *Intraoperative Imaging and Image-Guided Therapy*, New York, NY: Springer New York, 2014, pp. 277–289. doi: 10.1007/978-1-4614-76573_19.
- [29] „Autodesk Meshmixer.” [Online]. Available: <https://www.meshmixer.com/>
- [30] „PrusaSlicer.” Prusa Research. [Online]. Available: <https://www.prusa3d.com/prusaslicer/>
- [31] J. Schindelin *et al.*, „Fiji: an open-source platform for biological-image analysis“, *Nat Methods*, vol. 9, no. 7, pp. 676–682, Jul. 2012, doi: 10.1038/nmeth.2019.
- [32] K. M. Ogden, C. Aslan, N. Ordway, D. Diallo, G. Tillapaugh-Fay, and P. Soman, „Factors Affecting Dimensional Accuracy of 3-D Printed Anatomical Structures Derived from CT Data“, *J Digit Imaging*, vol. 28, no. 6, pp. 654–663, Dec. 2015, doi: 10.1007/s10278-015-9803-7.
- [33] C. Petropolis, D. Kozan, and L. Sigurdson, „Accuracy of medical models made by consumer-grade fused deposition modelling printers“, *CAN J PLAST SURG*, vol. 23, no. 2, 2015, doi: 10.4172/plastic-surgery.1000912.
- [34] F. Maschio, M. Pandya, and R. Olszewski, „Experimental Validation of Plastic Mandible Models Produced by a ‘Low-Cost’ 3-Dimensional Fused Deposition Modeling Printer“, *Med Sci Monit*, vol. 22, pp. 943–957, Mar. 2016, doi: 10.12659/MSM.895656.
- [35] P. Valchanov and S. Pavlov, „High Fidelity Anthropomorphic 3D Printed Models – Accuracy, Precision and Quality Control“, in *2022 E-Health and Bioengineering Conference (EHB)*, Iasi, Romania: IEEE, Nov. 2022, pp. 1–4. doi: 10.1109/EHB55594.2022.9991424.
- [36] M. Salmi, K. S. Paloheimo, J. Tuomi, J. Wolff, and A. Mäkitie, „Accuracy of medical models made by additive manufacturing (rapid manufacturing)“, *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, vol. 41, no. 7, pp. 603–609, Oct. 2013, doi: 10.1016/j.jcms.2012.11.041.

- [37] D. N. Silva, M. Gerhardt de Oliveira, E. Meurer, M. I. Meurer, J. V. Lopes da Silva, and A. Santa-Bárbara, „Dimensional error in selective laser sintering and 3D-printing of models for craniomaxillary anatomy reconstruction“, *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, vol. 36, no. 8, pp. 443–449, Dec. 2008, doi: 10.1016/j.jcms.2008.04.003.
- [38] R. Olszewski, P. Szymor, and M. Kozakiewicz, „Accuracy of three-dimensional, paper-based models generated using a low-cost, three-dimensional printer“, *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, vol. 42, no. 8, pp. 1847–1852, Dec. 2014, doi: 10.1016/j.jcms.2014.07.002.
- [39] A. Nizam, R. N. Gopal, L. Naing, A. B. Hakim, and A. R. Samsudin, „Dimensional Accuracy of the Skull Models Produced by RapidPrototyping Technology Using Stereolithography Apparatus“, *Archives of Orofacial Sciences*, vol. 2006, no. 1, pp. 60–66.
- [40] J.-Y. Choi *et al.*, „Analysis of errors in medical rapid prototyping models“, *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, vol. 31, no. 1, pp. 23–32, Feb. 2002, doi: 10.1054/ijom.2000.0135.
- [41] J. W. Stansbury and M. J. Idacavage, „3D printing with polymers: Challenges among expanding options and opportunities“, *Dental Materials*, vol. 32, no. 1, pp. 54–64, Jan. 2016, doi: 10.1016/J.DENTAL.2015.09.018.
- [42] N. Saba and M. Jawaid, „A review on thermomechanical properties of polymers and fibers reinforced polymer composites“, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, vol. 67, pp. 1–11, Nov. 2018, doi: 10.1016/J.IIEC.2018.06.018.
- [43] M. Galvez *et al.*, „Use of Three-dimensional Printing in Orthopaedic Surgical Planning“, *JAAOS: Global Research and Reviews*, vol. 2, no. 5, p. e071, May 2018, doi: 10.5435/jaaosglobal-d-17-00071.
- [44] K. M. Meess *et al.*, „3D printed abdominal aortic aneurysm phantom for image guided surgical planning with a patient specific fenestrated endovascular graft system“, T. S. Cook and J. Zhang, Eds., Mar. 2017, p. 101380P. doi: 10.1117/12.2253902.
- [45] J. S. Witowski, M. Pędziwiatr, P. Major, and A. Budzyński, „Cost-effective, personalized, 3D-printed liver model for preoperative planning before laparoscopic liver hemihepatectomy for colorectal cancer metastases“, *International Journal of Computer Assisted Radiology and Surgery*, vol. 12, no. 12, pp. 2047–2054, Dec. 2017, doi: 10.1007/s11548-017-1527-3.

- [46] E. Kudryavtseva, V. Popov, G. Muller-Kamskii, E. Zakurinova, and V. Kovalev, „Advantages of 3D Printing for Gynecology and Obstetrics: Brief Review of Applications, Technologies, and Prospects“, in *2020 IEEE 10th International Conference Nanomaterials: Applications & Properties (NAP)*, IEEE, Nov. 2020, pp. 02SAMA09-1-02SAMA09-5. doi: 10.1109/NAP51477.2020.9309602.
- [47] R. Ratinam, M. Quayle, J. Crock, M. Lazarus, Q. Fogg, and P. McMenamin, „Challenges in creating dissectible anatomical 3D prints for surgical teaching“, *Journal of Anatomy*, vol. 234, no. 4, pp. 419–437, Apr. 2019, doi: 10.1111/joa.12934.
- [48] H. Tomás, C. S. Alves, and J. Rodrigues, „Laponite®: A key nanoplatform for biomedical applications?“, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, vol. 14, no. 7, pp. 2407–2420, Oct. 2018, doi: 10.1016/j.nano.2017.04.016.
- [49] R. Tino, A. Yeo, M. Brandt, M. Leary, and T. Kron, „The interlace deposition method of bone equivalent material extrusion 3D printing for imaging in radiotherapy“, *Materials & Design*, vol. 199, p. 109439, Feb. 2021, doi: 10.1016/J.MATDES.2020.109439.
- [50] C. Hazelaar *et al.*, „Using 3D printing techniques to create an anthropomorphic thorax phantom for medical imaging purposes“, *Medical Physics*, vol. 45, no. 1, pp. 92–100, Jan. 2018, doi: 10.1002/mp.12644.
- [51] E. D. Ehler and D. A. Sterling, „3D printed copper-plastic composite material for use as a radiotherapy bolus“, *Physica Medica*, vol. 76, pp. 202–206, Aug. 2020, doi: 10.1016/j.ejmp.2020.07.008.
- [52] N. Okkalidis, C. Chatzigeorgiou, and D. Okkalides, „Assessment of 11 Available Materials With Custom Three-Dimensional-Printing Patterns for the Simulation of Muscle, Fat, and Lung Hounsfield Units in Patient-Specific Phantoms“, *Journal of Engineering and Science in Medical Diagnostics and Therapy*, vol. 1, no. 1, Feb. 2018, doi: 10.1115/1.4038228.
- [345] S. Miao *et al.*, „A 3D bioprinted nano-laponite hydrogel construct promotes osteogenesis by activating PI3K/AKT signaling pathway“, *Materials Today Bio*, vol. 16, p. 100342, Dec. 2022, doi: 10.1016/j.mtbio.2022.100342.
- [346] B. A. Hemmings and D. F. Restuccia, „PI3K-PKB/Akt Pathway“, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, vol. 4, no. 9, pp. a011189–a011189, Sep. 2012, doi: 10.1101/cshperspect.a011189.

- [347] G. Bovone, O. Y. Dudaryeva, B. Marco-Dufort, and M. W. Tibbitt, „Engineering Hydrogel Adhesion for Biomedical Applications via Chemical Design of the Junction“, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, vol. 7, no. 9, pp. 4048–4076, Sep. 2021, doi: 10.1021/acsbiomaterials.0c01677.
- [348] C. Palomino-Durand, E. Pauthé, and A. Gand, „Fibronectin-Enriched Biomaterials, Biofunctionalization, and Proactivity: A Review“, *Applied Sciences*, vol. 11, no. 24, p. 12111, Dec. 2021, doi: 10.3390/app112412111.
- [349] M. Aumailley, „The laminin family“, *Cell Adhesion & Migration*, vol. 7, no. 1, pp. 48–55, Jan. 2013, doi: 10.4161/cam.22826.
- [350] M. Yang *et al.*, „Function and Mechanism of RGD in Bone and Cartilage Tissue Engineering“, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 9, p. 773636, Dec. 2021, doi: 10.3389/fbioe.2021.773636.
- [351] A. K. Gaharwar, P. J. Schexnailder, B. P. Kline, and G. Schmidt, „Assessment of using Laponite® cross-linked poly(ethylene oxide) for controlled cell adhesion and mineralization“, *Acta Biomaterialia*, vol. 7, no. 2, pp. 568–577, Feb. 2011, doi: 10.1016/j.actbio.2010.09.015.