

Vilniaus universiteto  
Fizikos fakulteto  
Lazerinių tyrimų centras

Giedrė Grigalevičiūtė

ELASTOMERO 3D MIKROFORMAVIMO FEMTOSEKUNDINE LAZERINE  
SPINDULIUOTE TYRIMAS

Magistrantūros studijų baigiamasis darbas

Lazerinės technologijos studijų programa

Studentas

Giedrė Grigalevičiūtė

Leista ginti

2019-05-23

Darbo vadovas

dr. Mangirdas Malinauskas

Konsultantas

dr. Daiva Baltriukienė

Recenzentas

dr. Dalia Kaškelytė

Lazerinių tyrimų centro direktorius

l.e.p. dr. Rytis Butkus

Vilnius 2019

# Turinys

Įvadas .....	1
1 Literatūros apžvalga .....	3
1.1 Lazerinis formavimas .....	3
1.1.1 Netiesinė sugertis .....	3
1.1.2 3D lazerinė litografija .....	4
1.1.3 3D lazerinės litografijos įranga.....	5
1.1.4 Erdvinė skyra .....	6
1.2 Polimerai ir polimerizacija .....	7
1.2.1 Polimerų klasifikacija .....	7
1.2.2 Polimerizacijos mechanizmai .....	8
1.2.3 Fotoinicijavimo mechanizmai .....	10
1.2.4 Medžiagos tinkamumo fotopolimerizacijai kriterijai.....	11
1.2.5 Medžiagų pavyzdžiai .....	11
1.3 3D mikrodariniai audinių inžinerijos taikymams .....	12
1.3.1 Biosutaikomų karkasų mikro- ir makroarchitektūra.....	13
2 Eksperimentinė dalis .....	16
2.1 Naudota sistema ir medžiagos .....	16
2.1.1 Femtosekundinio lazerio sistema.....	16
2.1.2 UV-PDMS medžiagos savybės .....	16
2.2 Naudota prepolimero lašo konfigūracija .....	18
2.3 Darinių formavimas.....	18
3 Rezultatai ir jų aptarimas .....	23
3.1 UV-PDMS polimerizacijos parametrų testavimas: naudojant 0,45 NA ir 0,8 NA objektyvus.....	23
3.2 UV-PDMS polimerizacijos parametrų testavimas: naudojant 1,4 NA objektyvą...	25
3.3 Karkasų iš UV-PDMS formavimas audinių inžinerijos taikymams.....	31
Išvados .....	31
Literatūros sąrašas .....	36
Konferencijos ir publikacijos .....	39
Santrauka .....	41
Summary .....	42

# Įvadas

Gamybos technologija, įgalinanti 3D polimerinių mikrodarinių formavimą, naudojant aštriai sufokusuotą ultraspartaus lazerio spindulį, pirmą kartą buvo pademonstruota 1997 metais, Maruo et al. publikacijoje ir nuo to laiko ši technologija buvo sparčiai tobulinama [1]. Šviesos inicijuojama polimerizacijos reakcija jau plačiai naudojama pramonės kasdienybėje, taip pat daug žadančiuose laboratoriniuose tyrimuose. Daugiafotone polimerizacija parenta 3D lazerinė litografija (3DLL) gali būti apibūdinama kaip universalus įrankis trimačiams mikrodariniams iš fotojautrios dervos gaminti, nenaudojant kaukių. Lankstumas apdirbamų medžiagų pasirinkime, galimybė pagaminti trimačius, sudėtingos vidinės geometrijos ir įvairaus mastelio mikrodarinius atveria duris į daugybę naujų taikymo sričių, pavyzdžiui, medicina, optika, fotonika, mikromechanika, šviesolaidžių fizika. [2]

Minėtieji 3DLL išskirtiniai privalumai yra itin svarbūs technologijos pritaikymui naujai besivystančiai sričiai - audinių inžinerijai. Pagrindinė šios srities idėja - laboratorijoje sukurtas dirbtinis audinys, kuomet 3D karkasas užsėjamas konkreto paciento ląstelėmis, o vėliau toks darinys implantuojamas į pažeistą paciento organo vietą [3]. Medžiaga, iš kurios pagaminamas karkasas, ir jo vidinė 3D mikroarchitektūra yra vieni svarbiausių parametru sėkmingai audinių inžinerijos plėtrai.

Nepaisant to, kad 3DLL gali būti naudojama kaip universalus įrankis įvairiems mikrodariniams gaminti [4], egzistuoja elastomerinių medžiagų trūkumas, kurias būtų galima polimerizuoti, o polimerizuotus darinius pritaikyti audinių inžinerijoje. Viena iš polimerizacijai naudojamų elastomerinių dervų yra polidimetil-siloksanas (PDMS). Standartinės biosutaikomos PDMS medžiagos 3D mikroformavimas femtosekundine spinduliuote parodytas S. Rekštytės et. al. tyrimuose [5]. Elastomerinė UV šviesai jautrinta PDMS versija (UV-PDMS) pasižymi mažesniu traukimusi ir paprastesniu formavimu dėl pridėtinų jautrumą šviesai didinančių elementų. Kadangi standartinė PDMS medžiaga yra biosutaikoma, todėl tikėtina, kad nepaisant mums nežinomų medžiagos priedų, UV-PDMS irgi yra biosutaikoma, tačiau tai nėra tirta. Ištyrus mikrodarinių iš šios medžiagos biosutaikomumą, medžiaga galėtų būti potencialiai panaudojama audinių bioinžinerijos tikslams.

Šio darbo tikslas buvo ištirti UV-PDMS polimerizavimo 515nm bangos ilgio femtosekundine spinduliuote ypatumus ir tinkamumą audinių inžinerijos taikymams.

Šiam tikslui įgyvendinti buvo išsikelti uždaviniai:

1. Ištirti UV-PDMS formavimo ypatumus, skirtingomis ekspozicijos sąlygomis (fokusavimo, dozės, skenavimo), polimerizuojant trimačius darinius.
2. Suformuoti trimačius karkasus ir ištirti jų biosutaikomumą *in vitro*.

# 1 Literatūros apžvalga

## 1.1 Lazerinis formavimas

### 1.1.1 Netiesinė sugertis

Esant pakankamai dideliame spinduliuotės intensyvumui ( $\text{TW}/\text{cm}^2$  eilės), konkrečiam bangos ilgiui skaidri medžiaga vienu metu gali sugerti kelis fotonus, kurių suminė energija lygi draustinės juostos tarpo energijai. Toks procesas vadinamas netiesine sugertimi, o pats reiškinys gali būti apibūdinamas kaip optinio pralaidumo kitimas pagal lazerio spinduliuotės intensyvumą. [6]

Daugiafotonę sugertį galima išskirti į dvifotonę sugertį ir aukštesniųjų eilių sugertį. Kaip jau pats dvifotonės sugerties pavadinimas leidžia suprasti, šio proceso metu iš pagrindinės sistemos būsenos į sužadintą vienalaikiškai sugeriami du fotonai. Tokiu atveju sistemos kvantmechaninė būsena pasikeičia. Gali būti sugeriami tiek du vienodo dažnio, tiek du skirtingo dažnio fotonai, abu šiuos tipus vienija tai, jog sužadinimas vyksta per virtualius lygmenis, pasižymintį labai trumpa gyvavimo trukme. [6]

Jei vyksta dvifotonė sugertis, optinio intensyvumo nuostolius pluoštui sklindant medžiagoje galima aprašyti lygtimi:

$$dI/dz = -\alpha I - \beta I^2, \quad (1)$$

čia  $I$  - intensyvumas,  $\alpha$  - tiesinės sugerties koeficientas,  $\beta$  - dvifotonės sugerties koeficientas, kuris yra makroskopinis parametras, nusakantis medžiagos savybes ir siejamas su dvifotonės sugerties skerspjūviu:

$$\sigma_2 = \frac{\hbar\omega\beta}{N_0}, \quad (2)$$

čia  $\hbar\omega$  - fotono energija,  $N_0$  - medžiagos atomų ir molekulių tankis. [6]

Dvifotonę sugertį galima susieti su menamąja kubinio netiesinio optinio jautrio dalimi:

$$\beta = \frac{3\pi}{\epsilon_0 n^2 c \lambda} * \text{Im}(\chi^{(3)}). \quad (3)$$

čia  $\chi^{(3)}$  - kubinis optinis jautris.

Jei spinduliuotės intensyvumas pakankamai didelis, gali pasireikšti ir aukštesniųjų eilių netiesinė sugertis, kurios metu sugeriami trys ar daugiau fotonų vienu metu. Pavyzdžiui, trifotonės sugerties atveju, formulėje, aprašančioje spinduliuotės intensyvumo kitimą (1), vietoj dvifotonės sugerties koeficiento bus trifotonės sugerties koeficientas, kuris gali būti siejamas su penktosios eilės dielektrinio jautrio menamąja dalimi. Tačiau dvifotonės sugerties atvejis yra tikėtiniausias, kadangi daugiafotonų procesų tikimybė mažėja, kai proceso kartotinumai didėja [6]

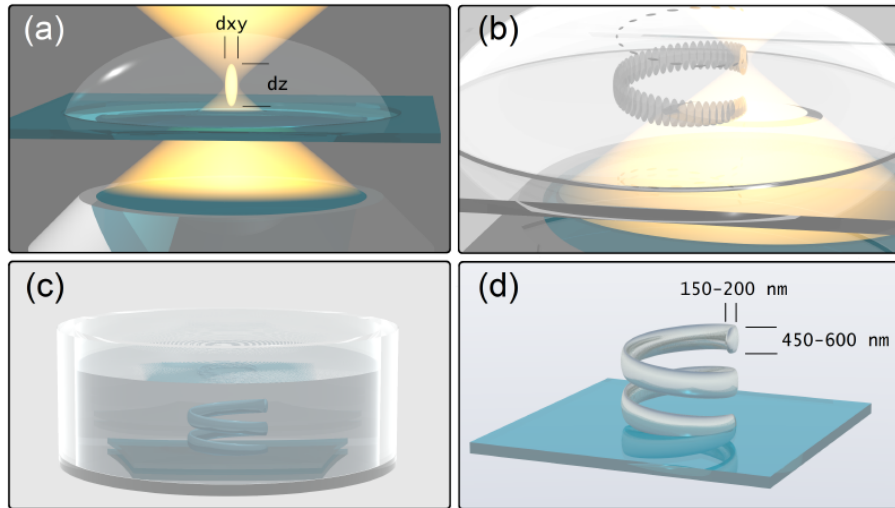
Daugiafotonė sugertis turi tam tikrų taikymų: daugiafotonė spektroskopija (galima žadinti

lygmenis, kurių vienfotonis žadinimas yra neįmanomas, nes šuoliai draustiniai) [7], dvifotonė mikroskopija [8], žadinimas stipriai sklaidančiose terpėse, spalvinių centrų indukavimas [9] ir kita. Tačiau ją lydi keletas neigiamų padarinių (pavyzdžiui, energijos nuostoliai, jei eksponuojant medžiagą sugertis yra nepageidaujama). [6]

### 1.1.2 3D lazerinė litografija

3DLL paremta selektyvios fotopolimerizacijos principu. Tai technologija, leidžianti pagaminti milimetrų eilės dydžio darinius su sub-mikrometrų eilės erdvine skyra [10]. Kai ultrasparčių impulsų lazerio spindulys (dažniausiai aukšto kokybės faktorius,  $M^2 \sim 1$ ) aštriai sufokusuojamas (naudojant 0,3 - 1,4 skaitinės apertūros objektyvą) į fotojautrios medžiagos (prepolimero) tūrį, dėl netiesinės sugerties medžiagos tūryje gali būti inicijuojamas fotocheminis procesas - polimerizacija, kurios metu monomerai susijungia suformuodami polimerus (1 pav. (a)) [11]. Polimerai yra makromolekulės, sudarytos iš tarpusavyje susijungusių tos pačios cheminės sudėties mažesnių molekulių (monomerų). Kad 3DLL procesas įvyktų, visų pirma reikia, kad lazerinės spinduliuotės intensyvumas viršytų slenkstinę daugiafotonės sugerties ribą, o tuomet reikia, kad pakankamo intensyvumo apšvitos fotonų tankis viršytų kiekvienai medžiagai būdingą slenkstinę vertę ir būtų sutinklinamas pakankamas kiekis monomerų. Toks fotomodifikuotas medžiagos tūris vadinamas vokseliu - tai trimatėje erdvėje pikselio analogija - jei dvimatėje erdvėje pakanka dviejų x ir y koordinačių (kurios suformuoja pikselį), tai 3D erdvėje reikalinga trečioji z koordinatė ir taip suformuojamas vokselis. Dėl impulso Gausinės formos galima laikyti, kad vokselis yra artimo elipsoidui formos, ištęsto išilgine kryptimi. Nustatant Gausinio spindulio intensyvumo vertę artimą minėtajam polimerizacijos slenkščiu, vokselis gali būti gaunamas mažesnis nei difrakciškai ribotas [1]. Sufokusuotam spinduliui trimatiškai pataškui apšviečiant medžiagą, gali būti suformuojami 3D objektai (1 pav. (b)). Atlikus pataškinę tūrinę medžiagos modifikaciją, kitas proceso žingsnis yra ryškinimas, kurio metu yra išplaunama aplinkui polimerizuotą darinį esantis prepolimeras (1 pav. (c)). Tam, kad medžiagoje įvyktų fazės transformacija, pakankamai daug medžiagos monomerų turi būti sutinklinami, kad susiformuotų struktūrinis vientisumas, kuris ryškinimo metu išsilaikytų nesuiręs [1]. 3DLL technologija pritaikyta įvairių medžiagų apdirbimui: akrilatams, epoksidams, hibridinėms organinėms-neorganinėms ir hidrogelinėms medžiagoms. [12] 3DLL technologija unikali tuo, kad suteikia galimybę gaminti aukštos skyros trimačius darinius, naudojant kompiuterinio projektavimo failus.

Formavimo metu skyra kontroliuojama šviesos ekspozicijos sąlygomis (bangos ilgiu, galia, ekspozicijos doze ir trukme), fotoiniciatoriais, įvairiais dažikliais, pigmentais ar kitais UV spinduliuotės sugėrėjais, kadangi dažniausiai procesų metu naudojami UV šaltiniai UV lazerių ar UV LED formomis [13]. Vienas iš svarbių polimerizacijos reakcijai įtaką darančių faktorių gali būti išskiriamas fotoiniciatorius. Radikalinė, katijoninė ir anijoninė polimerizacijos gali būti sužadintos šviesa, panaudojant tinkamas fotoinicijavimo sistemas. Tokios sistemos yra jautrios UV šviesai, tačiau naudojant fotoiniciatorius sugeriamos šviesos spektrą galima praplėsti iki



1 pav. 3DLL proceso principas. (a) Aštriai sufokusuoto didelio intensyvumo lazerio impulso sukeliama negrįžtama foto-modifikacija prepolimero turyje. Vokselio forma yra artima elipsoidui, kurio išilginiai ir skersiniai matmenys yra  $dz$  ir  $dxy$  atitinkamai. Naudojant objektyvą, kurio skaitinė apertūra yra apie 1.4, išilginių ir skersinių matmenų santykis yra apytiksliai 3. (b) Nuoseklus bandinio (arba sufokusuoto spindulio) transliavimas 3D erdvėje, suformuojant 3D darinius. (c) Neeksponuotas prepolimeras išplaunamas cheminio ryškinimo metu. (d) Išryškintas kietas mikro-darinyš. [1]

regimosios spinduliuotės [11].

3DLL metu naudojamas sufokusuotas lazerio pluoštas. Erdvinis varpo formos Gausinio profilio tenkina elektrinio lauko stiprio  $E$  (V/m), energijos  $E_n$  (J), energijos tankio  $F$  (J/cm<sup>2</sup>), intensyvumo  $I$  (W/cm<sup>2</sup>) ir dozės  $D = I * t_{ex}$  (čia  $t_{ex}$  yra ekspozicijos laikas) pasiskirstymus. Bendras Gauso pasiskirstymas fokuso vietoje aprašomas taip:

$$A(r) = A_0 \exp(-2r^2/\omega^2), \quad (4)$$

čia  $\omega$  – spindulio sąsmaukos plotis,  $A_0$  –  $E$ ,  $E_n$ ,  $I$ ,  $F$  ar  $D$  amplitudė,  $r$  - spindulys. Gausiniam pluoštui energijos tankis aprašomas:  $F_0 = 2E_0/(\pi\omega_0^2)$ . Net ir labai aštriai, imersiniu objektyvu (dažniausiai skaitinė apertūra  $NA > 1,25$ ) sufokusuoto spindulio fokuso intensyvumas visada labai artimas Gausiniam. Kai medžiagos modifikavimą sukelia netiesinė optinė sugertis, intensyvumas tampa svarbiu parametru, kadangi N-fotonių procesų įtaka priklauso nuo  $I^N$ . [12]

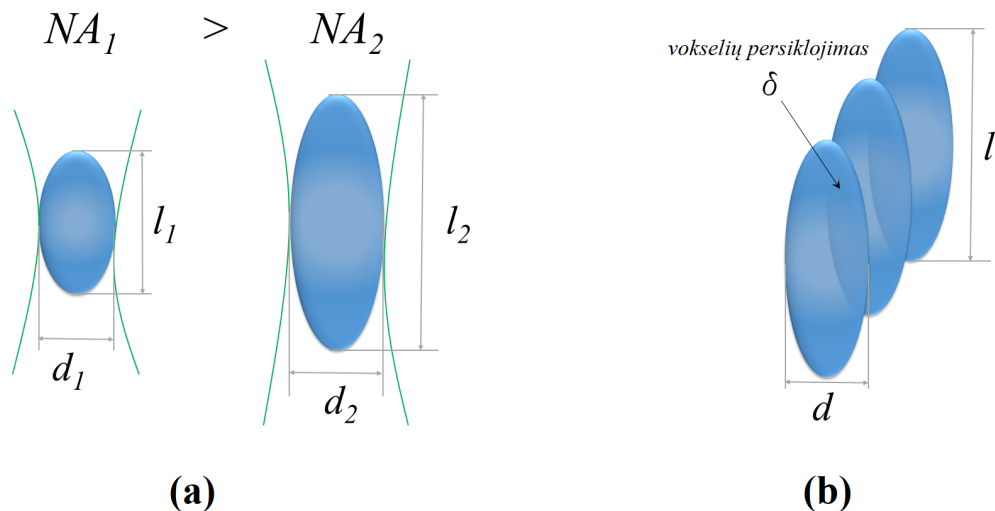
### 1.1.3 3D lazerinės litografijos įranga

3DLL reikalinga labai tiksli pozicionavimo sistema bandinio perkėlimui (ar spindulio nukreipimui). Tokiose sistemose kaip šviesos šaltiniai dažniausiai naudojami femtosekundinių lazerių osciliatoriai arba lazerinių stiprintuvų sistemos, nes pasiekiami pakankami netiesinei sugerčiai intensyvumai. Daugiausiai sutinkami parametrai: pasikartojimo dažnis nuo 1 kHz iki 80 MHz, vidutinė optinė galia nuo 200 mW iki 20 W, impulso trukmė nuo 20 fs iki 10 ps, bangos ilgis nuo

515 nm iki 1030 nm. Išplėstas femtosekundinio lazerio pluoštas nukreipiamas per fokusuojantį objektyvą į fotodervą. Papildomi spindulio kontrolės ir formavimo komponentai, tokie kaip erdviniai šviesos modulatoriai, skaitmeninių veidrodžių rinkiniai, galvoskeneriai ir kiti, gali būti įmontuojami spindulio kelyje. Bandinys pastatomas ant XYZ pozicionavimo platformos. Trimatiškai perkėlinėjant bandinį, atitinkamai po fotopolimerą juda lazerio fokuso padėtis, taip įgalinant sudėtingų objektų 3D rašymą, kuris po ekspozicijos išryškinamas tirpiklyje pašalinant aplinkui objektą esančią nepolimerizuotą dervą. Kaip alternatyva (arba kombinuotas būdas su pozicionavimo platforma) gali būti naudojami galvanometriniai skeneriai, siekiant nukreipti spindulį į norimą vietą. Tiesioginio lazerinio rašymo sistemoje gali būti integruota kamera, leidžianti stebėti ir valdyti formavimo procesą realiu laiku. Dažniausiai tokių sistemų kontrolė būna automatizuota specialiomis programinėmis įrangomis. [12]

#### 1.1.4 Erdvinė skyra

Erdvinė skyra apibūdinama kaip mažiausias atstumas tarp dviejų skirtingų taškų. Paviršiaus šiukštumas ir paviršiaus aukščio modifikacijos (profilis) daugiausiai priklauso nuo vokselių persidengimo ir mažėja mažėjant skenavimo žingsniams. [12] Vokselio matmenys gali kisti priklausomai nuo fokusavimo sąlygų - skaitinės apertūros (NA). Kuo didesnė naudojamo objektyvo skaitinė apertūra, tuo mažesnę vokselį galime gauti (2 pav. (a)).



2 pav. Vokselio matmenų priklausomybė nuo objektyvo skaitinės apertūros NA (a), vokselių persiklojimo laipsnis  $\delta$  (b).

Vokselių persiklojimo ( $\delta$ ) laipsnis (2 pav. (b)) gali būti išreiškiamas kaip poslinkis skersine ir išilgine kryptimis:

$$\delta = \frac{d - dz}{d} * \frac{l - dx}{l}, \quad (5)$$

kur  $d$  ir  $l$  yra atitinkamai skersiniai ir išilginiai vokselio matmenys, o  $dz$  ir  $dx$  yra skersiniai ir išilginiai skenavimo žingsniai. [12]

Sufokusuotos dėmės dydis  $\omega_0$  (skersmuo) apsprendžiamas fokusuojančio lęšio skaitinės apertūros (NA) ir bangos ilgio  $\lambda$ :

$$\omega_0 = 1,22\lambda/NA \quad (6)$$

Skersinis pluošto dėmės dydis nusakomas kaip dvigubas Relėjaus ilgis  $2z_R = 2\pi\omega_0^2/\lambda$ . [12]

Aukšta erdvinė skyra formavimo metu atneša ir trūkumą - mažą gamybos spartą, o tai turi įtakos tiesioginio lazerinio rašymo efektyvumui. Norint įvertinti konkretaus objekto formavimui reikalingą laiką  $t$ , galima naudoti paprastą skaičiavimą:

$$t = \frac{xyzF}{Rv}, \quad (7)$$

čia  $x$ ,  $y$  ir  $z$  yra objekto plotis, ilgis ir aukštis,  $R$  - skyra, priklausanti nuo naudojamo objektyvo NA ir pritaikyto lazerio galios  $P$ ,  $v$  - bandinio skenavimo greitis ir  $F$  yra išpildymo faktorius (viso objekto polimerizuoto ir nepolimerizuoto tūrio santykis). Iš šios formulės matoma, kad objekto tūrio ir/ar užpildymo faktoriaus padidėjimas ryškiai prailgina gamybos laiką. Parinkus tinkamus optinius elementus ir naudojant santykinai aukštą bandinio skenavimo greitį, įmanoma suformuoti didesnio tūrio ir užpildymo santykio objektą per trumpesnę laiką. [12]

## 1.2 Polimerai ir polimerizacija

### 1.2.1 Polimerų klasifikacija

Polimeras - tam tikra makromolekulių klasė, kurią sudaro tvarkingai išdėstytų vienodo (arba labai nedidelio kiekio, dažniausiai tik dviejų) tipo cheminių vienetų rinkinys, kurie sujungti pabaiga su pabaiga ar šiek tiek sudėtingesniais būdais [14].

Egzistuoja daug galimų polimerų klasifikavimo būdų. Vienas jų - pagal struktūras: linijiniai (angl. *linear*), šakotiniai (angl. *branched*) ar tinkliniai (angl. *network*) polimerai (3 pav.). Kitas galimas klasifikavimo būdas paremtas polimerų savybėmis: termoplastikai, elastomerai ir termoreaktingieji polimerai. Šios dvi klasifikacijos tarpusavyje labai artimos, kadangi struktūra ir savybės artimai susietos. Žemiau pateikiami trumpi polimerų tipų aprašymai pagal savybinį skirstymą.

Termoplastikai yra dauguma naudojamų polimerų. Jie sudaryti iš linijinių arba šakotinių molekulių, kaitinami suminkštėja ar išsilydo, dėl to šildant gali būti liejami ir perliejami.

Termoreaktingieji polimerai yra tinkliniai polimerai, kurių stiprus sujungimas lemia tankų trimatį tinklą. Paprastai šios medžiagos yra kietos, jos negali lydėtis kaitinant ir susiskaido, jei temperatūra yra pakankamai aukšta. [14]

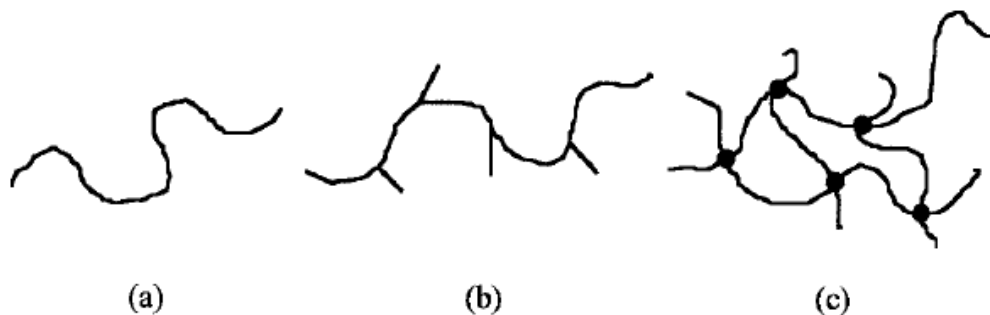
Elastomerai (dar vadinami gumomis) yra tinkliniai silpnai sujungti polimerai, kurie yra grįžtamai tamprūs. Neįtemptoje medžiagoje vyrauja gan standžiai atsitiktinai suvytos molekulių



lės (angl. *coiled molecules*), kurios išsitempia, kai polimeras deformuojamas. Dėl šios priežasties grandinės tampa mažiau atsitiktinės, medžiaga turi mažesnę entropiją ir pagal tai gali būti nustatoma sutraukianti jėga. Tinklinimas lemia tai, kad molekulės neteka viena paskui kitą, kai medžiaga ištempinama.

Dar vieną polimerų klasifikavimo būdą pateikė Carothers (1929) - skirstyti juos į kondensacijos (angl. *condensation*) ir sudėties (angl. *addition*), pagal kompozicinį skirtumą tarp polimerų ir monomerų, iš kurių medžiaga buvo susintetinta. Kondensacijos polimerai yra tie, kurie buvo suformuoti iš polifunkcinių monomerų įvairių organinės chemijos kondensacijos reakcijų metu pašalinant tam tikrą kiekį mažų molekulių, tokiu kaip vanduo. Tokiu polimerų pavyzdys yra poliamidai (angl. *polyamides*), suformuojami iš diaminų (angl. *diamines*) ir dirūgščių (angl. *diacids*) pašalinant vandenį. Plačiai naudojamų poliamidų pavyzdžiai yra nailonas, poliesteris. Kai kurie natūraliai atsirandantys polimerai, tokie kaip celiuliozė, krakmolai, vilna ir šilkas klasifikuojami kaip kondensacijos polimerai, nes galima postuliuoti šių medžiagų sintetinimą iš tam tikrų hipotetinių reaktantų eliminuojant vandenį. [15]

Sudėties polimerai - formuojami iš monomerų nepašalinant mažų molekulių. Skirtingai nei kondensacijos polimerų, pasikartojantis sudėties polimerų vienetas yra tokios pačios kompozicijos kaip ir monomeras. Dauguma šio tipo polimerų suformuojami polimerizuojant monomeras, turinčius anglies-anglies dvigubą ryšį. Tokie monomerai (vadinami vinilinais (angl. *vinyl*)) gali reaguoti vieni su kitais, o polimerai suformuojami konvertuojant dvigubąsias jungtis į prisotintas jungtis. [15]



3 pav. Schematinis polimerų struktūrų tipų vaizdas: (a) linijiniai polimerai, (b) šakotiniai polimerai ir (c) tinkliniai polimerai, kur juodas rutuliukas vaizduoja skersinio ryšio (angl. *cross-link*) tašką - vietą, kur dvi grandinės chemiškai susijungusios [14].

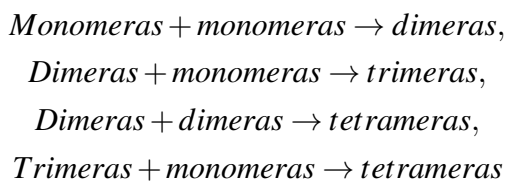
### 1.2.2 Polimerizacijos mechanizmai

Polimerizacijos metu monomerų vienetai reaguoja sukurdami polimerų molekules. Paprasčiausiuose polimerų pavyzdžiuose pasikartojantis cheminis vienetas turi tą pačią atomų grupę kaip ir monomeras, bet skirtingų ryšių [14]. Vieni paprasčiausių, klasikinių polimerizacijos

procesai yra dviejų pagrindinių tipų - žingsnio (angl. *step*) ir grandinės (angl. *chain*) polimerizacijos [15].

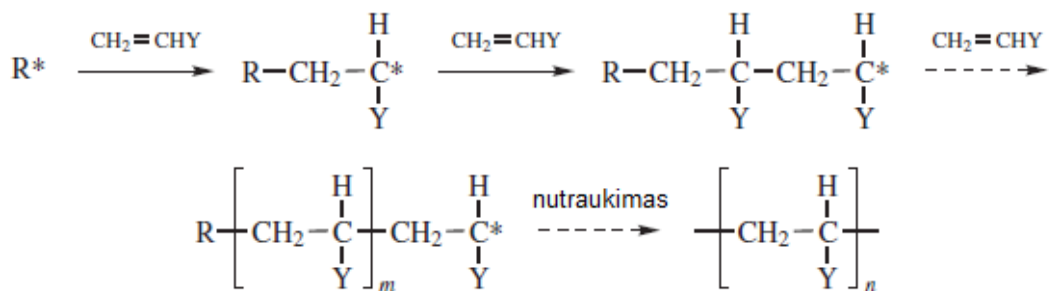
Grandinės ir žingsnio polimerizacijos skiriasi keliomis savybėmis, bet svarbiausias skirtumas yra rūšių, kurios gali reaguoti viena su kita, identiškumas. Kitas skirtumas - koku būdu polimero molekulinis dydis priklauso nuo konversijos laipsnio.

Žingsnio polimerizacija vyksta laipsniškais reakcijomis tarp reaktantų funkcinų grupių. Polimero molekulės dydis auga santykinai lėtu tempu, pradedant iš monomero į dimerą, trimerą, tetramerą, pentamerą ir taip toliau, kol galiausiai suformuojama didelio dydžio polimerinė molekulė. Išsiskirianti nuo grandinės polimerizacijos, žingsnio polimerizacijos charakteristika yra ta, kad reakcija įvyksta tarp bet kokių skirtingų dydžių rūšių esančių reakcijos sistemoje:



ir taip toliau. [15]

Situacija kiek kitokia grandinės polimerizacijos atveju, kai naudojamas iniciatorius sukuriantis iniciatoriaus rūšį su reaktyviuoju centru (4 pav.). Reaktyvus centras gali būti laisvasis radikalas, katijonas ar anijonas. Polimerizacija įvyksta, kai reaktyvusis centras dauginasi nuosekliais monomerų molekulių papildymais. Išsiskirianti grandinės polimerizacijos charakteristika yra ta, kad polimero augimas vyksta monomerui reaguojant tik su reaktyviuoju centru. Monomeras nesąveikauja su monomeru ir kitokio dydžio molekulėmis, tokiomis kaip dimeras, trimeras, tetrameras ir taip toliau. Kiekviena monomero molekulė, kuri prisideda prie reaktyviojo centro, atkuria jį. Polimero grandinės augimas baigiasi, kai reaktyvusis centras sunaikinamas nutraukimo reakcijomis.



4 pav. Grandinės polimerizacijos pavyzdys - viniliniai monomerai. Čia R\* žymi iniciatorių [15].

### 1.2.3 Fotoinicijavimo mechanizmai

*Polimeras su fotoiniciatoriumi.* Siekiant padidinti daugiafotonės polimerizacijos proceso efektyvumą, į polimerus įmaišomi cheminiai dariniai, kurie pasižymi žema disociacijos energija ir aukštu daugiafotonės sugerties skerspjūviu - fotoiniciatoriai. Didelis fotonų tankis, lokalizuotas mažame fotopolimero tūryje, sukelia daugiafotonę fotoiniciatoriaus molekulių sugertį. Dėl vienalaikės dviejų ar daugiau fotonų sugerties, fotoiniciatorius sužadinas iš elektroninės singletinės pagrindinės būsenos ( $S_0$ ) į laidumo juostą ( $S_1$ ). Iš čia relaksuoja į žemiausią  $S_1$  būseną ir suskyla, suformuodamas aukšto reaktingumo radikalus. Femtosekundine lazerine spinduliuote inicijuotos daugiafotonės sugerties metu sugeneruotų radikalų tankis priklauso nuo efektyviojo daugiafotonės radikalų generacijos skerspjūvio, fotonų srauto ir pirminio iniciatoriaus dalelių tankio. Polimerizacijos slenksčio modelis numato, kad polimerizacijos procesas atsiranda tada, kai radikalų tankis viršija tam tikrą minimalią koncentraciją (slenksstinę vertę), kuri yra pakankama, kad viršytų radikalų slopinimą dėl deguonies, ir užtikrintų pakankamą tinklinimo laipsnį. [1]

*Grynas polimeras (be priemaišų).* Dauguma komerciškai nudojamų fotoiniciatorių pasižymi toksiškumu [3]. Tai vienas iš pagrindinių trūkumų, stabdančių labai platų galimą 3D lazerinės litografijos pritaikymą biomedicinoje. [1] Atlikta nemažai tyrimų, kuriais parodyta, kad esant atitinkamoms apšvitos sąlygoms, gryni monomerai gali būti struktūrinami ir be fotoiniciatoriaus pagalbos [16–18]. Grynų monomerų atveju (pavyzdžiui, PDMS) tiesinė sugertis prasideda ties 225 nm bangos ilgiu, taigi 800 nm bangos ilgio spinduliuotės sugertis galima tik kaip 4 fotonų sugerties procesas, o tai labai mažos tikimybės įvykis. Dėl to labai nedaug laisvųjų elektronų (apie 10) [1] sugeneruojama apšviestame tūryje - per mažai, kad būtų inicijuojama polimerizacijos reakcija. Kita vertus, naudojant 515 nm bangos ilgio subpikosekundinę spinduliuotę, galima trijų fotonų sugertis. Tokiu atveju, laisvųjų elektronų tankis padidėja iki maždaug 100 per impulsą ir polimerizacijos reakcija įvyksta. [1]

*Polimerizacija naudojant slopiklius.* 3D lazerinės litografijos raiška gali būti kontroliuojama keičiant lazerio parametrus (bangos ilgį, impulsų pasikartojimo dažnį, impulso trukmę, ekspozicijos dozę ir t.t.). Šiame darbe raiška buvo keičiama varijuojant ekspozicijos dozę. Tačiau siekiant geresnės nei 100 nm formavimo raiškos vien spinduliuotės parametru kontrolės nepakanka ir šiam tikslui į prepolimerą įmaišomi slopiklių radikalai. Apšviestame tūryje sugeneruotų radikalų tankis yra proporcingas kvadratinei šakniai iš fotonų įtekio. Tokiame suformuotame elipsoido formos vokselyje didesnis sugeneruotų radikalų tankis yra vokselio centre ir nuosekliai mažėja artėjant prie elipsoido kraštų. Prepolimere įmaišyti slopikliai neleidžia susidaryti ilgoms polimerų grandinėms jas nutraukdami, todėl sutankinimo laipsnis vokselio kraštuose tampa žemas ir ryškavimo metu tik centrinė tankiai supolimerizuota dalis išsilaiko. Tokiu būdu pasiekama aukštesnė raiška. [19]

#### 1.2.4 Medžiagos tinkamumo fotopolimerizacijai kriterijai

Kad fotopolimeras būtų tinkamas 3DLL technologijai, jis turi tenkinti tokius reikalavimus:

1. Fotoderva turi būti sudaryta iš monomerų, oligomerų ar jų mišinio, kurie susijungtų diafotonės polimerizacijos proceso metu ir sudarytų galutinio polimero pagrindą, formuojantį darinį.

2. Naudojamos dervos daugiafotonės polimerizacijos slenkstis konkretaus lazerio spinduliutei turėtų būti mažesnis nei jos abliacijos slenkstis.

3. Turėtų egzistuoti bent vienas tirpalas, kuris išplautų monomerus, bet nepažeistų suformuotojo polimero, kad būtų galima išryškinti suformuotą objektą ir pašalinti nepolimerizuotą medžiagą.

3DLL procesui naudojama derva gali būti skystos, gelinės ar kietos agregatinės būsenos, taip pat gali būti sudaryta iš kelių komponentų (dažniausiai tai monomerų/oligomerų mišinys ir fotoiniciatorius), kurie sugers lazerio šviesą. Naudojamos medžiagos skirstomos į teigiamas ir neigiamas fotodervas. Kai neigiamos fotodervos eksponuojamos lazerio spinduliute, įvyksta tiesiogis darinių rašymas bandinyje. Polimerų grandinės susijungia, apšviestoje srityje suformuotas polimeras tampa netirpus tam tikram ryškikliui. [20] Skirtingas rezultatas gaunamas naudojant teigiamas fotodervas, kai daugiafotonė sugertis sukelia polimerinių grandinių nutraukimą ir apšviestos sritys tampa tirpios ryškiklyje. Neigiamų fotodervų pavyzdys yra akrilatinės dervos, epoksidai (vienos iš geriausiai žinomų komercinių epoksidinių fotodervų yra SU-8), hidrogeliai, hibridinės medžiagos (pavyzdžiui, ormocer, SZ2080). Teigiamos fotodervos dėl paprastumo replikuojant pasirenkamos vietoj neigiamų fotodervų, tokių medžiagų pavyzdžiai - AZ Electronic Materials ir S1800. [21]

#### 1.2.5 Medžiagų pavyzdžiai

*Akrilatinės dervos.* Akrilatinės dervos yra nebrangios ir plačiai prieinamos, tirpios nepavojinguose tirpaluose, tokiuose kaip alkoholiai ir propanoliai. Tokios medžiagos skaidrios regimajai ir artimajai raudonajai šviesai. [21]

*SU-8.* Neigiama fotoderva SU-8 unikali tuo, kad polimerinių ryšių sukūrimui įdarbinami jonai - visose kitose plačiai naudojamose medžiagose - radikalai. Apšvietus tam tikra šviesa, ekspozicijos vietoje susiformuoja rūgštis, kuri sutinkinama ir tampa netirpi. Dėl to bandiniams reikalingas terminis apdorojimas. Ši medžiaga plačiai naudojama dėl terminio stabilumo, skaidrumo regimojoje srityje, aukšto atsparumo tirpikliams. [21, 22]

*Organiniai-neorganiniai hibridai.* Hibridinės organinės-neorganinės medžiagos turi keletą labai patrauklių savybių, tokių kaip cheminis ir mechaninis stabilumas. Universalios cheminės savybės leidžia sujungti skirtingas medžiagas, tokias kaip metalų alkoksidai, polimerai ir net grafenas. Dažniausiai naudojamos hibridinės medžiagos silicio pagrindu, tokios medžiagos yra skaidrios regimajam spektre. [21] Vienas iš tokių medžiagų pavyzdžių silicio-cirkonio hibridinė derva SZ2080 [23].

*Hidrogeliai.* Dažniausiai iš hidrogelių suformuoti dariniai naudojami ląstelių auginimui audinių inžinerijos taikymams, kadangi tokie karkasai gali atkartoti tarpląstelinę mikro-aplinką. Šiomis dienomis dažniausiai naudojami sintetiniai hidrogeliai, vienas iš jų PEG. [21, 24]

*Fotoinicijatoriai ir kiti priedai.* Fotopolimerizacijos reakcija apjungia fotoinicijavimo sistemą, polimerizuotiną terpę ir šviesos šaltinį, dėl to tarp šių dedamųjų turėtų egzistuoti stipri sąveika. Fotoiniciatorius (PI) atlieka lemiamą rolę šiame procese, kadangi PI sugeria šviesą, paverčia energiją į reaktyvią rūšį (sužadinta būseną, laisvieji radikalai, katijonai, rūgštys ir bazės) ir pradeda reakciją. Fotopolimerizuojama formuluotė susideda iš monomerų/oligomerų matricos, PI ir įvairių priedų, pavyzdžiui tėkmės, slydimo, drėkinimo, dispersijos agentų, užpildų, plastifikatorių, matiškumo ar švytėjimo agentų, pigmentų ir šviesos stabilizatorių siekiant suteikti medžiagai norimų savybių. [2]

### 1.3 3D mikrodariniai audinių inžinerijos taikymams

Naudojant pažangiausias technologijas bei laimėjimus tokiose mokslo srityse kaip medžiagotyra, biologija ir medicina, susiformavo nauja tarpdisciplininė sritis – audinių inžinerija, kurios esmė – atkurti originalaus organo audinio funkcijas, pažeistą dalį pakeičiant nauju audiniu ar sukurti biologinį pakaitalą, kuris palaikytų ar pagerintų audinių funkcijas [25]. Naujasis audinys sukuriamas naudojant įvairias technologijas, viena iš jų – 3DLL [26].

Anksčiau dauguma karkasų buvo formuojami tokiais metodais kaip dujų putodara, šaldymas – džiovinimas, išplovimas, fazės atskyrimas/ inversija, pluošto siejimas. (angl. *gas floating, freeze-drying, particulate leaching, phase separation/inversion, fiber bonding*). Juose naudojamas polimerų kaitinimas, tirpinimas tirpikliuose, arba aukšto slėgio dujos. Visi šie metodai pasižymi atitinkamais trūkumais – sunkiai valdomas poringumas, porų nesusijungimas, nekontroliuojama architektūra, kuri neskatina tinkamo ląstelių augimo ir audinio formavimosi. 3D lazerinio mikroformavimo metu naudojant kompiuterines dizaino programas karkasų formos kūrimui, tokie mikroarchitektūros parametrai kaip porų dydis, forma, kiekis, vidinis karkaso praeinamumas, gali būti lengvai kontroliuojami. Kadangi toks gamybos būdas paremtas kompiuterio darbu, tai suteikia galimybę standartizuoti karkasus ir panaikina vidinės karkasų architektūros kitimą, pagerinant atkartojamumą ir eksperimentų patikimumą. Dar vienas pranašumas tai, jog dariniai gali būti sukurti pagal konkretaus paciento audinius, taip dar geriau išpildant panašumo į originalius audinius reikalavimą [26].

Audinių inžinerija susideda iš trijų pagrindinių komponentų: karkasų, biomolekulių ir ląstelių. Ląstelės organizme dažniausiai palaikomos trimatėje tarpląsteline forma, kuri skirtinga įvairiems audiniams ir daro įtaką ląstelių elgesiui [27]. Karkasai suformuoja dirbtinę struktūrą, kuri atkartoja trimatę audinio formą. Karkasuose pasėtos ląstelės sėkmingai auga ir diferencijuojasi, suformuodamos naują audinį, kai visi trys minėtieji komponentai tinkamai sukombinuoti [26, 28].

Siekiant įgyvendinti audinių atkūrimą, karkasai turi atitikti daugybę reikalavimų. Visų

pirma, jie turi būti biosutaikomi, kad palaikytų gyvybinius ir funkcinius ląstelių procesus. Taip pat karkasai turi pasižymėti atitinkamu porų dydžiu, reikalingu, kad ląstelė išgyventų. Karkasai turėtų būti laidūs mažo molekulinio svorio molekulėms, dujoms ir maisto medžiagoms, nekaupiantys atliekų. Optimalus porų dydis turėtų sudaryti galimybę ląstelės su ląstele sąveikai, migracijai. Darinio paviršiaus plotas turi būti tinkamas fiziologiniam plitimui [29]. Taip pat karkasai turi pasižymėti aukštu sujungiamumu, tinkamomis mechaninėmis savybėmis. Reikėtų atsižvelgti ir į karkasų degradaciją, kadangi tam tikrais atvejais svarbu, kad po kurio laiko organizme esantys karkasai suirtų [26].

Buvo atlikta daugybė tyrimų, kurie parodė, kad trimačių karkasų struktūros gali būti suformuojamos naudojant fotopolimerizaciją, kadangi toks gamybos būdas leidžia kontroliuoti darinio geometriją ir rinktis iš gan plataus apdirbamų medžiagų spektro [30]. Kadangi karkasai turi kuo tiksliau atkartoti skirtingų audinių ląstelių aplinką, lankstūs dariniai reikalingi tokioms ląstelėms, kurios natūraliai egzistuoja lanksčiuose ir minkštuose audiniuose, pavyzdžiui, raumenyse, riebaluose ar kraujagyslėse.

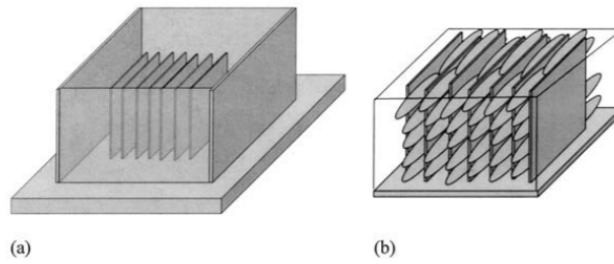
### 1.3.1 Biosutaikomų karkasų mikro- ir makroarchitektūra

Aukštos raiškos porėtų 3D darinių vienas iš reikalavimų yra sudėtinga vidinė geometrija. Ląstelių ir makromolekulių organizavimasis audinyje dažnai daro įtaką mechaniniui ir biologiniui funkcionalumui. Pavyzdžiui, skersinis raumenų skaidulų sluoksnių išsidėstymas leidžia keisti kraujagyslių vamzdinės struktūros vidinę erdvę; pinti kolageno pluošto dirbiniai suteikia odai mechaninio stiprumo; lygiagretus miocitų išdėstymas miokarde leidžia tinkamą širdies susitraukimą; daugiakampis fenotipas ir sudėtingas hepatocitų išsidėstymas yra būtinas tinkamai kepenų funkcijai. Be tinkamo ląstelių išsidėstymo, dirbtinio audinio sistema negalėtų reikiamai funkcionuoti kaip audinio pakaitalas. [31]

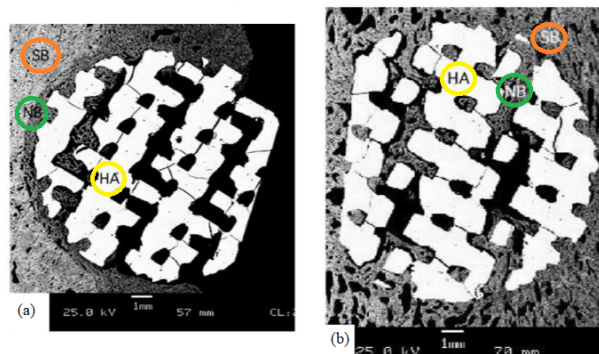
Įvairūs tyrimai pademonstravo karkasų mikroarchitektūros įtaką pažeisto audinio atkūrimo ir regeneracijos laipsniui, ląstelių organizavimuisi. Pavyzdžiui, Bostono universiteto Biomedicinos inžinerijos departamento mokslininkai savo publikacijoje [31] aprašė ląstelių organizavimosi trimačiuose PDMS karkasuose eksperimentus. Suformuotas mikro-karkasas iš polidimetilsiloksano (PDMS) buvo integruotas į kolageno matricos aplinką ir užsėtas fibroblastais. Tokia sistema veikė kaip fizinis orientyras augančioms ląstelėms, paskatinęs nustatytą išlygiuotą 3D ląstelių organizavimą, kuris pastebimas daugelyje žmogaus kūno audinių (pavyzdžiui, sausgyslėse) (5 pav.).

Mokslininkai Chu et al [32] pademonstravo biosutaikomo UV kietinamo polimero-keramikos kompozito panaudojimą karkasų kauliniams audiniams gamybai. Panaudojus stereolitografijos technologiją paruoštų karkasų vidinė mikroarchitektūra palaikė kaulinio audinio regeneraciją ir tokiu būdu suformuotas implantas buvo implantuotas *in vivo* (6 pav.).

Dar viena mokslininkų grupė [33] stereolitografijos principu suformavo trimačius PEG-DA medžiagos sudėtingos vidinės architektūros karkasus, skirtus tiksliai biologiskai aktyvių veiksmų paskirstymui (7 pav.). Buvo įrodyta *in vitro*, kad tokių biokarkasų funkcinės savybės

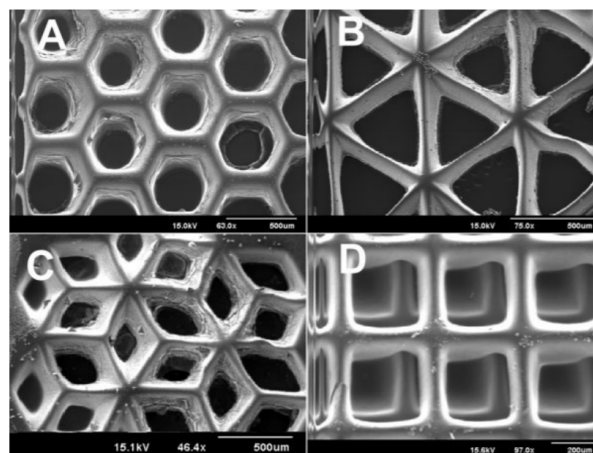


5 pav. Schematinis karkaso brėžinys: (a) PDMS karkaso dizainas. (b) Hipotetinis ląstelių organizavimasis karkase. [31]



6 pav. Kaulinio audinio regeneracijos karkaso viduje skenuojančio elektronų mikroskopo (SEM) atvaizdai: (a) po 5 savaičių; (b) po 9 savaičių. HA - implantas, NB - naujas kaulas, SB - aplinkui implantą esantis kaulas. [32]

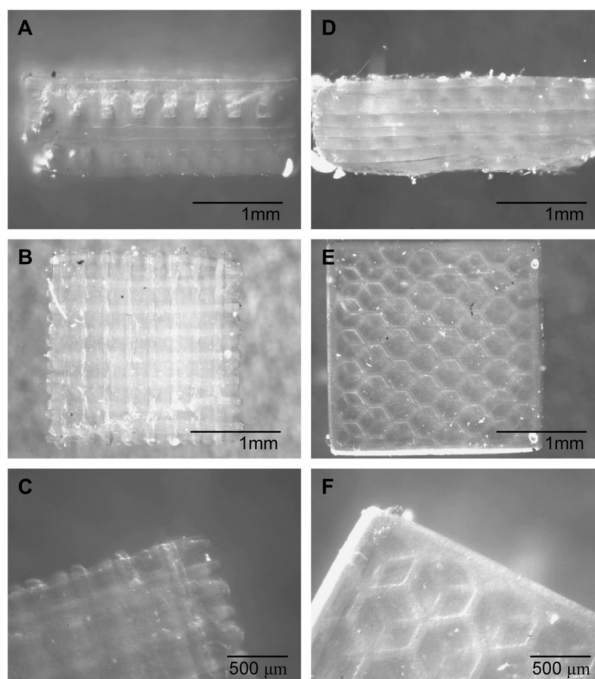
skatina kaulų čiulpų kamieninių ląstelių osteogeninę diferenciaciją, kaip parodė sukurtų audinių konstrukcijų mineralizacija.



7 pav. Skirtingų geometrijų porėtų karkasų SEM atvaizdai. [33]

Khademhosseini et al [34] pademonstravo aukštos raiškos skirtingų geometrijų karkasų kraujagyslių audiniui formavimą (8 pav.). Mechaninės tokių karkasų savybės buvo keičiamos

keičiant naudojamos polimerinės medžiagos cheminę sudėtį. Naudojama 3DLL technologija įgalino sudėtingų tarpusavyje susijusių porų geometrijos karkasų formavimą, kurie lėmė didelio žmogaus bambos venų endotelio ląstelių tankio tinklo susiformavimą. Karkasų su ląstelėmis tyrimai parodė, kad užsėtos ląstelės laikui bėgant išlaikė savo endotelinį fenotipą ir buvo gerai pasiskirsčiusios visame karkase.



8 pav. Skirtingų geometrijų porėtų karkasų atvaizdai. Rastų rietuvės (A-C) ir šešiakampio formos (D-F) karkasai, suformuoti naudojant 3DLL technologiją. [34]



## 2 Eksperimentinė dalis

### 2.1 Naudota sistema ir medžiagos

#### 2.1.1 Femtosekundinio lazerio sistema

Eksperimentų metu naudotos lazerinės litografijos sistemos optinė grandinė pavaizduota 9 paveiksle. Naudojamas femtosekundinis *Šviesos konversijos (Lietuva)* lazeris *Pharos*, kurio bangos ilgis 1030 nm, impulso trukmė - 300 fs, pasikartojimo dažnis - 200 kHz. Optinė galia sistemoje kontroliuojama dviem komponentais, sudarytais iš  $\lambda/2$  plokštelės ir Briusterio kampo poliarizatoriaus. Toks dviejų dalių galios valdymas - grubus ir tikslus - leidžia sumažinti galios fliktuacijas ir suteikia tikslią galios kontrolę gamybos metu. 3D polimerizacijai buvo naudojama antrosios harmonikos 515 nm bangos ilgio spinduliuotė, nes šiame darbe atliekamų eksperimentų metu visų pirma buvo stengiamasi nustatyti, ar UV-PDMS gali būti polimerizuojama ne tik vienfotoniškai UV spinduliuote kaip teigia gamintojas [35], bet ir regimąja spinduliuote (515 nm bangos ilgio). Šio tikslo priežastis - aukštesnė formavimo raiška. Visų pirma, lyginant vienfotonį ir daugiafotonį sugerties procesus svarbu pažymėti, kad daugiafotonio proceso metu pasiekama raiška yra daug aukštesnė dėl didelio netiesiškumo - skersinė rezoliucija geresnė net apie 4 kartus [36]. Lyginant skirtingomis sąlygomis įgyvendinamus daugiafotonės sugerties procesus (infraraudonąją ir regimąją spinduliuotę), lazerio pluoštas sufokusuojamas į mažesnio skersmens dėmę tada, kai naudojama trumpesnio bangos ilgio spinduliuotė (kai fokusuojančio objektyvo skaitinė apertūra yra tokia pati), žr. 6 formulę. Siekiant spinduliuote užpildyti visą objektyvo apertūrą, lazerio pluoštas išplečiamas dviejų kartų didinimo teleskopu. Darinių gamyba vyko naudojant *Aeortech (JAV)* linijinius stalus (ALS130-110-X,Y pozicionavimui XY ašimis, ALS130-60-Z pozicionavimui Z ašimi) sinchronizuotus su galvanoskeneriu. [37]

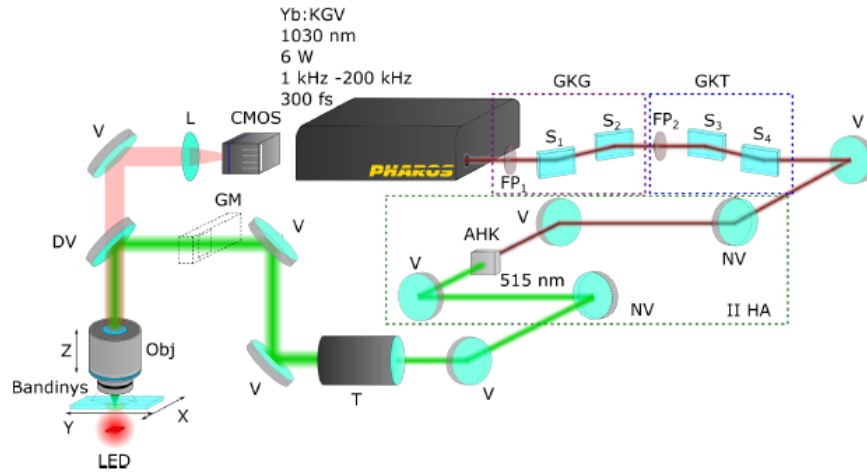
#### 2.1.2 UV-PDMS medžiagos savybės

Eksperimentų metu buvo naudojama *Shin-Etsu* gamintojo elastomerinė medžiaga - UV jautrinta skysta silikono (polidimetil-siloksano) derva (UV-PDMS KER-4690) [38]. Ši medžiaga pasižymi hidrofobiškomis savybėmis (molekulės savybė atsiskirti nuo vandens molekulių vandeniniame tirpale) [39]. Naudotos medžiagos fizikiniai parametrai pateikiami 1-oje lentelėje.

1 lentelė. UV-PDMS medžiagos parametrai [35].

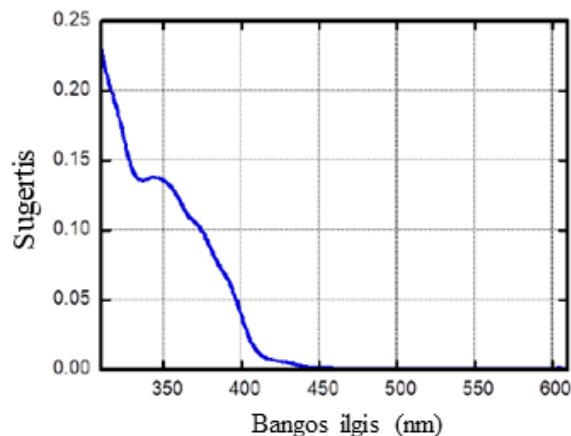
Išvaizda	Bespalvė, skaidri
Klampa [ $Pa \cdot s$ ]	2,7
Pailgėjimas iki nutrūkimo [%]	110
Tempimo jėga [ $MPa$ ]	7,7
Linijinis susitraukimas [%]	<0,1
Polimerizacijos sąlygos [ $J/cm^2$ ]	2

Yra atlikta nemažai eksperimentų, kurie demonstruoja, kad UV-PDMS gali būti formuo-



9 pav. Lazerinės litografijos sistema [37]. Žymėjimai: Pharos - lazeris, operuojantis nurodytaisiais parametrais; GKG - grubus galios keitiklis sudarytas iš ranka pasukamos fazinės plokštelės  $FP_1$  ir dviejų stikliukų Briusterio kampu poliarizatoriaus; GKT - tikslus galios keitiklis, sudarytas iš atenuatoriuje įstatytos fazinės plokštelės  $FP_2$  ir dviejų stikliukų Briusterio kampu poliarizatoriaus; V - veidrodžiai. II HA - antrosios harmonikos generacija, T- teleskopas, išplečiantis lazerio pluošto skersmenį 2 kartus; GM - galios matuoklis; DV - dichroinis veidrodis; Obj - objektyvas; LED - šviesos diodas, apšviečiantis bandinį gamybos proceso stebėjimui, CMOS - kamera, L - lęšis, XYZ - bandinio transliavimas ir pozicionavimas.

jama vienfotoniškai naudojant ultravioletinę spinduliuotę, o viename iš jų pateikiamas ir UV-PDMS sugerties spektras (10 pav.). Sugerties spektre matoma, kad UV jautrinta PDMS pasižymi menka sugertimi regimajame ruože ir gerai sugeria trumpesnių nei 455 nm bangos ilgių srityje [36, 40].



10 pav. UV jautrintos PDMS medžiagos sugerties spektras [40].

Medžiaga sumaišoma iš dviejų gamintojo neviešinamos sudėties komponentų - A ir B, kuriuos reikia sudėti vienodomis dalimis, gerai išmaišyti ir sunaudoti per 24 valandas. UV-PDMS yra fotojautrinta PDMS medžiagos versija, kuri būdama gryna (be fotoinicatorių) yra visiškai

biosutaikoma [5]. Taip pat UV-PDMS turi keletą pranašumų prieš gryną PDMS: trumpesnė kietinimo trukmė, 0,02% traukimasis [35]. UV-PDMS plačiai naudojama lazerinio štampanimo technologijose (angl. *UV nanoimprint lithography*) funkcinių polimerinių įrenginių gamybai [36], taip pat mikroskysčių taikymuose [41], audinių inžinerijoje [42, 43], mikrolašų gamyboje [44].

Kaip jau anksčiau buvo minėta, audinių inžinerijos taikymams suformuoti karkasai turi kaip įmanoma tiksliau atkartoti tarpląstelinę audinį formuojančią aplinką (šiuo atveju koncentruojamasi į minkštus audinius), taigi šiame darbe nagrinėjama medžiaga UV-PDMS yra itin patraukli dėl keleto priežasčių: yra lanksti [45]; kadangi nejautrinta UV šviesai PDMS versija gali būti apdirbama naudojant lazerinio formavimo technologiją, ko pasekoje karkasai kontroliuojamomis sąlygomis pagaminami tvarkūs ir mikroporėti [40]; yra biosutaikoma [46], pralaidi dujoms [47], tikėtina, kad ir UV-PDMS pasižymės tomis pačiomis savybėmis.

3DLL suformuotas darinys kitu žingsniu turi būti išryškintas ryškiklyje, siekiant išplauti nepolimerizuotus monomerus. Šių eksperimentų metu kaip ryškiklis buvo naudojamas 4-metil-2-pentanonas.

Visų eksperimentų metu buvo laikomasi vienodo medžiagos paruošimo protokolo: A ir B dalys maišomos santykiu 1:1, pusę valandos ant magnetinės maišyklės.

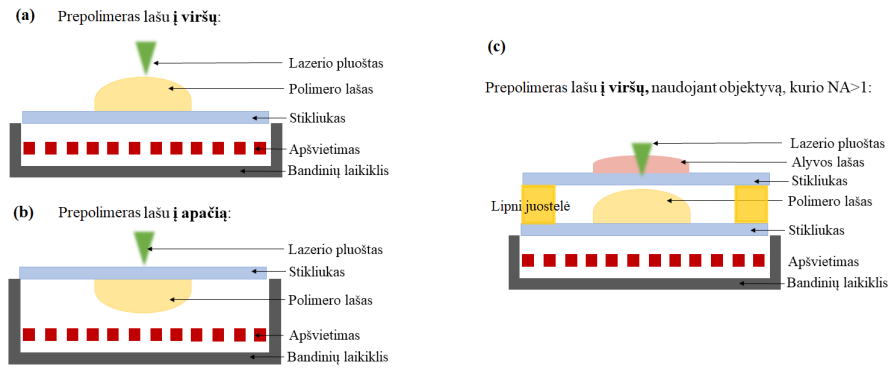
## 2.2 Naudota prepolimero lašo konfigūracija

3D darinių formavimo procesas gali vykti dviem būdais: prepolimero lašu į viršų ir prepolimero lašu į apačią (11 pav. (a) ir (b)). Jei naudojamas objektyvas, kurio skaitinė apertūra didesnė nei 1, objektyvas turi būti merkiamas į specialią alyvą. Naudojant tokį objektyvą, galima tik prepolimero lašu į apačią konfigūracija, kad stikliukas atskirtų prepolimero lašą nuo alyvos lašo. Nepolimerizuota UV-PDMS medžiaga yra skystos būsenos, dėl to formuojant šią medžiagą imersiniu objektyvu, prepolimero lašu į apačią, nėra galimybės formuoti darinių skenuojant iš medžiagos tūrio link stikliuko. Jei polimerizuojama nuo stikliuko link medžiagos tūrio, atsiranda "šešėliavimo" reiškinys - ta pati polimero vieta pereksponuojama formuojant tolimesnius sluoksnius.

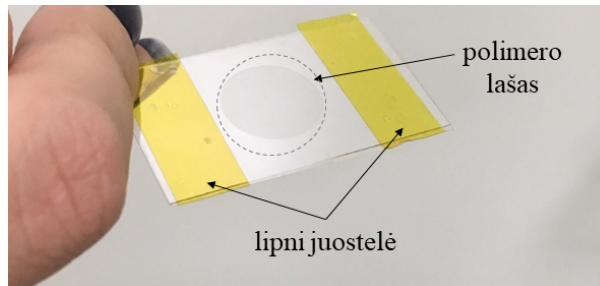
Siekiant išspręsti šią problemą, bandymų metu dariniai buvo formuojami naudojant prepolimero lašu į viršų būdą, tačiau virš fotojautrios medžiagos patalpinant papildomą stikliuką, kuris atskiria polimerą nuo alyvos (11 pav. (c)). Siekiant užtikrinti darinių formavimui pakankamą suspausto lašo aukštį, tarp dviejų stikliukų buvo klijuojamos lipnios polimidinės juostelės (12 pav.).

## 2.3 Darinių formavimas

Siekiant nustatyti, kokiais regimosios femtosekundinės spinduliuotės parametrais geriausiai polimerizuojami mikroobjektai, buvo formuojami trimačių darinių (13 pav.) masyvai, viena

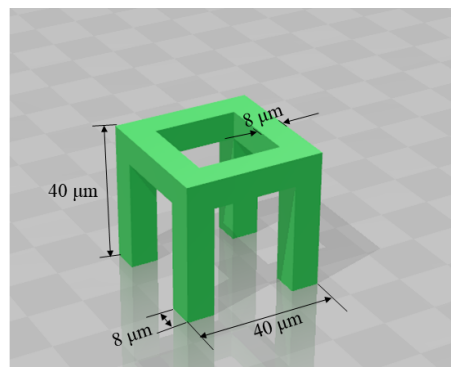


11 pav. Formavimo proceso konfigūracijos: (a) prepolimeras lašu į viršų; (b) prepolimeras lašu į apačią; (c) prepolimeras lašu į viršų, kai naudojamas objektyvas, kurio NA didesnė nei 1. Prepolimero lašas patalpinamas tarp dviejų stikliukų.



12 pav. Eksperimentų metu naudota polimerizacijos proceso konfigūracija prepolimero lašu į viršų, medžiaga tarp dviejų stikliukų.

ašimi keičiant galią nuo 0,5 mW iki 5 mW, 10 taškų. Kita ašimi buvo keičiamas formavimo greitis nuo 100  $\mu\text{m/s}$  iki 1000  $\mu\text{m/s}$ , taip pat 10 taškų.



13 pav. Trimačio objekto kompiuterinis modelis, naudotas medžiagos apdirbimo parametrų testavimui.

Šiems bandymams buvo naudojami 20x 0,45 NA ir 20x 0,8 NA objektyvai, kurie sufokusuoja lazerio pluoštą į teoriškai paskaičiuoto skersmens dėmę: 1396 nm ir 785 nm atitinkamai. Žinant lazerio galią  $P$  ir formavimo greitį  $v$ , buvo paskaičiuotos smailinio intensyvumo  $I_s$  ir persiklojimo

$n$  vertės, naudojant formules:

$$I_s = \frac{2P}{f\omega_0^2\pi\tau}, \quad (8)$$

$$n = \frac{2\omega_0 f}{v}, \quad (9)$$

[48] kur  $\omega_0^2 = 0,61\lambda/NA$ ,  $\tau$  - impulso trukmė,  $f$  - impulsų pasikartojimo dažnis,  $NA$  - objektyvo skaitinė apertūra [48]. Atlikti skaičiavimai pateikiami 2-oje lentelėje.

2 lentelė. Smailinio intensyvumo ir persiklojimo vertės esant skirtingoms lazerio galioms ir formavimo greičiams, naudojant objektyvus, kurių skaitinė apertūra 0,45 ir 0,8.

		NA = 0,45		NA = 0,8	
$P$ , mW	$v$ , $\mu\text{m/s}$	$I_s$ , TW/cm <sup>2</sup>	$n$	$I_s$ , TW/cm <sup>2</sup>	$n$
0,5	100	1,1	2790	3,4	1600
1	200	2,2	1400	6,9	800
1,5	300	3,3	930	10,3	520
2	400	4,4	700	13,7	390
2,5	500	5,4	560	17,2	310
3	600	6,5	470	20,6	260
3,5	700	7,6	400	24,1	220
4	800	8,7	350	27,5	200
4,5	900	9,8	310	30,9	175
5	1000	10,9	280	34	160

Tolimesnių tyrimų metu naudojant aukštesnės skaitinės apertūros objektyvą (1,4 NA), lazerio pluoštas buvo aštriau fokusuojamas į mažesnio diametro dėmę (teoriškai paskaičiuota vertė - 448 nm). Šiomis sąlygomis buvo formuojami raiškos tiltų masyvai, keičiant galią, skenavimo greitį ir skenavimų skaičių bei kryptį (14 pav.). Varijuojant šiuos parametrus, keičiama spinduliuotės dozė  $D$ , kurią aprašo 10 ir 11 formulės.

Kai keičiama galia (atitinkamai ir intensyvumas  $I$ ) bei skenavimo greitis  $v$ :

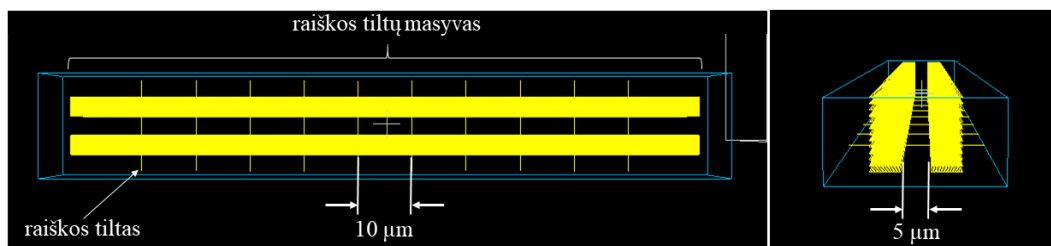
$$D = \frac{I\omega f\tau}{v}, \quad (10)$$

Kai keičiamas skenavimų skaičius  $N$ , greitį ir intensyvumą išlaikant tokius pačius:

$$D = N\frac{I\omega f\tau}{v}. \quad (11)$$

Suformavus darinius, buvo analizuojami ir matuojami SEM paveikslėliai.

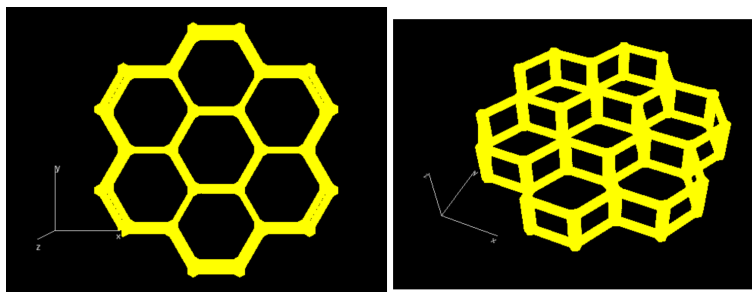
Nustačius UV-PDMS formavimo langą (optimalius fokusavimo ir dozės parametrus), buvo formuojami 3D karkasai, kuriuos būtų galima užsėti ląstelėmis ir tikrinti medžiagos biosutai-



14 pav. Eksperimentų metu naudoto raiškos tiltų masyvo modelis: vaizdas iš viršaus (kairėje), vaizdas iš šono (dešinėje).

komumą. Toks ląstelėmis užsėtas trimatis karkasas galėtų suformuoti dirbtinį audinį ir būti pritaikomas audinių inžinerijoje.

Pasirinkta karkasų mikroarchitektūra buvo šešiakampis (15 pav.). Nustatytas formavimo langas apibrėžia intervalą, iš kurio galima rinktis proceso parametrų vertes, tačiau kiekvienam skirtingam modeliui būtina surasti konkrečius parametrus iš jau nustatyto formavimo lango. Taip yra todėl, kad skirtingų trajektorijų piešimas stalų judėjimo atžvilgiu nėra vienodas. Pavyzdžiui, stalų judėjimas brėžiant ilgas ir tiesias linijas (kaip formuojant raiškos tiltus) nėra adekvatus trumpų ir kryptį keičiančių linijų (kaip šešiakampis karkasas) formavimui. Dėl šios priežasties šešiakampiai karkasai buvo formuojami skirtingomis ekspozicijos sąlygomis, ieškant optimalaus varianto.



15 pav. Šešiakampio geometrijos karkaso 3D modelis: kairėje vaizdas iš viršaus, dešinėje vaizdas kampu.

Taip pat buvo formuojamas apie  $570 \mu\text{m}$  dydžio karkasas (33 pav.), sudarytas iš 7 mažesnių (tokių kaip 32 pav.) karkasų. Tokio dydžio karkasas jau matomas ir plika akimi, o būtent tokie karkasai, kurie būtų patogiai apčiuopiami ir matomi gydytojui, ir yra reikalingi audinių inžinerijoje.

3D lazerinės litografijos būdu suformuoti karkasai buvo užsėti žiurkės danties pulpos (kraujagyslių, nervų ir limfmazgių raizginys, esantis danties viduje) kamieninėmis ląstelėmis ir buvo stebimas ląstelių polinkis augti ant karkasų. Lastelių auginimą Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro darbuotojai atliko laikantis šio protokolo:

1. Bandiniai 4 val. plaunami 96 % EtOH ant vartyklės (40 aps/min, 48 duobučių plokštelėje, kiekvienas bandinys atskirame 1 ml).

2. Bandiniai perkeliama į sterilų DPBS (angl. *Dullbecco's phosphate-buffered saline*) su 3x antibiotikų koncentracija (300 U/ml penicilino ir 300  $\mu$ g/ml streptomicino, 1 ml/bandini) ir inkubuojami 16val.

3. DPBS (su 3x antibiotikų) pakeičiamas ir inkubuojama 1 val. ant vartyklės. Šis etapas kartojamas 2 kartus.

4. Bandiniai steriliai perkeliama į plokštelę su IMDM (Iscov'e modifikuota Dulbec'o terpė) (papildyta serumu ir antibiotikais (1x)), inkubuojama 1 val.

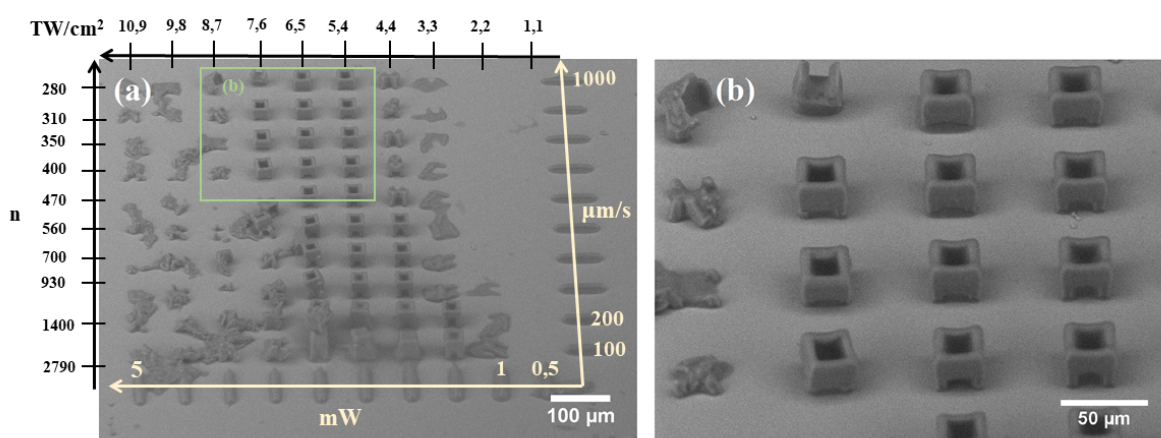
5. Paruošiama 35000 ląst./ml žiurkių dantų pulpos kamieninių ląstelių suspensija, išsėjama ant bandinių (prieš tai nusiurbus inkubacijos terpę) po 1 ml.

6. Įvertinamas rezultatas, padaromos išvados apie medžiagos biosutaikomumą.

### 3 Rezultatai ir jų aptarimas

#### 3.1 UV-PDMS polimerizacijos parametrų testavimas: naudojant 0,45 NA ir 0,8 NA objektyvus

Pirmųjų bandymų metu, formavimui buvo naudojamas 0,45 NA objektyvas. Gaunami rezultatai nebuvo pasikartojantys, išsilaikančių objektų formavimo parametrai skirtingų bandymų metu visiškai skyrėsi. 16 paveiksle matomas pirmasis darinių masyvas, kuriame pakankamai daug masyvo elementų suformuoti, tačiau 16 pav. (b) dalyje matoma, kad kompiuterinis modelis nėra tiksliai atkartojamas, viršutinės linijos išsiplėtusios.

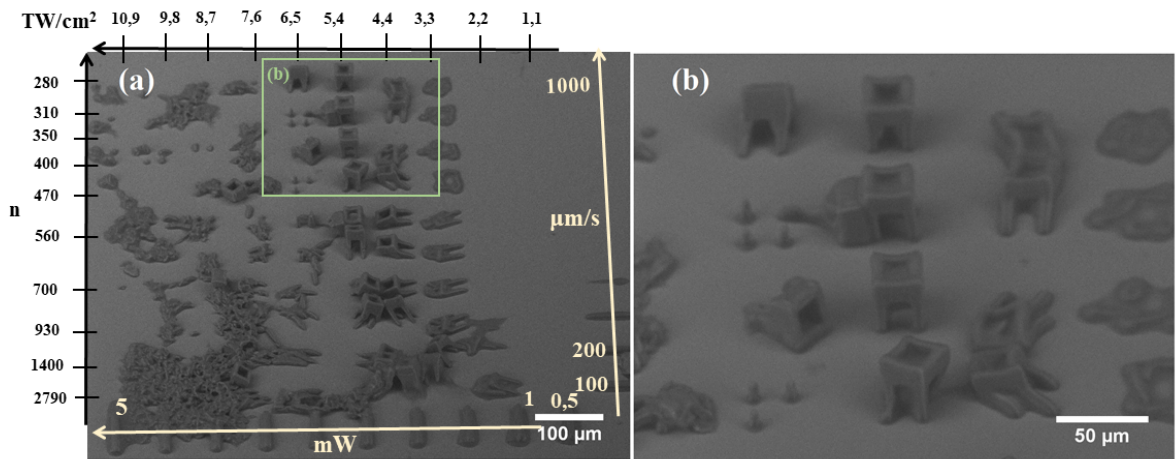


16 pav. Pirmojo bandymo rezultatas, naudojant 0,45 NA objektyvą: X ašyje keičiama ekspozavimo galia nuo 0,5 mW iki 5 mW, 0,5 mW žingsniu; Y ašyje keičiamas formavimo greitis nuo 100  $\mu\text{m/s}$  iki 1000  $\mu\text{m/s}$ , 100  $\mu\text{m/s}$  žingsniu; (a) visas formavimo masyvas; (b) pavykusių objektų vaizdas iš arčiau.

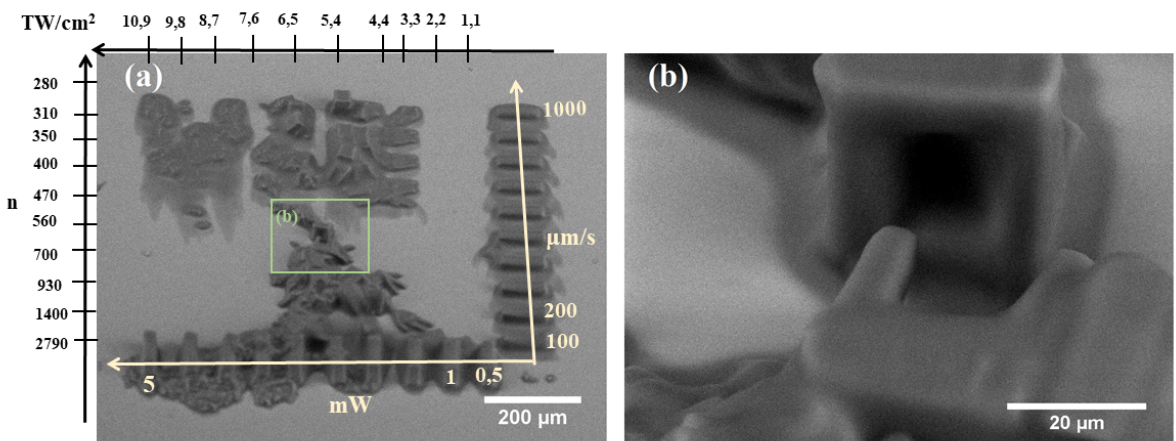
Siekiant patikrinti, ar rezultatai atkartojami, tokių pačių masyvų bandymas buvo pakartotas dar du kartus. Gautieji rezultatai pavaizduoti 17 pav. ir 18 pav. Skenuojančiu elektronų mikroskopu padarytuose paveikslėliuose matoma, kad visų trijų bandymų metu gauti skirtingi rezultatai.

Kadangi buvo gaunami rezultatai, kurie nesikartojo, buvo nupręsta formuoti su aštriau fokusuojančiu objektyvu - 0,8 NA. Taip pat dėl "išguldytų" objektų atsiradimo (kaip, pavyzdžiui, matoma 17 (b) pav.), buvo iškelta hipotezė, kad mikrodariniai gali būtų polimerizuoti, bet neišsilaiko ryškinimo 4-metil-2-pentanone metu. Dėl to prieš ryškinimą buvo fiksuojamas kamera pateikiamas vaizdas ir lyginama, ar rezultatas bus toks pats išryškinus. Prieš ryškinimą užfiksuotas vaizdas pateikiamas: 19 pav. Matoma, kad esant 0,5 mW galiai nepolimerizuota niekas, o ties 1 mW galia dariniai polimerizuoti silpnai - dariniai ne tokie ryškūs kaip tie objektai, kurie suformuoti ties 1,5 mW galia. Tai matoma ir 21 pav. - naudojant 1 mW galią gaminti mikrodariniai "išguldyti" po ryškinimo (prieš ryškinimą buvę silpnai polimerizuoti), o kameros užfiksuotame ryškių objektų ruože matomi išsilaikę dariniai ir po ryškinimo. Gauti rezultatai



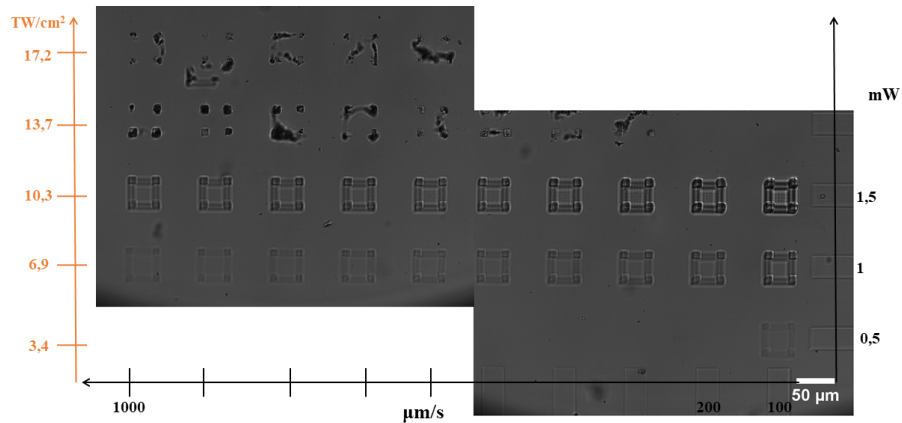


17 pav. Antrojo bandymo rezultatas, naudojant 0,45 NA objektyvą: X ašyje keičiama eksponavimo galia nuo 0,5 mW iki 5 mW, 0,5 mW žingsniu; Y ašyje keičiamas formavimo greitis nuo 100  $\mu\text{m/s}$  iki 1000  $\mu\text{m/s}$ , 100  $\mu\text{m/s}$  žingsniu; (a) visas formavimo masyvas; (b) pavykusių objektų vaizdas iš arčiau.

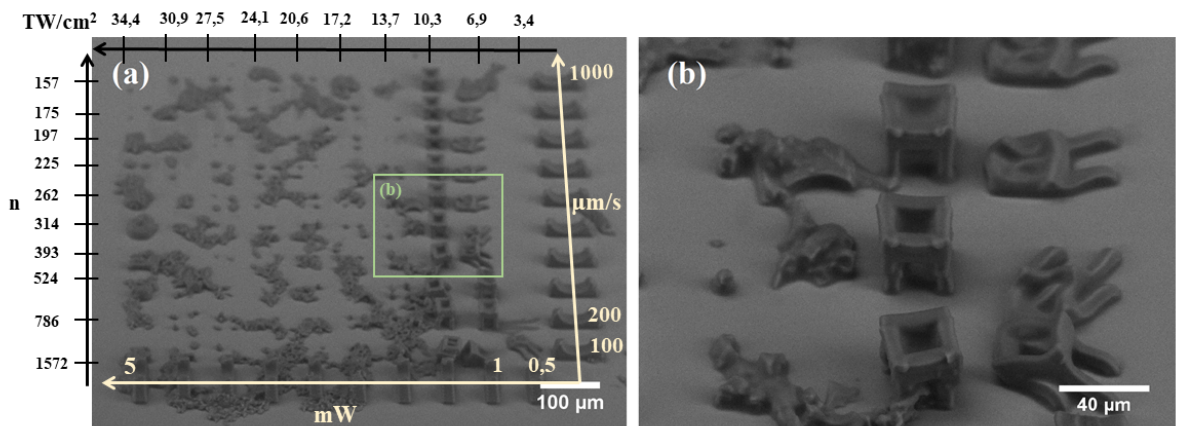


18 pav. Trečiojo bandymo rezultatas, naudojant 0,45 NA objektyvą: X ašyje keičiama eksponavimo galia nuo 0,5 mW iki 5 mW, 0,5 mW žingsniu; Y ašyje keičiamas formavimo greitis nuo 100  $\mu\text{m/s}$  iki 1000  $\mu\text{m/s}$ , 100  $\mu\text{m/s}$  žingsniu; (a) visas formavimo masyvas; (b) supolimerizuotų objektų vaizdas iš arčiau.

0,8 NA objektyvu buvo geresni - bandymai buvo atkartojami ir trimačiai dariniai buvo artimesni kompiuteriniam modeliui. Gauti rezultatai pateikiami 20 pav. ir 21 pav. Ketvirtojo ir penktojo bandymų rezultatuose matoma, kad suformuojami dariniai tada, kai naudojama 1,5 mW galia. Matoma, kad ties minėtąja galia visais nustatytais greičiais dariniai polimerizuojami ir išsilaiko, tačiau aukštesnė objektų kokybė pasiekama, kai greitis parenkamas nuo 100  $\mu\text{m/s}$  iki 900  $\mu\text{m/s}$  (šiam intervale abiejų eksperimentų metu suformuoti patenkinamos kokybės elementai, lyginant su kompiuteriniu modeliu).



19 pav. Šeštojo bandymo rezultatas, naudojant 0,8 NA objektyvą, užfiksuotas prieš ryškinimą.

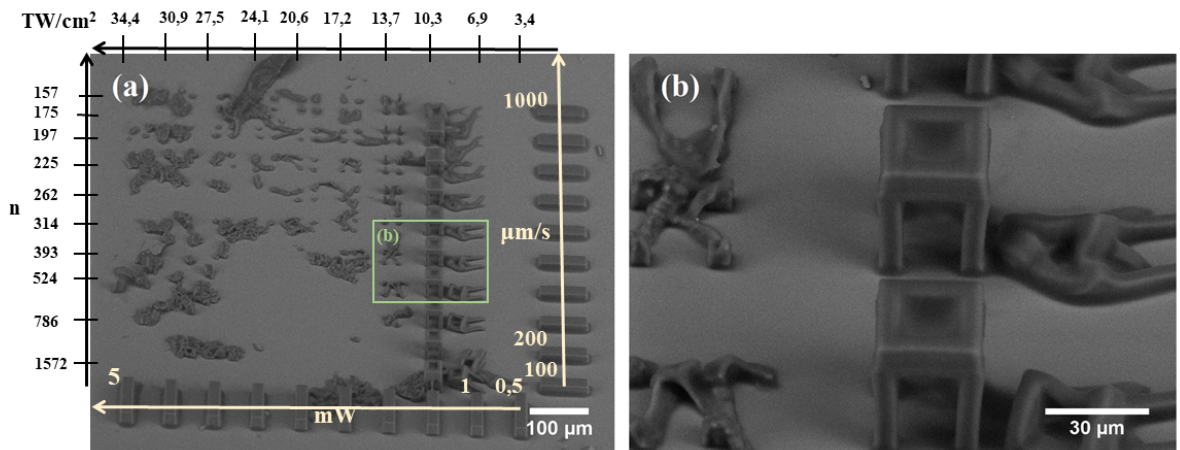


20 pav. Ketvirtojo bandymo rezultatas, naudojant 0,8 NA objektyvą: X ašyje keičiama ekspozicijos galia nuo 0,5 mW iki 5 mW, 0,5 mW žingsniu; Y ašyje keičiamas formavimo greitis nuo 100  $\mu\text{m/s}$  iki 1000  $\mu\text{m/s}$ , 100  $\mu\text{m/s}$  žingsniu; (a) visas suformuotas masyvas; (b) pavykusių objektų vaizdas iš arčiau.

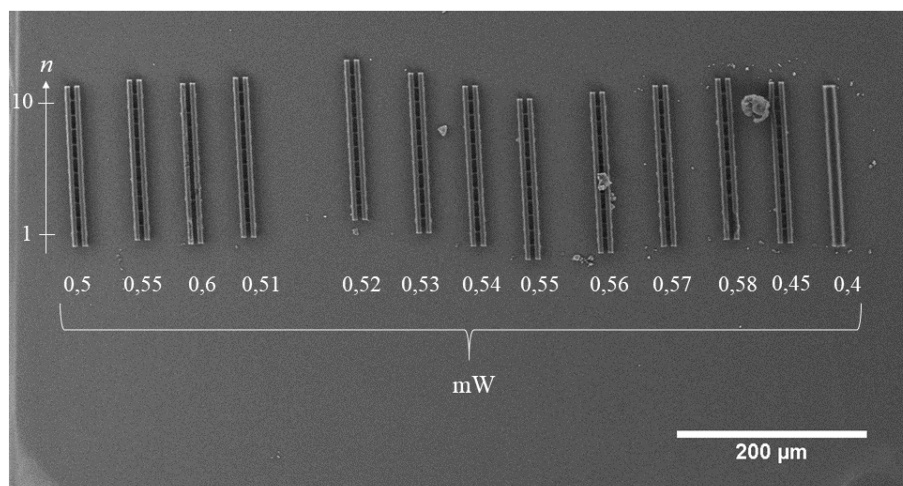
### 3.2 UV-PDMS polimerizacijos parametrų testavimas: naudojant 1,4 NA objektyvą

Naudojant 63x 1,4 NA objektyvą, pirmiausiai, buvo formuojami raiškos tiltų masyvai, kurių kiekviena linija buvo eksponuojama skirtingu skenavimų skaičiumi (nuo 1 iki 10), o raiškos tiltų masyvai tarpusavyje skyrėsi parinkta galios verte: nuo 0,3 mW iki 0,6 mW (22 pav.).

Atlikus matavimus, buvo pastebėta, kad skenuojant skirtingomis sąlygomis (nuo 1 iki 10 kartų) nepasireiškė ryškūs ar dėsningi pokyčiai, o linijos suformavimui pakako ir vieno skenavimo. Tačiau eksponuojant skirtingomis galiomis, buvo matoma linijos storio priklausomybė nuo galios, kuri atvaizduota 23 grafike. Greitis formavimų metu buvo laikomas pastovus ir lygus 1000  $\mu\text{m/s}$ . Kaip matoma, didinat galią, linijos storis didėja - padidinus galią apie 2,2 kartus, linijos storis padidėjo apie 1,6 karto.



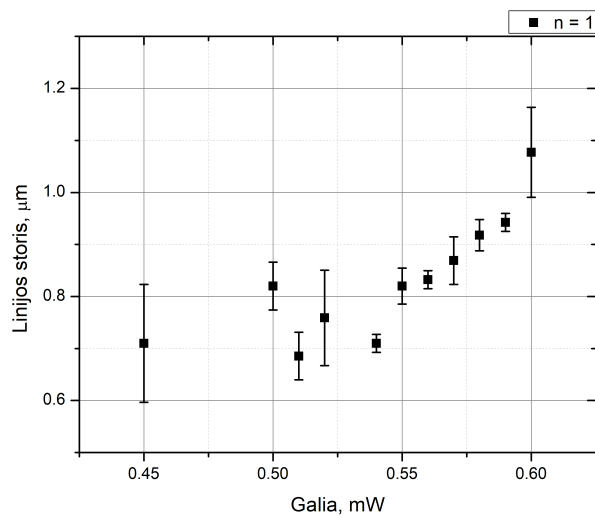
21 pav. Penktojo bandymo rezultatas, naudojant 0,8 NA objektyvą: X ašyje keičiama ekspozicijos galia nuo 0,5 mW iki 5 mW, 0,5 mW žingsniu; Y ašyje keičiamas formavimo greitis nuo 100  $\mu\text{m/s}$  iki 1000  $\mu\text{m/s}$ , 100  $\mu\text{m/s}$  žingsniu; (a) visas suformuotas masyvas; (b) pavykusių objektų vaizdas iš arčiau.



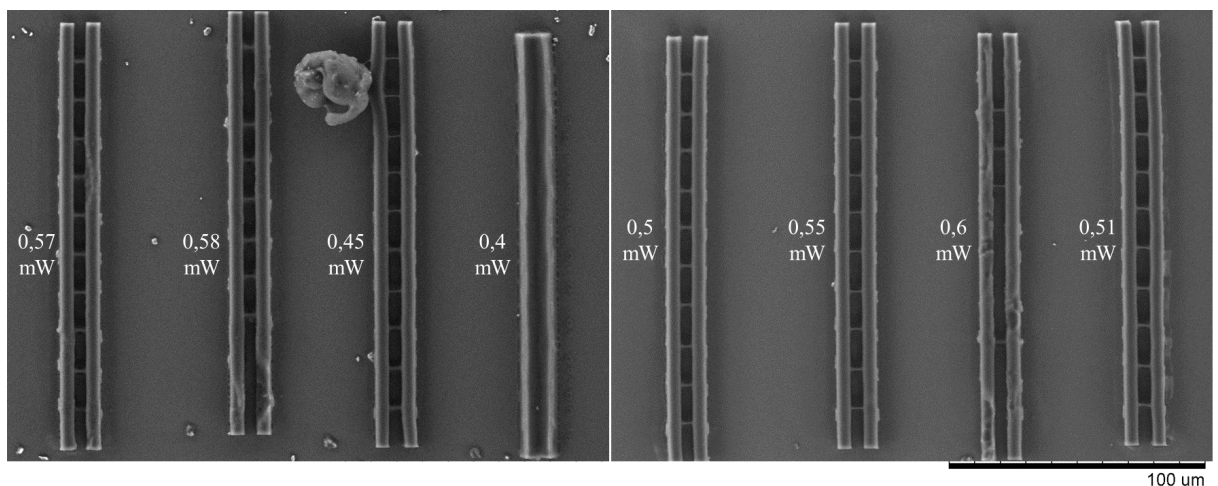
22 pav. Naudojant 1,4 NA objektyvą suformuoti raiškos tiltų masyvai: kiekvienoje linijoje keičiamas skenavimų skaičius, o kiekvienas masyvas formuojamas parinkus skirtingą galią.

Svarbu paminėti, kad parinkus 0,3 mW galią, suformuotas masyvas po ryškinimo neišsilaikė, o nustačius 0,6 mW galią, polimerizuojama medžiaga ėmė virti (susidarė burbuliukai), dėl to išryškinto darinio paviršiuje matomi nelygumai (24 pav.). Dėl to galima teigti, kad UV-PDMS medžiagos polimerizavimo galios parametrai naudojant 1,4 NA objektyvą, skenuojant 1000  $\mu\text{m/s}$  greičiu, yra nuo 0,4 mW iki 0,6 mW (24 pav.), atitinkamai spinduliuotės dozės intervalas - nuo 240  $\text{J/cm}^2$  iki 360  $\text{J/cm}^2$ .

Kitas svarbus parametras, kuris buvo keičiamas polimerizacijos metu fokusuojant lazerio spindulį su 1,4 NA objektyvu - skenavimo greitis (26 pav.). Buvo formuojami raiškos tiltų masyvai, kurių kiekviena linija buvo eksponuojama skirtingu skenavimų skaičiumi (nuo 1 iki 10), o raiškos tiltų masyvai tarpusavyje skyrėsi parinktu skenavimo greičiu: nuo 400  $\mu\text{m/s}$  iki



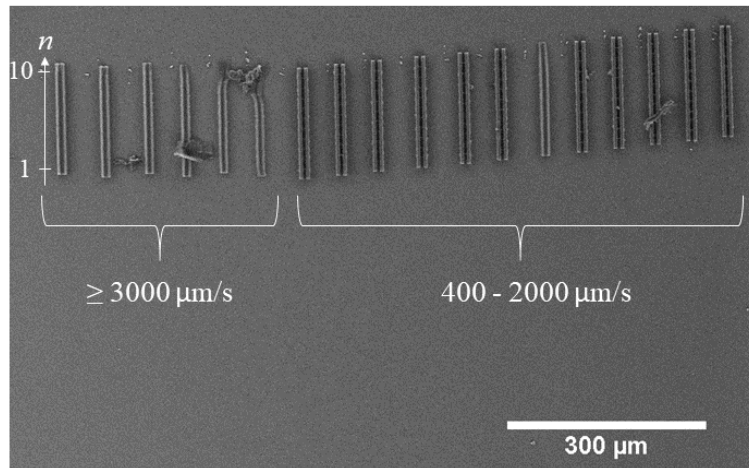
23 pav. Linijos storio priklausomybė nuo skenavimo greičio, kai naudojamas 1,4 NA objektyvas ir skenavimo greitis lygus  $1000 \mu\text{m/s}$ .



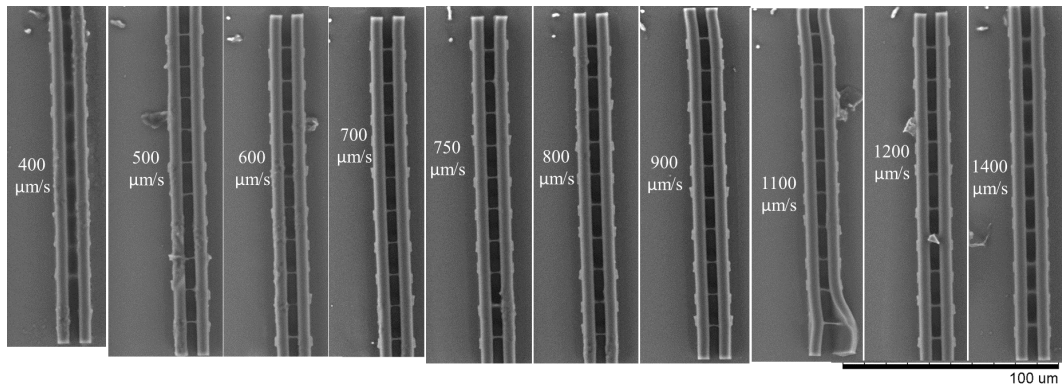
24 pav. Naudojant 1,4 NA objektyvą suformuoti raiškos tiltų masyvai: kiekvienoje linijoje keičiamas skenavimų skaičius, o kiekvienas masyvas formuojamas parinkus skirtingą galią. Ekspozuojant 0,6 mW galia, darinio paviršiuje matomi netolygumai. Ekspozuojant 0,4 mW galia, raiškos tiltų linijos nėra suformuotos, bet medžiaga polimerizuota.

6500  $\mu\text{m/s}$ . Darinių formavimo galia buvo pastovi ir lygi 0,5 mW. Išryškinius bandinius buvo pastebėta, kad formuojant didesniu nei 3000  $\mu\text{m/s}$  greičiu, dariniai susiformuoja, bet raiškos tiltų linijos ne (25 pav.). Siekiant optimalaus rezultato nustatytas spinduliuotės dozės intervalas - nuo 120  $\text{J/cm}^2$  iki 420  $\text{J/cm}^2$ .

Atlikus matavimus, taip pat nepastebėta ryški priklausomybė nuo skenavimų skaičiaus. Tačiau nustatyta, kad didinant skenavimo greitį, linijos plotis mažėja - padidinus greitį 4 kartus, linijos storis sumažėjo apie 1,3 karto (27 pav.).



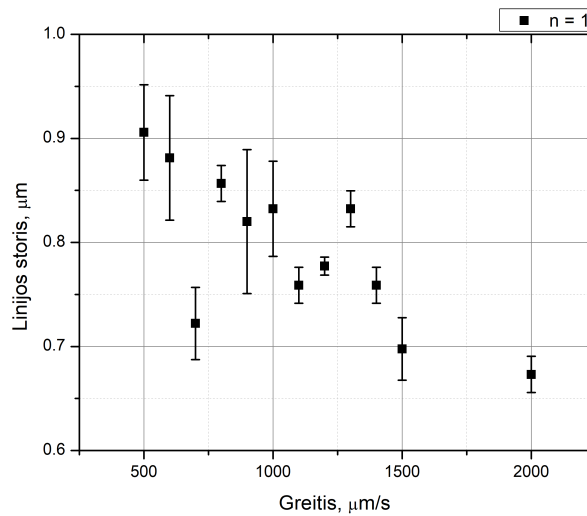
25 pav. Naudojant 63x 1,4 NA objektyvą suformuoti raiškos tiltų masyvai: kiekvienoje linijoje keičiamas skenavimų skaičius, o kiekvienas masyvas formuojamas parinkus skirtingą greitį.



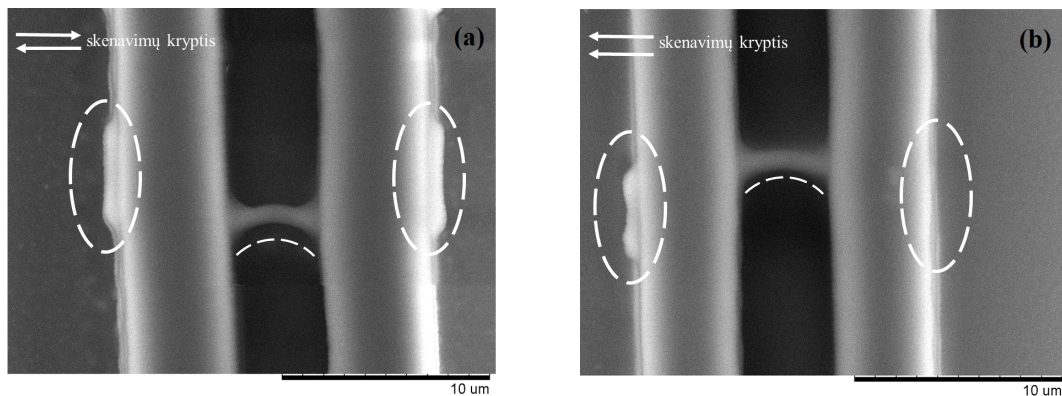
26 pav. Kai kurie raiškos tiltų masyvai: kiekvienoje linijoje keičiamas skenavimų skaičius, o kiekvienas masyvas formuojamas parinkus skirtingą greitį.

Keičiant skenavimų skaičių, bandymai buvo atlikti parenkant skirtingas kryptis. 28 (a) ir (b) paveikslėliuose pavaizduoti raiškos tiltai, kurie suformuoti skirtingais skenavimų krypties parinkimo būdais. Matoma, skenuojant vienodomis kryptimis, matomas tik vienas raiškos tilto galas - toje pusėje, kurioje baigėsi kiekvienas skenavimas. Tokia pati tendencija matoma ir vaizde per kamerą, prieš ryškinimą (29 pav.). Tačiau skenuojant priešingomis kryptimis, raiškos tiltų galai abiejuose šonuose susiformavę simetriškai.

Toks linijų nesimetriškumas skenuojant ta pačia kryptimi gali būti paaikšintas remiantis su-generuotų radikalų ir šilumos difuzija. Kaip žinoma, linijos suformuojamos iš vokselių sanklotų, kaip pavaizduota 30 paveiksle. Dėl netiesinio intensyvumo pasiskirstymo pluošto sąsmaukoje, centrinėje vokselio dalyje suformuojamas aukštesnis polimerizacijos laipsnis, o vokselio kraštuose - žemesnis, dėl to pastaroji zona gali lengvai iširti ryškinimo metu (30 pav. (a)). Linijos skenavimo metu, greta esantys vokseliai persikloja ir žemesnio polimerizacijos laipsnio zonos yra „perpolimerizuojamos“, taip paverčiant jas aukštesnio laipsnio zonomis. Kuo mažesnis ske-



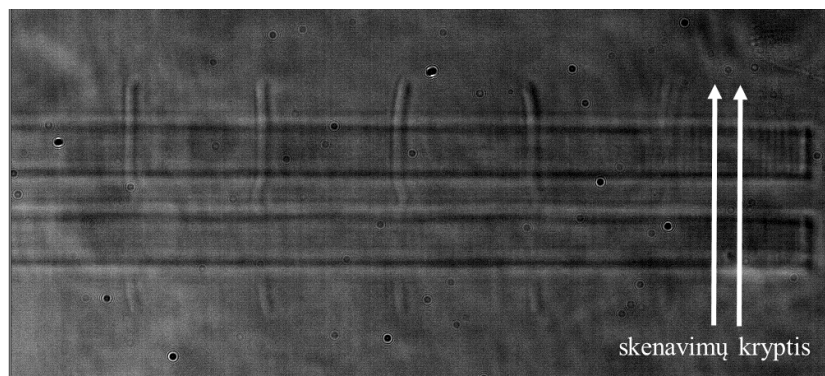
27 pav. Suformuotos linijos storio priklausomybė nuo skenavimo greičio, kai naudojamas 1,4 NA objektyvas ir galia lygi 0,5 mW.



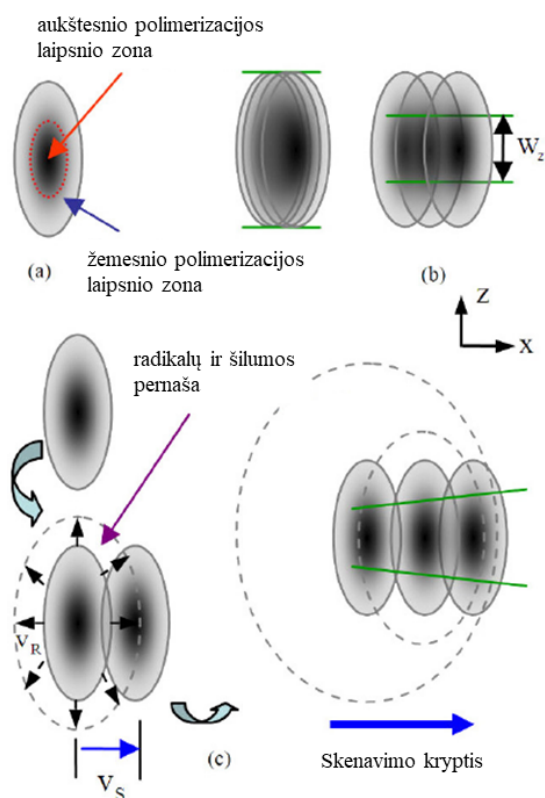
28 pav. Skirtingomis skenavimo kryptimis suformuoti raiškos tiltai: (a) kiekvienas skenavimas vyko priešinga kryptimi nei prieš tai buvęs; (b) visi skenavimai vyko ta pačia kryptimi.

navimo greitis, tuo daugiau vokseliai persikloja ir gaunamos storesnės linijos, tiek išilgine, tiek skersine kryptimi (30 pav. (b)). Greičiau skenuojant, persiklojimas sumažėja ir gaunami mažesni linijos matmenys. Jei skenuojama per greitai, linija suformuojama per plona ir per slipna, kad išliktų po ryškinimo. Kai lazerio spinduliuotė apšviečia medžiagą, joje sugeneruojami radikalai, kurie difunduoja visomis kryptimis greičiu  $v_R$ , kaip pavaizduota 30 pav. (c) dalyje. Kai lazerio spinduliuotės pluoštas skenuojama greičiu  $v_S$ , naujoje vietoje polimerizacija inicijuojama ne tik dėl apšvietos, bet ir dėl radikalų ir šilumos įtekio iš ankstesnio vokselio vietos. Dėl to stebimas linijų nesimetriškumas. [49]

Taip pat 28 pav. galima pastebėti, kad linijos tarp atramų yra išsilenkusios. Šis rezultatas ir raiškos tiltų šonų prilipimas prie atramų patvirtina faktą, kad UV-PDMS medžiaga yra lanksti. Neprilaikomos dalys negali tvirtai stovėti ore, o tarp dviejų atramų esanti linijos dalis išsilaiko,



29 pav. Parinkus tokias pačias skirtingų skenavimų kryptis suformuoti dariniai: matomi ryškesni raiškos tiltų galai toje pusėje, kurioje baigėsi kiekvienas skenavimas.



30 pav. Vokselių ir linijų formavimo schema. (a) Polimerizuotas vokselis. Aukštesnio polimerizacijos laipsnio zona apjuosiama žemesnio polimerizacijos laipsnio zonos, kuri gali būti išplaunama ryškinimo metu. (b) linijų formavimas skenuojant lėtai (kairėje) ir greitai (dešinėje). (c) linijos storio augimas skenavimo kryptimi dėl radikalų ir šilumos difuzijos. [49]

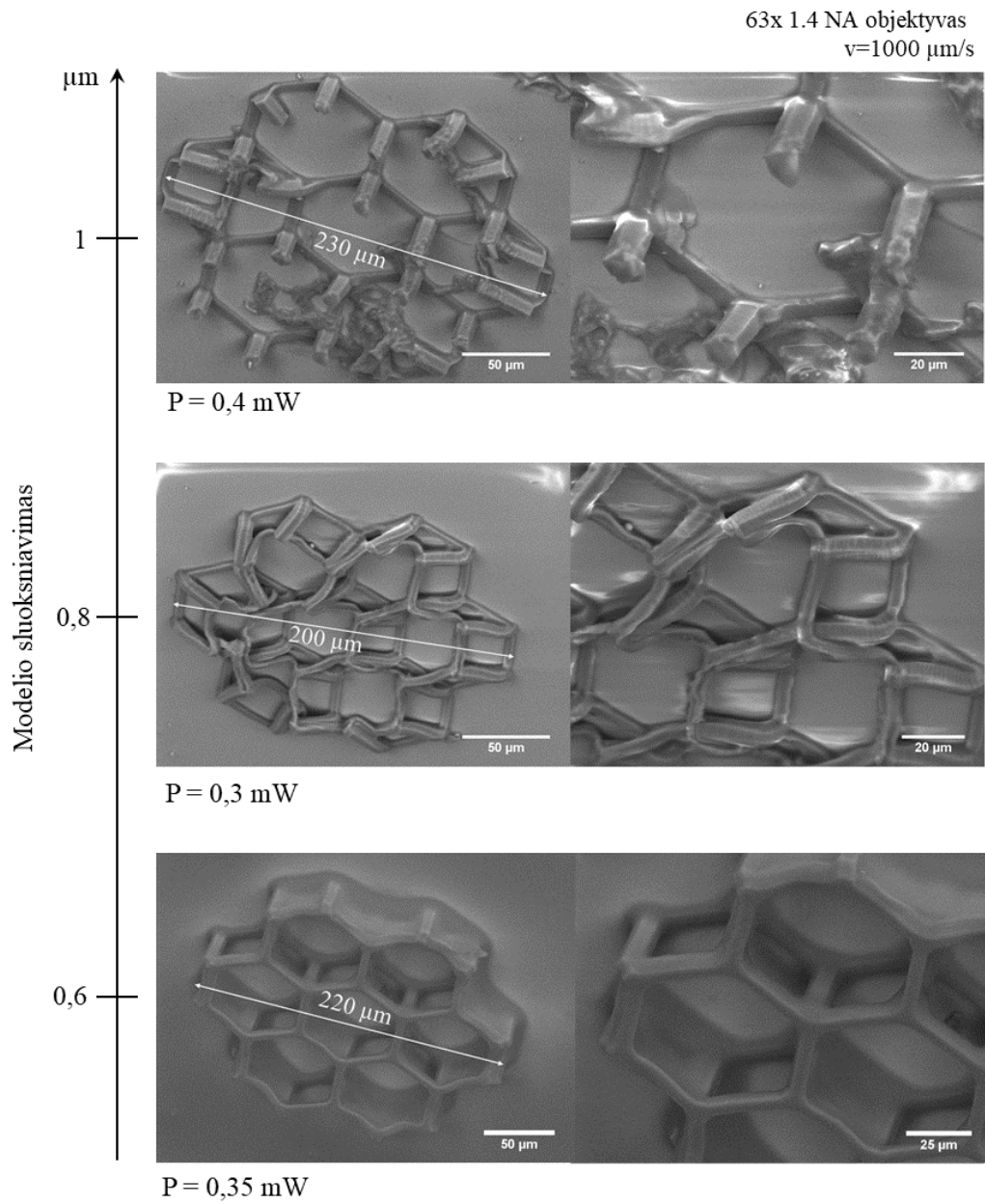
bet dėl savo elastingumo išsilenkia.

### 3.3 Karkasų iš UV-PDMS formavimas audinių inžinerijos taikymams

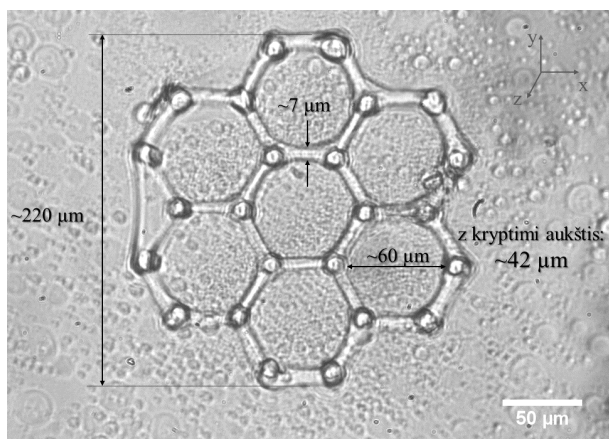
Šešiakampio geometrijos karkaso formavimo rezultatai pateikti 31 pav. Šešiakampiai karkasai suformuoti keičiant spinduliuotės galią ir modelio sluoksniavimo storį, t.y. į kokio storio skersinius pjūvius išskaidomas kompiuterinis 3D modelis formavimo metu. Fokusavimo sąlygos (1,4 NA objektyvas) ir skenavimo greičiai (1000  $\mu\text{m}$ ) visais pateiktais atvejais buvo vienodi. Kaip matoma, į kuo plonesnius sluoksnius išskaidomas modelis, tuo geresnis polimerizacijos rezultatas gaunamas, nes toje pačioje vietoje persikloja daugiau vokselių, padidėja spinduliuotės dozė, daugiau monomerų sutinklinama ir suformuotas darinys tampa tvirtesnis. Tačiau, pailgėja formavimo laikas - lyginant 1  $\mu\text{m}$  ir 0,6  $\mu\text{m}$  storius, formavimo laikas pailgėja beveik 1,8 karto, kai visi kiti parametrai vienodi. Taip pat šiame paveiksle matoma, kad šiuo atveju ekspozicijos dozės didinimas didinant galią nebuvo kritinis veiksnys darinio išsilaikymui. Galima pastebėti, kad ir darinio dydis nebuvo toks svarbus parametras, nes geriausiai suformuotas karkasas buvo vidutinio dydžio iš trijų pateiktų 31 pav., detalūs karkaso išmatavimai pateikti 32 pav. Taip pat buvo suformuotas apie 570  $\mu\text{m}$  dydžio karkasas (33 pav.).

34 pav. pateikti kubinės geometrijos karkasų iš UV-PDMS vaizdai, užfiksuoti prieš užsėjant ląstelėmis ir 96 val. po užsėjimo. Matoma, kad ląstelės yra linkusios augti ant karkasų, dėl to galima teigti, kad dariniai iš UV-PDMS medžiagos yra biosuderinami. Tokios pačios ląstelių augimo tendencijos buvo stebimos ir pakartotiniuose biosuderinamumo tyrimuose, užsėjant ląstelėmis šešiakampio geometrijos karkasus. Atliekant tolimesnius tyrimus, būtų tobulinama karkaso geometrija ir ląstelėmis apaugintas karkasas *in vitro* būtų implantuojamas *in vivo*.

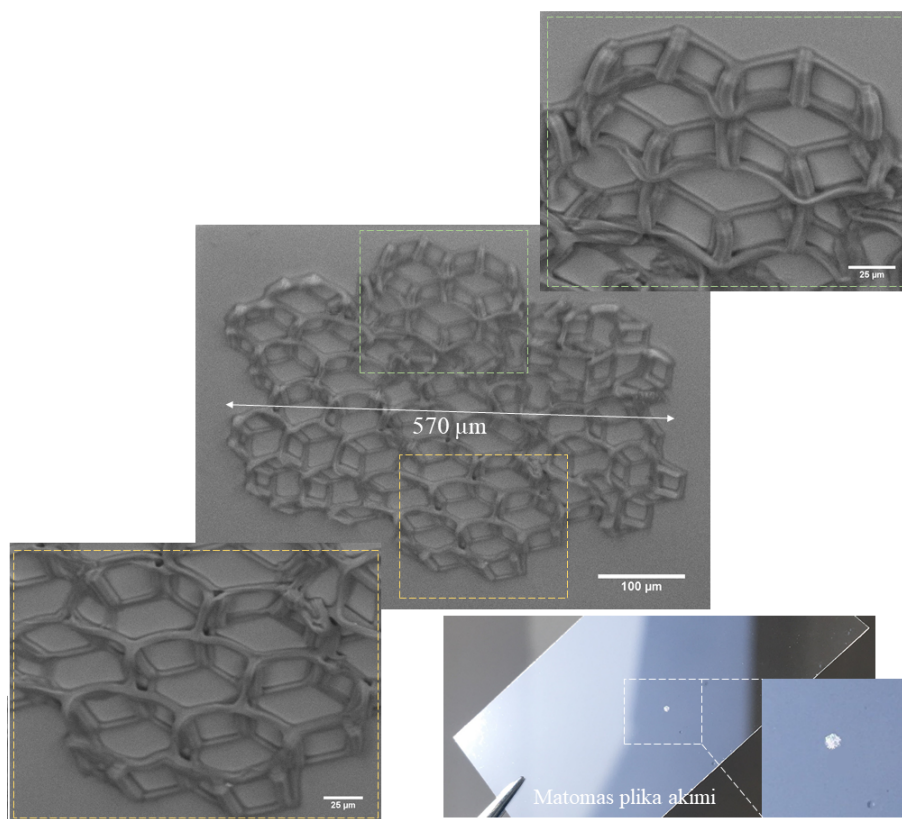




31 pav. Šešiakampio geometrijos karkasų SEM atvaizdai, esant skirtingoms modelio sluoksniavimo ir spinduliuotės galios sąlygoms, kai visais atvejais naudojamas 63x 1.4NA objektyvas ir 1000  $\mu\text{m/s}$  skenavimas. Matomas tvirčiausiai suformuotas karkasas, kai sluoksnių storis parinktas 0,6  $\mu\text{m}$ .

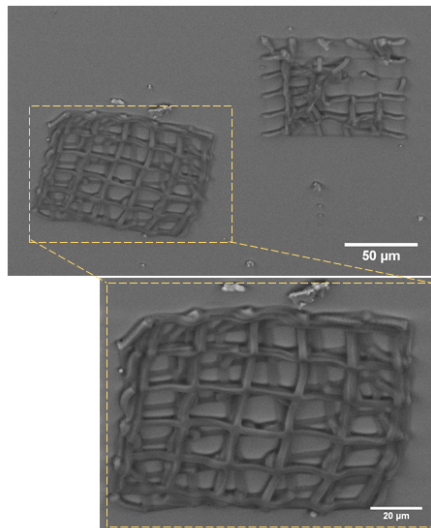


32 pav. Šešiakampio geometrijos karkaso atvaizdas optiniu mikroskopu ir išmatavimai (modelio sluoksniavimas  $0,6 \mu\text{m}$ ). Karkaso linijos storis  $7 \mu\text{m}$ , poros dydis  $60 \mu\text{m}$ , karkaso aukštis  $42 \mu\text{m}$ , o viso darinio dydis y kryptimi -  $220 \mu\text{m}$ .

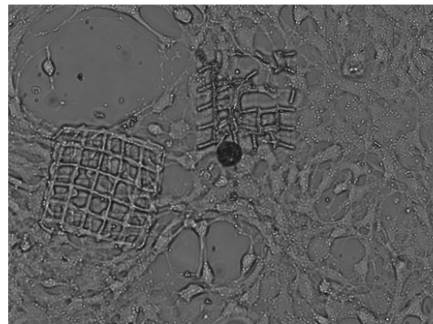


33 pav. Šešiakampio geometrijos karkasas (viso darinio dydis x kryptimi -  $570 \mu\text{m}$ ). Nespaltovai - SEM atvaizdai, apačioje - vaizdas matomas plika akimi.

Suformuoti karkasai:



Karkasai užsėti ląstelėmis:



34 pav. Kubinės geometrijos karkasai prieš ir po užsėjimo ląstelėmis praėjus 96 val. Matoma, kad ląstelės pilnai uždengia karkasus ("mieguliuojantis" fonas aplink karkasą ir jame - augančios ląstelės), o tai leidžia daryti išvadą, kad mėginiai yra biosuderinami.

## Išvados

1. Atlikus mikrodarinių iš UV-PDMS medžiagos formavimo femtosekundine spinduliuote tyrimus nustatyta, kad ši medžiaga gali būti polimerizuojama ne tik vienfotoniškai UV spinduliuote kaip nurodo gamintojas, bet ir 515 nm bangos ilgio femtosekundine spinduliuote daugiafotoniškai.

2. Atlikus trimačių mikrodarinių polimerizacijos skirtingais objektyvais (0,45 NA, 0,8 NA ir 1,4 NA) eksperimentus nustatyta, kad rezultatai labiau atkartojami naudojant aukštesnės skaitinės apertūros objektyvą, dėl pasiekiamos geresnės raiškos.

3. Atlikus mikrodarinių polimerizacijos skirtingomis galiomis (naudojant 1,4 NA objektyvą, skenuojant 1000  $\mu\text{m/s}$  greičiu) eksperimentus nustatyta, kad didinant galią, linijos plotis didėja (padidinus 2,2 kartus, linijos storis padidėja 1,6 karto), nes padidėja vokselio matmenys, o tenkinančios kokybės darinių formavimo spinduliuotės dozės ruožas yra nuo 240  $\text{J/cm}^2$  iki 360  $\text{J/cm}^2$ .

4. Atlikus mikrodarinių polimerizacijos skirtingais skenavimo greičiais (naudojant 1,4 NA objektyvą, parinkus 0,5 mW galią) eksperimentus nustatyta, kad didinant greitį, linijos plotis mažėja (padidinus 4 kartus, linijos storis sumažėja 1,3 karto), nes sumažėja vokselio matmenys, o spinduliuotės dozė norint suformuoti tenkinančios kokybės darinius turėtų būti nuo 120  $\text{J/cm}^2$  iki 420  $\text{J/cm}^2$ .

5. Atlikus linijų polimerizacijos skirtingomis skenavimų kryptimis eksperimentus buvo pastebėta, kad skenuojant ta pačia kryptimi linijos stipriau polimerizuojamos toje pusėje, kurioje baigiamas skenavimas, o skenuojant priešingomis kryptimis linijos formuojamos simetriškai, tikėtina dėl šilumos ir radikalų difuzijos.

6. Suformavus 3D mikrokarkasus ir užsėjus juos žiurkės dantų pulpos kamieninėmis ląstelėmis buvo nustatyta, kad polimerizuota UV-PDMS medžiaga yra potencialiai biosuderinama ir tinkama audinių inžinerijos tyrimams, nes po 96 val. augimo ląstelės buvo padengusios visą karkasą.

## Literatūros sąrašas

- [1] S. Varapnickas, M. Malinauskas, Processes of direct laser writing 3D nano-lithography, Preprints (2018120119) (2018).
- [2] J. P. Fouassier, J. Lalevee, *Photoinitiators for Polymer Synthesis* (Wiley-VCH, 2012).
- [3] R. Raman, R. Bashir, Stereolithographic 3D bioprinting for biomedical applications. in: Essentials of 3D biofabrication and translation, Elsevier 89–121 (2015).
- [4] M. Malinauskas, A. Žukauskas, S. Hasegawa, Y. Hayasaki, V. Mizeikis, R. Buividas, S. Juodkazis, Ultrafast laser processing of materials: from science to industry, *Light. Sci. Appl.* **5**(e16133) (2016).
- [5] S. Rekštytė, M. Malinauskas, S. Juodkazis, Three-dimensional laser micro-sculpturing of silicone: towards bio-compatible scaffolds, *Opt. Express* **21**(14), 17030 (2013).
- [6] A. Dubietis, *Netiesinė optika*, UDK 535:530.1(075.8) (Vilniaus Universitetas, 2011).
- [7] P. Bushev, C. Muller, J. Lisenfeld, J. H. Cole, A. Lukashenko, A. Shnirman, A. V. Ustinov, Multiphoton spectroscopy of a hybrid quantum system, *Phys. Rev.* **B 82**(134530) (2010).
- [8] K. Gaus, E. Gratton, E. P. W. Kable, A. S. Jones, I. Gelissen, L. Kritharides, W. Jessup, Visualizing lipid structure and raft domains in living cells with two-photon microscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**(26), 15554–15559 (2003).
- [9] N. Mansour, K. Mansour, E. W. V. Stryland, M. J. Soileau, Diffusion of color centers generated by two-photon absorption at 532 nm in cubic zirconia, *J. Appl. Phys.* **67**(1475) (1990).
- [10] L. Jonušauskas, S. Juodkazis, M. Malinauskas, Optical 3D printing: bridging the gaps in the mesoscale, *J. Opt.* **20**(053001) (2018).
- [11] J. Fouassier, X. Allonas, D. Burget, Photopolymerization reactions under visible lights: principle, mechanisms and examples of applications, *Prog. Org. Coat.* **47**(1), 16–36 (2003).
- [12] M. Malinauskas, S. Juodkazis, *Fundamentals of Laser-Assisted Micro- and Nanotechnologies* (Springer Series in Material Science, 2014), volume 195, chapter A Decade of Advances in Femtosecond Laser Fabrication of Polymers: Mechanisms and Applications, 271–291.
- [13] J. W. Stansbury, M. J. Idacavage, 3D printing with polymers: Challenges among expanding options and opportunities, *Dent. Mater.* **32**(1), 54–64 (2016).
- [14] D. I. Bower, *An Introduction to Polymer Physics* (Cambridge University Press, 2002).

- [15] G. Odian, *Principles of Polymerization, Fourth Edition* (A John Willey & Sons, INC., 2004).
- [16] M. Malinauskas, A. Zukauskas, G. Bickaускаite, R. Gadonas, S. Juodkasis, Mechanisms of three-dimensional structuring of photo-polymers by tightly focussed femtosecond laser pulses, *Opt Express* **18**(10), 10209–10221 (2010).
- [17] R. Buividas, S. Rekstyte, M. Malinauskas, S. Juokasis, Nano-groove and 3D fabrication by controlled avalanche using femtosecond laser pulses, *Opt. Mater. Express* **3**(10), 1674–1686 (2013).
- [18] K. Parkatzidis, E. Kabouraki, A. Selimis, M. Kaliva, A. Ranella, M. Farsari, M. Vamvakaki, Initiator-free, multiphoton polymerization of gelatin methacrylamide, *Macromol. Mater. Eng.* 1800458 (2018).
- [19] S. Park, T. Lim, D. Yang, R. Kim, K. Lee, Improvement of spatial resolution in nano-stereolithography using radical quencher, *Macromol. Res.* **14**(5), 559–564 (2006).
- [20] J. Shaw, J. Gelorme, N. LaBianca, W. Conley, S. Holmes, Negative photoresists for optical lithography, *IBM J. Res. Dev.* **41**, 81–94 (1997).
- [21] K. Terzaki, M. Farsari, *Polymer Processing Through Multiphoton Absorption* (Springer, 2018).
- [22] A. C. Campo, C. Greiner, SU-8: a photoresist for high-aspect-ratio and 3D submicron lithography, *J. Micromech. Microeng.* **17**, R18–R95 (2007).
- [23] M. Farsari, B. Chichkov, Two-photon fabrication, *Nat. Photon.* **3**, 450–452 (2009).
- [24] S. Lee, J. J. Moon, J. West, Three-dimensional micropatterning of bioactive hydrogels via two-photon laser scanning photolithography for guided 3D cell migration, *Biomaterials* **29**(20), 2962–2968 (2008).
- [25] R. Langer, J. Vacanti, Tissue engineering, *Science* **260**(5110), 920–926 (1993).
- [26] J. W. Lee, 3D nanoprinting technologies for tissue engineering applications, *J. Nanomater.* **2015**, 1–14 (2015).
- [27] B. Richter, V. Hahn, S. Bertels, T. K. Claus, M. Wegener, G. Delaittre, C. Barner-Kowollik, M. Bastmeyer, Guiding cell attachment in 3D microscaffolds selectively functionalized with two distinct adhesion proteins, *Adv. Mater.* **29**(5), 1604342 (2016).
- [28] E. Käpylä, D. Aydogan, S. Virjula, S. Vanhatupa, S. Miettinen, J. Hyttinen, M. Kellomäki, Direct laser writing and geometrical analysis of scaffolds with designed pore architecture for three-dimensional cell culturing, *J. Micromech. Microeng.* **22**(11), 115016 (2012).

- [29] P. S. Timashev, M. V. Vedunova, D. Guseva, E. Ponimaskin, A. Deiwick, T. A. Mishchenko, E. V. Mitroshina, A. V. Koroleva, A. S. Pimashkin, I. V. Mukhina, V. Y. Panchenko, B. N. Chichkov, V. N. Bagratashvili, 3D in vitro platform produced by two-photon polymerization for the analysis of neural network formation and function, *Biomed. Phys. Eng. Express* **2**(3), 035001 (2016).
- [30] M. T. Raimondi, S. M. Eaton, M. M. Nava, M. Lagan'a, G. Cerullo, R. Osellame, Two-photon laser polymerization: From fundamentals to biomedical application in tissue engineering and regenerative medicine, *J. Appl. Biomater. Funct. Mater.* **10**(1), 56–66 (2012).
- [31] J. J. Norman, T. A. Desai, Control of cellular organization in three dimensions using a microfabricated polydimethylsiloxane–collagen composite tissue scaffold, *Tissue Engineering* **11**(3-4) (2005).
- [32] T. M. G. Chu, D. G. Orton, S. J. Hollister, S. E. Feinberg, J. W. Halloran, Mechanical and in vivo performance of hydroxyapatite implants with controlled architectures, *Biomaterials* **23**(5), 1283–1293 (2002).
- [33] Y. Lu, G. Mapili, G. Suhali, S. Chen, K. Roy, A digital micro-mirror device-based system for the microfabrication of complex, spatially patterned tissue engineering scaffolds, *J. Biomed. Mater. Res.* **77A**(2), 396–405 (2006).
- [34] R. Gauvin, Y. Chen, J. W. Lee, P. Soman, P. Zorlutuna, J. W. Nichol, H. Bae, S. Chen, A. Khademhosseini, Microfabrication of complex porous tissue engineering scaffolds using 3D projection stereolithography, *Biomaterials* **33**, 3824–3834 (2012).
- [35] UV-PDMS, <https://www.microresist.de/en/products/nanoimprint-resists/working-stamp-fabrication/uv-curable-liquid-silicone-rubber-uv-pdms>, Micro resist technology GmbH (2018 06 09).
- [36] N. Chidambaram, R. Kirchner, High fidelity 3D thermal nanoimprint with UV curable polydimethyl siloxane stamps, *J. Vac. Sci. Technol. B* **34**(06K401) (2016).
- [37] L. Jonušauskas, D. Gailevičius, L. Mikoliūnaitė, D. Sakalauskas, S. Šakirzanocas, S. Juodkazis, M. Malinauskas, Optically clear and resilient free-form u-optics d-printed via ultra-fast laser lithography, *Materials* **10**(1)(12) (2017).
- [38] J. Lotters, W. Olthuis, P. Veltink, P. Bergveld, The mechanical properties of the rubber elastic polymer polydimethylsiloxane for sensor applications, *J. Micromech. Microeng.* **7**, 145–147 (2006).
- [39] W. Chen, P. Chen, S. Wang, J. Yeh, C. Huang, K. Chen, UV-curable PDMS-containing PU system for hydrophobic textile surface treatment, *J. Polym. Res* **16**, 601–610 (2009).

- [40] O. Suttmann, K. Obata, Y. Nakajima, A. Hohnholz, J. Koch, M. Terakawa, L. Overmeyer, UV laser photo-polymerization of elastic 2D/3D structures using photo-curable PDMS (polydimethylsiloxane), *J. Laser Micro Nanoeng.* **12**(2) (2017).
- [41] T. Thorsen, S. Maerkl, S. Quake, Microfluidic large scale integration, *Science* **298**, 580–584 (2002).
- [42] E. Leclerc, Y. Sakai, T. Fujii, Cell culture in 3-dimensional microfluidic structure of PDMS (polydimethyl-siloxane), *Biomed. Microdev.* **5**, 109–114 (2003).
- [43] J.-H. Jang, C. Ullal, T. Gorishnyy, V. Tsukruk, E.L.Thomas, Mechanically tunable three-dimensional elastomeric network/air structures via interference lithography, *Nano Lett.* **6**, 740–743 (2006).
- [44] N.-T. Nguyen, Micro-optofluidic lenses: a review, *Biomicrofluidics* **4**(031501) (2010).
- [45] F. Schneider, J. Draheim, R. Kamberger, U. Wallrabe, Process and material properties of polydimethylsiloxane (PDMS) for optical MEMS, *Sensor Actuat. A-Phys.* **151**(2), 95–99 (2009).
- [46] M.-C. Bélanger, Y. Marois, Hemocompatibility, biocompatibility, inflammatory and in vivo studies of primary reference materials lowdensity polyethylene and polydimethylsiloxane: A review, *J. Biomed. Mater. Res.* **58**(5), 467–477 (2001).
- [47] T. C. Merkel, V. I. Bondar, K. Nagai, B. D. Freeman, I. Pinnau, Gas sorption, diffusion, and permeation in poly(dimethylsiloxane), *J. Polym. Sci. Polym. Phys.* **38**(3), 415–434 (2000).
- [48] E. Garskaite, L. Alinauskas, M. Drienovsky, J. Krajcovic, R. Cicka, M. Palcut, L. Jonusauskas, M. Malinauskas, Z. Stankeviciute, A. Kareiva, Fabrication of a composite of nanocrystalline carbonated hydroxyapatite (cHAP) with polylactic acid (PLA) and its surface topographical structuring with direct laser writing (DLW), *RSC Adv.* **6**, 72733–72743 (2016).
- [49] Y. Li, H. Cui, F. Qi, H. Y. Yang, Q. Gong, Uniform suspended nanorods fabricated by bidirectional scanning via two-photon photopolymerization, *Nanotechnology* **19**(375304) (2008).



# Konferencijos ir publikacijos

## Konferencijos

1. G. Grigalevičiūtė, E. Balčiūnas, L. Jonušauskas, S. Rekštytė, D. Baltriukienė, V. Bukelskienė, M. Malinauskas, "Fabrication of flexible microporous 3D scaffolds via stereolithography", OpenReadings, Vilnius, Lietuva, 2017.

Darbas išrinktas vienu geriausių Fotonikos ir Lazerių technologijos srityje.

2. E. Skliutas, G. Grigalevičiūtė, S. Kašėtaitė, L. Jonušauskas, J. Ostrauskaitė, M. Malinauskas, "Fabrication of elastic microporous 3D scaffolds and photostructuring of naturally derived resins employing dynamic projection lithography", SPIE Nanophotonics Australasia, Melbourne, Australia, 2017.

3. G. Grigalevičiūtė, D. Baltriukienė, L. Jonušauskas, M. Malinauskas, "Fabrication of flexible microporous 3D scaffolds via stereolithography", Lietuvos Nacionalinė Fizikų Konferencija (LNKF), Vilnius, Lietuva, 2017.

4. G. Grigalevičiūtė, D. Baltriukienė, E. Balčiūnas, L. Jonušauskas, M. Malinauskas, "Fabrication of flexible microporous 3D scaffolds via stereolithography and their biocompatibility optimization", Photonics West 2018, San Francisco, USA, 2018.

5. G. Grigalevičiūtė, D. Baltriukienė, E. Balčiūnas, L. Jonušauskas, M. Malinauskas, "Fabrication of flexible microporous 3D scaffolds via stereolithography and optimization of their biocompatibility", OpenReadings, Vilnius, Lietuva, 2018.

6. G. Grigalevičiūtė, D. Baltriukienė, L. Jonušauskas, M. Malinauskas, "Fabrication of elastomeric structures via stereolithography and optimization of their biocompatibility", ICPEPA11, Vilnius, Lithuania, 2018.

7. G. Grigalevičiūtė, D. Baltriukienė, L. Jonušauskas, M. Malinauskas, Tvarikių mikroporėtų karkasų optinis 3D spausdinimas, jų biosuderinamumo tyrimas ir optimizavimas, LMT studentų mokslinės veiklos pasiekimų konferencija, Vilnius, Lietuva, 2018.

8. G. Grigalevičiūtė, D. Baltriukienė, L. Jonušauskas, M. Malinauskas, Femtosecond laser 3D microfabrication of elastomeric resin, Open Readings 2019, Vilnius, Lietuva, 2019.

## Publikacijos

1. E. Skliutas, S. Kašėtaitė, G. Grigalevičiūtė, L. Jonušauskas, J. Ostrauskaitė, M. Malinauskas, Bioresists from renewable resources as sustainable photoresins for 3D laser microlithography: material synthesis, cross-linking rate and characterization of the structures, Proc. SPIE **10115**, 1011514 (2017).

2. G. Grigalevičiūtė, D. Baltriukienė, E. Balčiūnas, L. Jonušauskas, M. Malinauskas, Fabrication of flexible microporous 3D scaffolds via stereolithography and optimization of their biocompatibility, Proc. SPIE **10544**, 105441E (2018).

Giedrė Grigalevičiūtė

ELASTOMERO 3D MIKROFORMAVIMO FEMTOSEKUNDINE LAZERINE  
SPINDULIUOTE TYRIMAS

**Santrauka**

Šiame magistrantūros studijų baigiamajame darbe yra pateikiama 3D lazerinės litografijos ir lazerinės daugiafotonės polimerizacijos literatūros apžvalga ir eksperimentai. Naudojant šviesai jautrią medžiagą ir femtosekundinius lazerio impulsus, galima inicijuoti medžiagoje fotochemines reakcijas, kurių metu apšviestoje vietoje monomerai jungiasi į polimerus taip skystoje fotoderoje suformuojant kietą trimatį objektą.

Šiame darbe femtosekundinės lazerinės litografijos eksperimentai buvo atliekami naudojant elastomerinę medžiagą polidimetil-siloksaną (UV-PDMS, gamintojas *ShinEtsu*). Eksperimentų metu buvo nustatyta, jog ši medžiaga gali būti polimerizuojama femtosekundine 515 nm bangos ilgio lazerine spinduliuote, taip pat nustatyta, kokie tinkamiausi formavimo parametrai (fokusavimo, ekspozicijos dozės) ir suformavus trimačius karkasus patikrintas medžiagos biosutaikomumas ir tinkamumas audinių bioinžinerijos taikymams.

Tyrimų metu buvo nustatyta, kad atkartojami UV-PDMS polimerizavimo rezultatai gauti, kai formavimui naudojamas aukštos skaitinės apertūros objektyvas (1,4 NA, lyginant su 0,45 NA ir 0,8 NA), parinkus ekspozicijos dozę intervale nuo 240 J/cm<sup>2</sup> iki 360 J/cm<sup>2</sup>. Taip pat nustatyta, kad skirtingos skenavimo kryptys (priešingai arba ta pačia kryptimi) pasireiškia skirtingais darinio simetrijos rezultatais. Remiantis nustatytais formavimo sąlygomis pagaminti 3D karkasai biosutaikomumo tyrimų metu pasireiškė teigiamais ląstelių gyvybingumo rezultatais.

Atlikti tyrimai suteikia pagrindą tolimesniems 3D lanksčių karkasų iš UV-PDMS medžiagos eksperimentams, plėtojant mikroarchitektūros ir karkase užaugusių ląstelių *in vivo* tyrimus.

Giedrė Grigalevičiūtė

## INVESTIGATION OF FEMTOSECOND LASER 3D MICROFABRICATION OF ELASTOMER

### Summary

In this work the literature review and experiments of 3D laser lithography and multiphoton polymerization are described. When using photosensitive material and femtosecond laser pulses, photochemical reactions can be initiated in the volume of material. As a result, monomers in the focus area merge into polymers so that confined 3D object can be formed in a liquid photoresin.

In this work femtosecond laser lithography experiments were performed with elastomeric resin polydimethyl-siloxane (UV-PDMS, manufacturer *ShinEtsu*). During the experiments the goal was to determine if this material can be processed with femtosecond laser of 515 nm wavelength. Also, to investigate the optimal parameters (focusing, exposition dosage) for the micro-fabrication of the material mentioned before. 3D scaffolds of UV-PDMS were fabricated and their biocompatibility as indicator of suitability for tissue engineering applications was tested.

During the researches the optimal parameters of quality results we achieved with the high numerical aperture objective (1.4 NA compared to 0.45 NA and 0.8 NA), when choosing the exposition dosage in the range from 240 J/cm<sup>2</sup> iki 360 J/cm<sup>2</sup>. Also there was noticed, that the scanning in different directions (opposite and the same) results in different symmetry of the fabricated object. The biocompatibility test results of fabricated 3D scaffolds out of UV-PDMS material showed positive cell viability results and suitability for tissue engineering applications.

The carried out researches provides the basis for further experiments of elastomeric 3D scaffolds of UV-PDMS, including its micro-architecture and grown cells *in vivo* investigation.