



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΤΩΝ ΥΛΙΚΩΝ

**Τριδιάστατη εκτύπωση (3D printing) υβριδικών υδρογελών για
βιολογικές εφαρμογές - Ανάλυση και βελτιστοποίηση των
παραμέτρων της διεργασίας**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

της

ΔΙΑΜΑΝΤΗ ΕΛΕΝΑΣ ΘΩΜΑΗ

Επιβλέπων : Κωνσταντίνος Χαριτίδης
Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Αθήνα, Ιούλιος 2017



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΤΩΝ ΥΛΙΚΩΝ

**Τριδιάστατη εκτύπωση (3D printing) υβριδικών υδρογελών
για βιολογικές εφαρμογές - Ανάλυση και βελτιστοποίηση των
παραμέτρων της διεργασίας**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

της

ΔΙΑΜΑΝΤΗ ΕΛΕΝΑΣ ΘΩΜΑΗ

Επιβλέπων : Κωνσταντίνος Χαριτίδης
Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Εγκρίθηκε από την τριμελή εξεταστική επιτροπή την 3^η Ιουλίου 2017.

Χαριτίδης Κωνσταντίνος

Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Δέτση Αναστασία

Αναπλ. Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

Κακάλη Γλυκερία

Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

Αθήνα, Ιούλιος 2017

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στην Ερευνητική Μονάδα Προηγμένων, Σύνθετων, Νάνο Υλικών και Νανοτεχνολογίας (R-NanoLab) του Τομέα Επιστήμης και Τεχνικής των Υλικών της Σχολής Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ.

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου σε όλους εκείνους που συνέβαλλαν ουσιαστικά, άμεσα ή έμμεσα, στην ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Αρχικά, οφείλω να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Ε.Μ.Π. κ. Χαριτίδη Κωνσταντίνο, επιβλέποντα της διπλωματικής μου εργασίας, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα, για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια ολόκληρης της πορείας μου. Η παροιμιώδης εμπιστοσύνη την οποία επέδειξε προς το πρόσωπό μου αποτέλεσε για μένα πηγή έμπνευσης και εντατικοποίησης των προσπαθειών μου.

Πολύτιμες υπήρξαν οι συμβουλές και η βοήθεια της Διδάκτορος Δέσποινας Μπρασινίκα καθώς και της υποψηφίας Διδάκτορος Ελένης Γκάρτζου. Η άποψη συνεργασίας μας καθώς και η συνεχής υποστήριξή τους ήταν καταλυτικής σημασίας για την εκπόνηση της παρούσας εργασίας. Οι λέξεις είναι φτωχές προκειμένου να εκφράσουν τις ευχαριστίες μου προς το πρόσωπό τους, μιας και ήταν πάντα διαθέσιμες να μου προσφέρουν τις γνώσεις και την επιστημονική εμπειρία τους.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλη την ομάδα του R-NANO. Το υπέροχο κλίμα συνεργασίας που δημιούργησαν τόσο σε φιλικό όσο και σε επιστημονικό επίπεδο συντέλεσε στην ομαλή ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να αφιερώσω την εργασία αυτή στην οικογένειά μου και στο κοντινό φιλικό μου περιβάλλον για την συμπαράστασή τους όλα τα χρόνια των σπουδών μου στο Ε.Μ.Π.

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία έγινε **σύνθεση υβριδικών νανοδομημένων υλικών** αποτελούμενων από **κρυστάλλους υδροξυαπατίτη και βιομόρια (χιτοζάνη, κολλαγόνο)** με στόχο την **τριδιάστατη εκτύπωση** εμφυτεύσιμων υλικών με **ενισχυμένη βιοσυμβατότητα και βιοδραστικότητα για οστική ανάπτυξη**. Ο χαρακτηρισμός του υλικού κι η επιβεβαίωση της σύνθεσης του υδροξυαπατίτη εργαστηριακά έγινε με Φασματοσκοπία Υπερύθρου με Μετασχηματισμό Fourier Εξασθενημένης Ολικής Ανάκλασης (FTIR-ATR). Η ανάπτυξη τριδιάστατων υβριδικών ικριωμάτων υδροξυαπατίτη-βιομορίων καθορισμένης μικρο-αρχιτεκτονικής και μακροπορώδους έγινε μέσω **τριδιάστατης εκτύπωσης (3D printing)** των υλικών που αναπτύχθηκαν σε σύστημα αυτοματοποιημένης εξώθησης και επιλεκτικής εναπόθεσης υλικού σε ρευστή κατάσταση. Απαραίτητη προϋπόθεση για την εκτυπωσιμότητα του υλικού αποτέλεσε η **προσθήκη υδρογέλης ζελατίνης** με στόχο τη **βελτίωση της ρεολογικής συμπεριφοράς του υλικού προς εκτύπωση**. Εξετάστηκε η **επίδραση των κατασκευαστικών παραμέτρων** F (ταχύτητα πρόωσης), E (απόσταση μετατόπισης εμβόλου), πλάτος μεμονωμένων ινών και ποσοστό πληρώσεως πλέγματος **στα γεωμετρικά χαρακτηριστικά και τη διαστατική ακρίβεια των εκτυπωμένων δομών**. Για την εύρεση των βέλτιστων παραμέτρων εκτύπωσης των υλικών που αναπτύχθηκαν σχεδιάστηκαν κυλινδρικά δοκίμια διαμέτρου 2cm, στα οποία μελετήθηκε η επίδραση των κατασκευαστικών παραμέτρων. Για την εκτύπωση των υβριδικών ικριωμάτων υδρογελών έγινε τροποποίηση του g κώδικα θερμοπλαστικών υλικών και τροποποίηση του 3D printer για υποστήριξη εκτύπωσης υδρογελών. Για την επίτευξη εσωτερικού μικροπορώδους στα εκτυπωμένα ικριώματα έγινε λυοφιλίωση και εξάχνωση των κρυστάλλων νερού που περιέχονταν σε αυτά. Όλα τα δείγματα παρατηρήθηκαν πριν και μετά την εξάχνωση του νερού μέσω οπτικής μικροσκοπίας, με στόχο την εύρεση του ποσοστού συρρικνώσεως και του βέλτιστου πλέγματος εκτύπωσης. Τα τριδιάστατα εκτυπωμένα ικριώματα υδροξυαπατίτη-βιομορίων που προέκυψαν μετά από τη μέθοδο της λυοφιλίωσης χαρακτηρίστηκαν ως προς τη δομή, το εσωτερικό πορώδες και τη διασυνδεσιμότητα των πόρων τους μέσω Ηλεκτρονική Μικροσκοπίας Σάρωσης (SEM) και Μικροϋπολογιστικής Τομογραφίας (microCT). Τα **παραγόμενα ικριώματα χαρακτηρίστηκαν από διασυνδεδεμένο πορώδες δίκτυο, διπλής κατανομής μεγέθους πόρων σε μικρο- και μακροκλίμακα και ικανοποιητικές μηχανικές αντοχές**.

Abstract

This thesis reports the synthesis of **hybrid nanostructured biomaterials** consisting of **hydroxyapatite crystals and biomolecules**, aiming at the **3D printing** of implantable materials **with enhanced biocompatibility and bioactivity**. The characterization and confirmation of the synthesis of the hydroxyapatite nanocrystals was based on the Fourier Transform Infrared Spectroscopy - Attenuated Total Reflection (FTIR-ATR) technique. The development of three-dimensional hybrid hydroxyapatite-biopolymers scaffolds of defined micro-architecture and macroporosity was achieved through **3D printing** of the developed materials in an automated extrusion system through selective deposition of material in liquid state. The main prerequisite for the printability of the material **was the addition of gelatin hydrogel** in order **to improve the rheological behavior of the ink**. **The influence of 3D printing process parameters** F (propulsion speed), E (piston displacement distance), fiber path width and infill pattern density were examined, **and their effect on the geometrical features and dimensional precision of the final structures** was investigated. Cylindrical specimens with 2 cm diameter were designed in order to study the effect and to find the optimal printing parameters of the developed materials. As far as the 3D printing process parameters of hybrid hydrogels scaffolds is concerned, G-code instructions for the 3D printer were generated by a Computer Aided Manufacturing software (Voxelizer) and these instructions were modified in order to support hydrogels printing. In order to achieve internal microporous network in the 3D-printed scaffolds, lyophilization and sublimation of the contained crystals of water were applied. All samples were observed before and after water was removed by optical microscopy, aiming at finding the shrinkage percentage and the optimal infill pattern. The 3D printed hydroxyapatite-biopolymers scaffolds were characterized after lyophilization to assess their structure, internal porosity and interconnectivity of their pores by Scanning Electron Microscope (SEM) and MicroCT (Micro-Computed Tomography). **The scaffolds produced exhibited a bimodal pore size distribution both in micro and macro-scale combined with satisfactory load bearing capabilities.**

Περιεχόμενα

A. Θεωρητικό Μέρος	9
1. Σύσταση και δομή του οστίτη ιστού	9
1.1. Δομικά συστατικά του οστού	9
1.2. Σύσταση και ιεραρχική δομή του οστού	22
2. Οστικά υποκατάστατα – ικρίσματα (scaffolds)	26
2.1. Ιστική Μηχανική και Αναγεννητική Ιατρική.....	26
2.2. Ικρίσματα – Ορισμός και απαιτούμενα χαρακτηριστικά.....	27
2.3. Είδη βιοϋλικών.....	30
2.4. Προκλήσεις της Ιστικής Μηχανικής	40
3. Κατασκευή ικριωμάτων μέσω της Τριδιάστατης Εκτύπωσης (3D printing)	41
3.1. Διαδικασία Προσθετικής Κατασκευής αντικειμένων	43
B. Πειραματικό Μέρος	54
4. Παρασκευή Αιωρημάτων Υδροξυαπατίτη Παρουσία Βιομορίων	54
4.1. Πειραματικός εξοπλισμός.....	54
4.2. Περιγραφή ανάπτυξης αιωρημάτων υδροξυαπατίτη	55
4.3. Πειραματική διαδικασία - παρασκευή αιωρημάτων υδροξυαπατίτη	59
5. Ανάπτυξη τριδιάστατων υβριδικών ικριωμάτων υδροξυαπατίτη-βιομορίων μέσω της τριδιάστατης εκτύπωσης	61
5.1. Πειραματικός εξοπλισμός.....	61
5.2. Τροποποίηση 3D printer για υποστήριξη εκτύπωσης υδρογελών	62
5.3. Επίτευξη κατάλληλης ρεολογικής συμπεριφοράς για τριδιάστατη εκτύπωση ικριωμάτων από υβριδικές υδρογέλες.....	64
5.4. Ανάπτυξη τριδιάστατων ικριωμάτων υδροξυαπατίτη-βιομορίων.....	68
5.5. Λυοφιλίωση (Freeze Drying).....	74
6. Τεχνικές Χαρακτηρισμού	76
6.1. Οπτικό μικροσκόπιο.....	76
6.2. Φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy –FT-IR).....	77
6.3. Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (SEM)	81
6.4. Μικροϋπολογιστική Τομογραφία (Microcomputed Tomography-microCT)	83
6.5. Μελέτη βιοσυμβατότητας-Ανάπτυξη κυτταρικών καλλιιεργειών	84
7. Αποτελέσματα και Συζήτηση	87

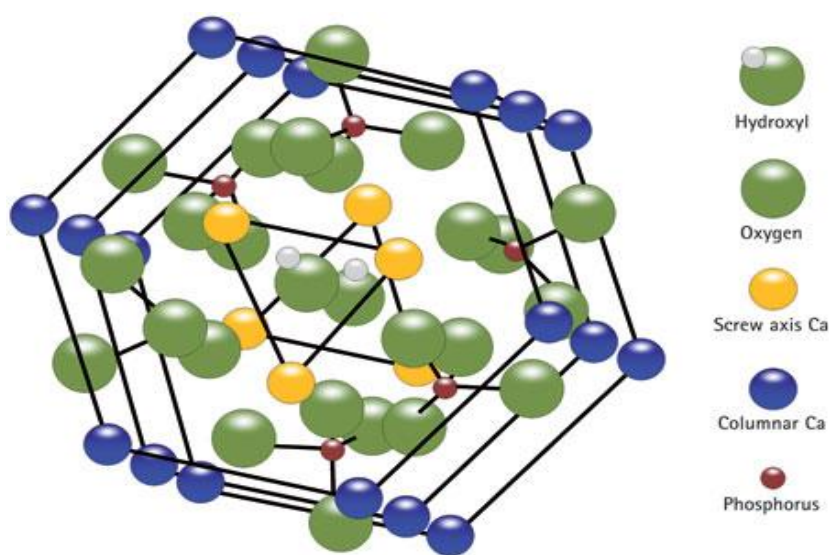
7.1. Ανάπτυξη υβριδικών νανο- κρυστάλλων υδροξυαπατίτη-βιομορίων	87
7.2. Ανάπτυξη τριδιάστατα εκτυπωμένων υβριδικών ικριωμάτων υδροξυαπατίτη-βιομορίων	89
8. Συμπεράσματα.....	115
9. Βιβλιογραφία.....	119

A. Θεωρητικό Μέρος

1. Σύσταση και δομή του οστίτη ιστού

1.1. Δομικά συστατικά του οστού

Το οστό είναι ένα σύνθετο υλικό το οποίο αποτελείται από μια οργανική και μια ανόργανη φάση, οι οποίες δημιουργούν ένα σύμπλεγμα μέσω ασβεστοποίησης της οργανικής φάσης. Το ανόργανο τμήμα είναι αυτό που υπερτερεί κατά βάρος μιας και αποτελεί περίπου το 60-70% της μάζας του οστού. Η οργανική φάση συνιστά το 20-30% της μάζας του ενώ το υπόλοιπο ποσοστό αποτελείται από νερό. Το ανόργανο τμήμα συνίσταται από άλας του φωσφορικού ασβεστίου [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, HAP] που ονομάζεται υδροξυαπατίτης. Από την άλλη, η συντριπτική πλειοψηφία της οργανικής φάσης αποτελείται από κολλαγόνο τύπου I (98% κ.β. περίπου). Το εναπομείνον 2% συνίσταται από ένα σύνολο μη κολλαγονούχων πρωτεϊνών, άλλων κυττάρων και μυελικών κυττάρων[1].



Εικόνα 1.1 Διαγραμματική απεικόνιση της δομής του υδροξυαπατίτη [2].

1.1.1. Σύσταση και δομή της ανόργανης φάσης

Ο υδροξυαπατίτης (HAP) ανήκει σε μια μεγάλη οικογένεια υλικών που ονομάζονται απατίτες και χρησιμοποιείται σε πληθώρα βιοϋλικών στην ιστική μηχανική, χάρη στην καλή του βιοσυμβατότητα. Οι απατίτες παρουσιάζουν πολύπλοκη

χημική σύσταση, καθώς είναι πολύ συνηθισμένες οι χημικές αντικαταστάσεις των ιόντων τους. Ο υδροξυαπατίτης είναι ένας άλας του φωσφορικού ασβεστίου που συναντάται στους ανθρώπινους σκληρούς ιστούς [3]. Πιο συγκεκριμένα, διαθέτει εξαγωνική δομή [4,5] και στοιχειομετρική αναλογία Ca/P 1,67 [4,6,7].

Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό του υδροξυαπατίτη είναι η σταθερότητά του σε σύγκριση με άλλα άλατα φωσφορικού ασβεστίου. Θερμοδυναμικά, είναι η πιο σταθερή ένωση άλατος φωσφορικού ασβεστίου υπό φυσιολογικές συνθήκες (θερμοκρασία, pH και σύσταση των σωματικών υγρών) [4]. Ο νανοϋδροξυαπατίτης προσελκύει το ενδιαφέρον ως βιοκεραμικό υλικό για χρήση σε βιοϊατρικές εφαρμογές, λόγω της ομοιότητάς του σε μέγεθος, κρυσταλλική δομή και χημική σύσταση με τον ανθρώπινο σκληρό συνδετικό ιστό. Τα οστά και το σμάλτο των δοντιών αποτελούνται κυρίως από μία μορφή αυτού του άλατος.

1.1.2. Τεχνικές βιομημητικής σύνθεσης υδροξυαπατίτη

Για να γίνει εφικτή η μίμηση της χημείας του ανθρώπινου οστού, πρέπει ο βιοκεραμικός νανοϋδροξυαπατίτης που παράγεται εργαστηριακά να παρουσιάζει τις εξής ιδιότητες:

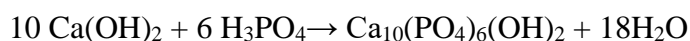
- Βιοσυμβατότητα
- Βιοδραστικότητα (bioactivity), δηλαδή ειδική επίδραση ή αντίδραση σε ζωντανό ζωικό ή φυτικό ιστό κατά την έκθεση σε μία ουσία
- Οστεοαγωγιμότητα
- Μη τοξικότητα και μη ανοσοποιητική δράση
- Αντιφλεγμονώδη δράση [8].

Λόγω της βιοδραστικότητας του, μπορεί να επάγει την ανάπτυξη νέου οστού και την αποκατάσταση βλαβών. Αυτή η διαδικασία μπορεί να αποτελέσει μια εναλλακτική λύση σε σχέση με τα αλλογενή (allografts) και ξενογενή (xenografts) μοσχεύματα οστού. Ως αλλογενές ορίζεται το μόσχευμα που προέρχεται από οργανισμό του ίδιου είδους με τον δέκτη, ενώ ξενογενές είναι το μόσχευμα που προέρχεται από οργανισμό διαφορετικού είδους. Η ύπαρξη υδροξυαπατίτη στα μοσχεύματα επιφέρει μικρότερους χρόνους επούλωσης [9].

Οι βασικότερες συνθετικές οδοί για την παραγωγή υδροξυαπατίτη είναι οι ακόλουθες:

➤ **Καταβύθιση-Χημική εναπόθεση**

Η πιο διαδεδομένη τεχνική που χρησιμοποιείται για την παραγωγή υδροξυαπατίτη είναι η καταβύθιση. Αυτή η μέθοδος προτάθηκε από τους Yagai Aoki. Οι χρησιμοποιούμενες πρώτες ύλες είναι υδροξείδιο του ασβεστίου και ορθοφωσφορικό οξύ, με μόνο παραπροϊόν της αντίδρασης το νερό:



Η μορφή του παραγόμενου υδροξυαπατίτη εξαρτάται από τον ρυθμό προσθήκης του οξέος και τη θερμοκρασία. Η ίδια μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί με διαφορετικά πρόδρομα συστατικά, με απώτερο στόχο την ομογενή κρυστάλλωση υδροξυαπατίτη σε διάλυμα κατάλληλου pH και θερμοκρασίας. Κατά περίπτωση, τα προϊόντα που προκύπτουν μπορεί να διαφέρουν ως προς τη μορφολογία ή το μέγεθος ανάλογα με την διαδικασία παρασκευής.

➤ **Τεχνική Sol-Gel**

Η μέθοδος Sol-Gel είναι πολύ αποτελεσματική για τη σύνθεση νανοϋδροξυαπατίτη, γιατί δίνει την δυνατότητα ελέγχου των παραμέτρων της διαδικασίας. Έχει παρατηρηθεί ότι τα δείγματα υδροξυαπατίτη που παρήχθησαν με αυτή τη μέθοδο βελτιώνουν την επαφή και τη σταθερότητα στη διεπιφάνεια φυσικού-συνθετικού οστού, τόσο σε περιβάλλον *in vitro* αλλά και *in vivo*. Για τη σύνθεση υδροξυαπατίτη με χρήση sol-gel, έχουν χρησιμοποιηθεί διάφοροι συνδυασμοί πρόδρομων ενώσεων-πηγών ασβεστίου και φωσφόρου. Και σε αυτή την περίπτωση η χημική δραστηριότητα και η απαιτούμενη θερμοκρασία για τον σχηματισμό δομής απατίτη εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη φύση των πρόδρομων υλικών.

➤ **Υδροθερμική Τεχνική**

Η υδροθερμική τεχνική είναι μια διεργασία που εκμεταλλεύεται αντιδράσεις απλές ή ετερογενούς φάσης σε υδατικό διάλυμα σε σχετικά αυξημένες θερμοκρασίες ($T > 25^\circ\text{C}$) και πιέσεις ($P > 100\text{kPa}$) για την κρυστάλλωση κεραμικών υλικών απευθείας

από διάλυμα. Με τη χρήση της εν λόγω τεχνικής, ο λόγος Ca/P βελτιώνεται με την αύξηση είτε της υδροθερμικής πίεσης είτε της θερμοκρασίας.

➤ Τεχνική βιομιμητικής απόθεσης

Στην τεχνική αυτή, ένα μετασταθές συνθετικό σωματικό υγρό (SBF) με συνθετικό οργανικό άλας παρεμφερούς σύστασης με αυτής του πλάσματος του αίματος, διευκολύνει την αυθόρμητη πυρήνωση και ανάπτυξη νανοϋδροξυαπατίτη που μιμείται το φυσικό οστό σε φυσιολογικό pH και θερμοκρασία. Ο σχηματισμός του στρώματος του απατίτη με βιομιμητική απόθεση σε διαφορετικά βιοϋλικά, έχει αποδειχτεί ότι προωθεί μηχανισμούς δημιουργίας ισχυρής πρόσδεσης με το οστό. Πιο συγκεκριμένα, αποδείχτηκε, ότι προωθεί την οστεογεννητική κυτταρική διαφοροποίηση με αποτέλεσμα τη δημιουργία ισχυρής σύνδεσης οστού και σύνθετης μήτρας. Με τη μέθοδο αυτή, διάφορα πορώδη εμφυτεύματα μπορούν να επικαλυφθούν με ανθρακούχο υδροξυαπατίτη νανοδιαστάσεων μέσω βύθισής τους σε διάλυμα προσομοίωσης του πλάσματος του αίματος (SBF). Η φύση των επιστρώσεων υδροξυαπατίτη μπορεί να επηρεάσει την οστεογεννητική κυτταρική διαφοροποίηση της επικάλυψης (osteogenecity), καθώς και τη διαδικασία επανασηματισμού του οστού, μέσω της μικροδομής τους, του ρυθμού διάλυσης τους και των ειδικών αλληλεπιδράσεών τους με τα σωματικά υγρά [10,11].

1.1.2.1. Μηχανισμός κρυστάλλωσης υδροξυαπατίτη

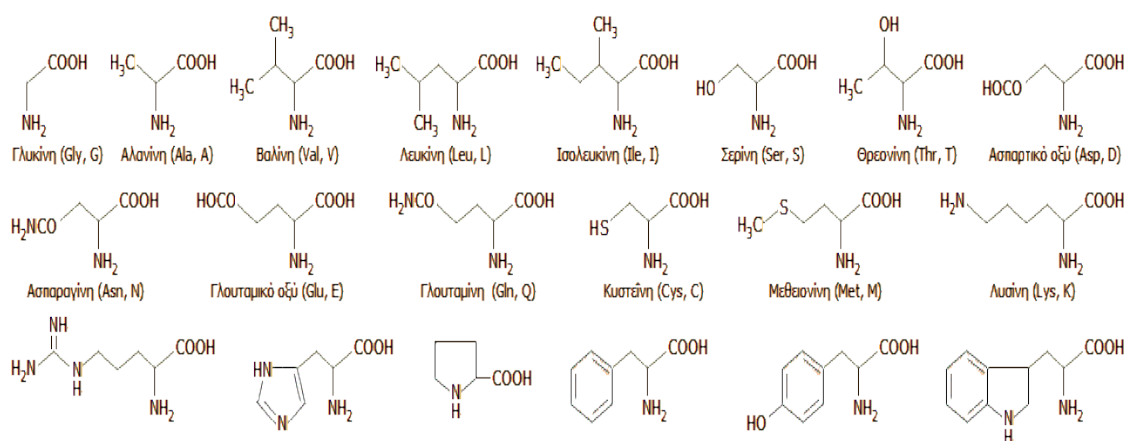
Η κρυστάλλωση του υδροξυαπατίτη φυσιολογικά πραγματοποιείται μέσω της καθίζησης ενός αριθμού ενδιάμεσων φάσεων, που διαλύονται και επανακαθαρίζουν μέχρι τον σχηματισμό της πιο θερμοδυναμικά σταθερής φάσης του. Γενικότερα, σε υψηλές τιμές pH παρατηρείται μία αρχική καθίζηση από άμορφο φωσφορικό ασβέστιο (ACP) και στη συνέχεια φωσφορικό οκτασβέστιο (OCP) με τον επακόλουθο μετασχηματισμό τους σε υδροξυαπατίτη. Σε χαμηλότερες τιμές pH είναι πιθανό να εμφανιστούν άλλες φάσεις όπως το ένυδρο φωσφορικό διασβέστιο (DCPD) [12-16]. Η καθίζηση αυτών των ενδιάμεσων φάσεων ακολουθεί τον νόμο του Ostwald για την καθίζηση ελαφρώς διαλυτών ιοντικών αλάτων, ο οποίος προβλέπει ότι η φάση που τείνει να σχηματιστεί είναι η λιγότερο σταθερή φάση, η οποία έχει τη μεγαλύτερη διαλυτότητα. Ωστόσο, ορισμένοι κινητικοί παράγοντες παίζουν σημαντικότερο ρόλο στον καθορισμό της φάσης του φωσφορικού ασβεστίου που θα σχηματιστεί. Άλλοι

παράγοντες, όπως η ύπαρξη και η επίδραση προσθέτων ή ιόντων, ή η ύπαρξη άλλων κρυστάλλων μέσα στους οποίους μπορεί να πραγματοποιηθεί επιταξιακή ανάπτυξη, έχουν σημαντική επίδραση στον σχηματισμό των φάσεων του φωσφορικού ασβεστίου [17]. Η διαδικασία της κρυσταλλοποίησης ξεκινάει όταν η συγκέντρωση των ιόντων στο διάλυμα ξεπερνά τη σταθερά διαλυτότητας του προϊόντος για τον συγκεκριμένο κρύσταλλο. Η διαλυτότητα του προϊόντος καθορίζει τις θερμοδυναμικές συνθήκες που απαιτούνται για την ανόργανη καθίζηση και συνδέεται με τη δραστηριότητα (δραστική συγκέντρωση) των ιόντων στο διάλυμα σε ισορροπία με τη στερεή φάση. Οι θερμοδυναμικοί υπολογισμοί της κρυσταλλοποίησης πρέπει να συμπεριλάβουν και τους κινητικούς παράγοντες που αφορούν στον σχηματισμό πυρήνων, μία διαδικασία απαραίτητη για την κρυσταλλοποίηση καθώς ο σχηματισμός αυτός αποτελεί τη βάση για την ανάπτυξη των κρυστάλλων. Η διαδικασία σχηματισμού πυρήνων μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε αυθόρμητα (ομογενής) ή να χρειάζεται ενεργοποίηση με την παρουσία ξένων ουσιών ή άλλων κρυστάλλων (ετερογενής). Η διαδικασία αυτή διέπεται από μία λεπτή ισορροπία ανάμεσα στην ελεύθερη ενέργεια που απαιτείται για τον σχηματισμό μιας διεπιφάνειας στερεού-υγρού και στην ενέργεια των ιόντων του διαλύματος (κύριος όγκος). Ο ετερογενής σχηματισμός πυρήνων είναι θερμοδυναμικά πιο εφικτός, καθώς παρέχεται επιφάνεια πάνω στην οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί η κρυσταλλική ανάπτυξη και έτσι απαιτείται μικρότερος υπερκορεσμός και κατ'επέκταση μειώνεται και η απαίτηση για υπέρβαση της ενέργειας ενεργοποίησης του σχηματισμού πυρήνων. Η ενέργεια που απαιτείται για την κρυσταλλοποίηση μειώνεται περαιτέρω εάν υπάρχει καλή χημική και δομική αλληλεπίδραση μεταξύ των νέων και των ήδη υπαρχόντων φάσεων. Η ύπαρξη προσθέτων, που δρουν σαν σημεία εκκίνησης του σχηματισμού πυρήνων, μειώνει επίσης την ενέργεια που απαιτείται για την κρυσταλλοποίηση, διευκολύνοντας έτσι την ανάπτυξη κρυστάλλων προς συγκεκριμένες κατευθύνσεις. Η ανάπτυξη των κρυστάλλων εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα των ιόντων στο διάλυμα. Καθώς ο υπερκορεσμός είναι εντονότερος από τη δραστηριότητα του προϊόντος, η ανάπτυξη των κρυστάλλων θα συνεχιστεί και θα σταματήσει όταν επιτευχθεί ισορροπία. Ωστόσο, σε ένα διάλυμα με συγκεκριμένη συγκέντρωση ιόντων, όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός διαθέσιμων σημείων για τον σχηματισμό πυρήνων, τόσο μικρότεροι θα είναι οι παραγόμενοι κρύσταλλοι. Η κρυσταλλική ανάπτυξη εξαρτάται επίσης από τη δομή των αναπτυσσόμενων κρυστάλλων και από τη φάση που καθιζάνει. Εάν η δομή περιέχει μεγάλο αριθμό επιφανειακών ατελειών, στις οποίες η κρυσταλλοποίηση δεν είναι πλέον θερμοδυναμικά εφικτή, η ανάπτυξη θα σταματήσει.

Ομοίως, εάν μία δεύτερη πιο διαλυτή φάση επικαθήσει πάνω από την πρωταρχική φάση, λόγω διακυμάνσεων στις συνθήκες του διαλύματος, η κρυσταλλική ανάπτυξη θα σταματήσει ακόμα και αν το διάλυμα είναι ακόμα υπέρκορο σε σχέση με την αρχική φάση. Παρεμπόδιση της κρυσταλλικής ανάπτυξης από πρόσθετα επιτυγχάνεται με προσρόφησή τους στην επιφάνεια του αναπτυσσόμενου κρυστάλλου, μπλοκάροντας έτσι την ανάπτυξή του. Εάν τα πρόσθετα προσροφούνται επιλεκτικά σε συγκεκριμένες κρυσταλλικές επιφάνειες, τότε η ανάπτυξη θα παρεμποδιστεί κατά τη συγκεκριμένη μόνο κατεύθυνση, τροποποιώντας με αυτόν τον τρόπο τη μορφολογία του κρυστάλλου [18].

1.1.2.2. Εφαρμογές αμινοξέων στο σχηματισμό του υδροξυαπατίτη

Αμινοξέα ονομάζονται οι χημικές ενώσεις που περιέχουν μία τουλάχιστον καρβοξυλική ομάδα (από τα καρβοξυλικά οξέα (RCOOH)) και μία τουλάχιστον αμινομάδα (-NH₂). Τα αμινοξέα αποτελούν τα βασικά δομικά στοιχεία των πρωτεϊνών που καθορίζουν και τις χαρακτηριστικές ιδιότητές τους. Μια μειοψηφία αυτών είναι ιδιαίτερα σημαντικά για τη Βιοχημεία. Πρόκειται κυρίως για α-αμινοξέα [γενικού τύπου RCH(NH₂)COOH], δηλαδή αμινοξέα που έχουν αμινομάδα στο πρώτο άτομο άνθρακα (C) μετά την καρβοξυλομάδα (-COOH). Είκοσι (20) από αυτά χρησιμοποιούνται στην κατασκευή των περισσότερων πρωτεϊνών των ζωντανών οργανισμών στη Γη. Αυτά ονομάζονται πρωτεϊνικά αμινοξέα. Πολλά αμινοξέα δημιουργούνται (συντίθενται) από άλλα αμινοξέα με μια διαδικασία που λέγεται διαμίνωση ή τρανσαμίνωση (transamination), αν και οι περισσότεροι οργανισμοί λαμβάνουν τα βασικά αμινοξέα (essential amino acids) με την τροφή. Κάθε αμινοξύ φέρεται κωδικοποιημένο από μια τουλάχιστον τριάδα (τριπλέτα) γενετικού κώδικα DNA. Τα πεπτίδια σχηματίζονται με



Εικόνα 1.2 Απεικόνιση των 20 βασικών αμινοξέων.

τη σύνδεση αμινοξέων μέσω αμιδικών δεσμών. Η σειρά των αμινοξέων που συνθέτουν μια πρωτεΐνη (πρωτοταγής δομή), ενώνεται με δεσμούς πεπτιδίων (-NH-CO-) προκειμένου να δημιουργήσει μια πολυπεπτιδική αλυσίδα.

Έχει αποδειχθεί πως η κρυσταλλική πυρήνωση του υδροξυαπατίτη επηρεάζεται από μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες που απαντώνται σε μικρές ποσότητες στους ιστούς. Αμινοξέα τέτοιων πρωτεϊνών είναι η αργινίνη (Arg), η λυσίνη (Lys), το ασπαρτικό οξύ (Asp) και το γλουταμινικό οξύ (Glu).

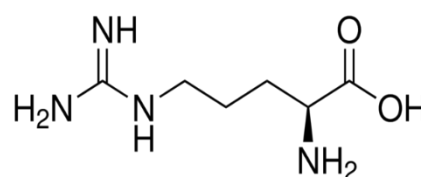
Έρευνες *in vitro* καταδεικνύουν πως οι εν λόγω πρωτεΐνες μπορούν, τόσο να ρυθμίσουν τον σχηματισμό του απατίτη, όσο και να ελέγξουν το σχήμα και το μέγεθος των τελικών κρυστάλλων που θα αναπτυχθούν, καθώς δρουν είτε ενισχυτικά ή παρεμποδιστικά στην αντίδραση ανάπτυξης του υδροξυαπατίτη, ανάλογα με τη συγκέντρωσή τους στο διάλυμα και τις συνθήκες που επικρατούν [19]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως κάποιες έρευνες αναφέρουν ότι πολλά από αυτά τα μόρια μπορεί κάποιες φορές να έχουν τα αντίθετα αποτελέσματα στις διαδικασίες κρυστάλλωσης, ανάλογα με τη συγκέντρωση των αμινοξέων και το αν το αμινοξύ βρίσκεται σε διάλυμα ή σε δεσμευμένη κατάσταση. Σε πολλές έρευνες χρησιμοποιούνται βιομόρια ως αναστολείς ανάπτυξης του υδροξυαπατίτη. Στο πλαίσιο αυτό, η χρήση αμινοξέων ως πιθανών αναστολέων παρουσιάζει πλεονεκτήματα, καθώς τα αμινοξέα είναι βιοενεργές, φυσιολογικές ουσίες που μετακινούνται ελεύθερα μέσω της κυκλοφορίας του αίματος σε όλους τους ιστούς του σώματος των σπονδυλωτών. Παρόλα αυτά, παρά τη σημασία των μη-κολλαγονούχων πρωτεϊνών και αμινοξέων στο σχηματισμό του υδροξυαπατίτη, η ακριβής επίδρασή τους στην κρυστάλλωσή του δεν είναι ακόμη ξεκάθαρη.

Δομή και ιδιότητες της L-Αργινίνης (Arg)

Η Αργινίνη (Arg ή (S)-2 -Amino-5-guanidinopentanoic acid κατά IU PAC) είναι ένα αμινοξύ με μοριακό τύπο $C_6H_{14}N_4O_2$ και μοριακή μάζα 174.2 g mol^{-1} . Η L-απεικόνιση της αποτελεί ένα από τα πιο κοινά φυσικά αμινοξέα. Η αργινίνη αποτελείται από μια αλειφατική ευθεία αλυσίδα 4 ανθράκων, στο τέλος της οποίας βρίσκεται μια σύνθετη γουανιδινομάδα. Εξαιτίας της κλίσης μεταξύ του διπλού δεσμού και των μη δεσμικών ηλεκτρονίων του αζώτου, το θετικό φορτίο είναι απεντοπισμένο, επιτρέποντας τον σχηματισμό πολλαπλών δεσμών υδρογόνου. Η γεωμετρία, η

διασπορά του φορτίου και η ικανότητα να δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου καθιστά την αργινίνη ιδανική περίπτωση για τη σύνδεση αρνητικά φορτισμένων ομάδων.

Με $PK_a = 12,48$ η γουανιδική ομάδα είναι θετικά φορτισμένη σε ουδέτερα, όξινα και ακόμα και στα περισσότερα βασικά περιβάλλοντα και για τον λόγο αυτό προσδίδει την βασικότητα του αμινοξέος. Η αργινίνη ως βασικό αμινοξύ, έχει



Εικόνα 1.3 Δομή της L-αργινίνης.

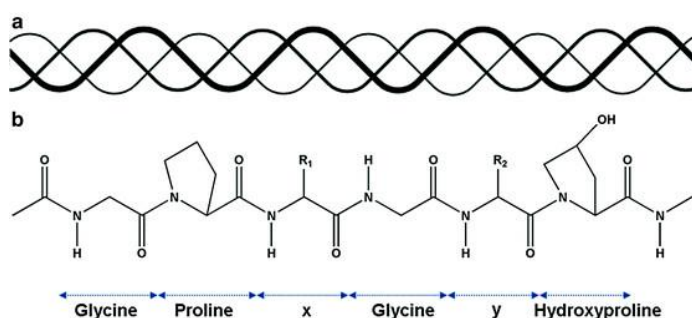
πολικές πλευρικές ομάδες γουανιδίνης πλήρως ιονισμένες, δηλαδή θετικά φορτισμένες σε ουδέτερο pH. Έτσι το μόριο της αργινίνης είναι ισχυρά πολικό και για τον λόγο αυτό και ισχυρά βασικό.

Στην έρευνα ανάπτυξης νανοσωματιδίων υδροξυαπατίτη, η αργινίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διεύρυνση της βιοδραστικότητας των νανοσωματιδίων με επιφανειακή ενεργοποίηση. Επιπλέον οφέλη για αυτήν τη χρήση είναι το σχετικά χαμηλό κόστος της, η ενδογενής της βιοσυμβατότητα και η ικανότητά της να αλληλοεπιδρά με τις επιφάνειες του υδροξυαπατίτη. Παλαιότερες μελέτες έδωσαν έμφαση στη χρήση των αμινοξέων ως αναστολέων ανάπτυξης της κρυστάλλωσης του υδροξυαπατίτη και όχι στη χρήση τους ως βοηθητικών μορίων για την παραγωγή νανοσωματιδίων με επιθυμητή λειτουργικότητα.

1.1.3. Σύσταση και δομή της οργανικής φάσης

1.1.3.1. Κολλαγόνο

Η οργανική φάση διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στις μηχανικές και βιοχημικές ιδιότητες του οστού. Αυτές οι λειτουργίες οφείλονται σε ένα πλήθος από πρωτεΐνες και κυρίως το κολλαγόνο τύπου I που αποτελεί το κυρίαρχο μέλος της οργανικής φάσης. Το κολλαγόνο αποτελεί την πιο διαδεδομένη πρωτεΐνη στον



Εικόνα 1.4 Χημική δομή του κολλαγόνου τύπου I. (a) δευτερογενής αριστερόστροφη έλικα και τριτογενής δεξιόστροφη τριπλή έλικα (b) πρωτογενής αλληλουχία αμινοξέων [20]

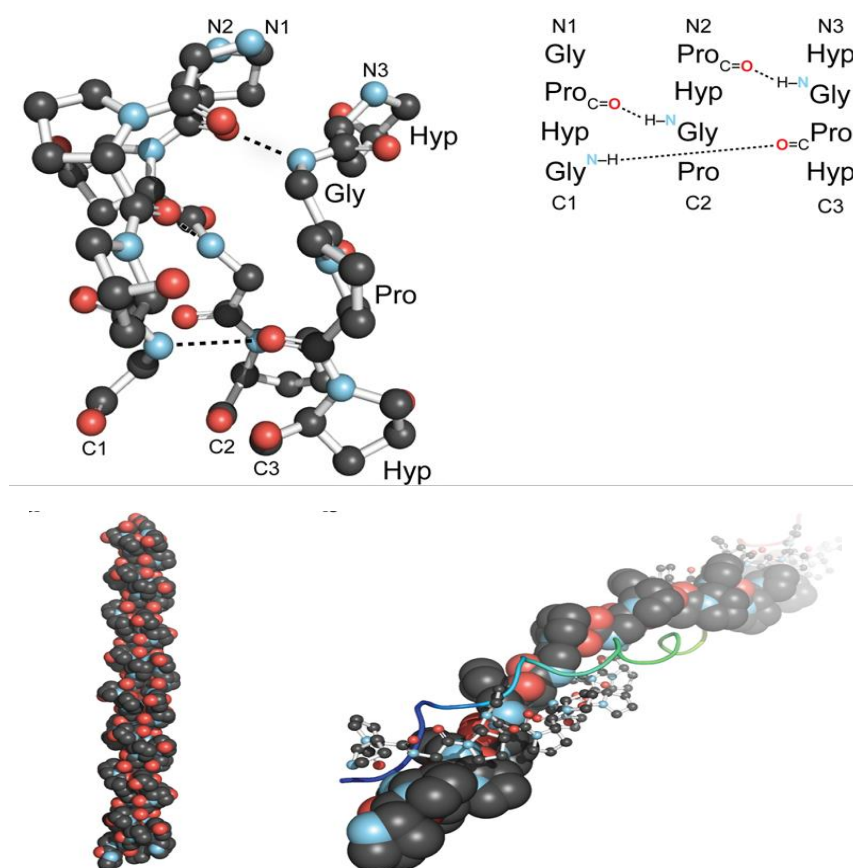
οργανισμό των θηλαστικών μια και συνιστά πάνω από το 50% των πρωτεϊνών του οργανισμού, το μεγαλύτερο μέρος της οποίας απαντάται στον οστίτη ιστό.

Λειτουργικός ρόλος του κολλαγόνου είναι η μηχανική στήριξη, η εξωτερική προστασία, η θερμική μόνωση, η συστολή και η κινητικότητα στους ιστούς του σώματος, όπως το δέρμα, τα αιμοφόρα αγγεία, οι τένοντες, οι χόνδροι και τα οστά.. Έχει όμως δομικό και στηρικτικό ρόλο. Η δομή και οι ιδιότητές τους παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον και, ως εκ τούτου, αξιοποιούνται και στα τεχνητά εμφυτεύματα στην προσπάθεια μίμησης των φυσικών βιολογικών δομών. Ούσα η πιο κοινή πρωτεΐνη στο σώμα, το κολλαγόνο μπορεί να εντοπιστεί στην εξωκυττάρια μήτρα - ένα περίπλοκο δίκτυο μακρομορίων που καθορίζει τις φυσικές ιδιότητες των ιστών του σώματος. Η παραγωγή κολλαγόνου μειώνεται με την ηλικία, μειώνοντας τη δομική ακεραιότητα του δέρματος και οδηγεί σε χαλάρωση αυτού, τον σχηματισμό των γραμμών και των ρυτίδων και την εξασθένηση του χόνδρου στις αρθρώσεις. Όλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά καθιστούν το κολλαγόνο απαραίτητο υλικό για τις εργαστηριακές συνθέσεις της παρούσας εργασίας.

Η σύνθεση του κολλαγόνου πραγματοποιείται στο εσωτερικό των κυττάρων, με τη μορφή πρόδρομης πρωτεΐνης που ονομάζεται προκολλαγόνο. Ακολούθως, το προκολλαγόνο οδηγείται εκτός κυττάρου, υπόκειται σε υδρόλυση όπου μειώνεται το μήκος του με την απομάκρυνση κάποιων αμινοξέων από τα άκρα και έτσι μετατρέπεται στη λειτουργική πρωτεΐνη που ονομάζεται κολλαγόνο [21]. Οι πρωτοπόρες μελέτες για την αποσαφήνιση της δομής του μορίου του κολλαγόνου έλαβαν χώρα στη δεκαετία του 1950. Διαπιστώθηκε λοιπόν ότι πρόκειται για μια πρωτεΐνη σχετικά μεγάλου μεγέθους (300 kDa) με μήκος που φθάνει περίπου τα 300 nm και πλάτος 1,5 nm [22]. Λίγο αργότερα ανακαλύφθηκε ότι το μόριο του κολλαγόνου δεν αποτελείται από μία αλλά από τρεις μακρομοριακές αλυσίδες [23]. Οι δύο από αυτές είναι όμοιες (α_1 (I) chains) ενώ η τρίτη διαφέρει (α_2 (II) chain). Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό τους όμως είναι το γεγονός ότι οι τρεις αλυσίδες σχηματίζουν μια ελικοειδή δεξιόστροφη δομή (εικ. 1.5) [24,25] και ενώνονται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ του αμινοξέως υδροξυπρολίνη και άλλων φορτισμένων καταλοίπων (residues) [26].

Κάθε μία από τις τρεις αλυσίδες του κολλαγόνου συνίσταται από έναν κύριο σκελετό 1014 αμινοξέων ενώ υπάρχουν επίσης πλευρικά τμήματα μικρού μήκους, αποτελούμενα από 20 περίπου αμινοξέα, ευρισκόμενα σε αμινοτελικά και καρβοξυλικά

άκρα τα οποία ονομάζονται τελοπεπίδια. Ένα χαρακτηριστικό της ακολουθίας των αμινοξέων του κύριου σκελετού είναι το γεγονός ότι η γλυκίνη (Gly), η οποία είναι και το συνηθέστερο αμινοξύ του κολλαγόνου, επαναλαμβάνεται μετά από κάθε τρία αμινοξέα. Η σειρά διαδοχής είναι Gly-X-Y, όπου X και Y είναι άλλα αμινοξέα. Στα 1014 επομένως αμινοξέα του κύριου σκελετού, το συγκεκριμένο μοτίβο διαδοχής επαναλαμβάνεται 338 φορές [27]. Συνήθως, στη θέση του X βρίσκεται η προλίνη (Pro)



Εικόνα 1.5 Δομή τριπλής έλικας του κολλαγόνου.

και του Y η υδροξυπρολίνη (Hyp), τα οποία είναι μετά τη γλυκίνη τα μεγαλύτερα σε αφθονία αμινοξέα. Υπάρχουν ακόμα 20 διαφορετικές τριάδες, όπου στις θέσεις X και Y δεν είναι Pro και Hyp, οι οποίες εμφανίζονται με συχνότητα 1% και άλλες 70 τριάδες που δεν εμφανίζονται παραπάνω από 1-3 φορές [28].

Μία ακόμα σημαντική παράμετρος της δομής του κολλαγόνου είναι η συμμετοχή μορίων νερού στις μακρομοριακές αλυσίδες του [29,30]. Η τριπλή έλικα του κολλαγόνου διαθέτει ισχυρά συνδεδεμένα μόρια νερού και τα πειραματικά δεδομένα καταδεικνύουν ότι δεν πρόκειται απλά για μεμονωμένα μόρια αλλά για ένα ολόκληρο δίκτυο [31,32]. Τα μόρια του νερού έχει αποδειχθεί ότι ενώνονται τόσο μεταξύ τους

όσο και με συγκεκριμένα άτομα από τη δομή της τριπλής έλικας [33]. Πιο συγκεκριμένα, το νερό ενώνεται με το κολλαγόνο σε δύο επίπεδα: με τις υδροφιλικές ομάδες του μορίου του κολλαγόνου (γλυκίνη, υδροξυλυσίνη, καρβοξύλια) αλλά και μέσω δεσμών υδρογόνου μεταξύ νερού και του υδροξυλίου της υδροξυπρολίνης [34,35]. Επίσης, νερό βρίσκεται και ανάμεσα στα άλλα συστατικά της οργανικής φάσης, όπως στο μυελό των οστών και ανάμεσα στους πόρους των ασβεστοποιημένων ινών κολλαγόνου. Αυτά τα μόρια νερού φαίνεται να είναι υπεύθυνα για την ιξωδοελαστική συμπεριφορά του οστού μιας και το ξηρό οστό έχει φανεί ότι χάνει αυτή τη συμπεριφορά. Γενικότερα, είναι γνωστό ότι ένας παράγοντας σταθεροποίησης της δομής των πρωτεϊνών είναι η συμμετοχή του καρβονυλίου και της αμινομάδας στη δημιουργία δεσμών του τύπου $\text{NH}\cdots\text{C}=\text{O}$ [36]. Στην περίπτωση όμως του κολλαγόνου παρατηρείται σημαντική έλλειψη αυτών των δεσμών, οι οποίοι είναι αρκετά λιγότεροι από όσους θα αναμένονταν. Από την άλλη, σε κάθε τριπλέτα αμινοξέων του μοτίβου Gly-X-Y η αμινομάδα της γλυκίνης σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το καρβονύλιο του αμινοξέος στη θέση X της γειτονικής αλυσίδας. Από αυτό το γεγονός προκύπτει ότι τα καρβονύλια της γλυκίνης και του αμινοξέος στη θέση Y μένουν χωρίς διαθέσιμη αμινομάδα ώστε να σχηματίσουν με τη σειρά τους δεσμούς υδρογόνου. Επιπλέον, επειδή το υδροξύλιο της υδροξυπρολίνης βρίσκεται σε απομακρυσμένη θέση σε σχέση με τον κύριο σκελετό της τριπλής έλικας, δεν έχει την κατάλληλη απόσταση ώστε να σχηματίσει αυτό δεσμούς υδρογόνου με τα διαθέσιμα καρβονύλια. Τις λύσεις σε αυτές τις φαινομενικές ασυμβατότητες δίνει η ύπαρξη των μορίων του νερού. Το νερό λοιπόν, καλύπτει όλες τις διαθέσιμες θέσεις για τη δημιουργία δεσμών υδρογόνου και έτσι σταθεροποιεί την τριπλή έλικα [37,38].

Σημαντικό ρόλο σ' αυτή τη δομή διαδραματίζει η υδροξυπρολίνη. Όπως αναφέρθηκε, το υδροξύλιό της μπορεί να συμμετάσχει στη δημιουργία δεσμών υδρογόνου με τα καρβονύλια των άλλων αμινοξέων. Ουσιαστικά δηλαδή, η υδροξυπρολίνη λειτουργεί ως δότης θέσεων για την πραγματοποίηση δεσμών υδρογόνου. Αυτό το χαρακτηριστικό του συγκεκριμένου αμινοξέος το ανάγει σε σημαντικό παράγοντα της σταθερότητας της ελικοειδής δομής του κολλαγόνου.

1.1.3.2. Μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες

Εκτός από το κολλαγόνο στην οργανική φάση του οστού συμμετέχουν 200 ή και περισσότερες μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες, οι οποίες όμως συνιστούν ένα πολύ μικρό

μέρος της [39,40]. Ένα από τα πιο σημαντικά μέλη αυτής της κατηγορίας είναι η οστεοκαλσίνη, οποία αποτελεί περίπου το 10-20% της κ.β. αναλογίας των μη κολλαγονούχων πρωτεϊνών. Πρόκειται για μια μικρού μεγέθους πρωτεΐνη (5,8 kDa) το κύριο χαρακτηριστικό της οποίας αποτελεί το γεγονός ότι τρία κατάλοιπα γλουταμινικού οξέος καρβοξυλιώνονται, ως αποτέλεσμα μιας διαδικασίας μετάφρασης εξαρτώμενη από τη βιταμίνη K. Η συγκεκριμένη καρβοξυλίωση προσδίδει στην οστεοκαλσίνη την ικανότητα πρόσδεσης σ' αυτή ασβεστίου, ανάγοντάς την έτσι σε ένα σημαντικό παράγοντα της ασβεστοποίησης του κολλαγόνου. Πιστεύεται ότι λειτουργεί ως αναστολέας του σχηματισμού νέου οστού ενώ έχει βρεθεί ότι επηρεάζει διάφορα ποιοτικά χαρακτηριστικά του βιοαπατίτη όπως είναι το μέγεθος των κρυσταλλιτών του και η ποσότητα των ανθρακικών ιόντων του [41].

Εκτός από την οστεοκαλσίνη υπάρχουν και άλλες πρωτεΐνες οι οποίες θεωρείται ότι σχετίζονται με τη σύνθεση και τις λειτουργίες της ανόργανης φάσης όπως είναι η κρυστάλλωση και η κρυσταλλική ανάπτυξη. Επίσης, σημαντικός αριθμός πρωτεϊνών του οστού όπως είναι οι οστεοποντίνη, οστική σιαλοπρωτεΐνη, οστική όξινη γλυκοπρωτεΐνη, θρομβοσποντίνη και φμπρονεκτίνη, περιέχουν σε σημαντικό βαθμό την ακολουθία αμινοξέων αργινίνη-γλυκίνη-ασπαρτικό οξύ η οποία είναι χαρακτηριστική μιας οικογένειας πρωτεϊνών που δεσμεύονται στην κυτταρική μεμβράνη, των ιντεγκρινών. Οι ιντεγκρίνες έχουν την ικανότητα να ανοίγουν την κυτταρική μεμβράνη και να συνδέουν το εξωκυττάριο περιβάλλον με τον κυτταροσκελετό. Στην περίπτωση οστικών κυττάρων δηλαδή των οστεοβλαστών και των οστεοκλαστών, ανοίγουν την κυτταρική τους μεμβράνη και προκαλούν την έκφραση του φαινότυπού τους [42] οδηγώντας με αυτό τον τρόπο στη σύνθεση και καταστροφή του οστού, όπως θα εξηγηθεί στη συνέχεια.

Επιπλέον, στο οστό υπάρχουν σε πολύ μικρά ποσοστά και άλλες πρωτεΐνες και οργανικές ενώσεις όπως είναι η οστεοπρωτογενίνη (OPG), η ινερφερόνη-γ, οι ιντερλευκίνες, οι μορφογενετικές πρωτεΐνες του οστού (BMP), οι κυτταροκίνες και οι αυξητικοί παράγοντες TGF και IGF. Οι παραπάνω ουσίες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση διαφόρων λειτουργιών του οστέινου σκελετού όπως η διαίρεση, η αύξηση και η λειτουργικότητα των κυττάρων ενώ οι αυξητικοί παράγοντες συντελούν στις διαδικασίες σχηματισμού και ανάπτυξης του οστού [43]. Τέλος, στον οστέينو ιστό

βρίσκεται και ένα μικρό ποσοστό λιπιδίων τα οποία πιστεύεται ότι παίζουν κάποιο ρόλο στην κρυστάλλωση του βιοαπατίτη [44].

1.1.4. Κύτταρα

Εκτός από τα βασικά δομικά συστατικά του (βιοαπατίτης-κολλαγόνο) στο οστό υπάρχει και ένας σημαντικός αριθμός κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά είναι κυρίως τριών ειδών, οι οστεοβλάστες, οι οστεοκλάστες και τα οστεοκύτταρα και η κύρια λειτουργία τους είναι η ρύθμιση του μεταβολισμού του οστού. Αυτοί οι τρεις τύποι κυττάρων προέρχονται από δυο διαφορετικές σειρές βλαστικών κυττάρων, τα μεσοδερμικά και τα αιμοποιητικά, υπογραμμίζοντας τη μοναδικότητα της διαδικασίας της ομοίωστας του οστού και της στενής σχέσης που το συνδέει με το ανοσοποιητικό σύστημα.

Οι οστεοβλάστες, που είναι κύτταρα μεγέθους 20-30 μm , είναι υπεύθυνοι για τον σχηματισμό των οστών ενώ οι οστεοκλάστες για την καταστροφή τους. Αυτή είναι μια διαδικασία μοναδική για τον οργανισμό καθώς ο οστίτης είναι ο μόνος ιστός ο οποίος οικοδομείται και αποικοδομείται συνεχώς κατά τη διάρκεια της ζωής του. Το συγκεκριμένο φαινόμενο ονομάζεται οστική ανακατασκευή (*bone remodeling*). Η οστική ανακατασκευή είναι ένα περιοδικό φαινόμενο το οποίο χαρακτηρίζεται από μια περίοδο 3-6 μηνών και βασίζεται στη συνδυασμένη λειτουργία οστεοβλαστών και οστεοκλαστών. Κατά τη συγκεκριμένη διαδικασία, οι οστεοκλάστες, που είναι μεγάλου μεγέθους (διαμέτρου 150-200 μm) συγκεντρώνονται στην υπό αποικοδόμηση περιοχή και εκκρίνουν H^+ , πιθανότατα υπό τη μορφή γαλακτικού οξέος, έτσι ώστε να δημιουργήσουν όξινο περιβάλλον και πρωτεάσες όπως είναι η πρωτεογλυκανάση και η κολλαγενάση [45]. Αυτό το όξινο περιβάλλον μαζί με την παρουσία των συγκεκριμένων ενζύμων προκαλούν τόσο τη διάλυση του βιοαπατίτη όσο και την αποσύνθεση των πρωτεϊνών του οστού. Μετά την αποικοδόμηση της συγκεκριμένης περιοχής οι οστεοκλάστες εξαφανίζονται και σ' αυτή την περιοχή εμφανίζονται οι οστεοβλάστες ώστε να ξεκινήσουν τη διαδικασία σύνθεσης του νέου οστού. Αρχικά, αποθέτουν την εξωκυττάρια μήτρα (κολλαγόνο I) και στη συνέχεια ελέγχουν την ασβεστοποίησή της εκκρίνοντας αυξητικούς παράγοντες [46].

Η όλη διαδικασία της οστικής ανακατασκευής μπορεί να χωριστεί σε 5 φάσεις. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την ενεργοποίηση (activation) της διαδικασίας. Στο στάδιο αυτό δίνεται σήμα στους οστεοκλάστες να μεταβούν στο σημείο το οποίο πρόκειται να

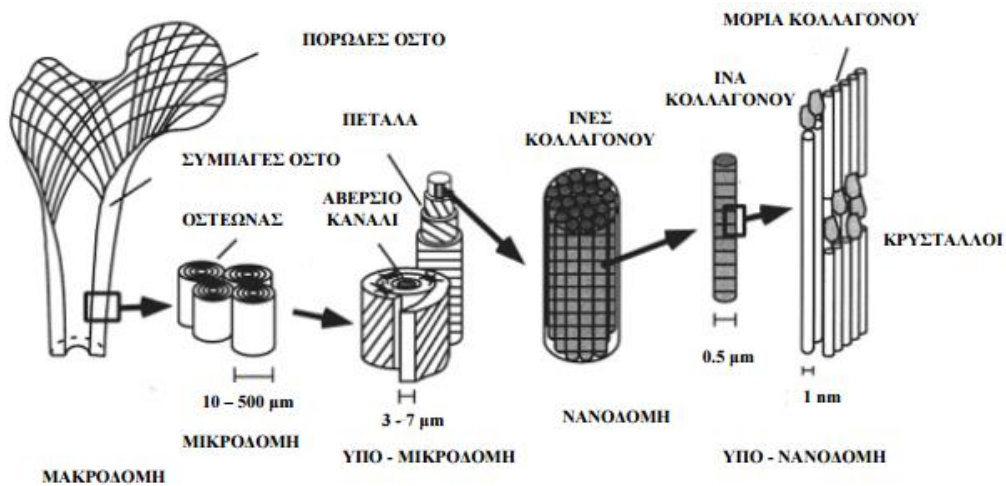
υποστεί ανακατασκευή. Στη συνέχεια ακολουθεί το στάδιο της απορρόφησης όπου αρχίζει η αποικοδόμηση της οργανικής και της ανόργανης φάσης από τους οστεοκλάστες. Μετά την ολοκλήρωση της αποικοδόμησης η διαδικασία αντιστρέφεται, συνιστώντας το στάδιο της αντιστροφής (reversal) κατά το οποίο κολλαγόνο εναποτίθεται στην αποικοδομημένη περιοχή από τους οστεοβλάστες. Στο στάδιο του σχηματισμού (formation) που ακολουθεί, πραγματοποιείται η ασβεστοποίηση του κολλαγόνου και η ολοκλήρωση της διαδικασίας σχηματισμού νέου οστού. Ακολουθεί τέλος, το στάδιο της ηρεμίας (quiescence) όπου το οστό παραμένει σε ανενεργή φάση [47].

1.2. Σύσταση και ιεραρχική δομή του οστού

Για την σχεδίαση ενός οστικού εμφυτεύματος είναι απαραίτητη η κατανόηση της σύνθεσης του οστού, της μικροαρχιτεκτονικής του και του τρόπου οργάνωσής του. Ο ανθρώπινος σκελετός αποτελείται από οστά και υποστηρίζεται και συμπληρώνεται από μια δομή ιστών, συνδέσμων, τενόντων, μυών, και χόνδρων. Σκοπός του σκελετού είναι να προσφέρει μηχανική στήριξη του σώματος και κινητικότητα, να αποθηκεύει ασβέστιο και φωσφορικό άλας, να αναπτύσσει κύτταρα αίματος για τις ανάγκες του οργανισμού και τέλος να προστατεύει τα ζωτικά όργανα, όπως είναι ο εγκέφαλος, τα σπλάχνα του θώρακα και της πύελου.

Ο υδροξυαπατίτης και το κολλαγόνο δεν ενώνονται απλά για να συνθέσουν το οστό, αλλά σχηματίζουν ιεραρχικές δομές που ξεκινούν από τα συγκεκριμένα μόρια και δημιουργούν ένα σύνθετο όργανο. Η δομή του οστού μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε έναν αριθμό επιπέδων (εικ. 1.6). Αυτή η δομική ιεράρχηση έχει μια ακανόνιστη διάταξη και προσανατολισμό σε επίπεδο μικροκλίμακας, καθώς και μεταβαλλόμενη σύσταση, καθιστώντας το υλικό του οστού ιδιαίτερα ετερογενές και ανισότροπο. Αυτά τα επίπεδα είναι:

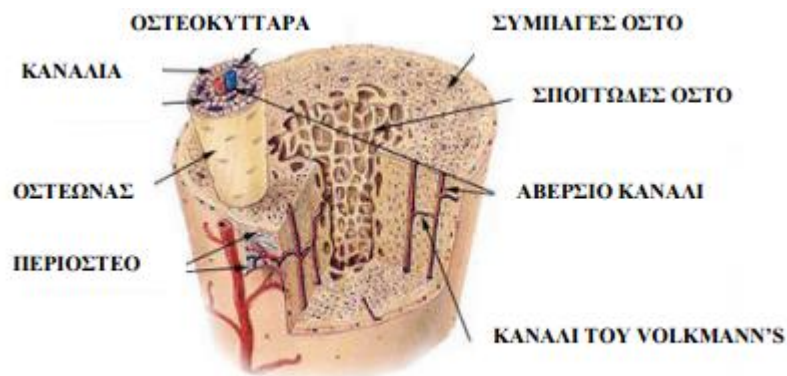
1. Μακροδομή: πορώδες και συμπαγές οστό
2. Μικροδομή: αβέρσια συστήματα
3. Υπο-μικροδομή: πέταλα
4. Νανοδομή: ίνες κολλαγόνου
5. Υπο-νανοδομή: ανόργανη ύλη, κολλαγόνο και μη κολλαγονούχες οργανικές πρωτεΐνες.



Εικόνα 1.6 Ιεραρχική δομή οστού.

Η εσωτερική δομή του οστού μοιάζει με πλέγμα, η πυκνότητα του οποίου μπορεί να ποικίλει σε διάφορα σημεία. Μακροσκοπικά, διακρίνονται δύο τύποι οστών (εικ. 1.7). Ο πρώτος τύπος είναι το συμπαγές οστό, ή αλλιώς φλοιώδες οστό, που είναι ένας αρκετά πυκνός ιστός, αν και διαπερνάται από αγγεία αίματος μέσα από ένα δίκτυο καναλιών. Βρίσκεται κυρίως στους άξονες των μακρών οστών. Ο δεύτερος τύπος είναι το πορώδες οστό, ή αλλιώς σπογγώδες οστό. Έχει μικρότερη πυκνότητα από το συμπαγές οστό, και βρίσκεται κυρίως κοντά στις επιφάνειες των αρθρώσεων, στα άκρα των μακρών οστών και μέσα στους σπονδύλους.

Ένα οστό μπορεί να έχει περιοχές τόσο με σπογγώδες όσο και με συμπαγές οστό. Παίρνοντας ως παράδειγμα τα επιμήκη οστά, όπως το μηριαίο, στην διάφυση υπάρχει συμπαγές οστό, ενώ στις μεταφύσεις σπογγώδες (πορώδες) οστό. Το σπογγώδες οστό βοηθά στην ευκαμψία και την απορρόφηση των κραδασμών, ενώ το συμπαγές αντέχει στις μεγάλες δυνάμεις συμπίεσης και κάμψης [48].

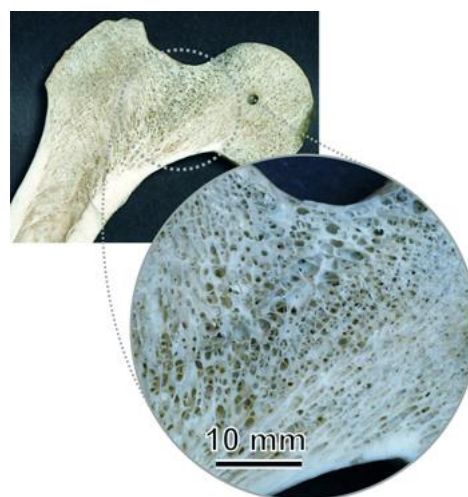


Εικόνα 1.7 Συμπαγές και πορώδες οστό.

Το οστό αποτελείται από κύτταρα και μεσοκυττάρια ουσία. Χαρακτηριστικό του είναι ότι η μεσοκυττάρια ουσία παρουσιάζει μεγάλο βαθμό σκληρότητας και αντοχής, λόγω των ανόργανων αλάτων που περιέχει. Είναι μια σπάνια σχεδιασμένη σύνθεση από πολύπλοκη ανόργανη και οργανική ύλη. Σε επίπεδο μικροκλίμακας, παρατηρούνται πυκνές ομόκεντρες πεταλώδεις δομές από κολλαγόνο και άλατα του φωσφορικού ασβεστίου, που αποτελούν τα αβέρσια συστήματα ή οστεώνες. Είναι μια κυλινδρική δομή της οποίας ο άξονας διασχίζει σχετικά ακανόνιστα κατά μήκος τον κεντρικό άξονα του οστού. Ο οστεώνας μοιάζει με κύλινδρο περίπου 200-250 μm στην διάμετρο, περιέχει πυκνά τοιχώματα και έναν στενό σωλήνα (αβέρσιο κανάλι), που περιβάλλεται από 4-20 ομόκεντρα πέταλα. Κάθε πέταλο είναι περίπου 3-7 μm σε πάχος και έχει ίνες κολλαγόνου προσανατολισμένες παράλληλα. Γύρω από το εξώτατο πέταλο του αβέρσιου συστήματος υπάρχει μια στενή ζώνη, η οποία είναι 1-2 μm σε πάχος και αποτελεί το πιο λεπτό συστατικό του οστού. Η διάταξη και η δομή των οστεώνων επιτρέπουν να κατανοήσουμε την μικροδομή του οστού. Η αρχική μονάδα αυτής της δομής είναι η ίνα κολλαγόνου και γύρω από τις ίνες κολλαγόνου υπάρχει μια υψηλά οργανωμένη γεωμετρική διάταξη κρυστάλλων άλατος φωσφορικού ασβεστίου, οι οποίοι έχουν ένα μέσο μήκος 50 nm, πλάτος 25 nm και πάχος 2-5 nm.

Σύνθεση συμπαγούς και πορώδους οστού

Περίπου 20-30% (του βάρους) του συμπαγούς οστού είναι οργανικό, 10% είναι νερό και το υπόλοιπο είναι ανόργανη ύλη. Το κύριο συστατικό που καταλαμβάνει το 90-95% της οργανικής ύλης είναι το κολλαγόνο, ενώ το υπόλοιπο ποσοστό αποτελείται από διάφορες μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες. Τα κύρια συστατικά του ανόργανου τμήματος του οστού είναι 80% ασβέστιο και φωσφορικό άλας και το υπόλοιπο αποτελείται από μικρές ποσότητες άνθρακα, κιτρικού άλατος, νατρίου, μαγνησίου, φθορίου, υδροξυλίου και άλλων ιόντων. Το ανόργανο τμήμα του οστού, που καταλαμβάνει και το μεγαλύτερο μέρος, είναι μικροκρυσταλλικό, δομικά ανάλογο του φωσφορικού ασβεστίου (υδροξυαπατίτης (HAP) -



Εικόνα 1.8 Δομή σπογγώδους ανθρώπινου οστού.

$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Αυτό το κάνει ένα αντιδρών υλικό, το οποίο μπορεί να ικανοποιήσει την ανάγκη για φυσιολογική απορρόφηση και επαναδιάταξη του οστού. Το πορώδες οστό έχει σχετικά παρόμοια σύνθεση με το συμπαγές οστό, αλλά έχει λιγότερη ανόργανη ύλη και είναι περισσότερο ένυδρο. Το ποσοστό του νερού, των ανόργανων και οργανικών συστατικών είναι 27%, 38% και 35% αντίστοιχα [48]. Η κύρια αιτία διαφοροποίησης των δύο τμημάτων έγκειται στο διαφορετικό πορώδες τους. Στην περίπτωση του συμπαγούς, το πορώδες κυμαίνεται μεταξύ 5-20% του όγκου του και οφείλεται κατά κύριο λόγο στα αβέρσια κανάλια και στα κανάλια Volkman διαμέτρου 50 μm [49]. Στο σπογγώδες, το πορώδες είναι αρκετά μεγαλύτερο και ξεπερνά το 40%, ενώ οι οπές στην επιφάνειά του κυμαίνονται από 100 έως 500 μm . Σημαντικό μέρος του μυελού των οστών φιλοξενείται στον όγκο του σπογγώδους οστού [50].

1.2.1. Μηχανικές ιδιότητες του οστού

Πέραν από την κατανόηση της δομής των οστών, ο υπολογισμός των διαφόρων παραμέτρων που τα επηρεάζουν βοηθάει στην εξήγηση μιας πιθανής βλάβης και στην διόρθωσή της. Οι πιο σημαντικές ιδιότητες του οστού είναι η αντοχή και η ακαμψία του, οι οποίες ποικίλουν συναρτήσει [51]:

- της ηλικίας,
- της θέσης,
- του ανόργανου περιεχομένου,
- του βαθμού της ενυδάτωσης,
- της θερμοκρασίας,
- του φύλου του ανθρώπου.

Ως δυσθραυστότητα ενός υλικού ορίζεται το ποσό της ενέργειας που το υλικό μπορεί να απορροφήσει πριν σπάσει και μπορεί να υπολογιστεί από το εμβαδόν της περιοχής κάτω από την καμπύλη στο διάγραμμα τάσης-παραμόρφωσης. Ένα υλικό θεωρείται δύσθραυστο όταν επιδεικνύει ταυτόχρονα αντοχή και ολκιμότητα. Παλαιότερες μελέτες [51] έχουν επικεντρωθεί στην επεξήγηση της ανθεκτικότητας των οστών υποστηρίζοντας ότι το κολλαγόνο (το κύριο οργανικό συστατικό του οστού) δημιουργεί δεσμούς μεταξύ των ινών. Αυτοί οι δεσμοί σπάνε πάνω σε κάποια φόρτιση, χωρίς να δημιουργούν κάποια σοβαρή καταστροφή στο οστό, και κάποιοι από αυτούς ανασχηματίζονται όταν η φόρτιση απομακρυνθεί, επιτρέποντας στο οστό να

αναδιαμορφωθεί σε κάποιο βαθμό. Η ανθεκτικότητα του οστού αποδίδεται στις μηχανικές ιδιότητες αυτών των δεσμών.

Το οστό είναι ανομοιογενές και ανισότροπο, καθώς δεν παρουσιάζει ίδιες ιδιότητες κατά μήκος και ακτινικά, και η αντοχή του εξαρτάται από τον τύπο φόρτισης, τον ρυθμό και την διεύθυνσή της. Τα οστά γενικώς έχουν μεγαλύτερη αντοχή σε θλίψη απ' ό,τι σε εφελκυσμό λόγω της λειτουργίας που επιτελούν για την υποστήριξη του σκελετού. Το συμπαγές οστό έχει μεγαλύτερη αντοχή από το σπογγώδες. Το μέτρο ελαστικότητας ή μέτρο του Young είναι η κλίση της καμπύλης τάσης-παραμόρφωσης στην ελαστική περιοχή ($E=\sigma/\epsilon$). Όσο μεγαλύτερο είναι το μέτρο ελαστικότητας τόσο πιο δύσκαμπτο είναι το υλικό, αλλιώς τόσο μικρότερη είναι η ελαστική παραμόρφωση που προκύπτει από την εφαρμογή μιας δεδομένης τάσης. Το οργανικό μέρος, κολλαγόνο, συμπεριφέρεται ως ένα υλικό με υψηλή ανθεκτικότητα. Οι ιδιότητες του οστού προκύπτουν από τον συνδυασμό της υψηλής σκληρότητας (του HAP) και της υψηλής ανθεκτικότητας στην θραύση (του κολλαγόνου) [51].

2. Οστικά υποκατάστατα – ικριώματα (scaffolds)

2.1. Ιστική Μηχανική και Αναγεννητική Ιατρική

Η ιστική μηχανική και η αναγεννητική ιατρική έχουν επικρατήσει στην αντικατάσταση οργάνων και ιστών που έχουν υποστεί βλάβη από κάποιον τραυματισμό ή από άλλου είδους ζημιάς, εξαιτίας κάποιου σοβαρού προβλήματος υγείας. Η χρήση της μεταμόσχευσης ιστών ή οργάνων ήταν υψίστης σημασίας, όμως, περιορίστηκε σημαντικά από την έλλειψη δωρητών. Η τρέχουσα χρήση φαρμακευτικής αγωγής, χειρουργικής αποκατάστασης και ιατρικών συσκευών είναι πάντα διαθέσιμες, αλλά τείνουν να εμφανίζουν προβλήματα, όπως ανικανότητα αποκατάστασης όλων των λειτουργιών του κατεστραμμένου ιστού ή του εκλειπόντος οργάνου [52].

Η επιτακτική ανάγκη να αντιμετωπιστούν τα παραπάνω προβλήματα έχουν οδηγήσει σε νέα βιοϋλικά και σε νέες θεραπείες αποκατάστασης. Η ιστική μηχανική αποτελείται από ένα σύνολο εργαλείων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να επιτευχθεί η αναγέννηση φθαρμένων ή κατεστραμμένων ιστών [53]. Είναι γεγονός πως πολυάριθμα ικριώματα έχουν αναπτυχθεί για διάφορες εφαρμογές στην ιστική μηχανική. Τα βιοϋλικά κάποιες φορές δρουν σαν ικριώματα για την αντικατάσταση,

επιδιόρθωση και συντήρηση της δομής των οργάνων. Τα ήδη υπάρχοντα ικριώματα, ωστόσο, τείνουν να εμφανίζουν ορισμένους περιορισμούς, όπως μόλυνση του υλικού, μηχανική αστοχία των υλικών και ανοσοποιητικές αντιδράσεις στα εμφυτευμένα υλικά [54].

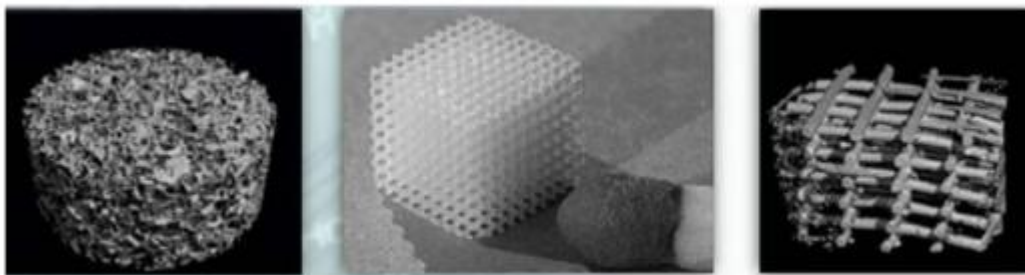
2.2. Ικριώματα – Ορισμός και απαιτούμενα χαρακτηριστικά

Τα ικριώματα είναι υλικά τα οποία έχουν κατασκευαστεί για να προκαλέσουν συγκεκριμένες κυτταρικές αλληλεπιδράσεις και να συμβάλλουν στον σχηματισμό νέων λειτουργικών ιστών για ιατρικούς σκοπούς, καθώς μιμούνται την εξωκυττάρια μήτρα του φυσικού ιστού. Ο κύριος στόχος των ικριωμάτων περιλαμβάνει τη συγκράτηση και υποστήριξη των κυττάρων καθώς και την παροχή κατάλληλων βιοχημικών μηχανισμών που προάγουν την κυτταρική προσκόλληση, διαφοροποίηση και πολλαπλασιασμό. Τα ικριώματα οφείλουν επίσης να διευκολύνουν τη διάχυση θρεπτικών ουσιών, που είναι ζωτικής σημασίας για τα κύτταρα, και να συντελούν στην τροποποίηση της συμπεριφοράς της κυτταρικής φάσης. Στην πραγματικότητα, τα ικριώματα λειτουργούν ως επαγωγείς (templates) της ανάπτυξης νέων ιστών. Ως εκ τούτου, τα ικριώματα χρησιμοποιούνται κυρίως στην αναγέννηση οστού και χόνδρου. Έχουν επίσης εφαρμοστεί με επιτυχία σε περιοχές ανάπλασης δέρματος και μυών.

Τα κύτταρα συχνά διασπείρονται σε αυτές τις δομές που είναι ικανές να υποστηρίξουν το σχηματισμό τριδιάστατου ιστού. Η επιτυχία και η λειτουργικότητα του ικριώματος, εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Οι παράγοντες αυτοί καθορίζουν το βαθμό μίμησης του ικριώματος όσον αφορά τα βιοχημικά, μηχανικά ή λειτουργικά χαρακτηριστικά της εξωκυττάριας μήτρας. Τα ικριώματα με βάση τη σύνθεσή τους διακρίνονται σε συνθετικά ή φυσικά πολυμερικά υλικά και σε φυσικούς ιστούς ανθρώπινης, χοίρειας ή βόειας προέλευσης από τους οποίους έχουν απομακρυνθεί τα κύτταρα.

Τα ικριώματα, που χρησιμοποιούνται για την κατευθυνόμενη δημιουργία ιστού στον οργανισμό του ανθρώπου θα πρέπει 1) να προσομοιάζουν τις μηχανικές ιδιότητες των φυσιολογικών ιστών και 2) να είναι ανοσολογικά ουδέτερα, ώστε να μην προκαλούν ανοσολογική αντίδραση στον λήπτη. Επίσης, το ικρίωμα θα πρέπει να επιτρέπει την

ανάπτυξη αγγείων τα οποία εξασφαλίζουν τόσο την τροφοδοσία του ιστού που αναπτύσσεται με αίμα όσο και τη λειτουργικότητά του.



Εικόνα 2.1 Ικρίωματα από φυσικής προέλευσης ή συνθετικά πολυμερή, που μορφοποιούνται κατάλληλα σχηματίζοντας πλεγματική ή και σπογγώδη μορφή, ώστε να μιμηθούν τον εγγενή ιστό.

Τα υλικά που προορίζονται για ικρίωματα στον χώρο της βιοϊατρικής πρέπει να εμφανίζουν συγκεκριμένες ιδιότητες. Πιο συγκεκριμένα, ένα βιοϋλικό οστικής αποκατάστασης πρέπει να χαρακτηρίζεται από:

- Μηχανικές ιδιότητες, ανάλογα με την ιατρική τους εφαρμογή (αυξημένη αντοχή, ακαμψία, αντοχή στην κόπωση) [55]
- Αντοχή στη διάβρωση
- Βιοσυμβατότητα
- Οστεοεπαγωγικότητα (osteoinductivity)
- Οστεοαγωγικότητα (osteoconductivity)

Βιοσυμβατότητα

Ένα υλικό θεωρείται βιοσυμβατό όταν:

- Δεν εμφανίζει συστηματική, τοπική τοξική δράση στους παρακείμενους ιστούς.
- Δεν προκαλεί αντιδράσεις υπερευαισθησίας, δηλαδή, δεν έχει αλλεργιογόνο δράση.
- Δεν έχει καρκινογόνο και μεταλλαξιογόνο δράση.
- Δεν αποβάλλεται από τον οργανισμό και προσπαθεί να μιμηθεί τη βιοχημεία του περιβάλλοντος όπου τοποθετείται.

Οστεοεπαγωγικότητα και οστεοαγωγικότητα

Η οστεοεπαγωγικότητα (osteoinductivity) αναφέρεται στη διαδικασία ανάπτυξης νέου οστού ή στην ανακατασκευή κατεστραμμένου τμήματός του. Περιλαμβάνει την

ενεργοποίηση οστεοπρογενετικών κυττάρων του οστίτη ιστού προς τη διαφοροποίηση τους σε οστεοβλάστες, οι οποίοι στη συνέχεια θα συνθέσουν το καινούριο οστό [56, 57]. Την ενεργοποίηση προκαλούν κυρίως παράγοντες του εμφυτεύματος, οι οποίοι ονομάζονται μορφογενετικές πρωτεΐνες. Η οστεοαγωγιμότητα (osteoconductivity) αφορά στη λειτουργία του εμφυτεύματος ως αδρανές ικρίωμα, το οποίο ενισχύει την προσκόλληση των οστεοβλαστών και των οστεοπρογενετικών κυττάρων στο εσωτερικό του. Το ικρίωμα αυτό παρέχει τη διασυνδεδεμένη δομή, μέσα στην οποία τα κύτταρα που πολλαπλασιάζονται μπορούν να διασπαρθούν και να δημιουργήσουν αιμοφόρα αγγεία και κατ' επέκταση να προάγουν την ανάπτυξη του νέου ιστού [57, 58].

Η κατασκευή ενός ικριώματος μπορεί να βασιστεί σε υλικά τα οποία εμφανίζουν οστεοαγωγιμότητα και οστεοεπαγωγικότητα, χωρίς ωστόσο να θεωρείται δεδομένο ότι το τελικό προϊόν θα εμφανίζει τις ίδιες ιδιότητες. Για τον λόγο αυτό θα πρέπει να ενσωματωθούν στη δομή του ικριώματος, μόρια που προάγουν την οστεοαγωγή και την οστεοεπαγωγή. Το ιδανικό εμφύτευμα, το οποίο θα είναι ταυτόχρονα οστεοαγώγιμο και οστεοεπαγωγικό, δεν θα αποτελέσει μόνο ικρίωμα για την προσκόλληση των οστεοβλαστών που υπάρχουν ήδη στο λήπτη, αλλά θα προωθήσει και τη διαφοροποίηση άλλων κυττάρων προς νέους οστεοβλάστες, επιταχύνοντας έτσι την ενσωμάτωση του εμφυτεύματος στον οργανισμό [59].

Επίσης, απαραίτητη προϋπόθεση για τη δημιουργία τριδιάστατων ικριωμάτων υδροξυαπατίτη-βιομορίων είναι η εσωτερική πορώδης δομής με υψηλό ποσοστό διασυνδεσιμότητας των πόρων, ώστε να επιτυγχάνεται η διέλευση κυττάρων και θρεπτικών υλικών από το εσωτερικό τους. Το πορώδες αυτό δίκτυο, για να θεωρηθεί ιδανικό για την ανάπτυξη κυτταρικών καλλιέργειών και τον επακόλουθο σχηματισμό νέου ιστού, θα πρέπει να εμφανίζει διπλή κατανομή μεγέθους των πόρων. Η διπλή αυτή κατανομή περιλαμβάνει μεγαλύτερους πόρους, που κυμαίνονται από 50 έως 200 μm , καθώς και μικρότερους με εύρος μεγέθους 5-20 μm , πόροι που όπως αναφέρθηκε παραπάνω θα είναι ικανοί να διαπεραστούν από διαφόρων ειδών κύτταρα και θρεπτικά συστατικά. Εκτός από τις ιδιότητες αυτές, τα τριδιάστατα ικρίωματα που αναπτύσσονται θα πρέπει να διαθέτουν και ικανοποιητικές μηχανικές αντοχές, ώστε να μπορούν να αντέξουν τις μηχανικές καταπονήσεις που θα δεχθούν στην περιοχή που θα εμφυτευθούν.

2.3. Είδη βιοϋλικών

Σύμφωνα με την Ελληνική Εταιρία Βιοϋλικών, ως βιοϋλικό ορίζεται το υλικό που προορίζεται για τη διασύνδεση με βιολογικά συστήματα με στόχο την αξιολόγηση, θεραπεία, αύξηση ή αντικατάσταση οποιουδήποτε ιστού, οργάνου ή λειτουργίας του σώματος. Επί του παρόντος, τα βιομιμητικά φυσικά πολυμερή έχουν κερδίσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας ως ιστικά ικριώματα για την ιστική αναγέννηση λόγω της ανώτερης βιολογικής απόκρισης τους σε σύγκριση με τα συνθετικά ικριώματα. Αυτά τα φυσικά βιοϋλικά μπορούν να ληφθούν από φυσικές πηγές και να υποβληθούν σε επεξεργασία ώστε να σχηματίσουν πορώδη ικριώματα.

Τα φυσικά βιοϋλικά έχουν αρκετά πλεονεκτήματα που κυμαίνονται από την πηγή προέλευσης και διαθεσιμότητά τους, έως τη βιοαποικοδομησιμότητα και τη βιοσυμβατότητά τους. Είναι, επίσης, γνωστά για τη δυνατότητα παραγωγής πολυάριθμων ενζυματικά τροποποιημένων παραγώγων για διάφορες εφαρμογές. Ωστόσο, παρουσιάζουν περιορισμένη φυσική και μηχανική αντοχή και επομένως κρίνονται ακατάλληλα για συγκεκριμένες εφαρμογές που απαιτούν αντοχή σε φορτίο. Τα φυσικά και συνθετικά πολυμερή ταξινομούνται περαιτέρω σε διαφορετικές υποομάδες ανάλογα με την προέλευσή τους. Ως εκ τούτου, τα φυσικά πολυμερή έχουν υποομάδες, όπως βιοϋλικά που βασίζονται σε πρωτεΐνες ή σε πολυσακχαρίτες.

2.3.1. Φυσικά πρωτεϊνικά βιοϋλικά

Το μετάξι, το κολλαγόνο και το ινώδες (fibrin) αποτελούν βιοϋλικά που έχουν ως βάση τους κάποια πρωτεΐνη. Αυτού του τύπου τα βιοϋλικά σχετίζονται με τη διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων και τείνουν να παρέχουν δομή στους ιστούς. Το κολλαγόνο και το μετάξι είναι τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα πρωτεϊνικά βιοϋλικά που χρησιμοποιούνται στην ιστική μηχανική για την παραγωγή ικριωμάτων.

Κολλαγόνο

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το κολλαγόνο παρέχει αντοχή και δομική σταθερότητα στους ιστούς του σώματος, όπως το δέρμα, τα αιμοφόρα αγγεία, ο τένοντας, οι χόνδροι και το οστό. Είναι επίσης η πιο κοινή πρωτεΐνη στο σώμα. Το κολλαγόνο είναι ένα από τα δύο κύρια συστατικά του οστού, που αποτελώντας το 89% της οργανικής μήτρας και το 32% της ογκομετρικής σύνθεσης του οστού. Μπορεί να απορροφηθεί στο σώμα, είναι

μη τοξικό, παράγει μόνο μια ελάχιστη ανοσολογική απόκριση (ακόμη και μεταξύ διαφορετικών ειδών) και είναι εξαιρετικό για προσκόλληση και βιολογική αλληλεπίδραση με κύτταρα [60]. Το κολλαγόνο μπορεί επίσης να μεταποιηθεί σε μια ποικιλία μορφών, συμπεριλαμβανομένων πορωδών σπόγγων και γελών, και μπορεί να διασυνδεθεί χημικά ώστε να ενισχυθεί ή να μεταβάλει τον ρυθμό αποδόμησης του. Ο αριθμός των βιοϊατρικών εφαρμογών στις οποίες έχει χρησιμοποιηθεί το κολλαγόνο είναι πολύ υψηλός - όχι μόνο έχει εξερευνηθεί για χρήση σε διάφορους τύπους χειρουργικών επεμβάσεων, καλλυντικών και φαρμάκων, αλλά σε βιοπροσθετικά εμφυτεύματα και στην ιστική μηχανική πολλαπλών οργάνων [60]. Τα κύτταρα που αναπτύσσονται στο κολλαγόνο παρουσιάζουν παρόμοια συμπεριφορά με αυτή του σώμα, γι' αυτό το κολλαγόνο είναι τόσο ελπιδοφόρο για τη μίμηση της λειτουργίας και της επούλωσης των φυσικών ιστών.

Ωστόσο, υπάρχουν ορισμένα μειονεκτήματα στη χρήση του κολλαγόνου ως κυτταρικό υπόστρωμα. Ανάλογα με τον τρόπο επεξεργασίας του, το κολλαγόνο μπορεί να προκαλέσει αλλοίωση της συμπεριφοράς των κυττάρων (π.χ. μεταβολές στην ανάπτυξη ή την κίνηση), να έχει ακατάλληλες μηχανικές ιδιότητες ή να υποστεί συστολή (συρρίκνωση) [60, 61]. Επειδή τα κύτταρα αλληλεπιδρούν τόσο εύκολα με το κολλαγόνο, μπορούν να τραβήξουν και να αναδιοργανώσουν τις ίνες κολλαγόνου, προκαλώντας χαλάρωμα του σχήματος εάν δεν έχουν σταθεροποιηθεί σωστά με διασταυρούμενη σύνδεση ή ανάμιξη με άλλο λιγότερο «ευάλωτο» υλικό. Το κολλαγόνο μπορεί εύκολα να συνδυαστεί με άλλα βιολογικά ή συνθετικά υλικά για να βελτιωθούν οι μηχανικές του ιδιότητες ή για να αλλάξει ο τρόπος με τον οποίο συμπεριφέρονται τα κύτταρα όταν καλλιεργούνται πάνω σε αυτό, όπως συμβαίνει με την προσθήκη ζελατίνης. Επιπλέον, έχουν πραγματοποιηθεί πολλές έρευνες για τη δέσμευση διαφόρων πρωτεϊνών ή αυξητικών παραγόντων στο κολλαγόνο ως μόρια σηματοδότησης για ρύθμιση μιας συγκεκριμένης κυτταρικής λειτουργίας [60]. Τα σήματα μπορούν να ενθαρρύνουν τα κύτταρα να αναπτύσσονται, να κινούνται, να δημιουργούν νέα αιμοφόρα αγγεία, να παράγουν κάποια πρωτεΐνη κ.τ.λ. Στην πραγματικότητα, απλά και μόνο ο προσανατολισμός των ινών κολλαγόνου ενός ικρίωματος μπορεί να προκαλέσει την ευθυγράμμιση των κυττάρων σε μια ορισμένη κατεύθυνση ή τη λήψη διαφορετικών σχημάτων [60, 62]. Συνεπώς, τα βιοϋλικά που περιέχουν κολλαγόνο διαθέτουν σημαντικές προοπτικές για την καλλιέργεια κυττάρων με στόχο την παραγωγή των οστών.

2.3.2. Φυσικά βιοϋλικά με βάση τους πολυσακχαρίτες

Το υαλουρονικό οξύ, τα άλατα του αλγινικού οξέος, η αγαρόζη και η χιτοζάνη είναι παραδείγματα πολυσακχαριτών στα οποία βασίζονται βιοϋλικά που χρησιμοποιούνται για την καλλιέργεια και τη διαφοροποίηση βλαστικών κυττάρων. Οι πολυσακχαρίτες, ως μία κατηγορία φυσικών μακρομορίων, έχουν την τάση να είναι εξαιρετικά βιοδραστικά. Προέρχονται από γεωργικές πρώτες ύλες ή από απόβλητα κελύφων. Διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της εξωκυττάριας ουσίας. Μια ανοσοαπόκριση μπορεί να ενεργοποιηθεί από την πηγή του πολυσακχαρίτη και την μέθοδο απομόνωσής του, γεγονός που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη στην επιλογή των υλικών που προορίζονται για εμφύτευση[63].

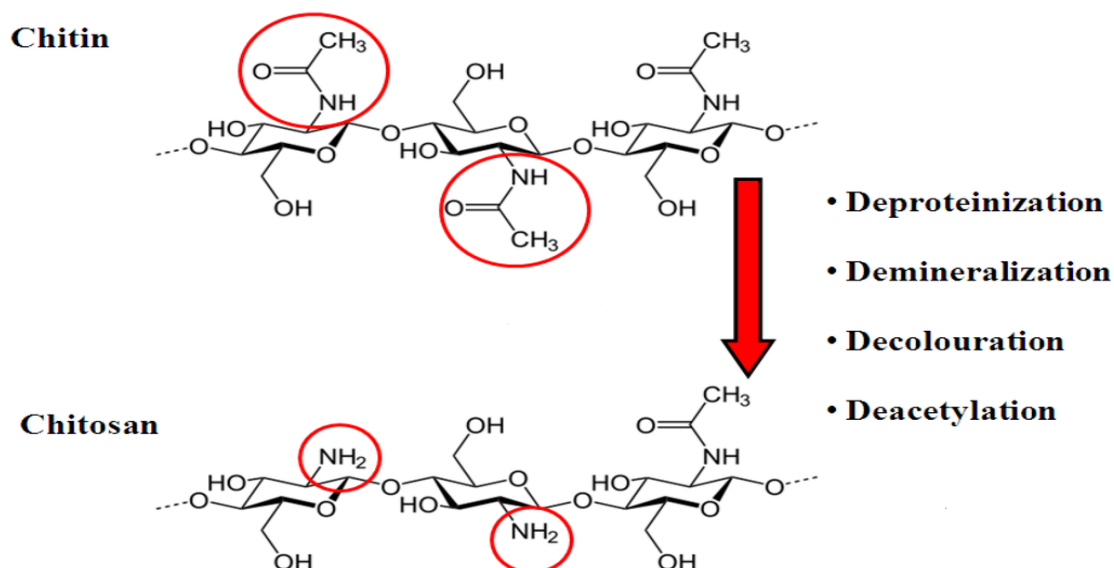
Χιτοζάνη

Η χιτοζάνη (Chit) (πολυ(β-(1-4)-D-γλυκοζαμίνη) είναι ένα φυσικό, μη τοξικό, βιοαποικοδομήσιμο, πολυκατιονικό πολυμερές (πολυηλεκτρολύτης). Το μόριο της είναι ένας γραμμικός πολυσακχαρίτης που προκύπτει έπειτα από μερική αποακετυλίωση της χιτίνης (εικ. 2.2). Η χιτοζάνη αποτελείται από γλυκοζαμίνη και N-ακετυλογλυκοζαμίνη συνδεδεμένες με β(1-4) δεσμό. Η χιτίνη (πολυ(β-(1→4)-Nακετυλο-D-γλυκοζαμίνη)) αποτελεί έναν φυσικό πολυσακχαρίτη υψηλής σημασίας με μεγάλη αφθονία στη φύση [64, 65]. Μετά την κυτταρίνη, η χιτίνη είναι το δεύτερο σε αφθονία βιοπολυμερές και απαντάται στη φύση σε κρυσταλλικές μικροϊνώδεις δομές.

Η χιτοζάνη, όπως και η χιτίνη μπορούν να απομονωθούν από φυσικά απόβλητα, όπως τα κελύφη οστρακοειδών. Ανάλογα με την πηγή και τη διαδικασία που ακολουθείται για την παραγωγή της χιτοζάνης το μοριακό της βάρος μπορεί να εκτείνεται σε εύρος από 300 έως 1.000 kDa και το ποσοστό αποακετυλίωσης από 30% μέχρι 95%. Στην κρυσταλλική της μορφή η χιτοζάνη είναι αδιάλυτη σε υδατικά διαλύματα με pH>7, ενώ σε υδατικά διαλύματα με pH<6, όπου οι ελεύθερες αμινομάδες στη γλυκοζαμίνη διευκολύνουν τη διάλυση του μορίου.

Η κατιοντική φύση της χιτοζάνης είναι κατ' αρχήν υπεύθυνη για την αντίδραση με τα αρνητικά φορτισμένα (ανιονικά) μόρια, όπως λ.χ. οι γλυκοζαμινογλυκάνες (GAG), το βασικό συστατικό της εξωκυττάριας μήτρας του φυσικού οστού [66]. Αυτή η ιδιότητα σε συνδυασμό με την καλή βιοσυμβατότητα, την αντιβακτηριδιακή της ιδιότητα και την ικανότητα της να συνδέεται με παράγοντες ανάπτυξης, καθιστούν τη

χιτοζάνη πολύ χρήσιμο υλικό για την ανάπτυξη μεθόδων σύνθεσης οστικών ιστών σε κλινικές εφαρμογές. Ο ρυθμός αποικοδόμησης της χιτοζάνης από βιολογικούς παράγοντες συνδέεται άμεσα με τον βαθμό κρυσταλλικότητας και κατ' επέκταση με το ποσοστό αποακετυλίωσης της ένωσης. Οι έντονα αποακετυλιωμένες δομές μπορούν να διατηρηθούν αρκετούς μήνες *in vivo*, παράγοντας κατά τη διάσπασή τους ολιγοσακχαρίτες διαφορετικών μηκών.



Εικόνα 2.2 Χημική δομή της χιτίνης και της χιτοζάνης.

Η χιτοζάνη λαμβάνεται ύστερα από τη μερική αποακετυλίωση της χιτίνης σε στερεή κατάσταση, υπό αλκαλικές συνθήκες (πυκνό διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου ή υδροξειδίου του αμμωνίου) ή με ενζυματική υδρόλυση, παρουσία του ενζύμου χιτινική αποακετυλάση. Λόγω της ημικρυσταλλικής μορφολογίας της χιτίνης, η χιτοζάνη που αποκτάται έχει ετερογενή κατανομή ακετυλομάδων κατά μήκος των αλυσίδων [67-69]. Η κατανομή αυτή αποτελεί έναν πολύ σημαντικό παράγοντα για τη διαλυτότητα του πολυμερούς.

Πολύ σημαντική είναι η χρήση της χιτοζάνης στην Ιστική Μηχανική [70-72], η οποία είναι εκτεταμένη, καθώς έχει αποδειχτεί πως η χιτοζάνη προωθεί την ανάπτυξη μήτρας πλούσιας σε εναποτιθέμενα άλατα σε καλλιέργεια οστεοβλαστών. Ερευνητικά έχει μελετηθεί και στον τομέα ανάπτυξης υποκατάστατου οστού, όπου γίνεται συνδυασμός πολυμερούς με άλας ώστε το τελικό υλικό να έχει την δυσθραυστότητα (toughness) και ελαστικότητα του πολυμερούς και την σκληρότητα και αντοχή του πληρωτικού άλατος, το οποίο είναι συνήθως υδροξυαπατίτης.

Τα πλεονεκτήματα τέτοιων συνθέτων είναι η αναβάθμιση της οστεογεννητικής δυνατότητας με την ενσωμάτωση βιοενεργού υδροξυαπατίτη στην πολυμερική μήτρα η οποία λειτουργεί και ως συνδέτης, εμποδίζοντας έτσι την «μετανάστευση» του υδροξυαπατίτη. Η χρήση της χιτίνης και των παραγώγων της σε αυτές τις εφαρμογές δίνει σημαντικά πλεονεκτήματα στο παραγόμενο υλικό αρχικά, καθότι είναι βιοσυμβατή και βιοαποικοδομήσιμη ουσία μεγιστοποιώντας την δυνατότητα του οστού να αναγεννηθεί. Λόγω της δόμησής της σε παράλληλες διατάξεις αλυσίδων συνδεδεμένων με δεσμούς υδρογόνου μπορεί να δώσει προϊόντα με μηχανικές ιδιότητες συγγενικές με το πραγματικό οστό, προσφέροντας σταθερότητα στο εμφύτευμα και μεγάλη φέρουσα ικανότητα φορτίου. Ο συνδυασμός της χιτοζάνης με άλλα βιοσυμβατά υλικά όπως ζελατίνη και φωφορικό ασβέστιο γίνεται ώστε να επιτευχθεί τροποποίηση των ιδιοτήτων της και της αλληλεπίδρασης της μήτρας με τα κύτταρα. [73].

Διαδεδομένη είναι και η παρασκευή σύνθετων υλικών υδροξυαπατίτη με το βιοπολυμερές χιτοζάνη. Η βιομιμητική σύνθεση υλικών χιτοζάνης-νανοϋδροξυαπατίτη οδηγεί σε υλικά με πολύ καλές φυσικοχημικές και ιδιαίτερα αυξημένες βιολογικές ιδιότητες, υστερώντας παρ' όλα αυτά στις μηχανικές αντοχές. Ωστόσο, αντίστοιχες μελέτες [64] για την παραγωγή νανοσύνθετων υλικών υδροξυαπατίτη σε συνδυασμό με χιτοζάνη έχουν αποφέρει τα επιθυμητά αποτελέσματα ως προς τη μηχανική συμπεριφορά. Ο Zhang και οι συνεργάτες του [65] μελέτησαν την παραγωγή σύνθετων υλικών υδροξυαπατίτη-χιτοζάνης, με ανάμιξη μεσοπορώδους υδροξυαπατίτη με χιτοζάνη διαλυμένη σε οξικό οξύ, επιφέροντας εξαιρετικά αποτελέσματα ως προς τη βιολογική συμπεριφορά τους. Τα δείγματα αυτά παρουσίασαν βιοσυμβατότητα και επέτρεψαν την κυτταρική προσκόλληση και ανάπτυξη, αποτελώντας έτσι υποσχόμενα υλικά ως υποκατάστατα οστού.

2.3.3. Συνθετικά βιοϋλικά

Τα συνθετικά βιοϋλικά είναι η τρίτη κατηγορία βιοϋλικών, υπηρετώντας ως ικριώματα για την καλλιέργεια βλαστικών κυττάρων. Παρέχουν, τη δυνατότητα ελέγχου των μηχανικών ιδιοτήτων και του ρυθμού αποδόμησης, καθώς και το πλεονέκτημα της αυτόνομης διαμόρφωσης. Η καθοδήγηση από συνθετικά βιοϋλικά μπορεί να διευκολύνει την αποκατάσταση της δομής και της λειτουργίας των κατεστραμμένων ή νοσούντων ιστών [63]. Παρακάτω αναφέρονται ορισμένοι τύποι

συνθετικών βιοϋλικών που χρησιμοποιούνται στην ιστική μηχανική των οστών, ορισμένες φορές σε συνδυασμό με τα φυσικά βιοϋλικά.

- **Συμπολυμερή:** Τα συμπολυμερή προέρχονται από την ένωση δύο ή περισσότερων μονομερών. Παραδείγματα συμπολυμερών που εξετάζονται στην ιστική μηχανική των οστών αποτελούν το πολύ(γαλακτικό-συν-γλυκολικό) οξύ (PLGA) και την πολυστερουρεθάνη DegraPolTM [74].
- **Μίγματα πολυμερών:** Τα συγκεκριμένα μίγματα πολυμερών αποτελούν μίγματα δύο πολυμερών. Επιλέγοντας πολυμερή με τις απαιτούμενες διαμοριακές αλληλεπιδράσεις, είναι δυνατόν να σχεδιασθεί ένα αναμίξιμο σύστημα με βελτιωμένες ιδιότητες. Τα μίγματα PLGA με πολυφωσφαζένια είναι ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα. Είναι γνωστό ότι τα βιοϋλικά με βάση το PLGA παράγουν όξινα παραπροϊόντα κατά την αποικοδόμηση, και αυτό αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα, επειδή η μακροχρόνια έκθεση του ιστού σε όξινα προϊόντα μπορεί να οδηγήσει σε νέκρωση του ιστού και στην αποτυχία του εμφυτεύματος. Από την άλλη πλευρά, τα πολυφωσφαζένια απελευθερώνουν ουδέτερα ή βασικά προϊόντα κατά την αποικοδόμησή τους. Ως εκ τούτου, το PLGA αναμιγνύεται με μία ευρεία ποικιλία πολυφωσφαζενίων για την παρασκευή νέων βιοϋλικών με σχεδόν ουδέτερα προϊόντα αποικοδόμησης.
- **Σύνθετα πολυμερών-κεραμικών:** Τα σύνθετα βιοϋλικά αποτελούν ιδανικά συστήματα για την ιστική μηχανική των οστών, μιας και το οστό είναι, στην πραγματικότητα, ένα σύνθετο μίγμα ανόργανων κρυστάλλων υδροξυαπατίτη και οργανικών ινών κολλαγόνου. Ακόμα, τα σύνθετα πολυμερών-κεραμικών εξασφαλίζουν τα πλεονεκτήματα του κάθε συστατικού ξεχωριστά και εμφανίζουν επιτυχή αποτελέσματα στην αναγέννηση οστών, υπερβαίνοντας τα αντίστοιχα αποτελέσματα όταν τα πολυμερή και τα κεραμικά χρησιμοποιούνται ξεχωριστά. Τα σύνθετα υδροξυαπατίτη και διαφόρων πολυμερών, όπως το πολυγαλακτικό οξύ (PLA), το PLGA, η ζελατίνη, η χιτοζάνη, και το κολλαγόνο έχουν επιτυχώς παρασκευαστεί και έχουν επιδείξει ενισχυμένο οστικό σχηματισμό τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*. Τα υλικά αυτά θεωρούνται βιομιμητικά και μπορούν να διεγείρουν τον σχηματισμό και την απόθεση φωσφορικού ασβεστίου από υγρό προσομοίωσης του πλάσματος του αίματος (SBF), με αποτέλεσμα την αυξημένη αντοχή της διεπιφάνειας μήτρας-οστού.

- **Προηγμένες υδρογέλες:** Οι υδρογέλες, χάρη στην μοναδική τους βιοσυμβατότητα και των επιθυμητών τους φυσικών χαρακτηριστικών, έχουν χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα ως βιοϋλικά στην ιστική μηχανική. Όχι μόνο λειτουργούν ως μήτρα για την ιστική μηχανική και την αναγεννητική ιατρική αλλά, επίσης, είναι ικανές να μιμηθούν την εξωκυττάρια τοπογραφία της μήτρας και να παράσχουν τους επιθυμητούς βιοενεργούς παράγοντες που προωθούν την ιστική αναγέννηση. Παραδείγματα προηγμένων υδρογελών που δρουν ως βιοϋλικά για την ιστική μηχανική των οστών αποτελούν το φυσικής προέλευσης κολλαγόνο και η ζελατίνη [75].

2.3.3.1. Οι υδρογέλες ως βιοϋλικά

Οι υδρογέλες αποτελούν ένα διογκωμένο δίκτυο διασυνδεδεμένων πολυμερικών αλυσίδων και νερού [76]. Μπορούν να δημιουργηθούν από αλυσίδες υδρόφιλων φυσικών πολυμερών όπως το κολλαγόνο ή το αλγινικό ή από συνθετικά πολυμερή όπως η πολυ(βινυλική αλκοόλη) (PVA) ή το πολυ(ακρυλικό οξύ) (PAA). Η βιοσυμβατότητα, η ευκολία παρασκευής τους και οι ιξωδοελαστικές ιδιότητες τους τις καθιστούν ιδιαίτερα χρήσιμες για την ιστική μηχανική. Έχουν γίνει προσπάθειες για να κατασκευαστούν διάφοροι τύποι ιστών όπως χόνδρος [77,78], κερατοειδής [79,80], δέρμα [81], τένοντας [82] και αγγειακός ιστός χρησιμοποιώντας υδρογέλες [83].

Ένας από τους κύριους περιορισμούς της χρήσης υδρογελών στην ιστική μηχανική *in vitro* είναι οι περιορισμένες μηχανικές τους ιδιότητες. Σε προηγούμενες προσπάθειες χρήσης υδρογελών στην ιστική μηχανική, έχουν παραχθεί ιστοί με σημαντικά χαμηλότερη μηχανική αντοχή από τους πραγματικούς ιστούς [84,85]. Ο κυριότερος λόγος είναι η υψηλή περιεκτικότητα των υδρογελών σε νερό. Όταν κύτταρα εισάγονται σε μια υδρογέλη τότε μπορούν να βελτιώσουν τη μηχανική αντοχή του υλικού μέσω της αναδιοργάνωσης των ινών, της παραγωγής προϊόντων εξωκυττάριας μήτρας και της εφαρμογής ενδογενών τάσεων [86-89]. Η ικανότητα καταγραφής των αλλαγών στις μηχανικές ιδιότητες των υδρογελών με την πάροδο του χρόνου είναι σημαντική για την παρασκευή λειτουργικών ιστών *in vitro*. Αρκετές μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί για την εξέταση των μηχανικών ιδιοτήτων των υδρογελών, αλλά ελάχιστες έχουν εφαρμοσθεί σε υδρογέλες που περιέχουν κύτταρα. Παρακάτω

παρουσιάζονται διάφοροι μέθοδοι που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον χαρακτηρισμό των υδρογελών.

Υδρογέλη ζελατίνης

Η ζελατίνη είναι ένα φυσικό βιοπολυμερές που προέρχεται από το κολλαγόνο και χαρακτηρίζεται ως βιοσυμβατή. Χρησιμοποιείται σαν πηκτικός παράγοντας διότι εμφανίζει ενδιαφέρουσες ιδιότητες διαλυτότητας και πηκτωματοποίησης (gelation). Είναι απόλυτα διαλυτή σε ζεστό νερό, ενώ σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (κρύο νερό) διογκώνεται. Η προσθήκη διαλυμένης ζελατίνης σε ένα οποιοδήποτε διάλυμα προκαλεί μετατροπή της δομής του από υγρή σε gel. Η δομή αυτή (γέλη) εμφανίζει παρόμοιες ιδιότητες με μία αντίστοιχη στερεή φάση με μόνη διαφορά την απουσία πλήρους σταθερότητας. Κατ' επέκταση, η προσθήκη της υδρογέλης ζελατίνης σε ένα διάλυμα έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση του ιξώδους του διαλύματος [90].

Η υδρογέλη ζελατίνης εμφανίζει ιδιότητες θερμοαντιστρεπτότητας. Πιο συγκεκριμένα, κατά την ψύξη του διαλύματος της γέλης το ιξώδες αυξάνεται σταδιακά, μετατρέποντας το υγρό σε gel. Αντίθετα, κατά τη θέρμανση του το gel διαλύεται και επιστρέφει στην αρχική υγρή κατάσταση. Η διαδικασία αυτή μπορεί να επαναληφθεί, ωστόσο η διαδοχική θέρμανση και ψύξη του υλικού είναι πιθανό να επιφέρει μείωση της ιδιότητας πηκτωματοποίησης της υδρογέλης [91]. Ως βιοπολυμερές, η ζελατίνη είναι γνωστή για την εκτυπωσιμότητά της λόγω της εύκολης παρασκευής της και του εύκολου χειρισμού της. Ως εκ τούτου, χρησιμοποιείται ως βιοϋλικό και στη συγκεκριμένη εργασία εξετάζεται πως η υδρογέλη ζελατίνης μπορεί να λειτουργήσει ως φορέας για την κατασκευή πορώδων ικριωμάτων με τη τεχνική της τριδιάστατης εκτύπωσης.

Μέθοδοι χαρακτηρισμού μηχανικών ιδιοτήτων υδρογελών

Δοκιμή εφελκυσμού

Επί του παρόντος, η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος για τον προσδιορισμό των μηχανικών ιδιοτήτων των υδρογελών είναι η δοκιμή εφελκυσμού ή η μέτρηση επιμήκυνσης φιλμ [88, 92]. Η τεχνική περιλαμβάνει στην εφαρμογή δύναμης εφελκυσμού σε φιλμ υλικού που συγκρατείται μεταξύ δύο λαβών (εικ. 2.3a).

Εναλλακτικά, η δύναμη μπορεί να εφαρμοστεί σε δακτύλιο αντί για μία μονή ταινία (εικ. 2.3b).

Η εφαρμοζόμενη δύναμη και η επιμήκυνση του υλικού χρησιμοποιούνται για να ληφθεί ένα γράφημα τάσης-παραμόρφωσης. Αυτό το γράφημα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να αντληθούν πληροφορίες διάφορες μηχανικές ιδιότητες των υδρογελών, συμπεριλαμβανομένου και του συντελεστή Young, των τάσεων στο όριο διαρροής και της τελικής αντοχής εφελκυσμού. Η μελέτη της επιμήκυνσης μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την εξέταση των ιξωδοελαστικών χαρακτηριστικών ενός υλικού υδρογέλης με επιμήκυνση του φιλμ του υλικού σε ένα συγκεκριμένο μήκος και εξέταση της τάσεως χαλάρωσης με την πάροδο του χρόνου σε μία συγκεκριμένη επιμήκυνση. Υπάρχουν, ωστόσο, αρκετοί περιορισμοί της μεθόδου αυτής, οι οποίοι περιλαμβάνουν δοκιμές μόνο σε φιλμ υδρογέλης ή δακτυλίου, μετρήσεις που μπορούν να πραγματοποιηθούν μόνο μία φορά σε κάθε δοκίμιο, πιθανή κακή ευθυγράμμιση των λαβών και επιμήκυνση που περιορίζεται στο να είναι μονοαξονικά. Επίσης, η καταστροφική φύση αυτής της μεθόδου χαρακτηρισμού καθιστά δύσκολη την παρακολούθηση της μεταβολής των μηχανικών ιδιοτήτων των υδρογελών με την πάροδο του χρόνου, μια σημαντική παράμετρο στην ιστική μηχανική [93].

Δοκιμή συμπίεσης

Η δοκιμή συμπίεσης είναι μια άλλη τεχνική που χρησιμοποιείται για να εξετάσει τις μηχανικές ιδιότητες πολλών διαφορετικών τύπων υδρογελών [94,95]. Αυτή η τεχνική περιλαμβάνει την τοποθέτηση του υλικού ανάμεσα σε δύο πλάκες και τη συμπίεσή του (εικ. 2.3c). Η πίεση που εφαρμόζεται στην επιφάνεια της υδρογέλης και η απόσταση από την συμπίεση της υδρογέλης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό των μηχανικών ιδιοτήτων των υδρογελών μέσω ενός θεωρητικού μοντέλου. Ένα από τα πλεονεκτήματα της δοκιμής συμπίεσης συγκριτικά με την προηγούμενη είναι ότι δεν περιορίζει τη γεωμετρία της υδρογέλης σε φιλμ ή δακτυλίου, αν και απαιτεί επίπεδη επιφάνεια. Ωστόσο, έχει αρκετούς περιορισμούς, συμπεριλαμβανομένης της διογκώσεως της υδρογέλης υπό συμπίεση και της δυσκολίας εφαρμογής ομοιόμορφης πίεσεως. Η διογκωση μπορεί να ξεπεραστεί περιορίζοντας την υδρογέλη γύρω από την εξωτερική της ακμή, αν και αυτό αλλάζει τη φύση των μετρήσεων. Ορισμένες μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει τη δοκιμή συμπίεσης για να εξετάσουν τις μηχανικές ιδιότητες των υδρογελών που περιέχουν κύτταρα [94,95].

Όμως, ο μη καταστρεπτικός απευθείας μηχανικός χαρακτηρισμός των υδρογελών δεν είναι εφικτός με αυτή την τεχνική.

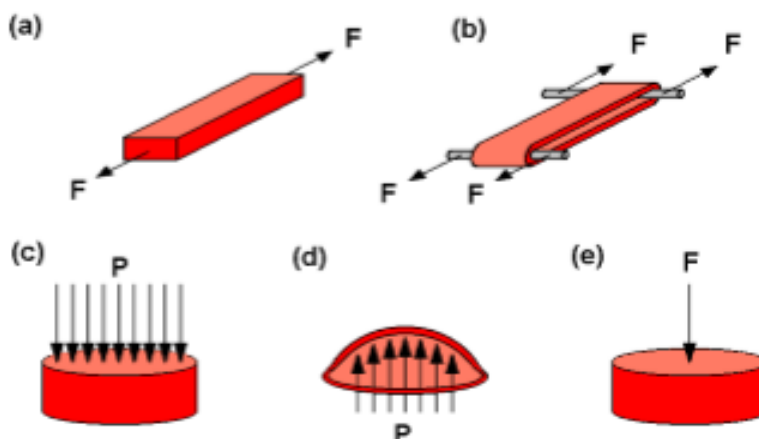
Δοκιμή διόγκωσης

Μια άλλη συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος για τον μηχανικό χαρακτηρισμό των υδρογελών αποτελεί η δοκιμή διόγκωσης (bulge test). Η δοκιμή περιλαμβάνει τη διόγκωση της υδρογέλης μέσω ενός ανοίγματος στο υπόστρωμα και μέτρηση της προκύπτουσας μετατόπισης ως συνάρτηση της εφαρμοζόμενης πίεσης (εικ. 2.3d). Η δοκιμή διόγκωσης έχει μια σειρά ελαττωμάτων, συμπεριλαμβανομένης της πιθανής διαρροής, της δυσκολίας ελέγχου της εφαρμοζόμενης πίεσης και του διαλυμένου αέρα που παγιδεύεται στο διάλυμα [96]. Αυτοί οι περιορισμοί καθιστούν αυτή την τεχνική ακατάλληλη για την εξέταση των υδρογελών που έχουν κύτταρα απευθείας σε περιβάλλον κυτταροκαλλιέργειας.

Σκληρομέτρηση

Η σκληρομέτρηση (indentation) αποτελεί τη δημοφιλέστερη και πλέον εύχρηστη τεχνική προσδιορισμού των μηχανικών ιδιοτήτων των υδρογελών. Η τεχνική αυτή λειτουργεί διεισδύοντας σε μία υδρογέλη σε ένα μόνο σημείο, μέχρι ένα προκαθορισμένο βάθος και μετρώντας το απαιτούμενο επιβαλλόμενο φορτίο για τη συγκεκριμένη μετατόπιση. Στην πιο κοινή προσέγγιση της τεχνικής, γίνεται χρήση μιας ακίδας διείσδυσης που συνδέεται με ένα μετατροπέα δύναμης για την καταγραφή της δύναμης που απαιτείται για τη διείσδυση. Μέσω των καμπυλών δύναμης-μετατόπισης είναι δυνατός ο προσδιορισμός του μέτρου ελαστικότητας του υλικού. Για αυτόν τον τύπο σκληρομέτρησης παίζει πολύ σημαντικό ρόλο η γεωμετρία της ακίδας διείσδυσης για τον προσδιορισμό των μηχανικών αντοχών του υλικού [97]. Με την εφαρμογή της

ακίδας σε ένα δείγμα για ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα σε ένα προκαθορισμένο βάθος διείσδυσης, μπορούν να ληφθούν δεδομένα χαλάρωσης τάσης.



Εικόνα 2.3 Συμβατικές τεχνικές για τον μηχανικό χαρακτηρισμό των υδρογελών: a) επιμήκυνση ταινιών, (b) επιμήκυνση δακτυλίων, c) δοκιμή συμπίεσης, d) δοκιμή διόγκωσης e) σκληρομέτρηση (F = δύναμη, P = πίεση).

Η σκληρομέτρηση έχει αρκετά πλεονεκτήματα έναντι άλλων συμβατικών τεχνικών μηχανικού χαρακτηρισμού [98]. Πιο συγκεκριμένα, επιτρέπει τη γρήγορη, απευθείας και σε πραγματικό χρόνο μέτρηση των υλικών. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση της εντοπισμένης μηχανικής αντοχής σε διάφορα σημεία της επιφάνειας του υλικού. Ένα μειονέκτημα με τη χρήση αυτού του τύπου σκληρομέτρησης είναι ότι δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε αποστειρωμένο περιβάλλον υπό συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας, καθώς κάτι τέτοιο θα έβλαπτε τον μορφοτροπέα δύναμης.

2.4. Προκλήσεις της Ιστικής Μηχανικής

Κύρια πρόκληση της ιστικής μηχανικής αποτελεί η μίμηση της φυσικής εξωκυττάριας μήτρας και των συνθηκών που επικρατούν εντός του οργανισμού. Η σύνθεση ικριωμάτων που διαθέτουν ικανοποιητικές μηχανικές ιδιότητες είναι μία από τις προκλήσεις που εμφανίζονται στην ιστική μηχανική των οστών. Στους οστικούς ιστούς, το εμφυτευμένο ικρίωμα πρέπει να διαθέτει μηχανική αντοχή ώστε να λειτουργεί σωστά από τη στιγμή της εμφύτευσης μέχρι το πέρας της διαδικασίας ανάπτυξης. Επιπλέον πρόκληση αποτελεί το γεγονός πως η διαδικασία επούλωσης εξαρτάται από την ηλικία. Στα νεαρά άτομα, ο ρυθμός ίασης είναι υψηλός, ενώ στους ηλικιωμένους ο ρυθμός αυτός μειώνεται. Πολλά υλικά με καλές μηχανικές ιδιότητες στερούνται το υψηλό πορώδες που απαιτείται για την παροχή θρεπτικών ουσιών, και πολλά υλικά που *in vitro* έχουν επιδείξει καλή συμπεριφορά, αποτυγχάνουν *in vivo*, εξαιτίας της ανεπαρκούς ικανότητάς τους να αναπτύξουν αγγειακό δίκτυο (vascularization). Η

βελτίωση της αγγείωσης θεωρείται μία από τις πιο σημαντικές πτυχές που απαιτούν πιο εκτεταμένη έρευνα στο τομέα της ιστικής μηχανικής. Η αγγείωση μπορεί να βελτιωθεί επιτρέποντας τα κύτταρα να σχηματίσουν μικροαγγείωση στο ικρίωμα πριν την εμφύτευση.

Η καλλιέργεια των κυττάρων σε μία τριδιάστατη δομή φαίνεται πολλά υποσχόμενη για την ανάπτυξη φαρμάκων και για την ιστική μηχανική. Ωστόσο, υπάρχουν πολλά προβλήματα ή ανικανοποίητες ανάγκες που πρέπει να διευθετηθούν. Η πλειοψηφία των διαθέσιμων τριδιάστατων καλλιεργειών αποτυγχάνουν να μιμηθούν το ανθρώπινο περιβάλλον και ως εκ τούτου αποτελούν μόνο μια στατική κατάσταση. Τα μοσχεύματα που προέρχονται από ζώα ή ανθρώπους περικλείουν τον κίνδυνο μετάδοσης ασθενειών. Τα αποτελέσματα των κυτταρικών καλλιεργειών σε ικρίωματα παρουσιάζουν υψηλές διακυμάνσεις μεταξύ διαφορετικών παρτίδων, ειδικά όταν προέρχονται από *in vivo* πειράματα σε ζώα. Για να ξεπεραστούν αυτοί οι περιορισμοί, γίνεται ανάπτυξη συνθετικών ικριωμάτων ελεγχόμενης σύστασης. Τα συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα συνθετικά ικρίωματα βασίζονται στην πολυαιθυλενογλυκόλη, είναι συμβατά και αδρανή. Τα κολλαγονούχα ικρίωματα τείνουν να αυτο-φθορίζονται, γεγονός που αποτελεί περιοριστικό παράγοντα. Πολλές ενώσεις μπορούν να αλληλεπιδρούν με τα ικρίωματα και αυτό αποτελεί έναν επιπλέον περιορισμό των ικριωμάτων για τριδιάστατα συστήματα καλλιεργειών. Η απορρόφηση μιας ένωσης από το ικρίωμα εξαρτάται από τις ιδιότητες της και ως εκ τούτου, είναι σημαντική η σύγκριση διαφορετικών ικριωμάτων για τις ιδιότητες απορρόφησής τους από την συγκεκριμένη ένωση [63].

3. Κατασκευή ικριωμάτων μέσω της Τριδιάστατης Εκτύπωσης (3D printing)

Τα τελευταία χρόνια έχει εντατικοποιηθεί η έρευνα για τη χρήση της τριδιάστατης εκτύπωσης σε βιοϊατρικές εφαρμογές, σε συνδυασμό με δεδομένα διαγνωστικών τεχνικών που περιγράφουν τα ιδιαίτερα ανατομικά στοιχεία του ασθενούς. Από την πρώτη χρήση της για την κατασκευή καλουπιών χειρουργικών εργαλείων και για ανατομικά μοντέλα προεγχειρητικού σχεδιασμού, σταδιακά η τριδιάστατη εκτύπωση χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή εξειδικευμένων συστημάτων, όπως εμφυτεύματα, ικρίωματα και συστήματα χορήγησης φαρμάκων.

Η τριδιάστατη εκτύπωση (3D printing) είναι μια μέθοδος προσθετικής κατασκευής με την οποία κατασκευάζονται αντικείμενα μέσω της διαδοχικής πρόσθεσης επάλληλων στρώσεων υλικού. Στη τριδιάστατη εκτύπωση μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφοροι τύποι υλικών, όπως μέταλλα, κεραμικά και πολυμερή. Οι τριδιάστατοι εκτυπωτές χρησιμοποιούνται κυρίως για την κατασκευή φυσικών μοντέλων και πρωτοτύπων και παρέχουν τη δυνατότητα εκτύπωσης μερών και εξαρτημάτων από διάφορα υλικά, με διαφορετικές μηχανικές και φυσικές ιδιότητες, συχνά σε μια ενιαία διαδικασία κατασκευής.

Οι τεχνικές της τριδιάστατης εκτύπωσης παρουσιάζουν μια σημαντική διαφορά σε σχέση με τις κλασικές μεθόδους κατασκευής διαφόρων προϊόντων οι οποίες χρησιμοποιούνται μέχρι σήμερα, όπως οι μέθοδοι χύτευσης. Το σύνολο των κατασκευαστικών μεθόδων βασίζεται ουσιαστικά στην χύτευση σε καλούπια ή την αφαίρεση υλικού από ακατέργαστα, χυτά, σφυρήλατα, ή πρεσσαριστά τεμάχια, είτε με την χρήση εργαλείων χειρός, είτε με την χρήση εργαλειομηχανών, μέχρις ότου το αντικείμενο λάβει την επιθυμητή μορφή. Η τριδιάστατη εκτύπωση, από την άλλη πλευρά, αποτελεί μια διαδικασία πρόσθεσης υλικού, κατά την οποία η κατασκευή ενός αντικειμένου πραγματοποιείται με την εναπόθεση, στερεοποίηση ή συγκόλληση διαδοχικών λεπτών στρώσεων υλικού, σύμφωνα με το αποθηκευμένο στον υπολογιστή σχέδιο ή εικόνα [99].

Όσον αφορά τα ικριώματα, οι παραδοσιακές μέθοδοι κατασκευής περιλαμβάνουν τεχνικές όπως: η διαλυτική χύτευση, η πορογενής έκπλυση, η λυοφιλίωση, η ηλεκτρική ή η υγρή νηματοποίηση, ή συνδυασμός των παραπάνω τεχνικών. Αν και οι τεχνικές αυτές χρησιμοποιούνται ευρέως στο τομέα της ιστικής μηχανικής, παρουσιάζουν πολλά μειονεκτήματα, συμπεριλαμβανομένης της χρήσης τοξικών οργανικών διαλυτών, δυσκολία απομάκρυνσης υπολειμμάτων σωματιδίων του διαλύτη από τη μήτρα των ικριωμάτων, μακρά περίοδο κατασκευής, χαμηλή αναπαραγωγιμότητα (reproducibility) και κατασκευή ακανόνιστου πορώδους και λεπτοδομών. Η τεχνική διαλυτικής χύτευσης, για παράδειγμα, εξαρτάται από το σχήμα του καλουπιού, καθιστώντας αδύνατη την αναπροσαρμογή του πορώδους και του μεγέθους των πόρων.

Πολλές έρευνες δείχνουν ότι η αλληλεπίδραση κυττάρων-υλικού παίζει σημαντικό ρόλο στην ιστική μηχανική, ευνοώντας τη μετανάστευση των κυττάρων, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίησή τους. Ως εκ τούτου, το μέγεθος, η μορφή και η

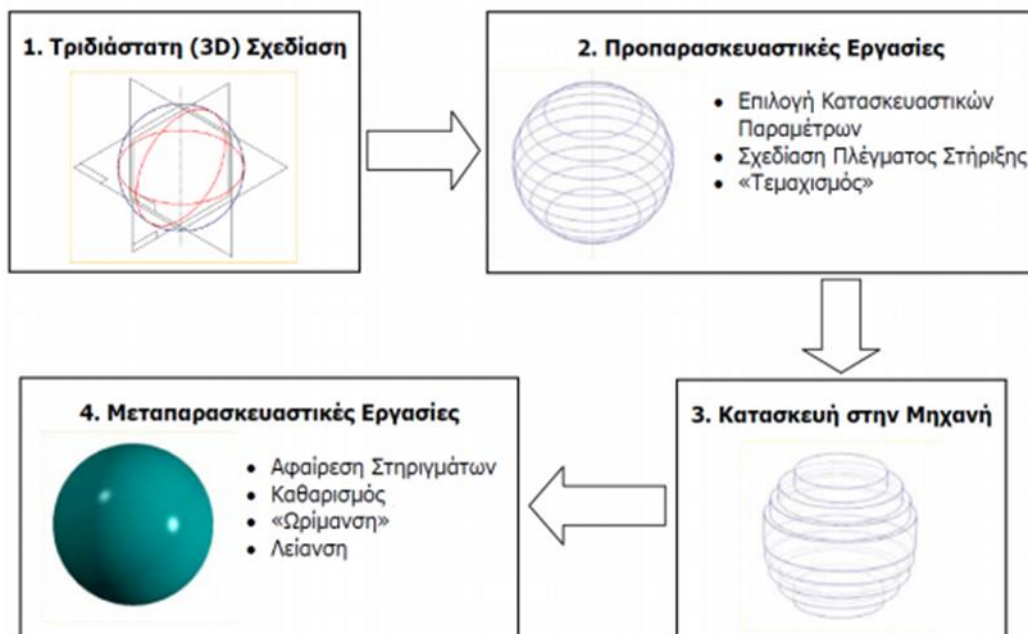
διασυνδεσιμότητα των πόρων είναι ουσιώδεις παράγοντες που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την κατασκευή ενός ικριώματος. Η τριδιάστατη εκτύπωση επιτρέπει καλύτερο έλεγχο της αρχιτεκτονικής του ικριώματος, αφού το εκτυπωμένο αντικείμενο αποτελεί πιστή αντιγραφή του σχεδιασμένου μοντέλου. Εκτός αυτού, οι διαδικασίες μοντελοποίησης και εκτύπωσης είναι πολύ πιο γρήγορες και ευέλικτες, γεγονός που επιτρέπει τη διεξαγωγή πολλών ερευνητικών δοκιμών. Έτσι, ικριώματα με διαφορετικά σχέδια και μεγέθη πόρων μπορούν να δοκιμασθούν και να ελεγχθούν, δίνοντας στους ερευνητές την δυνατότητα να δημιουργήσουν μια πλατφόρμα για τη μελέτη των αποτελεσμάτων της γεωμετρίας και της αρχιτεκτονικής των εκτυπωμένων δομών, τόσο στη κυτταρική απόκριση όσο και στη μηχανική συμπεριφορά [100].

Στις πιο γνωστές τεχνολογίες Προσθετικής Κατασκευής συγκαταλέγονται η Στερεολιθογραφία (Stereolithography-SL), η Κατασκευή με Εναπόθεση Υλικού (Fused Deposition Modelling -FDM), η Επιλεκτική Συσσωμάτωση με Λείζερ (Selective Laser Sintering - SLS), η Συγκόλληση Κόκκων με Ψεκασμό (Powder Bed Inkjet Printing), η Κατασκευή με Πολλαπλό ψεκασμό (Multi-jet Modelling - MJM) και η Συγκόλληση Επάλληλων Φύλλων (Laminated Object Manufacturing - LOM).

3.1. Διαδικασία Προσθετικής Κατασκευής αντικειμένων

Η διαδικασία κατασκευής ενός αντικειμένου με τεχνολογίες προσθετικής κατασκευής (ΠΚ) μπορεί να διαχωριστεί σε τέσσερα βασικά στάδια (εικ. 3.1). Το πρώτο στάδιο αποτελεί η σχεδίαση του τριδιάστατου (3D) ψηφιακού μοντέλου του αντικειμένου μέσω ενός λογισμικού μηχανολογικής ή βιομηχανικής σχεδίασης σε υπολογιστή (CAD). Η τριδιάστατη σχεδίαση είναι μία σχετικά συνηθισμένη πλέον εργασία για ένα πλήθος εφαρμογών, που εκτείνονται από την απλή απεικόνιση μιας ιδέας μέχρι τον λειτουργικό, μηχανικό και υδροδυναμικό έλεγχο εξαρτημάτων και προϊόντων. Σε αντίθεση με κάποιες από τις προηγούμενες εφαρμογές, στην περίπτωση των τεχνολογιών ΠΚ υπάρχει η επιπλέον απαίτηση το 3D μοντέλο να είναι στερεό (solid model). Στερεό θεωρείται το 3D μοντέλο του οποίου ο όγκος καθορίζεται απόλυτα και σαφώς από τις περιβάλλουσες επιφάνειες, είναι δηλαδή εντελώς «κλειστό» έτσι ώστε να είναι σαφές πιο τμήμα του χώρου είναι εντός του μοντέλου και πιο εκτός. Σε ένα στερεό μοντέλο είναι επίσης σαφώς καθορισμένη η τοπολογία των επιφανειών, ποιες δηλαδή επιφάνειες συνδέονται μεταξύ τους και μέσω ποιων ακμών, ενώ δεν

επιτρέπονται τεμνόμενες ή ελεύθερες ακμές (ακμές που ανήκουν σε μία μόνο επιφάνεια).



Εικόνα 3.1 Σχηματική απεικόνιση διαδικασίας παραγωγής ενός αντικειμένου με διαδικασίες προσθετικής κατασκευής.

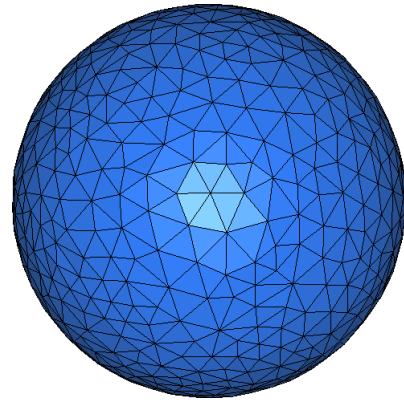
Στο δεύτερο στάδιο εκτελούνται προπαρασκευαστικές εργασίες με βάση το 3D μοντέλο και ο προγραμματισμός κατασκευής στη μηχανή ΠΚ. Για την αναπαράσταση του 3D μοντέλου και την μεταφορά των γεωμετρικών δεδομένων χρησιμοποιείται το πρότυπο STL, το οποίο αναπτύχθηκε από την 3D Systems, την πρώτη εταιρία που κατασκεύασε εμπορική μονάδα Στερεολιθογραφίας. Πρόκειται ουσιαστικά για πολυεδρικό πρότυπο (facet format) στο οποίο οι επιφάνειες του τριδιάστατου μοντέλου προσεγγίζονται μέσω τριγώνων, κατά την απλούστερη δηλαδή πολυεδρική προσέγγιση/ψηφιδωτή αναπαράσταση (tessellated modeling). Καθώς πρόκειται για ένα απλό μοντέλο επιφανειών, το μοντέλο STL δεν περιέχει επιπλέον πληροφορίες που αφορούν στο χρώμα των επιφανειών, το υλικό, τις κατασκευαστικές ανοχές κλπ.

Με βάση το STL μοντέλο του αντικειμένου εκτελούνται οι προπαρασκευαστικές εργασίες με πρώτη την επιλογή προσανατολισμού και παραμέτρων κατασκευής. Ως

προσανατολισμό κατασκευής ορίζεται η θέση του αντικειμένου σε σχέση με το σύστημα συντεταγμένων της μηχανής και ειδικά τον άξονα κατασκευής Z, ο οποίος ορίζει την κατεύθυνση κατά την οποία προστίθενται τα διαδοχικά στρώματα.

Στη συνέχεια και ανάλογα με το είδος της τεχνολογίας ΠΚ, υπολογίζονται αυτόματα τα σημεία που χρειάζονται στήριξη και δημιουργείται η αντίστοιχη υποστηρικτική δομή (support structure).

Η υποστηρικτική δομή είναι απαραίτητη σε αρκετές τεχνολογίες ΠΚ, έτσι ώστε να διασφαλισθεί ότι η κατασκευή θα παραμείνει σταθερή κατά την διάρκεια του «χτισίματος», ότι τμήματα του αντικειμένου που εξέχουν ή «κρέμονται» σύμφωνα με τον επιλεχθέντα προσανατολισμό δε θα καμφθούν λόγω βάρους ή θα παρασυρθούν από τα κινούμενα μέρη της μηχανής. Η υποστηρικτική δομή αποτρέπει επίσης την άμεση επαφή του προς κατασκευή αντικειμένου με την πλατφόρμα της μηχανής, την οριζόντια επιφάνεια πάνω στην οποία χτίζεται σταδιακά η κατασκευή, επιτρέποντας έτσι την απομάκρυνση του αντικειμένου στο τέλος της κατασκευής με ευκολία και χωρίς τον κίνδυνο να τραυματιστούν οι επιφάνειές του.



Εικόνα 3.2 Μοντέλο σφαίρας σε αναπαράσταση STL.

Μετά την επιλογή κατασκευαστικού προσανατολισμού καθώς και τη δημιουργία τυχόν στηριγμάτων ακολουθεί η διαδικασία του τεμαχισμού (slicing) όπου το αντικείμενο και η αντίστοιχη υποστηρικτική δομή τέμνονται από διαδοχικά επίπεδα, τα οποία είναι παράλληλα σε αυτό της πλατφόρμας (επίπεδο XY). Σημαντική σε αυτή τη φάση είναι η επιλογή του πάχους στρώματος (layer thickness) το οποίο ορίζει την απόσταση μεταξύ δύο διαδοχικών εγκάρσιων τομών του αντικειμένου. Η απόσταση αυτή περιγράφεται συχνά και με τον όρο βήμα τεμαχισμού και επηρεάζει σημαντικά την ακρίβεια του τελικού αντικείμενου. Αποτέλεσμα της διαδικασίας τεμαχισμού είναι το αρχείο διατομών (sliced file), μία ιεραρχημένη από κάτω προς το πάνω «στοίβα» διδιάστατων τομών, που περιγράφουν γεωμετρικά τα στρώματα τα οποία πρέπει να κατασκευασθούν από τη μηχανή για να «χτισθεί» το αντικείμενο.

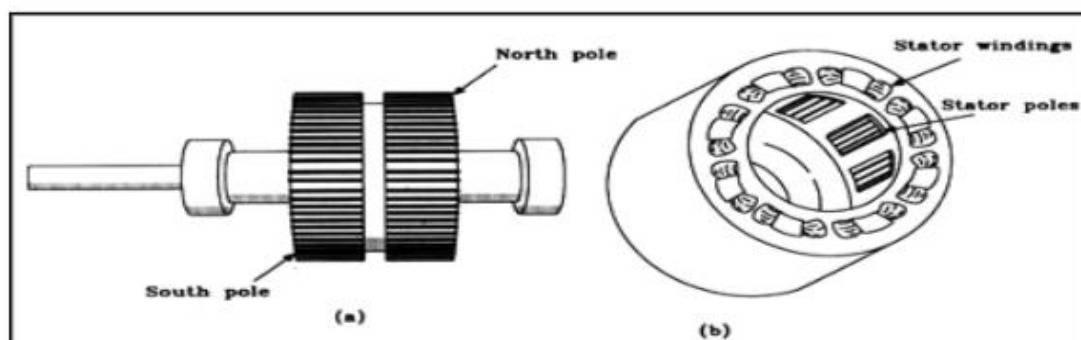
Στην τρίτη φάση της διαδικασίας, τα αρχεία τομών των αντικειμένων εισάγονται στη μηχανή ΠΚ και με τη ρύθμιση ορισμένων κατασκευαστικών παραμέτρων (π.χ. θερμοκρασία εκτύπωσης, ταχύτητα κίνησης και ρυθμό εναπόθεσης υλικού) ξεκινά η

κατασκευή του αντικειμένου. Η φάση αυτή είναι εντελώς αυτοματοποιημένη και δεν απαιτείται η εποπτεία του χειριστή.

Με την ολοκλήρωση της κατασκευαστικής φάσης το αντικείμενο απομακρύνεται είτε με τη βοήθεια ειδικών εργαλείων είτε με το χέρι, ώστε να καθαρισθεί από τυχόν υπάρχοντα στηρίγματα ή/και υπολείμματα πρώτης ύλης. Επίσης, ανάλογα με τη φύση της χρησιμοποιούμενης τεχνολογίας ΠΚ, ίσως απαιτηθούν επιπλέον μετα-παρασκευαστικές εργασίες όπως η τοποθέτηση του κομματιού εντός κατάλληλου θαλάμου «ωρίμανσης», όπου εκτίθεται σε κατάλληλες συνθήκες προκειμένου να αποκτήσει αντοχή τέτοια που θα επιτρέπει την εκτέλεση των τελικών εργασιών φινιρίσματος, όπως λείανση και βάνιμο των επιφανειών του.

Μία από τις πιο σημαντικές παραμέτρους που επηρεάζουν την ακρίβεια των εκτυπωμένων αντικειμένων είναι ο έλεγχος των κινήσεων της κεφαλής και της πλατφόρμας εκτύπωσης. Οι κινήσεις αυτές προκαλούνται και ελέγχονται από κινητήρες και πιο συγκεκριμένα, στην παρούσα εργασία, από βηματικούς κινητήρες. Τα κινητήρια αυτά στοιχεία συνδέονται μέσω τροχαλιών, ιμάντων και ράβδων έτσι ώστε να επιτευχθεί ο έλεγχος της κίνησης και στις τρεις διαστάσεις. Συνεπώς, οι βηματικοί κινητήρες αποτελούν σημαντικό τμήμα του τριδιάστατου εκτυπωτή.

Ένας βηματικός κινητήρας μετατρέπει τους ηλεκτρονικούς παλμούς σε ανάλογη μηχανική μετακίνηση. Κάθε περιστροφή του άξονα του βηματικού κινητήρα αποτελείται από μια σειρά ξεχωριστών μεμονωμένων βημάτων. Ένα βήμα ορίζεται ως η γωνιακή περιστροφή που παράγεται από τον άξονα κάθε φορά που λαμβάνει η μηχανή έναν παλμό βήματος. Αυτοί οι τύποι μηχανών είναι πολύ δημοφιλείς σε συστήματα αυτόματου ελέγχου, όπως η ρομποτική, επειδή είναι κατάλληλοι για τη λήψη των ψηφιακών παλμών για τον έλεγχο βημάτων. Κάθε βήμα αναγκάζει τον άξονα να



Εικόνα 3.3 Στοιχεία ενός (PM) βηματικού κινητήρα: (a) Στροφέας, (b) Στάτορας.

περιστραφεί συγκεκριμένες μοίρες ανάλογα με τον βηματικό κινητήρα. Ο αριθμός δοντιών στον στροφέα και τον στάτορα καθορίζουν τη βηματική γωνία που θα εμφανιστεί κάθε φορά που αντιστρέφεται η πολικότητα της περιέλιξης. Όσο μεγαλύτερος ο αριθμός δοντιών, τόσο μικρότερη η βηματική γωνία.

Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό ενός (PM) βηματικού κινητήρα είναι ότι μπορεί να διατηρήσει τη ροπή εκμετάλλευσης κατά τρόπο αόριστο όταν σταματήσει ο στροφέας. Όταν καμία δύναμη δεν εφαρμόζεται στις περιελίξεις, μια μικρή μαγνητική δύναμη αναπτύσσεται μεταξύ του μόνιμου μαγνήτη και του στάτορα. Δίνοντας παλμό στα καλώδια του στάτορα σε μια επιθυμητή ακολουθία (δηλαδή επανάληψη παλμών), είναι δυνατό να ελεγχθεί η ταχύτητα και η κατεύθυνση της μηχανής. Ο αριθμός των επαναλαμβανόμενων παλμών που χρειάζεται ο βηματικός κινητήρας για να λειτουργήσει δίνεται από τον τύπο:

Οι βηματικοί κινητήρες ταξινομούνται ανάλογα με τον αριθμό βημάτων ανά δευτερόλεπτο, την βηματική γωνία και τη χωρητικότητα φορτίων ροπής που η μηχανή μπορεί να ξεπεράσει. Ο αριθμός βημάτων ανά δευτερόλεπτο, είναι επίσης γνωστός ως ρυθμός βήματος. Η πραγματική ταχύτητα ενός βηματικού κινητήρα εξαρτάται από τη βηματική γωνία, δηλαδή τη γωνία περιστροφής ανά παλμό, και τον ρυθμό βημάτων και βρίσκεται την ακόλουθη εξίσωση:

$$\text{Αριθμός Επανάληψης Παλμοσειρών} = \frac{\text{Επιθυμητές μοίρες χρήστη}}{\text{Μοίρες ανά βήμα}}$$

$$N = \Psi (s/s) / 6\beta, \text{ όπου}$$

N = η ταχύτητα του κινητήρα σε στροφές ανά λεπτό (rpm),

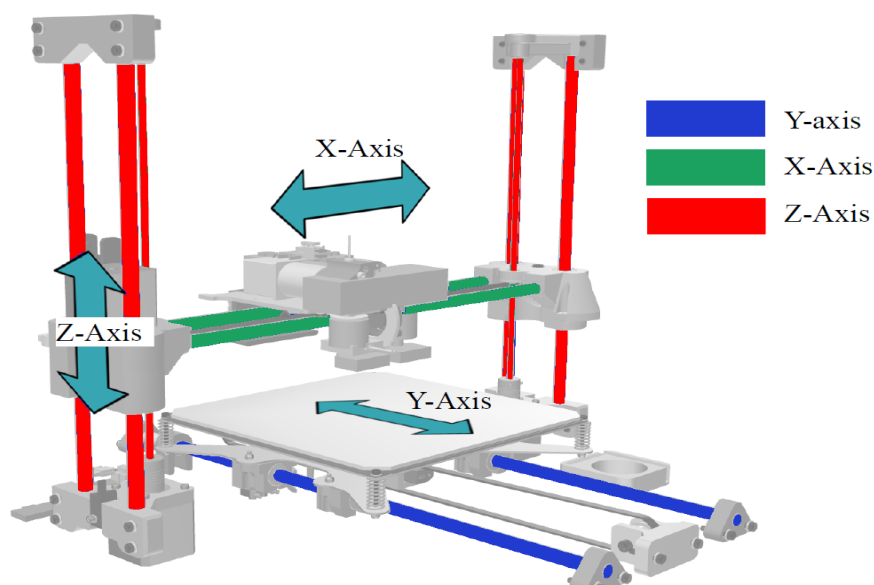
Ψ = η βηματική γωνία σε μηχανικούς βαθμούς,

s/s = ο αριθμός των βημάτων ανά δευτερόλεπτο.

Όπως προαναφέρθηκε, η κίνηση του άξονα γίνεται με κατάλληλη παλμική τροφοδοσία στα τυλίγματα του στάτη. Το γεγονός ότι η περιστροφή καθορίζεται εξ' ολοκλήρου από τη παλμοδότηση που εφαρμόζεται, προσφέρει το μεγάλο πλεονέκτημα αυτού του κινητήρα, το οποίο είναι ο έλεγχος της ακριβής θέσης του δρομέα μέσω της τροφοδοσίας. Έτσι αποφεύγεται η χρήση αισθητήρα θέσης, ο οποίος όχι μόνο κοστίζει

επιπλέον (ειδικότερα για μεγάλη ακρίβεια) αλλά και η ακρίβειά του εξαρτάται από τη προσεκτική τοποθέτησή του στον άξονα και τη στιβαρή μηχανική στήριξη που θα έχει κατά τη διάρκεια λειτουργίας της μηχανής.

Για την εκτύπωση ενός αντικειμένου χρησιμοποιούνται 4 κινητήρες. Ένας εξ' αυτών είναι υπεύθυνος για την κίνηση της πλατφόρμας εκτύπωσης κατά τον άξονα y (εικ. 3.4). Ένας κινητήρας κινεί την κεφαλή εκτύπωσης στον κάθετο άξονα z, ένας στον άξονα x και ο τελευταίος κινεί το κατακόρυφο έμβολο που ρυθμίζει τη ροή υλικού. Γίνεται, λοιπόν, κατανοητό πως η σχεδιαστική λεπτομέρεια του αντικειμένου που εκτυπώνεται εξαρτάται από το ποσοστό κβάντισης του χώρου, δηλαδή από πλήθος κινήσεων του συστήματος εκτύπωσης και κυρίως του εμβόλου που εκκρίνει το υλικό. Όσο μικρότερη η γωνία περιστροφής του κινητήρα ανά παλμό, τόσο μεγαλύτερο το πλήθος των κινήσεων του άξονα, με αποτέλεσμα την καλύτερη ακρίβεια στην εκτύπωση και περισσότερες σχεδιαστικές λεπτομέρειες.



Εικόνα 3.4 Έλεγχος κινήσεων κατά τους άξονες x,y,z στον τριδιάστατο εκτυπωτή.

3.1.1. Μελάνια εκτύπωσης οστικών ικριωμάτων

Κάθε μία από τις μεθόδους τριδιάστατης εκτύπωσης ικριωμάτων για οστική αποκατάσταση βασίζεται στα μελάνια εκτύπωσης. Ωστόσο, οι προδιαγραφές που πρέπει να πληρούνται από ένα μελάνι εκτύπωσης διαφέρουν ανάλογα με τη μέθοδο εκτύπωσης. Στη συγκεκριμένη εργασία γίνεται παρασκευή οστικών ικριωμάτων μέσω προσθετικής κατασκευής με εξώθηση υλικού (extrusion). Στη μέθοδο αυτή το υλικό εξωθείται μέσω

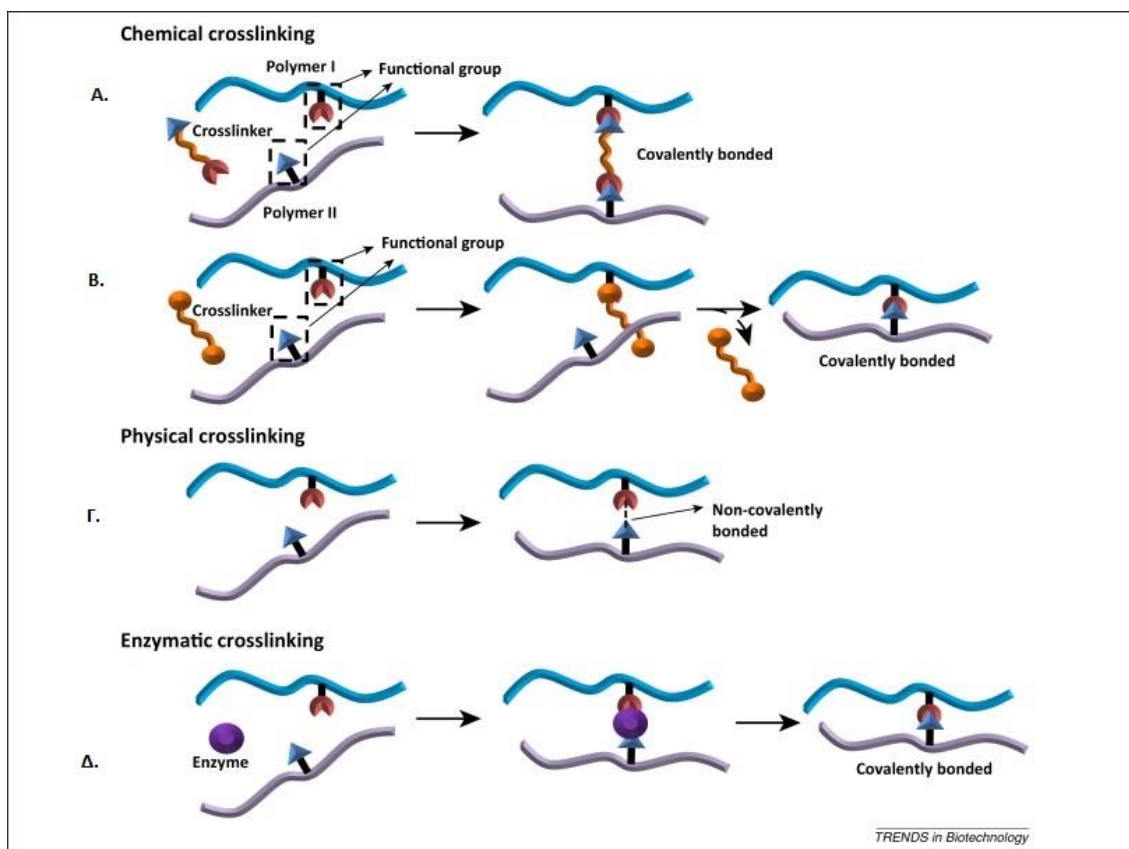
ενός ακροφυσίου και εναποτίθενται στην πλατφόρμα εκτύπωσης. Κατά τη διάρκεια της εκτύπωσης μέσω αυτής της τεχνικής, επιδιώκεται χαμηλό ιξώδες ώστε να αποφεύγονται οι έντονες διατμητικές τάσεις και πιθανό φράξιμο (clogging) του ακροφυσίου. Μετά την εναπόθεση, απαιτείται υψηλό ιξώδες ή υψηλός ρυθμός στερεοποίησης, έτσι ώστε το μελάνι εκτύπωσης να διατηρήσει το σχήμα του και να διατηρηθεί η ακρίβεια της εκτύπωσης ως προς το σχεδιαστικό μοντέλο. Για παράδειγμα, η θερμοαντιστρεπτή πηκτωματοποίηση της ζελατίνης έχει εφαρμοσθεί στη τριδιάστατη εκτύπωση βιολογικών συστημάτων μιας και βοηθά στη διατήρηση των εκτυπωμένων δομών. Ωστόσο, η ζελατίνη δε χρησιμοποιείται αυτοτελώς κατά τη τριδιάστατη εκτύπωση βιολογικών συστημάτων, καθώς η θερμοαντιστρεπτότητά της δημιουργεί δυσκολίες στη βελτιστοποίηση της θερμοκρασίας και του ιξώδους εκτύπωσης. Πολλές εκτυπώσιμες υδρογέλες, όπως η αγαρόζη, διατηρούν τη δομική τους ακεραιότητα μέσω υψηλών συγκεντρώσεων πολυμερών [101]. Όταν στο μελάνι εκτύπωσης περιέχονται και κύτταρα (bioink) τότε το υλικό προς εκτύπωση πρέπει να εμφανίζει μικρό συντελεστή θερμικής αγωγιμότητας ώστε να αποτρέπεται η θερμική καταστροφή των κυττάρων. Επίσης, πρέπει το μελάνι να αντιστέκεται σε έντονα διατμητικά φαινόμενα προς αποφυγήν καταστροφής των κυττάρων [102, 103, 104]. Μια σειρά φυσικών, χημικών και βιολογικών παραμέτρων μπορούν να επηρεάσουν την καταλληλότητα ενός μελανιού για τριδιάστατη εκτύπωση. Οι παράμετροι αυτές περιλαμβάνουν το ιξώδες, το φαινόμενο λέπτυνσης (shear thinning), την ιξωδοελαστικότητα, τη βιοσυμβατότητα, την κινητική πηκτωματοποίησης και το βαθμό ενυδάτωσης του υλικού.

3.1.2. Μέθοδος Χημικής Διασύνδεσης (Cross-Linking)

Πέρα από τα χαρακτηριστικά της εναπόθεσης ενός υλικού, στην κατασκευή ικριωμάτων μέσω τριδιάστατης εκτύπωσης σημαντικό ρόλο διαδραματίζει και η διαδικασία στερεοποίησης του υλικού ώστε να εμφανίζει αυτόνομη δομή (self-standing). Πολλές μέθοδοι έχουν εξετασθεί για τον σκοπό αυτόν, όπως η ξήρανση και η εξάτμιση διαλύτη, ωστόσο για τα οστικά υποκατάστατα αρκετά διαδεδομένη είναι η χημική διασύνδεση (chemical cross-linking) [105].

Ως διασταυρούμενη ή διαμοριακή σύνδεση ορίζεται ο δεσμός που συνδέει τη μία πολυμερική αλυσίδα με την άλλη. Μπορεί να αναφέρεται σε ομοιοπολικούς ή ιοντικούς δεσμούς και τα διασυνδεδεμένα πολυμερή να είναι συνθετικά ή φυσικά, όπως οι πρωτεΐνες. Η σύνδεση των πολυμερών (κολλαγόνο, αργινίνη και χιτοζάνη) μπορεί να

γίνει μέσω μιας χημικής, φυσικής ή ενζυματικής διαδικασίας. Η μέθοδος της χημικής διασύνδεσης στηρίζεται στην κατεργασία με χημικά αντιδραστήρια πρωτεϊνικών δειγμάτων, για τη δημιουργία διασυνδέσεων ανάμεσα σε γειτονικά πρωτεϊνικά μόρια.



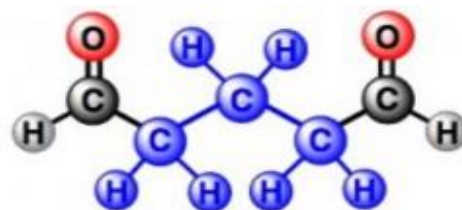
Εικόνα 3.5 Σχηματική απεικόνιση των μεθόδων διαμοριακής διασύνδεσης. Α. χημική διασύνδεση με το μέσο διασύνδεσης να έχει ενσωματωθεί στο δεσμό. Β. χημική διασύνδεσης με το μέσο διασύνδεσης να μην έχει ενσωματωθεί στο δεσμό. Γ. φυσική διασύνδεση. Δ. ενζυματική διασύνδεση [70].

3.1.2.1. Η Γλουταραλδεΐδη (GA) ως χημικός διασυνδέτης μακρομοριακών ενώσεων

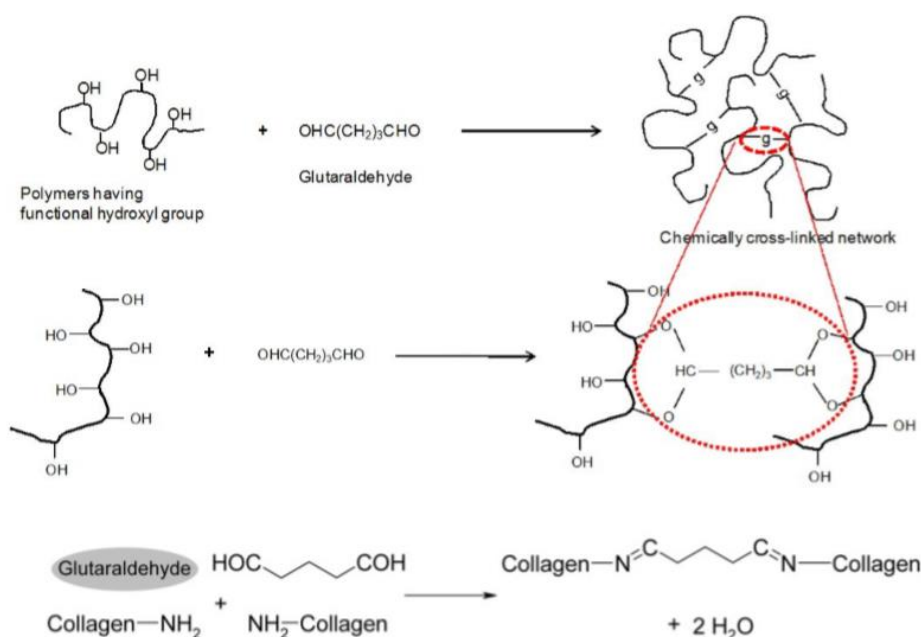
Η γλουταραλδεΐδη (GA) είναι μία οργανική ένωση με χημικό τύπο $\text{CH}_2(\text{CH}_2\text{CHO})_2$. Αποτελεί μία γραμμική αλδεΐδη με 5 άτομα άνθρακα, διαλυτή σε όλες τις αναλογίες σε νερό και αλκοόλες, καθώς και σε οργανικούς διαλύτες [106]. Εντοπίζεται σε τουλάχιστον 13 διαφορετικές μορφές ανάλογα με τις συνθήκες διάλυσης, όπως το pH, τη συγκέντρωση, τη θερμοκρασία κ.λπ. Έχει χρησιμοποιηθεί σε πάρα πολλές εφαρμογές λόγω του χαμηλού της κόστους και της μεγάλης διαθεσιμότητά της σε συνδυασμό με την υψηλή της δραστηριότητα. Αντιδρά ταχύτατα με τις αμινομάδες των πρωτεϊνών σε ουδέτερες τιμές pH [107] και είναι η πιο αποτελεσματική ανάμεσα σε όλες τις αλδεΐδες για τον σχηματισμό θερμικά και χημικά σταθερών διασυνδέσεων [108]. Πράγματι, σε μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στη διασύνδεση κολλαγόνου

με μόνο-αλδεΐδες (φορμαλδεΐδη) και δι-αλδεΐδες με μήκος αλυσίδας από δύο έως έξι άτομα άνθρακα, αποδείχθηκε ότι η μέγιστη δραστηριότητα προήλθε στα πέντε άτομα άνθρακα [109].

Η γλουταραλδεΐδη έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για τη διασύνδεση βιοπολυμερών για ιατρικές εφαρμογές. Ωστόσο, αντιφατικά αποτελέσματα έχουν δημοσιευθεί σχετικά με την κυτταροτοξικότητα των βιοϋλικών που έχουν διασυνδεθεί με γλουταραλδεΐδη. Η γλουταραλδεΐδη εισάγει κυτταροτοξικά μόρια αλδεΐδης στα ικρίωματα που αναπτύσσονται, τα οποία είναι πιθανό να παραμείνουν στο εσωτερικό του υλικού χωρίς να έχουν προσδεθεί, ακόμα και έπειτα από πολλαπλές εκπλύσεις.



Εικόνα 3.6 Χημική δομή της γλουταραλδεΐδης.



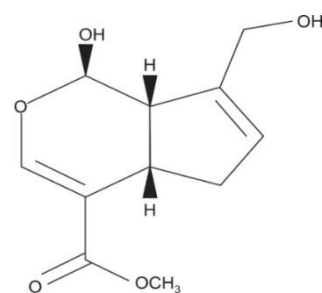
Εικόνα 3.7 Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού αντίδρασης διασύνδεσης της γλουταραλδεΐδης.

Τα τοξικά αυτά υπολείμματα είναι πολύ πιθανό να απελευθερωθούν στον οργανισμό κατά τη διάρκεια της αποικοδόμησης του ικρίωματος και να επιδράσουν αρνητικά στη βιοσυμβατότητα του προϊόντος και κατ' επέκταση στη σωστή λειτουργία του οργανισμού δέκτη. Επιπλέον, η γλουταραλδεΐδη είναι δύσκολα διαχειρίσιμη κατά τη διάρκεια της διασύνδεσης λόγω της έντονης οσμής και πτητικότητάς της. Τα περισσότερα αποτελέσματα χημικής διασύνδεσης με γλουταραλδεΐδη βασίζονται σε *in*

in vitro μελέτες, ενώ η *in vivo* αξιολόγηση των διασυνδεδεμένων υλικών είναι απαραίτητη για την ουσιαστική κατανόηση της κυτταροτοξικότητας και των δυνατοτήτων των υλικών σε ιατρικές εφαρμογές. Ωστόσο, η κυτταροτοξικότητα της γλουταραλδεΐδης εξαρτάται από τη συγκέντρωση που χρησιμοποιείται [110]. Μέχρι και συγκέντρωση 0,05 ppm γλουταραλδεΐδης έχει αποδειχθεί ότι είναι μη-κυτταροτοξική [111,112].

3.1.2.2. Η Γενιπίνη (GN) ως χημικός διασυνδέτης μακρομοριακών ενώσεων

Τα τελευταία χρόνια, ολοένα και αυξανόμενο ενδιαφέρον έχει αποκτήσει για τις εφαρμογές στο χώρο της Ιστικής Μηχανικής, ένας φυσικός πρωτεϊνικός διασυνδέτης, η γενιπίνη. Η γενιπίνη είναι το υδρολυμένο προϊόν του γενιποζίτη (geniposide) των καρπών του φυτού της γαρδένιας, με χημικό τύπο $C_{11}H_{14}O_5$. Η γενιπίνη δημιουργεί σταυροειδείς δεσμούς αυθόρμητα με πρωτεΐνες, κολλαγόνο, ζελατίνη, χιτοζάνη, κ.ά. Για μεγάλο χρονικό διάστημα, η γενιπίνη έχει χρησιμοποιηθεί ως θεραπεία για τη χολόσταση και την ηπατίτιδα στην παραδοσιακή κινεζική ιατρική. Ακόμη έχει χρησιμοποιηθεί ως φυσική χρωστική ουσία [113]. Η ίδια η γενιπίνη δεν έχει χρώμα αλλά δημιουργεί μπλε σωματίδια όταν αντιδρά αυθόρμητα με αμινοξέα και πρωτεΐνες. Πολλές μελέτες έχουν επισημάνει την εξαιρετικά χαμηλή κυτταροτοξικότητα και γονοτοξικότητα της γενιπίνης σε σύγκριση με τη γλουταραλδεΐδη [114,115].

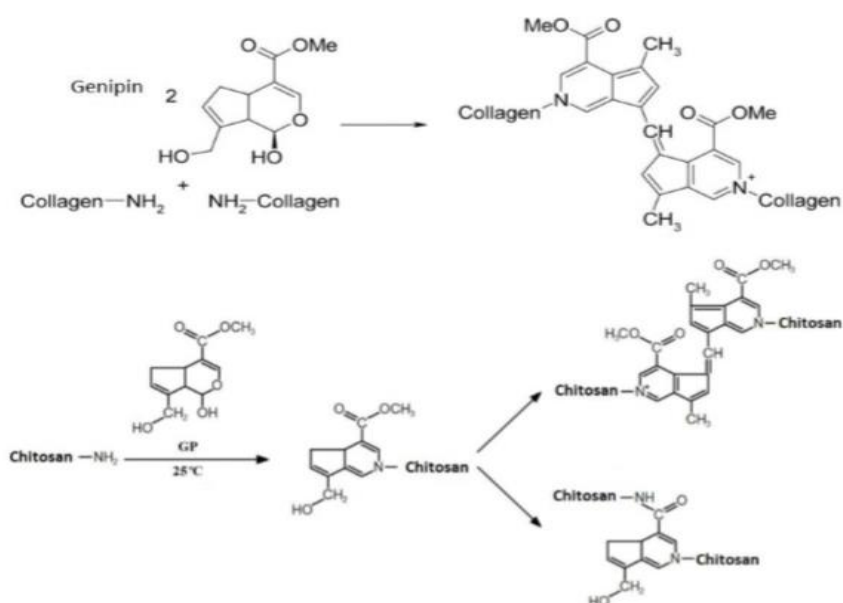


Εικόνα 3.8 Χημική δομή της Γενιπίνης.

Η γενιπίνη αντιδρά ταχύτατα με τις πρωτοταγείς αμίνες παρέχοντας έντονα κυανές χρωστικές. Ο μηχανισμός της αντίδρασης θεωρείται εξαιρετικά πολύπλοκος και δεν έχει διευκρινισθεί πλήρως. Ωστόσο, ο Touyama και οι συνεργάτες του [116] προτείνουν ένα πιθανό μηχανισμό της αντίδρασης της γενιπίνης με μεθυλαμίνη (CH_3NH_2) σε αδρανή ατμόσφαιρα. Σε γενικές γραμμές ο μηχανισμός της αντίδρασης διαφοροποιείται ανάλογα με τις τιμές του pH. Σε όξινες και ουδέτερες τιμές pH, πραγματοποιείται μία πυρηνόφιλη προσβολή (nucleophilic attack) από τις πρωτοταγείς αμίνες στο ολεφινικό άτομο άνθρακα C_3 της γενιπίνης, η οποία οδηγεί σε διάνοιξη του διυδροπυρανικού δακτυλίου. Στη συνέχεια, οι δευτεροταγείς αμίνες προσβάλλουν την αλδεΐδομάδα που μόλις δημιουργήθηκε. Με άλλα λόγια, η γενιπίνη δρα σαν μία διαλδεΐδη, παρ' όλα αυτά τα προϊόντα της είναι πολύ πιο σταθερά σε σύγκριση με αυτά που προκύπτουν από τη διασύνδεση με γλουταραλδεΐδη [117, 118]. Αντίθετα, σε

βασικές τιμές pH, η αντίδραση διάνοιξης του δακτυλίου της γενιπίνης, πραγματοποιείται μέσω πυρηνόφιλης προσβολής των ομάδων του υδροξυλίου προς το σχηματισμό ενδιάμεσων αλδεϋδομάδων, η οποία στη συνέχεια υφίσταται αλδολική συμπύκνωση.

Το τελικό στάδιο για τη διασύνδεση υλικών με γενιπίνη, εικάζεται ότι αποτελείται από το διμερισμό της γενιπίνης μέσω αντίδρασης ριζών. Το προϊόν του διμερισμού μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη ενδομοριακών και διαμοριακών διασυνδέσεων, οι οποίες εμφανίζουν συνδετικές γέφυρες ετεροκυκλικού χαρακτήρα, με όλες τις μακρομοριακές ενώσεις που περιέχουν πρωτοταγείς αμινομάδες.

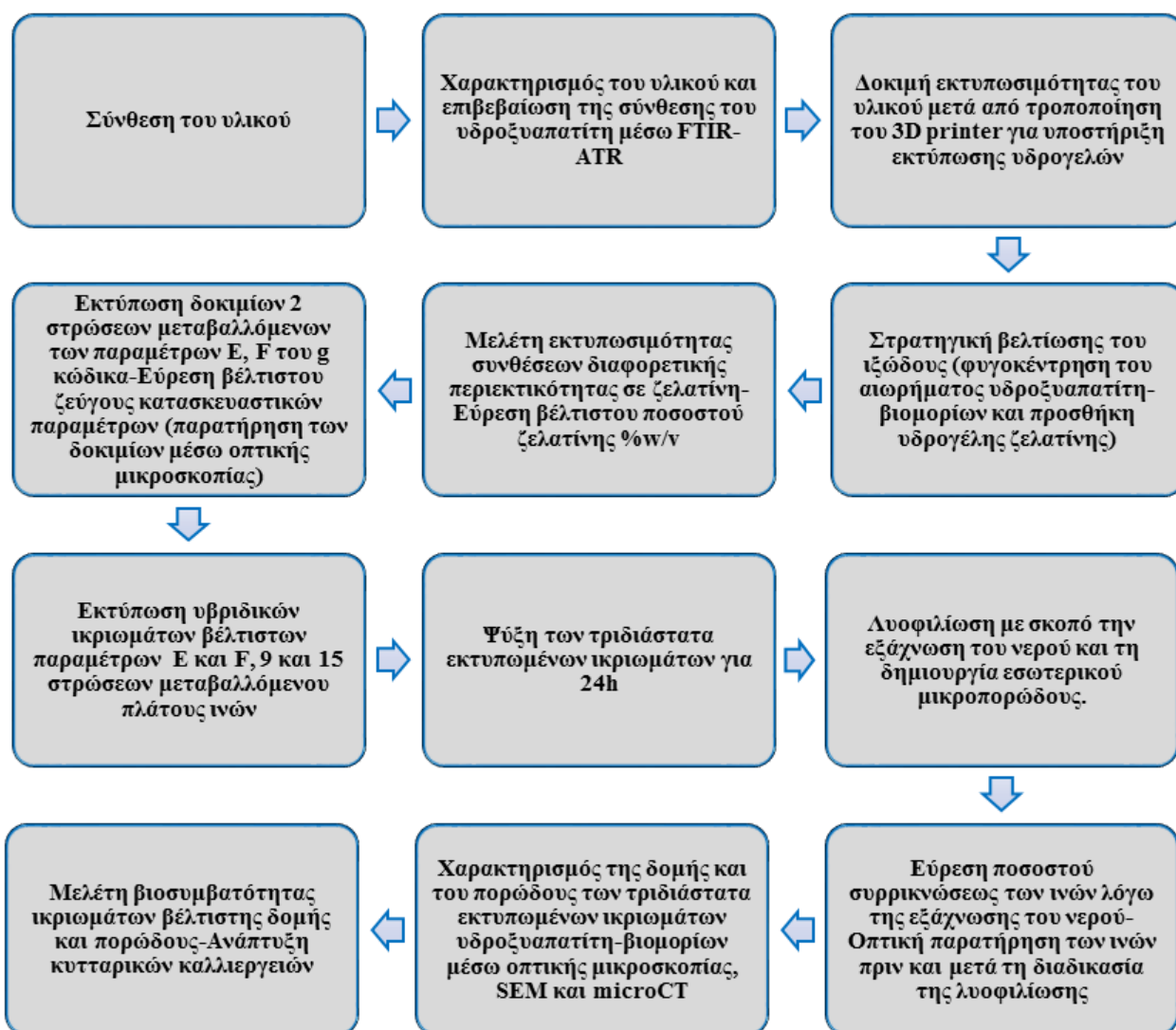


Εικόνα 3.9 Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού αντίδρασης διασύνδεσης της γενιπίνης με τη χιτοζάνη και το κολλαγόνο.

Η ιδιότητα αυτή της γενιπίνης είναι ίσως και η σπουδαιότερη και η πλέον αξιοποιήσιμη στον χώρο της Ιστικής μηχανικής για την κατασκευή βιοσυμβατών εμφυτευσιμων υλικών. Επίσης, η γενιπίνη αποτελεί ένα φυσικό, βιοδιασπώμενο μόριο με ιδιαίτερα χαμηλή τοξικότητα για αυτό και η χρήση της ως χημικός διασυνδέτης αποτελεί μία πολύ ενδιαφέρουσα εναλλακτική, για την αποφυγή των προβλημάτων κυτταροτοξικότητας, που παρουσιάζονται στην περίπτωση της γλουταραλδεϋδης. Στο σημείο αυτό να τονιστεί ένα ακόμα πλεονέκτημα της χρήσης της γενιπίνης, η οποία εμφανίζει αντιμικροβιακές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι βακτηριακές μολύνσεις, αποτελούν την κυριότερη αιτία για την απόρριψη ενός εμφυτεύματος από τον οργανισμό.

B. Πειραματικό Μέρος

Διάγραμμα ροής πειραματικού μέρους



4. Παρασκευή Αιωρημάτων Υδροξυαπατίτη Παρουσία Βιομορίων

4.1. Πειραματικός εξοπλισμός

Η ανάμειξη των πρόδρομων αιωρημάτων φωσφορικού οξέος-χιτοζάνης και φωσφορικού οξέος-κολλαγόνου καθώς και του υδατικού αιωρήματος υδροξειδίου του ασβεστίου πραγματοποιήθηκε με τη χρήση διασπορέα τύπου IKA T25 digital ULTRA-TURRAX (Germany). Η ανάδευση κατά τη διάρκεια της αντίδρασης των πρόδρομων διαλυμάτων έλαβε χώρα με μαγνητικό αναδευτήρα τύπου VELP Scientifica (Italy) μέσα σε αυτοσχέδιο υδατικό λουτρό. Η θερμοκρασία του λουτρού ρυθμίζεται μέσω

θερμομέτρου, το οποίο βρίσκεται διαρκώς βυθισμένο στο λουτρό. Καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων η μάζα των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν καθορίστηκε με ζυγό METTLER TOLEDO ME204, ακρίβειας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων.

4.2. Περιγραφή ανάπτυξης αιωρημάτων υδροξυαπατίτη

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η βιομιμητική σύνθεση ναοκρυστάλλων υδροξυαπατίτη με στόχο την αυξημένη βιοσυμβατότητα και βιοδραστικότητα, ώστε να είναι σε θέση να διεγείρουν την κυτταρική απόκριση και την οστική ανάπλαση.

Απαραίτητη προϋπόθεση για τη μίμηση του περιβάλλοντος στο οποίο πραγματοποιείται η φυσική διαδικασία ανάπτυξης των φωσφορικών αλάτων του ασβεστίου είναι η παρουσία βιοπολυμερών, όπως είναι το κολλαγόνο (Col) και η χιτοζάνη (Chit). Η βιομιμητική προσέγγιση στην παρασκευή των βιοαλάτων που ακολουθήθηκε, στοχεύει στην παραγωγή τελικού προϊόντος, που να μιμείται καλύτερα τις ιδιότητες των οστών (δομή, μηχανικές ιδιότητες και βιοαποικοδομησιμότητα). Η χρησιμοποιούμενη τεχνική συνδυάζει τη μέθοδο της χημικής καταβύθισης με την τεχνική λύματος-πηκτής (sol-gel), μιας και το τελικό παραγόμενο προϊόν που προκύπτει δεν είναι ίζημα, αλλά αιώρημα. Η σύνθεση των κρυστάλλων του υδροξυαπατίτη έγινε παρουσία του βιομορίου αργινίνης (Arg), που περιέχει συγκεκριμένα κατάλοιπα αμινοξέων, τα οποία όπως έχει διαπιστωθεί βιβλιογραφικά ενισχύουν σημαντικά την κυτταρική διασύνδεση, ανάπτυξη και διαφοροποίηση στις επιφάνειες του υλικού, ενώ παράλληλα ενισχύουν τον σχηματισμό ναοκρυστάλλων υδροξυαπατίτη [119]. Η συγκεκριμένη υβριδική τεχνική παρουσιάζει πλεονεκτήματα ως προς την παραγωγή ελεγχόμενων δομών που προσεγγίζουν τη δομή του βιοαπατίτη των οστών με χρήση σχετικά απλών αντιδραστηρίων, την ευκολότερη και οικονομικότερη παραγωγή προϊόντος σε σύγκριση με άλλες μεθόδους και την παραγωγή τελικού βιοσυμβατού προϊόντος.

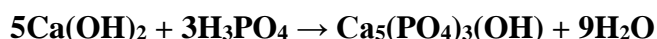
Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση του υδροξυαπατίτη είναι τα εξής:

- Διάλυμα ορθοφωσφορικού οξέος (H_3PO_4) 85%, το οποίο λειτουργεί σαν πηγή ιόντων φωσφόρου. Το ορθοφωσφορικό οξύ χρησιμοποιείται επίσης για τη

διάλυση του βιοπολυμερούς κολλαγόνου καθώς και της χιτοζάνης, η οποία διαλύεται μόνο σε όξινα διαλύματα..

- Υδροξείδιο του ασβεστίου ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), σαν πηγή ιόντων ασβεστίου.

Μέσα στο διάλυμα πραγματοποιείται εξουδετέρωση της βάσης και του οξέος με παραγωγή νερού και φωσφορικού άλατος του ασβεστίου (υδροξυαπατίτη), σύμφωνα με την αντίδραση:



Οι συγκεντρώσεις των πρόδρομων αντιδραστηρίων υπολογίστηκαν έτσι ώστε να ισχύουν οι μοριακές αναλογίες $\text{Ca}/\text{P} = 10/6 = 1,67$ για τη σύνθεση με τη χιτοζάνη και 1/1 για τη σύνθεση με το κολλαγόνο καθώς έχει αποδειχθεί πως η περίσσεια φωσφορικού οξέος επιδρά στην καλύτερη διάλυση του κολλαγόνου , [105].

Στη συνέχεια, υπολογίστηκε η επιθυμητή συγκέντρωση του βιοπολυμερούς σε σχέση με την επιθυμητή τελική ποσότητα υδροξυαπατίτη. Η αναλογία μαζών υδροξυαπατίτη/βιοπολυμερές που επιλέχθηκε ήταν η αναλογία 70/30, αναλογία που απαντάται στο φυσικό οστό. Αναφορικά με το ορθοφωσφορικό οξύ, σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα, επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί τελική συγκέντρωση 0,06 M. Τέλος, υπολογίστηκε η συγκέντρωση της L-αργινίνης με βάση τη μοριακή αναλογία $\text{Ca}^{2+}/\text{αμινοξύ} = 1:1$, τόσο για το αιώρημα υδροξυαπατίτη- κολλαγόνου-αργινίνης όσο και για το αιώρημα υδροξυαπατίτη-χιτοζάνης-αργινίνης [119].

Παρακάτω παρατίθενται αναλυτικά οι υπολογισμοί για τον καθορισμό όλων των παραμέτρων της σύνθεσης των κρυστάλλων του υδροξυαπατίτη.

Μοριακό βάρος H_3PO_4 : $MW = 98 \text{ g/mol}$

Πυκνότητα H_3PO_4 : $\rho = 1,689 \text{ g/ml}$

Μοριακό βάρος $\text{Ca}(\text{OH})_2$: $MW = 74,10 \text{ g/mol}$

Μοριακό βάρος HAP : $MW = 502,31 \text{ g/mol}$

Μοριακό βάρος Arg : $MW = 174,2 \text{ g/mol}$

Αρχικά υπολογίστηκε η ποσότητα ορθοφωσφορικού οξέος (H_3PO_4) με βάση τη μοριακή αναλογία $\text{Ca/P} = 10/6$, θέτοντας ως άγνωστο a τον αρχικό όγκο (mL) του διαλύματος ορθοφωσφορικού οξέος που χρησιμοποιήθηκε.

$$a \text{ ml } \text{H}_3\text{PO}_4 \rightarrow \frac{0,85 \cdot a \cdot 1,689}{98} = 0,014649 \cdot a \text{ mol} = n_1$$

Έστω n_2 τα moles του υδροξειδίου του ασβεστίου:

$$n_2 = n_1 \cdot 1,67 = 0,024465 \cdot a \text{ mol} \text{ και}$$

$$m_{\text{Ca}} = n_2 \cdot 74,10 = 1,8128 \cdot a \text{ g } \text{Ca(OH)}_2$$

Έστω n_3 τα moles του υδροξυαπατίτη. Σύμφωνα με τον μοριακό του τύπο ισχύει ότι:

$$n_3 = \frac{n_1}{3} \text{ ή } \frac{n_2}{5}$$

Επομένως η μάζα του υδροξυαπατίτη:

$$m_{\text{Hap}} = 0,00489 \cdot a \cdot 502,31 = 2,4578 \cdot a \text{ g}$$

Με βάση την αναλογία μαζών $\text{HAP/βιοπολυμερούς} = 70/30$ μπορεί να υπολογιστεί η μάζα του αντίστοιχου βιοπολυμερούς είτε κολλαγόνου ή χιτοζάνης που θα προστεθεί στην εκάστοτε περίπτωση.

$$m_{70/30} = 1,0533 \cdot a \text{ g πολυμερούς}$$

Στη συνέχεια, βάσει τη μοριακή αναλογία $\text{Ca}^{2+}:\text{Arg} = 1:1$ καθορίζονται τα moles και κατ' επέκταση η μάζα της L-αργινίνης.

$$n_{\text{Arg}} = n_2, \text{ άρα}$$

$$m_{\text{Arg}} = 0,024465 \cdot a \cdot 174,2 = 4,2618 \cdot a \text{ g}$$

Ο όγκος του τελικού διαλύματος μπορεί να υπολογιστεί εάν είναι γνωστή η τελική συγκέντρωση του ορθοφωσφορικού οξέος στο διάλυμα (y) καθώς και ο αρχικός όγκος του διαλύματος ορθοφωσφορικού οξέος από την παρακάτω σχέση:

$$V_{\text{ολ}} = \frac{14,649 \cdot a}{y}$$

Ακολουθήθηκε σύνθεση στην οποία ο όγκος του διαλύματος του ορθοφωσφορικού οξέος να είναι ίσος με τον όγκο του αιωρήματος του υδροξειδίου του ασβεστίου και διπλάσιος από τον όγκο του διαλύματος της αργινίνης. Επομένως, ισχύει:

$$V_P = V_{Ca} = 2 * V_{Arg}$$

$$\text{με } V_{Arg} = V_{ολ}/5$$

Για μοριακή αναλογία **Ca/P = 1/1** που αναφέρεται στο αιώρημα υδροξυαπατίτη-κολλαγόνου-αργινίνης ισχύει:

- Συγκέντρωση ορθοφωσφορικού οξέος **C = 0,06M** και **V_{ολ} = 144,5 mL**
- Διάλυμα ορθοφωσφορικού οξέος: **1 mL H₃PO₄ + 56,8 mL H₂O**
- Αιώρημα υδροξειδίου του ασβεστίου: **1,0743 g Ca(OH)₂ + 57,8 ml H₂O**
- Διάλυμα αργινίνης: **m_{Arg} g Arg + 28,9 ml H₂O**
- Περιεκτικότητα σε αργινίνη:
- **Ca²⁺:Arg = 1:1 → m_{Arg} = 2,5259 g Arg**
- Περιεκτικότητα σε κολλαγόνο:
- **HAP/κολλαγόνο = 70/30 → m_{Col} = 0,6223 g Col**

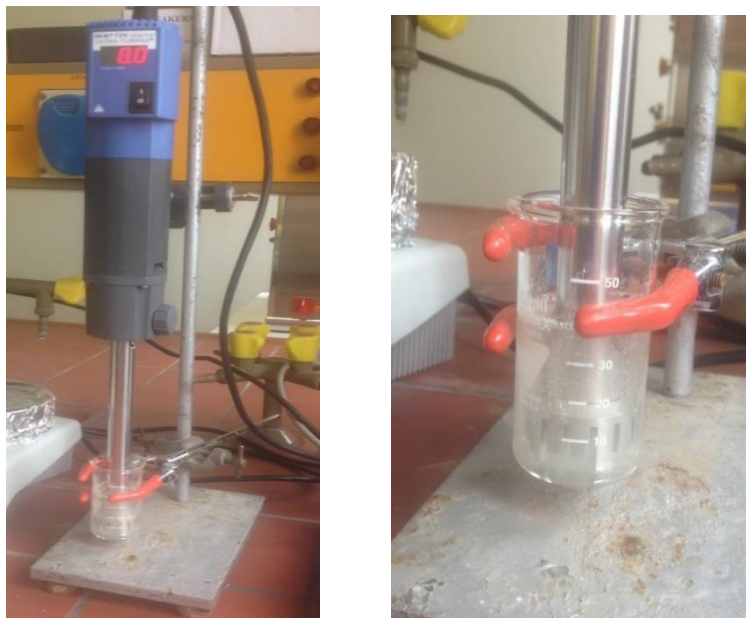
Για μοριακή αναλογία **Ca/P = 10/6** που αναφέρεται στο αιώρημα υδροξυαπατίτη-χιτοζάνης-αργινίνης ισχύει:

- Συγκέντρωση ορθοφωσφορικού οξέος **C = 0,06M** και **V_{ολ} = 146,49 mL**
- Διάλυμα ορθοφωσφορικού οξέος: **0,6 mL H₃PO₄ + 58 mL H₂O**
- Αιώρημα υδροξειδίου του ασβεστίου: **1,0877 g Ca(OH)₂ + 58,6 ml H₂O**
- Διάλυμα αργινίνης: **m_{Arg} g Arg + 29,3 ml H₂O**
- Περιεκτικότητα σε αργινίνη:
- **Ca²⁺:Arg = 1:1 → m_{Arg} = 2,5259 g Arg**
- Περιεκτικότητα σε χιτοζάνη:
- **HAP/χιτοζάνη = 70/30 → m_{Chit} = 0,632 g Chit**

4.3. Πειραματική διαδικασία - παρασκευή αιωρημάτων υδροξυαπατίτη-χιτοζάνης

➤ Χιτοζάνη

Αρχικά, για την παρασκευή του αιωρήματος υδροξυαπατίτη-χιτοζάνης-αργινίνης παρασκευάζεται το υδατικό διάλυμα ορθοφωσφορικού οξέος τοποθετώντας σε ένα



Εικόνα 4.1 Πειραματική διάταξη διάλυσης της χιτοζάνης στο υδατικό διάλυμα ορθοφωσφορικού οξέος.

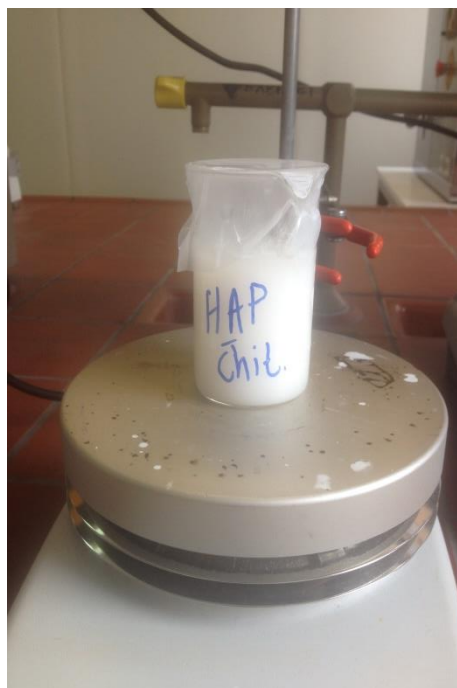
ποτήρι ζέσεως τους κατάλληλους όγκους οξέος και απιονισμένου νερού. Το υδατικό διάλυμα παραμένει υπό μαγνητική ανάδευση καθ' όλη τη διάρκεια ζύγισης της επιθυμητής ποσότητας χιτοζάνης. Το πολυμερές της χιτοζάνης προστίθεται στο υδατικό διάλυμα ορθοφωσφορικού οξέος και διαλύεται σε αυτό υπό έντονη ανάδευση με χρήση διασπορέα υψηλών ταχυτήτων. Το διάλυμα χιτοζάνης υφίσταται ανάδευση για μία μισή ώρα σε 8.000-8.500 rpm έως ότου δημιουργηθεί ένα διαυγές διάλυμα, με ελαφρώς παχύρρευστη υφή. Η ταχύτητα ανάδευσης αυξομειώνεται καθ' όλη τη διάρκεια διεξαγωγής της πειραματικής διαδικασίας ώστε να υπάρχει έλεγχος της θερμοκρασίας του διαλύματος.

Κατά τη διάρκεια διάλυσης της χιτοζάνης στο υδατικό διάλυμα ορθοφωσφορικού οξέος ζυγίζονται οι απαραίτητες ποσότητες L-αργινίνης και υδροξειδίου του ασβεστίου ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) και παρασκευάζονται τα αντίστοιχα υδατικά διαλύματα-αιωρήματα. Το αιώρημα του υδροξειδίου του ασβεστίου παράγεται με έντονη ανάδευση του στερεού υδροξειδίου σε συγκεκριμένη ποσότητα νερού με τη χρήση του διασπορέα, με ρυθμό

ανάδευσης 6.000 rpm και διατήρηση του αιωρήματος υπό ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος ώστε να παραμείνει το αιώρημα ομοιογενές και να διατηρηθεί σε αιώρηση το υδροξείδιο.

Παράλληλα, παρασκευάζεται το διάλυμα της L-αργινίνης με ανάδευση της επιθυμητής ποσότητας της σκόνης της αργινίνης με χρήση μαγνητικού αναδευτήρα μέσα σε ορισμένη ποσότητα απιονισμένου νερού. Το διάλυμα θερμαίνεται στους 37-40 °C και ελέγχεται διαρκώς με τη χρήση θερμομέτρου που βρίσκεται βυθισμένο στο αυτοσχέδιο λουτρό. Έτσι, επιτυγχάνεται η προσομοίωση των θερμοκρασιακών συνθηκών με εκείνων του ανθρώπινου σώματος.

Στη συνέχεια, το διάλυμα ορθοφωσφορικού οξέος-χιτοζάνης, προστίθεται στάγδην ταυτόχρονα με το αιώρημα του υδροξειδίου του ασβεστίου μέσα στο διάλυμα της αργινίνης που αποτελεί και το «περιβάλλον» σχηματισμού του υδροξυαπατίτη. Το αιώρημα του υδροξυαπατίτη που αναπτύσσεται παρουσία των πολυμερών, παραμένει υπό ανάδευση για 24 ώρες.

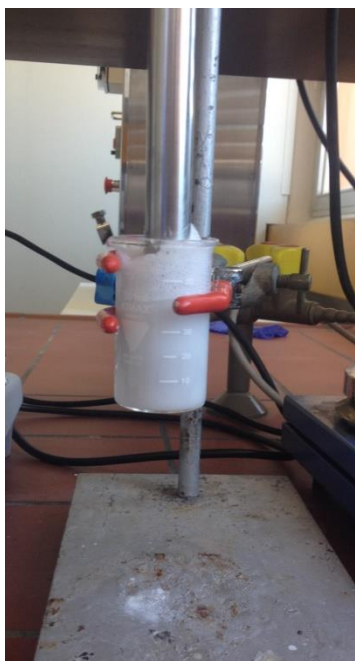


Εικόνα 4.2 αριστερά: σχηματισμός υδροξυαπατίτη, δεξιά: γήρανση του αιωρήματος υδροξυαπατίτη-χιτοζάνης-αργινίνης.

➤ Κολλαγόνο

Η πειραματική διαδικασία για την παρασκευή αιωρήματος υδροξυαπατίτη-κολλαγόνου-αργινίνης διαφέρει ως προς τη διαδικασία παρασκευής του αιωρήματος

υδροξυαπατίτη-χιτοζάνης-αργινίνης μόνο ως προς τον απαιτούμενο χρόνο ανάδευσης του κολλαγόνου στο υδατικό διάλυμα ορθοφωσφορικού οξέος. Πιο συγκεκριμένα, για το κολλαγόνο απαιτούνται 2 ώρες ανάδευσης για την επίτευξη τελικά ενός παχύρευστου αιωρήματος.



Εικόνα 4.3 αριστερά: πειραματική διάταξη διάλυσης του κολλαγόνου στο διάλυμα ορθοφωσφορικού οξέος, δεξιά: γήρανση του αιωρήματος υδροξυαπατίτη-κολλαγόνου-αργινίνης.

5. Ανάπτυξη τριδιάστατων υβριδικών ικριωμάτων υδροξυαπατίτη-βιομορίων μέσω της τριδιάστατης εκτύπωσης

Τα ικριώματα που προορίζονται για οστική αποκατάσταση πρέπει να παρουσιάζουν διπλή κατανομή πόρων για τη διέλευση και προσκόλληση κυττάρων αλλά και τη διέλευση θρεπτικού υλικού. Το απαραίτητο μακροπορώδες των ικριωμάτων της παρούσας εργασίας επιτυγχάνεται μέσω της τριδιάστατης εκτύπωσης (3D printing) ενώ το μικροπορώδες με τη μέθοδο της λυοφιλίωσης (freeze drying).

5.1. Πειραματικός εξοπλισμός

Αρχικά, η φυγοκέντρωση των αιωρημάτων έλαβε χώρα σε φυγόκεντρο HERMLE Labortechnik Z 366. Για την τριδιάστατη εκτύπωση των ικριωμάτων έγινε χρήση εκτυπωτή ZMorph 2.0 S (Poland). Ο τριδιάστατος εκτυπωτής διαθέτει πολλές λειτουργίες ανάλογα με την κεφαλή που τοποθετείται και συνδέεται. Για τη συγκεκριμένη εργασία χρειάστηκε τροποποίηση του τριδιάστατου εκτυπωτή ώστε να

υποστηρίζει την εκτύπωση υδρογελών. Στην κεφαλή εκτύπωσης ρευστών υλικών που διαθέτει ο εκτυπωτής προσαρμόστηκε σύριγγα 10mL με ακροφύσιο διαμέτρου 600 μm



Εικόνα 5.1 αριστερά: εργαστηριακός εξοπλισμός φυγοκέντρησης, δεξιά: εργαστηριακός εξοπλισμός οπτικού μικροσκοπίου.



Εικόνα 5.2 εργαστηριακός εξοπλισμός λυοφιλίωσης (δεξιά) και τριδιάστατου εκτυπωτή προσαρμοσμένου για την εκτύπωση υδρογελών (αριστερά).

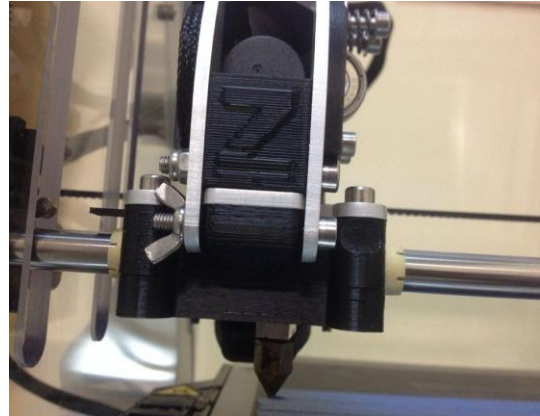
και μήκους 12 mm. Τα δείγματα μετά από κάθε εκτύπωση παρατηρήθηκαν μέσω του οπτικού μικροσκοπίου ZEISS Imager.A2m. Τέλος, η λυοφιλίωση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του μοντέλου CHRIST ALPHA 1-4 B. Braun Biotech International.

5.2. Τροποποίηση 3D printer για υποστήριξη εκτύπωσης υδρογελών

Παρακάτω παρατίθενται αναλυτικά τα βήματα για την τροποποίηση του ZMorph 2.0 S ώστε να υποστηρίζει την εκτύπωση των υδρογελών που έχουν παρασκευασθεί:

1. Αφαιρείται το μπροστινό κέλυφος του εκτυπωτή, αφού ξεβιδωθούν οι 6 βίδες που το συγκρατούν.

2. Προαιρετικά, μπορεί να αφαιρεθεί το θερμοπλαστικό νήμα από την κεφαλή extruder.
3. ΠΡΟΣΟΧΗ: Βεβαιωνόμαστε ότι ο εκτυπωτής δε διαρρέεται από ρεύμα (ο διακόπτης πρέπει να είναι κλειστός).
4. Αφαίρεση της κύριας βίδας (που συγκρατείται με παξιμάδι πεταλούδα) που συγκρατεί την κεφαλή στο εργαλειοφορείο του X άξονα (εικ. 5.3).
5. Αφαίρεση των βυσμάτων χαμηλής και υψηλής ισχύος που τροφοδοτούν με ρεύμα την κεφαλή, όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.



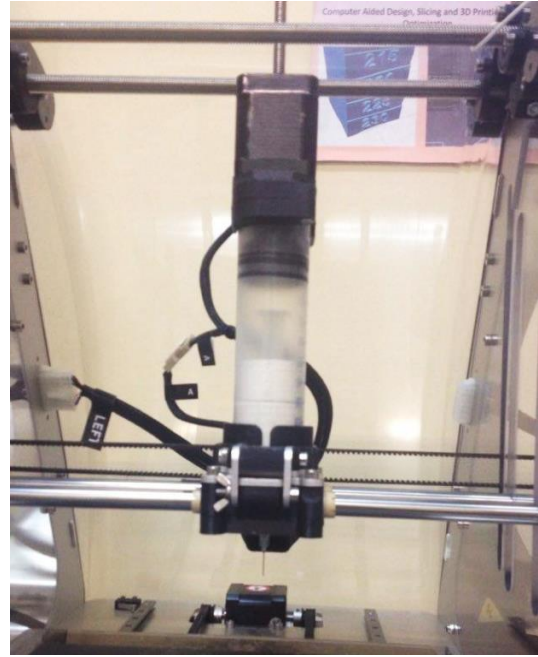
Εικόνα 5.3 Κύρια βίδα (με παξιμάδι πεταλούδα) συγκράτησης της κεφαλής στον τριδιάστατο εκτυπωτή.



Εικόνα 5.4 αριστερά: βίσμα υψηλής ισχύος, δεξιά: βίσμα χαμηλής ισχύος.

6. Προσεκτική αφαίρεση της υπάρχουσας κεφαλής.
7. Τοποθέτηση της σύριγγας στην κεφαλή κινούμενου εμβόλου και προσαρμογή της βάσης που «κουμπώνει» στο εργαλειοφορείο.
8. Τοποθέτηση της κεφαλής στο εργαλειοφορείο, επανατοποθέτηση των βυσμάτων χαμηλής και υψηλής ισχύος. Προσοχή στην σωστή σύνδεσή τους (αν συνδεθούν ανάποδα θα προκαλέσουν βλάβη στην κεφαλή).
9. Επανατοποθέτηση της κύριας βίδας (βήμα 2) που συγκρατεί την κεφαλή.
10. Άνοιγμα του εκτυπωτή και σύνδεση με το Host λογισμικό (Voxelizer).

11. Επιλέγεται ως ροή εργασιών η επιλογή ceramics (Voxelizer→Workflow→ceramics).
12. Φόρτωση του g-κώδικα στο λογισμικό. Βαθμονόμηση X και Y άξονα.
13. Τοποθέτηση και στερέωση τρυβλίου Petri σε κατάλληλη θέση έτσι ώστε να συμπίπτει με τη θέση εκτύπωσης της υδρογέλης. Δίνουμε εντολή μέσω του Voxelizer για την μετακίνηση της κεφαλής πάνω από το τρυβλίο.
14. Προσαρμογή του Z-endstop ψηλότερα, δηλαδή του σημείο με το οποίο έρχεται σε επαφή ο τερματικός διακόπτης του z-άξονα για να σταματήσει η κίνηση, ώστε το άκρο της σύριγγας να βρίσκεται 2 cm πάνω από την επιφάνεια του τρυβλίου. Εκτελούμε επαναλαμβανόμενη βαθμονόμηση του Z άξονα μέσω του λογισμικού, κατεβάζοντάς κάθε φορά λίγα χιλιοστά το Z-endstop, μέχρι το άκρο της σύριγγας να φτάσει 1 mm πάνω από την επιφάνεια του τρυβλίου.



Εικόνα 5.5 Τελική συνδεσμολογία για την κεφαλή εκτύπωσης υδρογελών.

ΠΡΟΣΟΧΗ: Απότομες μεταβολές του ύψους του Z-endstop μπορεί να προκαλέσουν πρόσκρουση της βελόνας της σύριγγας στο τρυβλίο και βλάβη στην κεφαλή.

15. Στο λογισμικό Voxelizer Play→Print για εκκίνηση της εκτύπωσης.
16. Προσαρμόζουμε κατάλληλα το ύψος του Z-endstop (με πολύ μικρές μεταβολές), μέχρι να επιτευχθεί η βέλτιστη πρόσφυση του υλικού εκτύπωσης πάνω στην επιφάνεια του τρυβλίου και να σχηματιστεί ένα συνεχόμενο μοτίβο.

Σημείωση: Σε ενδεχόμενη μη ορθή λειτουργία, πατάμε τα κουμπιά Pause και Reset από το panel του εκτυπωτή, για διακοπή της λειτουργίας και επανεκκίνηση.

5.3. Επίτευξη κατάλληλης ρεολογικής συμπεριφοράς για τριδιάστατη εκτύπωση ικριωμάτων από υβριδικές υδρογέλες

Η τριδιάστατη εκτύπωση προϋποθέτει κατάλληλη ρεολογική συμπεριφορά του υλικού προς εκτύπωση. Οι υδρογέλες χιτοζάνης και κολλαγόνου που

παρασκευάστηκαν, δεν ήταν ικανές να αποτελέσουν αυτόνομα μελάνια εκτύπωσης μιας και το ακροφύσιο εκτύπωσης μικρής διαμέτρου που απαιτείται για την απόδοση της μικροδομής ασκεί έντονες διατμητικές τάσεις στο υλικό. Οι τάσεις αυτές προκαλούν διαχωρισμό φάσης του υλικού αναγκάζοντας το νερό να εξέλθει πρώτο από το ακροφύσιο και αποτρέποντας την ομαλή διέλευση του συστήματος υδροξυαπατίτη-βιοπολυμερές-αργινίνη. Παράλληλα, αν το προκύπτον πειραματικά αιώρημα φυγοκεντρηθεί τόσο ώστε να περιέχει όσο το δυνατόν λιγότερο νερό, τότε το υλικό που προκύπτει μετά τη φυγοκέντρωση είναι σε μορφή πάστας υψηλού ιξώδους με αποτέλεσμα να μην είναι εκτυπώσιμο.

Εξετάσθηκαν διάφορες συστάσεις ζελατίνης-αιωρήματος υδροξυαπατίτη-χιτοζάνης-αργινίνης και οι βέλτιστες τιμές αποτέλεσαν σημείο αναφοράς για το σύστημα ζελατίνη-αιώρημα υδροξυαπατίτη-κollaγόνο-αργινίνη. Αρχικά, εξετάσθηκαν διάφορες περιεκτικότητες ζελατίνης σε υδατικό διάλυμα, με σκοπό την εύρεση της περιεκτικότητας που παρουσιάζει τη βέλτιστη συμπεριφορά κατά την τριδιάστατη εκτύπωση. Οι δοκιμές περιλάμβαναν περιεκτικότητες ζελατίνης **4% w/v**, **6% w/v** και **8% w/v**. Οι υπολογισμοί των διαλυμάτων παρουσιάζονται αναλυτικά παρακάτω, θέτοντας ως άγνωστο x την ποσότητα ζελατίνης σε g που απαιτείται για την παρασκευή υδατικού διαλύματος ζελατίνης όγκου 25mL.

➤ **4% w/v**

$$m_{Gel} = 0,04 * V_{H_2O} = 1 \text{ g Gel}$$

➤ **6% w/v**

$$m_{Gel} = 0,06 * V_{H_2O} = 1,5 \text{ g Gel}$$

➤ **8% w/v**

$$m_{Gel} = 0,08 * V_{H_2O} = 2 \text{ g Gel}$$

Η βέλτιστη περιεκτικότητα ζελατίνης βρέθηκε να είναι η **6% w/v** και χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη διαφόρων συστάσεων ζελατίνης-αιωρήματος HAP-χιτοζάνης. Η υδρογέλη ζελατίνης λειτουργεί ως φορέας του αιωρήματος υδροξυαπατίτη. Συνεπώς, εξετάσθηκαν συστάσεις 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% $V_{\text{αιωρήματος}}/V_{\text{συστήματος Gel-HAp-Chit}}$, ώστε η τελική σύνθεση που θα αποτελέσει το μελάνι

εκτύπωσης να περιέχει όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ποσότητα αιωρήματος HAP-χιτοζάνης και παράλληλα να είναι εκτυπώσιμο. Επιλέχθηκε ο τελικός όγκος του υλικού προς εκτύπωση να είναι $V_{\text{τελ}} = 20 \text{ mL}$, έτσι ώστε κάθε παρτίδα υλικού να επαρκεί σε ποσότητα για το σετ διαφορετικών πειραμάτων που απαιτούνται.

Το αιώρημα HAP-χιτοζάνης περιέχει συνολικό όγκο νερού $V_1 = 72,95 \text{ mL}$ και θεωρείται σχεδόν ίσο με τον συνολικό όγκο του αιωρήματος για τους υπολογισμούς που παρατίθενται στη συνέχεια. Έστω z η επιθυμητή περιεκτικότητα αιωρήματος HAP-χιτοζάνης στην τελική σύνθεση, τότε:

$$z = \frac{V_1}{V_{\text{τελ}}} * 100\%$$

Από την παραπάνω σχέση υπολογίζεται ο όγκος του αιωρήματος που απαιτείται για κάθε σύσταση. Στις τελικές συνθέσεις απαιτείται 6% w/v περιεκτικότητα ζελατίνης. Επομένως, η απαραίτητη ποσότητα ζελατίνης είναι ίδια για κάθε σύσταση και ίση με:

$$m_{\text{Gel}} = 0,06 * 20 = 1,2 \text{ g Gel}$$

Ο όγκος του νερού που προστίθεται για τη διάλυση της ζελατίνης είναι κάθε φορά ίσος με:

$$V_2 = V_{\text{τελ}} - V_1$$

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται οι τιμές που προκύπτουν από τους υπολογισμούς για την κάθε σύσταση.

Σύσταση (%v/v)	Όγκος αιωρήματος HAP-χιτοζάνη (mL)	Όγκος νερού που προστίθεται (mL)	Ποσότητα ζελατίνης (g)
10	2	18	1,2
20	4	16	1,2
30	6	14	1,2
40	8	12	1,2
50	10	10	1,2
60	12	8	1,2
70	14	6	1,2
80	16	4	1,2
90	18	2	1,2

Η παρασκευή του υλικού ζελατίνης-υδροξυαπατίτη-χιτοζάνης διαφόρων συστάσεων έχει ως αρχικό στάδιο τη διάλυση απαραίτητης ποσότητας ζελατίνης σε ογκομετρημένο απιονισμένο νερό υπό συνεχή μαγνητική ανάδευση μέσα σε λουτρό σταθερής θερμοκρασίας. Η θερμοκρασία του νερού πριν την προσθήκη της ζελατίνης πρέπει να είναι 40 °C [120] και να διατηρείται σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια διάλυσης της ζελατίνης. Στη συνέχεια, προστίθεται κατάλληλη ποσότητα αιωρήματος και το σύστημα αναδεύεται έντονα με τη χρήση διασπορέα για 10 min. Το προκύπτον υλικό ψύχεται για μισή ώρα στους 5 °C ώστε η ζελατίνη να δράσει και να πηκτωματοποιηθεί το σύστημα. Αφήνεται, έπειτα, σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου φτάσει τους 20 °C, θερμοκρασία στην οποία εξετάστηκε πως είναι εκτυπώσιμο.

Τα τριδιάστατα ικρίωματα υδροξυαπατίτη-βιομορίων απαιτούν υψηλές μηχανικές αντοχές και ελεγχόμενο πορώδες, επομένως δεν πρέπει να περιέχουν μεγάλη ποσότητα νερού. Επίσης, ακόμα και μετά τη λυοφιλίωση, η όποια τριδιάστατη δομή έχει προκύψει κατά την τριδιάστατη εκτύπωση καταρρέει και καταστρέφεται. Έτσι, έγινε φυγοκέντρηση του αιωρήματος υδροξυαπατίτη-χιτοζάνη-αργινίνη με μοριακή αναλογία Ca^{2+} /αμινοξύ (L-αργινίνη) 1:1 ώστε να απομακρυνθεί μεγάλη ποσότητα νερού, όχι όμως όλη. Για τη δημιουργία ικρίωμάτων με πορώδες δίκτυο απαιτείται η ύπαρξη νερού πριν τη διαδικασία της λυοφιλίωσης, ωστόσο περιορισμένου όγκου, μιας και μεγάλες τιμές μπορούν να οδηγήσουν σε κατάρρευση των δειγμάτων στο στάδιο της λυοφιλίωσης. Επιλέχθηκε, λοιπόν, φυγοκέντρηση **4 min** με ταχύτητα **8000 rpm** και επιτάχυνση **5 acc/dec** με αποτέλεσμα να απομακρυνθούν **60 mL νερού**. Συνεπώς, ο όγκος νερού που απέμεινε στο αιώρημα ήταν ίσος με **72,95-60 = 13 mL νερού**. Ο όγκος του νερού που απομακρύνεται μεταβάλλεται ελαφρώς για κάθε σετ πειραμάτων, παρόλα αυτά η ποσότητα της ζελατίνης που προστίθεται αναφέρεται πάντα σε % w/v νερού έτσι ώστε να εξασφαλίζεται η εκτυπωσιμότητα κάθε παρτίδας υλικού.

Επιλέχθηκε η περιεκτικότητα σε ζελατίνη να παραμείνει 6% w/v καθώς τα υλικά εμφάνισαν τις καλύτερες ρεολογικές ιδιότητες στη σύσταση αυτή. Για τη διάλυσή της απαιτήθηκε όγκος νερού ίσος με 2 mL επομένως συνολικά το υλικό περιέχει **15mL νερού**. Ο υπολογισμός της απαιτούμενης μάζας ζελατίνης για να επιτευχθεί το 6% w/v δίνεται από τη σχέση:

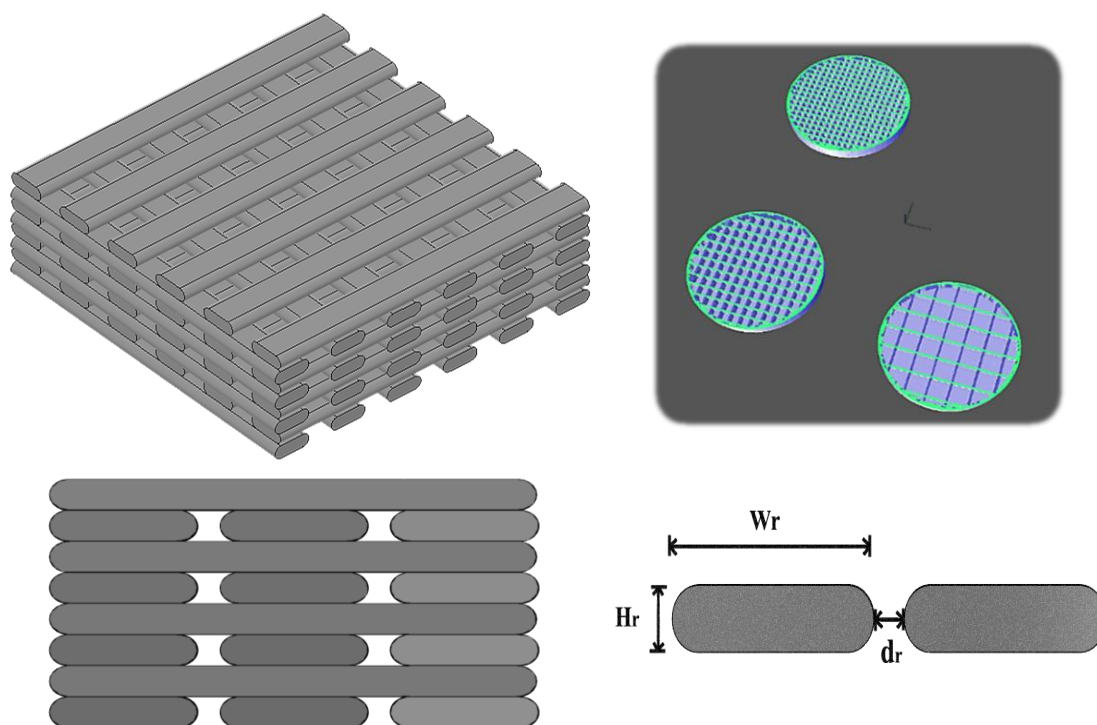
$$m_{\text{Gel}} = 0,06 * 15 = 0,9 \text{ g Gel}$$

Για την παρασκευή του υλικού ζελατίνης υδροξυαπατίτη-χιτοζάνης μειωμένης περιεκτικότητας νερού γίνεται αρχικά διάλυση της ζελατίνης σε 2mL νερού υπό μαγνητική ανάδευση στους 40 °C και προσθήκη του αιωρήματος που έχει προκύψει μετά τη φυγοκέντρωση. Το ιζώδες του φυγοκεντρημένου αιωρήματος είναι πολύ υψηλό και η ποσότητα του υδατικού διαλύματος ζελατίνης πολύ μικρή, συνεπώς οι δύο συνθέσεις αναδεύονται μηχανικά. Το προκύπτον υλικό ψύχεται για μισή ώρα στους 5 °C και στη συνέχεια αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου φτάσει τους 20 °C, θερμοκρασία στην οποία εξετάστηκε πως είναι εκτυπώσιμο.

Για το κολλαγόνο ακολουθήθηκε αντίστοιχη πειραματική διαδικασία, ξεκινώντας κατευθείαν από υλικά μεγάλης περιεκτικότητας (v/v) σε αιώρημα υδροξυαπατίτη-κολλαγόνο-αργινίνη, μιας και τα αιωρήματα των δύο βιοπολυμερών (χιτοζάνη, κολλαγόνο) παρουσιάζουν παρόμοιες ρεολογικές ιδιότητες.

5.4. Ανάπτυξη τριδιάστατων ικριωμάτων υδροξυαπατίτη-βιομορίων

Τα ικριώματα που κατασκευάστηκαν αποτελούνταν από ένα κυλινδρικό κέλυφος διαμέτρου 2 cm, το εσωτερικό του οποίου πληρώθηκε από μία τριδιάστατη πλεγματοειδή δομή ευθύγραμμων ινών υλικού (πλέγμα πλήρωσης, infill pattern), η οποία απεικονίζεται σχηματικά στην εικόνα 5.6.



Εικόνα 5.6 Υπολογισμός πλεγμάτων πλήρωσης τύπου rectilinear με διαφορετικό ποσοστό πλήρωσης 10, 20 και 30% infill density (Voxelizer 1.4.18).

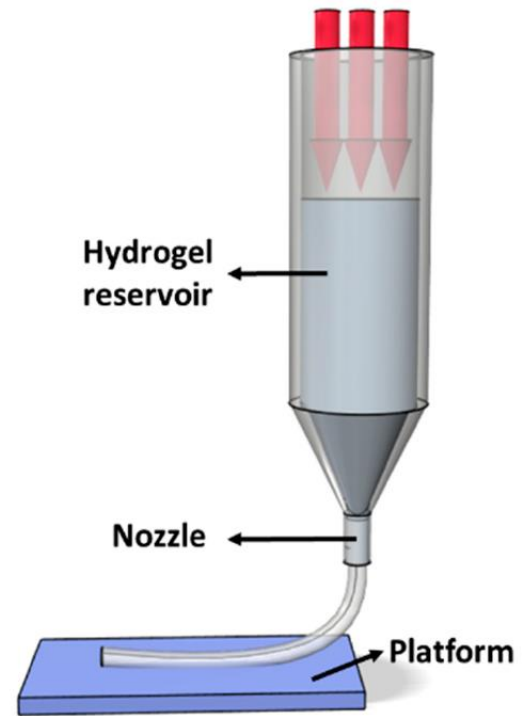
Το CAM λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε για την τριδιάστατη εκτύπωση είναι το Voxelizer 1.4.18. Το Voxelizer 3D έχει σχεδιαστεί για να οδηγεί τους ZMorph τριδιάστατους εκτυπωτές και άλλους desktop εκτυπωτές. Εκτός από το να είναι ένα λογισμικό για τον έλεγχο του μηχανήματος, είναι σε θέση να παράγει G-κώδικες (gcodes) από τριδιάστατα γεωμετρικά σχήματα. Το πλέγμα πλήρωσης των ικριωμάτων εξάγεται απευθείας από το λογισμικό CAM, όπου μπορούν να καθοριστούν οι βασικές κατασκευαστικές παράμετροι του ικριώματος. Οι παράμετροι αυτές περιλαμβάνουν το ύψος της στρώσης (H_T), το πλάτος των μεμονωμένων ινών (W_T), την πυκνότητα του πλέγματος πλήρωσης (που καθορίζει την απόσταση μεταξύ γειτονικών ινών (d_T) και συνεπώς το μέγεθος των πόρων μακροσκοπικού μεγέθους που θα έχει στο ικρίωμα), καθώς και παραμέτρους που σχετίζονται με την ταχύτητα κίνησης της κεφαλής και την ταχύτητα εξώθησης υλικού.

Με βάση τις κατασκευαστικές παραμέτρους που ορίζονται από τον χρήστη, το CAM λογισμικό συντάσσει το τεχνολογικό πρόγραμμα κατασκευής του ικριώματος, το οποίο αποτελείται από αλληλουχία εντολών σε G-κώδικα, οι οποίες εκτελούνται από τον 3D printer για την αυτοματοποιημένη κατασκευή του αντικειμένου. Η πιστότητα απόδοσης της γεωμετρικής μορφής του ικριώματος και της διαστατικής ακρίβειάς του εξαρτάται τόσο από την απόδοση του συστήματος τριδιάστατης εκτύπωσης (στιβαρότητα κατασκευής, ακρίβεια και επαναληψιμότητα της κίνησης των αξόνων κ.ά.), από το λογισμικό που χρησιμοποιείται για τη δημιουργία του G κώδικα (αλγόριθμοι υπολογισμού τροχιάς κεφαλής και ελέγχου της ογκομετρικής παροχής υλικού) αλλά και από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του υλικού κατεργασίας (ρεολογικά χαρακτηριστικά, σταθερότητα).

```
G91
G1 Z1.000 F200.000
G90
G28 X0.000 Y0.000
G1 X117.500 Y125.000 F8000.000
G28 Z0.000
T1
G92 E0.00000
T0
G92 E0.00000
M117 Level: 0
G1 E-4.00000 F3000.000
G1 Z0.200
G1 X99.786 Y128.320 F7200.000
G1 Z0.200 F3000.000
G1 E0.00000
G1 X99.680 Y128.404 E0.00338 F540.000
G1 X99.040 Y128.959 E0.02447
G1 X98.400 Y129.623 E0.04738
```

Εικόνα 5.7 Δείγμα εντολών G κώδικα από την αρχή του τεχνολογικού προγράμματος κατασκευής.

Δύο βασικές παράμετροι του G κώδικα που επηρεάζουν άμεσα το υλικό κατεργασίας είναι η παράμετρος E, που μετριέται σε mm και ορίζει την ονομαστική απόσταση κίνησης του εμβόλου της σύριγγας που εξωθεί το υλικό κατεργασίας και η παράμετρος F (σε mm/min), που ορίζει την ταχύτητα πρόωσης των κινούμενων μερών του εκτυπωτή. Ουσιαστικά η παράμετρος E ορίζει την ποσότητα υλικού που εξωθείται μέσω της μετατόπισης του εμβόλου, ενώ η παράμετρος F ορίζει την κίνηση όλων των κινητήρων του συστήματος, δηλαδή τόσο την ταχύτητα κίνησης της κεφαλής εκτύπωσης κατά τους XY άξονες (σε επίπεδο στρώσης) όσο και την ογκομετρική παροχή του υλικού (όγκος υλικού που εξωθείται ανά μονάδα χρόνου). Στα περισσότερα CAM λογισμικά ο χρήστης μπορεί να ορίσει απευθείας την παράμετρο F, ενώ η παράμετρος E υπολογίζεται από το λογισμικό συναρτήσει της εσωτερικής διαμέτρου της σύριγγας που χρησιμοποιείται, της διαμέτρου του ακροφυσίου της, και του ύψους/πλάτους/μήκους των μεμονωμένων ινών υλικού που έχει ορίσει ο χρήστης και το ψηφιακό μοντέλο του αντικειμένου υπό κατασκευή.



Εικόνα 5.8 Σχηματική απεικόνιση του συστήματος επιλεκτικής εναπόθεσης υδρογελών.

Για την εκτύπωση των υλικών χρησιμοποιήθηκε σύριγγα χωρητικότητας 20 ml, εσωτερικής διαμέτρου $D_s = 15,5$ mm και ακροφύσιο διαμέτρου $D_n = 0.6$ mm και μήκους $L = 12$ mm. Για το σύστημα αυτό οι σχέσεις που συνδέουν τα E, F με τον όγκο υλικού που εξωθείται V_s και της ογκομετρικής παροχής Q είναι:

$$V_s = \pi \cdot (D_s)^2 \cdot E / 4$$

$$Q = \dot{V}_s = \pi \cdot (D_s)^2 \cdot F / 4$$

ενώ εφαρμόζοντας την εξίσωση συνέχειας για το υλικό που εξωθείται προκύπτει πως η ταχύτητα εξώθησης U_{ex} είναι:

$$U_{ex} = F \cdot (D_s / D_n)^2$$

Η ταχύτητα πρόωσης συνδέεται με την ροπή που μεταφέρεται από τον βηματικό κινητήρα για την άσκηση πίεσης στο υλικό μέσω του εμβόλου μέσω των παρακάτω σχέσεων.

$$F = \Delta P * A$$

$$\Gamma = F * R_r$$

$$P_{\text{mot}} = \omega_r * \Gamma$$

όπου F: η απαραίτητη εφαρμοζόμενη δύναμη για την εξώθηση του υλικού, ΔP: η πτώση πίεσης κατά την έξοδο του υλικού από το ακροφύσιο, R_r: η ακτίνα των κυλίνδρων, ω_r: η γωνιακή ταχύτητα, Γ: η ροπή και P: η ισχύς του κινητήρα.

Καθώς το υλικό διέρχεται από το ακροφύσιο υπό την επίδραση της πίεσης που του ασκείται από το σύστημα τροφοδοσίας, η ροή του κυριαρχείται από την ισορροπία των δυνάμεων πίεσης και διατμητικών τάσεων, που οδηγούν σε διαφορετικούς ρυθμούς παραμόρφωσης και πτώση της πίεσης ΔP. Η πίεση που ασκεί ο κινητήρας πρέπει να ξεπεράσει την τιμή του ΔP, η οποία σε πρώτη προσέγγιση δίνεται από τη σχέση Hagen-Poiseuille:

$$\Delta P = \frac{8\mu L Q}{\pi R^4}$$

όπου Q: η ογκομετρική παροχή του υλικού

μ: το δυναμικό ιξώδες του υλικού

L: το μήκος του ακροφυσίου

R: η ακτίνα του ακροφυσίου

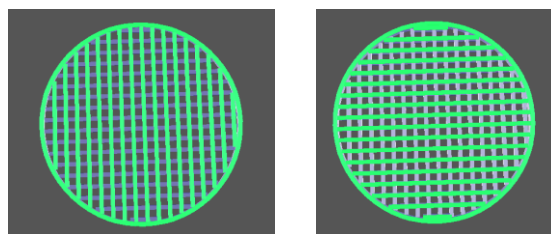
Η ακρίβεια του εκτυπωμένου αντικειμένου εξαρτάται από την απόδοση του συστήματος τριδιάστατης εκτύπωσης και του λογισμικού CAM, όσον αφορά την ικανότητα ελέγχου της κίνησης και της ογκομετρικής παροχής υλικού από το ακροφύσιο καθ' όλη τη διάρκεια της εκτύπωσης. Όπως είναι αναμενόμενο, μεγαλύτερο πλάτος ίνας προϋποθέτει μεγαλύτερη ογκομετρική παροχή σε κάθε σημείο του αντικειμένου που εκτυπώνεται. Παράλληλα, μεγαλύτερη απόσταση μετακίνησης του εμβόλου συνεπάγεται μεγαλύτερο όγκο εξωθούμενου υλικού, παράμετρος, ωστόσο, που δεν μπορεί να χαρακτηρίσει από μόνη της τον πραγματικό ρυθμό τροφοδοσίας του υλικού από το ακροφύσιο, μιας και πολύ σημαντικό ρόλο διαδραματίζει και η ταχύτητα πρόωσης. Η χαμηλή ταχύτητα πρόωσης επιτρέπει καλύτερο έλεγχο του συστήματος κατά τη

διάρκεια της εκτύπωσης, όμως σε περιπτώσεις που το υλικό βρίσκεται κοντά στο σημείο διαρροής του, πολύ χαμηλές τιμές της παραμέτρου F προκαλούν τοπική συσσώρευση υλικού (η ταχύτητα κίνησης της κεφαλής είναι μικρότερη από την ταχύτητα εξώθησης υλικού) και μεγαλύτερες αποκλίσεις από τις ονομαστικές τιμές των γεωμετρικών χαρακτηριστικών των δομών. Αναφορικά με τη θερμοκρασία εκτύπωσης, πρέπει να παραμένει σταθερή καθ'όλη τη διάρκεια της εκτύπωσης καθώς μπορεί να επηρεάσει τη ρεολογική συμπεριφορά των υλικών, επιδρώντας κυρίως στο ιξώδες τους.

Για ένα υλικό το οποίο δεν εμφανίζει σταθερό ιξώδες η πτώση πίεσης κατά την έξοδο του υλικού από το ακροφύσιο καθώς και το όριο διαρροής του μεταβάλλονται δεν επιτρέπουν τον πλήρη έλεγχο του συστήματος, εισάγοντας σφάλματα στη δομή και την ακρίβεια του τελικού αντικειμένου. Έτσι, ενώ κανονικά η τιμή της παραμέτρου F δεν επηρεάζει θεωρητικά το τελικό πλάτος των ινών, μπορούν να προκύψουν αποκλίσεις κατά τη μεταβολή της αν βρισκόμαστε κοντά στο όριο διαρροής του υλικού. Στο σημείο αυτό, η ροή του υλικού είναι συνεχής και ομοιόμορφη και εξαρτάται κυρίως από τα ρεολογικά χαρακτηριστικά του μελανιού εκτύπωσης.

Συνεπώς μεταβάλλοντας τις τιμές της παραμέτρου F μπορούμε να βρούμε την ελάχιστη δυνατή ταχύτητα στην οποία μπορεί να γίνει συνεχόμενη εξώθηση ινών υλικού, ενώ μεταβάλλοντας την παράμετρο E μπορούμε να ελέγξουμε το πάχος των μεμονωμένων ινών που εξωθούνται. Δεδομένου ότι το λογισμικό CAM που χρησιμοποιήθηκε δεν υποστηρίζει την υψηλής ακρίβειας εναπόθεση υδρογελών, έγινε τροποποίηση κώδικα για την εκτύπωση θερμοπλαστικού νήματος για τις ανάγκες της τροποποιημένης κεφαλής, μεταβάλλοντας τις τιμές των E και F με βάση την απόκριση των υλικών κατεργασίας.

Αρχικά έγινε δοκιμαστική εκτύπωση δοκιμίων δύο στρώσεων για την βελτιστοποίηση των παραμέτρων που επηρεάζουν την τριδιάστατη εκτύπωση πριν την εναπόθεση επιπλέον στρώσεων, μιας και οι ίδιες αυτές στρώσεις επαναλαμβάνονται εναλλάξ κατά την εναπόθεση υλικού για τον σχηματισμό του ικριώματος. Παράλληλα, τα υβριδικά ικριώματα δύο στρώσεων αποτέλεσαν πειραματικά τεστ με στόχο την εύρεση της



Εικόνα Τα 2 είδη στρώσεων που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των ικριωμάτων.

συμπεριφοράς του κάθε υλικού, του μοτίβου με τη λεπτότερη και πιο ομοιόμορφη ίνα πλέγματος και της εφικτότητας του να σχηματίζει αυτοστηριζόμενη (self-standing) δομή. Με αυτόν τον τρόπο ελέγχεται κατά πόσο το μοτίβο που έχει σχεδιαστεί εκτυπώνεται επιτυχώς μεταβάλλοντας τις παραμέτρους που αναφέρονται αναλυτικά στη συνέχεια.

Για την εύρεση του βέλτιστου ρυθμού τροφοδοσίας E για τη τριδιάστατη εκτύπωση της υδρογέλης ζελατίνης, επιλέχθηκε μεταβολή του E που παρήχθη από τον G-κώδικα για θερμοπλαστικά υλικά, πολλαπλασιάζοντάς τον επί 10 έως επί 100 με βήμα 10. Η ταχύτητα πρόωσης F έμεινε σταθερή και ίση με $1500 \frac{mm}{min}$.

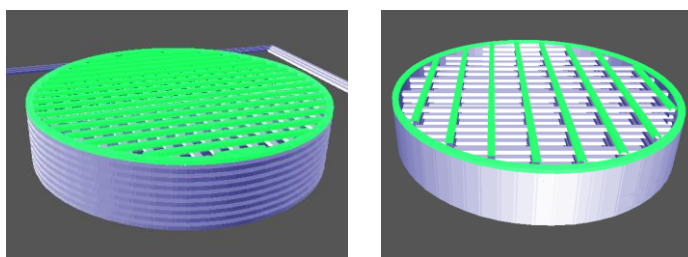
Για την εύρεση του βέλτιστου ρυθμού τροφοδοσίας E για τη τριδιάστατη εκτύπωση των διάφορων συστάσεων (10%-90%) υβριδικών γελών ζελατίνης-υδροξυαπατίτη-χιτοζάνης, που παρασκευάστηκαν από την πειραματική διαδικασία που έχει ήδη περιγραφεί, επιλέχθηκε ταχύτητα πρόωσης $F = 1800 \frac{mm}{min}$ και μεταβολή του E όπως και κατά την εκτύπωση της υδρογέλης ζελατίνης, για κάθε σύσταση. Η αύξηση της ταχύτητας πρόωσης κρίθηκε απαραίτητη μιας και με την προσθήκη του αιωρήματος υδροξυαπατίτη-χιτοζάνη, η υβριδική υδρογέλη ζελατίνης-υδροξυαπατίτη-χιτοζάνης αποκτά διαφορετικά χαρακτηριστικά ροής και για να είναι εκτυπώσιμη στο επιθυμητό γεωμετρικό μοτίβο απαιτείται μεγαλύτερη ροπή από τον βηματικό κινητήρα, ενώ αύξηση της ταχύτητας κίνησης της κεφαλής μεταβάλλει το πάχος των ινών υλικού που εναποτίθενται, επιτυγχάνοντας μικρότερο μέγεθος μακροπόρων στα τελικά ικρίωματα.

Για το υλικό ζελατίνης-υδροξυαπατίτη-χιτοζάνης καθώς και για το υλικό ζελατίνης-υδροξυαπατίτη-κολλαγόνο, που προέκυψαν μετά από φυγοκέντρηση του εκάστοτε αιωρήματος, εξετάστηκε η επίδραση της ταχύτητας πρόωσης F όσο και του ρυθμού ροής E στη μορφή του τριδιάστατα εκτυπωμένου αιωρήματος. Παρακάτω παρατίθενται πίνακες με τις τιμές F και E που εξετάστηκαν για τα δύο υλικά. Πρέπει να σημειωθεί πως οι τιμές F και E συνδυάστηκαν κατά ζεύγη ώστε να βρεθούν οι βέλτιστες τιμές και για τις δύο παραμέτρους εκτύπωσης. Μετά από κάθε εκτύπωση τα δείγματα παρατηρήθηκαν με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου για να είναι εφικτή η μεταξύ τους σύγκριση.

Ταχύτητα πρόωσης F (mm/min)
1800
1900
2000

Ρυθμός τροφοδοσίας E (mm/s)
x10
x20
x30
x40
x50
x60
x70
x80
x90
x100

Στη συνέχεια, σχεδιάστηκαν ικρίωματα 9 και 15 στρώσεων διαφόρων πυκνοτήτων πλέγματος, μεταβάλλοντας το ποσοστό πλήρωσης και διατηρώντας σταθερές τις παραμέτρους F και E του G-κώδικα που εμφάνισαν τη βέλτιστη συμπεριφορά κατά την εκτύπωση.



Εικόνα 5.10 Ικρίωματα 9 και 15 στρώσεων διαφορετικού ποσοστού πλήρωσης.

Τέλος, τα δείγματα στα οποία παρατηρήθηκαν οι βέλτιστες ιδιότητες τοποθετήθηκαν απευθείας για ψύξη 24 ωρών με σκοπό τον σχηματισμό κρυστάλλων πάγου στο εσωτερικό τους ώστε να μπορεί να πραγματοποιηθεί η διαδικασία της λυοφιλίωσης.

5.5. Λυοφιλίωση (Freeze Drying)

5.5.1. Αρχή λειτουργίας της λυοφιλίωσης

Η λυοφιλίωση αποτελεί μία μέθοδο ξήρανσης, η οποία χρησιμοποιείται κυρίως για τη διατήρηση ευπαθών υλικών ή για τη δημιουργία τριδιάστατων δομών με εσωτερικό πορώδες δίκτυο. Η αρχή λειτουργίας της βασίζεται στην ψύξη τους προς ξήρανση δείγματος και την εν συνεχεία τοποθέτησή του μέσα σε θάλαμο υψηλού κενού, ώστε οι παγωμένοι κρύσταλλοι του νερού να μεταβούν απευθείας από τη στερεή στην

αέρια φάση. Η εξάχνωση πραγματοποιείται με τη βοήθεια αντλίας κενού, η οποία δημιουργεί το υψηλό κενό στο εσωτερικό του δοχείου Λυοφιλίωσης.

Η εξάχνωση αρχικά πραγματοποιείται στην επιφάνεια του προϊόντος και βαθμιαία προχωρά προς το εσωτερικό του. Κατά τα πρώτα στάδια της ξήρανσης, περίπου το 95% του νερού απομακρύνεται από το προϊόν. Με τον τρόπο αυτό, διασφαλίζεται ότι η δομή του δείγματος θα παραμείνει άθικτη.

Τα κυριότερα μέρη των εργαστηριακών συσκευών λυοφιλίωσης είναι ο θάλαμος κατάψυξης, ο ψυχόμενος συμπυκνωτής, από τον οποίο διέρχονται οι υδρατμοί ενώ παράλληλα παρέχει τη δυνατότητα απομάκρυνσης του σχηματιζόμενου πάγου χωρίς να διακόπτεται το κενό στους θαλάμους, και η αντλία κενού που διατηρεί την πίεση μέσα στο θάλαμο στα επιθυμητά επίπεδα.

Οι παράμετροι που επηρεάζουν τη λυοφιλίωση είναι οι εξής:

1. Ρυθμός ψύξης – Θερμοκρασία ψύξης

Όταν η διαδικασία της κατάψυξης είναι γρήγορη, σχηματίζονται μόνο μικροί κρύσταλλοι πάγου. Στην περίπτωση της αργής ψύξης αντίθετα, πιθανόν να υπάρξει σχηματισμός πολύ μεγαλύτερων κρυστάλλων πάγου και κατά συνέπεια να καταστραφεί η ομοιογένεια και η δομή του εκάστοτε δείγματος. Ανάλογα με την εκάστοτε εφαρμογή, χρησιμοποιούνται και διαφορετικοί ρυθμοί ψύξης του υλικού.

2. Ρυθμός εξάχνωσης – Τιμές επιβαλλόμενης εσωτερικής πίεσης

Η τιμή της επιβαλλόμενης πίεσης, καθορίζει και το ρυθμό εξάχνωσης. Ο ρυθμός αυτός καθορίζει το ποσοστό του σχηματιζόμενου πορώδους καθώς και του μεγέθους των πόρων. Αξίζει να σημειωθεί ότι κατά τη διάρκεια της εξάχνωσης, δηλαδή στο στάδιο της εφαρμογής κενού στο εσωτερικό του δοχείου λυοφιλίωσης, η χαμηλή πίεση προστατεύει τα παγωμένα δείγματα από το να υγροποιηθούν και επιταχύνει το πρωταρχικό στάδιο της ξήρανσης.

5.5.2. Πειραματική διαδικασία λυοφιλίωσης

Το υλικό ψύχθηκε σε θερμοκρασία $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$, για 24 ώρες με σκοπό τον σχηματισμό κρυστάλλων πάγου στο εσωτερικό του. Μετά τη διαδικασία της ψύξης, εφαρμόστηκε

υποπίεση (από 0,1 έως 1 mbar) στο εσωτερικό του θαλάμου λυοφιλίωσης, ενώ ταυτόχρονα το υλικό διατηρήθηκε για 24 ώρες υπό ψύξη στους $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$. Στις συνθήκες αυτές, οι οποίες είναι αρκετά πιο κάτω από το τριπλό σημείο του νερού, οι κρύσταλλοι του πάγου περνούν απευθείας στην αέρια κατάσταση. Η εξάχνωση αυτή των κρυστάλλων του νερού οδηγεί στο σχηματισμό εκτεταμένου μικροπορώδους δικτύου στο εσωτερικό των ικριωμάτων.

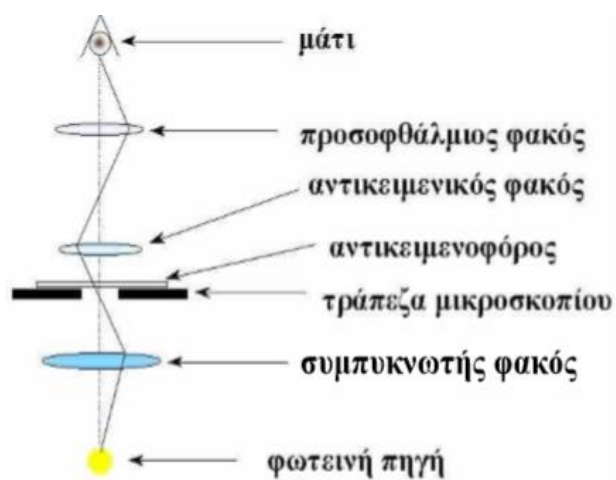
6. Τεχνικές Χαρακτηρισμού

6.1. Οπτικό μικροσκόπιο

Αρχή λειτουργίας

Το μικροσκόπιο είναι ένα εργαλείο που επιτρέπει την παρατήρηση μικρών αντικειμένων, που με γυμνό μάτι είναι αόρατα, είναι δηλαδή μικρότερα του $0,1\text{mm}$. Με το οπτικό μικροσκόπιο μπορούμε να δούμε μικρά αντικείμενα μεγέθους μέχρι $0,1\mu=0,0001\text{mm}$. Για μικρότερα αντικείμενα χρησιμοποιούνται άλλοι τύποι μικροσκοπίων.

Το οπτικό μικροσκόπιο αποτελείται από ένα οπτικό σύστημα (εικ. 6.1), δηλαδή ένα σύστημα από φακούς κατάλληλα διευθετημένους, μέσω του οποίου ο παρατηρητής βλέπει ένα μεγεθυμένο είδωλο του αντικειμένου που θέλει να μελετήσει. Το οπτικό σύστημα αποτελείται από δύο συγκλίνοντα ομοαξονικά συστήματα φακών, τον αντικειμενικό και τον προσοφθάλμιο φακό. Ο πρώτος τοποθετείται πάνω από το αντικείμενο και δίνει είδωλο πραγματικό και ανεστραμμένο. Ο δεύτερος είναι ο φακός μέσα από τον οποίο ο παρατηρητής βλέπει το αντικείμενο και χρησιμεύει για να μεγενθύνει την εικόνα που δίνει ο αντικειμενικός φακός. Το φως παράγεται από μια φωτεινή πηγή (λυχνία) και εστιάζεται στο ύψος του αντικειμένου με τη βοήθεια ενός συμπυκνωτή φακού.



Εικόνα 6.1 Σχηματική απεικόνιση αρχής λειτουργίας οπτικού μικροσκοπίου.

Η διακριτική ικανότητα είναι η "ικανότητα" του μικροσκοπίου να δείχνει δύο πολύ κοντινά σημεία ως δύο καθαρά ξεχωριστά σημεία. Η διακριτική ικανότητα (d) ενός οπτικού συστήματος δίνεται από το τύπο:

$$d = 0,61 \frac{\lambda}{n \cdot \eta \mu \alpha}$$

όπου d είναι η διακριτική ικανότητα, 0,61 ένας σταθερός αριθμός, λ το μήκος κύματος του φωτός (ή της ακτινοβολίας) που χρησιμοποιείται, n ο δείκτης διάθλασης του μέσου μεταξύ παρασκευάσματος και φακού και α το μισό της γωνίας του φωτεινού κώνου που δέχεται ο φακός. Η μεγέθυνση δείχνει πόσες φορές μπορεί το μικροσκόπιο να μεγεθύνει το είδωλο του αντικειμένου. Η μεγέθυνση ενός οπτικού μικροσκοπίου δίνεται από το τύπο $M=m_1 \cdot m_2$ όπου m_1 και m_2 είναι οι μεγεθύνσεις των δύο φακών, δηλαδή του προσοφθάλμιου και του αντικειμενικού. Τα μέρη του αντικειμένου γίνονται διακριτά (και επομένως ορατά), όταν υπάρχει επαρκής αντίθεση μεταξύ τους. Σε περίπτωση βιολογικών δομών οι οποίες είναι πολύ διαφανείς, η αντίθεση ενισχύεται με την χρήση χρωστικών.

6.2. Φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy –FT-IR)

Στη φασματοσκοπία υπέρυθρου μελετάται η απορρόφηση υπέρυθρου φωτός από το δείγμα συναρτήσει της συχνότητας. Το μόριο απορροφά ενέργεια $\Delta E = h \cdot \nu$ από την IR πηγή (που εκπέμπει ακτινοβολία έντασης I) σε κάθε δονητική μετάβαση.

Η πλέον χρήσιμη σχέση στην φασματοφωτομετρία απορρόφησης προκύπτει από τον συνδυασμό του νόμου του Lambert (κάθε στρώμα, ίσης επιφάνειας, ενός απορροφητικού μέσου απορροφά ίσο ποσοστό της ακτινοβολίας που το διασχίζει) και του νόμου του Beer (η απορρόφηση ενός διαλύματος είναι ανάλογη προς την συγκέντρωση της απορροφητικής ουσίας. Το φάσμα απορρόφησης και ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης σε μήκος κύματος λ είναι παράμετροι που χαρακτηρίζουν μοναδικά συγκεκριμένα μόρια και μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο για ποσοτικοποίηση, όσο και για χαρακτηρισμό δειγμάτων.

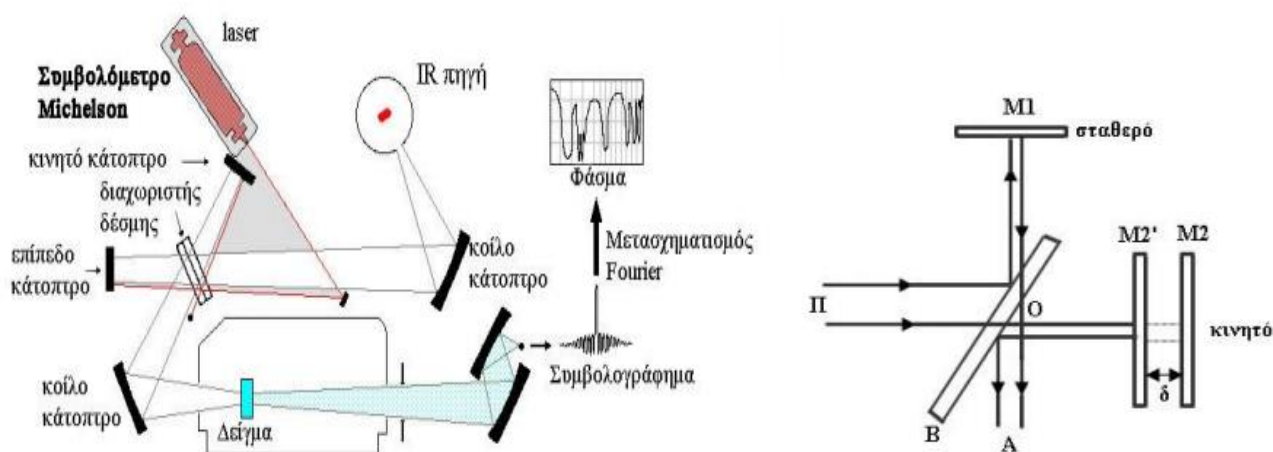
Αρχή λειτουργίας

Τα δονητικά φάσματα λαμβάνονται με ένα φασματοφωτόμετρο FT-IR. Αυτό έχει ως βάση λειτουργίας το συμβολόμετρο Michelson, το οποίο χρησιμοποιείται για να δημιουργηθεί ένα συμβολογράφημα. Μαθηματική επεξεργασία του συμβολογραφήματος (μετασχηματισμός Fourier) δίνει το φάσμα απορρόφησης IR. Το συμβολόμετρο (interferometer) δύο δεσμών, αρχικά σχεδίασε ο Michelson το 1891. Το συμβολόμετρο Michelson είναι μια διάταξη οπτικών που χωρίζει μια δέσμη ακτινοβολίας σε δύο δέσμες και τις επανασυνθέτει, αφού πρώτα ακολουθήσουν ξεχωριστές διαδρομές που διαφέρουν στο μήκος. Οι μεταβολές της έντασης της επαλληλίας των δύο δεσμών ακτινοβολίας, ως συνάρτηση της διαφοράς των οπτικών διαδρομών καταγράφονται από έναν ανιχνευτή.

Όλα τα φασματοφωτόμετρα μετασχηματισμού Fourier χρησιμοποιούν ένα συμβολόμετρο τύπου Michelson (εικ. 6.2). Η πολυχρωματική IR ακτινοβολία, που εκπέμπεται από την πηγή, φθάνει στο διαχωριστή δέσμης όπου είναι φτιαγμένος από ημιδιαφανές υλικό, συνήθως KBr και το 50% της ακτινοβολίας ανακλάται και το υπόλοιπο 50% περνά από το διαχωριστή. Ο διαχωριστής είναι τοποθετημένος σε γωνία 45° , ως προς την προσπίπτουσα δέσμη, ώστε να είναι μέγιστες οι εντάσεις τόσο του μέρους της δέσμης που ανακλάται, όσο και εκείνου που διαπερνά.

Η ακτινοβολία που παράγεται από την IR πηγή προσπίπτει στον διαχωριστή δέσμης, ο οποίος διαιρεί την ακτινοβολία σε δύο ίσα μέρη αποστέλλοντας το ένα τμήμα στο κάτοπτρο M_1 και το άλλο μισό στο M_2 . Η ανακλώμενη ακτινοβολία προσπίπτει πάνω στο σταθερό καθρέπτη, ο οποίος βρίσκεται σε απόσταση L από το διαχωριστή. Η δέσμη ανακλάται και επιστρέφει στο διαχωριστή. Το δεύτερο κλάσμα της IR ακτινοβολίας που διαπερνά τον διαχωριστή, αφού διανύσει απόσταση $(L+d)$, ανακλάται από τον κινούμενο καθρέπτη και επανέρχεται στον διαχωριστή. Έτσι, η διαφορά των δύο οπτικών διαδρομών είναι $\delta = 2d$. Οι δύο ανακλώμενες δέσμες, όταν επιστρέψουν στο διαχωριστή, συμβάλουν έχοντας διανύσει διαφορετικό οπτικό δρόμο. Με την διαδικασία αυτή, δημιουργούνται οι κροσσοί συμβολής μέσω των οποίων γίνεται η κατάλληλη επιλογή των μηκών κύματος

Σε ένα φασματοφωτόμετρο FT-IR η πηγή εκπέμπει ένα συνεχές φάσμα. Κατά την έξοδο από το συμβολόμετρο έχουμε επαλληλία των διαφόρων φασματικών συνιστωσών των επιμέρους δεσμών. Το τελικό αποτέλεσμα προκύπτει από το άθροισμα των επιμέρους εντάσεων ακτινοβολίας που αντιστοιχούν σε κάθε φασματική περιοχή. Έτσι για μηδενική διαφορά οπτικού δρόμου όλες οι φασματικές συνιστώσες είναι σε φάση και η συνολική ένταση ακτινοβολίας είναι μέγιστη. Καθώς αυξάνεται η διαφορά οπτικού δρόμου ΔL η επαλληλία για κάθε φασματική συνιστώσα οδηγεί σε μέγιστο η ελάχιστο ανάλογα με τον λόγο $\Delta L/\lambda$. Έτσι η συνολική ένταση μειώνεται ή αυξάνεται με όλο και μικρότερο πλάτος διαμόρφωσης. Μετά από μια μέγιστη διαφορά οπτικού δρόμου δεν υπάρχει πια κανένας συσχετισμός φάσης μεταξύ των διαφόρων φασματικών συνιστωσών και η συνολική ένταση είναι πια σταθερή και ανεξάρτητη από την διαφορά οπτικού δρόμου. Όπως αποδεικνύεται το πλάτος διαμόρφωσης των πολυχρωματικών κροσσών συμβολής είναι συνάρτηση ως συνάρτηση του της διαφοράς οπτικού δρόμου σχετίζεται με τον μετασχηματισμό Fourier της φασματικής κατανομής της πηγής [121].



Εικόνα 6.2 Δεξιά: Σχηματική αναπαράσταση φασματοφωτόμερου FTIR με συμβολόμετρο Αριστερά: Σχηματικό διάγραμμα συμβολόμετρου Michelson. Π= πηγή, M1= κάτοπτρο μείξης, M1' = είδωλο του M1 όπως φαίνεται από τη θέση A, M2= κινητό κάτοπτρο, B= διαιρέτης δέσμης (chopper) και A= αναλυτής.

Τεχνικές φασματοσκοπικών μετρήσεων – Εξασθενημένη Ολική Ανάκλαση, ATR (Attenuated Total Reflectance)

Η φασματοσκοπία του μέσου υπέρυθρου φωτός είναι μία εξαιρετικά αξιόπιστη και αναγνωρισμένη τεχνική για τη μελέτη των χαρακτηριστικών πολλών ουσιών ώστε αυτές να αναγνωριστούν και να καθοριστούν ποσοτικά.

Ένα από τα μεγαλύτερα πλεονεκτήματα της φασματοσκοπίας ATR είναι ότι τα φάσματα απορρόφησης μιας μεγάλης ποικιλίας δειγμάτων λαμβάνονται άμεσα και με ελάχιστη προετοιμασία. Ίνες, νήματα και υφάσματα μπορούν να εξετασθούν με πίεση

τους πάνω στον στερεό κρύσταλλο. Με παρόμοιο τρόπο αντιμετωπίζονται πάστες, σκόνες και εναιωρήματα. Υδατικά διαλύματα μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν, επειδή ο κρύσταλλος δεν είναι διαλυτός στο νερό. Επιπλέον ο κρύσταλλος ATR μπορεί απ' ευθείας να βυθιστεί σε υγρά δείγματα.

Αρχές της τεχνικής ATR

Το φασματοφωτόμετρο της εξασθενημένης ολικής ανάκλασης λειτουργεί μετρώντας τις αλλαγές που εμφανίζονται σε μία εσωτερικά ανακλώμενη υπέρυθρη ακτίνα όταν αυτή έρχεται σε επαφή με το δείγμα.

Μία ακτίνα υπέρυθρου φωτός ανιχνεύεται από έναν αδιαφανή κρύσταλλο με υψηλό δείκτη διάθλασης σε μία συγκεκριμένη γωνία. Αυτή η εσωτερική ανάκλαση δημιουργεί ένα απορροφούμενο κύμα σαν μία φυσαλίδα υπέρυθρου φωτός που επικάθεται στην επιφάνεια του κρυστάλλου. Αυτό το κύμα εξέρχεται μόνο κατά μερικά μικρά ($0.5 \mu - 5 \mu$) πάνω από την επιφάνεια του κρυστάλλου και από το δείγμα. Κατά συνέπεια, πρέπει να υπάρχει καλή επαφή μεταξύ του δείγματος και της επιφάνειας του κρυστάλλου. Στις περιοχές του υπέρυθρου όπου το δείγμα απορροφά ενέργεια, το απορροφούμενο κύμα συνεχώς θα ισχναίνεται ή θα μεταβάλλεται. Η μεταβαλλόμενη ενέργεια από κάθε απορροφούμενο κύμα προωθείται προς την ακτίνα του υπέρυθρου, το οποίο στη συνέχεια εξέρχεται από την αντίθετη άκρη του κρυστάλλου και περνά στον ανιχνευτή του φασματοφωτομέτρου. Στη συνέχεια το σύστημα παράγει μία ακτίνα υπέρυθρου.

Απαραίτητες προϋποθέσεις για την επιτυχία της εκτέλεσης της διαδικασίας είναι οι εξής:

- Το δείγμα πρέπει να είναι σε άμεση επαφή με τον κρύσταλλο του ATR διότι το απορροφούμενο κύμα ή η φυσαλίδα εξέρχεται κατά μόνο $0.5 \mu - 5 \mu$ από την επιφάνεια του κρυστάλλου.
- Ο δείκτης διάθλασης του κρυστάλλου πρέπει να είναι σημαντικά μεγαλύτερος από αυτόν του δείγματος, διαφορετικά δεν θα πραγματοποιηθεί εσωτερική ανάκλαση (το φως απλά θα διαδοθεί και δεν θα ανακλαστεί εσωτερικά του κρυστάλλου). Συνήθως οι κρύσταλλοι που χρησιμοποιούνται στην τεχνική ATR έχουν δείκτη διάθλασης με τιμές μεταξύ 2.38 και 4.01 στα 2000 cm^{-1} . Η πλειονότητα των στερεών και των υγρών έχουν πολύ μικρότερους δείκτες διάθλασης.

Το ζήτημα της καλής επαφής δείγματος/κρυστάλλου ξεπεράστηκε σε μεγάλο βαθμό με την καθιέρωση συσκευών με πολύ μικρούς κρυστάλλους, περίπου 2mm. Ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος κρύσταλλος είναι το διαμάντι λόγω της ανθεκτικότητας και της χημικής του σταθερότητας. Αυτή η μικρή επιφάνεια του κρυστάλλου του ATR μπορεί να προσφέρει μόνο μία ανάκλαση, αλλά αυτή είναι αρκετή με δεδομένο τα πολύ χαμηλά επίπεδα θορύβου των νέων φασματοφωτομέτρων. Πολύ μεγαλύτερη πίεση με περιορισμένη εφαρμογή δύναμης μπορεί να παραχθεί σε αυτή τη μικρή περιοχή. Έτσι, απαιτείται μία πολύ μικρότερη περιοχή επαφής και ως αποτέλεσμα, μπορεί να παραχθεί το φάσμα ενός πλήθους στερεών υλικών, περιλαμβάνοντας και τα ορυκτά.

6.3. Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (SEM)

Αρχή λειτουργίας

Η αρχή λειτουργίας του Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Σάρωσης (SEM = Scanning Electron Microscopy) στηρίζεται στην εκπομπή δευτερογενών ή οπισθοσκεδαζόμενων ηλεκτρονίων από μια επιφάνεια, όταν αυτή σαρώνεται από μια καλά εστιασμένη προσπίπτουσα δέσμη ηλεκτρονίων αρκετά υψηλής ενέργειας. Η ένταση των εκπεμπόμενων ηλεκτρονίων επηρεάζεται από τα χαρακτηριστικά της μορφολογίας της επιφάνειας. Έτσι το SEM δίνει πληροφορίες που αφορούν κυρίως στη μορφολογία και στη σύσταση της επιφανείας. Επομένως χρησιμοποιείται για την εξέταση της μικροδομής των στερεών δειγμάτων και για να δίνει εικόνες υψηλού βαθμού διείσδυσης.

Οι βασικές διατάξεις που απαρτίζουν το μικροσκόπιο είναι το σύστημα παραγωγής δέσμης ηλεκτρονίων, το σύστημα κατεύθυνσης της δέσμης, το σύστημα ανίχνευσης και τέλος το σύστημα κενού.

➤ Σύστημα παραγωγής και κατεύθυνσης της δέσμης ηλεκτρονίων

Τα ηλεκτρόνια παράγονται συνήθως από νήμα βολφραμίου, το οποίο λειτουργεί σαν κάθοδος. Μέσα από το νήμα περνάει ρεύμα (filament current). Καθώς το ρεύμα αυξάνεται, εκπέμπονται ηλεκτρόνια τα οποία κατευθύνονται προς την άνοδο στην οποία εφαρμόζεται δυναμικό ~0.1-30 KV (accelerating voltage). Η άνοδος, που είναι θετική, δημιουργεί ισχυρές ελκτικές δυνάμεις στα ηλεκτρόνια με αποτέλεσμα να κατευθύνει και να επιταχύνει τα ηλεκτρόνια, ελέγχει δηλαδή την ενέργειά τους. Καθώς αυξάνεται το

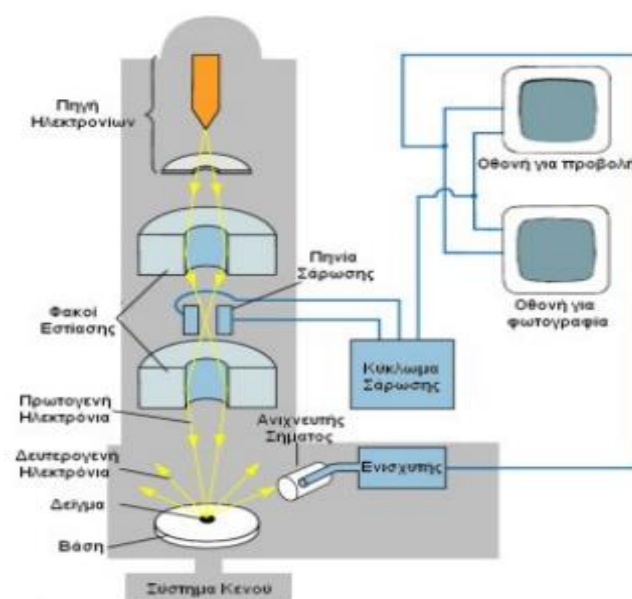
ρεύμα του νήματος, φθάνει σε ένα σημείο που δεν εκπέμπονται πλέον άλλα ηλεκτρόνια. Αυτή η κατάσταση ονομάζεται κορεσμός του νήματος (filament saturation). Αν το ρεύμα του νήματος αυξηθεί επιπλέον, έχουμε υπερθέρμανση και εξάχνωση του βολφραμίου. Ακόμα όμως και στο σημείο κορεσμού, μέρος του βολφραμίου εξαχνώνεται και γι' αυτό με την πάροδο του χρόνου το νήμα λεπταίνει. Ο αριθμός ηλεκτρονίων στην δέσμη ορίζεται σαν ρεύμα εκπομπής (emission current). Καθορίζεται από την απόσταση ανάμεσα στην άκρη του νήματος (filament tip) και του ανοίγματος που υπάρχει στο διάφραγμα (Wehnelt cap aperture). Όσο πιο κοντά είναι τόσο περισσότερα ηλεκτρόνια έλκονται και τόσο μεγαλύτερο γίνεται το ρεύμα εκπομπής. Τα ηλεκτρόνια επιταχύνονται από την άνοδο και περνούν μέσα από ένα ηλεκτρομαγνητικό φακό συμπύκνωσης (condenser lens) που τα μετατρέπει σε δέσμη (στάδιο απομεγέθυνσης). Η ισχύς αυτού του φακού καθορίζει την διάμετρο της δέσμης (spot size). Άλλοι ηλεκτρομαγνητικοί φακοί ελέγχουν την εστίαση της δέσμης πάνω στην επιφάνεια του δείγματος.

➤ Σύστημα κενού

Κατά την χρήση του SEM, η στήλη πρέπει να βρίσκεται υπό κενό για να μπορεί να παραχθεί και διατηρηθεί σταθερή η δέσμη των ηλεκτρονίων. Ειδάλλως τα ηλεκτρόνια συγκρούονται με τα μόρια του αέρα και απορροφώνται. Το κενό επιτυγχάνεται με την χρήση αντλιών κενού.

➤ Σύστημα ανίχνευσης

Περιλαμβάνει τους διάφορους ανιχνευτές που δέχονται τα σήματα που παράγονται από την αλληλεπίδραση της δέσμης ηλεκτρονίων με το δείγμα και το σύστημα παρουσίασης (μεγέθυνση-παρουσίαση-καταγραφή). Οι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι ανιχνευτές δευτερογενών ηλεκτρονίων [98].

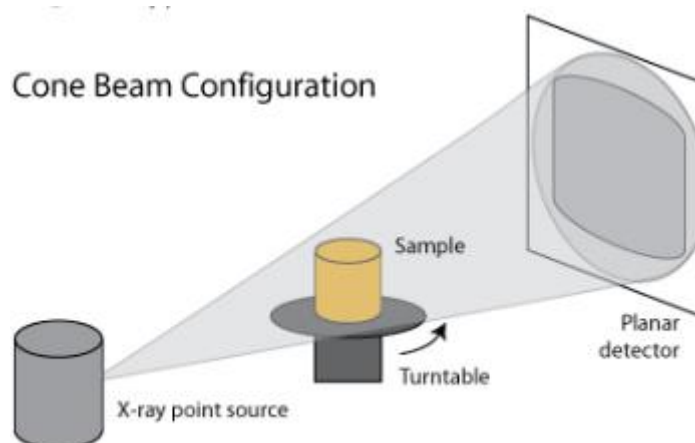


Εικόνα 6.3 Σχηματική αναπαράσταση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM).

6.4. Μικροϋπολογιστική Τομογραφία (Microcomputed Tomography-microCT)

Αρχή λειτουργίας

Η μικροϋπολογιστική Τομογραφία (microCT) είναι μία μη καταστρεπτική μέθοδος απεικόνισης για την παραγωγή τριδιάστατων (3D) εικόνων υψηλής ανάλυσης που αποτελούνται από διδιάστατες (2D) διαξονικές προβολές ή «φέτες» ενός δείγματος-στόχου. Η μικροϋπολογιστική τομογραφία είναι μια διαδικασία δύο βημάτων: 1) μέτρηση της διάδοσης μιας δέσμης ακτίνων X μέσα από μια τομή ενός αντικειμένου, σε διάφορες διευθύνσεις στο επίπεδο της τομής, 2) εκτίμηση του γραμμικού συντελεστή εξασθένισης των ακτίνων X σε διάφορα σημεία της τομής του αντικειμένου. Σύμφωνα με τα βήματα αυτά η αρχή λειτουργίας του αξονικού τομογράφου είναι η εξής: Μια δέσμη ακτίνων X προσπίπτει σε μια εγκάρσια τομή του αντικειμένου προς εξέταση που ορίζει ένα επίπεδο. Καθώς η λυχνία και οι ανιχνευτές βρίσκονται σε αντιδιαμετρικές θέσεις, ανιχνεύεται η ένταση I της εξερχόμενης δέσμης και η πληροφορία καταγράφεται σε ηλεκτρονικό υπολογιστή.

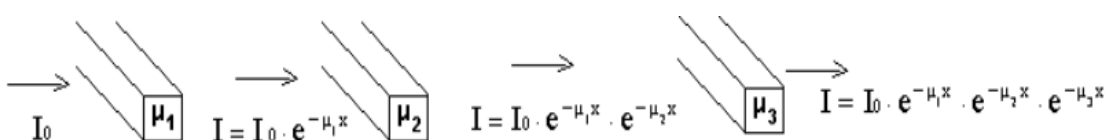


Εικόνα 6.4 Σχηματική απεικόνιση απόκτησης δεδομένων από μικροϋπολογιστικό τομογράφο με τη χρήση δέσμης ακτίνων κώνου.

Στη συνέχεια το σύστημα πηγή - ανιχνευτής περιστρέφεται σε μια νέα θέση και επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία. Καθώς γίνεται η περιστροφή καταγράφεται η ένταση της εξερχόμενης δέσμης σε κάθε θέση. Το σύστημα συλλογής δεδομένων που εκτελεί τις μετρήσεις της εξερχόμενης έντασης, κωδικοποιεί τα αποτελέσματα σε ψηφιακή μορφή και μεταφέρει τις τιμές σ' έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή. Με τον τρόπο αυτό καταγράφονται οι προβολές για κάθε θέση του συστήματος λυχνία - ανιχνευτής. Η δέσμη των ακτίνων X καθορίζει μια τομή πάνω στο εξεταζόμενο σώμα ορισμένου πάχους. Θεωρούμε ότι η τομή αυτή αποτελείται από πολλά ορθογώνια

παραλληλεπίπεδα, που ονομάζονται στοιχεία όγκου (voxels). Κάθε ένα από αυτά έχει βάθος ίσο με το πάχος της τομής και διατομή x^2 . Εάν η δέσμη διέλθει μέσα από ένα από αυτά τότε η ένταση στην έξοδο θα είναι $I = I_0 e^{-\mu x}$ όπου μ είναι ο γραμμικός συντελεστής εξασθένησης του συγκεκριμένου στοιχειώδους όγκου, ο οποίος για σταθερή ενέργεια των φωτονίων X εξαρτάται από τη σύσταση του υλικού.

Αν υποθέσουμε ότι η δέσμη διέρχεται διαδοχικά από τρία voxels (εικ. 6.5) με γραμμικούς συντελεστές εξασθένησης αντίστοιχα μ_1 , μ_2 και μ_3 , η ένταση της δέσμης μετά το πρώτο voxel θα είναι $I = I_0 e^{-\mu_1 x}$, μετά το δεύτερο θα είναι $I = I_0 e^{-\mu_1 x} \cdot e^{-\mu_2 x}$ και μετά το τρίτο θα είναι $I = I_0 e^{-\mu_1 x} \cdot e^{-\mu_2 x} \cdot e^{-\mu_3 x} = I_0 e^{-\mu_1 x - \mu_2 x - \mu_3 x} = I_0 e^{-(\mu_1 + \mu_2 + \mu_3)x}$. Στην πραγματικότητα η δέσμη διέρχεται από περισσότερα voxels και συνεπώς η ένταση της δέσμης θα είναι $I = I_0 e^{-(\mu_1 + \mu_2 + \mu_3 + \dots + \mu_n)x}$. Οι τιμές των εντάσεων I είναι μεγέθη που μετρούνται από τους ανιχνευτές και η διάσταση x καθορίζεται από το χειριστή ανάλογα με την επιθυμητή διακριτική ικανότητα.



Εικόνα 6.5 Διέλευση δέσμης ακτίνων X από τρία voxels.

6.5. Μελέτη βιοσυμβατότητας-Ανάπτυξη κυτταρικών καλλιέργειών

Υλικά και Μέθοδος

Τα 3D εκτυπωμένα ικρίωματα βέλτιστων παραμέτρων που παρήχθησαν εργαστηριακά αποστειρώθηκαν ακολουθώντας 2 σειρές αποστείρωσεων, με αλκοόλη 70% για 10 λεπτά και με υπεριώδη ακτινοβολία (UV) για 10 λεπτά για κάθε πλευρά του εκάστοτε δοκιμίου. Κατόπιν, τα ικρίωματα και οι μάρτυρες καλλιεργήθηκαν με πρώιμους οστεοβλάστες MG3 σε θρεπτικό υλικό DMEM, το οποίο περιείχε Βόειο Εμβρυικό Ορό (FBS) 10% v/v, γλουταμίνη 1% v/v και αντιβιοτικό διάλυμα πενικιλίνης στρεπτομυκίνης 1% v/v. Οι καλλιέργειες τοποθετήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο υπό ελεγχόμενες συνθήκες καλλιέργειας 5% CO_2 , σταθερή θερμοκρασία 37°C και 95% σχετικής υγρασίας. Ως δείγματα αναφοράς θεωρήθηκαν οι πλαστικοί πυθμένες του πολυτριβλίου καλλιέργειας, που αντιπροσωπεύουν τις ιδανικές συνθήκες προσκόλλησης και ανάπτυξης των κυττάρων. Οι καλλιέργειες διήρκησαν 24, 48, 72

ώρες και 7 ημέρες και εξετάστηκε η βιοσυμβατότητα των πρωτότυπων υλικών καθώς και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η προσκόλληση των κυττάρων στην επιφάνειά τους. Έγινε επίσης έλεγχος οστικής διαφοροποίησης.

Έλεγχος Βιοσυμβατότητας

Για τον έλεγχο της βιοσυμβατότητας, μετά το πέρας του εκάστοτε πειραματικού χρόνου για τα καλλιεργημένα με οστεοβλάστες βιοϋλικά καθώς και για τους μάρτυρες, έγινε ανίχνευση της κυτταρικής απόπτωσης με τη χρήση δύο φθορίζουσών ουσιών (FDA/PI) 5 ml διαλύματος διοξικής φθοροσεΐνης και προπίδιο του Ιωδίου (Fluoresceine DiAcetate /Propidium Iodide FDA/PI). Το διάλυμα διατηρήθηκε επί 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε ένα σκοτεινό και υγρό μέρος. Στο μικροσκόπιο φθορισμού τα ζωντανά κύτταρα εμφανίζονται με πράσινο χρώμα (βαφή FDA) κάτω από το μπλε φως διέγερσης FITC, ενώ τα νεκρά κύτταρα παρατηρούνται με πορτοκαλί - κόκκινο χρώμα με βαφή PI κάτω από το πράσινο φως διέγερσης TEXAS RED. Ελήφθησαν φωτογραφίες από 5 τυχαίες περιοχές του δείγματος, των οποίων έγινε στη συνέχεια ψηφιακή επεξεργασία μέσω του προγράμματος ImageJ. Για κάθε δείγμα μετρήθηκαν τα ζωντανά και τα νεκρά κύτταρα κάθε μιας από τις 5 τυχαίες περιοχές και υπολογίστηκε ο μέσος όρος βιωσιμότητας.

Κυτταρικός Πολλαπλασιασμός

Η μέθοδος MTT (MTT colorimetric assay) βασίζεται στην ιδιότητα των ζωντανών (μεταβολικά ενεργών) κυττάρων να ανάγουν ένα άλας του τετραζολίου (3{4,5-διμέθυλθειαζολ-2-yl}-2,5 βρωμίδιο του διφαινυλο-τετραζολίου), με τη βοήθεια του μιτοχονδριακού ενζύμου ηλεκτρική αφυδρογονάση (succinic dehydrogenase), με αποτέλεσμα να παράγονται ως προϊόν ιώδεις κρύσταλλοι. Οι κρύσταλλοι αυτοί είναι δυνατό να διαλυτοποιηθούν με τη βοήθεια κατάλληλων οργανικών διαλυτών και να προσδιοριστεί στη συνέχεια φασματοφωτομετρικά (οπτική απορρόφηση) η έκταση της αντίδρασης. Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων τόσο πιο έντονος είναι ο σχηματισμός των κρυστάλλων τετραζολίου και τόσο μεγαλύτερη οπτική απορρόφηση καταγράφεται σε μήκος κύματος από 570-600 nm. Επομένως η δοκιμασία MTT αντανακλά άμεσα τη μιτοχονδριακή δραστηριότητα και κατ' επέκταση τη ζωτικότητα (viability) και το ρυθμό αύξησης (growth rate) ενός κυτταρικού πληθυσμού.

Προετοιμασία για παρατήρηση μέσω Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Σάρωσης

Για την παρατήρηση σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, τα δείγματα έπρεπε να περάσουν από τις φάσεις της μονιμοποίησης, ξήρανσης και επιχρύσωσης. Οι πληροφορίες που λήφθηκαν από τις εικόνες SEM είναι μεγάλης σημασίας όσον αφορά τη συμπεριφορά των κυττάρων σε σχέση με την επιφάνεια επαφής και την μορφολογία που έχουν σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα επώασης και παρουσιάζονται στο επόμενο κεφάλαιο.

Έλεγχος Οστικής Διαφοροποίησης

Η ικανότητα οστεογενετικής διαφοροποίησης των άωρων οστεοβλαστών εξετάστηκε μέσω ενός από τους πρωταρχικούς βιοχημικούς δείκτες οστικής διαφοροποίησης, το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση (ALP). Για την ποσοτικοποίηση της αλκαλικής φωσφατάσης χρησιμοποιήθηκε η χρωματομετρική μέθοδος QUANTI-Blue (InVivogen, USA), η οποία καθορίζει τη δραστηριότητα του ενζύμου σε κάποιο βιολογικό δείγμα, όπως το υπερκείμενο υλικό καλλιιεργειών οστεοβλαστικών κυτταρικών. Παρουσία της αλκαλικής φωσφατάσης, το υπόστρωμα QUANTI Blue αλλάζει χρώμα και από ροζ γίνεται μπλε. Με το πέρας των κυτταρικών καλλιιεργειών προστέθηκαν 200 ml από το διάλυμα QUANTI-Blue και 20 ml υπερκείμενου υλικού από κάθε δείγμα και επώαστηκαν για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η οπτική απορρόφηση κατεγράφη σε μήκος κύματος από 620-655 nm σε φασματοφωτόμετρο ELISA reader.

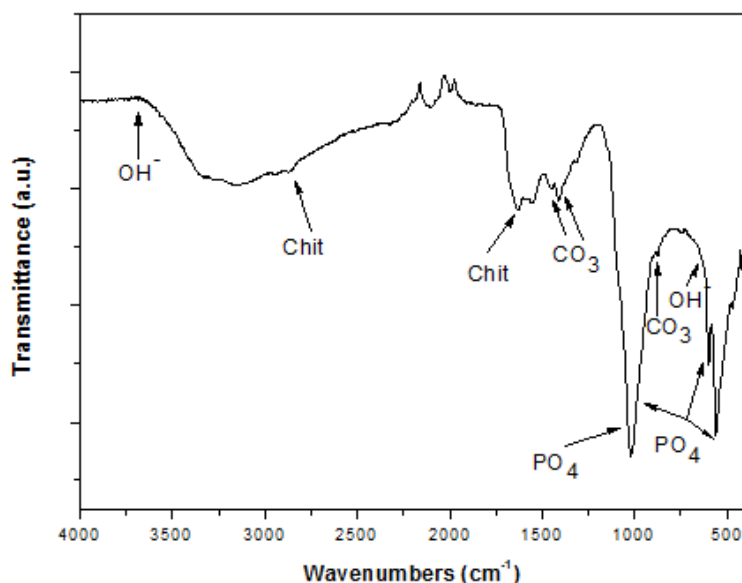
Δεδομένου ότι τα υλικά είναι πρότυπα, αναμένεται οι κυτταρικές καλλιιεργειες να συντελέσουν στην βελτιστοποίηση της παρασκευής τους και στην επιβεβαίωση της βιοσυμβατότητά τους. Τα πειράματα επανελήφθησαν 3 φορές.

7. Αποτελέσματα και Συζήτηση

7.1. Ανάπτυξη υβριδικών νανο- κρυστάλλων υδροξυαπατίτη-βιομορίων

7.1.1. Φασματοσκοπία Υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR)

Αιωρήματα υδροξυαπατίτη, χιτοζάνης και L-αργινίνης



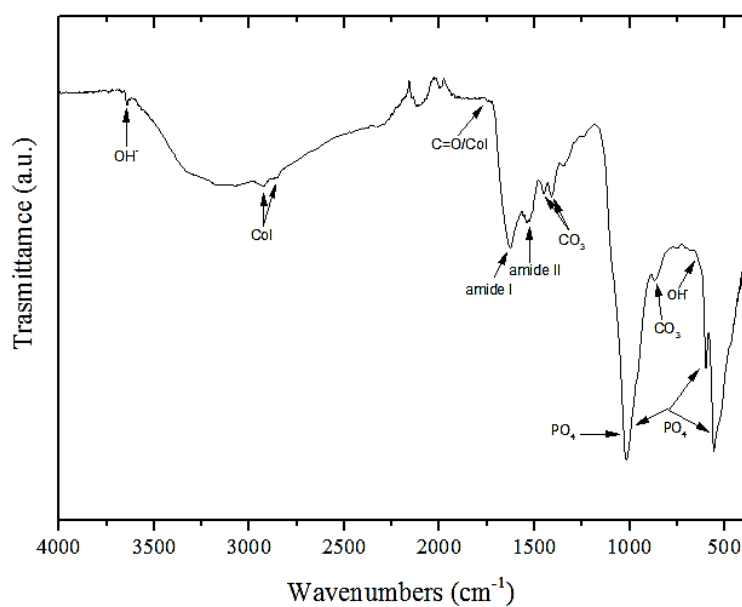
Σχήμα 7.1 Φάσμα FTIR-ATR για ικρίωματα HAp-Chit τα οποία αναπτύχθηκαν με λυοφιλίωση

Πραγματοποιείται ανάλυση με υπέρυθη φασματομετρία μετασχηματισμού Fourier των αιωρημάτων υδροξυαπατίτη, τα οποία αναπτύχθηκαν παρουσία της χιτοζάνης και της L-αργινίνης. Στο παραπάνω διάγραμμα που παρουσιάζεται παρατηρούνται όλες οι χαρακτηριστικές κορυφές που αποδεικνύουν την ανάπτυξη κρυστάλλων υδροξυαπατίτη παρουσία χιτοζάνης και L-αργινίνης. Συγκεκριμένα, στους κυματάριθμους 1018 και 1088 cm^{-1} εμφανίζονται οι κορυφές που αντιστοιχούν στις αντι-συμμετρικές ν_3 δονήσεις τάσης των φωσφορικών ομάδων (PO_4) ενώ στα 965 cm^{-1} η κορυφή των συμμετρικών ν_1 δονήσεων τάσης τους. Οι ν_4 δονήσεις κάμψεως των ίδιων φωσφορικών ομάδων εντοπίζονται στα 599, 570 και 558 cm^{-1} . Επιπλέον, εντοπίζονται στα 3573 και στα 642 cm^{-1} κορυφές, οι οποίες αποδίδονται στις συμμετρικές δονήσεις τάσης και στις δονήσεις κάμψεως αντίστοιχα, των ομάδων του υδροξυλίου του υδροξυαπατίτη.

Τέλος, τα φάσματα υπέρυθρης φασματοσκοπίας των δειγμάτων που έχουν αναπτυχθεί παρουσία της χιτοζάνης εμφανίζουν τις κορυφές που αντιστοιχούν στις

αλληλεπιδράσεις των μορίων της χιτοζάνης περίπου στα 3345 , 2870 and 1634 cm^{-1} . Οι κορυφές της χιτοζάνης προκύπτουν έπειτα από σύγκριση των φασμάτων των αιωρημάτων του υδροξυαπατίτη με το αντίστοιχο φάσμα υπέρυθρης φασματοσκοπίας καθαρής χιτοζάνης [119,122].

Αιωρήματα υδροξυαπατίτη, κολλαγόνου και L-αργινίνης



Σχήμα 7.2 Φάσμα FTIR-ATR για ικρίωματα HAp-Col τα οποία αναπτύχθηκαν με λυοφιλίωση.

Στο σχήμα 7.2 παρατηρούνται όλες οι χαρακτηριστικές κορυφές που αποδεικνύουν την ανάπτυξη κρυστάλλων υδροξυαπατίτη παρουσία κολλαγόνου και L-αργινίνης. Συγκεκριμένα, οι κορυφές που εντοπίζονται στα 556 και στα 596 cm^{-1} , αποδίδονται στις ν_4 τάσεις κάμψεως των δεσμών O-P-O [123, 124]. Επιπλέον, η κορυφή στα 1016 προκύπτει από τις αντι-συμμετρικές ν_3 δονήσεις τάσης των δεσμών P-O, ενώ η κορυφή στα 963 cm^{-1} αποδίδεται στις συμμετρικές ν_1 δονήσεις τάσης των φωσφορικών ομάδων (PO_4) [125]. Η κορυφή που εμφανίζεται στα 3644 cm^{-1} αντιστοιχεί στις συμμετρικές εκτάσεις των δεσμών των ιόντων υδροξυλίου (OH^-), σε συνδυασμό με την κορυφή στα 645 cm^{-1} , η οποία αντιστοιχεί στις δονήσεις κάμψεως των ιόντων υδροξυλίου του υδροξυαπατίτη [126, 127].

Στη συνέχεια, οι κορυφές που εμφανίζονται στα 1453 , 1408 και 871 cm^{-1} αποδεικνύουν την ύπαρξη ανθρακικών ιόντων στα ικρίωματα του υδροξυαπατίτη. Πράγματι, η κορυφή στα 1453 cm^{-1} αποδίδεται στις ν_3 δονήσεις τάσης των ανθρακικών ιόντων (CO_3^{2-}) [128] και η κορυφή στα 875 cm^{-1} στις ν_2 δονήσεις τάσης των ίδιων ομάδων [129]. Επιπλέον, η κορυφή στα 1412 cm^{-1} υποδεικνύει την ύπαρξη ανθρακικών

ιόντων στα δείγματα, τα οποία οφείλονται σε ίχνη από διαλυμένο διοξείδιο του άνθρακα (CO₂) [124].

Στο φάσμα FTIR μπορούν επίσης να εντοπιστούν και οι χαρακτηριστικές κορυφές των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μορίων του κολλαγόνου στα 2930 και 2853 cm⁻¹. Η κορυφή που αντιστοιχεί στο αμίδιο I του κολλαγόνου εμφανίζεται στα 1627 cm⁻¹, ενώ η κορυφή στα 1526 cm⁻¹ αποδίδεται στην παραμόρφωση του δεσμού N-H του αμιδίου II του κολλαγόνου [128, 130]. Τέλος, η ύπαρξη του κολλαγόνου στα ικρίωματα μπορεί επιπλέον να αποδειχθεί από την κορυφή που εμφανίζεται στα 1748 cm⁻¹ και οφείλεται στις δονήσεις τάσης των καρβοξυλικών ομάδων του αμιδίου I του κολλαγόνου (δεσμός C=O) [131].

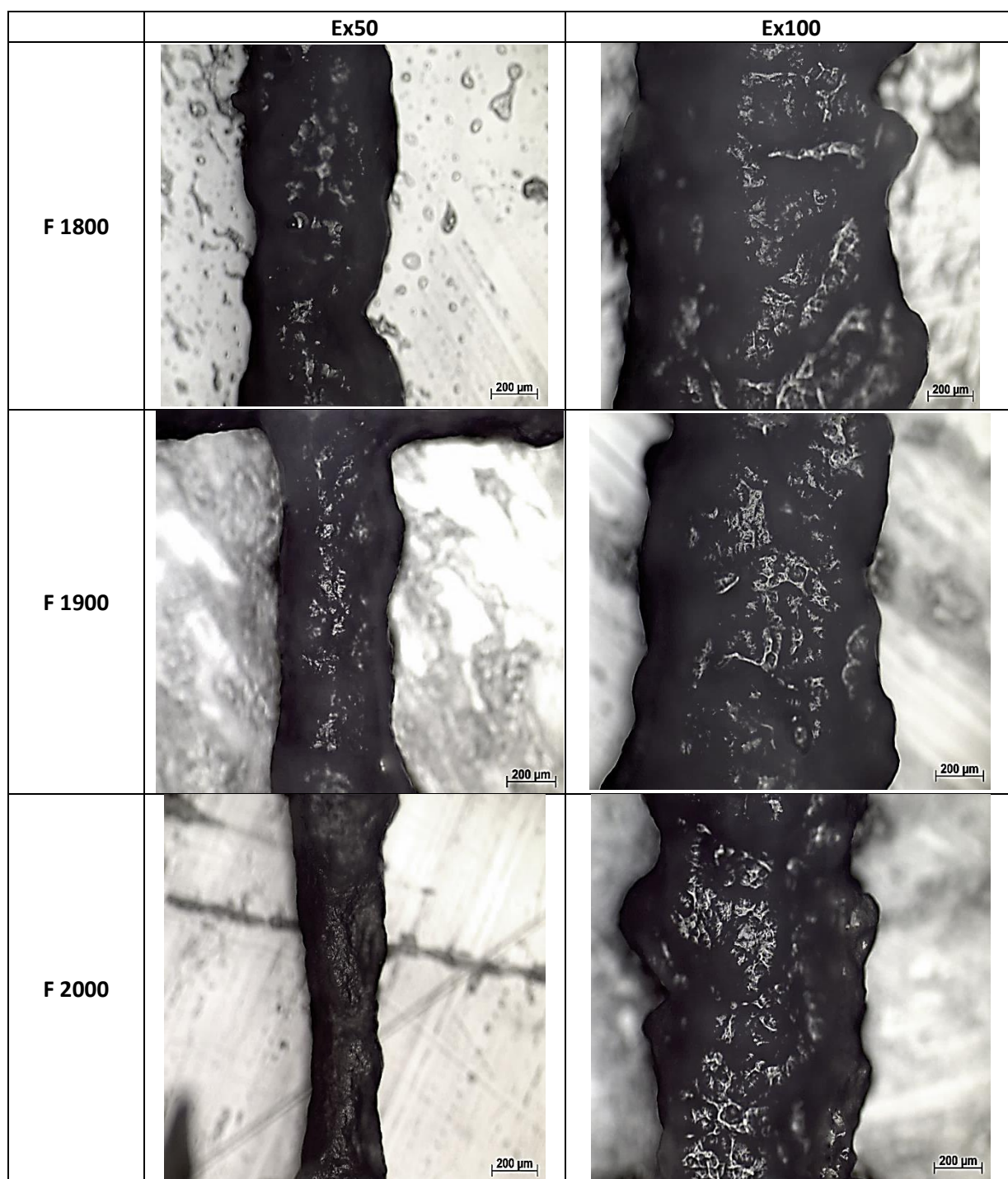
7.2. Ανάπτυξη τριδιάστατα εκτυπωμένων υβριδικών ικριωμάτων υδροξυαπατίτη-βιομορίων

7.2.1. Οπτική Μικροσκοπία

Η παρατήρηση των υβριδικών ικριωμάτων που ελήφθησαν μετά από κάθε εκτύπωση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου. Η οπτική μικροσκοπία επέτρεψε τη σύγκριση των δειγμάτων που είχαν παρασκευαστεί με διαφορετικές τιμές των παραμέτρων “ταχύτητα πρόωσης F” και “ρυθμού τροφοδοσίας E”, καθώς και με διαφορετικά μοτίβα, συντελώντας επομένως στην εύρεση των βέλτιστων τιμών των παραμέτρων αυτών [133]. Παράλληλα, έγινε παρατήρηση των ικριωμάτων πριν και μετά τη διαδικασία αφαίρεσης νερού μέσω της λυοφιλίωσης ώστε να βρεθεί το ποσοστό συρρίκνωσης των ινών του πλέγματος. Οι εικόνες που ελήφθησαν από την οπτική μικροσκοπία, οι πίνακες με τις πειραματικές τιμές του πλάτους ινών, καθώς και ο σχολιασμός τους, παρατίθενται παρακάτω.

Εύρεση βέλτιστων παραμέτρων E και F

➤ Για τη σύνθεση χιτοζάνης



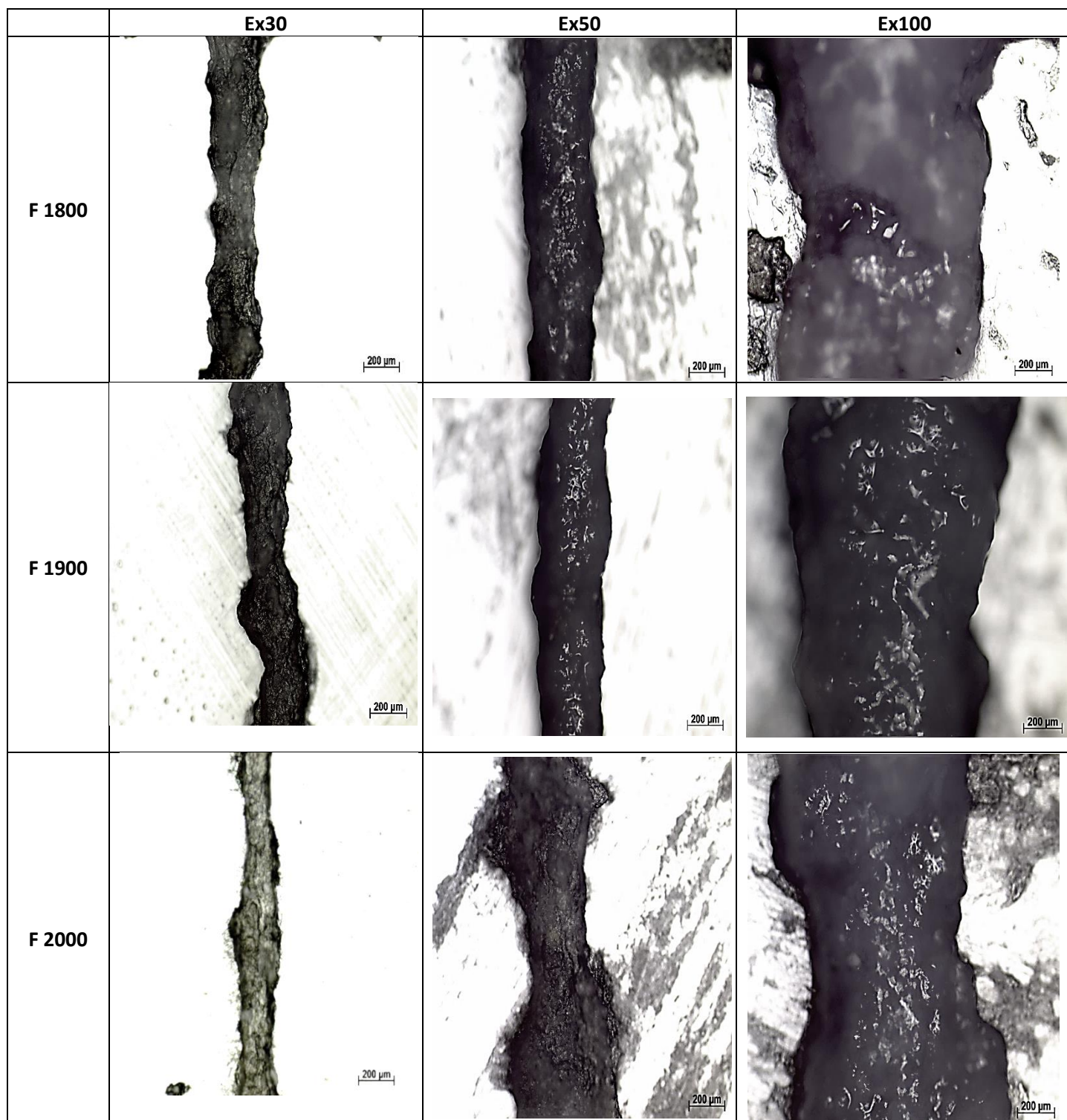
Σχήμα 7.3 Εικόνες οπτικού μικροσκοπίου για τα υβριδικά ικρίσματα Har παρουσία του βιομορίου χιτοζάνης και του αμινοξέος L-αργινίνη στο οποίο έχει προστεθεί υδρογέλη ζελατίνης, μεταβαλλόμενων των παραμέτρων εκτόπωσης E και F.

<i>Μέτρηση για F1800</i>	<i>d (Ex40)</i>	<i>d (Ex50)</i>	<i>d (Ex60)</i>	<i>d (Ex70)</i>	<i>d (Ex80)</i>	<i>d (Ex90)</i>	<i>d (Ex100)</i>
<i>1</i>	547,26	588,36	972,60	732,88	832,19	921,23	1203,42
<i>2</i>	954,11	662,33	659,59	736,30	780,82	1107,53	1062,33
<i>3</i>	643,15	521,92	537,67	675,34	589,04	1219,18	864,39
<i>4</i>	547,26	954,11	608,22	1056,17	1110,82	873,97	1132,88
<i>5</i>	508,90	774,66	989,04	1100,68	1030,82	1001,37	954,11
<i>d̄</i>	640,14	700,28	753,42	860,27	868,74	1024,66	1043,43
<i>τυπική απόκλιση</i>	182,39	170,10	212,13	201,23	207,47	140,226	146,08

<i>Μέτρηση για F1900</i>	<i>d (Ex40)</i>	<i>d (Ex50)</i>	<i>d (Ex60)</i>	<i>d (Ex70)</i>	<i>d (Ex80)</i>	<i>d (Ex90)</i>	<i>d (Ex100)</i>
<i>1</i>	521,23	885,62	720,55	765,07	1100,68	956,85	1004,79
<i>2</i>	473,97	939,73	800,00	893,15	908,91	1017,81	1174,66
<i>3</i>	400,68	954,11	736,30	509,43	860,96	947,27	1539,46
<i>4</i>	623,97	716,44	486,30	1043,84	706,85	1004,79	1315,07
<i>5</i>	768,50	457,53	1030,82	950,68	665,07	733,56	1424,67
<i>d̄</i>	557,67	790,69	754,79	832,43	848,49	932,06	1291,73
<i>τυπική απόκλιση</i>	143,02	208,83	194,83	206,90	174,00	114,99	209,54

<i>Μέτρηση για F2000</i>	<i>d (Ex40)</i>	<i>d (Ex50)</i>	<i>d (Ex60)</i>	<i>d (Ex70)</i>	<i>d (Ex80)</i>	<i>d (Ex90)</i>	<i>d (Ex100)</i>
<i>1</i>	-	361,64	518,49	435,62	839,04	1116,44	1091,78
<i>2</i>	-	275,34	537,67	710,27	537,67	896,58	832,19
<i>3</i>	-	409,59	547,26	793,84	495,89	742,47	841,79
<i>4</i>	-	217,81	508,90	428,77	445,21	1058,91	886,30
<i>5</i>	-	403,12	426,03	586,99	653,42	761,67	972,60
<i>d̄</i>	-	333,50	507,67	591,10	594,25	915,21	924,93
<i>τυπική απόκλιση</i>	-	83,96	48,09	162,67	156,93	169,49	108,53

➤ Για τη σύνθεση κολλαγόνου



Σχήμα 7.4 Εικόνες οπτικού μικροσκοπίου για τα υβριδικά ικρίωματα Haρ παρουσία του βιομορίου κολλαγόνου και του αμινοξέος L-αργινίνη στο οποίο έχει προστεθεί υδρογέλη ζελατίνης, μεταβαλλόμενων των παραμέτρων εκτύπωσης E και F.

<i>Μέτρηση για F1800</i>	<i>d (Ex30)</i>	<i>d (Ex40)</i>	<i>d (Ex50)</i>	<i>d (Ex60)</i>	<i>d (Ex70)</i>	<i>d (Ex80)</i>	<i>d (Ex90)</i>	<i>d (Ex100)</i>
1	246,58	329,47	409,59	473,97	835,62	742,47	784,25	1148,63
2	256,99	378,09	390,41	745,89	857,53	1043,75	950,00	941,10
3	330,15	326,03	556,86	563,70	550,68	556,85	803,42	608,22
4	313,70	393,85	780,82	519,18	687,68	831,37	679,45	870,55
5	302,38	460,96	352,05	630,14	914,38	665,75	864,38	741,10
ḍ	289,96	377,68	497,95	586,58	769,18	768,04	816,30	861,92
<i>τυπική απόκλιση</i>	36,41	55,20	176,17	106,09	148,06	184,22	100,14	204,64

<i>Μέτρηση για F1900</i>	<i>d (Ex30)</i>	<i>d (Ex40)</i>	<i>d (Ex50)</i>	<i>d (Ex60)</i>	<i>d (Ex70)</i>	<i>d (Ex80)</i>	<i>d (Ex90)</i>	<i>d (Ex100)</i>
1	256,16	301,37	367,81	428,77	854,11	876,71	956,85	998,63
2	271,94	403,43	413,01	669,18	771,23	943,84	804,11	1164,38
3	287,68	380,84	585,62	485,62	627,41	638,36	925,34	858,9
4	306,87	342,47	361,72	505,48	589,05	608,23	652,75	786,99
5	257,46	306,85	659,59	735,72	665,75	592,47	864,39	716,44
ḍ	276,02	346,99	477,55	564,95	701,51	731,92	840,69	905,07
<i>τυπική απόκλιση</i>	21,47	44,84	136,42	130,77	109,05	165,36	120,29	178,64

<i>Μέτρηση για F2000</i>	<i>d (Ex30)</i>	<i>d (Ex40)</i>	<i>d (Ex50)</i>	<i>d (Ex60)</i>	<i>d (Ex70)</i>	<i>d (Ex80)</i>	<i>d (Ex90)</i>	<i>d (Ex100)</i>
1	210,96	297,26	336,30	406,85	669,18	752,05	665,75	797,26
2	301,11	271,92	576,03	521,92	572,60	825,37	762,33	1132,88
3	223,97	230,14	307,55	278,08	492,47	663,72	499,32	761,64
4	239,75	317,14	195,21	380,82	617,81	585,62	812,33	541,10
5	307,53	387,04	284,95	342,47	822,60	538,36	697,26	876,72
ḍ	257,26	300,7	340,01	386,03	634,93	673,02	687,40	821,92
<i>τυπική απόκλιση</i>	45,50	58,19	142,10	90,11	123,36	117,60	119,54	213,78

Κατά την εκτύπωση των υβριδικών κριωμάτων χιτοζάνης, μεταβαλλόμενων παραμέτρων, παρατηρήθηκε πως αύξηση του συντελεστή της ταχύτητας του εμβόλου E είχε ως αποτέλεσμα ίνες πλέγματος αυξανόμενης διαμέτρου. Ωστόσο, σε πολύ χαμηλές τιμές του συντελεστή (x10, x20) δεν ήταν εφικτή η εκτύπωση του υλικού, ενώ σε

σχετικά χαμηλές τιμές (x30, x40) οι ίνες που προέκυπταν χαρακτηρίζονταν από ομοιομορφία και μικρή διάμετρο, όμως η ροή του υλικού ήταν συνεχής μόνο μετά το όριο διαρροής του.

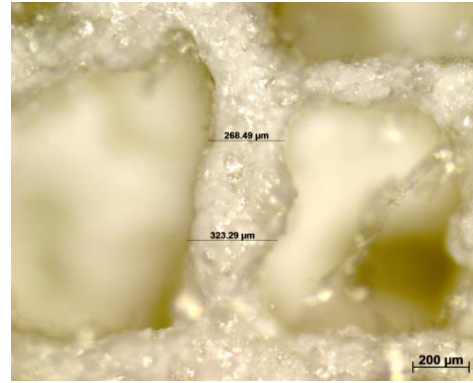
Αντίστροφη συμπεριφορά εμφάνισε η ταχύτητα πρόωσης F, μιας και η αύξησή της επέφερε ίνες ελαττωμένης διαμέτρου και υψηλότερης ομοιομορφίας. Φυσικά οι δύο αυτές παράμετροι δεν ήταν ανεξάρτητες μεταξύ τους, αφού αύξηση της ταχύτητας πρόωσης απαιτούσε και υψηλότερη ταχύτητα εμβόλου προκειμένου να ρυθμιστεί η ογκομετρική παροχή. Τέλος, η διακύμανση του πλάτους μεταξύ των ινών ήταν υψηλή, καθώς τα πλέγματα που παρατηρήθηκαν αποτελούνταν από ίνες διαφόρων τιμών.

Τα υβριδικά ικριώματα κολλαγόνου παρουσιάζουν παρόμοια συμπεριφορά με τα υβριδικά ικριώματα χιτοζάνης. Ωστόσο, οι ίνες, που προκύπτουν για σταθερές παραμέτρους, έχουν γενικά μικρότερο πλάτος συγκριτικά με εκείνες του υλικού χιτοζάνης μιας και το υλικό εξωθείται δυσκολότερα αλλά πιο ομοιόμορφα. Ως αποτέλεσμα, το υλικό κολλαγόνου απαιτεί υψηλότερες τιμές του συντελεστή της ταχύτητας του εμβόλου συγκριτικά με το υλικό χιτοζάνης.

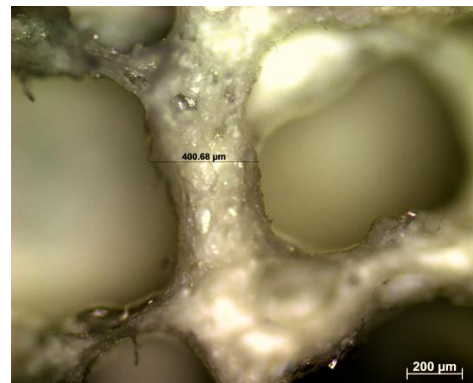
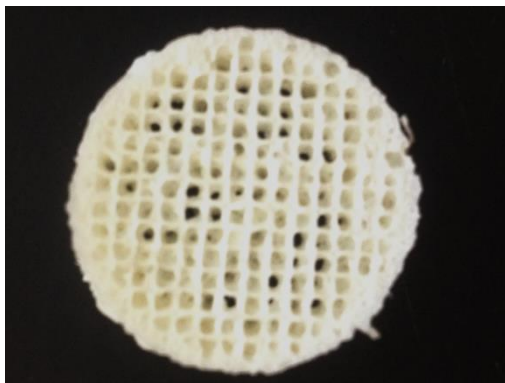
Εύρεση βέλτιστου μοτίβου πλέγματος εκτύπωσης

Όσον αφορά τα δύο διαφορετικά υλικά προς εκτύπωση, το μελάνι με τη χιτοζάνη φάνηκε να επηρεάζεται περισσότερο από τις ασκούμενες σε αυτό διατμητικές τάσεις με αποτέλεσμα να είναι πιο δύσκολο στο χειρισμό του και στην εκτύπωση του. Έτσι, ενώ με το υλικό κολλαγόνου επιτεύχθηκε με επιτυχία η εκτύπωση ικριωμάτων πυκνότερου πλέγματος, το υλικό χιτοζάνης δεν κατάφερε να επιφέρει επαναλήψιμα αποτελέσματα.

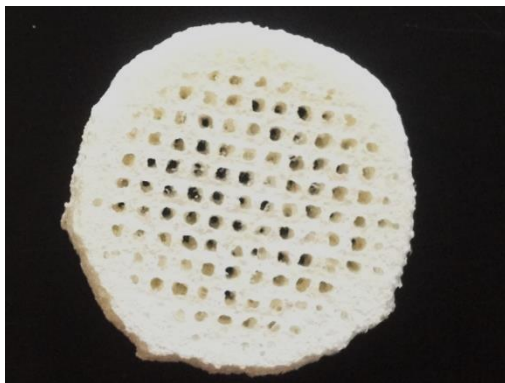
Για την εύρεση του βέλτιστου πλέγματος εκτύπωσης δοκιμάστηκαν εκτυπώσεις του υλικού κολλαγόνου μεταβαλλόμενου πλάτους ινών (path width), ύψους στρώσης (layer height) και ποσοστού πλήρωσης. Τα ικριώματα κολλαγόνου αποτελούνταν από 9 στρώσεις εναποτεθειμένου υλικού και προορίστηκαν για κυτταροκαλλιέργειες, έτσι η επιλογή των πλεγμάτων έγινε με γνώμονα την εφικτότητα του ικριώματος να συγκρατήσει στο πλέγμα του τα κύτταρα.



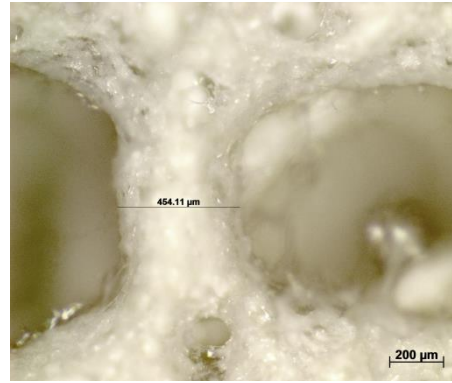
Εικόνα 7.1 αριστερά: ικρίωμα κολλαγόνου-υδροξυαπατίτη-ζελατίνης εκτυπωμένου με παραμέτρους F1800, Ex30, ονομαστικό πλάτος ίνας 600 μm, ονομαστικό ύψος στρώσεως 400μm, 9 στρώσεων δεξιά: εικόνα από οπτικό μικροσκόπιο μεγέθυνσης x100, φίλτρο Brightfield.



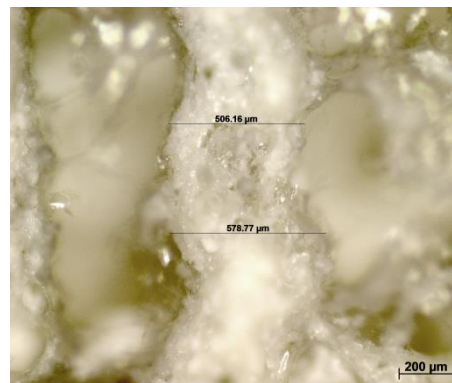
Εικόνα 7.2 αριστερά: ικρίωμα κολλαγόνου-υδροξυαπατίτη-ζελατίνης εκτυπωμένου με παραμέτρους F1800, Ex30, ονομαστικό πλάτος ίνας 700 μm, ονομαστικό ύψος στρώσεως 400μm, 9 στρώσεων, δεξιά: εικόνα από οπτικό μικροσκόπιο μεγέθυνσης x100, φίλτρο Brightfield.



Εικόνα 7.3 αριστερά: ικρίωμα κολλαγόνου-υδροξυαπατίτη-ζελατίνης εκτυπωμένου με παραμέτρους F1800, Ex40, ονομαστικό πλάτος ίνας 700 μm, ονομαστικό ύψος στρώσεως 400μm, 9 στρώσεων, δεξιά: εικόνα από οπτικό μικροσκόπιο μεγέθυνσης x100, φίλτρο Brightfield.



Εικόνα 7.4 αριστερά: ικρίωμα κολλαγόνου-υδροξυαπατίτη-ζελατίνης εκτυπωμένου με παραμέτρους F1800, Ex40, ονομαστικό πλάτος ίνας 800 μm, ονομαστικό ύψος στρώσεως 400μm, 9 στρώσεων, δεξιά: εικόνα από οπτικό μικροσκόπιο μεγέθυνσης x100, φίλτρο Brightfield.



Εικόνα 7.5 αριστερά: ικρίωμα κολλαγόνου-υδροξυαπατίτη-ζελατίνης εκτυπωμένου με παραμέτρους F1800, Ex50, ονομαστικό πλάτος ίνας 800 μm, ονομαστικό ύψος στρώσεως 400μm, 9 στρώσεων, δεξιά: εικόνα από οπτικό μικροσκόπιο μεγέθυνσης x100, φίλτρο Brightfield.

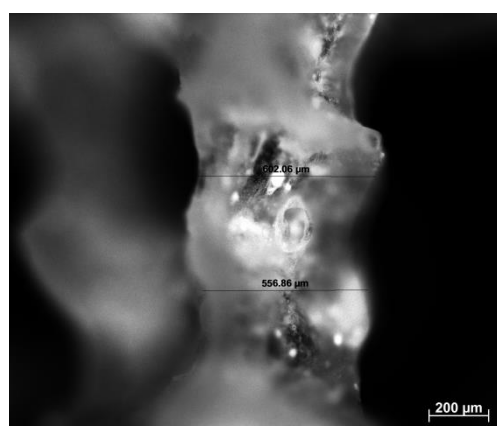
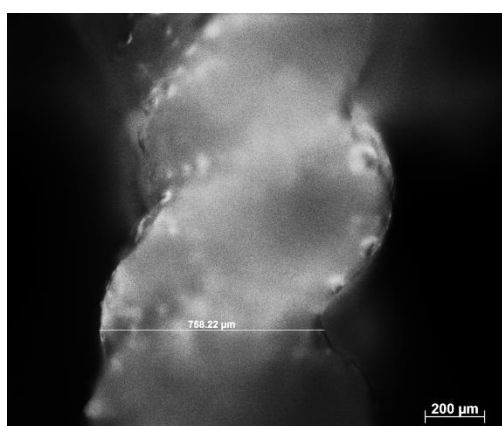
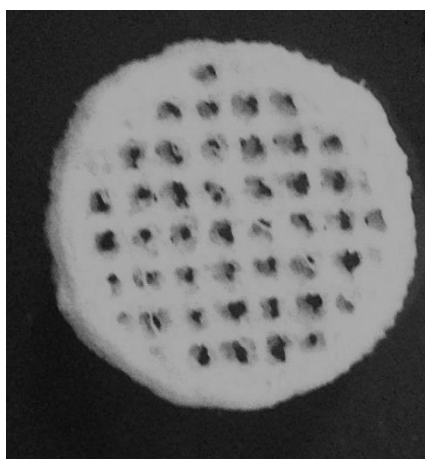
Το ακριβέστερο και βέλτιστο για κυτταροκαλλιέργειες πλέγμα πλήρωσης εμφάνισαν τα ικρίωματα με τις κατασκευαστικές παραμέτρους F1800, Ex30, ονομαστικό πλάτος ίνας 700 μm και ονομαστικό ύψος στρώσης 400 μm. Έτσι, τα ικρίωματα αυτά του κολλαγόνου οδηγήθηκαν προς κυτταροκαλλιέργειας.

Αντίστοιχα, προέκυψαν τα ικρίωματα χιτοζάνης-υδροξυαπατίτη-ζελατίνης με κατασκευαστικές παραμέτρους F1800 και Ex20,30, ενώ το ονομαστικό πλάτος των ινών κυμάνθηκε από 0,6 έως 0,8 mm, όπως και στα ικρίωματα κολλαγόνου.

Εύρεση ποσοστού συρρίκνωσης ινών από τη διαδικασία αφαίρεσης νερού (Λυοφιλίωση - Freeze Drying)

Για την εύρεση του ποσοστού συρρίκνωσης των ινών από τη διαδικασία της λυοφιλίωσης έγινε παρατήρηση των ινών πριν και μετά την αφαίρεση του νερού.

➤ Για τη σύνθεση χιτοζάνης

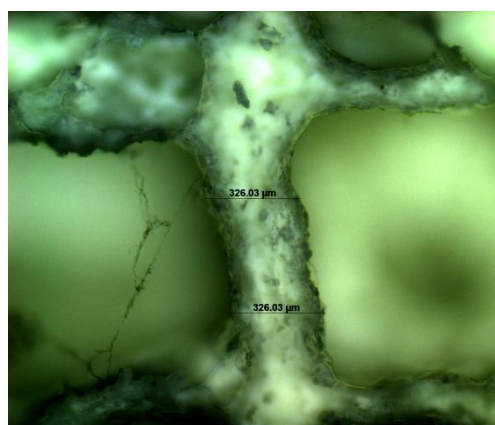
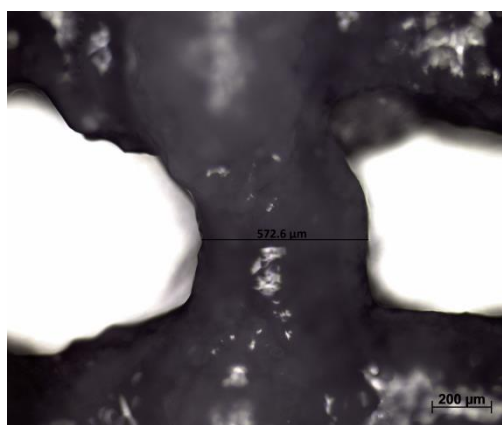
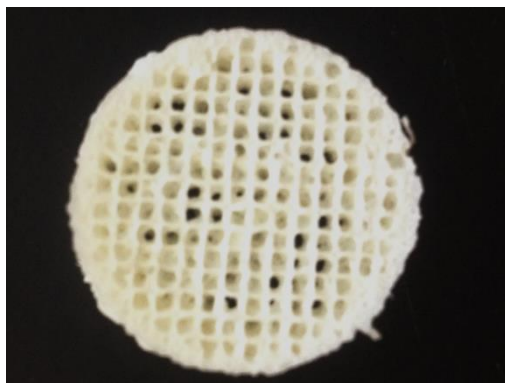


Εικόνα 7.6 πάνω: ικρίωμα χιτοζάνης-υδροξυαπατίτη-ζελατίνης εκτυπωμένου με παραμέτρους F1800, Ex50, ονομαστικό πλάτος ίνας 800 μm, ονομαστικό ύψος στρώσεως 400μm, 10 στρώσεων, κάτω αριστερά: εικόνα οπτικού μικροσκοπίου μεγένθυσης x100 πριν τη λυοφιλίωση, φίλτρο Polarised, κάτω δεξιά: εικόνα οπτικού μικροσκοπίου μεγένθυσης x100 μετά τη λυοφιλίωση, φίλτρο Polarised.

Ο πίνακας με τις τιμές των πλατών των ινών για τα ικρίσματα χιτοζάνης-υδροξυαπατίτη-ζελατίνης εκτυπωμένων με παραμέτρους F1800, Ex50, ονομαστικού πλάτος ίνας 800 μm, ονομαστικού ύψος στρώσεως 400μm, 10 στρώσεων όπως παρατηρήθηκαν στο οπτικό μικροσκόπιο πριν και μετά τη μέθοδο της λυοφιλίωσης είναι ο εξής:

Μέτρηση	Πλάτος ίνα d (μm) <i>PPIN</i>	Πλάτος ίνας d (μm) <i>META</i>
1	620,55	463,75
2	800,06	578,81
3	841,78	476,75
4	835,62	336,30
5	563,01	573,50
6	758,22	602,08
7	793,84	556,82
8	784,25	313,71
9	854,11	377,40
10	605,51	608,42
d	745,70	488,75
τυπική απόκλιση	107,85	112,62
Ποσοστό συρρίκνωσης	34,46%	

➤ Για τη σύνθεση κολλαγόνου



Εικόνα 7.7 πάνω: ικρίωμα κολλαγόνου-υδροξυαπατίτη-ζελατίνης εκτυπωμένου με παραμέτρους F1800, Ex30, ονομαστικό πλάτος ίνας 700 μm, ονομαστικό ύψος στρώσεως 400μm, 9 στρώσεων, κάτω αριστερά: εικόνα οπτικού μικροσκοπίου μεγένθυσης x100 πριν τη λυοφιλίωση, φίλτρο Brightfield, κάτω δεξιά: εικόνα οπτικού μικροσκοπίου μεγένθυσης x100 μετά τη λυοφιλίωση, φίλτρο Polarised.

Ο πίνακας με τις τιμές των πλατών των ινών για τα ικρίωματα κολλαγόνου-υδροξυαπατίτη-ζελατίνης εκτυπωμένων με παραμέτρους F1800, Ex30, ονομαστικού πλάτος ίνας 700 μm, ονομαστικού ύψος στρώσεως 400μm, 9 στρώσεων όπως παρατηρήθηκαν στο οπτικό μικροσκόπιο πριν και μετά τη μέθοδο της λυοφιλίωσης είναι ο εξής:

Μέτρηση	Πλάτος ίνα d (μm) <i>IPIN</i>	Πλάτος ίνας d (μm) <i>META</i>
1	745,89	518,49
2	700,68	525,35
3	694,52	367,82
4	822,60	529,88
5	742,47	313,52
6	736,60	317,12
7	576,71	438,36
8	671,92	326,03
9	451,38	467,13
10	691,79	367,82
\bar{d}	689,46	417,51
τυπική απόκλιση	108,04	89,16
Ποσοστό συρρίκνωσης	39,44%	

Κατά συνέπεια, το ποσοστό συρρίκνωσης των ινών κατά τη διαδικασία της λυοφιλίωσης βρέθηκε ίσο με **34,46 %** για τα ικρίωματα της χιτοζάνης και **39,44 %** για τα ικρίωματα του κολλαγόνου. Τα ποσοστά για τα δύο υλικά δεν έχουν μεγάλη απόκλιση πειραματικά, καθώς στις δύο συνθέσεις περιέχεται παραπλήσια ποσότητα νερού και κατά τη φυγοκέντρηση, επίσης, αποβάλλονται σχεδόν ίσοι όγκοι νερού.

7.2.2. Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (SEM) – Μελέτη εσωτερικού πορώδους

Ο χαρακτηρισμός της πορώδους δομής των ικριωμάτων υδροξυαπατίτη έγινε με τη λήψη εικόνων από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης SEM. Εξετάσθηκαν τέσσερα ικρίωματα κολλαγόνου με πλέγμα διαφορετικού πλάτους ινών και ποσοστού πληρώσεως και ένα ικρίωμα χιτοζάνης.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί σε προηγούμενη ενότητα, απαραίτητη προϋπόθεση για την παρασκευή υλικών, τα οποία θα μπορούν να εφαρμοστούν για τη θεραπεία κατεστραμμένων τμημάτων των φυσικών οστών, είναι η ανάπτυξη βιοϋλικών τριών διαστάσεων. Ωστόσο, εξίσου σημαντικό για τα υβριδικά ικρίωματα είναι να εμφανίζουν πορώδες δίκτυο με διπλή κατανομή μεγέθους των πόρων, ώστε να είναι δυνατή η ανάπτυξη των κυττάρων και των αιμοφόρων τριχοειδών αγγείων στο εσωτερικό τους. Το εσωτερικό πορώδες δίκτυο θα πρέπει να αποτελείται τόσο από μικρούς πόρους με μέσο μέγεθος περίπου στα 10 μm , όσο και πόρους μεγαλύτερους από 50 μm , έτσι ώστε να είναι δυνατή η διέλευση των κυττάρων καθώς και των θρεπτικών συστατικών που απαιτούνται για την ανάπτυξη τους, από το εσωτερικό των ικριωμάτων. Παράλληλα, όπως έχει ήδη αναφερθεί, ένα μεγάλο μέρος του πορώδους δικτύου του σπογγώδους οστού αφορά πόρους που ξεπερνούν κατά πολύ τα 100 μm . Η διατήρηση αυτής της ανοιχτής πορώδης δομής με τις κατάλληλες διαστάσεις πόρων κατά την ανάπτυξη των κυτταροκαλλιεργειών, είναι ιδιαίτερα σημαντική για την επιτυχή διασπορά των κυττάρων, την προσκόλληση, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση τους.

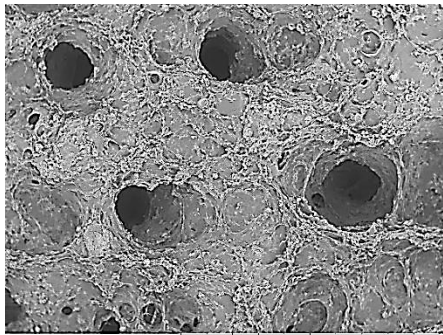
Στα Σχήματα 7.5 έως 7.9 παρουσιάζονται εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας SEM εγκάρσιων και κάθετων τομών ικριωμάτων υδροξυαπατίτη – κολλαγόνου – αργινίνης με προσθήκη ζελατίνης σε αναλογία 0.6% w/v. Οι εικόνες αυτές αντιστοιχούν σε εγκάρσιες και κάθετες τομές των ικριωμάτων, ώστε να εξάγονται συμπεράσματα και

για την ομοιογένεια της εσωτερικής δομής τους. Η σύνθεση των ικριωμάτων παραμένει μονίμως σταθερή και μεταβάλλονται μόνο οι κατασκευαστικές παράμετροι, ώστε να μελετηθεί η επίδρασή τους στο εσωτερικό πορώδες δίκτυο που αναπτύσσεται στα ικριώματα (σχήμα, μέγεθος και κατανομή μεγέθους πόρων).

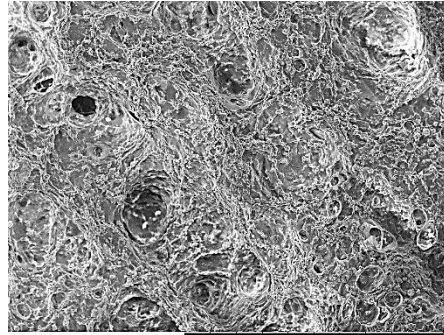
Αρχικά παρατηρείται πως τα ικριώματα παρουσιάζουν γενικά παρόμοια δομή κατά την εγκάρσια και κάθετη τομή με τη διαφορά πως εγκάρσια η μορφολογία της επιφάνειας περιέχει περιοχές πιο συμπαγείς με αρκετές αυλακώσεις. Ωστόσο, η μη ύπαρξη εκτεταμένου μικροπορώδους αποτελεί επιφανειακό φαινόμενο μιας και τα ικριώματα στο εσωτερικό τους παρουσιάζουν πορώδη δομή. Όσον αφορά τα ικριώματα των σχημάτων 7.5 και 7.7 η απουσία ομοιόμορφου πορώδους οφείλεται στις κατασκευαστικές παραμέτρους της τριδιάστατης εκτύπωσης. Πιο συγκεκριμένα, σε κάποιες περιοχές η ογκομετρική παροχή αυξάνεται ενώ η ορισμένη από το λογισμικό απόσταση μεταξύ των ινών παραμένει σταθερή με αποτέλεσμα την πιθανή συνένωση των ινών και την εξάλειψη του πορώδους από το σχεδιασμό των τριδιάστατων ικριωμάτων. Βελτιστοποίηση του G κώδικα καθώς και του ιξώδους του υλικού μπορούν να επιτρέψουν τον καλύτερο έλεγχο της ρεολογίας του κατά την εκτύπωση.

Ακόμη, παρατηρείται σποραδική εμφάνιση πόρων μικρού μεγέθους (5 έως 20 μm) σε όλα τα ικριώματα που φαίνεται να αποτελούν απόρροια της εκτύπωσης ή της εξάχνωσης του νερού κατά τη διαδικασία της λυοφιλίωσης. Το πορώδες δίκτυο που οφείλεται στα χαρακτηριστικά της επιφανειακής μορφολογίας του υλικού και της συμπεριφοράς του τόσο κατά τη λυοφιλίωση όσο και κατά την εκτύπωση περιλαμβάνει πόρους μέσης διαμέτρου από 5 έως 20 μm , πόρους 50 μm αλλά και πόρους μεγαλύτερους από 100 μm . Το πορώδες δίκτυο, που σχεδιάστηκε και δημιουργήθηκε μέσω τριδιάστατης εκτύπωσης, αποτελείται από μακροπόρους που κυμαίνονται από 300 έως 700 μm για τα ικριώματα του σχήματος 7.5, είναι μέσης διαμέτρου 700 μm για τα ικριώματα των σχημάτων 7.6 και 7.7 ενώ οι πόροι που προέκυψαν μέσω τριδιάστατης εκτύπωσης στα ικριώματα του σχήματος 7.8 κυμαίνονται από 100 έως 300 μm . Συμπεραίνεται, λοιπόν, πως το εύρος της κατανομής του μακροπορώδους επηρεάζεται από μεταβολές στην ογκομετρική παροχή του υλικού κατά την εκτύπωση.

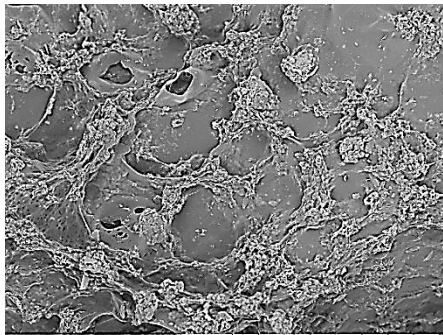
Εγκάρσια τομή



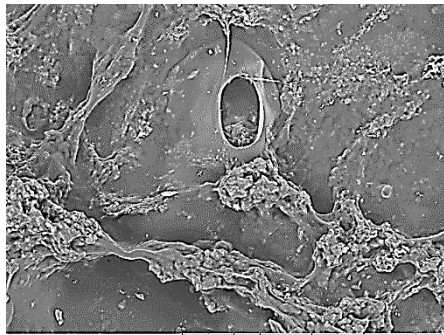
Test1040 2017/05/23 HL D5.7 x50 2 mm
Hitachi TM3030Plus



Test1185 2017/06/09 NMUD9.9 x50 2 mm
Hitachi TM3030Plus

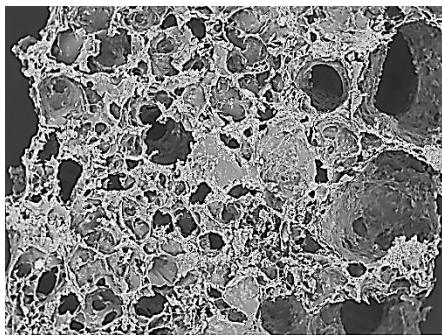


Test1043 2017/05/23 HL D5.6 x200 500 μm
Hitachi TM3030Plus

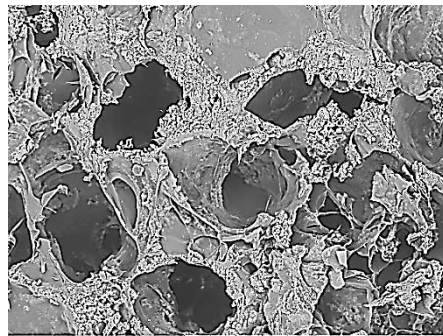


Test1045 2017/05/23 HL D5.6 x500 200 μm
Hitachi TM3030Plus

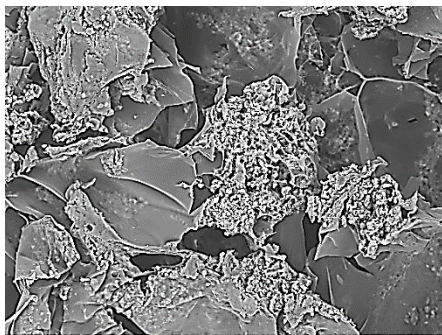
Κάθετη τομή



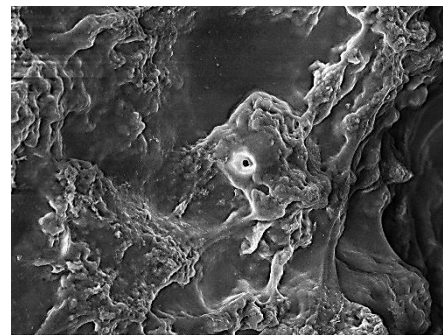
Test0984 2017/05/23 HL D6.3 x50 2 mm
Hitachi TM3030Plus



Test0970 2017/05/23 HL D6.3 x200 500 μm
Hitachi TM3030Plus



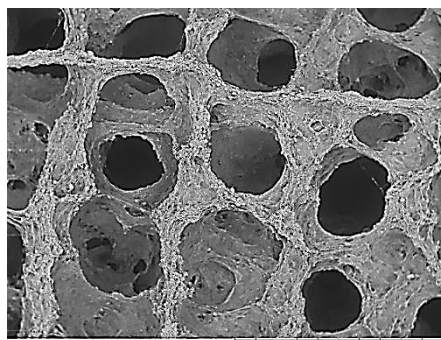
Test0973 2017/05/23 HL D6.3 x500 200 μm
Hitachi TM3030Plus



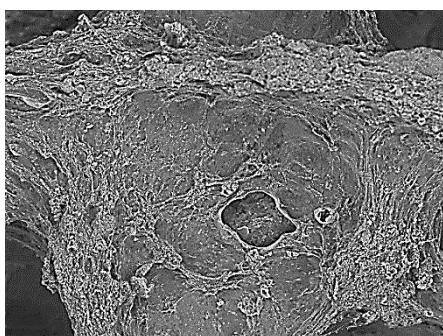
Test1187 2017/06/09 NMUD10.3 x1.0k 100 μm
Hitachi TM3030Plus

Σχήμα 7.5 Εικόνες SEM ικριωμάτων υδροξυαπατίτη-κollαγόνου-αργινίνης-ζελατίνης εκτυπωμένα με κατασκευαστικές παραμέτρους F1800, Ex30, ονομαστικού πλάτους ίνας 600μm, ύψους στρώσεως 400μm, 9 στρώσεων.

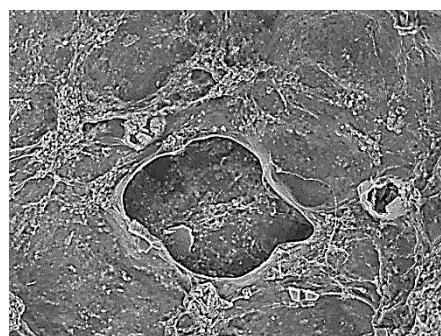
Εγκάρσια τομή



Test1011 2017/05/23 HL D5.8 x40 2 mm
Hitachi TM3030Plus

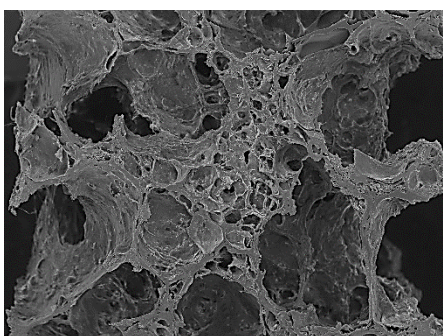


Test1015 2017/05/23 HL D6.0 x200 500 μm
Hitachi TM3030Plus

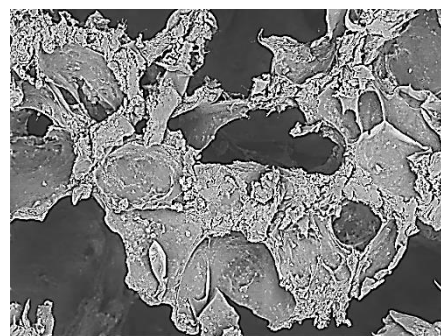


Test1018 2017/05/23 HL D6.0 x500 200 μm
Hitachi TM3030Plus

Κάθετη τομή



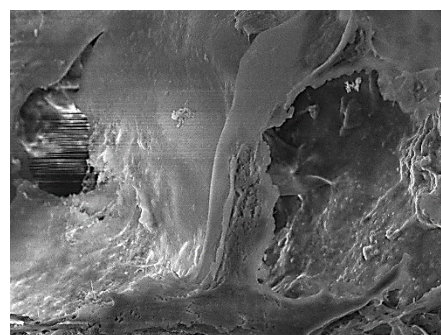
Test1165 2017/06/09 HMMD8.1 x50 2 mm
Hitachi TM3030Plus



Test0984 2017/05/23 HL D7.0 x200 500 μm
Hitachi TM3030Plus



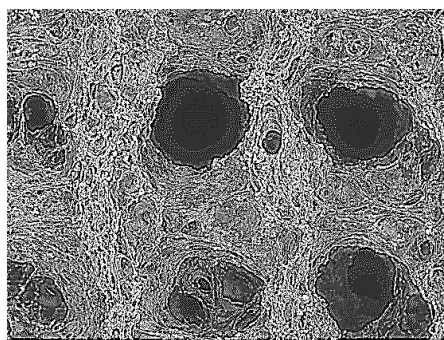
Test0988 2017/05/23 HL D7.0 x500 200 μm
Hitachi TM3030Plus



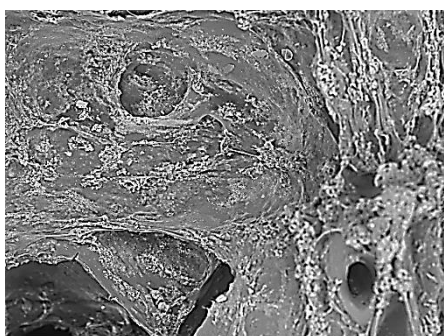
Test1171 2017/06/09 NMUD8.0 x1.0k 100 μm
Hitachi TM3030Plus

Σχήμα 7.6 Εικόνες SEM ικριωμάτων υδροξυαπατίτη-κολλαγόνου-αργινίνης-ζελατίνης εκτυπωμένα με κατασκευαστικές παραμέτρους F1800, Ex30, ονομαστικού πλάτους ίνας 700μm, ύψους στρώσεως 400μm, 9 στρώσεων.

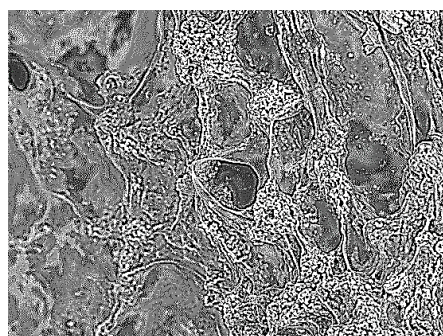
Εγκάρσια τομή



Test1029 2017/05/23 HL D5.9 x50 2 mm
Hitachi TM3030Plus

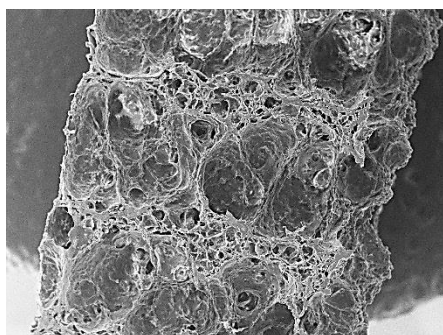


Test1033 2017/05/23 HL D5.8 x200 500 μm
Hitachi TM3030Plus

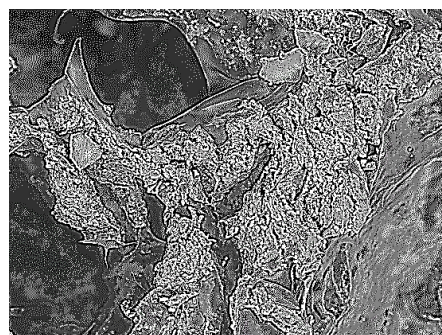


Test1038 2017/05/23 HL D5.2 x500 200 μm
Hitachi TM3030Plus

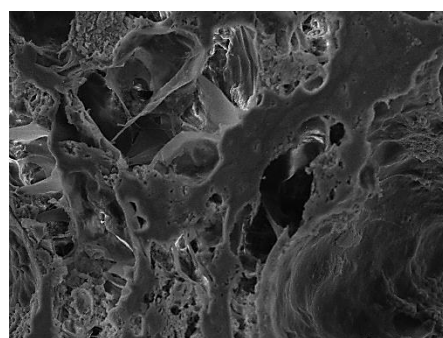
Κάθετη τομή



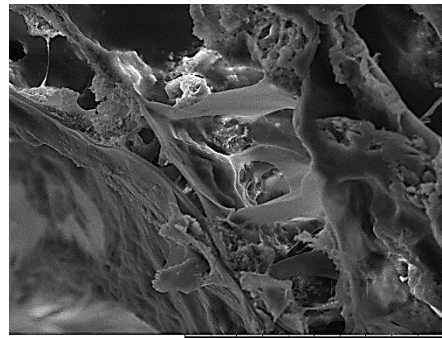
Test1176 2017/06/09 NMUD7.2 x40 2 mm
Hitachi TM3030Plus



Test0999 2017/05/23 HL D6.3 x500 200 μm
Hitachi TM3030Plus



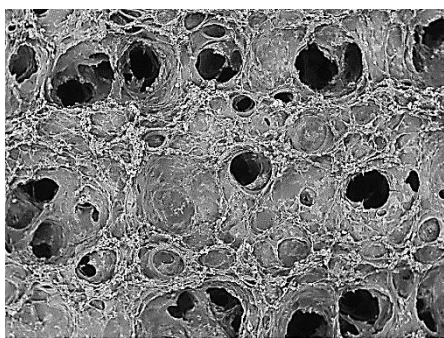
Test1181 2017/06/09 NMUD7.3 x500 200 μm
Hitachi TM3030Plus



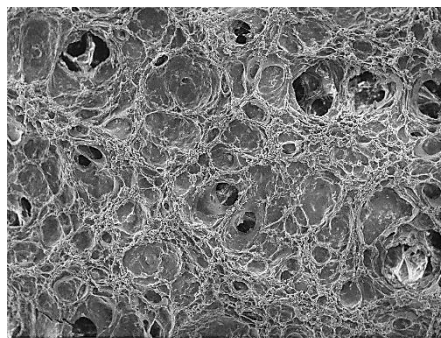
Test1179 2017/06/09 NMUD7.3 x1.0k 100 μm
Hitachi TM3030Plus

Σχήμα 7.7 Εικόνες SEM ικριωμάτων υδροξυαπατίτη-κολλαγόνου-αργινίνης-ζελατίνης εκτυπωμένα με κατασκευαστικές παραμέτρους F1800, Ex40, ονομαστικού πλάτους ίνας 800μm, ύψους στρώσεως 400μm, 9 στρώσεων.

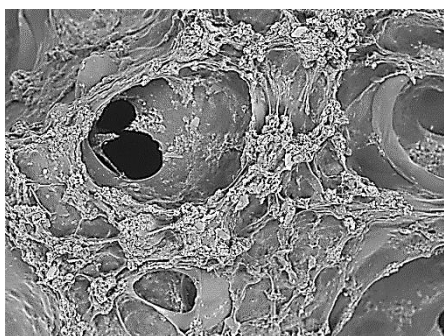
Εγκάρσια τομή



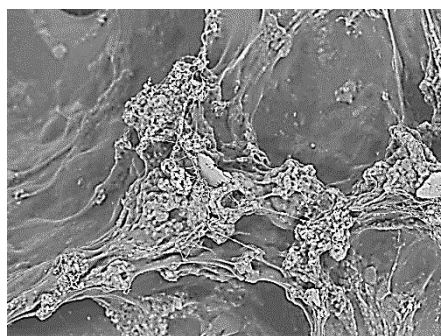
Test1019 2017/05/23 HL D5.0 x50 2 mm
Hitachi TM3030Plus



Test1191 2017/06/09 NMUD8.9 x50 2 mm
Hitachi TM3030Plus

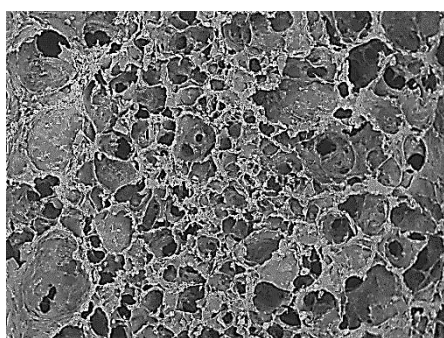


Test1025 2017/05/23 HL D4.9 x200 500 μm
Hitachi TM3030Plus

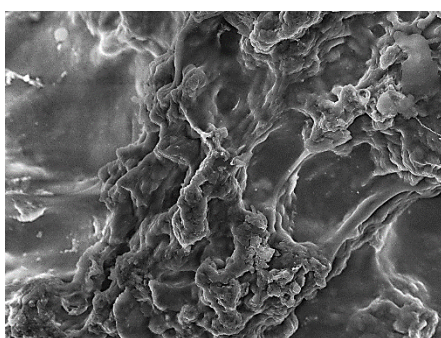


Test1023 2017/05/23 HL D4.9 x500 200 μm
Hitachi TM3030Plus

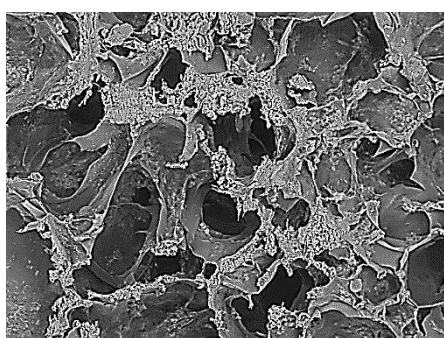
Κάθετη τομή



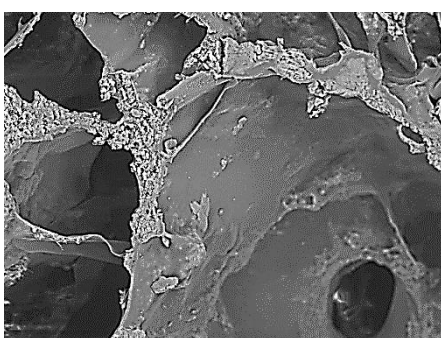
Test1001 2017/05/23 HL D5.8 x50 2 mm
Hitachi TM3030Plus



Test1190 2017/06/09 NMUD8.9 x1.0k 100 μm
Hitachi TM3030Plus



Test1004 2017/05/23 HL D5.8 x200 500 μm
Hitachi TM3030Plus



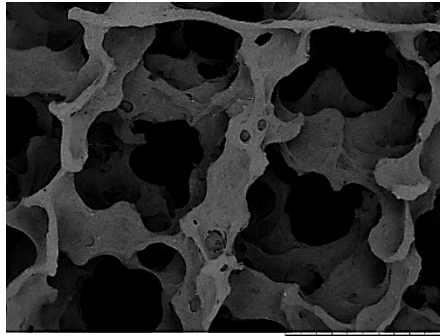
Test1009 2017/05/23 HL D5.7 x500 200 μm
Hitachi TM3030Plus

Σχήμα 7.8 Εικόνες SEM ικριωμάτων υδροξυαπατίτη-κολλαγόνου-αργινίνης-ζελατίνης εκτυπωμένα με κατασκευαστικές παραμέτρους F1800, Ex50, ονομαστικού πλάτους ίνας 800μm, ύψους στρώσεως 400μm, 9 στρώσεων.

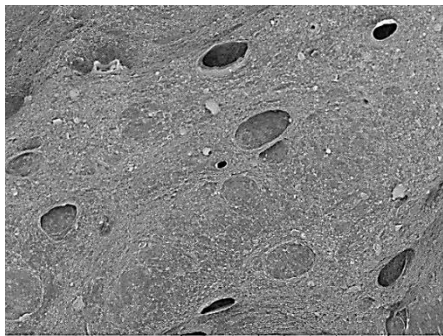
Πρέπει να σημειωθεί πως αυτή η πορώδης δομή με διπλή κατανομή μεγέθους πόρων θεωρείται ευνοϊκή για την ανάπτυξη κυττάρων, καθώς τα υλικά που εμφανίζουν σπογγοειδή μορφή τέτοιου τύπου επιτρέπουν μεγαλύτερη διεπιφάνεια και τις επιθυμητές φυσικοχημικές ιδιότητες ανάμεσα στον ιστό και το προς εμφύτευση υλικό, από ότι τα συμπαγή υλικά [132].

Η ομοιόμορφη πορώδης δομή που εμφανίζεται τόσο στις εγκάρσιες όσο και στις κάθετες τομές των κριωμάτων του σχήματος 7.6 που προορίστηκαν για κυτταροκαλλιέργειες αποδεικνύει την ύπαρξη διασυνδεσιμότητας ανάμεσα στους πόρους. Η διασυνδεσιμότητα των πόρων μπορεί να εξασφαλισθεί μέσω της σχεδίασης του πορώδους των κριωμάτων πριν την τριδιάστατη εκτύπωση. Έτσι, το πρόβλημα της απουσίας εκτενούς πορώδους από την εξάχνωση του νερού μπορεί να ξεπερασθεί με τη μέθοδο της τριδιάστατης εκτύπωσης και το επιφανειακό φαινόμενο μειωμένου μακροπορώδους των κριωμάτων να αποτελέσει πλεονέκτημα σχετικά με τη μηχανική συμπεριφορά τους.

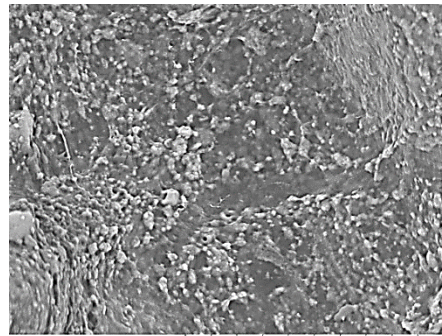
Εγκάρσια τομή



Test0903 2017/04/07 HL D10.6 x30 2 mm
Hitachi TM3030Plus

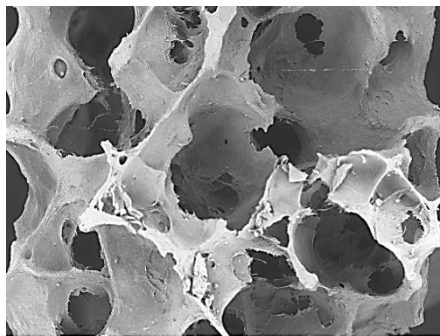


Test0899 2017/04/07 HL D9.1 x200 500 μm
Hitachi TM3030Plus

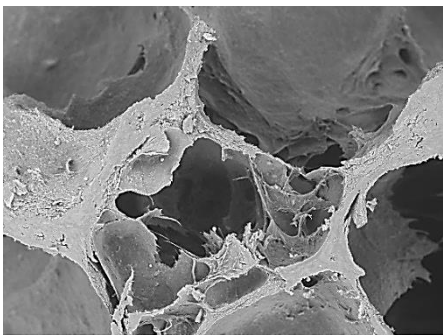


Test0901 2017/04/07 HL D9.1 x1.0k 100 μm
Hitachi TM3030Plus

Κάθετη τομή



Test0948 2017/05/23 HL D5.4 x50 2 mm
Hitachi TM3030Plus



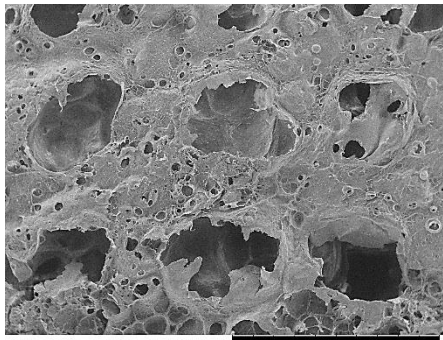
Test0954 2017/05/23 HL D4.7 x200 500 μm
Hitachi TM3030Plus



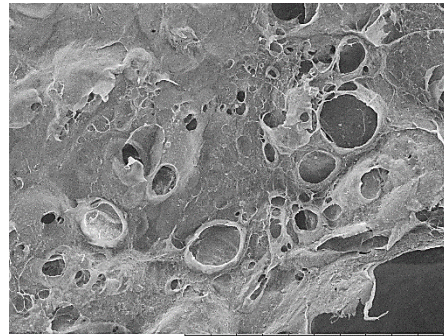
Test0962 2017/05/23 HL D4.6 x1.0k 100 μm
Hitachi TM3030Plus

Σχήμα 7.9 Εικόνες SEM κριωμάτων υδροξυαπατίτη-χιτοζάνης-αργινίνης-ζελατίνης εκτυπωμένα με κατασκευαστικές παραμέτρους F1800, Ex50, ονομαστικού πλάτους ίνας 800μm, ύψους στρώσεως 400μm, 10 στρώσεων.

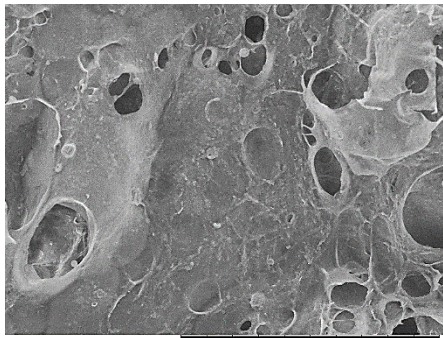
Εγκάρσια τομή



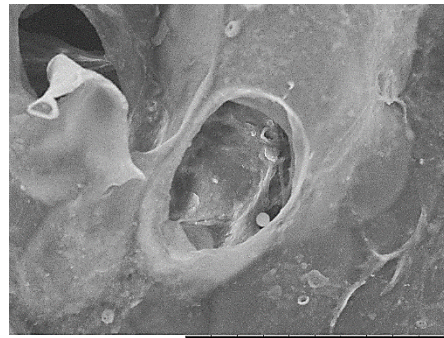
Test1192 2017/06/13 NMUD7.1 x40 2 mm
Hitachi TM3030Plus



Test1199 2017/06/13 NMUD7.3 x200 500 μm
Hitachi TM3030Plus

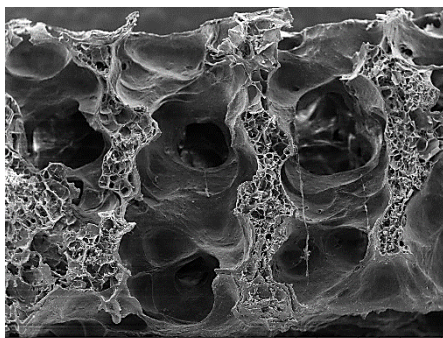


Test1201 2017/06/13 NMUD7.3 x500 200 μm
Hitachi TM3030Plus

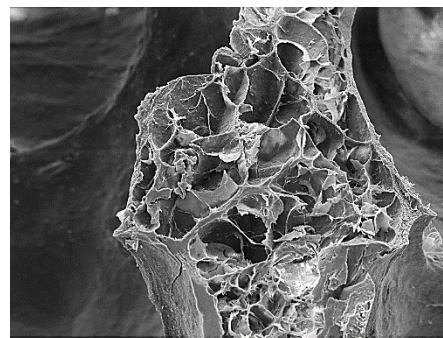


Test1196 2017/06/13 NMUD7.3 x1.0k 100 μm
Hitachi TM3030Plus

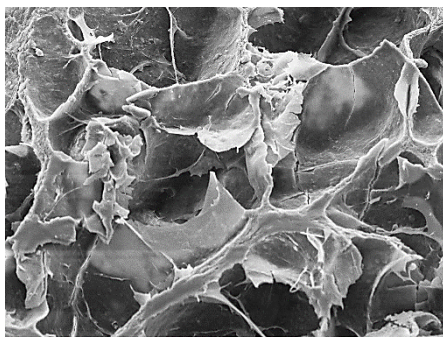
Κάθετη τομή



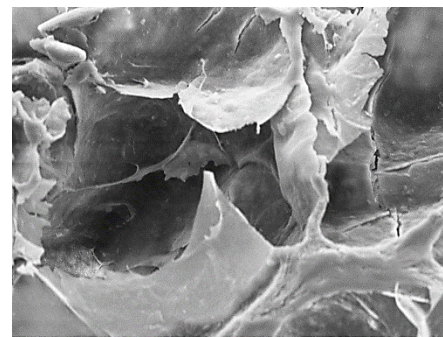
Test1241 2017/06/13 HMUD7.7 x40 2 mm
Hitachi TM3030Plus



Test1245 2017/06/13 HMUD7.7 x200 500 μm
Hitachi TM3030Plus



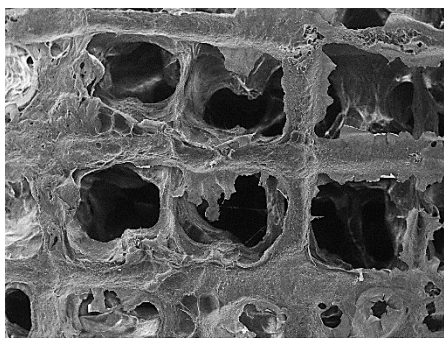
Test1247 2017/06/13 HMUD7.7 x500 200 μm
Hitachi TM3030Plus



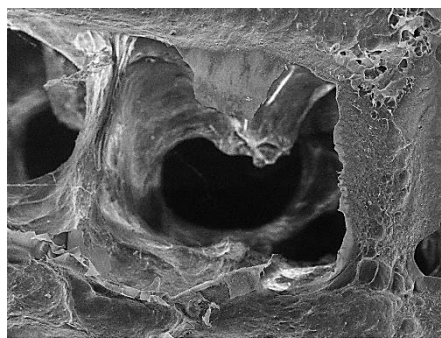
Test1248 2017/06/13 HMUD7.7 x1.0k 100 μm
Hitachi TM3030Plus

Σχήμα 7.10 Εικόνες SEM ικριωμάτων υδροξυαπατίτη-χιτοζάνης-αργίνινης-ζελατίνης εκτυπωμένα με κατασκευαστικές παραμέτρους F1800, Ex30, ονομαστικού πλάτους ίνας 800 μm, ύψους στρώσεως 400 μm, 9 στρώσεων.

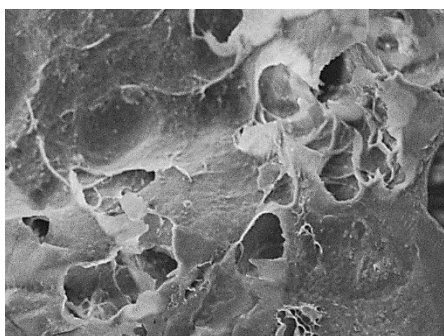
Εγκάρσια τομή



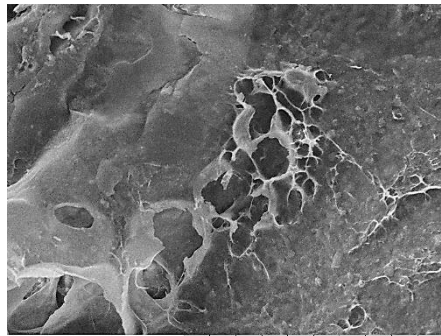
Test1206 2017/06/13 NMUD7.5 x40 2 mm
Hitachi TM3030Plus



Test1211 2017/06/13 NMUD7.5 x100 1 mm
Hitachi TM3030Plus

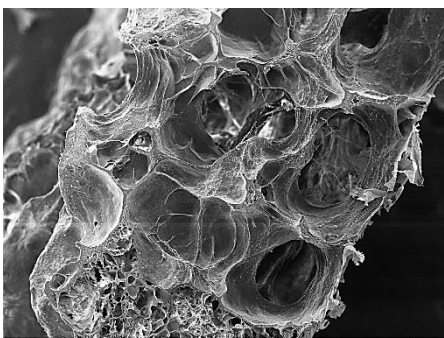


Test1212 2017/06/13 NMUD7.5 x500 200 μm
Hitachi TM3030Plus

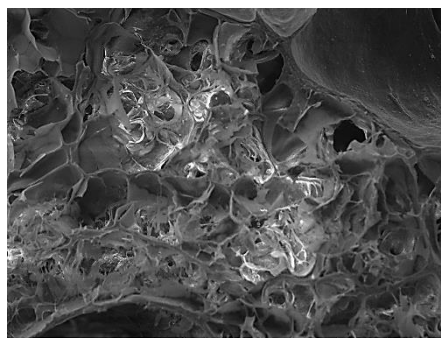


Test1216 2017/06/13 NMUD7.7 x1.0k 100 μm
Hitachi TM3030Plus

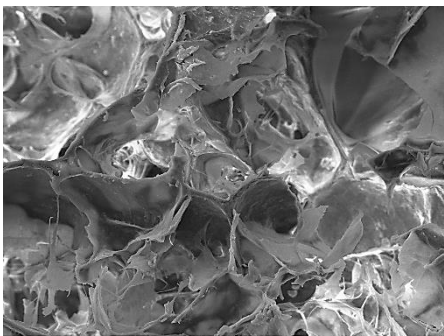
Κάθετη τομή



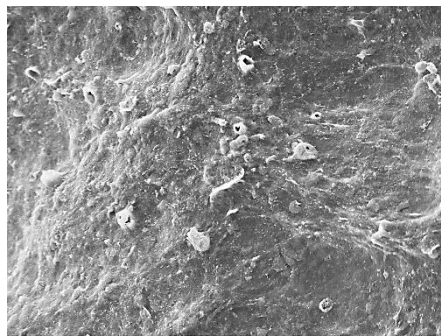
Test1253 2017/06/13 HMUD7.9 x50 2 mm
Hitachi TM3030Plus



Test1256 2017/06/13 HMUD7.9 x200 500 μm
Hitachi TM3030Plus



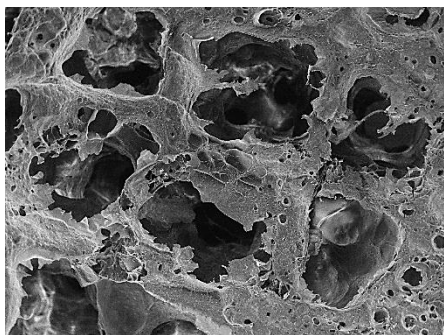
Test1258 2017/06/13 HMUD7.6 x500 200 μm
Hitachi TM3030Plus



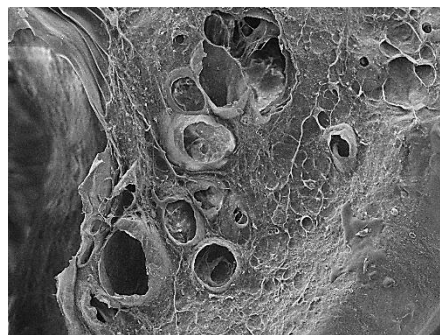
Test1251 2017/06/13 HMUD7.9 x1.0k 100 μm
Hitachi TM3030Plus

Σχήμα 7.11 Εικόνες SEM ικριωμάτων υδροξυαπατίτη-χιτοζάνης-αργινίνης-ζελατίνης εκτυπωμένα με κατασκευαστικές παραμέτρους F1800, Ex20, ονομαστικού πλάτους ίνας 700 μm, ύψους στρώσεως 400 μm, 9 στρώσεων.

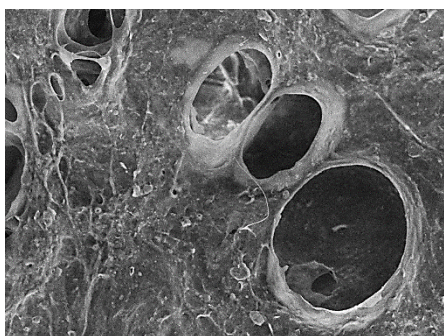
Εγκάρσια τομή



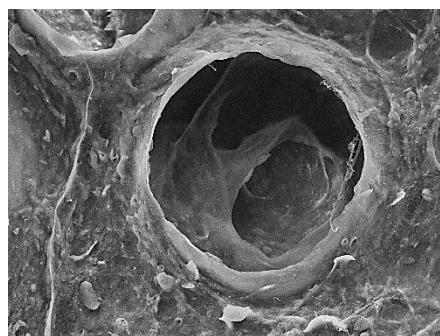
Test1225 2017/06/13 NMUD7.5 x40 2 mm
Hitachi TM3030Plus



Test1219 2017/06/13 NMUD7.5 x200 500 μm
Hitachi TM3030Plus

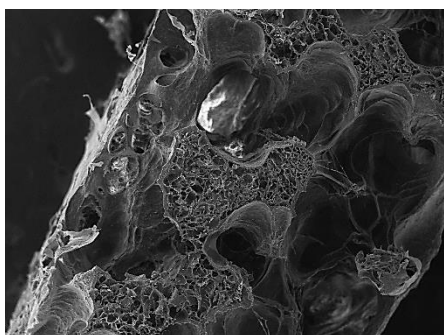


Test1229 2017/06/13 NMUD7.5 x500 200 μm
Hitachi TM3030Plus

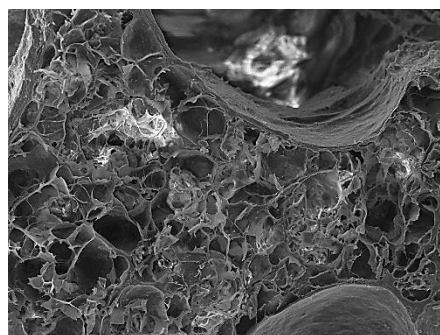


Test1217 2017/06/13 NMUD7.5 x1.0k 100 μm
Hitachi TM3030Plus

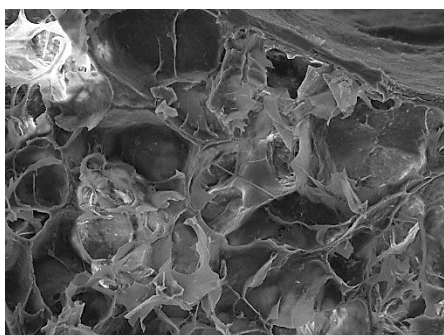
Κάθετη τομή



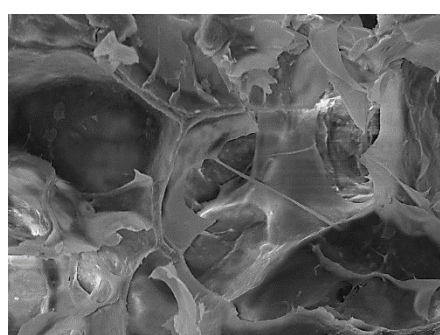
Test1265 2017/06/13 HMUD10.4 x50 2 mm
Hitachi TM3030Plus



Test1262 2017/06/13 HMUD10.4 x200 500 μm
Hitachi TM3030Plus



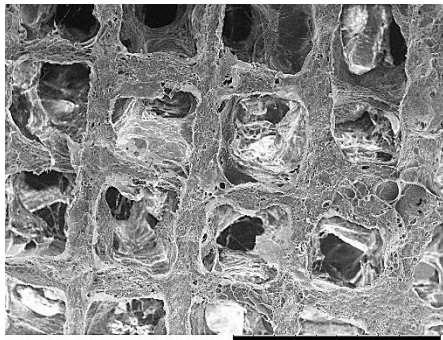
Test1261 2017/06/13 HMUD10.4 x500 200 μm
Hitachi TM3030Plus



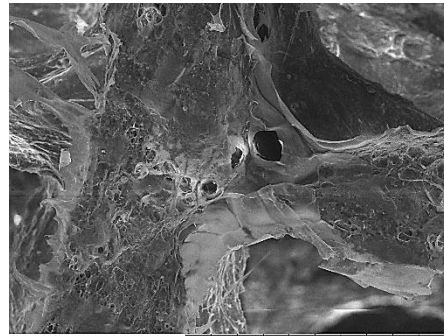
Test1260 2017/06/13 HMUD10.4 x1.0k 100 μm
Hitachi TM3030Plus

Σχήμα 7.12 Εικόνες SEM ικριωμάτων υδροξυαπατίτη-χιτοζάνης-αργινίνης-ζελατινής εκτυπωμένα με κατασκευαστικές παραμέτρους F1800, Ex20, ονομαστικού πλάτους ίνας 800 μm, ύψους στρώσεως 400 μm, 9 στρώσεων.

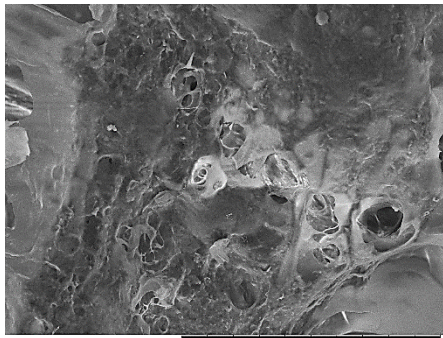
Εγκάρσια τομή



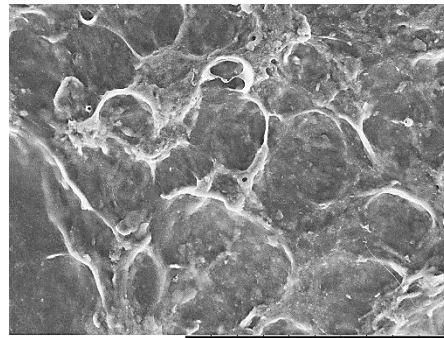
Test1233 2017/06/13 NMUD8.4 x40 2 mm
Hitachi TM3030Plus



Test1237 2017/06/13 NMUD8.4 x200 500 μm
Hitachi TM3030Plus

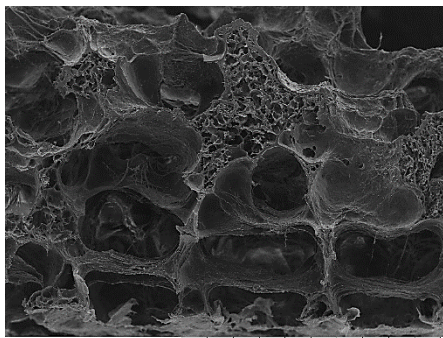


Test1239 2017/06/13 NMUD8.4 x500 200 μm
Hitachi TM3030Plus

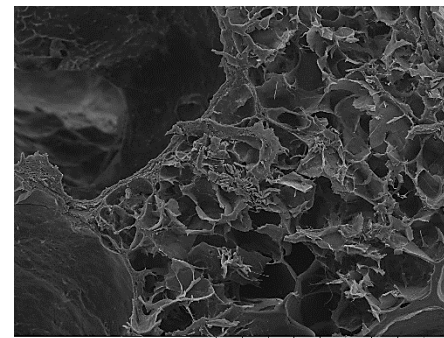


Test1232 2017/06/13 NMUD8.4 x1.0k 100 μm
Hitachi TM3030Plus

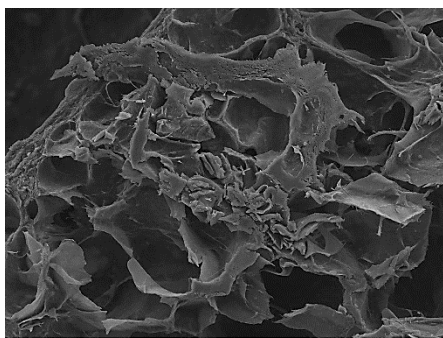
Κάθετη τομή



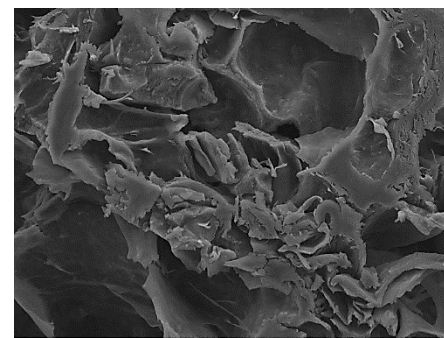
Test1275 2017/06/13 HMUD10.3 x50 2 mm
Hitachi TM3030Plus



Test1271 2017/06/13 HMUD10.3 x200 500 μm
Hitachi TM3030Plus



Test1270 2017/06/13 HMUD10.3 x500 200 μm
Hitachi TM3030Plus



Test1269 2017/06/13 HMUD10.3 x1.0k 100 μm
Hitachi TM3030Plus

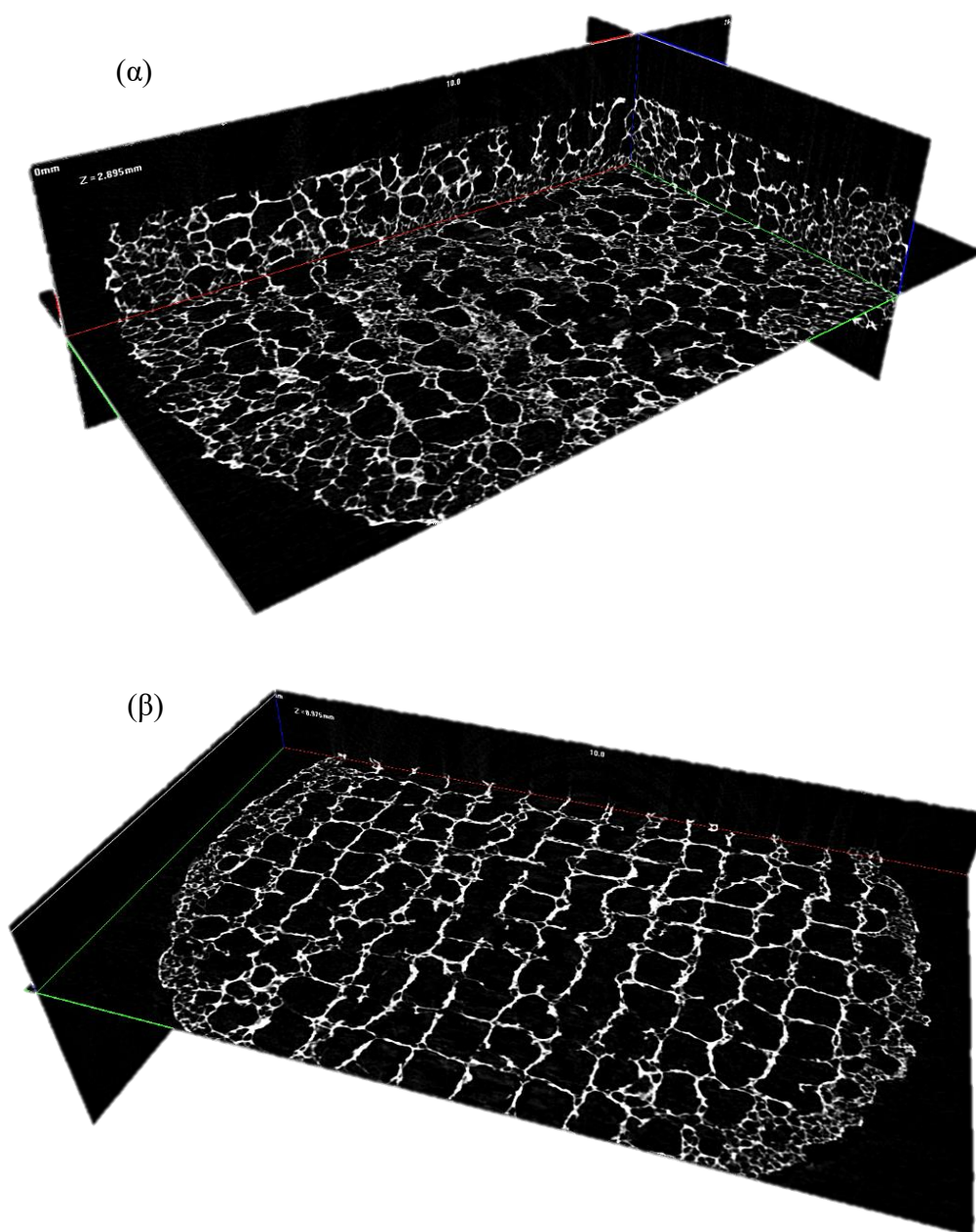
Σχήμα 7.13 Εικόνες SEM ικριωμάτων υδροξυαπατίτη-χιτοζάνης-αργινίνης-ζελατίνης εκτυπωμένα με κατασκευαστικές παραμέτρους F1800, Ex20, ονομαστικού πλάτους ίνας 600 μm, ύψους στρώσεως 400 μm, 9 στρώσεων.

Όσον αφορά τα ικρίωματα χιτοζάνης, τα Σχήματα 7.9-7.13 παρουσιάζουν τις εικόνες που ελήφθησαν από το οπτικό μικροσκόπιο. Όπως φαίνεται, οι ίνες του πλέγματος των ικριωμάτων χιτοζάνης παρουσιάζουν παρόμοια μορφολογία συγκριτικά με αυτά του κολλαγόνου και ευδιάκριτο μακροπορώδες της τριδιάστατης εκτύπωσης. Επίσης, η δομή είναι ομοιόμορφη κατά την εγκάρσια και κάθετη τομή με διπλή κατανομή μεγέθους πόρων αποδεικνύοντας, έτσι, την διαπερατότητα των πόρων. Πιο συγκεκριμένα, διακρίνονται μακροπόροι μέσης διαμέτρου 1500 μm για τα ικρίωματα του σχήματος 7.9 ενώ για τα ικρίωματα των σχημάτων 7.10 έως 7.13 που έχουν μικρότερο ποσοστό πληρώσεως, οι μακροπόροι που προκύπτουν από τριδιάστατη εκτύπωση κυμαίνονται από 700-1200 μm και διασπορά μικρότερων πόρων από 5 έως 60 μm. Το πλάτος των ινών των ικριωμάτων κυμαίνεται από 200 έως 500 μm και σχετίζεται με το μακροπορώδες της τριδιάστατης εκτύπωσης. Όσο πιο μεγάλη είναι η διάμετρος των πόρων τόσο μικρότερο προκύπτει το πλάτος των ινών. Πρέπει, ωστόσο, να σημειωθεί πως πόροι με μεγάλη μέση τιμή μεγέθους είναι πιθανό να επιδράσουν αρνητικά στην προσκόλληση των κυττάρων και στη μετέπειτα καλλιέργεια τους. Επιδρώντας στη σύνθεση του υλικού για την επίτευξη κατάλληλης ρεολογίας και μεταβάλλοντας τόσο την πυκνότητα πλέγματος όσο και το ονομαστικό πλάτος των ινών, μπορούν να επιτευχθούν οι βέλτιστες κατασκευαστικές παράμετροι έτσι ώστε να μην προκαλείται αλληλεπικάλυψη των ινών αλλά να επιτυγχάνεται το μικρότερο δυνατό μέσου μεγέθους πορώδες [133, 134, 135].

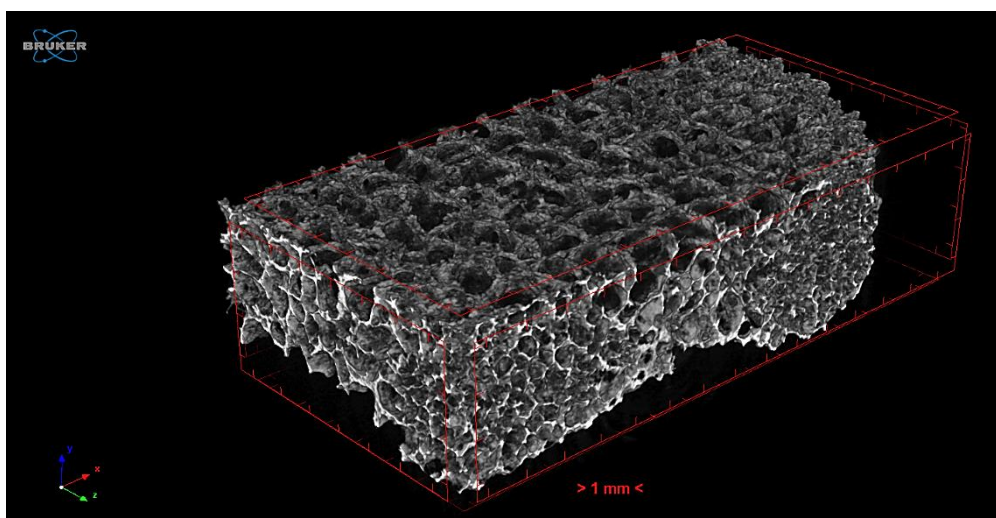
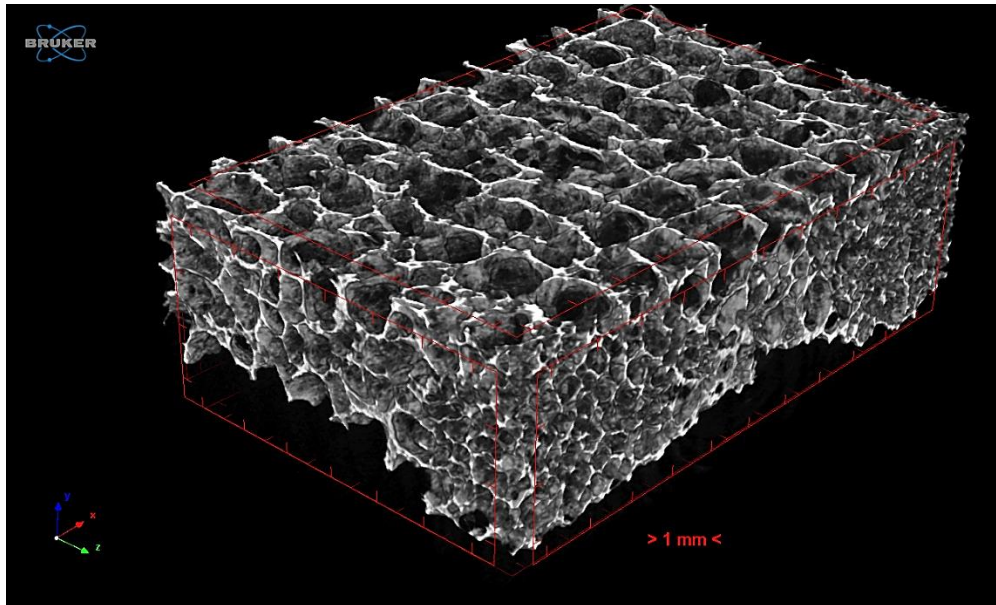
Αναφορικά με το υλικό, φαίνεται να υπάρχουν περιορισμοί κατά την εκτύπωση, μιας και οι ονομαστικές τιμές των κατασκευαστικών παραμέτρων μπορεί να διαφέρουν αρκετά από τις αντίστοιχες πειραματικές. Οι αποκλίσεις αυτές, ωστόσο, δικαιολογούνται καθώς είναι απόρροια της έλλειψης κώδικα για την εκτύπωση υδρογελών. Τα ικρίωματα της παρούσας εργασίας, όπως έχει ήδη αναφερθεί, κατασκευάστηκαν με τη χρήση κώδικα που υποστηρίζεται από θερμοπλαστικά υλικά. Η ιξωδοελαστική συμπεριφορά του μελανιού εκτύπωσης των παρατηρηθέντων ικριωμάτων έχει ως αποτέλεσμα την εύρεση των πραγματικών τιμών των κατασκευαστικών παραμέτρων μόνο πειραματικά.

7.2.3. Μικροϋπολογιστική Τομογραφία (Microcomputed Tomography-microCT) – Μελέτη πορώδους πλέγματος

Για την εξέταση της εσωτερικής δομής, και πιο συγκεκριμένα του εσωτερικού πορώδους των τριδιάστατα εκτυπωμένων ικριωμάτων υδροξυαπατίτη-κολλαγόνου-αργινίνης-ζελατίνης που προορίστηκαν για κυτταροκαλλιέργειες, έγινε ανάλυση μέσω μικροϋπολογιστικού τομογράφου (microCT). Παρακάτω παρατίθενται οι εικόνες από την ανάλυση που πραγματοποιήθηκε.



Εικόνα 7.10 Εικόνες από microCT ικριωμάτων υδροξυαπατίτη-κολλαγόνου-αργινίνης-ζελατίνης εκτυπωμένα με κατασκευαστικές παραμέτρους F1800, Ex30, ονομαστικού πλάτους ίνας 700μm, ύψους στρώσεως 400μm, 9 στρώσεων σε ύψος (α) 2,895 mm και (β) 0,975 mm.



Σχήμα 7.11 Εικόνες από microCT τρισδιάστατης συνολικής απεικόνισης ικριωμάτων υδροξυαπατίτη-κολλαγόνου-αργινίνης-ζελατίνης εκτυπωμένα με κατασκευαστικές παραμέτρους F1800, Ex30, ονομαστικού πλάτους ίνας 700μm, ύψους στρώσεως 400μm, 9 στρώσεων.

Τα αποτελέσματα της μικροϋπολογιστικής τομογραφίας συμφωνούν με εκείνα που προέκυψαν από την παρατήρηση μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας όσον αφορά στο εσωτερικό πορώδες των ικριωμάτων, ενώ παρείχαν χρήσιμες πληροφορίες για τη διασυνδεσιμότητα και την ομοιομορφία των πόρων στον χώρο.

7.2.4. Μελέτη βιοσυμβατότητας-Ανάπτυξη κυτταρικών καλλιιεργειών

Ο έλεγχος της βιοσυμβατότητας των τριδιάστατα εκτυπωμένων ικρλωμάτων δεν ήταν εφικτός, μιας και τα ικρλώματα δεν διατηρούν την δομή τους κατά το στάδιο της εμβαπτίσεως τους στο θρεπτικό υλικό. Η χημική σύσταση, και όχι οι μηχανικές ιδιότητες, των ικρλωμάτων δεν επέτρεψε την επιτυχή ανάπτυξη κυτταροκαλλιιεργειών. Αυτό οφείλεται στη διάλυση της ζελατίνης και ενυδάτωση του υλικού. Το πρόβλημα αυτό μπορεί να αντιμετωπιστεί μέσω χημικής διασύνδεσης των βιομορίων που περιλαμβάνονται στη σύνθεση των ικρλωμάτων, προσδίδοντάς τους σταθερότητα και αυξημένη μηχανική αντοχή σε υδατικό περιβάλλον για μεγάλο εύρος θερμοκρασιών και pH. Συνεπώς μελλοντική έρευνα θα μπορούσε να επικεντρωθεί στη μελέτη μη τοξικών διασυνδετών που θα προστεθούν είτε στο στάδιο της σύνθεσης του υλικού είτε στο στάδιο μετά τη λυοφιλίωση των τριδιάστατα εκτυπωμένων ικρλωμάτων.

8. Συμπεράσματα

Στη συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκε η ανάπτυξη τριδιάστατων υβριδικών ικριωμάτων υδροξυαπατίτη-φυσικών πολυμερών μέσω τριδιάστατης εκτύπωσης, με στόχο τα παραγόμενα ικριώματα να χαρακτηρίζονται από διασυνδεδεμένο πορώδες δίκτυο, διπλής κατανομής μεγέθους πόρων σε μικρο- και μακροκλίμακα και ικανοποιητικές μηχανικές αντοχές. Τα πρόδρομα αιωρήματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη αυτή αποτελούνται από νανοκρυστάλλους υδροξυαπατίτη που αναπτύχθηκαν παρουσία των βιομορίων χιτοζάνη και κολλαγόνο και του αμινοξέος L-αργινίνη, σύνθεση η οποία επιβεβαιώθηκε μέσω Φασματοσκοπίας Υπερύθρου με Μετασχηματισμό Fourier Εξασθενημένης Ολικής Ανάκλασης (FTIR-ATR). Πρόκειται για μία **βιομιμητική σύνθεση** η οποία, όπως έχει αποδειχθεί σε προηγούμενες μελέτες, είναι **ιδιαιτέρως επιτυχής αφού το σχήμα και οι διαστάσεις των κρυστάλλων του υδροξυαπατίτη που αναπτύσσονται είναι παρόμοια με τους κρυστάλλους που απαντώνται στον υδροξυαπατίτη του φυσικού οστού**. Για την **επίτευξη κατάλληλης ρεολογικής συμπεριφοράς** κατά την εκτύπωση προστέθηκε **υδρογέλη ζελατίνης**, η οποία είναι βιοσυμβατή και λειτουργεί ως πηκτικός παράγοντας για την αύξηση του ιξώδους και εμφάνιση διατμητικής λέπτυνσης των υλικών, ώστε να μπορέσουν να εξωθηθούν από το ακροφύσιο της σύριγγας και να διατηρήσουν τη μορφή που τους δίνεται μετά την εναπόθεση.

Για να θεωρηθεί η ανάπτυξη των ικριωμάτων επιτυχής, θα πρέπει στο εσωτερικό τους να φέρουν **πόρους τόσο της τάξεως των 100 μm όσο και μικρότερους με μέγεθος στα 5-50 μm**, ώστε να είναι δυνατή η διέλευση σε όλον τον όγκο του ικριώματος των κυττάρων αλλά και των θρεπτικών συστατικών που είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη και των πολλαπλασιασμό τους. Παράλληλα, **για τη μίμηση του φυσικού ανθρώπινου σπογγώδους οστού το μακροπορώδες δίκτυο πρέπει να ξεπερνά το 40% και να είναι της τάξεως των 100-500 μm**. Το μακροπορώδες των ικριωμάτων προέκυψε μέσω τριδιάστατης εκτύπωσης ενώ το εσωτερικό μικροπορώδες δίκτυο επιτεύχθηκε με χρήση της μεθόδου λυοφιλίωσης, όπου το πορώδες δίκτυο στο εσωτερικό των ικριωμάτων παράγεται μέσω της εξάχνωσης των κρυστάλλων νερού που περιέχεται στο υλικό.

Για την εκτύπωση των εργαστηριακά παρασκευασμένων υδρογελών απαιτήθηκε **τροποποίηση του G κώδικα θερμοπλαστικών υλικών και τροποποίηση του 3D**

printer. **Οι κατασκευαστικές παράμετροι** που εξετάστηκαν ως προς την επίδρασή τους στην ακρίβεια του τελικού προϊόντος και κυρίως του πλέγματος των ικριωμάτων, ήταν η **παράμετρος E**, που ορίζει την ποσότητα υλικού που εξωθείται μέσω της μετατόπισης του εμβόλου, και η **παράμετρος F** η οποία ορίζει την κίνηση όλων των κινητήρων του συστήματος, δηλαδή τόσο την ταχύτητα κίνησης της κεφαλής εκτύπωσης κατά τους XY άξονες (σε επίπεδο στρώσης) όσο και την **ογκομετρική παροχή του υλικού** (όγκος υλικού που εξωθείται ανά μονάδα χρόνου). Πιο συγκεκριμένα, τα υβριδικά δοκίμια διαμέτρου 2 cm που σχεδιάστηκαν εξετάστηκαν μέσω οπτικής μικροσκοπίας και απεδείχθη παράμετροι E και F πως παρουσιάζουν αντίστροφη επίδραση στο πλάτος των ινών του σχεδιασμένου πλαισίου. Αύξηση της παραμέτρου E έχει οδηγεί σε αύξηση του πλάτους των ινών ενώ αύξηση της παραμέτρου F επιφέρει λεπτότερες ίνες. Βρίσκοντας το βέλτιστο ζεύγος των παραμέτρων αυτών σχεδιάστηκαν ικριώματα περισσότερων στρώσεων στα οποία έγινε λυοφιλίωση και έλεγχος βιοσυμβατότητας με την ανάπτυξη κυτταροκαλλιιεργειών.

Ο χαρακτηρισμός του πορώδους δικτύου των τριδιάστατα εκτυπωμένων ικριωμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Σάρωσης (SEM) αλλά και μέσω Μικροϋπολογιστικής Τομογραφίας (microCT). Πιο συγκεκριμένα, η διασυνδεσιμότητα και η ομοιομορφία των πόρων σε όλο των όγκο των ικριωμάτων εξετάστηκε μέσω της Μικροϋπολογιστικής Τομογραφίας, η οποία αποτελεί μία μη καταστρεπτική μέθοδο για τη τριδιάστατη απεικόνιση των εκτυπωμένων δειγμάτων. Από τις εικόνες του Μικροσκοπίου SEM παρατηρήθηκε ότι τα τριδιάστατα ικριώματα βιομορίων-υδροξυαπατίτη εμφανίζουν **διπλή κατανομή πόρων η οποία προσδίδει εξαιρετική σπογγοειδή μορφή στα ικριώματα**. Οι πόροι μεγέθους από 5-100 μm φαίνεται να αποτελούν απόρροια της εκτύπωσης ή της εξάχνωσης του νερού κατά τη διαδικασία της λυοφιλίωσης. Για τα τριδιάστατα ικριώματα κολλαγόνου-υδροξυαπατίτη οι μακροπόροι που προκύπτουν μέσω τριδιάστατης εκτύπωσης κυμαίνονται από 300-700 μm, ενώ για τα τριδιάστατα ικριώματα χιτοζάνης-υδροξυαπατίτη το μακροπορώδες είναι από 700 έως 1200 μm. Η πορώδης δομή με διπλή κατανομή μεγέθους πόρων θεωρείται ευνοϊκή για την ανάπτυξη κυττάρων, καθώς **τα υλικά που εμφανίζουν σπογγοειδή μορφή τέτοιου τύπου επιτρέπουν μεγαλύτερη διεπιφάνεια και τις επιθυμητές φυσικοχημικές ιδιότητες ανάμεσα στον ιστό και το προς εμφύτευση υλικό, από ότι τα συμπαγή υλικά**. Ωστόσο, το αρκετά μεγάλο μακροπορώδες των ικριωμάτων χιτοζάνης, συγκριτικά με το μακροπορώδες των ικριωμάτων κολλαγόνου,

οφείλεται στις διαφορετικές τιμές των κατασκευαστικών παραμέτρων και μπορεί να αποτελέσει πρόβλημα για την προσκόλληση των κυττάρων κατά τις κυτταροκαλλιέργειες. Επιδρώντας στη σύνθεση του υλικού για την επίτευξη κατάλληλης ρεολογίας και μεταβάλλοντας τόσο την πυκνότητα πλέγματος όσο και το ονομαστικό πλάτος των ιών, μπορούν να επιτευχθούν οι βέλτιστες κατασκευαστικές παράμετροι έτσι ώστε να μην προκαλείται αλληλεπικάλυψη των ιών αλλά να επιτυγχάνεται το μικρότερο δυνατό μέσου μεγέθους πορώδες.

Τα ικρίωματα υδροξυαπατίτη-βιομορίων που αναπτύχθηκαν με τις βέλτιστες κατασκευαστικές παραμέτρους χαρακτηρίστηκαν από διασυνδεδεμένο πορώδες δίκτυο, διπλής κατανομής μεγέθους πόρων 5-50μm και 100-300μm, προσομοιάζοντας το πορώδες του ανθρώπινου οστού, όπως αναφέρθηκε. Ωστόσο τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά των ικριωμάτων παρουσίασαν υψηλή διακύμανση, συνεπώς χρειάζονται περαιτέρω βελτιστοποίηση έτσι ώστε να αυξηθεί η επαναληψιμότητα της διεργασίας και να μειωθεί το μέσο μέγεθος των μακροπόρων που προκύπτουν από τριδιάστατη εκτύπωση.

Ο έλεγχος της βιοσυμβατότητας των τριδιάστατα εκτυπωμένων ικριωμάτων δεν ήταν εφικτός, μιας και τα ικρίωματα δεν διατηρούν την δομή τους κατά το στάδιο της εμφαπτίσεως τους στο θρεπτικό υλικό. Αυτό οφείλεται στη διάλυση της ζελατίνης και ενυδάτωση του υλικού. Το πρόβλημα αυτό μπορεί να αντιμετωπιστεί μέσω χημικής διασύνδεσης των βιομορίων που περιλαμβάνονται στη σύνθεση των ικριωμάτων, προσδίδοντάς τους σταθερότητα και αυξημένη μηχανική αντοχή σε υδατικό περιβάλλον για μεγάλο εύρος θερμοκρασιών και pH. Συνεπώς μελλοντική έρευνα θα μπορούσε να επικεντρωθεί στη μελέτη μη τοξικών διασυνδετών που θα προστεθούν είτε στο στάδιο της σύνθεσης του υλικού είτε στο στάδιο μετά τη λυοφιλίωση των τριδιάστατα εκτυπωμένων ικριωμάτων.

Προτάσεις προς διερεύνηση

Αν και η διαδικασία ανάπτυξης τριδιάστατων ικριωμάτων μέσω τριδιάστατης εκτύπωσης που παρουσιάστηκε στην παρούσα εργασία έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα και εμφανίζει πολλές προοπτικές για τον κλάδο της Ιστικής Μηχανικής, υπάρχουν σημεία που θα μπορούσαν να μελετηθούν και να βελτιστοποιηθούν, όπως παρατίθενται παρακάτω:

- Μελέτη βιοσυμβατότητας και κυτταροτοξικότητας των ικριωμάτων.
- Προσθήκη μη τοξικών διασυνδετών για χημική διασύνδεση των βιομορίων που περιλαμβάνονται στη σύνθεση των ικριωμάτων κατά το στάδιο της σύνθεσης, με σκοπό την σταθερότητα και την αυξημένη μηχανική αντοχή σε υδατικό περιβάλλον για μεγάλο εύρος θερμοκρασιών και pH.
- Προσθήκη μη τοξικών διασυνδετών για χημική διασύνδεση των βιομορίων που περιλαμβάνονται στη σύνθεση των ικριωμάτων μετά τη λυοφιλίωση των τριδιάστατα εκτυπωμένων ικριωμάτων.
- Βελτιστοποίηση του g κώδικα για την επίτευξη μακροπορώδους μικρότερης μέσης διαμέτρου με στόχο την καλύτερη προσομοίωση.
- Μελέτη των νανομηχανικών ιδιοτήτων των τριδιάστατα εκτυπωμένων ικριωμάτων.
- Χαρακτηρισμό της ρεολογικής συμπεριφοράς των παραγόμενων υλικών.

9. Βιβλιογραφία

- [1] Gong J.K., Arnold J.S. and Cohn S.H., "Composition of trabecular and cortical bone", *The Anatomical Record* (1964) 149:325-331.
- [2] P. A. Brunton, R. P. W. Davies, J. L. Burke, A. Smith, A. Aggeli, S. J. Brookes & J. Kirkham *BDJ* 215, E6 (2013) Published online: 23 August 2013.
- [3] Wei G, Ma PX. Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2004;25(19):4749-57.
- [4] Kalita SJ, Bhardwaj A, Bhatt HA. Nanocrystalline calcium phosphate ceramics in biomedical engineering. *Materials Science and Engineering: C*. 2007;27(3):441-9.
- [5] Mostafa NY, Brown PW. Computer simulation of stoichiometric hydroxyapatite: Structure and substitutions. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*. 2007;68(3):431-7.
- [6] Teixeira S, Rodriguez MA, Pena P, De Aza AH, De Aza S, Ferraz MP, et al. Physical characterization of hydroxyapatite porous scaffolds for tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*. 2009;29(5):1510-4.
- [7] Guo L, Huang M, Zhang X. Effects of sintering temperature on structure of hydroxyapatite studied with Rietveld method. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2003;14(9):817-22.
- [8] Kantharia N, Naik S, Apte S, Kheur M, Kheur S, Kale B. Nano-hydroxyapatite and its contemporary applications. *J Dent Res Sci Develop*. 2014;1(1):15.
- [9] Liliane Elze Falcão Lins² , Edmar José Borges de Santana³ , Antonio Fernando Pereira Falcão³ , Pedro Paulo Monteiro Martins⁴ , Tereza Raquel Vianna Calmon³ and Viviane Almeida Sarmiento³, THE INFLUENCE OF HYDROXYAPATITE ON BONE HEALING IN TITANIUM IMPLANTS AS SHOWN BY SCANNING ELECTRON MICROSCOPY, ² Department of Morphology, Medicine and Health Public College of Bahia, Salvador, BA, Brazil, ³ Department of Diagnostics and Treatment, College of Dentistry, Federal University of Bahia, Salvador, BA, Brazil, ⁴ College of Dentistry, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil, Braz. *J. morphol. Sci.* (2003) 20(1), 25-29
- [10] M.P.Ferraz, F.J.Monteiro, C.M. Manuel, "Hydroxyapatite nanoparticles: a review of Preparation Methodologies, *Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics*" *Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics* 2004; 2: 74-80.

- [11] J.J.J.M. Donners, R.J.M. Nolte, N.A.J.M. Sommerdijk "Dendrimer based Hydroxyapatite composites with remarkable Material properties", *Advanced Materials*, 2003, 15, (4), 313–316.
- [12] R.Z. LeGeros. Calcium phosphates in oral biology and medicine, *Monographs in Oral Science*, H.M. Myers, S. Karger (Eds.) 15 (1991) 1-201.
- [13] R.Z. LeGeros, D. Lee, G. Quirolgico, W.P. Shirra, L. Reich. In vitro formation of dicalcium phosphate dehydrate, CaHPO₄, *Scan. Electron. Micros.* (1983) 407418.
- [14] R.Z. LeGeros, G. Daculsi, I. Orly. Solution-mediated transformation of OCP to apatite, *Scan. Electron. Micros.* 3 (1989) 129-138.
- [15] R.Z. LeGeros, G. Daculsi, I. Orly. Solution-mediated transformation of OCP to apatite, *Scan. Electron. Micros.* 3 (1989) 129-138. [112] R.Z. LeGeros, J.P. LeGeros, O.R. Trautz, W.P. Shirra. Conversion of monetite, CaHPO₄, to apatites: effect of carbonate on the crystallinity and the morphology of apatite crystallites, *Adv. X-ray Anal. I* 14 (1971) 57-66.
- [16] K. Ishikawa, E.D. Eanes. The hydrolysis of anhydrous dicalcium phosphate into hydroxyapatite, *J. Dent. Res.* 72 (1993) 474-480.
- [17] G.H. Nancollas, M. Lore, L. Perez, C. Richardson, S.J. Zawacki. Mineral phases of calcium phosphate, *The Anatomical Record* 224 (1989) 234-241.
- [18] R. Gonzalez-McQuire, J.Y. Chane-Ching, E. Vignau, A. Lebugle, S. Mann. Synthesis and characterization of amino acid-functionalized hydroxyapatite nanorods, *J. Mater. Chem.* 14 (2004) 2277-2281.
- [19] M.D. Sikiric, H. Furedi-Milhofer. The influence of surface active molecules on the crystallization of biominerals in solution, *J. Adv. Colloid Inter. Sci.* 128-130 (2006) 135-158.
- [20] Pastorino L, Erokhina S, Soumetz FC et al. Collagen containing microcapsules: Smart containers for disease controlled therapy. *J Colloid Interface Sci.* 2011; 357:56-62.
- [21] Viguet-Carrin S., Garnero P. and Delmas P.D., "The role of collagen in bone strength", *Osteoporosis International* (2006) 17:319-336.
- [22] Boedtker H. and Doty P., "The native and denatured states of soluble collagen", *J. Am. Chem. Soc.* (1956) 78:4267-4280
- [23] Piez K.A., Lewis M.S., Martin G.R. and Gross J., "Subunits of the collagen molecule", *BBA - General Subjects* (1961) 53:596-598

- [24] Ramachandran G.N. and Kartha G., "Structure of collagen", *Nature* (1955) 176:593-595
- [25] Rich A. and Crick F.H.C., "The structure of collagen", *Nature* (1955) 176:915-916
- [26] Morgan E.F., Barnes G.L. and Einhorn T.A., "The bone organ system: Form and function", in: *Osteoporosis*, Chapter 1, 3rd Edition, Marcus R., Feldman D., Nelson D. and Rosen C. (edit.), Academic Press (2007)
- [27] Hofmann H. and Kuhn K., "Structural aspects of recognition and assembly in biological macromolecules", Vol. 1, Balaban International Science Services, Rehovot and Philadelphia (1981), pp. 403-426
- [28] Dolz R. and Heidemann E., "Influence of different tripeptides on the stability of the collagen triple helix. I. Analysis of the collagen sequence and identification of typical tripeptides", *Biopolymers* (1986) 25:1069-1080
- [29] Traub W. and Piez K.A., "The chemistry and structure of collagen", *Advances in Protein Chemistry* (1971) 25:243-352
- [30] Brodsky B. and Persikov A.V., "Molecular structure of the collagen triple helix", in: *Advances in Protein Chemistry*, Parry D. A. D. and Squire J. M. (edit.), Elsevier Academic Press (2005)
- [31] Grigera J.R. and Berendsen H.J.C., "Molecular Details of Collagen Hydration", *Biopolymers* (1979) 18:47-57
- [32] Suzuki E., Fraser R.D.B. and Macrae T.P., "Role of hydroxyproline in the stabilization of the collagen molecule via water-molecules", *Int. J. Biol. Macromol.* (1980) 2:54-56
- [33] Ramachandran G.N. and Chandrasekharan R., "Interchain hydrogen bonds via bound water molecules in the collagen triple helix", *Biopolymers* (1968) 6:1649-1658.
- [34] Pineri M.H., Escoubes M. and Roche G., "Water collagen interactions: calorimetric and mechanical experiments", *Biopolymers* (1978) 17:2799-2815
- [35] Nomura S., Hiltner A., Lando J.B. and Baer E., "Interaction of water with native collagen", *Biopolymers* (1977) 16:231-246.
- [36] Brodsky B. and Ramshaw J.A.M., "The collagen triple-helix structure", *Matrix Biol.* (1997) 15:545-554
- [37] Bella J. and Berman H.M., "Crystallographic evidence for C-alpha-H center dot center dot center dot O=C hydrogen bonds in a collagen triple helix", *Journal of Molecular Biology* (1996) 264:734-742.

- [38] Privalov P.L., "Stability of proteins: Proteins which do not present a single cooperative system ", in: *Advances in Protein Chemistry*, Anfinsen C. B., Edsall J. T. and Richards F. M. (edit.), Academic Press INC (1982)
- [39] Weiner S. and Wagner H.D., "The material bone: Structure mechanical function relations", *Annual Review of Materials Science* (1998) 28:271-298
- [40] Delmas P.D., Tracy R.P., Riggs B.L. and Mann K.G., "Identification of the noncollagenous proteins of bovine bone by two-dimensional gel electrophoresis", *Calcified Tissue International* (1984) 36:308-316
- [41] Boskey A.L., Gadaleta S., Gundberg C., Doty S.B., Ducy P. and Karsenty G., "Fourier transform infrared microspectroscopic analysis of bones of osteocalcine-deficient mice provides insight into the function of osteocalcin", *Bone* (1998) 23:187-196
- [42] Ruoslahti E., "Integrins", *J. Clin. Invest.* (1991) 87:1-5
- [43] Morgan E.F., Barnes G.L. and Einhorn T.A., "The bone organ system: Form and function", in: *Osteoporosis*, Chapter 1, 3rd Edition, Marcus R., Feldman D., Nelson D. and Rosen C. (edit.), Academic Press (2007)
- [44] Zhu W., Robey P.G. and Boskey A.L., "The regulatory role of matrix proteins in mineralization of bone", in: *Osteoporosis*, Chapter 9, 3rd Edition, Marcus R., Feldman D., Nelson D. and Rosen C. (edit.), Academic Press (2007)
- [45] Vaes G., "Cellular biology and biochemical mechanism of bone resorption. A review of recent developments on the formation, activation, and mode of action of osteoclasts", *Clinical Orthopaedics and Related Research* (1988) 239-271
- [46] Wada T., Nakashima T., Hiroshi N. and Penninger J.M., "RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease", *Trends Mol. Med* (2006) 12:17-25
- [47] Behari J., "Biophysical Bone Behaviour-Principals and Applications", John Wiley & Sons (2009), pp. 38-50
- [48] Jae-Young Rho, Liisa Kuhn-Spearing, Peter Zioupos, Mechanical properties and the hierarchical structure of bone, *Medical Engineering & Physics* Vol. 20 (1998) p. 92–102.
- [49] Xiaodu Wang, Qingwen Ni, Determination of cortical bone porosity and pore size distribution using a low field pulsed NMR approach, March 2003, DOI: 10.1016/S0736-0266(02)00157-2.

- [50] Καραμπάς Α Ιωάννης, Ανάπτυξη Αναλυτικής Μεθοδολογίας για την Εκτίμηση της Ποιότητας των Οστών, Τμήμα Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Πατρών, Πάτρα, Μάιος 2011.
- [51] Jeffrey S. Nymana, Michael Reyes, Xiaodu Wanga, Effect of ultrastructural changes on the toughness of bone, *Micron* Vol. 36 (2005) p. 566–582.
- [52] Shirley C K M Motaung, Paul Dicesare, A Hari Reddi, Differential response of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) to morphogens of bone morphogenetic protein/transforming growth factor- β family in the surface, middle and deep zones of articular cartilage, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 5(6):e87-96, June 2011
- [53] Khay-Yong Saw, Adam Anz, Caroline Siew-Yoke Jee, Kunasegaran Ragavanaidu, Articular Cartilage Regeneration with Autologous Peripheral Blood Stem Cells Versus Hyaluronic Acid: A Randomized Controlled Trial (SS-57), *Arthroscopy The Journal of Arthroscopic and Related Surgery* 29(4), February 2013
- [54] Joanne Raghunath, John Rollo, Kevin Sales, Alexander Seifalian, Biomaterials and scaffold design: Key to tissue-engineering cartilage, *Biotechnology and Applied Biochemistry* 46(Pt 2):73-84 · March 2007.
- [55] L.A. Pruitt, A.M. Chakravartula. *Mechanics of Biomaterials: Fundamental principles for implant design*, Cambridge University Press, New York, 2011.
- [56] R.J. Miron, Y.F. Zhang. Osteoinduction: A Review of old concepts with new standards, *J. Dent. Res.* 91 (2012) 736-744.
- [57] T. Albrektsson, C. Johansson. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration, *Eur. Spine J.* 10 (2001) 96-101.
- [58] B.S. Chang, C.K. Lee, K.S. Hong, H.J. Youn, H.S. Ryu, S.S. Chung, K.W. Park. Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations, *Biomaterials* 21 (2000) 1291-1298.
- [59] A. Boyde, A. Corsi, R. Quarto, R. Cancedda, P. Bianco. Osteoconduction in large macroporous hydroxyapatite ceramic implants: evidence for a complementary integration and disintegration mechanism, *Bone* 24 (1999) 579-589.
- [60] Han B, Huang LLH, Cheung D, Cordoba F, Nimni M. Polypeptide growth factors with a collagen binding domain: Their potential for tissue repair and organ regeneration. In Zilla P and Greisler HP, editors. *Tissue engineering of vascular prosthetic grafts*. Austin: RG Landes, 1999: 287-299.

- [61] Vaissiere G, Chevally B, Herbage D, Damour O. Comparative analysis of different collagen-based biomaterials as scaffolds for long-term culture of human fibroblasts. *Med Biol Eng Comput* 2000; 38, 205-210.
- [62] Tranquillo RT. Self-organization of tissue-equivalents: The nature and role of contact guidance. *Biochem Soc Symp* 1999; 65, 27-42.
- [63] Franca N . Alaribe*, Sello L. Manoto & Shirley C.K.M. Motaung, Scaffolds from biomaterials: advantages and limitations in bone and tissue engineering, Department of Biomedical Sciences, Tshwane University of Technology, Pretoria 0001, South Africa, 2016
- [64] W.W. Thein-Han, R.D.K. Misra. Biomimetic chitosan-nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering, *Acta Biomaterialia* 5 (2009) 1182-1197.
- [65] W.W. Thein-Han, J. Saikhun, C. Pholpramoo, R.D.K. Misra, Y. Kitiyanant. Chitosan – gelatin scaffolds for tissue engineering: Physico-chemical properties and biological response of buffalo embryonic stem cells and transfectant of GFP buffalo embryonic stem cells, *Acta Biomaterialia* 5 (2009) 3453-3466.
- [66] E. Khor, L.Y. Lim. Implantable applications of chitin and chitosan, *Biomaterials* 24 (2003) 2339-2349
- [67] F. Croisier, C. Jérôme. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering, *J. Eur. Polymer* 49 (2013) 780-792.
- [68] I.Y. Kim, S.J. Seo, H.S. Moon, M.K. Yoo, I.Y. Park, B.C. Kim, C.S. Cho. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications, *Biol. Adv.* 26 (2008) 1-21.
- [69] M. Rinaudo. Chitin and chitosan: Properties and applications, *Prog. Polymer Sci.* 31 (2006) 603-632.
- [70] Suh J-KF, Matthew HWT. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: A review. *Biomaterials* 2000; 21: 2589-2598.
- [71] Elcin AE, Elcin YM, Pappas GD. Neural tissue engineering: Adrenal chromaffin cell attachment and viability on chitosan scaffolds. *Neurol Res* 1998; 20: 648-654.
- [72] Elcin YM, Dixit V, Gitnick G. Hepatocyte attachment on biodegradable modified chitosan membranes: In vitro evaluation for the development of liver organoids. *Artif Organs* 1998; 22: 837-846.
- [73] Prabakaran B Chitosan derivatives as promising materials for controlled drug delivery, 2008.

- [74] Jerome A. Henry,^{1,2} Marc Simonet,³ Abhay Pandit,^{1,2} Peter Neuenschwander³, Characterization of a slowly degrading biodegradable polyesterurethane for tissue engineering scaffolds, ¹Department of Mechanical and Biomedical Engineering, National University of Ireland, Galway, Galway, Ireland ²National Centre for Biomedical Engineering Science, National University of Ireland, Galway, Galway, Ireland ³Department of Materials, Polymer Technology Group, ETH Zurich, Zurich 8093, Switzerland, Wiley InterScience, 23 February 2007, DOI: 10.1002/jbm.a.31094.
- [75] Ami R. Amini, Cato T. Laurencin, and Syam P. Nukavarapu, Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges, Institute for Regenerative Engineering, University of Connecticut Health Center, Farmington, C T, Department of Orthopedic Surgery, University of Connecticut Health Center, Farmington, C T, Chemical and Biomolecular Engineering, University of Connecticut, Storrs, C T, Materials Science and Engineering, University of Connecticut, Storrs, C T, Biomedical Engineering, University of Connecticut, Storrs, C T, Crit Rev Biomed Eng . 2012 ; 40(5): 363–408.
- [76] Valentin JE, Badylak JS, McCabe GP, Badylak SF. Extracellular matrix bioscaffolds for orthopaedic applications. A comparative histologic study. J Bone Joint Surg Am. 2006; 88(12): 2673–2686 [PubMed: 17142418].
- [77] Yamaoka H, Asato H, Ogasawara T, Nishizawa S, Takahashi T, Nakatsuka T, Koshima I, Nakamura K, Kawaguchi H, Chung UI, Takato T, Hoshi K. Cartilage tissue engineering chondrocytes embedded in using human auricular different hydrogel materials. J Biomed Mat Res A 2006; 78A:1-11.
- [78] Kisiday J, Jin M, Kurz B, Hung H, Semino C, Zhang S, Grodzinsky AJ. Self-assembling peptide hydrogel fosters chondrocyte extracellular matrix production and cell division: Implications for cartilage tissue repair. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99:9996-10001.
- [79] Hu X, Lui W, Cui L, Wang M, Cao Y. Tissue engineering of nearly transparent corneal stroma. Tissue Eng 2005; 11:1710-1717.
- [80] Li F, Carlsson D, Lohmann C, Suuronen E, Vascotto S, Kobuch K, Sheardown H, Munger R, Nakamura M, Griffith M. Cellular and nerve regeneration within a biosynthetic extracellular matrix for corneal transplantation. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100:15346-15351.

- [81] Black AF, Bouez C, Perrier E, Schlotmann K, Chapuis F, Damour O. Optimization and characterization of an engineered human skin equivalent. *Tissue Eng* 2005; 11:723-733.
- [82] Fuchs JR, Kaviani A, Oh JT, LaVan D, Udagawa T, Jennings RW, Wilson JM, Fauza DO. Diaphragmatic reconstruction with autologous tendon engineered from mesenchymal amniocytes. *J Pediatr Surg* 2004; 39:834-838.
- [83] Nerem RM, Seliktar D. Vascular tissue engineering. *Annu Rev Biomed Eng* 2001; 3:225-243.
- [84] Orwin EJ, Borene ML, Hubel A. Biomechanical and optical characteristics of a corneal stromal equivalent. *J Biomech Eng.* 2003; 125:439-444.
- [85] Petrini P, Fare S, Piva A, Tanzi MC. Design, synthesis and properties of polyurethane hydrogels for tissue engineering. *J Mater Sci: Mater Med* 2003; 14:683-686.
- [86] Hu JC, Athanasiou KA. Low-density cultures of bovine chondrocytes: effects on scaffold materials and culture system. *Biomaterials* 2005; 26:2001-2012.
- [87] Wakatsuki T, Elson EL. Reciprocal interactions between cells and extracellular matrix during remodeling of tissue constructs. *Biophys Chem* 2003; 100:593-605.
- [88] Drury JL, Dennis RG, Mooney DJ. The tensile properties of alginate hydrogels. *Biomaterials* 2004; 25:3187-3199.
- [89] Kazakia GJ, Nauman EA, Ebenstein DM, Halloran BP, Keaveny TM. Effects of in vitro bone formation on the mechanical properties of a trabeculated hydroxyapatite bone substitute. *J Biomed Mat Res A* 2006; 77:688-699.
- [90] Fu You, Xia Wu & Xiongbiao Chen (2017) 3D printing of porous alginate/gelatin hydrogel scaffolds and their mechanical property characterization, *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 66:6, 299-306, DOI: 10.1080/00914037.2016.1201830
- [91] Kozlov PV, The structure and properties of solid gelatin and the principles of their modification, *Polymer*, 1983.
- [92] Jeffrey L, Hinkley A, Morgret LD, Gehrke SH. Tensile properties of two responsive hydrogels. *Polymer* 2004; 45:8837-8843.
- [93] M. Ahearne, Y. Yang and K-K Liu, Mechanical Characterisation of Hydrogels for Tissue Engineering Applications, *Topics in Tissue Engineering*, Vol. 4. Eds. N Ashammakhi, R Reis, & F Chiellini © 2008.

- [94] Svensson A, Nicklasson E, Harrah T, Panilaitis B, Kaplan DL, Brittberg M, Gatenholm P. Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. *Biomaterials* 2005; 26:419-431.
- [95] Awad HA, Quinn Wickham M, Leddy HA, Gimble JM, Guilak F. Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate and gelatin scaffolds. *Biomaterials* 2004; 25:3211-3222.
- [96] Ahearne M, Yang Y, El Haj AJ, Then KY, Liu KK. Characterizing the viscoelastic properties of thin hydrogel-based constructs for tissue engineering applications. *J R Soc Interface* 2005; 2:455-463.
- [97] Mirshams RA, Pothapragada RM. Correlation of nanoindentation measurements of nickel made using geometrically different indenter tips. *Acta Mater* 2006; 54:1123-1134.
- [98] Merino JC, Martin B, Pastor JM. Mechanical indentation tester designed to control and measure in real-time the microhardness process. *Meas Sci Technol* 1991; 2:740-743.
- [99] Ταλιούρης Νικόλαος, Τρισδιάστατη γεωμετρική τεκμηρίωση άρθρωσης ώμου και βιομηχανική προτυποποίηση, Ηράκλειο Κρήτης, 2014.
- [100] Raquel Couto de Azevedo Gonçalves Mota¹, Emerson Oliveira da Silva, Felipe Fortes de Lima, Lívia Rodrigues de Menezes, Antonio Carlos Santos Thiele, 3D Printed Scaffolds as a New Perspective for Bone Tissue Regeneration: Literature Review, Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, Universidade Federal do Rio de Janeiro Pólo Xerém, Estr. de Xerém, 27-Xerém, Duque de Caxias-RJ, Rio de Janeiro, Brazil, 31 August 2016.
- [101] Bertassoni, L. E., M. Cecconi, V. Manoharan, M. Nikkhah, J. Hjortnaes, A. L. Cristino, G. Barabaschi, D. Demarchi, M. R. Dokmeci, and Y. Yang. Hydrogel bioprinted microchannel networks for vascularization of tissue engineering constructs. *Lab Chip* 14:2202–2211, 2014.
- [102] Billiet, T., M. Vandenhaute, J. Schelfhout, S. Van Vlierberghe, and P. Dubruel. A review of trends and limitations in hydrogel-rapid prototyping for tissue engineering. *Biomaterials* 33:6020–6041, 2012.
- [103] Malda, J., J. Visser, F. P. Melchels, T. Jungst, W. E. Hennink, W. J. Dhert, J. Groll, and D. W. Hutmacher. 25th anniversary article: engineering hydrogels for biofabrication. *Adv. Mater.* 25:5011–5028, 2013.

- [104] Murphy, S. V., and A. Atala. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat. Biotechnol.* 32:773–785, 2014.
- [105] A. Tsetsekou, D. Brasinika, V. Vaou, E. Chatzitheorides, “On the synthesis of tailored biomimetic hydroxyapatite nanoplates through a 90 bioinspired approach in the presence of collagen or chitosan and L-arginine”, *J. Mater. Sci. Eng. C*, 43 (2014) 555-565.
- [106] I. Migneault, C. Dartiguenave, M.J. Bertrand, K.C. Waldron. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking, *Bio Techniques* 37 (2004) 790-802.
- [107] K. Okuda, I. Urabe, Y. Yamada, H. Okada. Reaction of glutaraldehyde with amino and thiol compounds, *J. Ferment. Bioeng.* 71 (1991) 100-105.
- [108] M.E. Nimni, D. Cheung, B. Strates, M. Kodama, K. Sheikh. Chemically modified collagen: a natural biomaterial for tissue replacement, *J. Biomed. Mater. Res.* 21 (1987) 741-771
- [109] J.H. Bowes, C.W. Cater. The interaction of aldehydes with collagen, *Biochim. Biophys. Acta* 168 (1968) 341-352.
- [110] Umashankar, P.R. et al., Glutaraldehyde treatment elicits toxic response compared to decellularization in bovine pericardium, 2012, *Toxicol*, 19: 51–58
- [111] Occupational Safety and Health Administration OSHA [Online] [Cited 2014 March 17]
- [112] Hazard evaluation system and information service [Online] [Cited 2014 March 17]
- [113] Jung J. W. et al. Evaluation of the Effective Diffusivity of a Freeform Fabricated Scaffold Using Computational Simulation. *J. Biomech. Eng.* 135, 084501–084501 (2013)
- [114] Kang T. Y., Hong J. M., Kim B. J., Cha H. J. & Cho D. W. Enhanced endothelialization for developing artificial vascular networks with a natural vessel mimicking the luminal surface in scaffolds. *Acta Biomater.* 9, 4716–4725 (2013)
- [115] Luo F. et al. Effects of Initial Cell Density and Hydrodynamic Culture on Osteogenic Activity of Tissue-Engineered Bone Grafts. *PLoS ONE* 8, e53697 (2013)
- [116] R. Touyama, K. Inoue, Y. Takeda, M. Yatsuzuka, T. Ikumoto, N. Moritome, T. Shingu, T. Yoko, H. Intuye. Studies on the blue pigments produced from genipin and methylamine. II. On the formation mechanisms of brownish-red intermediates leading to the blue pigment formation, *Chem. Pharm. Bull.* 42 (1994) 1571-1578.

- [117] F.L. Mi, S.S. Shyu, C.K. Peng. Characterization of ring-opening polymerization of genipin and pH-dependent crosslinking reactions between chitosan and genipin, *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* 43 (2005) 1985–2000.
- [118] H.W. Sung, R.N. Huang, L. L. H. Huang, C. C. Tsai. In vitro evaluation of cytotoxicity of a naturally occurring crosslinking reagent for biological tissue fixation, *J. Biom. Sci. Polym. Edit.* 10 (1999) 63–78.
- [119] Δέσποινα Μπρασινίκα, Βιομημητική Ανάπτυξη Σύνθετων Βιοκεραμικών Νανοϋδροξυαπατίτη – Πολυμερών Με Ελεγχόμενες Ιδιότητες Για Βιολογικές Εφαρμογές, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Μηχανικών Μεταλλείων – Μεταλλουργών, Τομές Μεταλλουργίας και Τεχνολογίας Υλικών, Αθήνα, 2015
- [120] Saranjit Singh, K.V. Rama Rao, K. Venugopal, and R. Manikandan, Alteration in Dissolution Characteristics of Gelatin-Containing Formulations, A Review of the Problem, Test Methods, and Solutions, *Pharmaceutical Technology* APRIL 2002.
- [121] US EPA, Open Path Technologies: Measurement at a Distance (OP-FTIR), [<http://clu-in.org/programs/21m2/openpath/op-ftir/>]
- [122] Maria Ratajska, K. Haberk*, Danuta Ciechańska, Antoni Niekraszewicz, Magdalena Kucharska, HYDROXYAPATITE - CHITOSAN BIOCOSCOMPOSITES, Institute of Biopolymers and Chemical Fibres, Lodz, Poland, AGH –University of Science and Technology, Kraków, Poland, 2008.
- [123] M.C. Chang, J. Tanaka. FT-IR study for hydroxyapatite / collagen nanocomposite cross-linked by glutaraldehyde, *Biomaterials* 23 (2002) 4811-4818.
- [124] A. Slosarczyk, Z. Paszkiewicz, C. Paluszkiwicz. FTIR and XRD evaluation of carbonated hydroxyapatite powders synthesized by wet methods, *J. Mol. Struct.* 744–747 (2005) 657–661.
- [125] J.J.M. Donners, R.J.M. Nolte, A.J.M. Sommerdijk. Dendrimer-Based Hydroxyapatite composites with remarkable material properties, *J. Adv.Mater.* 15 (2003) 13-316.
- [126] S. Markovic, L. Veselinovic, M.J. Lukic, L. Karanovic, I. Bracko, N. Ignjatovic, D. Uskokovic. Synthetical bone-like and biological hydroxyapatites: a comparative study of crystal structure and morphology, *Biomed. Mater.* 6 (2011) 045005-045017.
- [127] S. Raynaud, E. Champion, D. Bernache-Assollant, P. Thomas. Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio I. Synthesis, characterization and thermal stability of powders, *Biomaterials* 23 (2002) 1065-1072.
- [128] W. Jie, L. Yubao, C. Weiqun, Z. Yi. A study of nano-composite of hydroxyapatite, *J. Mater. Sci.* 38 (2003) 3303-3306.

- [129] R.L. Frost, Y. Xi, R.E. Pogson, G.J. Millar, K. Tan, S.J. Palmer. Raman spectroscopy of synthetic $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - and in comparison with the cave mineral brushite, *J. Raman Spec.* 43 (2012) 571-576.
- [130] A. Boskey, N.P. Camacho. FT-IR imaging of native and tissue-engineered bone and cartilage, *Biomaterials* 28 (2007) 2465-2478.
- [131] X. Li, J. Chang. Preparation of bone-like apatite-collagen nanocomposites by a biomimetic process with phosphorylated collagen, *J. Biomed. Mater. Res. A* 85 (2008) 293-300.
- [132] R Dorati, C Colonna, C Tomasi, B Conti, Design of 3D scaffolds for tissue engineering testing a tough polylactide-based graft copolymer, PubMed, January 2014, DOI: 10.1016/j.msec.2013.08.037.
- [133] Brian N. Turner, Robert Strong, Scott A. Gold, (2014) "A review of melt extrusion additive manufacturing processes: I. Process design and modeling", *Rapid Prototyping Journal*, Vol. 20 Issue: 3, pp.192-204, <https://doi.org/10.1108/RPJ-01-2013-0012>
- [134] Brian N. Turner, Scott A Gold, (2015) "A review of melt extrusion additive manufacturing processes: II. Materials, dimensional accuracy, and surface roughness", *Rapid Prototyping Journal*, Vol. 21 Issue: 3, pp.250-261, <https://doi.org/10.1108/RPJ-02-2013-0017>
- [135] Chimene, D., Lennox, K.K., Kaunas, R.R. et al. *Ann Biomed Eng* (2016) 44: 2090. doi:10.1007/s10439-016-1638-y