



**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ**  
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ (Δ.Π.Μ.Σ.)

**"ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΥΛΙΚΩΝ"**

**ΤΡΙΔΙΑΣΤΑΤΗ ΕΚΤΥΠΩΣΗ ΒΙΟΪΛΙΚΩΝ  
ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΙΚΡΙΩΜΑΤΩΝ ΜΕ  
ΙΑΤΡΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ ΖΑΦΕΙΡΗ**

Διπλωματούχου Ε.Μ.Φ.Ε. Ε.Μ.Π.

**ΕΠΙΒΛΕΨΗ:**

**Κ. ΧΑΡΙΤΙΔΗΣ**

Καθηγητής Ε.Μ.Π.

**ΑΘΗΝΑ, Οκτώβριος 2019**





**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ**  
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ (Δ.Π.Μ.Σ.)

**"ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΥΛΙΚΩΝ"**

**ΤΡΙΔΙΑΣΤΑΤΗ ΕΚΤΥΠΩΣΗ ΒΙΟΪΛΙΚΩΝ  
ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΙΚΡΙΩΜΑΤΩΝ ΜΕ  
ΙΑΤΡΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ ΖΑΦΕΙΡΗ**

Διπλωματούχου Ε.Μ.Φ.Ε. Ε.Μ.Π.

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:**

Κ. ΧΑΡΙΤΙΔΗΣ, Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Λ. ΖΟΥΜΠΟΥΛΑΚΗΣ, Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Α. ΚΥΡΙΤΣΗΣ, Αν. Καθηγητής Ε.Μ.Π.

**ΑΘΗΝΑ, Οκτώβριος 2019**



## Ευχαριστίες

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

Ολοκληρώνοντας την μεταπτυχιακή μου εργασία, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους που συνέβαλαν άμεσα ή έμμεσα, στην ολοκλήρωση της. Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα των επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Χαριτίδη Κωνσταντίνο, Καθηγητή Ε.Μ.Π., πρωτίστως για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, αναθέτοντας μου ένα τόσο ενδιαφέρον και παράλληλα απαιτητικό ερευνητικό αντικείμενο. Τον ευχαριστώ επίσης για την πολύτιμη βοήθεια και στήριξη και που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας, ώστε να έρθει εις πέρας επιτυχώς. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον συνεπιβλέποντα καθηγητή κ. Ζουμπουλάκη Λουκά, Καθηγητή Ε.Μ.Π., για το άριστο κλίμα επικοινωνίας κατά τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας μου. Ευχαριστώ επίσης και τον κ. Κυρίτση Απόστολο, Αν. Καθηγητή Ε.Μ.Π. για την παρουσία του στην τριμελή επιτροπή εξέτασης της διπλωματικής μου εργασίας, καθώς και το εξαιρετικό κλίμα επικοινωνίας κατά τη διάρκεια της συμμετοχής μου στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια, Δρ. Δέσποινα Μπρασινίκα για την άψογη συνεργασία μας, καθώς και την συνεχή καθοδήγηση της. Εξάλλου, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Μεταδιδακτορικό Ερευνητή, Δρ. Ηλία Κούμουλο, για την άριστη επικοινωνία και την διεξαγωγή των μετρήσεων μηχανικών ιδιοτήτων. Αμφότερους τους ευχαριστώ για τον χρόνο που μου δέχτηκαν και τις γνώσεις που μου εμφύσησαν καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας. Οφείλω επίσης να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην εταιρία «BioG3D Νέες Τεχνολογίες 3D Εκτύπωσης» με έδρα το Τεχνολογικό Πολιτιστικό Πάρκο Λαυρίου, για την παραχώρηση υλικοτεχνικού εξοπλισμού. Ευχαριστώ επίσης την Δρ. Κυριακή Κυριακίδου για την διεξαγωγή των μελετών βιοσυμβατότητας. Τέλος, ευχαριστώ θερμά την υποψήφια Διδάκτορα, Άννα Καρατζά για το άριστο κλίμα συνεργασίας και επικοινωνίας τόσο σε συναδελφικό όσο και φιλικό επίπεδο. Η συνεισφορά της υπήρξε καταλυτική στην κατανόηση του αντικειμένου της διπλωματικής μου εργασίας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλη την ερευνητική ομάδα του R-NanoLab. Η βοήθεια που μου παρείχαν στα διάφορα στάδια της μελέτης μου, καθώς και το εξαιρετικό κλίμα συνεργασίας που αναπτύξαμε, τόσο σε φιλικό, όσο και επιστημονικό επίπεδο, συνετέλεσαν στην ομαλή διεκπεραίωση της εργασίας μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω το οικογενειακό και φιλικό μου περιβάλλον για τη συμπαράσταση και κυρίως την κατανόηση που επέδειξαν όλα τα χρόνια των σπουδών μου.



## Περίληψη

Στην παρούσα εργασία έγινε **σύνθεση υβριδικού νανοδομημένου υλικού** αποτελούμενο από κρυστάλλους υδροξυαπατίτη και βιομόρια (χιτοζάνη, L-αργινίνη) με στόχο την **τριδιάστατη εκτύπωση εμφυτεύσιμων υλικών για οστική ανάπτυξη**.

Η ανάπτυξη των τριδιάστατων υβριδικών ικριωμάτων καθορισμένης μικρο-αρχιτεκτονικής έγινε μέσω τριδιάστατης εκτύπωσης (3D Printing). Απαραίτητη προϋπόθεση για την εκτύπωση του υλικού αποτέλεσε η προσθήκη διαλύματος ζελατίνης/οξικού οξέος, με στόχο τη βελτίωση της ρεολογικής συμπεριφοράς του μελανιού του εκτυπωτή.

Οι παράμετροι που εξετάστηκαν ως προς την επίδρασή τους στην γεωμετρική ακρίβεια του τελικού 3D εκτυπωμένου ικριώματος ήταν (α) η ταχύτητα ροής υλικού και (β) οι ταχύτητες κατασκευής πλέγματος και περιμέτρου. Επιπλέον μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας και της εσωτερικής διαμέτρου του ακροφυσίου της κεφαλής εκτύπωσης στην εκτυπωτική συμπεριφορά του μελανιού.

Για την εύρεση του **βέλτιστου συνδυασμού παραμέτρων εκτύπωσης**, σχεδιάστηκαν κυλινδρικά ικριώματα διαμέτρου 15 mm και ύψους 2 mm. Τα δείγματα που παρουσίασαν τη μεγαλύτερη ακρίβεια 3D εκτύπωσης, εξετάστηκαν από πλευράς μηχανικών ιδιοτήτων, πορώδους δομής και βιοσυμβατότητας. Για την επίτευξη εσωτερικού μικροπορώδους στα 3D εκτυπωμένα δείγματα, έγινε λυοφιλίωση και εξάχνωση των κρυστάλλων νερού που περιέχονταν σε αυτά. Τα υβριδικά ικριώματα που προέκυψαν χαρακτηρίστηκαν αρχικά ως προς τις μηχανικές τους ιδιότητες μέσω Νανοδιείσδυσης (Nanoindentation) και παρουσίασαν τιμές μέτρου ελαστικότητας εντός του εύρους τιμών του μέτρου ελαστικότητας του σπογγώδους οστού. Η πορώδης δομή των ικριωμάτων εξετάστηκε με χρήση Υπολογιστικής Μικροτομογραφίας (micro-CT) και Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Σάρωσης (SEM). Τα ικριώματα χαρακτηρίστηκαν από ποσοστό συνολικού πορώδους που εμπίπτει με το αντίστοιχο του σπογγώδους οστού. Επιπλέον διαπιστώθηκε η ύπαρξη αρκετά μεγάλου ποσοστού μικροπόρων τόσο στην επιφάνεια όσο και στο εσωτερικό των ικριωμάτων υπό μορφή διασυνδεδεμένου δικτύου. Για την εξέταση της βιοσυμβατότητας των 3D εκτυπωμένων ικριωμάτων, έγιναν καλλιέργειες οστεοβλαστών των σειρών MG63. Η βιωσιμότητα των τελευταίων μελετήθηκε μέσω της χρωματομετρικής μεθόδου MTT (MTT Assay) και με χρήση φθορίζουσών ουσιών (FDA/PI). Τα αποτελέσματα φανέρωσαν την πλήρως βιοσυμβατή φύση του υλικού, έπειτα και από την προσθήκη του διαλύματος ζελατίνης/οξικού οξέος, καθώς καταγράφηκε ξεκάθαρη τάση των οστεοβλαστών για πολλαπλασιασμό και πλήρη αποίκηση των ικριωμάτων σε διάστημα 7 ημερών. Η βιοσυμβατότητα επιβεβαιώθηκε και με οπτική παρατήρηση των κυτταροκαλλιεργειών μέσω SEM, όπου διαπιστώθηκε ότι τα κύτταρα έχουν εξαπλωθεί στην επιφάνεια και εισχωρήσει στους πόρους των 3D εκτυπωμένων ικριωμάτων.

Συμπερασματικά, κατόπιν της βιβλιογραφικής ανασκόπησης που πραγματοποιήθηκε κατά τη διεξαγωγή της εργασίας, τα ικριώματα εμφανίζουν **ενισχυμένες μηχανικές ιδιότητες** σε σύγκριση με αντίστοιχα 3D εκτυπωμένα εμφυτεύματα αποτελούμενα από φυσικά βιοϋλικά, ενώ προσεγγίζουν τις αντίστοιχες συνθετικών βιοϋλικών. Τα 3D εκτυπωμένα ικριώματα παρουσίασαν συνολικά ιδιότητες που τα καθιστούν **ιδανικά για εφαρμογές οστικής ανάπτυξης και ειδικά του σπογγώδους οστού**.





## Abstract

This work reports the synthesis of a **hybrid nanostructured material** consisting of hydroxyapatite crystals and biomolecules (chitosan, L-arginine), aiming at the **3D printing of implantable materials for bone tissue engineering applications**.

The fabrication of three-dimensional hybrid scaffolds with tailored micro-architecture was achieved through a 3D printing process. In order for the ink to be printed, its rheology was modified with the use of a gelatin/acetic acid solution.

The influence of the main 3D printing parameters such as (a)flow, (b)infill and perimeter speed and their effect on the geometrical precision of the final 3D printed scaffolds was investigated. Furthermore, ink temperature and nozzle diameter were also studied, regarding their influence on the ink printability.

Cylindrical scaffolds with 15 mm diameter and 2 mm height were designed in order to establish the **optimal combination of printing parameters**. Samples that exhibited the best printing quality were characterized in terms of their mechanical properties, porous structure and biocompatibility. Following the printing procedure, the 3D scaffolds were freeze dried in order to remove the entrapped solvents and therefore, obtain a porous interconnected network. Nanoindentation was used to determine the mechanical properties of the scaffolds, showing that all tested samples presented high values of Young's Modulus, which fall within the equivalent values of cancellous bone. The evaluation of total and internal porosity was performed using Computed Microtomography (micro-CT) and Scanning Electron Microscopy (SEM). All scaffolds demonstrated porosity values similar to those of cancellous bone. A high percentage of micropores distributed both on the scaffolds' surface and internal in the form of an interconnected network, was also recorded. The biocompatibility of the 3D printed scaffolds was assessed using MG3 osteoblasts. Cell viability was evaluated by MTT assay as well as double staining and visualized under fluorescence microscopy. Results showed a high degree of osteoblasts proliferation and colonization of the scaffolds after 7 days of cell cultures. Cell attachment and morphology were investigated by SEM, showing that cells have well populated the surface and infiltrated the pores of the 3D printed scaffolds.

In conclusion, after the literature reviewed during the present work, the scaffolds presented **enhanced mechanical properties** compared to other 3D printed implants consisted of natural biomaterials, while they are close to those consisting of synthetic ones. The 3D printed scaffolds' properties make them **ideal candidates for bone tissue engineering applications, especially targeted to cancellous bone tissue**.



# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

I. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	14
1. Μια εισαγωγή στην Ιστική Μηχανική (Tissue Engineering).....	15
2. Το φυσικό οστό .....	15
2.1. Μακροδομή.....	16
2.2. Μικροδομή.....	16
2.3. Νανοδομή.....	17
2.4. Χημική σύσταση.....	18
2.4.1. Σύσταση και δομή της ανόργανης φάσης.....	18
2.4.1.1. Μηχανισμός Κρυστάλλωσης Υδροξυαπατίτη .....	19
2.4.1.2. Συνεισφορά αμινοξέων στον σχηματισμό της ανόργανης φάσης.....	20
2.4.1.3. Δομή και ιδιότητες L – αργινίνης.....	20
2.4.2. Σύσταση και δομή της οργανικής φάσης.....	21
2.4.2.1. Κολλαγόνο.....	21
2.4.2.2. Μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες.....	22
2.5. Ο ρόλος των κυττάρων στον οστικό ιστό.....	23
3. Βιοϋλικά .....	25
3.1. Ικρίωματα.....	25
3.2. Οστικά Ικρίωματα .....	26
4. Τριδιάστατη Εκτύπωση.....	28
4.1. Στερεολιθογραφία .....	29
4.2. Επιλεκτική Συσσωμάτωση με Λείζερ.....	30
4.3. Κατασκευή με Εναπόθεση Συνδετικού Υλικού .....	31
4.4. Κατασκευή με Εναπόθεση Υλικού.....	32
4.5. Τεχνικές Εξώθησης Διαλυμάτων/Αιωρημάτων.....	33
4.6. Τριδιάστατη Βιοεκτύπωση Ιστών/Οργάνων.....	34
5. Υδρογέλες.....	35
5.1. Εκτυπωτική Συμπεριφορά (Printability) Υδρογελών .....	36
5.1.1. Ρεολογία και Διασύνδεση.....	36
5.1.2. Παράμετροι τριδιάστατης εκτύπωσης .....	37
5.2. Φυσικά βιοϋλικά με βάση τους πολυσακχαρίτες .....	38
5.2.1. Χιτοζάνη (Chitosan).....	38
5.3. Φυσικά βιοϋλικά με βάση τις πρωτεΐνες.....	40

5.3.1.	<i>Κολλαγόνο (Collagen)</i> .....	40
5.3.2.	<i>Ζελατίνη (Gelatin)</i> .....	41
5.4.	<i>Διασύνδεση (Cross- linking)</i> .....	42
5.4.1.	<i>Γλουταραλδεΐδη (Glutaraldehyde)</i> .....	43
5.4.2.	<i>Γενπίνη (Genipin)</i> .....	45
II.	<b>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	47
6.1.	<b>Σύνθεση υβριδικού νανοδομημένου υλικού</b> .....	48
6.1.1.	<i>Βιομημητική ανάπτυξη κρυστάλλων υδροξυαπατίτη</i> .....	48
6.1.2.	<i>Χημική διασύνδεση (Chemical Cross-linking)</i> .....	51
6.1.3.	<i>Ρύθμιση ρεολογικών ιδιοτήτων</i> .....	51
6.2.	<b>Ανάπτυξη Ικριωμάτων μέσω τριδιάστατης (3D) εκτύπωσης</b> .....	52
6.2.1.	<i>Σύστημα Τριδιάστατης Εκτύπωσης</i> .....	53
6.2.2.	<i>Βελτιστοποίηση Παραμέτρων Εκτύπωσης</i> .....	59
6.2.3.	<i>Τριδιάστατη Εκτύπωση Ικριωμάτων</i> .....	61
7.	<b>Χαρακτηρισμός Δομής και Μηχανικών Ιδιοτήτων</b> .....	63
7.1.	<b>Υπολογιστική Μικροτομογραφία Ακτίνων-Χ (X-ray computed microtomography)</b> .....	63
7.2.	<b>Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM)</b> .....	64
7.3.	<b>Μέτρηση Νανομηχανικών Ιδιοτήτων – Νανοδιείσδυση (Nanoindentation)</b> .....	65
8.	<b>Μελέτες Βιολογικής Συμπεριφοράς Ικριωμάτων</b> .....	67
8.1.	<b>Ανάπτυξη κυτταρικών καλλιιεργειών</b> .....	67
8.1.1.	<i>Πρωτόκολλο διατήρησης της κυτταροκαλλιιεργείας</i> .....	68
8.2.	<b>Έλεγχος κυτταρικής βιωσιμότητας – Μέθοδος MTT (MTT Assay)</b> .....	69
8.3.	<b>Έλεγχος κυτταρικής απόπτωσης με χρήση δύο φθοριζουσών ουσιών (FDA/PI)</b> .....	69
8.4.	<b>Οπτική παρακολούθηση μορφολογίας κυττάρων μέσω Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Σάρωσης</b> .....	70
8.4.1.	<i>Πρωτόκολλο Μονιμοποίησης</i> .....	71
10.	<b>Χαρακτηρισμός πορώδους δομής και μηχανικών ιδιοτήτων ικριωμάτων</b> .....	80
10.1.	<b>Υπολογιστική Μικροτομογραφία Ακτίνων – Χ</b> .....	80
10.3.	<b>Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης</b> .....	83
10.2.	<b>Μέτρηση Νανομηχανικών Ιδιοτήτων – Νανοδιείσδυση (Nanoindentation)</b> .....	85
11.	<b>Βιολογική συμπεριφορά ικριωμάτων</b> .....	88
11.1.	<b>Μέθοδος MTT</b> .....	88
11.2.	<b>Μέθοδος φθοριζουσών ουσιών FDA/PI</b> .....	90

<b>11.3 Μορφολογία κυττάρων .....</b>	<b>91</b>
<b>IV. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>96</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>99</b>

## **I. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## 1. Μια εισαγωγή στην Ιστική Μηχανική (Tissue Engineering)

Η απώλεια ή μερική καταστροφή ενός ιστού, καθώς και η μη αναστρέψιμη οργανική ανεπάρκεια, αποτελούν δύο από τα σημαντικότερα προβλήματα του Τομέα της Ιατρικής. Οι συνηθέστεροι τρόποι αντιμετώπισης των συγκεκριμένων περιστατικών είναι μέσω φαρμακευτικής αγωγής, χειρουργικής επέμβασης και τοποθέτησης ιατρικών συσκευών στον οργανισμό του ασθενούς. Ο πιο αποτελεσματικός ωστόσο τρόπος, είναι η μεταμόσχευση ιστών και οργάνων σε περιπτώσεις υψίστης σημασίας. Οι εν λόγω τακτικές ενέχουν περιορισμούς όπως η αποτυχία πλήρους αποκατάστασης και η πρόκληση ανοσολογικών αποκρίσεων. Δεδομένου όμως και του συνεχώς μειούμενου αριθμού δότην σε σχέση με τον αντίστοιχο των ασθενών, κρίνεται επιτακτική η αναζήτηση καινοτόμων λύσεων για την αποκατάσταση της λειτουργικότητας ιστών και οργάνων.

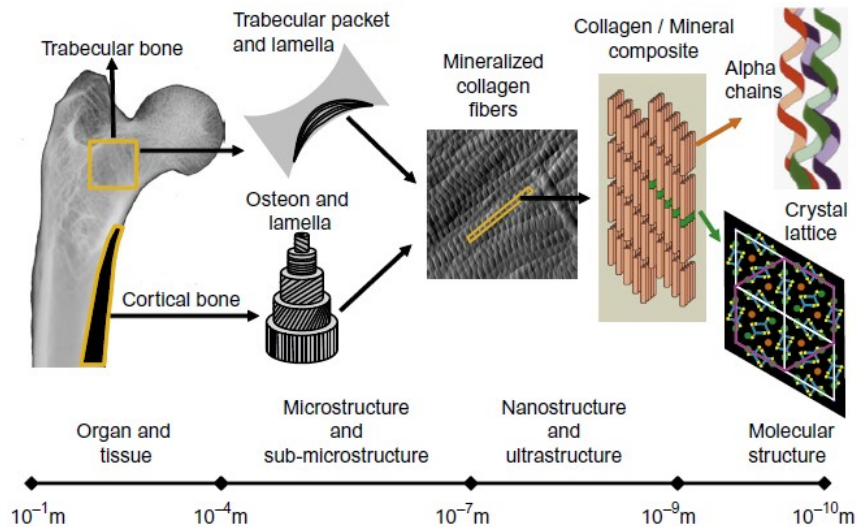
Η Ιστική Μηχανική αποτελεί ένα διεπιστημονικό πεδίο που εφαρμόζει τις αρχές της μηχανικής των επιστημών της ζωής προς την κατεύθυνση της ανάπτυξης βιολογικών υποκατάστατων που επαναφέρουν, διατηρούν ή βελτιώνουν τη λειτουργία των ιστών ή ενός ολόκληρου οργάνου.<sup>[1]</sup> Πολύτιμο εργαλείο στον σκοπό αυτό, είναι τα ικρίσματα, τριδιάστατες δομές ειδικά σχεδιασμένες για τις εξατομικευμένες ανάγκες της κάθε εφαρμογής. Τα ικρίσματα φέροντας κύτταρα του ίδιου του ασθενούς, επιτελούν το ρόλο ενός ζωντανού ιστού που «μεσολαβεί» στην παθούσα περιοχή για την επούλωση και ανάπτυξη του φυσικού ιστού. Η Ιστική Μηχανική προσανατολίζεται στη μελέτη και κατάλληλη επιλογή υλικών που θα συντελέσουν στην ορθή αποκατάσταση της πάσχουσας περιοχής. Ωστόσο, δεν παύουν να υπάρχουν περιπτώσεις όπου ένα ικρίσμα αποτυγχάνει να λειτουργήσει ορθά λόγω μηχανικής αστοχίας ή ανοσολογικών αντιδράσεων που οφείλονται στη σύνθεσή του.<sup>[2]</sup>

## 2. Το φυσικό οστό

Τα οστά αποτελούν ιδιαίτερα εξειδικευμένα όργανα, ικανά να επιτελούν πληθώρα λειτουργιών, συνεισφέροντας στη μηχανική υποστήριξη και προστασία του οργανισμού, την ομοιόσταση και την παραγωγή ερυθρών αιμοσφαιρίων (αιματοποίηση). Παράλληλα επιτελούν και ενδοκρινικές λειτουργίες. Από τα προαναφερθέντα, οι μηχανικές ιδιότητες και λειτουργίες είναι εκτενέστερα μελετημένες. Σε αυτές συνεισφέρουν τόσο το φλοιώδες (cortical) όσο και το σπογγώδες (cancellous) οστό, με διαφορετικό ωστόσο τρόπο.<sup>[3]</sup> Το πυκνό φλοιώδες οστό αποτελεί το μεγαλύτερο ποσοστό της οστικής μάζας και επωμίζεται σχεδόν εξολοκλήρου την καταπόνηση του βάρους του οργανισμού. Παρόλο που σε αυτό συνεισφέρει και το σπογγώδες οστό, βασικός του ρόλος είναι να ανακατευθύνει τα υφιστάμενα φορτία στο ανθεκτικότερο φλοιώδες περίβλημα του οστού. Η διάρθρωση του οστού σε διαφορετικές κλίμακες μεγεθών (μακρο – μικρο – νανο) συνεισφέρει στην αποφυγή της θραύσης του, λόγω του συνεχούς φέροντος φορτίου του οργανισμού.<sup>[4]</sup>

Τα οστά προσφέρουν προστασία ειδικά σε ζωτικής σημασίας περιοχές όπως ο θώρακας και το κεφάλι, όπου ένας τραυματισμός μπορεί να καταστεί θανάσιμος. Στις περιοχές αυτές, η μικροδομή, παρότι δε διαφέρει σε σχέση με τις υπόλοιπες οστικές περιοχές, είναι οργανωμένη κατά τρόπο τέτοιο ώστε να απορροφά τη μέγιστη δυνατή ενέργεια, μειώνοντας δραστικά την έκταση του εν δυνάμει τραύματος. Επιπλέον, οι περιοχές του σπογγώδους οστού συμμετέχουν στη σύνθεση του αίματος (αιμοποιητικό όργανο). Παραδείγματα των εν λόγω περιοχών είναι το λαγόνιο και το μηριαίο οστό.<sup>[5]</sup>

Το φυσικό οστό πρόκειται για ένα ιεραρχικά δομημένο και πολυσύνθετο υλικό που παρουσιάζει ετερογενή και ανισοτροπική δομή. Η περίπλοκη δομική του διάρθρωση είναι και αυτή που το καθιστά ικανό να επιτελεί τις προαναφερθείσες λειτουργίες. Τον οστικό ιστό συνθέτουν συστατικά με μέγεθος που κυμαίνεται σε ευρύ φάσμα τιμών. Λόγω αυτού, η δομή έχει χωριστεί σε τρεις ορθά ορισμένες κατηγορίες: τη μακροδομή (>500 μm), τη μικροδομή (1 – 500 μm) και τη νανοδομή (<100 nm – 1 μm).<sup>[6]</sup>



Σχήμα 1: Η ιεραρχική οργάνωση του οστού.<sup>[3]</sup>

## 2.1. Μακροδομή

Από μακροσκοπικής άποψης, το οστό διακρίνεται σε φλοιώδες (cortical) και σπογγώδες (cancellous). Τα δύο είδη διαχωρίζονται μεταξύ τους με βάση το ποσοστό πορώδους τους, καθώς το πρώτο κυμαίνεται μεταξύ 4 – 28% ενώ το δεύτερο μεταξύ 40 – 95%. Η πυκνή διάρθρωση του φλοιώδους οστού συνιστά ένα άκαμπτο εξωτερικό περίβλημα, ικανό να αντιστέκεται σε δυνάμεις παραμόρφωσης, παρέχοντας προστασία και υποστήριξη στις εσωτερικές περιοχές τους. Αντίθετα, το σπογγώδες τμήμα, παρουσιάζει πόρους με διαστάσεις στη μακροκλίμακα, εντός των οποίων βρίσκεται ο μυελός των οστών. Η περιοχή αυτή συναντάται στο κέντρο όλων των οστών. Οι πυκνότητες του φλοιώδους και του σπογγώδους τμήματος κυμαίνονται μεταξύ  $1.8 - 2 \text{ mg/m}^3$  και  $0.07 - 0.97 \text{ mg/m}^3$  αντίστοιχα. Επιπλέον, το σπογγώδες οστό συχνά έχει υψηλότερο βαθμό μεταβολικής δραστηριότητας και ανταποκρίνεται καλύτερα στις μεταβολές των μηχανικών φορτίσεων.<sup>[3,7]</sup>

## 2.2. Μικροδομή

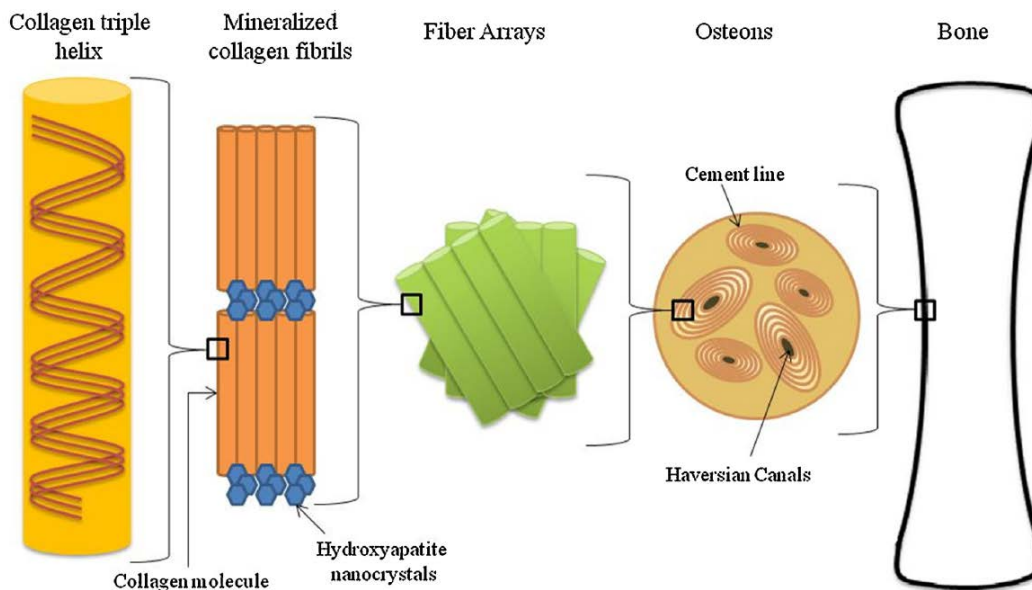
Το φλοιώδες οστό είναι οργανωμένο σε Αβερσιανά συστήματα (Haversian systems), γνωστά και ως οστεοειδή (μικροσκοπικοί οστικοί κύλινδροι). Τα οστεοειδή έχουν συνήθως διάμετρο 200 – 250 μm και είναι προσανατολισμένα παράλληλα με τον επιμήκη άξονα του εκάστοτε οστού. Στο κέντρο των οστεοειδών, συναντώνται τα Αβερσιανά κανάλια (Haversian canals), που χαρακτηρίζονται από διάμετρο περίπου 50 μm και εμπεριέχουν αιμοφόρα και λεμφικά αγγεία, όπως και νεύρα. Τα εν λόγω κανάλια περιβάλλονται από ομόκεντρους δακτυλίους μεμβρανών (lamellae) αποτελούμενες από ίνες κολλαγόνου πάχους 3 -7 μm.<sup>[3]</sup> Μεταξύ των μεμβρανών βρίσκονται μικροσκοπικές περιοχές (lacunae) που περιέχουν οστεοκύτταρα (osteocytes). Οι περιοχές των οστεοκυττάρων συνδέονται μεταξύ τους



μέσω ενός διακλαδιζόμενου δικτύου μικροσκοπικών καναλιών που μεταφέρουν μεταβολικά απόβλητα και θρεπτικά συστατικά, από και προς τα οστεοκύτταρα. Τα τελευταία επικοινωνούν μεταξύ τους μέσω των καναλιών Βόλκμαν (Volkmann's canals) που περιέχουν αιμοφόρα αγγεία τα οποία και συνενώνονται με τα αντίστοιχα των Αβερσιανών καναλιών. Όσον αφορά στη δομή του σπογγώδους ιστού, πρόκειται για ένα πλέγμα από ακανόνιστα διατεταγμένες κυψελίδες, αποτελούμενες από λεπτά πλακίδια οστικών δοκίδων πάχους 50 – 400 μm, ενώ οι εσωτερικές κοιλότητες περιέχουν μυελό των οστών. Τα θρεπτικά συστατικά λαμβάνονται μέσω αιμοφόρων αγγείων που διέρχονται μέσω του μυελού, καθώς και από οστεοκύτταρα, οστεοβλάστες (κύτταρα υπεύθυνα για τον σχηματισμό οστού) και οστεοκλάστες (κύτταρα υπεύθυνα για την αποδόμηση οστού).<sup>[8]</sup>

### 2.3. Νανοδομή

Σε επίπεδο νανοκλίμακας τα οστεοειδή συντίθενται κατά κύριο λόγο από ίνες κολλαγόνου διαμέτρου 0.2 – 1.2 μm, οι οποίες σχηματίζονται από δέσμες ακόμα μικρότερων ινών, τα ινίδια. Το κολλαγόνο αποτελείται από διατεταγμένα μόρια τροποκολλαγόνου, με συνήθεις διαστάσεις μήκους 300 nm και πλάτους 1.5 nm.<sup>[9]</sup> Το κάθε μόριο τροποκολλαγόνου προκύπτει από τη σύνθεση τριών ελίκων πεπτιδίων (μονομερή πρωτεϊνών αποτελούμενα από αμινοξέα), γνωστές ως α – αλυσίδες. Οι αλυσίδες ενώνονται μεταξύ τους σε μορφή δεξιόστροφης τριπλής έλικας, σχηματίζοντας έτσι το ινίδιο κολλαγόνου με μέση διάμετρο 100 nm.<sup>[10]</sup> Τα ινίδια δύναται να αποτελούνται από κολλαγόνο τύπου I ή V και διατάσσονται παράλληλα σε μοτίβο που επαναλαμβάνεται κάθε 64 nm. Μεταξύ των ινιδίων κολλαγόνου βρίσκονται μικρές οπές μεγέθους 40 nm εντός των οποίων συναντώνται κρύσταλλοι απατίτη. Οι εν λόγω ανόργανοι κρύσταλλοι, παρατηρούνται είτε στη μορφή λεπτών φύλλων είτε βελονών σε διαφορετικά μεγέθη. Συγκεκριμένα, έχουν μήκος 40 – 60 nm, πλάτος 5 – 25 nm και πάχος 1.5 – 5 nm.<sup>[4]</sup>



**Σχήμα 2:** Ιεραρχική δομή του οστού. Η τριπλή έλικα του κολλαγόνου σχηματίζει ινίδια με τους νανοκρυστάλλους του υδροξυαπατίτη. Τα ινίδια διαστρωματώνονται σε συστοιχία μεμβρανών που με τη σειρά τους αναδιπλώνονται σχηματίζοντας τα οστεοειδή. Τα οστεοειδή πακτώνονται διαμορφώνοντας το συμπαγές οστό.<sup>[10]</sup>

## 2.4. Χημική σύσταση

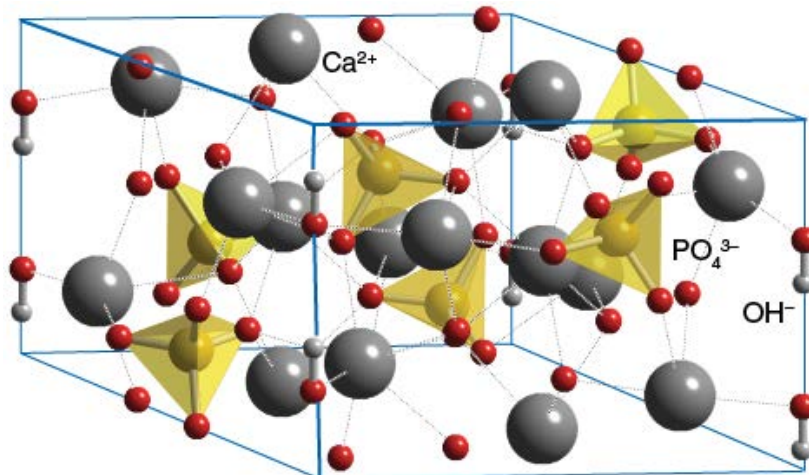
Ο οστικός ιστός αποτελείται κατά 90% κ.β. από ανόργανες και οργανικές φάσεις, ενώ το υπόλοιπο 10% κ.β. αντιστοιχεί σε νερό. Η ανόργανη φάση αντιστοιχεί σε κρυστάλλους απατίτη που καταλαμβάνουν ποσοστό 65 – 70 % επί του συνολικού βάρους του εκάστοτε οστού, εξαιρουμένου του νερού.<sup>[3]</sup> Η παρουσία απατίτη συνεισφέρει στην αντοχή του οστού σε θλιπτικές καταπονήσεις, ενισχύοντας ταυτόχρονα το μέτρο ελαστικότητας και τη σκληρότητα.<sup>[4]</sup> Η ανόργανη φάση χαρακτηρίζεται από μη – στοιχειομετρικό ανθρακικό υδροξυαπατίτη (HAp) που περιέχει ασβέστιο (Ca) και φώσφορο (P) σε μοριακές αναλογίες Ca/P, μεταξύ 1.37 και 1.87. Το υπόλοιπο 30 – 35% αντιστοιχεί στην οργανική φάση και ειδικότερα σε κολλαγόνο τύπου I - που είναι και το επικρατές συστατικό (90%) - και σε μη – κολλαγονούχες πρωτεΐνες (πρωτεογλυκάνες, γλυκοπρωτεΐνες, οστεοκαλσίνη, οστεονεκτίνη κ.ά.) που συνδέουν την ανόργανη φάση με τις ίνες κολλαγόνου. Αντίστοιχα με τη συνεισφορά της ανόργανης, η οργανική φάση προσφέρει αντοχή σε εφελκυστικές παραμορφώσεις, ελαστικότητα και αντοχή στη θραύση.<sup>[6]</sup>

### 2.4.1. Σύσταση και δομή της ανόργανης φάσης

Το ανόργανο τμήμα του οστού αποτελείται κυρίως από υδροξυαπατίτη,  $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ , που αποτελεί το σταθερότερο από τα φωσφορικά άλατα του ασβεστίου. Όλες οι μορφές του απατίτη, παρουσιάζουν πολύπλοκη χημική σύσταση, καθώς υφίστανται χημικές αντικαταστάσεις των ιόντων στο κρυσταλλικό τους πλέγμα. Συνηθέστερες αντικαταστάσεις πραγματοποιούνται από ανθρακικά άλατα και μαγνήσιο ή ιχνοστοιχεία, το είδος των οποίων εξαρτάται από τη διατροφή και το περιβάλλον του οργανισμού. Ο υδροξυαπατίτης διαθέτει εξαγωνική δομή και στοιχειομετρική αναλογία Ca/P 1.67.<sup>[11]</sup>

Ο υδροξυαπατίτης αποτελεί το κυριότερο συστατικό του ανόργανου τμήματος των σκληρών ανθρώπινων ιστών (οστά και δόντια) και ένα από τα συνηθέστερα βιοϋλικά που μελετώνται στο πλαίσιο της Ιστικής Μηχανικής. Η σταθερή μακρομοριακή δομή του σε συνδυασμό με τη χαμηλή του διαλυτότητα σε φυσιολογικές τιμές pH, συντελούν σε σχετική αντίσταση σε αναρρόφηση *in vivo*. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε βιολογικά συστήματα δεν εντοπίζεται «καθαρός» υδροξυαπατίτης, λόγω των προαναφερθέντων χημικών υποκαταστάσεων των ιόντων του πλέγματος. Οι υποκαταστάσεις μπορεί να περιλαμβάνουν την υποκατάσταση των ιόντων ασβεστίου ( $Ca^{2+}$ ) από ιόντα στροντίου ( $Sr^{2+}$ ), των ιόντων νατρίου ( $Na^+$ ) από ιόντα μαγνησίου ( $Mg^+$ ), των ιόντων υδροξυλίου ( $OH^-$ ) από ιόντα φθορίου ( $F^-$ ) και χλωρίου ( $Cl^-$ ) και φωσφορικών ιόντων ( $PO_4^{3-}$ ) από ανθρακικά ( $CO_3^{2-}$ ) και θειικά ιόντα ( $SO_4^{2-}$ ).<sup>[12]</sup>

Μελέτες ενισχύουν την καταλληλότητα του υδροξυαπατίτη, καθώς φαίνεται πως εμφανίζει ιδιότητες οστεοαγωγικότητας και κατ' επέκταση μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως κρίωμα πάνω στο οποίο θα αναπλαστεί το οστό. Εμφυτεύματα υδροξυαπατίτη εμφανίζουν ταχύτερο ρυθμό ανάπτυξης σε σχέση με τα οστικά μοσχεύματα, ενώ και οι χόνδροι δύναται να επιδιορθωθούν μέσω αντίστοιχων πορωδών κριωμάτων. Μεταξύ εμφυτεύματος και οστού σχηματίζονται χημικοί δεσμοί σε μία διαδικασία που αναφέρεται ως οστεοενσωμάτωση. Ο νανο – υδροξυαπατίτης προσελκύει εξίσου το ενδιαφέρον της έρευνας στο χώρο της Ιστικής Μηχανικής, λόγω της ομοιότητας του σε μέγεθος, κρυσταλλική δομή και χημική σύσταση με τον ανθρώπινο σκληρό συνδετικό ιστό.<sup>[14]</sup>



Σχήμα 3: Απεικόνιση χημικής δομής του υδροξυαπατίτη.<sup>[13]</sup>

#### 2.4.1.1. Μηχανισμός Κρυστάλλωσης Υδροξυαπατίτη

Ο υδροξυαπατίτης κρυσταλλώνεται μέσω καθίζησης ενδιάμεσων φάσεων, που διαλύονται και επανακαθιζάνουν μέχρι τον σχηματισμό της πιο θερμοδυναμικά σταθερής φάσης του. Αναλόγως το υφιστάμενο pH, καθιζάνουν και διαφορετικές φάσεις. Ειδικότερα, για υψηλές τιμές pH, παρατηρείται καθίζηση άμορφου φωσφορικού ασβεστίου (ACP) και φωσφορικού οκτασβεστίου (OCP), ενώ για χαμηλές, ένυδρο φωσφορικό διασβέστιο (DCPD). Η εν λόγω καθίζηση ακολουθεί τον νόμο του Ostwald για την καθίζηση ελαφρώς διαλυτών ιοντικών αλάτων, που προβλέπει ότι η φάση που τείνει να σχηματιστεί είναι η λιγότερο σταθερή και έχει τη μεγαλύτερη διαλυτότητα.<sup>[3]</sup>

Η διαδικασία της κρυσταλλοποίησης ξεκινά όταν η συγκέντρωση των ιόντων στο διάλυμα ξεπερνά τη σταθερά διαλυτότητας του προϊόντος για τον εκάστοτε κρύσταλλο. Η διαλυτότητα καθορίζει τις θερμοδυναμικές συνθήκες που απαιτούνται για την καθίζηση της ανόργανης φάσης και συνδέεται με τη δραστηκότητα των ιόντων στο διάλυμα σε ισορροπία με τη στερεά φάση. Απαραίτητη προϋπόθεση για την κρυσταλλοποίηση είναι ο σχηματισμός πυρήνων, μία διαδικασία που μπορεί να συμβεί είτε αυθόρμητα (ομογενής), είτε ενεργοποιείται με την παρουσία ξένων ουσιών ή άλλων κρυστάλλων (ετερογενής). Ο ετερογενής σχηματισμός είναι θερμοδυναμικά πιο εφικτός, καθώς παρέχεται επαρκής επιφάνεια για την ανάπτυξη κρυστάλλων, μειώνοντας τη ενέργεια ενεργοποίησης της διαδικασίας. Επιπρόσθετα, η ορθή χημική και δομική αλληλεπίδραση καινούργιων και ήδη υπαρχόντων φάσεων και η ύπαρξη προσθέτων, δρουν ενισχυτικά, μειώνοντας περαιτέρω την ενέργεια ενεργοποίησης.<sup>[9]</sup>

Η ανάπτυξη των κρυστάλλων εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα των ιόντων στο διάλυμα. Δεδομένου ότι ο υπερκορεσμός είναι εντονότερος από τη δραστηκότητα του προϊόντος, η ανάπτυξη των κρυστάλλων θα συνεχιστεί μέχρις ότου επιτευχθεί ισορροπία. Σε δεδομένη ωστόσο συγκέντρωση ιόντων, όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των διαθέσιμων θέσεων ανάπτυξης πυρήνων, τόσο μικρότερο είναι το μέγεθος των παραγόμενων κρυστάλλων. Η ανάπτυξη των τελευταίων εξαρτάται επίσης από τη δομή και το είδος της φάσης που καθιζάνει. Εάν η δομή περιέχει μεγάλο αριθμό επιφανειακών ατελειών, όπου η κρυσταλλοποίηση δεν είναι θερμοδυναμικά εφικτή, η ανάπτυξη θα σταματήσει. Ομοίως, στην περίπτωση που η δεύτερη, πιο διαλυτή φάση, επικαθίσει επί της αρχικής, η ανάπτυξη θα παρεμποδιστεί.

Παρεμπόδιση της κρυσταλλικής ανάπτυξης από πρόσθετα επιτυγχάνεται με προσρόφησή τους στην επιφάνεια του αναπτυσσόμενου κρύσταλλου, μπλοκάροντας έτσι την ανάπτυξή του. Εάν τα πρόσθετα προσροφώνται επιλεκτικά σε συγκεκριμένες κρυσταλλικές επιφάνειες, τότε η ανάπτυξη θα παρεμποδιστεί κατά τη συγκεκριμένη μόνο κατεύθυνση, τροποποιώντας με αυτόν τον τρόπο τη μορφολογία του κρυστάλλου.<sup>[10,15]</sup>

#### 2.4.1.2. Συνεισφορά αμινοξέων στον σχηματισμό της ανόργανης φάσης

Τα αμινοξέα αποτελούν χημικές ενώσεις που περιέχουν μία τουλάχιστον ομάδα καρβοξυλίου (- COOH) και μία τουλάχιστον ομάδα αμίνης (- NH<sub>2</sub>) στο μόριο τους. Αποτελούν τη δομική μονάδα των πρωτεϊνών, καθορίζοντας παράλληλα τις χαρακτηριστικές τους ιδιότητες. Στη σύνθεση των πρωτεϊνών των ζωντανών οργανισμών συνεισφέρουν είκοσι (20) αμινοξέα (πρωτεϊνικά αμινοξέα). Κάθε αμινοξύ φέρει κωδικοποιημένη τουλάχιστον μία τριάδα (τριπλέτα) του γενετικού κώδικα DNA και συνδέεται με άλλα μέσω αμιδικών δεσμών προς σχηματισμό πεπτιδίων.<sup>[16]</sup>

Όπως και σάκχαρα, τα αμινοξέα (εκτός της γλυκίνης) υπάρχουν ως οπτικά ισομερή σε D- και L- μορφή, από τα οποία μόνο τα L- βρίσκονται στις πρωτεΐνες. Αντίθετα, τα αμινοξέα με D- απεικόνιση, συναντώνται στο κυτταρικό τοίχωμα βακτηρίων. Από τα είκοσι αμινοξέα, τα πέντε έχουν πλευρικές ομάδες, ικανές να σχηματίσουν ιόντα, όταν εκτεθούν σε κατάλληλο διάλυμα. Επιπλέον, τα αμινοξέα μπορούν να είναι υδρόφιλα και πολικά ή υδρόφοβα και μη πολικά. Η L- αργινίνη, η λυσίνη και η ιστιδίνη είναι τα μόνα αμινοξέα που εμφανίζουν βασικό pH σε υδατικό διάλυμα, με την πρώτη να αποκτά θετικό φορτίο σε pH ~ 7.<sup>[17]</sup>

Οι ζωντανοί οργανισμοί συνθέτουν μια πληθώρα ανόργανων ενώσεων με αξιοσημείωτες ιδιότητες και ιεραρχικές δομές, υπό την επίδραση βιομορίων όπως οι πρωτεΐνες και τα πεπτίδια. Η εν λόγω διαδικασία καλείται ασβεστοποίηση (biomineralization). Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η εξωκυττάρια μήτρα συνεισφέρει μέσω των ινών κολλαγόνου (τύπου I) στην τελική δομή και κατευθυντικότητα των κρυστάλλων του υδροξυαπατίτη. Ωστόσο η διαδικασία κρυστάλλωσης του υδροξυαπατίτη, ελέγχεται κατά βάση από μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες. Τα εν λόγω βιομόρια προσελκύουν τα ιόντα ασβεστίου και φωσφόρου, προκαλώντας τον υπερκορεσμό τους σε τοπικό επίπεδο. Εξαιτίας αυτού, σχηματίζονται πυρήνες κατάλληλου μεγέθους που εξελίσσονται σε κρυστάλλους υδροξυαπατίτη. Οι μη κολλαγονούχες ενώσεις απαντώνται σε μικρές ποσότητες στους ιστούς με τις κυριότερες εκ των οποίων να είναι η αργινίνη (Arg), η λυσίνη (Lys), το ασπαρτικό οξύ (Asp) και το γλουταμινικό οξύ (Glu).<sup>[18]</sup>

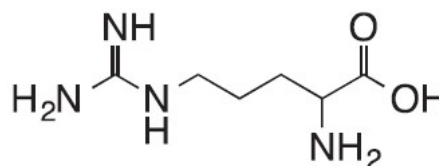
#### 2.4.1.3. Δομή και ιδιότητες L – αργινίνης

Η αργινίνη (Arg ή (S)-2-Amino-5-guanidinopentanoic acid) είναι ένα αμινοξύ με μοριακό τύπο C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> και η L απεικόνισή της αποτελεί ένα από τα πιο κοινά φυσικά αμινοξέα. Το μόριό της αποτελείται από μία αλειφατική ευθεία αλυσίδα τεσσάρων ανθράκων, στο τέλος της οποίας βρίσκεται μια σύνθετη γουανιδινομάδα. Λόγω κλίσης διπλού δεσμού και μεμονωμένων δεσμών αζώτου, το θετικό φορτίο είναι απεντοπισμένο, καθιστώντας την L-αργινίνη ικανή να σχηματίσει δεσμούς υδρογόνου, συνδεόμενη με αρνητικά φορτισμένες ομάδες.

Η L – αργινίνη αποτελεί πολύτιμο για τον οργανισμό αμινοξύ, καθώς συμμετέχει σε πληθώρα βιοχημικών διεργασιών που σχετίζονται με τις φυσιολογικές του δραστηριότητες. Συνεισφέρει στη σύνθεση

πρωτεϊνών και την ενεργοποίηση της κυτταρικής ανάπτυξης. Παρά το γεγονός ότι συντίθεται σε επαρκείς ποσότητες στον οργανισμό, η χορήγηση της είναι επιβεβλημένη υπό περιπτώσεις (υπερβολική παραγωγή αμμωνίας, εγκαύματα, μολύνσεις κ.ά.). Συγκεκριμένα αποτελεί το 57% το αμινοξέων που λαμβάνονται από τη διατροφή.<sup>[19]</sup> Εξάλλου η L – αργινίνη σχετίζεται με την παραγωγή της L – προλίνης και πολυαμίνης οι οποίες συμμετέχουν στη σύνθεση του κολλαγόνου και της αυξητικής ορμόνης, που με τη σειρά τους είναι απαραίτητα για τη δόμηση και αποκατάσταση των οστικών ιστών και τη δημιουργία οστεοβλαστών.<sup>[20]</sup>

Η αργινίνη συνεισφέρει στη σύνθεση νανοκρυστάλλων υδροξυαπατίτη διευρύνοντας τη βιοδραστικότητα τους με επιφανειακή τροποποίηση. Παράλληλα καθορίζει το σχήμα και το μέγεθος των κρυστάλλων.<sup>[21]</sup> Όσον αφορά στην εφαρμογή της L – αργινίνης στον τομέα της Ιστικής Μηχανικής, το χαμηλό κόστος και η εγγενής βιοσυμβατότητα της, την καθιστούν εύκολα εφαρμόσιμο βιοϋλικό. Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι η χρήση του συγκεκριμένου αμινοξέος έχει διερευνηθεί εκτενώς ως παράγοντας περιορισμού της ανάπτυξης των κρυστάλλων του υδροξυαπατίτη, με στόχο την ανάπτυξη νανοκρυστάλλων.<sup>[22]</sup>

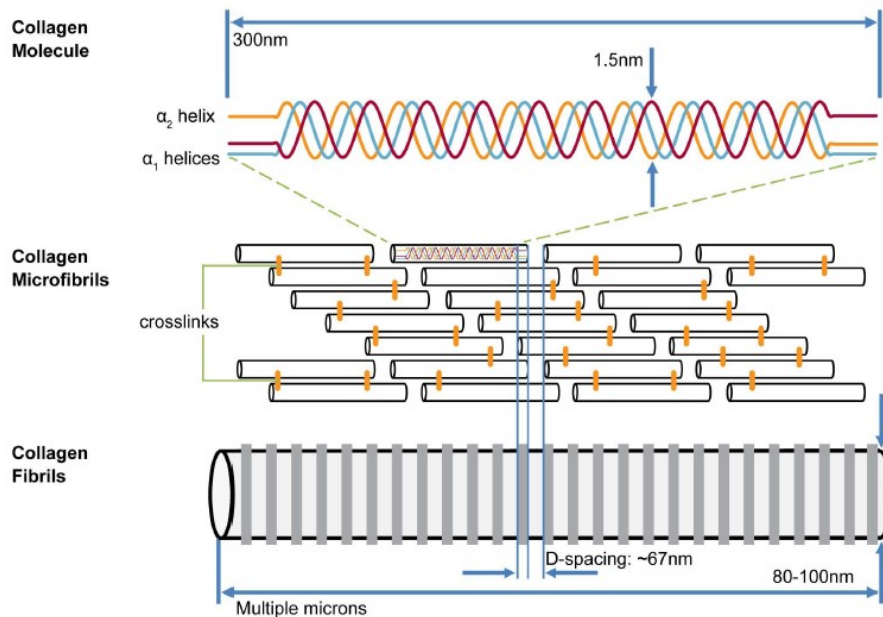


**Σχήμα 4:** Απεικόνιση χημικής δομής της L-αργινίνης.<sup>[21]</sup>

## 2.4.2. Σύσταση και δομή της οργανικής φάσης

### 2.4.2.1. Κολλαγόνο

Η οργανική φάση είναι ιδιαίτερα σημαντική για τις βιοχημικές και μηχανικές ιδιότητες του οστού. Αποτελείται από ένα πλήθος πρωτεϊνών, με κυριότερο συστατικό το κολλαγόνο τύπου I. Γενικότερα, το κολλαγόνο συναντάται σε 19 διαφορετικές μορφές (τύπους) στο εσωτερικό του ανθρώπινου οργανισμού, ωστόσο, στον οστικό ιστό εντοπίζεται μόνο ο τύπος I.<sup>[3]</sup> Το μόριο του κολλαγόνου αποτελείται από τρεις μακρομοριακές αλυσίδες. Οι δύο εξ' αυτών είναι πανομοιότυπες ( $\alpha_1(I)$  αλυσίδες) και η τρίτη διαφορετική ( $\alpha_2(II)$  αλυσίδα). Οι αλυσίδες σχηματίζουν μια ελικοειδή δεξιόστροφη δομή και κάθε μία εξ αυτών αποτελείται από 1014 αμινοξέα με βασικό χαρακτηριστικό τη συστηματική επανάληψη του αμινοξέος γλυκίνη (Gly). Συγκεκριμένα το τελευταίο επαναλαμβάνεται μετά από κάθε τρία αμινοξέα με σειρά διαδοχής Gly – X – Y, όπου οι θέσεις X και Y καταλαμβάνονται συνήθως από προλίνη (Pro) και υδροξυπρολίνη (Hyr).<sup>[6,23]</sup>



**Σχήμα 5:** Η οργάνωση και η δομή του κολλαγόνου.<sup>[24]</sup>

Υπεύθυνοι για την παραγωγή κολλαγόνου είναι οι ινοβλάστες, παρότι υπάρχουν και άλλα κύτταρα με αυτά τη δυνατότητα. Η σύνθεση πραγματοποιείται σταδιακά, περιλαμβάνοντας μία πληθώρα αντιδράσεων. Αρχικά, στο εσωτερικό των ινοβλαστών, σχηματίζονται τα πεπτιδία και εν συνεχεία, η προλίνη και η λυσίνη υδροξυλιώνονται. Κατόπιν συνδέονται σε αυτές σάκχαρα (γλυκόζη, γαλακτόζη κ.ά.) με ομοιοπολικούς δεσμούς χάρη σε ενζυματική διασύνδεση. Ακολουθεί ο σχηματισμός τις τριπλής αλυσίδας στα ριβοσώματα, οδηγώντας στην κατασκευή του προκολλαγόνου, που αποτελεί το πρόδρομο μόριο του κολλαγόνου. Οι δέσμες του προκολλαγόνου εκκρίνονται στον εξωκυττάριο χώρο, όπου κόβονται τα μη ελικοειδή άκρα τους από τις πρωτεάσες, τροποποιώντας τα μόρια σε τροποκολλαγόνο. Τα μόρια του τελευταίου συνδέονται μεταξύ τους συνιστώντας τα ινίδια του κολλαγόνου τα οποία με τη σειρά τους διασυνδέονται και συναθροίζονται προς τον σχηματισμό ινών. Οι διασυνδέσεις είναι δεσμοί ομοιοπολικής φύσης μεταξύ των αμινοξέων της λυσίνης και υδροξυλυσίνης και σχηματίζουν ένα πλέγμα που αυξάνει τη μηχανική και χημική αντοχή του κολλαγόνου.<sup>[24,25]</sup>

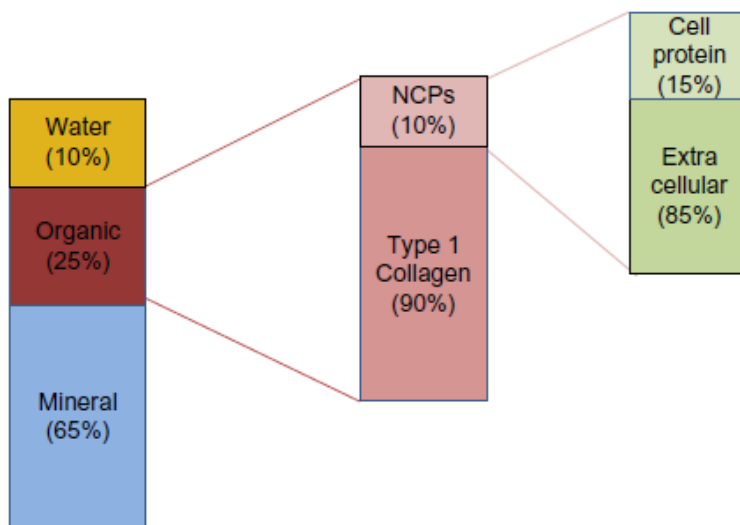
#### 2.4.2.2. Μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες

Οι κολλαγονούχες πρωτεΐνες αποτελούν το 10-15% του συνολικού ποσοστού των πρωτεϊνών στον οστικό ιστό. Έχουν ωστόσο πολλαπλούς ρόλους, όπως η οργάνωση της εξωκυττάριας μήτρας, ο συντονισμός των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των κυττάρων και του ιστού όπως και μεταξύ των οργανικών και των ανόργανων φάσεων. Επιπλέον συνεισφέρουν στη διαδικασία ασβεστοποίησης. Η πολυδιάστατη λειτουργικότητα τους οφείλεται στη δομή τους, η οποία στις περισσότερες περιπτώσεις συνίσταται από τυχαία συνδεδεμένα πεπτιδία, καθιστώντας τις μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες ικανές να συνδεθούν με πληθώρα σωματιδίων. Συνοπτικά, οι μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες διαχωρίζονται στις εξής κατηγορίες:<sup>[3,5]</sup>

1. **Πρωτεογλυκάνες** (θειική ηπαρίνη, υαλουρονικό οξύ, βερσικάνη): Πρόκειται για ευρεία κατηγορία μορίων που αποτελούνται από μία κεντρική πρωτεΐνη, συνδεδεμένη με πλευρικές

ομάδες γλυκοζαμινών. Χαρακτηρίζονται από κυμαινόμενο μέγεθος, ανάλογα τον ιστό στον οποίο εντοπίζονται. Όσον αφορά στον οστικό ιστό, οι πρωτεογλυκάνες συνεισφέρουν στην πυρήνωση του υδροξυαπατίτη και στην ανάπτυξη των κρυστάλλων του.

2. **Γλυκοπρωτεΐνες** (αλκαλική φωσφατάση, ινονεκτίνη, θρομβοσπονδίνη, βιτρονεκτίνη): Παρόλο που οι λειτουργίες των γλυκοπρωτεϊνών δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί, ορισμένες εξ αυτών διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ασβεστοποίησης. Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα της αλκαλικής φωσφατάσης, που είναι υπεύθυνη για την ομαλή ανάπτυξη των κρυστάλλων του υδροξυαπατίτη, που οδηγεί σε εξομάλυνση της ασβεστοποίησης.
3. **Οστεοκαλσίνη**: Η συγκεκριμένη συνεισφέρει στην ανάπτυξη της ανόργανης φάσης. Εκφράζεται μέσω οστεοβλαστών και οστεοκυττάρων και για αυτόν τον λόγο αποτελεί δείκτη της ανάπτυξης του οστού. Συγκεκριμένα αυξημένα ποσότητα οστεοκαλσίνης αντικατοπτρίζει τη διαδικασία επιδιόρθωσης του οστού.
4. **Οστεονεκτίνη**: Συνδέεται τόσο με τον υδροξυαπατίτη, όσο και με το κολλαγόνο και συνεισφέρει στον σχηματισμό καινούργιων κρυστάλλων. Επιπλέον, συνδράμει στον πολλαπλασιασμό των οστεοβλαστών και η απουσία της οδηγεί σε φαινόμενα όπως η οστεοπενία και η χαμηλή οστική μάζα.



**Σχήμα 6:** Το οστό αποτελείται από οργανικές και ανόργανες φάσεις και νερό. Η πλειοψηφία της οργανικής φάσης καταλαμβάνεται από κολλαγόνο τύπου I, ωστόσο συναντώνται και μη κολλαγονούχες ενώσεις που συνεισφέρουν στην ασβεστοποίηση. Το μεγαλύτερο ποσοστό των πρωτεϊνών βρίσκεται εκτός των κυττάρων.<sup>[3]</sup>

## 2.5. Ο ρόλος των κυττάρων στον οστικό ιστό

Εκτός από τα βασικά δομικά συστατικά του, στο οστό συναντάται και ένας σημαντικός αριθμός κυττάρων. Πρόκειται για κύτταρα τεσσάρων διαφορετικών ειδών: α) τα αδιαφοροποίητα κύτταρα, β) οι οστεοβλάστες, γ) οι οστεοκλάστες και δ) τα οστεοκύτταρα. Πρωτεύουσα λειτουργία τους είναι η ρύθμιση του μεταβολισμού του οστού. Το οστό συντίθεται από τους οστεοβλάστες, συντηρείται και αποκαθίσταται από τα οστεοκύτταρα και αποδομείται από τους οστεοκλάστες.

### Αδιαφοροποίητα κύτταρα

Πρόκειται για μονοπύρηννα κύτταρα, μικρού μεγέθους που βρίσκονται στα κανάλια των οστών, στο ενδόστεο και στο περιόστεο. Με τη λήψη του κατάλληλου ερεθίσματος, διαφοροποιούνται σε οστεοβλάστες.<sup>[4]</sup>

### Οστεοβλάστες

Οι οστεοβλάστες είναι κυβοειδή κύτταρα με συνήθως έκκεντρο πυρήνα, τα οποία περιέχουν μεγάλο αριθμό συνθετικών οργανιλίων και εκτεταμένο ενδοπλασματικό δίκτυο. Πρόκειται για κύτταρα του συνδετικού ιστού και συναντώνται στις ελεύθερες επιφάνειες του οστού και όταν διεγερθούν κατάλληλα αλλάζουν το σχήμα τους (στρογγυλό, ελλειψοειδές ή πολυεδρικό) και επεκτείνονται με κυτταροπλασματικές προεκβολές εντός της θεμέλιας ουσίας επικοινωνώντας με τα οστεοκύτταρα. Τα εν λόγω κύτταρα συνθέτουν και εκκρίνουν την οργανική θεμέλια ουσία (κολλαγόνο τύπου I), μικρές ποσότητες κολλαγόνου τύπου V και πολυάριθμα μακρομόρια που συμμετέχουν στον σχηματισμό και επιδιόρθωση του οστού. Πρόκειται για κύτταρα που επωμίζονται τη σύνθεση, την απόθεση και την ανάπτυξη φωσφορικών αλάτων του ασβεστίου στην οστική θεμέλια ουσία, την οποία και εκκρίνουν.<sup>[4, 26]</sup>

### Οστεοκλάστες

Τα κύτταρα της συγκεκριμένης κατηγορίας σχηματίζονται έπειτα από συνένωση πολλών μονοπύρηννων κυττάρων, που προέρχονται από τον μυελό των οστών. Χαρακτηρίζονται επομένως από μεγάλο αριθμό πυρήνων, καθώς και μεγάλο και ακανόνιστο μέγεθος. Εξαιτίας της παραπάνω κυτταρικής συνένωσης, οι οστεοκλάστες διαθέτουν επαρκή αριθμό μιτοχονδρίων για να τους παρέχουν την απαραίτητη ενέργεια για τη βασική τους λειτουργία, την απορρόφηση του οστού. Οι οστεοκλάστες συμμετέχουν στην ομοίωση των οστών. Οι διαδικασίες σύνθεσης και αποδόμησης του οστού είναι αλληλοσυνδεμένες αλλά η δεύτερη συμβαίνει με μεγαλύτερη ταχύτητα.<sup>[27]</sup> Σε περίπτωση ελλείματος ασβεστίου, οι οστεοκλάστες ενεργοποιούνται, απελευθερώνοντας τοπικά ένζυμα που αυξάνουν τη διαλυτότητα των κρυστάλλων του υδροξυαπατίτη, αντλώντας την απαραίτητη ποσότητα ασβεστίου για τον οργανισμό. Μετά το πέρας της οστικής απορρόφησης, οι οστεοκλάστες δύναται να μετακινηθούν σε παρακείμενη οστική επιφάνεια, είτε να διαιρεθούν σε πολλαπλά μονοπύρηννα κύτταρα. Οι λειτουργίες των οστεοκλαστών και των οστεοβλαστών φαίνονται αντίθετες, παραμένουν ωστόσο συμπληρωματικές και ίσης σημασίας, καθώς οι πρώτοι είναι υπεύθυνοι για την αποδόμηση του οστού, ενώ οι δεύτεροι για την αναδόμησή του.<sup>[3]</sup>

### Οστεοκύτταρα

Τα οστεοκύτταρα αποτελούν την πλειοψηφία (90%) των κυττάρων ενός ώριμου σκελετού. Το σχήμα τους είναι ελλειψοειδές και εμφανίζουν μεγάλο αριθμό κυτταροπλασματικών προεκβολών ώστε να καθίσταται δυνατή η επικοινωνία τους με άλλα οστεοκύτταρα της ανόργανης θεμέλιας ουσίας και οστεοβλάστες της οργανικής θεμέλιας ουσίας. Τα οστεοκύτταρα διαδραματίζουν πρωτεύοντα ρόλο στη συντήρηση του οστού, τον οστικό μεταβολισμό και τη μεταφορά θρεπτικών και μεταβολικών αποβλήτων μέσω του αίματος.<sup>[4]</sup> Εξάλλου, δύναται να μεταφέρουν μηνύματα αναφορικά με αλλαγές στο μηχανικό περιβάλλον και τις καταπονήσεις των οστών, επηρεάζοντας δραστικά την προσαρμογή των τελευταίων. Βασικός ρόλος των συγκεκριμένων κυττάρων είναι επίσης η συντήρηση της δομής και σύστασης της



εξωκυττάριας ουσίας. Ο μεταβολικός ρυθμός και η παραγωγή τους υστερούν ωστόσο σε σχέση με των οστεοβλαστών. Ελέγχουν ακόμη την εξωκυττάρια συγκέντρωση του ασβεστίου και του φωσφόρου και εντοπίζουν αλλαγές στα επίπεδα των ορμονών όπως τα οιστρογόνα και τα κορτικοειδή που επηρεάζουν την επιβίωσή τους.<sup>[14]</sup>

### 3. Βιοϋλικά

Η επιστήμη των βιοϋλικών εξετάζει υλικά φυσικής προέλευσης ή κατασκευασμένα από τον άνθρωπο, μη – φαρμακευτικά, που χρησιμοποιούνται στη βιοϊατρική τεχνολογία ή σε ιατρικές συσκευές, με στόχο να αλληλεπιδράσουν με βιολογικά συστήματα ή οργανισμούς. Στην ευρύτερη κατηγορία των βιοϋλικών εντάσσεται κάθε υλικό ή συνδυασμός δύο ή περισσότερων υλικών, ικανών να λειτουργήσουν σε επαφή με ζωτικούς ιστούς χωρίς να προκαλούν ανεπιθύμητες παρενέργειες στον οργανισμό. Τα βιοϋλικά μπορούν να διατηρούνται σταθερά εντός του σημείου εμφύτευσης ή να αποδομούνται κατά ελεγχόμενο τρόπο, ανάλογα τις ανάγκες της εφαρμογής.<sup>[28]</sup>

Ένα βιοϋλικό θεωρείται λειτουργικό όταν διαθέτει παρεμφερείς – αν όχι όμοιες – μηχανικές, χημικές και βιολογικές ιδιότητες με το υλικό που καλείται να αντικαταστήσει. Πρέπει επομένως να είναι βιοσυμβατά και βιολειτουργικά, δηλαδή, κατά την απευθείας επαφή τους με τον φυσικό ιστό να αποτρέπονται καταστάσεις όπως η ανοσολογική ιστολογική αντίδραση, η τοξική αντίδραση και η καρκινογένεση. Τα βιοϋλικά είναι βιοαπορροφήσιμα, εφαρμόζονται ένθετα ή χειρουργικά και μπορούν να είναι μέταλλα, κράματα, κεραμικά, πολυμερή και σύνθετα υλικά. Εισάγονται προσωρινά ή μόνιμα εντός του ανθρώπινου οργανισμού με στόχο την αντικατάσταση ή βελτίωση της λειτουργίας τραυματισμένων ή εκφυλισμένων ιστών και οργάνων. Μπορούν να δράσουν υποβοηθώντας την εκάστοτε θεραπεία που ήδη εφαρμόζεται, ή τη διόρθωση μη φυσιολογικών αποκρίσεων. Βελτιώνουν επομένως την ποιότητα ζωής του ασθενούς.<sup>[29]</sup>

Τα φυσικά βιοϋλικά πρωταγωνιστούν στις έρευνες και εφαρμογές της επιστημονικής κοινότητας λόγω της ενισχυμένης βιολογικής απόκρισης που παρουσιάζουν σε σχέση με τα τεχνητά. Η χρήση τους σε ικρίωματα προσφέρει πλεονεκτήματα όπως η βιοσυμβατότητα και η βιοαποικοδομησιμότητα. Λόγω της φυσικής τους προέλευσης έχουν σχετικά χαμηλό κόστος, ενώ σπανίως προκαλούν ανοσολογικές αποκρίσεις. Εντούτοις, παρουσιάζουν περιορισμένη φυσική και μηχανική αντοχή με αποτέλεσμα η χρήση τους να κρίνεται ακατάλληλη για εφαρμογές σε περιοχές που απαιτούν αντοχή σε φορτίο. Ένα λοιπόν από τα ερευνητικά αντικείμενα της Ιστικής Μηχανικής είναι η διερεύνηση ιδανικών συνδυασμών βιοϋλικών για την κατασκευή ικριωμάτων που θα συγκεντρώνουν όσο το δυνατό καλύτερες ιδιότητες για αποτελεσματικότερη χρήση και λειτουργία.<sup>[30]</sup>

#### 3.1. Ικρίωματα

Κατά τον σοβαρό τραυματισμό ή την ολική απώλεια ενός ιστού, ένας μεγάλος αριθμός λειτουργικών κυττάρων, όπως και η εξωκυττάρια μήτρα του (extracellular matrix -ECM) καταστρέφονται. Δεδομένου ότι ο εκάστοτε ιστός αντιπροσωπεύει μια ιδιαίτερα οργανωμένη αλληλεπίδραση από κύτταρα και μήτρες, η αναγέννηση του ιστού πρέπει να χαρακτηρίζεται από την εν λόγω χωρική οργάνωση. Επομένως, η Ιστική Μηχανική προσανατολίζεται στην κατασκευή μιας τεχνητής ή φυσικά προερχόμενης εξωκυττάριας μήτρας, ικανής να ενισχύσει την ανάπτυξη του καινούργιου υγιούς ιστού.<sup>[31]</sup> Το γεγονός

ότι τα κύτταρα όταν τοποθετηθούν αυτούσια στην πάσχουσα περιοχή, είναι ικανά να δημιουργήσουν μία ιστική δομή σε περιορισμένο βαθμό, απαιτείται η ύπαρξη ενός «υποστρώματος» που θα καθοδηγεί την οργάνωσή τους. Το υποκατάστατο της φυσικής εξωκυττάριας μήτρας χαρακτηρίζεται ως «ικρίωμα», «επαγωγός» ή «τεχνητή μήτρα». Το ικρίωμα παρέχει μία τριδιάστατη δομή ανάλογη της εξωκυττάριας μήτρας λειτουργώντας ως ο απαραίτητος «οδηγός» για την αποίκηση και πολλαπλασιασμό των κυττάρων στον εκάστοτε ιστό ή όργανο.<sup>[32]</sup>

Βασική λειτουργία των ικριωμάτων είναι να παρέχουν την κατάλληλη δομή για την οργάνωση του κυττάρου ούτως ώστε να σχηματίσουν τον καινούργιο ιστό. Αυτό επιτυγχάνεται με τη δημιουργία ενός περιβάλλοντος που επιτρέπει την τριδιάστατη κυτταρική ανάπτυξη και τον σχηματισμό του ιστού. Μείζονος σημασίας είναι η επιτυχής εμφύτευση των κυττάρων στο ικρίωμα για να εμφυτευθεί στη συνέχεια εντός του οργανισμού. Για την κατασκευή των ικριωμάτων χρησιμοποιούνται φυσικά ή συνθετικά βιοϋλικά, τα οποία θα πρέπει να εμφανίζουν ιδιότητες βιοσυμβατότητας, βιοαποικοδομησιμότητας και τις απαραίτητες μηχανικές ιδιότητες. Το στάδιο της εμφύτευσης των κυττάρων στο ικρίωμα είναι ιδιαίτερα κρίσιμο και ενισχύεται με χρήση βιοδραστικών μορίων.<sup>[33]</sup> Η παραδοσιακή μέθοδος εμφύτευσης περιλαμβάνει στατικές καλλιέργειες, στις οποίες ένα κυτταρικό αιώρημα εναποτίθεται επί του ικριώματος. Ακολουθεί επώαση για διάφορες χρονικές περιόδους με στόχο την πλήρη προσκόλληση των κυττάρων στο ικρίωμα.

Ένα βιολογικά λειτουργικό ικρίωμα διακρίνεται από τα εξής χαρακτηριστικά.<sup>[34]</sup>

- Κατάλληλη γεωμετρία, αντίστοιχη με την περιοχή του πάσχοντος ιστού.
- Τριδιάστατη και καθορισμένη πορώδης δομή για την επιτυχή εμφύτευση κυττάρων.
- Κατάλληλη φυσικοχημική δομή ώστε να υποστηρίξει την προσκόλληση των κυττάρων και συνεπώς τις στοιχειώδεις λειτουργίες τους όπως ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση.
- Διασυνδεδεμένο πορώδες δίκτυο, ώστε να επιταχύνεται η μεταφορά θρεπτικών συστατικών και μεταβολικών αποβλήτων από και προς τον αναπτυσσόμενο ιστό καθώς και του απαραίτητου οξυγόνου για την επιβίωση των κυττάρων
- Σύσταση από υλικά ικανά να προσομοιάσουν τα χαρακτηριστικά του περιβάλλοντος του πάσχοντος ιστού. Η επιλογή των υλικών γίνεται με γνώμονα τον εκάστοτε ιστό που χρήζει επιδιόρθωσης. Τα υλικά πρέπει να είναι ικανά να ενισχύσουν την αιμάτωση εντός και επί του ικριώματος. Επιπλέον απαιτούνται μη τοξικά και βιοαποικοδομήσιμα υλικά με ελεγχόμενο ρυθμό αποδόμησης, αντίστοιχου με τον ρυθμό ανάπτυξης κυττάρων και ιστού, ώστε να αποφευχθεί η παραμονή τμημάτων του ικριώματος εντός του καινούργιου ιστού.
- Μηχανικές ιδιότητες και δομή που θα παράσχουν την κατάλληλη υποστήριξη στα κύτταρα για την ανάπτυξη της φυσικής εξωκυττάριας μήτρας και συνεπώς του καινούργιου ιστού.

### 3.2. Οστικά Ικρίωματα

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το οστό αποτελεί ένα πολύπλοκο και απαιτητικό σύστημα, από πλευράς βιολογικών και μηχανικών χαρακτηριστικών. Συνέπεια αυτού, είναι οι κατασκευαστικές απαιτήσεις για ένα οστικό ικρίωμα να ποικίλουν ανάλογα το είδος τους οστού και την εκάστοτε εφαρμογή. Ωστόσο, τα χαρακτηριστικά ενός οστικού ικριώματος συνοψίζονται ακολούθως:<sup>[35-37]</sup>

- I. Βιοσυμβατότητα: Πρόκειται για βασική απαίτηση ώστε να γίνει αποτελεσματική χρήση του ικρίωματος. Η βιοσυμβατότητα περιγράφεται ως η ικανότητα του ικρίωματος να υποστηρίξει τις διάφορες κυτταρικές λειτουργίες, χωρίς να προκαλεί τοξικές αντιδράσεις στον περιβάλλοντα φυσικό ιστό. Το ιδανικό οστικό ικρίωμα πρέπει να είναι οστεοαγώγιμο, επιτρέποντας στα κύτταρα του φυσικού ιστού να προσκολληθούν επί αυτού και να πολλαπλασιαστούν, σχηματίζοντας εξωκυττάρια μήτρα στην επιφάνεια και τους πόρους. Επιπλέον, το ικρίωμα οφείλει να επάγει τη δημιουργία καινούργιου οστού (οστεοεπαγωγικό), προσελκύοντας οστεοβλάστες, δηλαδή τα κύτταρα που εκκινούν τη διαδικασία σύνθεσης οστού. Ένα ακόμη χαρακτηριστικό ενός βιοσυμβατού ικρίωματος είναι η άμεση αιμάτωσή του μέσω σχηματισμού αιμοφόρων αγγείων στην επιφάνεια και το εσωτερικό του. Μέσω των αιμοφόρων αγγείων πραγματοποιείται η μεταφορά θρεπτικών ουσιών, οξυγόνου και μεταβολικών αποβλήτων γεγονός που συνεισφέρει στην εύρυθμη λειτουργία του ικρίωματος και τη διαδικασία ανάπτυξης.
- II. Μηχανικές ιδιότητες: Οι μηχανικές ιδιότητες κάθε οστικού ικρίωματος θα πρέπει να συμβαδίζουν με τις αντίστοιχες του υπόλοιπου φυσικού ιστού εντός του οποίου εμφυτεύεται. Οι μηχανικές ιδιότητες των δύο βασικών τμημάτων των οστών, του φλοιώδους και του σπογγώδους, διαφέρουν αισθητά μεταξύ τους. Όσον αφορά στο φλοιώδες, το μέτρο ελαστικότητας (Young's Modulus) κυμαίνεται μεταξύ 15 και 20 GPa ενώ του σπογγώδους μεταξύ 0.1 και 2 GPa. Η αντοχή στη θλίψη του φλοιώδους οστού κυμαίνεται μεταξύ 100 και 200 MPa ενώ του σπογγώδους μεταξύ 2 και 20 MPa. Όπως γίνεται αντιληπτό, η μεγάλη διακύμανση των μηχανικών ιδιοτήτων εντός του οστού, καθιστά ιδιαίτερα δύσκολο τον σχεδιασμό και την κατασκευή ενός ιδανικού οστικού ικρίωματος.
- III. Πορώδες και μέγεθος πόρων: Εξίσου σημαντικό χαρακτηριστικό είναι το πορώδες του ικρίωματος. Πρόκειται για το ποσοστό των κενών χώρων που υπάρχουν στον όγκο του εμφυτεύματος. Όσον αφορά στο μέγεθος των εν λόγω πόρων, τα οστικά ικρίωματα πρέπει να παρουσιάζουν εσωτερικό δίκτυο διασυνδεδεμένων πόρων (κλειστό πορώδες) διαμέτρου τουλάχιστον 100μm. Χάρη στο εσωτερικό δίκτυο καθίσταται δυνατή η μεταφορά θρεπτικών ουσιών και οξυγόνου σε όλο τον όγκο του ικρίωματος, άρα και στα κύτταρα που βρίσκονται στο εσωτερικό αυτού. Εντούτοις, φαίνεται ότι πόροι διαμέτρου 200 – 350 μm επαρκούν για την ανάπτυξη οστού. Οι πόροι που βρίσκονται στην επιφάνεια του εμφυτεύματος (ανοιχτό πορώδες) διαδραματίζουν εξίσου σημαντικό ρόλο, καθώς από αυτή ξεκινά η αποίκηση του από τα κύτταρα. Η πορώδης επιφάνεια συνεισφέρει επίσης στην αποτελεσματικότερη συναρμογή του ικρίωματος με τον περιβάλλοντα φυσικό ιστό. Ωστόσο, θα πρέπει να τονιστεί ότι το πορώδες μειώνει τη μηχανική αντοχή του ικρίωματος, ενώ δυσκολεύει τη διαδικασία παρασκευής του ικρίωματος δυσχεραίνοντας την επαναληψιμότητα της. Επιπλέον, ικρίωματα με μεγάλα ποσοστά πορώδους ειδικά στην επιφάνεια, αποδομούνται ταχύτερα από τον οργανισμό, γεγονός που πρέπει να ληφθεί υπόψη κατά τον σχεδιασμό τους.
- IV. Βιοαπορροφησιμότητα: Ένα ιδανικό οστικό ικρίωμα, πέραν των παρόμοιων μηχανικών ιδιοτήτων με την περιοχή εμφύτευσης, θα πρέπει να αποδομείται σταδιακά και ελεγχόμενα εντός του οργανισμού, δημιουργώντας παράλληλα χώρο για την ανάπτυξη του καινούργιου οστού. Τα προϊόντα αποδόμησης δε θα πρέπει να προκαλούν τοξικές επιδράσεις στον οργανισμό. Το χρονικό διάστημα πλήρους αποικοδόμησης του ικρίωματος εξαρτάται από το

εκάστοτε σημείο εφαρμογής του, όπως για παράδειγμα για εφαρμογές ικριωμάτων στην περιοχή του κρανίου, της γνάθου και του υπόλοιπου προσώπου, ο ιδανικός χρόνος αποικοδόμησης κυμαίνεται μεταξύ 3 και 6 μηνών.

#### 4. Τριδιάστατη Εκτύπωση

Η τριδιάστατη εκτύπωση (ή προσθετική κατασκευή (additive manufacturing – AM)) πρόκειται για ένα ευρύ φάσμα τεχνικών που επιτρέπουν την κατασκευή τριδιάστατων (3D) αντικειμένων από διαφορετικά υλικά, με χρήση ενός τριδιάστατου μοντέλου ή άλλων ηλεκτρονικών δεδομένων μέσω προσθετικών διαδικασιών. Μία από τις πρώτες ευρεσιτεχνίες ανήκει στον Chuck Hull που ίδρυσε το 1986 την εταιρία 3D Systems Corp. Ο Hull εφηύρε την τεχνική που σήμερα είναι γνωστή με τον όρο «στερεολιθογραφία» (stereolithography) εφαρμόζοντας υπεριώδη ακτινοβολία από πηγές λέιζερ για τον φωτοπολυμερισμό ρητινών. Ο Hull ανέπτυξε επίσης τη Βασική Γλώσσα Ψηφιοθέτησης (Standard Tessellation Language), έναν τύπο ψηφιακού αρχείου που εφαρμόζεται ευρέως στα λογισμικά που χρησιμοποιούνται στην τριδιάστατη εκτύπωση. Επιπλέον μελέτησε στρατηγικές «τεμαχισμού» (slicing) ενός τριδιάστατου αντικειμένου σε επάλληλα στρώματα. Κατά τη δεκαετία του '80 αναπτύχθηκαν τεχνικές προσθετικής κατασκευής με πρώτη ύλη μέταλλα όπως η επιλεκτική τήξη με δέσμη λέιζερ (Selective Laser Sintering - SLS) και η άμεση τήξη μετάλλου με δέσμη λέιζερ (Direct Metal Laser Sintering - DMLS).<sup>[38,39]</sup> Το 1990 η τεχνολογία εξώθησης πλαστικού, περισσότερο γνωστή τότε ως «3D printing» εντάχθηκε στον βιομηχανικό κλάδο από την εταιρία Stratasys με την ονομασία «τεχνολογία προτυποποίησης μέσω εναπόθεσης τήγματος» (Fused Deposition Modeling – FDM). Μερικά χρόνια αργότερα, η εταιρία Z – Corporation διέθεσε στο εμπόριο μια τεχνική προσθετικής κατασκευής ανεπτυγμένη στο MIT (Massachusetts Institute of Technology), που αφορούσε την εναπόθεση συνδεδεμένων υγρών οργανικών ουσιών σε σκόνη. Τα πεδία εφαρμογής της τριδιάστατης εκτύπωσης άρχισαν να πληθαίνουν φτάνοντας και στον τομέα της Ιστικής Μηχανικής.<sup>[40]</sup>

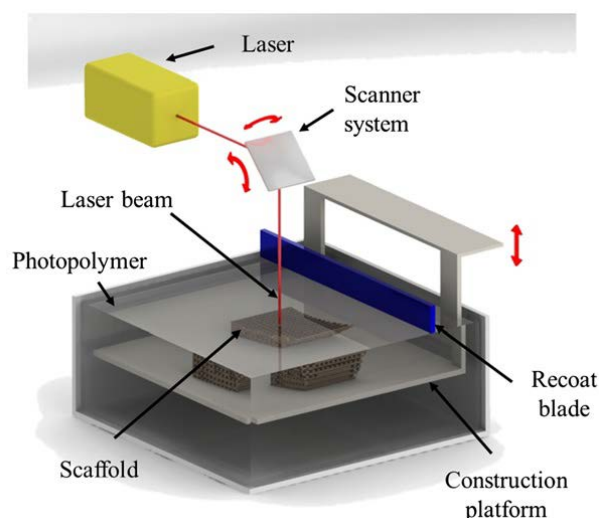
Η προσθετική κατασκευή ορίζεται ως «η διαδικασία της συνένωσης υλικών για την κατασκευή αντικειμένων από δεδομένα τριδιάστατων μοντέλων, συνήθως με επαλληλία στρώσεων» (ASTM 2012)<sup>[41]</sup> και έχει εφαρμοστεί εκτενώς στην παρασκευή ικριωμάτων για εφαρμογές της Ιστικής Μηχανικής μέσω διαφόρων τεχνικών. Οι τελευταίες επιτρέπουν την κατασκευή τριδιάστατων δομών με προκαθορισμένο μέγεθος και γεωμετρία και πορώδη αρχιτεκτονική που χαρακτηρίζεται από ένα πλήρως διασυνδεδεμένο δίκτυο πόρων με τροποποιήσιμο μέγεθος, σχήμα και κατανομή. Τα δεδομένα του τριδιάστατου μοντέλου για την κατασκευή του ικρίωματος μπορούν να εξαχθούν από τεχνολογίες ιατρικής απεικόνισης που χρησιμοποιούνται για διαγνωστικούς σκοπούς. Βασικότερες πηγές δεδομένων είναι η αξονική ή υπολογιστική τομογραφία (Computer Tomography – CT) και η μαγνητική τομογραφία (Magnetic Resonance Imaging – MRI), ενώ η επεξεργασία τους μπορεί να διευκολυνθεί με προγράμματα λογισμικού σχεδίασης (Computer Aided Design – CAD) ή κατασκευής (Computer Aided Manufacturing – CAM) του εκάστοτε μοντέλου. Εναλλακτικά, ένα απλοποιημένο τριδιάστατο μοντέλο μπορεί να κατασκευαστεί απευθείας μέσω του λογισμικού σχεδίασης ή μαθηματικών εξισώσεων. Τα περισσότερα λογισμικά σχεδίασης μετατρέπουν το μοντέλο σε αρχείο Βασικής Γλώσσας Ψηφιοθέτησης (Standard Tessellation Language -STL) που περιέχει όλη την πληροφορία για την επιφανειακή γεωμετρία του αντικειμένου. Το τελευταίο στη συνέχεια «κόβεται» σε στρώσεις δημιουργώντας το αντίστοιχο ψηφιακό αρχείο (Slice File

– SLI) το οποίο και εν τέλει χρησιμοποιείται από τον κινητήρα που ρυθμίζει τις θέσεις των κινούμενων εξαρτημάτων του εκτυπωτή.<sup>[42,43]</sup>

Ανάλογα την αρχή λειτουργίας, παρουσιάζεται μία πληθώρα τεχνικών προσθετικής κατασκευής που χρησιμοποιούνται σε εφαρμογές στην Ιστική Μηχανική, και συνοψίζονται σε τέσσερις κύριες κατηγορίες: (α) στερεολιθογραφία, (β) επιλεκτική συσσωμάτωση με λέιζερ, (γ) κατασκευή με εναπόθεση συνδετικού υλικού και (δ) κατασκευή μέσω εναπόθεσης τήγματος. Ωστόσο επιπλέον τεχνικές ΠΚ ήδη εφαρμοσμένες στον βιομηχανικό κλάδο ή βασισμένες σε καινοτόμες αρχές λειτουργίας εντάσσονται στον τομέα της Ιστικής Μηχανικής με στόχο την επίτευξη των εκάστοτε απαιτήσεων για την κατασκευή ικριωμάτων. Στο σημείο αυτό πρέπει να τονιστεί ότι το φάσμα τεχνικών οδηγεί συχνά σε αμφισβητήσιμη ορολογία, καθώς ενδέχεται να συνδυάζουν αρχές λειτουργίας από παραπάνω από μία κατηγορίες. Ακολούθως παρουσιάζονται συνοπτικά ορισμένες από τις βασικές τεχνικές ΠΚ που μεταξύ άλλων δρουν στην υπηρεσία της Ιστικής Μηχανικής.<sup>[44]</sup>

#### 4.1. Στερεολιθογραφία

Η στερεολιθογραφία (Stereolithography – SLA) βασίζει τη λειτουργία της στη χρήση υπεριώδους (UV) ακτινοβολίας για τον ελεγχόμενο πολυμερισμό ρευστών ρητινών. Οι πρώτες μελέτες παραγωγής 3D αντικειμένων με τη συγκεκριμένη τεχνική πραγματοποιήθηκαν από τον Kodama (1981) που ανέπτυξε δύο διαφορετικές τεχνικές. Η πρώτη περιλάμβανε τη χρήση μασκών για τον καθορισμό της δομής κάθε στρώσης, ενώ η δεύτερη τη χρήση οπτική ίνας για τον πολυμερισμό της ρευστής ρητίνης. Στην τελευταία περίπτωση κατέστη δυνατή η κατασκευή προκαθορισμένου μοτίβου με μετακίνηση της ίνας κατά τη διεύθυνση των αξόνων X και Y. Το 1986 ο Hull κατοχύρωσε την ευρεσιτεχνία με την ονομασία που είναι γνωστή σήμερα και τον ορισμό της «διαδικασίας κατασκευής 3D στερεών αντικειμένων με επάλληλες στρώσεις με χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας».<sup>[45]</sup>



**Σχήμα 7:** Αναπαράσταση διάταξης Στερεολιθογραφίας.<sup>[45]</sup>

Κατόπιν του πολυμερισμού μίας στρώσης, η πλατφόρμα εκτύπωσης χαμηλώνει σε ένα δεδομένο ύψος και εναποτίθεται η επόμενη στρώση ρητίνης επί της ήδη τοποθετημένης. Για την αποφυγή της αποκόλλησης των στρώσεων, ο πολυμερισμός που πραγματοποιείται στην καινούργια στρώση επικαλύπτει και ένα ποσοστό της προηγούμενης. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται έως ότου κατασκευαστεί πλήρως το 3D αντικείμενο. Η προετοιμασία της φωτοπολυμεριζόμενης ρητίνης απαιτεί γενικά τοξικούς καταλύτες και οι εμπορικά διαθέσιμες ρητίνες κατάλληλες για στερεολιθογραφία υπολείπονται βιοσυμβατότητας και βιοαποικοδομησιμότητας. Για αυτό τον λόγο οι πρώτες προσπάθειες εκτύπωσης εμφυτευμάτων

πραγματοποιήθηκαν με έμμεσους τρόπους. Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα του Levy και των συνεργατών του. Συγκεκριμένα, συνέθεσαν ένα μελάνι εκτύπωσης από εναιώρημα υδροξυαπατίτη και

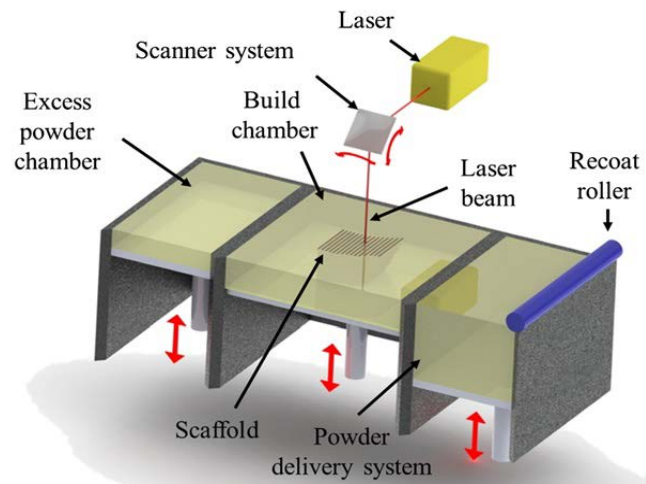
φωτοευαίσθητη ρητίνη. Ύστερα από τη διαδικασία σκλήρυνσης, η ακρυλική ρητίνη αφαιρέθηκε με εφαρμογή θέρμανσης οδηγώντας στη δημιουργία ενός εμφυτεύματος από αμιγώς καθαρό υδροξυαπατίτη.<sup>[46]</sup> Παρόμοιες τεχνικές έμμεσης κατασκευής εμφυτευμάτων έχουν ακολουθηθεί από αρκετούς ερευνητές<sup>[47]</sup> ωστόσο, ο αριθμός των φωτοευαίσθητων βιοϋλικών που να πληρούν τις προϋποθέσεις της Ιστικής Μηχανικής παραμένει περιορισμένος.

Βασικά μειονεκτήματα της στερεολιθογραφίας είναι η συρρίκνωση της δομής του ικρίωματος κατά τη διάρκεια της κατασκευαστικής διαδικασίας, η ανάγκη για βοηθητική υποστήριξη κατά την κατασκευή περίπλοκων γεωμετρικών δομών, η δυσκολία εναπόθεσης βιοδραστικών παραγόντων στο υπό κατασκευή ικρίωμα, και η χρήση διαφορετικών υλικών στην ίδια διεργασία. Η χρήση της εν λόγω διάταξης για κατασκευή μοντέλων ενέχει υψηλό λειτουργικό κόστος, γεγονός που αποτελεί το βασικό εμπόδιο για να εφαρμοσθεί σε βιομηχανική κλίμακα. Τέλος, πιθανά κατάλοιπα φωτοεκκινητή μπορούν να καταστούν καταδικαστικά για τη βιοσυμβατότητα του ικρίωματος.<sup>[45-47]</sup>

## 4.2. Επιλεκτική Συσσωμάτωση με Λείζερ

Η τεχνική της επιλεκτικής συσσωμάτωσης με λέιζερ (Selective Laser Sintering – SLS) αναπτύχθηκε από τον Deckard (1989). Η μέθοδος χρησιμοποιεί κυρίως πολυμερικά ή κεραμικά υλικά σε μορφή σκόνης που τήκονται από μία δέσμη λέιζερ υψηλής έντασης. Η σκόνη εναποτίθεται ομοιόμορφα επί της πλατφόρμας εκτύπωσης και η δέσμη λέιζερ σαρώνει επιλεκτικά την επιφάνεια, τήκοντας και συνδέοντας τους κόκκους του υλικού. Με τον τρόπο αυτό συντίθεται κάθε στρώση του 3D αντικειμένου.<sup>[45,48]</sup> Μεταξύ των συνθέσεων κάθε στρώσης, η πλατφόρμα εκτύπωσης μετακινείται προς το κάτω, ένας κυλιόμενος κύλινδρος απλώνει την καινούργια στρώση σκόνης και η διαδικασία συσσωμάτωσης επαναλαμβάνεται. Η τελευταία, πραγματοποιείται με την κατάλληλη ένταση δέσμης ανάλογα τη σύσταση της σκόνης, ενώ πέραν της συνένωσης των κόκκων, περιλαμβάνει και τη σύνδεση των διαδοχικών στρώσεων. Οι περιοχές που δεν έχουν τηχθεί από τη δέσμη, δρουν υποστηρικτικά στην κατασκευή του τελικού 3D αντικειμένου.

Η παρούσα τεχνική βρίσκει εφαρμογή στον τομέα της Ιστικής Μηχανικής, κατασκευάζοντας ωστόσο ικρίωματα με χαμηλές μηχανικές ιδιότητες, περιορίζοντας τη χρήση τους σε περιοχές που δε φέρουν φορτία.<sup>[48]</sup> Εντούτοις, έχουν σημειωθεί προσπάθειες σύνθεσης ικριωμάτων οστικού ιστού με κύριο συστατικό την πολυκαπρολακτόνη (polycaprolactone – PCL) με μηχανικές ιδιότητες που πλησιάζουν τις αντίστοιχες του δοκιδωτού οστού.<sup>[49]</sup> Η κατασκευή υβριδικών ικριωμάτων που συνδυάζουν συνθετικά και φυσικά πολυμερή δεν αποτελεί βασικό αντικείμενο της συγκεκριμένης τεχνικής, λόγω της γρήγορης αποδόμησης των φυσικών συστατικών από τη δέσμη λέιζερ. Εξαίρεση αποτελεί η περίπτωση του Ciardelli και των συνεργατών του που κατασκεύασαν



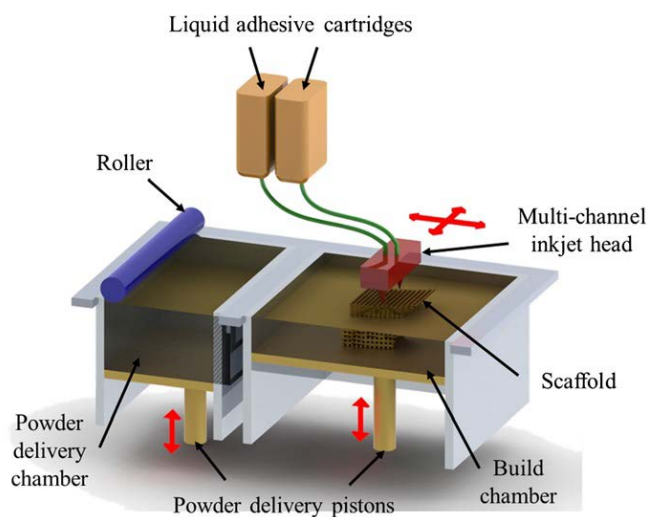
Σχήμα 8: Αναπαράσταση διάταξης Επιλεκτικής Συσσωμάτωσης με Λείζερ.<sup>[45]</sup>

ικριώματα αποτελούμενα από πολυκαπρολακτόνη και διαφορετικούς πολυσακχαρίτες που υπέστησαν μόνο επιφανειακή αποδόμηση ενώ ο κύριος όγκος τους παρέμεινε ανεπηρέαστος.<sup>[50]</sup>

Η τεχνική της επιλεκτικής συσσωμάτωσης με λέιζερ παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα με το κυριότερο να είναι η εγγενής υποστήριξη που προσφέρει η αρχή λειτουργίας της στην κατασκευή των διαδοχικών στρώσεων των αντικειμένων. Ωστόσο, τα βιοϋλικά που δύναται να χρησιμοποιηθούν με τη μορφή λεπτόκοκκης σκόνης είναι υψηλού κόστους και σχετικά περιορισμένα. Επιπλέον, οι περισσότερες τεχνικές προετοιμασίας της πολυμερικής ή κεραμικής σκόνης περιορίζονται προς το παρόν σε εργαστηριακή κλίμακα για καθαρά ερευνητικούς σκοπούς. Επίσης, η δυνατότητα απομάκρυνσης του υλικού που είναι εγκλωβισμένου εντός πολύπλοκων σχημάτων είναι περιορισμένη, όπως και ο έλεγχος της επιφανειακής τοπογραφίας που εξαρτάται κυρίως από το μέγεθος και σχήμα του εκάστοτε είδους κόκκων.<sup>[51]</sup>

### 4.3. Κατασκευή με Εναπόθεση Συνδετικού Υλικού

Η συγκεκριμένη τεχνική αναπτύχθηκε στο Ινστιτούτο Τεχνολογίας της Μασαχουσέτης (Massachusetts Institute of Technology – MIT) στις αρχές της δεκαετίας του 1990 και βασίζεται στην ελεγχόμενη εναπόθεση συνδετικού υλικού σε στρώση σκόνης με χρήση κεφαλής ψεκασμού (inkjet head). Κατόπιν εναπόθεσης του προαναφερθέντος υλικού, μία καινούργια στρώση σκόνης τοποθετείται επί της ήδη υπάρχουσας και η διαδικασία επαναλαμβάνεται. Για να συμβεί αυτό, η πλατφόρμα εκτύπωσης χαμηλώνει κατά απόσταση ίση με το πάχος της στρώσης που εναποτίθεται. Τα τμήματα σκόνης που δεν έχουν συνδεθεί σε κάθε στρώση, λειτουργούν ως υποστήριξη για το υπό κατασκευή 3D αντικείμενο. Η διαδικασία προσθετικής κατασκευής επαναλαμβάνεται μέχρι την ολοκληρωτική κατασκευή του αντικειμένου.<sup>[45]</sup> Ο υψηλός ρυθμός κατασκευής και η δυνατότητα παραγωγής προϊόντων μεγάλου μεγέθους, καθιστούν τη εν λόγω τεχνική ιδιαίτερα ελκυστική για βιομηχανικές εφαρμογές.



Σχήμα 9: Αναπαράσταση διάταξης Κατασκευής με Εναπόθεση Συνδετικού Υλικού.<sup>[45]</sup>

Από πλευράς εφαρμογών στην Ιστική Μηχανική, έχουν σημειωθεί προσπάθειες κατασκευής ικριωμάτων αποτελούμενα από φυσικά πολυμερή. Ο Lam και οι συνεργάτες του<sup>[52]</sup> επιχείρησαν να παρασκευάσουν ικριώματα αποτελούμενα από ζελατίνη και δεξτράνη. Ωστόσο τα τελευταία παρουσίασαν περιορισμένη δομική σταθερότητα και χαμηλές μηχανικές ιδιότητες. Αποτελεσματική εφαρμογή φαίνεται πως σημειώνουν τα βιοενεργά κεραμικά υλικά όπως ο υδροξυαπατίτης, οι βιοενεργοί ύαλοι και τα άλατα του φωσφορικού ασβεστίου. Από τα πρώτα προϊόντα τριδιάστατης εκτύπωσης που βρήκαν άμεση ιατρική εφαρμογή είναι οστικά εμφυτεύματα κατασκευασμένα από β –

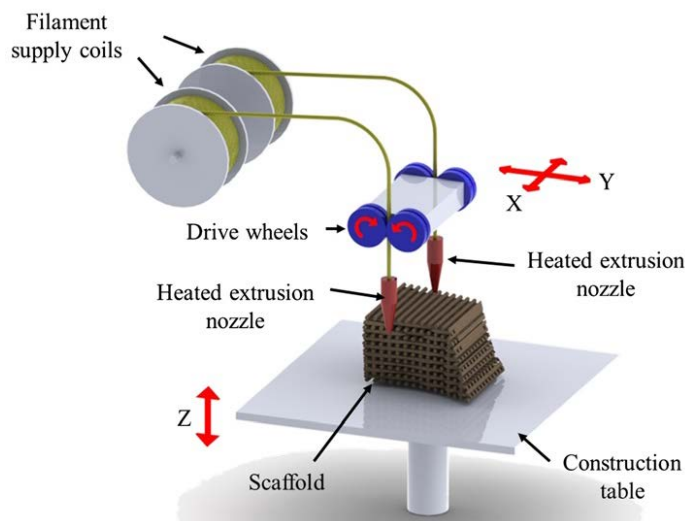
τριφωσφορικό ασβέστιο (β – TCP) μέσω της τεχνικής Theriform που αποτελεί τροποποίηση της

διαδικασίας της τριδιάστατης εκτύπωσης. Εξάλλου, έχει μελετηθεί ο συνδυασμός τριφωσφορικού (TCP) και τετραφωσφορικού ασβεστίου (TTCP) για κατασκευή ικριωμάτων χορήγησης φαρμάκων.<sup>[45]</sup>

Ωστόσο, για τη βελτίωση των μηχανικών ιδιοτήτων των ικριωμάτων απαιτείται περαιτέρω κατεργασία του προϊόντος της τριδιάστατης εκτύπωσης. Βασικό μειονέκτημα της εν λόγω τεχνικής είναι η συρρίκνωση των υπό κατασκευή 3D αντικειμένων κατά τη διαδικασία ψεκασμού με το συνδετικό υλικό. Συνέπεια της πιθανής συρρίκνωσης είναι η πρόκληση γεωμετρικών αλλοιώσεων ή ακόμα και η ολική αστοχία του αντικειμένου.<sup>[53]</sup> Επίσης, όπως στην περίπτωση της επιλεκτικής συσσωμάτωσης με λέιζερ, έτσι και εδώ, το περισσευούμενο, μη συνδεδεμένο υλικό παραμένει εγκλωβισμένο εντός περίπλοκων γεωμετριών, ενώ η επιφανειακή τοπογραφία εξαρτάται από το είδος της σκόνης που χρησιμοποιείται.

#### 4.4. Κατασκευή με Εναπόθεση Υλικού

Η κατασκευή με εναπόθεση υλικού (Fused Deposition Modelling – FDM), πρόκειται για τεχνική που αναπτύχθηκε εμπορικά από την εταιρία Stratasys (1990) με στόχο την κατασκευή προτύπων. Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου βασίζεται στην εξώθηση πολυμερικής φύσης υλικού υπό μορφή νήματος μέσω θερμαινόμενης κεφαλής. Συγκεκριμένα, εξωθείται θερμοπλαστικό πολυμερές σε ρευστή κατάσταση αφού πρώτα έχει θερμανθεί σε θερμοκρασία λίγο χαμηλότερη από την αντίστοιχη τήξης του. Το νήμα τροφοδοτείται στην κεφαλή με τη βοήθεια ενός ή περισσότερων τροχών και το τήγμα του εναποτίθεται συνεχώς επί της πλατφόρμας εκτύπωσης. Η κίνηση της κεφαλής και της πλατφόρμας εκτύπωσης, ρυθμίζονται από κατάλληλο λογισμικό ηλεκτρονικού υπολογιστή, το οποίο επιτρέπει την εναπόθεση του τήγματος με συγκεκριμένο μοτίβο. Μετά την κατασκευή κάθε στρώσης, η πλατφόρμα κινείται προς τα κάτω, ούτως ώστε να συνεχιστεί η διαδικασία με την κατασκευή την εναπόθεση της επόμενης στρώσης υλικού, έως την ολοκληρωτική κατασκευή του 3D αντικειμένου.<sup>[45,53]</sup>



Σχήμα 10: Αναπαράσταση διάταξης Κατασκευής με Εναπόθεση Υλικού.<sup>[45]</sup>

Βασικό πλεονέκτημα της εν λόγω τεχνικής που την κάνει να ξεχωρίζει από της προαναφερθείσες, είναι η δυνατότητα ταυτόχρονης εναπόθεσης παραπάνω του ενός υλικών με χρήση διαφορετικών κεφαλών. Εξαιτίας αυτού, δύναται είτε η παρασκευή αντικειμένων με πολύ-λειτουργικά μέλη, είτε η εναπόθεση υποστηρικτικού υλικού που θα εξασφαλίζει τη σταθερότητα του υπό κατασκευή μοντέλου. Η σύνθεση ικριωμάτων με εναπόθεση υλικού ερευνήθηκε αρχικά από τον Huttmacher<sup>[53]</sup> που κατέγραψε την παρασκευή 3D αντικειμένων από πολυκαπρολακτόνη, τα οποία έδειξαν ότι μπορούν να υποστηρίξουν *in vitro*

πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση πρωτογενών ανθρώπινων ινοβλαστών και περισοτικών κυττάρων. Περιπτώσεις κατασκευής σύνθετων ικριωμάτων οστικού ιστού έχουν επίσης καταγραφεί όπως ο



συνδυασμός πολυκαπρολακτόνης και αλάτων φωσφορικού ασβεστίου που παρουσιάζει ενισχυμένες βιοχημικές και μηχανικές ιδιότητες.<sup>[54]</sup>

Η κατασκευή με εναπόθεση υλικού έχει παρουσιάσει αρκετά υποσχόμενα αποτελέσματα σε *in vivo* επίπεδο δοκιμών. Εντούτοις, η εφαρμογή της περιορίζεται σε μικρό αριθμό θερμοπλαστικών πολυμερών. Επίσης, η χρήση των θερμοπλαστικών υλικών περιορίζεται και από πλευράς ιξώδους. Συγκεκριμένα, το ιξώδες του τήγματος πρέπει να είναι επαρκώς χαμηλό ώστε να συνδυάζει εύκολη εξώθηση από την κεφαλή, αλλά και επαρκώς υψηλό ώστε να εξασφαλίζει τη δομική σταθερότητα του 3D αντικειμένου. Για την κατεργασία μεγαλύτερου εύρους πολυμερών, έχουν αναπτυχθεί παραλλαγές της παρούσα τεχνικής, όπου η πρώτη ύλη έχει τη μορφή σκόνης ή σφαιριδίων (pellet).

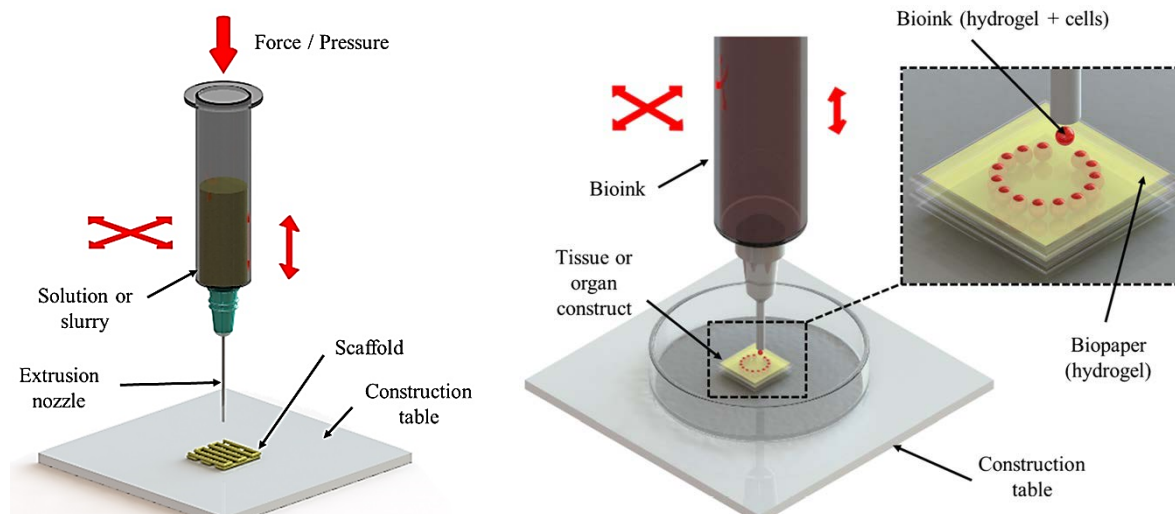
#### **4.5. Τεχνικές Εξώθησης Διαλυμάτων/Αιωρημάτων**

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί αρκετές τεχνικές ΠΚ για πολυμερικά διαλύματα και αιωρήματα κεραμικών υλικών. Οι εν λόγω τεχνικές δεν απαιτούν τη χρήση υψηλών θερμοκρασιών, αποφεύγοντας έτσι την πιθανή αποικοδόμηση φυσικών πολυμερών και βιοδραστικών παραγόντων που μπορεί να περιλαμβάνονται στη σύσταση του 3D αντικειμένου. Μπορεί ωστόσο να περιλαμβάνουν κάποιο οργανικό διαλύτη, ο οποίος αν δεν αφαιρεθεί ολοκληρωτικά μπορεί να θέσει σε κίνδυνο τη βιοσυμβατότητα των ικριωμάτων και να επηρεάσει τη δράση των βιοδραστικών παραγόντων στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται.

Η Εξώθηση Υποβοηθούμενη από Πίεση (Pressure Assisted Microsyringe – PAM) πρόκειται για τεχνική ΠΚ που βασίζεται στην εξώθηση υλικού με εφαρμογή πίεσης. Το προς εκτύπωση υλικό τοποθετείται εντός σύριγγας μικρής χωρητικότητας και εξωθείται υπό πίεση μέσω βελόνας μικρού διαμετρήματος στην πλατφόρμα εκτύπωσης. Η τεχνική καθιστά δυνατή την ελεγχόμενη εναπόθεση πολυμερικού διαλύματος, το οποίο κατόπιν εξάτμισης του διαλύτη σχηματίζει μια προσχεδιασμένη μικρο - αρχιτεκτονική. Μια παραλλαγή της προαναφερθείσας μεθόδου είναι η Εξώθηση Υποβοηθούμενη από Έμβολο (Piston Assisted Microsyringe – PAM2). Η πρόσφατα αναπτυγμένη αυτή μέθοδος στοχεύει στην εφαρμογή χαμηλών διατμητικών τάσεων για εξώθηση υδρογελών με υψηλό ιξώδες. Επιπρόσθετα, έχει εξεταστεί επιτυχώς η δυνατότητα προσθήκης κυττάρων στην προς εκτύπωση υδρογέλη για κατασκευή ικριωμάτων.<sup>[45,51]</sup>

Στην κατηγορία εξώθησης διαλυμάτων και αιωρημάτων ανήκει και η Εναπόθεση Υλικού σε Χαμηλή Θερμοκρασία (Low Temperature Deposition Manufacturing – LDM). Για την κατασκευή του 3D αντικειμένου, χρησιμοποιείται θάλαμος ψύξης που διατηρεί το προς εκτύπωση αιώρημα σε σταθερά χαμηλή θερμοκρασία καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας ΠΚ. Όταν η διαδικασία ΠΚ ολοκληρωθεί, ο διαλύτης αφαιρείται συνήθως με λυοφιλίωση (freeze drying).<sup>[52]</sup> Επιπλέον, υπάρχει η δυνατότητα επικουρικής χρήσης ψυχόμενης πλατφόρμας εκτύπωσης. Ο Kim και οι συνεργάτες του κατάφεραν με τον συγκεκριμένο τρόπο να κατασκευάσουν ικριώματα αποτελούμενα από φυσικά πολυμερή. Συγκεκριμένα, παρήχθησαν ικριώματα κολλαγόνου με προκαθορισμένη πορώδη αρχιτεκτονική και μειωμένη συρρίκνωση, τα οποία και εφαρμόστηκαν στην επιδιόρθωση δερματικών τραυμάτων.<sup>[45,52]</sup>

Τέλος, παρόμοιας λειτουργίας είναι η μέθοδος της Άμεσης Εκτύπωσης Μελανιού (Direct Ink Writing) που χρησιμοποιείται για την κατασκευή ικριωμάτων κεραμικών υλικών (πχ υδροξυαπατίτης ή β – τετραφωσφορικό ασβέστιο) με καθορισμένα γεωμετρικά χαρακτηριστικά και πορώδες. Η πρώτη ύλη για την κατασκευή των εν λόγω ικριωμάτων είναι κολλοειδή υδατικά αιωρήματα με ελάχιστο περιεχόμενο οργανικού διαλύτη, τα οποία εξωθούνται από κεφαλή εκτύπωσης κατάλληλης διαμέτρου.



**Σχήμα 11:** Αναπαράσταση διατάξεων Εξώθησης Διαλυμάτων/Αιωρημάτων (αριστερά) και Τριδιάστατης Εκτύπωσης Ιστών/Οργάνων (δεξιά).<sup>[45]</sup>

#### 4.6. Τριδιάστατη Βιοεκτύπωση Ιστών/Οργάνων

Τα τελευταία χρόνια, έχει κάνει την εμφάνισή της μια καινούρια μέθοδος στην υπηρεσία της Ιστικής Μηχανικής που βασίζεται στις πρωτεύουσες αρχές της ΠΚ. Πρόκειται για την «βιοεκτύπωση» ιστών ή οργάνων που στοχεύει στη δημιουργία 3D κυτταρικών δομών. Η μέθοδος εκμεταλλεύεται την ικανότητα των κυττάρων και των ιστών να σχηματίζουν αυτοοργανωμένες δομές. Στη βιοεκτύπωση χρησιμοποιείται συνήθως κάποια μορφή υδρογέλης ικανή να φέρει στο εσωτερικό της κύτταρα και βιοδραστικούς παράγοντες, η οποία και καλείται «βιομελάνι» (bioink). Η εναπόθεση γίνεται επί μίας δεύτερης, διαφορετικής ή παρόμοιας σύστασης υδρογέλης, του «βιοχάρτου» (biopaper).<sup>[45]</sup>

Στόχος της συγκεκριμένης τεχνικής είναι η εναπόθεση του «βιομελανιού», αποτελούμενο από τα υλικά του ικριώματος, ζωντανά κύτταρα, θρεπτικά συστατικά, βιοδραστικούς παράγοντες ή ακόμα και φάρμακα, ανάλογα την εκάστοτε εφαρμογή. Η εναπόθεση συμβαίνει με πλήρως ελεγχόμενο τρόπο από πλευράς παραμέτρων όπως η χρονική διάρκεια εναπόθεσης, η θέση και η ποσότητα του «βιομελανιού» που εξωθείται, ούτως ώστε να δημιουργηθεί το κατάλληλο μικρο – περιβάλλον που θα ενισχύσει την ανάπτυξη του ζωντανού ιστού. Το αυξανόμενο ενδιαφέρον για την κατασκευή ιστών και οργάνων, έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη μεγάλου εύρους συσκευών βιοεκτύπωσης, εμπορικά διαθέσιμων για χρήση σε εργαστηριακή κλίμακα.<sup>[55]</sup>

Μία καινοτόμος στρατηγική για την ΠΚ ζωντανών ιστών ή οργάνων αποτελεί ο «βιοεκβολέας» (Bioextruder). Πρόκειται για ένα σύστημα που συνδυάζει δύο διαφορετικές τεχνικές ΠΚ, καθιστώντας δυνατή την ταυτόχρονη εξώθηση διαλυμάτων/αιωρημάτων και τήγματος πολυμερούς, ώστε να κατασκευάσει υβριδικά ικριώματα που περιέχουν κύτταρα και βιοδραστικούς παράγοντες. Η

συγκεκριμένη διάταξη έχει εφαρμοστεί για την κατασκευή ικριωμάτων πολυκαπρολακτόνης με διαφορετικά μεγέθη πόρων και μικρο – αρχιτεκτονική, δείχνοντας ότι το πορώδες του ικριώματος σχετίζεται με τους παράγοντες εκτύπωσης, όπως η ταχύτητα εξώθησης και εναπόθεσης του «βιομελανιού». Παρά το γεγονός ότι η χρήση αποκλειστικά «βιοεκτυπωτών» δεν επαρκεί για την ανάπτυξη τεχνητών οργάνων σε βιομηχανική κλίμακα, η αλματώδης ανάπτυξη των πρώτων σε συνδυασμό με την ερευνητική πρόοδο των τεχνικών της ιστικής μηχανικής, δημιουργούν τις προϋποθέσεις για την εμπορευματοποίηση της τεχνολογίας τριδιάστατης εκτύπωσης οργάνων.<sup>[56]</sup>

## 5. Υδρογέλες

Οι υδρογέλες αποτελούν το πιο διαδεδομένο υλικό για την κατασκευή ικριωμάτων μέσω της τριδιάστατης εκτύπωσης. Μπορούν να τροποποιηθούν με σχετικά απλές διαδικασίες ώστε να προσομοιάσουν τις φυσικοχημικές ιδιότητες της πλειοψηφίας των βιολογικών ιστών και να ανταποκριθούν σε εξωτερικά ερεθίσματα (θερμοκρασία, pH, ιόντα κ.ά.). Οι υδρογέλες αποτελούνται από πολυμερικά δίκτυα ικανά να παρουσιάσουν μεταβολή του όγκου τους έως και 40 φορές, καθώς διογκώνονται και συρρικνώνονται παρουσία ή απουσία νερού (ή βιολογικών υγρών) αντίστοιχα. Συνήθως η εν λόγω συμπεριφορά εξαρτάται από το είδος του πολυμερούς που συνθέτει την υδρογέλη. Όσο πιο υδρόφιλο είναι το πολυμερές τόσο μεγαλύτερη είναι η απορροφητικότητα – άρα και η διόγκωση - της υδρογέλης. Αντίστοιχα, όσο πιο εκτεταμένη και ισχυρή είναι μια πιθανή διασύνδεση (cross linking) (φυσική ή χημική) της υδρογέλης, τόσο μικρότερη η διόγκωση αυτής.<sup>[57,58]</sup>

Οι υδρογέλες μπορούν να ταξινομηθούν με βάση διάφορα κριτήρια (φυσικές – συνθετικές, αποικοδομήσιμες – μη αποικοδομήσιμες, άμορφες – μικροκρυσταλλικές κλπ.) Με βάση την προέλευσή τους, χωρίζονται σε δύο κύριες κατηγορίες: τις φυσικές και τις συνθετικές υδρογέλες. Αμφότερες διαθέτουν ξεχωριστά πλεονεκτήματα και χρήσεις. Οι φυσικές υδρογέλες προέρχονται από φυσικά βιοϋλικά και τα πιο συνηθισμένα παραδείγματα αυτών είναι οι πρωτεΐνες όπως το κολλαγόνο και η ζελατίνη. Πρόκειται για βιοσυμβατά και βιοαποικοδομήσιμα υλικά που εναρμονίζονται πλήρως με την περιοχή εμφύτευσής τους. Εξάλλου οι εν λόγω πρωτεΐνες όπως και πλήθος άλλων φυσικών βιοϋλικών, διαθέτουν περιοχές επί των οποίων δύναται να συνδεθούν διαφόρων ειδών κύτταρα. Βασικά ωστόσο μειονεκτήματα των φυσικών υδρογελών είναι η διακύμανση των ιδιοτήτων τους κατά τη διάρκεια κάθε σύνθεσης, όπως και το γεγονός ότι τα τελικά χαρακτηριστικά τους μπορεί να μην παραμένουν σταθερά.<sup>[59]</sup> Οι συγκεκριμένες υδρογέλες δεν παύουν να χρησιμοποιούνται σε πλήθος εφαρμογών της Ιστικής Μηχανικής στοχεύοντας στην αποκατάσταση κυρίως μαλακών ιστών. Οι συνθετικές υδρογέλες χρησιμοποιούνται αντίστοιχα σε βιοϊατρικές και φαρμακευτικές εφαρμογές λόγω της μεγάλης τους διαθεσιμότητας. Επιπλέον, μπορούν να τροποποιηθούν με χημικό τρόπο με βάση τις απαιτήσεις της κάθε χρήσης. Λόγω αυτού, δύναται να συντεθούν καταλλήλως ώστε να επιτευχθεί βιοσυμβατότητα και ικανοποιητικός ρυθμός βιοαποικοδόμησης, όχι ωστόσο στον ίδιο βαθμό με τις αντίστοιχες φυσικές υδρογέλες. Επιπλέον δε διαθέτουν τους κατάλληλους συνδέτες κυτταρικής πρόσδεσης. Βασικά πλεονεκτήματα των συνθετικών υδρογελών είναι οι συγκριτικά καλύτερες μηχανικές ιδιότητες και η δυνατότητα τροποποίησης του ρυθμού αποικοδόμησής τους.<sup>[60]</sup>

Κατά γενική ωστόσο ομολογία, οι υδρογέλες που αποτελούνται εξ' ολοκλήρου από ένα είδος πολυμερούς, υστερούν σε μηχανική αντοχή ή/και βιοενεργότητα έναντι του εκάστοτε ιστού στόχου

(τένοντας, μυς, χόνδροι κ.ά.). Βασική πρόκληση λοιπόν αποτελεί η κατασκευή υδρογελών με ενισχυμένες τις παραπάνω ιδιότητες. Η κατασκευή σύνθετων υδρογελών αποτελούμενων από διαφορετικά υλικά, αποτελεί τον πλέον αποτελεσματικό τρόπο για την ενίσχυση των ιδιοτήτων τους. Ειδικότερα, οι υδρογέλες ενισχύονται με διάφορα εγκλείσματα, υπό μορφή σωματιδίων ή ινών τα οποία σταθεροποιούνται και ακινητοποιούνται στο εσωτερικό τους, μέσω των φυσικών ή χημικών αλληλεπιδράσεων με τη μήτρα του πολυμερούς.<sup>[61]</sup> Στην περίπτωση που δύο πολυμερή συνδυάζονται προς σχηματισμό μιας υδρογέλης, τα δύο περιπλεκόμενα πολυμερικά δίκτυα συνεισφέρουν στην ενίσχυση της μηχανικής αντοχής επηρεάζοντας παράλληλα ιδιότητες όπως η ρεολογία και ο ρυθμός αποικοδόμησης. Παρόμοια είναι και η αλληλεπίδραση των ανόργανων εγκλεισμάτων με την πολυμερική μήτρα. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, η ενίσχυση των ιδιοτήτων της υδρογέλης εξαρτάται από τη συγκέντρωση και το ποσοστό των εγκλεισμάτων που αλληλεπιδρά με την οργανική φάση.<sup>[62]</sup>

### **5.1. Εκτυπωτική Συμπεριφορά (Printability) Υδρογελών**

Απαραίτητη προϋπόθεση για την αποτελεσματική κατασκευή ενός τριδιάστατου ικρίωματος με τη μέθοδο της προσθετικής κατασκευής, είναι η ανάπτυξη μιας λεπτομερούς στρατηγικής. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, κύριο πλεονέκτημα της εν λόγω τεχνικής έναντι των συμβατικών, είναι η κατασκευή τριδιάστατων δομών με προσχεδιασμένη μικρο – αρχιτεκτονική. Για τη διατήρηση των γεωμετρικών προδιαγραφών, μία σειρά από παράγοντες πρέπει να ληφθεί υπόψη όσον αφορά στα υλικά που συνθέτουν την υδρογέλη εκτύπωσης και τις συνθήκες που η ίδια πραγματοποιείται. Η σχέση που συνδέει τα προαναφερθέντα με την υψηλής ακρίβειας εκτύπωση, συνοψίζεται ως «εκτυπωτική συμπεριφορά».<sup>[61]</sup> Σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την εκτυπωτική συμπεριφορά της εκάστοτε υδρογέλης είναι η ρεολογία και η μέθοδος διασύνδεσης των υλικών που την αποτελούν. Ωστόσο οι ιδιότητες αυτές εξαρτώνται και από τη μέθοδο της τριδιάστατης εκτύπωσης που χρησιμοποιείται. Επιπλέον, οι εγγενείς ιδιότητες των συστατικών μιας σύνθετης ή υβριδικής υδρογέλης πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά τον προγραμματισμό της διαδικασίας προσθετικής κατασκευής.<sup>[62]</sup>

#### **5.1.1. Ρεολογία και Διασύνδεση**

Κατά τον σχεδιασμό της υδρογέλης, ρεολογικοί παράγοντες όπως το ιξώδες (viscosity), η μη – Νευτωνική συμπεριφορά (non – Newtonian behavior) και το φαινόμενο Μπάρους (Barus effect) πρέπει να λαμβάνονται υπόψη. Η μη – Νευτωνική συμπεριφορά αποδίδεται σε υλικά όπου το ιξώδες τους μειώνεται κατόπιν εφαρμογής διατμητικών τάσεων. Τα εν λόγω υλικά καλούνται λεπτόρευστα (shear – thinning) και προτιμώνται σε έναντι των παχύρευστων (shear – thickening), καθώς βελτιώνουν την ακρίβεια εκτύπωσης. Τα τελευταία, παρουσιάζουν αύξηση του ιξώδους τους υπό την επιβολή πίεσης, με κίνδυνο το φράξιμο του ακροφυσίου του εκτυπωτή.<sup>[65]</sup> Υλικά τα οποία πρέπει να αποφεύγονται είναι τα θιξοτροπικά (thixotropic), στα οποία το ιξώδες μεταβάλλεται με την πάροδο του χρόνου, οδηγώντας σε ανόμοια κατανομή των σωματιδίων που περιέχουν (πχ. νανο – σωματίδια) και την κατασκευή ανομοιογενών αντικειμένων. Συνήθης επίσης συμπεριφορά ενός υλικού κατά την τριδιάστατη εκτύπωση, είναι το φαινόμενο Μπάρους (Barus effect), δηλαδή η διόγκωση του υλικού όταν αυτό εκβάλλει από το ακροφύσιο. Ιδανικά το «μελάνι» που χρησιμοποιείται πρέπει να χαρακτηρίζεται από μηδενική έως ελάχιστη διόγκωση, ώστε να διαφυλάσσεται η σχεδιαστική ακρίβεια του αντικειμένου.

Τα υλικά που αποτελούν το «μελάνι» της τριδιάστατης εκτύπωσης είναι ως επί το πλείστον υδρογέλες. Δεδομένου ότι οι υδρογέλες φυσικών βιοϋλικών έχουν εκ φύσεως χαμηλές μηχανικές ιδιότητες, αδυνατούν να διατηρήσουν ακέραια τη δομή τους. Για τον λόγο αυτόν χρησιμοποιούνται διάφορες τεχνικές διασύνδεσης (φυσική, χημική ή ενζυμική). Η διασύνδεση συνεισφέρει υπό προϋποθέσεις στη βελτίωση της ρεολογικής συμπεριφοράς του μελανιού, διευκολύνοντας την εναπόθεση των στρώσεων του υλικού κατά την κατασκευή του τριδιάστατου ικρίωματος. Απαραίτητη ωστόσο προϋπόθεση για την αποτελεσματική διασύνδεση, είναι το ικρίωμα να διατηρεί τη δομή του σε συνθήκες που προσομοιάζουν τον οργανισμό (υδάτινο περιβάλλον, φυσιολογική θερμοκρασία και pH).<sup>[66]</sup> Στην περίπτωση που η υδρογέλη έχει διασυνδεθεί με φυσικό τρόπο, η δεσμοί είναι σχετικά αδύναμοι, καθώς είναι μη – ομοιοπολικοί. Για την κατασκευή ικρίωμάτων φυσικών υδρογελών, λαμβάνονται υπόψη παράγοντες όπως η θερμοκρασία και οι δεσμοί υδρογόνου και ιόντων. Απεναντίας, οι χημικά διασυνδεδεμένες υδρογέλες αποδίδουν μηχανικά ενισχυμένες τριδιάστατες δομές. Η διαδικασία διασύνδεσης μπορεί να προηγηθεί της τριδιάστατης εκτύπωσης ή να ακολουθεί αυτής. Εξάλλου, συχνά προστίθεται κάποιου είδους φωτοευαίσθητος εκκινητής στην υδρογέλη, ο οποίος σχηματίζει δραστικές ομάδες κατόπιν έκθεσης σε ιονίζουσα ακτινοβολία.<sup>[65,67]</sup>

### **5.1.2. Παράμετροι τριδιάστατης εκτύπωσης**

Πέραν των ιδιοτήτων που διέπουν την υδρογέλη, την εκτυπωτική συμπεριφορά επηρεάζουν και οι παράμετροι που χρησιμοποιούνται κατά τη λειτουργία της συσκευής τριδιάστατης εκτύπωσης. Κοινά σημεία αναφοράς όλων των ειδών εκτυπωτών και ιδιαίτερα όσων ειδικεύονται στη χρήση υδρογελών ως «μελάνι», είναι η **διάμετρος του ακροφυσίου**, οι **ταχύτητες εκτύπωσης** και η **θερμοκρασία** που εφαρμόζεται (ή όχι) κατά τη διαδικασία. Οι ταχύτητες εκτύπωσης συνήθως ορίζονται εννοιολογικά από το λογισμικό της κάθε συσκευής. Βασικές ταχύτητες εκτύπωσης είναι η «ταχύτητα εκβολής ή ρυθμός ροής» (extrusion speed, flow rate), η «ταχύτητα εναπόθεσης του υλικού» και η «ταχύτητα μετακίνησης» (travel speed) των κεφαλών του εκτυπωτή κατά τους άξονες X, Y και Z.<sup>[68]</sup>

Το ακροφύσιο είναι το τελευταίο στέλεχος του εκτυπωτή, πριν η υδρογέλη εξέλθει για να σχηματίσει το προσχεδιασμένο αντικείμενο. Η εκβολή πραγματοποιείται είτε με χρήση πεπιεσμένου αέρα ή εμβόλου. Έρευνες έχουν δείξει<sup>[71]</sup> ότι η εκτύπωση υδρογελών υψηλού ιξώδους μέσω ακροφυσίων μικρών διαμέτρων οδηγεί στη μείωση του πλάτους της ίνας που εναποτίθεται. Αποτέλεσμα αυτού, είναι η επιβολή μεγαλύτερης πίεσης για να υπερκεραστεί η αντίσταση που αναπτύσσεται στο ακροφύσιο. Στην προκειμένη περίπτωση, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη το ενδεχόμενο διόγκωσης της υδρογέλης κατά την έξοδό της από το ακροφύσιο, γεγονός που θα υποβαθμίσει την ποιότητα της εκτύπωσης. Μια πιο αποτελεσματική προσέγγιση<sup>[70]</sup> φαίνεται πως είναι ο συνδυασμός μικρότερων διαμέτρων και μικρότερων ρυθμών εκβολής. Η συγκεκριμένη τακτική προαιρετικά μπορεί να συνοδεύεται από μεταβολή και των συμπληρωματικών ταχυτήτων εκτύπωσης. Ο ιδανικός συνδυασμός ταχυτήτων εκτύπωσης αποτελεί και αυτούσιος αντικείμενο μελέτης από τους ερευνητές κατά την κατασκευή σύνθετων γεωμετριών.<sup>[71]</sup> Η εκτυπωτική συμπεριφορά φαίνεται πως υποβαθμίζεται όταν το αντικείμενο περιέχει οξείες γωνίες έναντι των ορθών και αμβλειών γωνιών. Το φαινόμενο μπορεί να περιοριστεί με την κατάλληλη προσαρμογή των ταχυτήτων.

Πέραν των ταχυτήτων εκτύπωσης, στη βελτίωση της εκτυπωτικής συμπεριφοράς μπορεί να συνεισφέρει και η εφαρμογή θερμοκρασίας. Οι υδρογέλες φυσικών βιοϋλικών είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες σε υψηλές θερμοκρασίες και συνήθως η εκτύπωση τους περιορίζεται σε τιμές που δεν ξεπερνούν τη φυσιολογική του ανθρώπινου σώματος (~ 37 °C).<sup>[71]</sup> Ωστόσο η επιβολή χαμηλότερων θερμοκρασιών μπορεί να βελτιώσει τη ρεολογική συμπεριφορά του «μελανιού» αυξάνοντας το ιξώδες του, όταν αυτό κρίνεται απαραίτητο. Εξάλλου, αν η διάταξη του εκτυπωτή το επιτρέπει, πέραν του υλικού, μπορεί να μεταβληθεί και η θερμοκρασία της πλατφόρμας εκτύπωσης, βοηθώντας την υπό εκτύπωση υδρογέλη να διατηρήσει ακέραια τη δομή της.<sup>[72]</sup>

Όπως φανερώνει η πληθώρα των παραγόντων που αναφέρθηκαν, ο έλεγχος και η ρύθμιση της εκτυπωτικής συμπεριφοράς της υδρογέλης αποτελεί μια πολύπλοκη διαδικασία. Η μελέτη μπορεί να γίνει από διαφορετικές οπτικές με τις κυριότερες να είναι:

(α) ο μεμονωμένος έλεγχος της σύστασης και της ρεολογίας της υδρογέλης και

(β) η ρύθμιση των παραμέτρων εκτύπωσης σε συνάρτηση με την εκάστοτε ρεολογία.

Σε κάθε περίπτωση από τις μέχρι τώρα έρευνες φαίνεται πως υιοθετείται η τακτική της «δοκιμής και σφάλματος» (trial and error) σε μια προσπάθεια άμεσης και αποτελεσματικής κατανόησης της συμπεριφοράς της εκάστοτε υδρογέλης.<sup>[73]</sup>

## 5.2. Φυσικά βιοϋλικά με βάση τους πολυσακχαρίτες

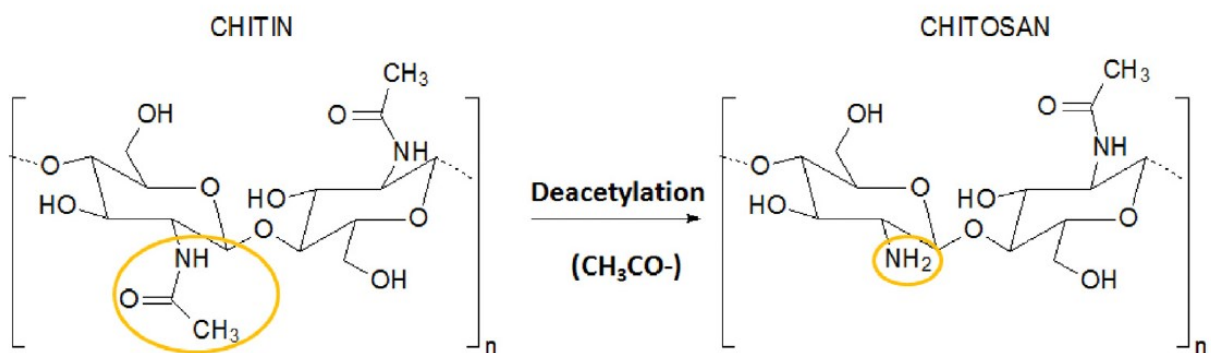
Τα βιομακρομόρια (πολυσακχαρίτες και πρωτεΐνες) που προέρχονται από ζώα ή φυτά συγκεντρώνουν όλο και περισσότερο το ενδιαφέρον των ερευνητών για την κατασκευή ικρωμάτων. Χαρακτηριστικά παραδείγματα πολυσακχαριτών είναι η χιτοζάνη (chitosan), το άλας του αλγινικού οξέος (alginate) και το υαλουρονικό οξύ (hyaluronic acid).<sup>[74]</sup> Βασικό χαρακτηριστικό αυτής της κατηγορίας υλικών είναι η ευκολία σχηματισμού πηκτώματος (γέλης) εντός υδατικών μέσων, μέσω μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων. Παρουσιάζουν χαμηλό κόστος, εξαγονται εύκολα από την εκάστοτε πηγή, ενώ είναι βιοσυμβατά και βιοαποικοδομήσιμα υλικά. Προσομοιάζουν επίσης την εξωκυττάρια μήτρα, καθώς η ίδια περιέχει σε μεγάλο ποσοστό γλυκοζαμινογλυκάνες, γλυκοπρωτεΐνες και γλυκολιπίδια.<sup>[75]</sup>

### 5.2.1. Χιτοζάνη (Chitosan)

Η χιτοζάνη αποτελεί ένα κατιονικό πολυσακχαρίτη που προκύπτει έπειτα από την μερική αποακετυλίωση της χιτίνης. Η χιτίνη αποτελεί δομικό συστατικό του εξωσκελετού εντόμων, οστρακόδερμων και του κυτταρικού τοιχώματος μυκήτων και ζυμομυκήτων. Αποτελείται από μονάδες D – γλυκοζαμίνης και N – ακετυλο – D – γλυκοζαμίνης συνδεδεμένες με β-(1-4) γλυκοσιδικό δεσμό.<sup>[76]</sup> Η χιτίνη αποτελεί το δεύτερο σε αφθονία στη φύση βιοπολυμερές μετά την κυτταρίνη. Οι χημικές δομές κυτταρίνης και χιτοζάνης είναι παρόμοιες με μοναδική διαφορά την παρουσία της χαρακτηριστικής ομάδας του υδροξυλίου (-OH) στην αντίστοιχη θέση της αμίνης (-NH<sub>2</sub>).<sup>[77]</sup>

Υπάρχουν πολλές μορφές χιτοζάνης που διαφέρουν από πλευράς βαθμού αποακετυλίωσης και μοριακού βάρους. Ο βαθμός αποακετυλίωσης αντιπροσωπεύει την αναλογία γλυκοζαμίνης και N –

ακετυλο – γλυκοζαμίνης και συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 50 – 95%. Το μοριακό βάρος της εμπορικά διαθέσιμης χιτοζάνης κυμαίνεται μεταξύ 300 – 1000 kDa εξαρτώμενο άμεσα από τις συνθήκες αποακετυλίωσης. Αμφότεροι βαθμός αποακετυλίωσης και μοριακό βάρος επηρεάζουν φυσικοχημικές ιδιότητες όπως η κρυσταλλικότητα, η διαλυτότητα και ο ρυθμός αποικοδόμησης.<sup>[78,79]</sup> Η χιτοζάνη είναι αδιάλυτη σε διαλύματα με βασικό και ουδέτερο pH, ωστόσο σχηματίζει ευδιάλυτα άλατα εντός όξινων διαλυμάτων. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, οι ελεύθερες αμινικές ομάδες πρωτονιώνονται, καθιστώντας τη χιτοζάνη θετικά φορτισμένη. Επιπλέον, ανάλογα το είδος οξέος που χρησιμοποιείται, δύναται να σχηματιστούν σύμπλοκα μορίων χιτοζάνης που φέρουν συνδυαστικές ιδιότητες.<sup>[80]</sup> Έχει διαπιστωθεί ότι υψηλός βαθμός αποακετυλίωσης οδηγεί σε υψηλά ποσοστά θετικά φορτισμένων αμινών.<sup>[79]</sup>



**Σχήμα 12:** Χημική δομή χιτίνης (αριστερά) και χιτοζάνης (δεξιά).<sup>[80]</sup>

Η κατιοντική φύση της χιτοζάνης, την καθιστά ιδιαίτερα ελκυστική ως βιοϋλικό. Χάρη σε αυτή, μπορεί να αλληλεπιδρά με τα αρνητικά φορτισμένα τμήματα των κυτταρικών μεμβρανών, ενισχύοντας την δυνατότητα εισόδου θρεπτικών συστατικών εντός των κυττάρων. Ομοίως αιτιολογείται και η αιμοστατική συμπεριφορά του εν λόγω πολυσακχαρίτη, καθώς οι κυτταρικές μεμβράνες των ερυθρών αιμοσφαιρίων είναι αρνητικά φορτισμένες.<sup>[81]</sup> Επιπλέον, όπως και άλλα κατιοντικά πολυμερή, έτσι και η χιτοζάνη παρουσιάζει αντιμικροβιακές ιδιότητες. Παρόλο που οι μηχανισμοί δράσης δεν έχουν ακόμα εξακριβωθεί, φαίνεται ότι διαταράσσει τα αρνητικά φορτία των τοιχωμάτων των βακτηριακών κυττάρων, καταστέλλοντας την ανάπτυξή τους.<sup>[79]</sup>

Η χιτοζάνη μπορεί να σχηματίσει φυσικά συνδεδεμένες υδρογέλες μέσω δεσμών υδρογόνου ή υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, αποτελούμενες αυτούσιες από μόρια χιτοζάνης. Αντίστοιχα δημιουργεί σύνθετες υδρογέλες αντιδρώντας με αρνητικά φορτισμένους πολυσακχαρίτες (πχ. άλας αλγινικού οξέος) ή πρωτεΐνες (πχ. ζελατίνη). Ωστόσο, οι χαμηλές μηχανικές ιδιότητες της χιτοζάνης περιορίζουν τις δυνατότητες εφαρμογής της σε ικρίωματα, οδηγώντας στην εύρεση καινούριων μεθόδων σύνθεσης, όπως χρήση χημικής διασύνδεσης, ανάμιξη με συνθετικά πολυμερή ή χρήση εγκλεισμάτων. Υπάρχει εντούτοις πάντα ο κίνδυνος απώλειας των εγγενών ιδιοτήτων της χιτοζάνης, σε περίπτωση χημικής τροποποίησης της δομής της. Πέραν αυτού, υπολείμματα του εκάστοτε χημικού διασυνδέτη, είναι ικανά να μολύνουν το ικρίωμα καθιστώντας το τοξικό προς τα κύτταρα του οργανισμού, υποβαθμίζοντας τη λειτουργικότητά του.

Χάρη στις προαναφερθείσες αξιοσημείωτες ιδιότητες, η χιτοζάνη χρησιμοποιείται ευρέως στον τομέα της Ιστικής Μηχανικής και ειδικότερα στον σχεδιασμό υλικών ικανών να υποκαταστήσουν

κατεστραμμένους ιστούς ή όργανα και να ενισχύσουν την κυτταρική προσκόλληση και πολλαπλασιασμό. Λόγω της δομικής της ομοιότητας με τις γλυκοζαμινογλυκάνες της εξωκυττάριας μήτρας, η χιτοζάνη βρίσκει εκτεταμένη εφαρμογή στην επιδιόρθωση πληθώρας ιστών.<sup>[82]</sup> Η χρήση αμιγώς του συγκεκριμένου πολυμερούς περιορίζεται στην επιδιόρθωση μαλακών ιστών όπως το δέρμα και τα νεύρα, λόγω των μειωμένων μηχανικών του αντοχών. Ωστόσο, η εύκολη αναμιξιμότητα και κατεργασιμότητα της χιτοζάνης, προσφέρουν τη δυνατότητα τροποποίησης και συνδυασμού της με οργανικά ή/και ανόργανα υλικά.<sup>[77]</sup>

Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η χρήση της σε συνδυασμό με υδροξυαπατίτη (HAp) ή φωσφορικά άλατα του ασβεστίου (CPs) γενικότερα, για την παραγωγή ικριωμάτων οστικού ιστού. Η δυνατότητα της χιτοζάνης να υποστηρίξει την ανάπτυξη οστεοβλαστών και η οστεοαγωγιμότητά της σε συνδυασμό με την ενίσχυση των μηχανικών ιδιοτήτων που επιφέρουν τα άλατα του ασβεστίου, συντελούν στην κατασκευή ικριωμάτων ιδανικών για οστική ανάπλαση. Ο Hu και οι συνεργάτες του<sup>[83]</sup> συνέθεσαν ένα πολυστρωματικό νανοσύνθετο υλικό χιτοζάνης – υδροξυαπατίτη με υψηλή αντοχή και μέτρο κάμψης, με εν δυνάμει εφαρμογή στην επούλωση εκτεταμένων καταγμάτων. Δεδομένου ότι ο υδροξυαπατίτης, όπως και η χιτοζάνη είναι αδιάλυτος σε διαλύματα ουδέτερου και αλκαλικού pH, καθίσταται δυνατή η αποτελεσματική ανάμιξη των δύο σε παρόμοιες συνθήκες. Επιπλέον στην περίπτωση των νανοκρυστάλλων υδροξυαπατίτη, βελτιώνεται η κατανομή τους εντός της πολυμερικής μήτρας της χιτοζάνης.<sup>[76,79]</sup> Επιπλέον, οι υδρογέλες που περιέχουν χιτοζάνη βρίσκουν εκτενή εφαρμογή στην ανάπλαση του δέρματος και των νεύρων, λόγω της ομοιότητας των συστατικών με τα αντίστοιχα της εξωκυττάριας μήτρας του φυσικού ιστού.<sup>[84]</sup> Ο C.A. Stone και οι συνεργάτες του<sup>[85]</sup> απέδειξαν ότι η χιτοζάνη επιταχύνει την επούλωση τραυμάτων, ενισχύοντας την αναγέννηση των νεύρων και την κυτταρική μετανάστευση.

### **5.3. Φυσικά βιοϋλικά με βάση τις πρωτεΐνες**

Το κολλαγόνο, η ζελατίνη και η ελαστίνη αποτελούν χαρακτηριστικά παραδείγματα βιοϋλικών που ανήκουν στην ευρύτερη κατηγορία των πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες χαρακτηρίζονται από βιοσυμβατότητα και βιοαποικοδομησιμότητα. Παράλληλα, αρκετές από αυτές, διαθέτουν βιοενεργές περιοχές που επιτρέπουν στα εκάστοτε ικριώματα την αλληλεπίδραση με την περιοχή του ιστού στην οποία εμφυτεύονται. Το κολλαγόνο και η ζελατίνη είναι τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα βιοϋλικά πρωτεϊνικής φύσης στην ιστική μηχανική για την παραγωγή ικριωμάτων.<sup>[86,87]</sup>

#### **5.3.1. Κολλαγόνο (Collagen)**

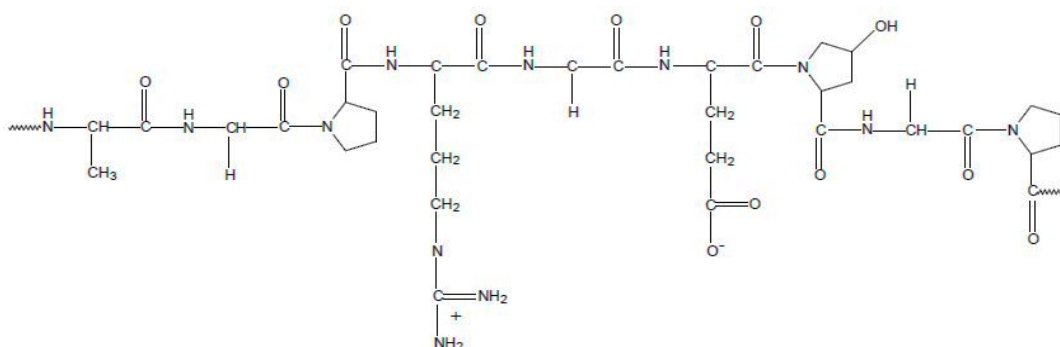
Το κολλαγόνο είναι μια βιοσυμβατή πρωτεΐνη, η οποία αποτελεί ένα από τα βασικά συστατικά των συνδετικών ιστών των θηλαστικών. Έχει χρησιμοποιηθεί σε πληθώρα βιοϊατρικών εφαρμογών μεταξύ των οποίων η αντικατάσταση και ανάπλαση ιστών και η χορήγηση φαρμάκων λόγω των ευνοϊκών βιολογικών και φυσικοχημικών ιδιοτήτων της. Ειδικότερα, το κολλαγόνο τύπου I είναι βασικό στοιχείο της εξωκυττάριας μήτρας βρίσκοντας εφαρμογή σε επούλωση τραυμάτων, την ενίσχυση των κυτταρικών λειτουργιών και την ανάπλαση ιστών. Ωστόσο, η χρήση του συγκεκριμένου τύπου κολλαγόνου στην τριδιάστατη εκτύπωση είναι περιορισμένη καθώς έχει ρευστή μορφή σε χαμηλές θερμοκρασίες, ενώ σχηματίζει ινώδεις δομές σε υψηλότερες. Επιπλέον, η τριδιάστατη εκτύπωση δομών αποτελούμενες αμιγώς από κολλαγόνο είναι ιδιαίτερα δύσκολη λόγω του χαμηλού ρυθμού πηγμάτωσης (gelation) του



υλικού, καθώς απαιτείται θερμοκρασία ~ 37 °C και η διαδικασία μπορεί να διαρκέσει έως και 0.5 ώρα. Η υδρογέλη παραμένει σε υγρή μορφή για διάστημα 10 λεπτών έως ότου ξεκινήσει η πηγμάτωση.<sup>[88]</sup>

### 5.3.2. Ζελατίνη (Gelatin)

Η ζελατίνη είναι ένα φυσικό βιοπολυμερές που προέρχεται από όξινη ή αλκαλική υδρόλυση του ζωικού κολλαγόνου προερχόμενο από δέρμα, οστά ή τένοντες. Στην πρώτη περίπτωση προκύπτει ζελατίνη τύπου A, ενώ στη δεύτερη, τύπου B. Οι διαφορετικές πηγές κολλαγόνου και οι τεχνικές τροποποίησης, προσδίδουν στη συγκεκριμένη πρωτεΐνη διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, καθιστώντας ιδιαίτερα ευέλικτο ως βιοϋλικό. Η ζελατίνη αποτελεί ένα ετερογενές μίγμα πολυπεπτιδίων αποτελούμενων από 20 διαφορετικά αμινοξέα σε ποικίλες αναλογίες. Παρά τη διαδικασία της υδρόλυσης, διατηρεί σημαντικές ακολουθίες αμινοξέων όπως οι σειρές κυτταρικής προσκόλλησης (RGD) και αποικοδόμησης (MPP) «κληρονομώντας» τη βιοσυμβατότητα και βιοαποικοδομησιμότητα του κολλαγόνου.<sup>[87]</sup> Η ζελατίνη, πέραν του χαμηλού κόστους, διαθέτει πληθώρα λειτουργικών ομάδων, γεγονός που ενισχύει την κατεργασιμότητά της. Επιπλέον, χρησιμοποιείται σε ευρύ φάσμα εφαρμογών της Ιστικής Μηχανικής, εξυπηρετώντας είτε ως βασική μήτρα είτε συνδυαστικά με άλλα βιοϋλικά για την κατασκευή ικριωμάτων, λόγω του αυξημένου πορώδους δικτύου της.<sup>[89]</sup>



Σχήμα 13: Χημική δομή ζελατίνης.<sup>[90]</sup>

Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της ζελατίνης είναι η δυνατότητα σχηματισμού θερμικά αντιστρεπτού δικτύου σε υδατικό διάλυμα. Σε αντίθεση με το κολλαγόνο που έχει μορφή διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου και άνω, το διάλυμα ζελατίνης αποκτά μορφή πήγματος σε θερμοκρασίες ~ 35 °C και κάτω. Το τελευταίο αποδίδεται στην αλλαγή της διαμόρφωσης του μορίου ζελατίνης, από τυχαία σπειροειδή, σε ελικοειδή μορφή, που οδηγεί σε οργάνωση των πολυμερικών αλυσίδων της σε ένα τριδιάστατο δίκτυο. Λόγω αυτού, είναι αναγκαία η τροποποίηση της ζελατίνης για την επιτυχή εφαρμογή της σε τριδιάστατες εκτυπώσεις μέσω φυσικής ή χημικής διασύνδεσης. Ο συνηθέστερος τρόπος επεξεργασίας του εν λόγω υλικού είναι η τροποποίηση του με μεθακρυλικό οξύ. Η υδρογέλη μεθακρυλικής ζελατίνης (gelatin methacrylate) είναι συνθετικής φύσης και βασικό της χαρακτηριστικό είναι διατήρηση της δομής της σε θερμοκρασία μεγαλύτερη των 37 °C, όπου υπό άλλες συνθήκες θα ρευστοποιούνταν. Κάτι τέτοιο επιτυγχάνεται με εφαρμογή υπεριώδους (UV) ακτινοβολίας η οποία προκαλεί τον σχηματισμό ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ των πολυμερικών αλυσίδων.<sup>[91,92]</sup>

Ωστόσο, λόγω της μοναδικής συμπεριφοράς της, η ζελατίνη χρησιμοποιείται στην αύξηση του ιξώδους διαλυμάτων, ως πηκτικός παράγοντας, βρίσκοντας ευρύτατη εφαρμογή στον τομέα της τριδιάστατης

εκτύπωσης<sup>[93]</sup> που προσανατολίζεται σε βιοϊατρικές εφαρμογές. Συνεισφέρει στην κατασκευή «μελανιού» προσδίδοντας ιδιότητες όπως η βιοσυμβατότητα και η βιοαποικοδομησιμότητα και βελτιώνει την ποιότητα τριδιάστατης εκτύπωσης του υλικού.<sup>[94]</sup>

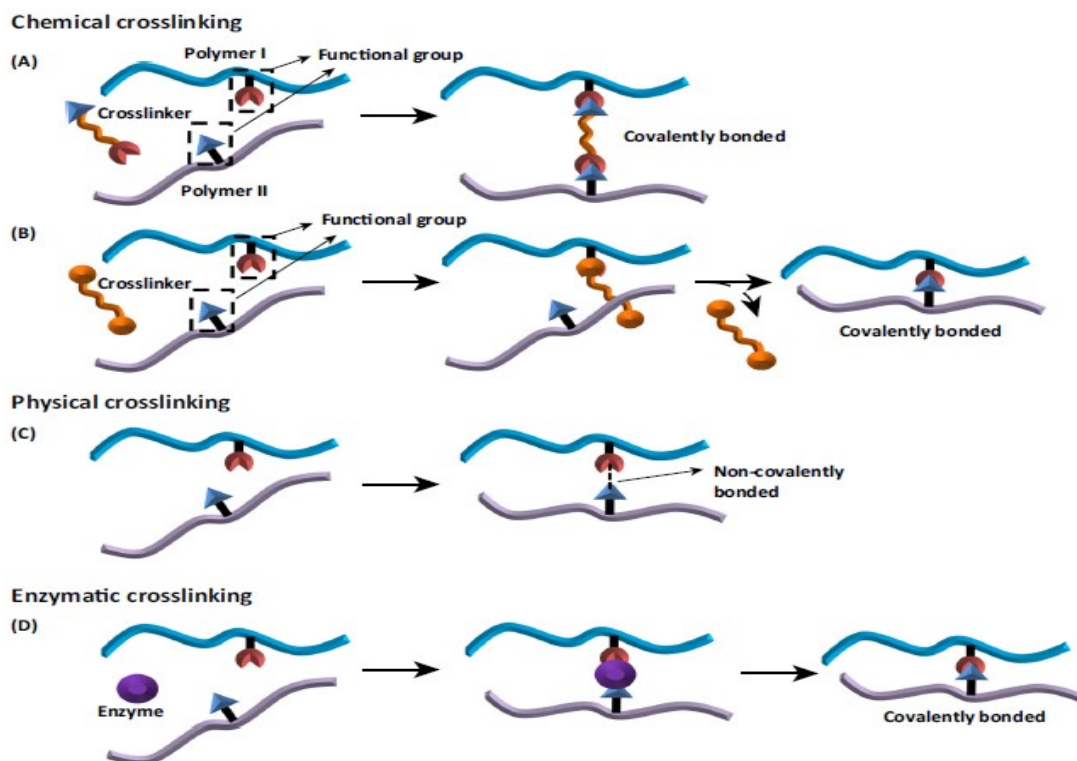
Εναλλακτικά, το φαινόμενο ρευστοποίησης της υδρογέλης ζελατίνης την καθιστά ελκυστικό «θυσιαζόμενο» υλικό (sacrificial material). Στις τεχνολογίες προσθετικής κατασκευής συχνά χρησιμοποιούνται υλικά επικουρικά, με στόχο τη βελτίωση της εκτυπωτικής συμπεριφοράς του βασικού υλικού και της ποιότητας εκτύπωσης της τριδιάστατης δομής. Κατόπιν της εκτύπωσης, πραγματοποιείται έκπλυση του ικρίωματος ώστε να απομακρυνθεί το θυσιαζόμενο υλικό, δημιουργώντας έτσι σπές και πόρους στη δομή.<sup>[95]</sup> Όταν η ζελατίνη χρησιμοποιηθεί συνδυαστικά με κάποιο διασυνδεδεμένο πολυμερικό δίκτυο, μπορεί να αφαιρεθεί υπό κατάλληλες συνθήκες (υδατικό μέσο, 37 °C), διατηρώντας ανέπαφη την τριδιάστατη δομή του ετέρου πολυμερούς. Συμπερασματικά, η ζελατίνη μπορεί να συμμετέχει σε μια διαδικασία τριδιάστατης εκτύπωσης με τρεις διαφορετικούς τρόπους:

1. Ως το βασικό πολυμερές της υδρογέλης, έχοντας ωστόσο υποστεί κάποιας μορφής διασύνδεση (π.χ. χρήση γλουταραλδεϋδης, υπεριώδης ακτινοβολία κατόπιν τροποποίησης)
2. Ως συστατικό της υδρογέλης με στόχο τη βελτίωση της εκτυπωτικής της συμπεριφοράς.
3. Ως «θυσιαζόμενο» υλικό.

Η ζελατίνη είναι ένα υλικό με υψηλό ιξώδες σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C) και για αυτό τον λόγο, η τριδιάστατη εκτύπωση της γίνεται με τη μέθοδο της εκβολής (extrusion – based printers).

#### **5.4. Διασύνδεση (Cross- linking)**

Η διασύνδεση είναι μια διαδικασία που χρησιμοποιείται για να βελτιώσει τη σταθερότητα και τις μηχανικές ιδιότητες των πολυμερών. Οι πολυμερικές αλυσίδες ενώνονται μεταξύ τους με ομοιοπολικούς ή μη – ομοιοπολικούς δεσμούς, ανάλογα τη λειτουργική ομάδα που τις χαρακτηρίζει. Διακρίνονται τρεις βασικές κατηγορίες διασύνδεσης: η χημική, η φυσική και η ενζυμική. Στη χημική διασύνδεση, οι αλυσίδες του πολυμερούς ενώνονται μεταξύ τους με τη βοήθεια διασυνδέτη (cross linker) που λειτουργεί είτε ως «γέφυρα», συνδέοντας έμμεσα τις λειτουργικές ομάδες, είτε ως εκκινητής, προκαλώντας την άμεση σύζευξη τους. Η φυσική διασύνδεση βασίζεται σε φυσικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πολυμερικών αλυσίδων, απουσία διασυνδέτη και περιλαμβάνει πληθώρα μεθόδων όπως η υδροθερμική κατεργασία και η ακτινοβολία του δείγματος με υπέρυθρη ή γ – ακτινοβολία. Όσον αφορά στην ενζυμική, η διασύνδεση πραγματοποιείται με τη βοήθεια ενζύμου που καταλύει την αντίδραση μεταξύ των διαφορετικών αλυσίδων, σχηματίζοντας ομοιοπολικούς δεσμούς.<sup>[96, 97]</sup>



**Σχήμα 14:** Αναπαράσταση ειδών διασύνδεσης: (A) Χημική διασύνδεση όπου ο διασυνδέτης εντάσσεται στον δεσμό (B) Χημική διασύνδεση όπου ο διασυνδέτης δεν εντάσσεται στο δεσμό, (C) Φυσική διασύνδεση και (D) Ενζυμική διασύνδεση.<sup>[98]</sup>

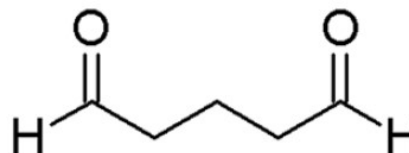
Όσον αφορά στον τομέα της Ιστικής Μηχανικής, η χρήση βιοϋλικών και συγκεκριμένα φυσικών πολυμερών στην κατασκευή ικρωμάτων προσφέρει πληθώρα πλεονεκτημάτων από πλευράς βιοσυμβατότητας, βιοαποικοδομησιμότητας και κυτταροσυμβατότητας. Εντούτοις, υστερεί από πλευράς μηχανικών ιδιοτήτων αλλά και δομικής σταθερότητας όταν τοποθετηθούν σε βιομιμητικό περιβάλλον. Ευρύτατα διαδεδομένη είναι η εφαρμογή της χημικής διασύνδεσης για τη λύση του εν λόγω προβλήματος. Πρόκειται για σύντομη διαδικασία, όπου οι διασυνδέτες συνεισφέρουν ενώνοντας τις πολυμερικές αλυσίδες, αυξάνοντας το μοριακό βάρος και εν τέλει ενισχύοντας τις μηχανικές ιδιότητες και τη σταθερότητα του ικρωματος.<sup>[98]</sup> Επιπλέον, η χρήση διασυνδετών συνεισφέρει και στην τεχνική της τριδιάστατης εκτύπωσης, βελτιώνοντας την εκτυπωτική συμπεριφορά του υλικού. Ειδικότερα, ενισχύει τη στερεοποίηση του υλικού και τροποποιεί τη ρεολογία του. Ωστόσο, θα πρέπει να τονιστεί ότι η χρήση διασυνδετών, κυρίως χημικής προέλευσης (π.χ. γλουταραλδεΐδη), οδηγεί σε μείωση της βιοαποικοδομησιμότητας, αλλαγή της ρεολογίας και δύναται να καταστήσει το υλικό τοξικό προς τα κύτταρα.<sup>[66]</sup>

#### 5.4.1. Γλουταραλδεΐδη (Glutaraldehyde)

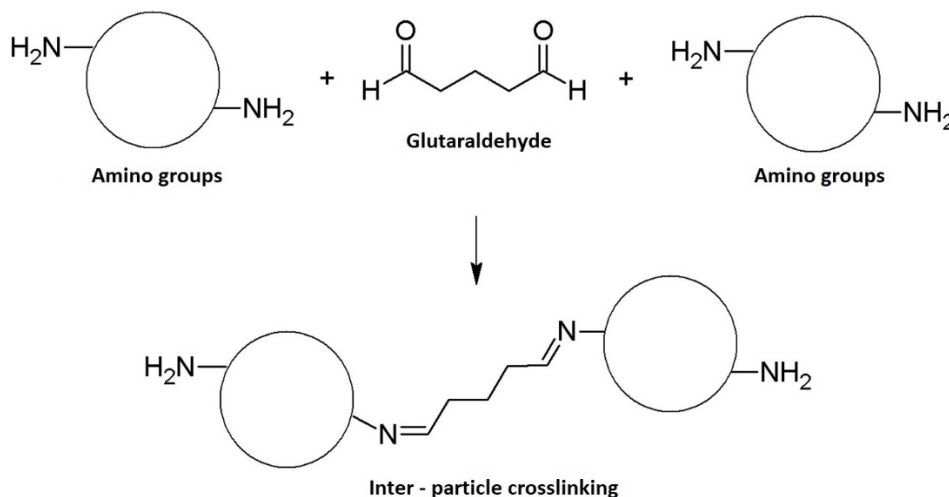
Η γλουταραλδεΐδη είναι για οργανική ένωση με χημικό τύπο  $\text{CH}_2(\text{CH}_2\text{CHO})_2$  και ανάλογα τις συνθήκες που εφαρμόζονται (pH, θερμοκρασία, συγκέντρωση κλπ.), μπορεί να αντιδράσει με αμινομάδες ή υδροξυλομάδες προκαλώντας ενδομοριακές ή διαμοριακές αλληλεπιδράσεις.<sup>[99]</sup> Χρησιμοποιείται ευρέως σε εφαρμογές της Ιστικής Μηχανικής για τη χημική διασύνδεση διαφόρων τύπων πολυμερικών ικρωμάτων, υδρογελών και σύνθετων υλικών ενισχύοντας τις μηχανικές ιδιότητες και την ανθεκτικότητά

τους. Η εν λόγω ουσία αποτελεί βασικό εργαλείο στη διασύνδεση μεμβρανών και ικρωμάτων με στόχο την επιδιόρθωση ιστών, ιδιαίτερα οστικής φύσης, ενισχύοντας την αντοχή σε εφελκυσμό και μειώνοντας φαινόμενα ανοσολογικής απόκρισης.<sup>[100]</sup>

Σε αντίθεση με την περίπτωση των υδροξυλομάδων, όπου η χημική διασύνδεση απαιτεί εφαρμογή ακραίων συνθηκών (χαμηλό pH, υψηλή θερμοκρασία), η διασύνδεση πολυμερών που περιέχουν αμινομάδες, απαιτεί ήπιες συνθήκες, καθιστώντας την γλουταραλδεΐδη ιδανική για περιπτώσεις πρωτεϊνών και πολυσακχαριτών που περιέχουν αμίνες. Παρά το γεγονός ότι η χρήση της γλουταραλδεΐδης έχει μελετηθεί σε πληθώρα διαφορετικών συγκεντρώσεων, νεότερες μελέτες υποδεικνύουν ότι ορθότερη προσέγγιση της χημικής διασύνδεσης είναι με βάση τις συνολικές ομάδες αμίνης του εκάστοτε πολυμερούς. Συγκριτικά με άλλες αλδεΐδες (π.χ. φορμαλδεΐδη, γλυκεραλδεΐδη) η γλουταραλδεΐδη είναι αποτελεσματικότερη στη δημιουργία θερμικά και χημικά σταθερών ικρωμάτων.<sup>[102]</sup>



Σχήμα 15: Χημική δομή γλουταραλδεΐδης<sup>[101]</sup>



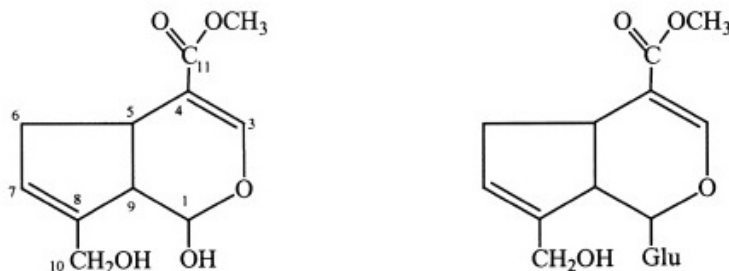
Σχήμα 16: Απεικόνιση χημικής διασύνδεσης αμινομάδων με χρήση γλουταραλδεΐδης.<sup>[101]</sup>

Οι λειτουργικές ομάδες της γλουταραλδεΐδης, οι αλδεΐδομάδες, είναι ιδιαίτερα τοξικές για τα κύτταρα, προκαλώντας φλεγμονές στον οργανισμό. Συγκεκριμένα κατά τη σύνθεση χημικά διασυνδεδεμένων ικρωμάτων ελλοχεύει ο κίνδυνος παγίδευσης ελεύθερων μορίων αλδεΐδης εντός του πολυμερικού δικτύου. Τα τελευταία δύνανται να απελευθερωθούν εντός του οργανισμού κατά την αποικοδόμηση του ικρώματος υποβαθμίζοντας τη βιοσυμβατότητα και τη λειτουργία του. Για τον λόγο αυτόν, εφαρμόζονται διάφορες στρατηγικές περιορισμού της τοξικότητας όπως για παράδειγμα οι συστηματικές εκπλύσεις με διαλύματα που περιέχουν ελεύθερες ομάδες αμίνης. Ωστόσο, λόγω της κυτταροτοξικότητάς της, η περιεκτικότητά της στο ικρίωμα περιορίζεται σε ποσοστό της τάξης του 8%, υπό την προϋπόθεση να υποβληθεί στις κατάλληλες διαδικασίες απομάκρυνσης τυχόν υπολειμμάτων.

### 5.4.2. Γενιπίνη (Genipin)

Τα τελευταία χρόνια οι φυσικοί διασυνδέτες έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον της Ιστικής Μηχανικής, λόγω των πλεονεκτημάτων που εμφανίζουν έναντι των αντίστοιχων χημικών σε διάφορους τομείς και ιδιαίτερα σε αυτόν της κυτταροτοξικότητας. Στο ευρύ φάσμα των φυσικών διασυνδετών ανήκουν ουσίες όπως η γενιπίνη, το κιτρικό και το ταννικό οξύ, ωστόσο η πρώτη διερευνάται εκτενέστερα, ιδιαίτερα σε εφαρμογές επιδιόρθωσης οστικού ιστού. Η γενιπίνη είναι ένας φυσικός πρωτεϊνικός διασυνδέτης και αποτελεί προϊόν υδρόλυσης του γενιποζίτη (geniposide) των καρπών του φυτού της γαρδένιας.

Παρά το γεγονός ότι η γαρδένια αποτελεί από τα πλέον δημοφιλή αρωματικά φυτά, οι περισσότεροι αγνοούν ότι αποτελεί και ένα πανίσχυρο φαρμακευτικό φυτό. Η Γαρδένια ιασμινοειδής (*Gardenia jasminoides* J. Ellis) ανήκει στην οικογένεια των ρουβιωδών και προέρχεται από την Κίνα και την Ιαπωνία.<sup>[103]</sup> Οι αποξηραμένοι καρποί της γαρδένιας αποτελούν ιδιαίτερα δραστικά φάρμακα στην υπηρεσία της κινέζικης βοτανολογίας. Το εκχύλισμα του καρπού του φυτού χρησιμοποιείται επί αιώνες σε ασιατικές χώρες για θεραπευτικούς σκοπούς δρώντας ως αντιφλεγμονώδες, αντιυπερτασικό και αντιπυρετικό φάρμακο. Η βιοχημική σημασία της γενιπίνης αναδεικνύεται σε πληθώρα ερευνών σε τομείς που περιλαμβάνουν τις αγγειακές παθήσεις, την καταπολέμηση του διαβήτη, τις δυσλειτουργίες ύπατος, όπως και στην οδοντιατρική, την οφθαλμολογία και την επούλωση τραυμάτων.<sup>[104]</sup>

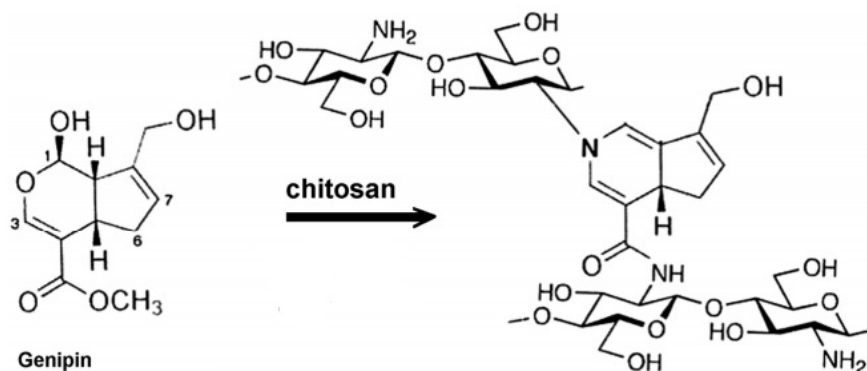


Σχήμα 17: Χημική δομή γενιπίνης (αριστερά) και γενιποζίτη (δεξιά).<sup>[105]</sup>

Η γενιπίνη έχει μοριακό τύπο C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub> και διαθέτει αρκετές ενεργές ομάδες όπως αυτές των υδροξυλίων και καρβοξυλίων. Πρόκειται για άχρωμο διαφανές υλικό που αντιδρά άμεσα με αμινοξέα (συγκεκριμένα τις πρωτοταγείς αμίνες) σχηματίζοντας μια έντονη κυανή χρωστική. Ο μηχανισμός αντίδρασης της γενιπίνης προς σχηματισμό σταυροειδών δεσμών δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως, ωστόσο ο Touyama και οι συνεργάτες του πρότειναν μία πιθανή ερμηνεία του.<sup>[106]</sup> Ο μηχανισμός διαφοροποιείται ανάλογα την τιμή του pH. Στην περίπτωση όξινων ή ουδέτερων τιμών pH, πραγματοποιείται πυρηνόφιλη επίθεση των αμινών στο ολεφινικό άτομο άνθρακα C3 της γενιπίνης, προκαλώντας τη διάνοιξη του δακτυλίου της. Ακολούθως, δευτεροταγείς αμίνες επιτίθενται στη νεοσύστατη αλδεϋδομάδα. Η γενιπίνη δηλαδή δρα σαν μία αλδεϋδη, τα προϊόντα της οποία εντούτοις είναι πολύ πιο σταθερά σε σχέση με τα αντίστοιχα που σχηματίζονται στην περίπτωση της γλουταραλδεϋδης.<sup>[107,108]</sup> Στην περίπτωση των βασικών τιμών pH, η διάνοιξη του δακτυλίου οφείλεται σε πυρηνόφιλη επίθεση ομάδων υδροξυλίου προς σχηματισμό ενδιάμεσων αλδεϋδομάδων που στη συνέχεια υφίστανται αλδολική συμπύκνωση.

Το τελικό στάδιο της χημικής διασύνδεσης αποτελείται από τον διμερισμό της γενιπίνης μέσω αντίδρασης ριζών. Αποτέλεσμα αυτού, είναι η δυνατότητα ανάπτυξης ενδομοριακών και διαμοριακών διασυνδέσεων, οι οποίες εμφανίζουν συνδυαστικές «γέφυρες» ετεροκυκλικού χαρακτήρα με όλες τις

μακρομοριακές ενώσεις που περιέχουν πρωτοταγείς αμινομάδες.<sup>[109]</sup> Η συγκεκριμένη ιδιότητα της γενιπίνης είναι υψίστης σημασίας καθώς συμβάλλει σημαντικά στην κατασκευή βιοσυμβατών ικτριωμάτων αποτελούμενων από φυσικά βιοϋλικά όπως το κολλαγόνο, η ζελατίνη, η χιτοζάνη κ.ά.<sup>[100]</sup>



Σχήμα 18: Απεικόνιση χημικής διασύνδεσης χιτοζάνης με χρήση γενιπίνης.<sup>[104]</sup>

Καθώς η γενιπίνη αποτελεί φυσικό διασυνδέτη και παρουσιάζει βιοαποικοδομησιμότητα και χαμηλής κυτταροτοξικότητα, έχει αρχίσει να χρησιμοποιείται εκτεταμένα σε αρκετές βιολογικές εφαρμογές. Αρκετές είναι οι *in vitro* μελέτες που καταδεικνύουν την συντριπτικά κατώτερη κυτταροτοξικότητα της γενιπίνης έναντι της γλουταραλδεΐδης.<sup>[110]</sup> Συγκεκριμένα, μελέτες κυτταρικών καλλιιεργειών, απέδειξαν ότι η γενιπίνη είναι περίπου 10.000 φορές λιγότερο τοξική από την γλουταραλδεΐδη. Επιπλέον ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός έπειτα από έκθεση στον εν λόγω φυσικό διασυνδέτη ήταν 5.000 φορές μεγαλύτερος έναντι του χημικού. Πληθώρα μελετών επιδιόρθωσης οστικού ιστού περιλαμβάνουν τη χρήση γενιπίνης στην κατασκευή υβριδικών ικτριωμάτων. Ο Yao και οι συνεργάτες του<sup>[111]</sup>, συνέθεσαν ικτριώματα ζελατίνης και τετραφωσφορικού ασβεστίου διασυνδέοντας την πρώτη με τη βοήθεια γενιπίνης. Τα αποτελέσματα των *in vitro* μελετών έδειξαν ότι το ικτριώμα ήταν βιοσυμβατό, βιοαποικοδομήσιμο και παράλληλα συνεισέφερε στον σχηματισμό καινούργιου οστού. Παρά το γεγονός ότι η γενιπίνη αποτελεί έναν επαρκώς ασφαλή διασυνδέτη, είναι αρκετά ακριβή, ειδικά όταν προορίζεται για μαζική παραγωγή ικτριωμάτων. Για αυτό τον λόγο, περιορίζεται προς το παρόν σε εργαστηριακές κλίμακας μελέτες.<sup>[100]</sup>

## II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## 6. Πειραματική Διαδικασία

### 6.1. Σύνθεση υβριδικού νανοδομημένου υλικού

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε σύνθεση υβριδικού νανοδομημένου υλικού για την κατασκευή ικριωμάτων μέσω 3D εκτύπωσης. Το υλικό αποτελείται από νανοκρυστάλλους υδροξυαπατίτη (HAp) που αναπτύχθηκαν παρουσία φυσικών βιομορίων, με στόχο την ενίσχυση της βιοσυμβατότητας και βιοδραστικότητας, παράγοντες που συνδράμουν στην κυτταρική απόκριση και οστική ανάπτυξη. Για την ορθή και αποτελεσματική μίμηση του περιβάλλοντος ανάπτυξης των φωσφορικών αλάτων του ασβεστίου, απαραίτητη είναι η παρουσία βιοπολυμερών όπως π.χ. η χιτοζάνη. Η προσέγγιση που ακολουθήθηκε στοχεύει στην παραγωγή τελικού προϊόντος, που να προσομοιάζει όσο το δυνατόν καλύτερα τις ιδιότητες των οστών (δομή, μηχανικές ιδιότητες και βιοαποικοδομησιμότητα). Για την κατασκευή ικριωμάτων μέσω 3D εκτύπωσης, το υλικό χρησιμοποιήθηκε σε μορφή υδρογέλης.

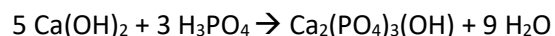
#### 6.1.1. Βιομιμητική ανάπτυξη κρυστάλλων υδροξυαπατίτη

Η χρησιμοποιούμενη τεχνική συνδυάζει τη μέθοδο της χημικής καταβύθισης με την τεχνική λύματος – πηκτής (sol – gel), καθώς το τελικό προϊόν είναι αιώρημα και όχι ίζημα. Η σύνθεση των κρυστάλλων του υδροξυαπατίτη πραγματοποιείται παρουσία του βιομορίου L-αργινίνη, το οποίο περιέχει συγκεκριμένα κατάλοιπα αμινοξέων τα οποία όπως έχει αποδειχθεί ενισχύουν αισθητά την κυτταρική διασύνδεση, ανάπτυξη και διαφοροποίηση στις επιφάνειες του υλικού, ενώ παράλληλα συνδράμουν στον αποτελεσματικό σχηματισμό νανοκρυστάλλων υδροξυαπατίτη και στη ρύθμιση του μεγέθους τους.<sup>[112]</sup>

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση του υδροξυαπατίτη αναφέρονται ακολούθως:

- I. Διάλυμα ορθοφωσφορικού οξέος,  $H_3PO_4$  85%. Το παρόν λειτουργεί ως πηγή ιόντων φωσφόρου, ενώ παράλληλα εξυπηρετεί στην επιτυχή διάλυση βιοπολυμερών όπως η χιτοζάνη, η οποία και απαιτεί όξινο περιβάλλον.
- II. Υδροξείδιο του ασβεστίου,  $Ca(OH)_2$  που λειτουργεί ως πηγή ιόντων ασβεστίου.

Κατά την ανάμιξη των αντιδραστηρίων I και II πραγματοποιείται εξουδετέρωση του οξέος και της βάσης προς παραγωγή φωσφορικού άλατος του ασβεστίου (υδροξυαπατίτης) και νερού. Η εξουδετέρωση περιγράφεται από την αντίδραση:



Οι συγκεντρώσεις των πρόδρομων αντιδραστηρίων υπολογίστηκαν έτσι ώστε να ισχύει η στοιχειομετρική μοριακή αναλογία  $Ca/P = 10/6 = 1.67$ . Ακολούθως υπολογίστηκε η συγκέντρωση του βιοπολυμερούς σε σχέση με την επιθυμητή τελική ποσότητα υδροξυαπατίτη. Η αναλογία μαζών **HAp/βιοπολυμερούς** επιλέχθηκε να είναι όμοια με την αντίστοιχη που συναντάται στο φυσικό οστό, δηλαδή **70/30**. Η συγκέντρωση του ορθοφωσφορικού οξέος επιλέχθηκε 0.06 M σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα, ενώ η αντίστοιχη της L-αργινίνης υπολογίστηκε με βάση τη μοριακή αναλογία  $Ca^{2+} / \text{αμινοξύ} = 1 : 1$ .<sup>[112]</sup>



Παρακάτω παρατίθενται αναλυτικά οι υπολογισμοί για τον καθορισμό των παραμέτρων σύνθεσης των κρυστάλλων υδροξυαπατίτη:

Μοριακό βάρος  $\text{H}_3\text{PO}_4$  : MW = 98 g/mol

Πυκνότητα  $\text{H}_3\text{PO}_4$  :  $\rho = 1.689$  g/ml

Μοριακό βάρος  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  : MW = 74.10 g/mol

Μοριακό βάρος HAp : MW = 502.31 g/mol

Μοριακό βάρος L-arginine: MW = 174.2 g/mol

Αρχικά υπολογίστηκε η ποσότητα ορθοφωσφορικού οξέος,  $\text{H}_3\text{PO}_4$  με βάση τη μοριακή αναλογία Ca/P = 10/6, θέτοντας ως άγνωστο  $x$  τον αρχικό όγκο (ml) του όξινου διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε.

- Έστω λοιπόν  $x$  τα ml του διαλύματος  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Τότε τα mol του  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $n_1$ , υπολογίζονται ως εξής:  
$$n_1 = 0.85 * x * 1.689 / 98 = 0.014649 * x \text{ mol}$$
- Έστω τώρα  $n_2$  τα mol του υδροξειδίου του ασβεστίου,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  :  
$$n_2 = n_1 * 1.67 = 0.024465 * x \text{ mol}$$
  
$$m_{\text{Ca}} = n_2 * 74.10 = 1.8128 * x \text{ g Ca}(\text{OH})_2$$
- Έστω  $n_3$  τα mol του HAp. Σύμφωνα με το μοριακό του τύπο ισχύει ότι:  
$$n_3 = n_1/3 \text{ ή } n_3 = n_2/5$$
- Επομένως η μάζα του υδροξυαπατίτη είναι:  
$$m_{\text{HAp}} = 0.00489 * x * 502.31 = 2.4578 * x \text{ g}$$
- Με βάση την αναλογία μαζών HAp/βιοπολυμερές = 70/30 μπορεί να υπολογιστεί η μάζα του αντίστοιχου βιοπολυμερούς (εδώ χιτοζάνη) που θα προστεθεί.  
$$m_{\text{chitosan}} = 1.0533 * x \text{ g}$$
- Στη συνέχεια, με βάση τη μοριακή αναλογία  $\text{Ca}^{2+} / \text{L-arginine} = 1 : 1$  καθορίζονται τα mol και η μάζα της L-αργινίνης:  
$$n_{\text{L-arginine}} = n_2$$
  
$$m_{\text{L-arginine}} = 0.024465 * x * 174.2 = 4.2618 * x \text{ g}$$

Ο όγκος του τελικού διαλύματος μπορεί να προσδιοριστεί εάν είναι γνωστή η τελική συγκέντρωση του ορθοφωσφορικού οξέος σε αυτό, και ο αρχικός όγκος του διαλύματος. Θεωρώντας  $y$  την τελική συγκέντρωση του οξέος, ο τελικός όγκος είναι:

$$V_{\text{ολ}} = 14.649 * x / y$$

Κατά τη σύνθεση, ο όγκος του διαλύματος του ορθοφωσφορικού οξέος είναι ίσος με τον αντίστοιχο του αιωρήματος υδροξειδίου του ασβεστίου και διπλάσιος αυτού της L – αργινίνης. Επομένως ισχύει:

$$V_{H_3PO_4} = V_{Ca(OH)_2} = 2 * V_{L-arginine} \text{ και προφανώς } V_{L-arginine} = V_{ολ} / 5$$

Παρακάτω καταγράφονται πλήρως τα αριθμητικά στοιχεία για την περίπτωση του αιωρήματος υδροξυαπατίτη – χιτοζάνης – L-αργινίνης:

Συγκέντρωση ορθοφωσφορικού οξέος, C = 0.06 M και τελικός όγκος,  $V_{ολ} = 146.49 \text{ ml}$

Διάλυμα ορθοφωσφορικού οξέος: **0.6 ml  $H_3PO_4$  + 58 ml  $H_2O$**

Αιώρημα υδροξειδίου του ασβεστίου: **1.0877 g  $Ca(OH)_2$  + 58.6 ml  $H_2O$**

Διάλυμα L-αργινίνης: **2.5259 g L-arginine + 29.3 ml  $H_2O$**

Μάζα χιτοζάνης που προστίθεται στο διάλυμα ορθοφωσφορικού οξέος:  **$m_{chitosan} = 0.632 \text{ g}$**

### ***Διαδικασία παρασκευής αιωρήματος υδροξυαπατίτη***

Αρχικά, για τη σύνθεση του αιωρήματος, παρασκευάζεται το υδατικό διάλυμα του ορθοφωσφορικού οξέος  $H_3PO_4$ , τοποθετώντας σε ποτήρι ζέσεως τους κατάλληλους όγκους απιονισμένου νερού και οξέος. Το διάλυμα παραμένει υπό μαγνητική ανάδευση καθ' όλη τη διάρκεια ζύγισης της επιθυμητής ποσότητας χιτοζάνης. Ακολούθως, το πολυμερές προστίθεται στο διάλυμα και διαλύεται σε αυτό υπό έντονη ανάδευση με χρήση διασπορέα υψηλών ταχυτήτων. Η ανάδευση πραγματοποιείται με συχνότητα 8.000 – 8.500 rpm για διάστημα μισής ώρας, έως ότου δημιουργηθεί ένα διαυγές διάλυμα με ελαφρώς παχύρρευστη μορφή. Καθ' όλη τη διάρκεια της ανάδευσης, το ποτήρι ζέσεως βρίσκεται εμβαπτισμένο σε υδατόλουτρο, ώστε να διατηρηθεί σταθερή η θερμοκρασία του.

Στη συνέχεια, ζυγίζονται οι απαραίτητες ποσότητες υδροξειδίου του ασβεστίου,  $Ca(OH)_2$  και L-αργινίνης και παρασκευάζονται τα αντίστοιχα αιωρήματα – διαλύματα. Το αιώρημα του υδροξειδίου του ασβεστίου, παράγεται με έντονη ανάδευση σε συγκεκριμένη ποσότητα απιονισμένου νερού με χρήση διασπορέα, σε συχνότητα 6.000 rpm. Ταυτόχρονα, πραγματοποιείται η διάλυση της L-αργινίνης στην αντίστοιχη ποσότητα νερού, υπό μαγνητική ανάδευση. Για να εξασφαλιστεί η βιομημητική σύνθεση του άλατος του υδροξυαπατίτη, να προσομοιάζονται δηλαδή οι συνθήκες που επικρατούν εντός του ανθρωπίνου σώματος, το διάλυμα της αργινίνης τοποθετείται εντός υδατόλουτρου ώστε η θερμοκρασία του να διατηρείται σταθερή στους 40 °C και ελέγχεται διαρκώς με χρήση θερμοστοιχείου.

Ακολούθως, το διάλυμα ορθοφωσφορικού οξέος – χιτοζάνης προστίθεται στάγδην ταυτόχρονα με το αιώρημα του υδροξειδίου του ασβεστίου εντός του διαλύματος της L-αργινίνης (στο συγκεκριμένο στάδιο της διαδικασίας, το διάλυμα υδροξειδίου του ασβεστίου, παύει να αναδεύεται με διασπορέα, αλλά διατηρείται υπό μαγνητική ανάδευση). Η προσθήκη πραγματοποιείται στάγδην ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία συσσωματωμάτων εντός του τελικού αιωρήματος. Τέλος, το αιώρημα του υδροξυαπατίτη που αναπτύσσεται, παραμένει υπό ανάδευση για διάστημα μίας ώρας προς βελτίωση της ομοιογένειας.

### 6.1.2. Χημική διασύνδεση (Chemical Cross-linking)

Η μηχανική συμπεριφορά και η σταθερότητα των ικριωμάτων εντός υδατικού περιβάλλοντος, επηρεάζεται αρνητικά από το εκτεταμένο πορώδες δίκτυο που εντοπίζεται στο εσωτερικό τους. Απαραίτητη λοιπόν είναι η βελτίωση των αντοχών τους, ούτως ώστε να μπορέσουν να χρησιμοποιηθούν σαν πιθανά εμφυτεύσιμα υλικά για την αποκατάσταση του κατεστραμμένου φυσικού ιστού.

Ο συνηθέστερος και πιο αποτελεσματικός τρόπος ενίσχυσης των μηχανικών ιδιοτήτων και της αντοχής των παραγόμενων ικριωμάτων είναι η χημική διασύνδεση (cross – linking) των βιομορίων που περιλαμβάνονται στο αιώρημα του υδροξυαπατίτη. Η χημική διασύνδεση περιλαμβάνει την ανάπτυξη ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ των αμινικών ή καρβοξυλικών ομάδων των βιομορίων που χρησιμοποιούνται και των δραστικών ομάδων των μορίων των διασυνδετών.

Στην παρούσα εργασία ως χημικός διασυνδέτης χρησιμοποιήθηκε η γενιπίνη (genipin). Πρόκειται για πρωτεϊνικό διασυνδέτη που δημιουργεί ισχυρούς δεσμούς με τα αμινικά άκρα των βιομορίων που συμμετέχουν στην αντίδραση. Προσδίδει με αυτό τον τρόπο στο τελικό ικρίωμα πιο σταθερή δομή με μεγαλύτερη ελαστικότητα, σκληρότητα και βελτιωμένες ιδιότητες διαβροχής. Η χιτοζάνη περιέχει μία αμινομάδα στο μόριό της, ενώ το μόριο της L-αργινίνης, δύο. Με βάση λοιπόν τον αριθμό των αμινομάδων, είναι δυνατόν να υπολογιστεί η ποσότητα του διασυνδέτη που πρέπει να προστεθεί στο αιώρημα, ώστε να επιτευχθεί η επιτυχής διασύνδεση. Η γενιπίνη μπορεί να προστίθεται κατευθείαν υπό μορφή σκόνης στο αιώρημα υδροξυαπατίτη. Ωστόσο, το τελευταίο θα πρέπει να παραμείνει υπό έντονη μαγνητική ανάδευση για χρονικό διάστημα 24 ωρών, για την πλήρη περάτωση της διασύνδεσης. Η επίτευξη της χημικής διασύνδεσης, στην περίπτωση της γενιπίνης, σηματοδοτείται από το έντονο μπλε χρώμα που αποκτά σταδιακά το αιώρημα, καθώς λαμβάνει χώρα η αντίδραση του διασυνδέτη με τις ομάδες αμίνης των βιομορίων.

Όσον αφορά στην ποσότητα της γενιπίνης που χρησιμοποιήθηκε, επιλέχθηκε με βάση την υπάρχουσα βιβλιογραφία συγκέντρωση 1% επί του συνολικού αριθμού των αμινομάδων των βιομορίων. Παρακάτω παρουσιάζεται αναλυτικά ο υπολογισμός της προστιθέμενης ποσότητας.

$$m_{\text{ολ}} = m_{\text{Chitosan}} + 2 m_{\text{L-arginine}} = 0.316 + 2 * 1.2786 = 2.8732 \text{ g}$$

Με βάση το 1% ποσοστό διασύνδεσης, η απαιτούμενη ποσότητα γενιπίνης για τη συγκεκριμένη μάζα είναι **28.4 mg**.

### 6.1.3. Ρύθμιση ρεολογικών ιδιοτήτων

#### **Αφαίρεση νερού – Φυγοκέντρηση αιωρήματος**

Για την περαιτέρω επεξεργασία του αιωρήματος του υδροξυαπατίτη και τη μελέτη του ως ικρίωμα οστικού ιστού, απαραίτητη είναι η αφαίρεση του μεγαλύτερου μέρους της ποσότητας νερού που περιέχεται σε αυτό. Δεδομένου ότι η παρασκευή των ικριωμάτων θα μελετηθεί με την τεχνική της τριδιάστατης εκτύπωσης, η ποσότητα του νερού που παραμένει στο υλικό χρήζει ιδιαίτερης προσοχής, καθώς επηρεάζει τη ρεολογική του συμπεριφορά και συνεπώς την ποιότητα της εκτύπωσης. Ύστερα από δοκιμές, εφαρμόστηκε πρωτόκολλο φυγοκέντρησης **8.000 rpm , accel = 5 , decel = 5 και διάρκεια 4 min**. Με βάση τις συγκεκριμένες ρυθμίσεις, το αιώρημα απέβαλε κατά μέσο όρο **59,5 ml** νερού σε κάθε

φυγοκέντρηση. Με βάση τον όγκο νερού που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του αιωρήματος, ύστερα από τη φυγοκέντρηση παραμένουν στο εσωτερικό του υλικού **13,5 ml** νερού.

### **Αραίωση υδρογέλης**

Για την περαιτέρω ρύθμιση της ρεολογικής συμπεριφοράς της υβριδικής υδρογέλης και την αποτελεσματική τριδιάστατη εκτύπωσή της, πραγματοποιήθηκε ανάμιξη με διάλυμα ζελατίνης/οξικού οξέος. Η συγκέντρωση του οξικού οξέος διατηρήθηκε χαμηλή (5% v/v) ούτως ώστε να διατηρηθεί η κυτταροσυμβατότητα του υλικού. Πραγματοποιήθηκαν δοκιμές με διαφορετικές περιεκτικότητες ζελατίνης παρασκευάζοντας τις αντίστοιχες υδρογέλες, οι οποίες ελέγχθηκαν ως προς την ρεολογική τους συμπεριφορά. Η τροποποιημένη υδρογέλη αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία 5°C για διάστημα 24 ωρών. Η εξέταση έγινε με χρήση σύριγγας με προσαρτημένη βελόνα εσωτερικής διαμέτρου 0,60 mm. Η υδρογέλη ζελατίνης που παρουσίασε την πιο ικανοποιητική ροή ήταν αυτή με **περιεκτικότητα 6,4% σε ζελατίνη**. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν δοκιμές ανάμιξης του διαλύματος ζελατίνης/οξικού οξέος με την υβριδική υδρογέλη υδροξυαπατίτη-χιτοζάνης- L-αργινίνης που είχε διασυνδεθεί χημικά με γενιπίνη. Ικανοποιητική ρεολογική συμπεριφορά παρουσίασε η υβριδική υδρογέλη στην οποία προστέθηκε διάλυμα ζελατίνης/οξικού οξέος **σε ποσοστό 11% επί του αρχικού όγκου του νερού** σε αυτή. Ο όγκος του περιεχόμενου νερού παρουσίασε μικρές διακυμάνσεις στην τιμή για κάθε πείραμα φυγοκέντρησης, που ωστόσο δεν επηρέασε τη βελτίωση της ρεολογίας.

## **6.2. Ανάπτυξη Ικριωμάτων μέσω τριδιάστατης (3D) εκτύπωσης**

Στην παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκε τριδιάστατη εκτύπωση υδρογελών, οι οποίες μπορούν να αποτελέσουν ικριώματα οστικού ιστού. Ως «μελάνι» για τον εκτυπωτή χρησιμοποιήθηκε η υβριδική υδρογέλη υδροξυαπατίτη – χιτοζάνης, η οποία είχε υποστεί χημική διασύνδεση με γενιπίνη. Οι τριδιάστατες εκτυπώσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του βιοεκτυπωτή (bioprinter) Regemat V1 της εταιρίας Regemat 3D (Γρανάδα, Ισπανία). Στο σημείο αυτό, αξίζει να τονιστεί η διαφορά της τριδιάστατης εκτύπωσης από την βιοεκτύπωση, άρα και των αντίστοιχων διατάξεων. Η βιοεκτύπωση (bioprinting), όπως αναφέρθηκε και στο θεωρητικό μέρος, πρόκειται για μία τεχνική κατασκευής τριδιάστατων δομών που φέρουν εγγενώς κύτταρα, παρακάμπτοντας με αυτό τον τρόπο το στάδιο των κυτταρικών καλλιεργειών. Ειδοποιός διαφορά της τριδιάστατης εκτύπωσης ικριωμάτων από την αντίστοιχη βιοεκτύπωση, είναι πως στη δεύτερη περίπτωση, το «μελάνι» του εκτυπωτή, πέραν των βιοϋλικών, αποτελείται και από κύτταρα συνοδευόμενα από θρεπτικό υλικό.

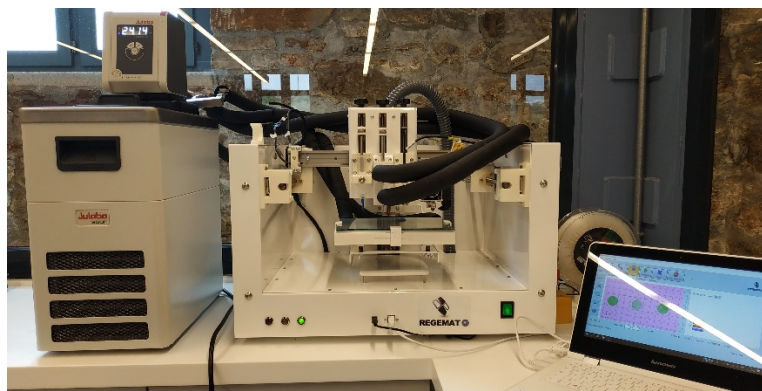
Το «βιομελάνι» (bioink), ανάλογα τις εκάστοτε ερευνητικές εφαρμογές, προορίζεται για την κατασκευή ικριωμάτων, αυτούσιων ιστών ή οργάνων. Εντούτοις, όπως είναι λογικό, ένας βιοεκτυπωτής δύναται να εκτυπώσει «μελάνι» αποτελούμενο αποκλειστικά από βιοϋλικά, χωρίς την απαραίτητη συνύπαρξη με κύτταρα. Τα ικριώματα που κατασκευάστηκαν και μελετήθηκαν δεν έφεραν εξαρχής κύτταρα στη δομή τους. Ωστόσο, στα πλαίσια της μελέτης τους από πλευράς βιοσυμβατότητας, πραγματοποιήθηκαν κυτταρικές καλλιέργειες στις επιφάνειες αυτών. Η μελέτη της εκτυπωτικής συμπεριφοράς του

«μελανιού» της υβριδικής υδρογέλης υδροξυαπατίτη και των ιδιοτήτων των ικρωμάτων μπορεί να αποτελέσει προπομπό για την μελλοντική μελέτη του αντίστοιχου «βιομελανιού».

### 6.2.1. Σύστημα Τριδιάστατης Εκτύπωσης

Το σύστημα τριδιάστατης βιοεκτύπωσης Regemat V1, κατασκευάστηκε από την εταιρία Regemat 3D (Γρανάδα, Ισπανία) και μπορεί να εφαρμόσει (ξεχωριστά ή συνδυαστικά) δύο διαφορετικές τεχνικές για την κατασκευή 3D ικρωμάτων:

- i. Η βασική τεχνική που εφαρμόζεται είναι η εξώθηση διαλυμάτων ή αιωρήματος παρουσία κυττάρων, όπου πρώτη ύλη είναι ως επί το πλείστο υδρογέλες. Η εξώθηση πραγματοποιείται με τη βοήθεια εμβόλου, το οποίο ασκεί μηχανική πίεση στο υλικό, ώστε να εκβάλει από την κεφαλή εκτύπωσης. Ανάλογα την ποσότητα που χρησιμοποιείται, το υλικό τοποθετείται σε σύριγγες διαφορετικής χωρητικότητας (3, 5 ή 10 ml). Αντίστοιχα, ανάλογα τη ρεολογική συμπεριφορά του υλικού, επιλέγεται το κατάλληλο είδος και εσωτερική διάμετρος της κεφαλής εκτύπωσης (ενδεικτικά 0.10 – 1.20 mm). Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως η εν λόγω λειτουργία είναι διττής φύσης, καθώς επιτρέπει και την εξώθηση «μελανιού» απουσία κυττάρων.
- ii. Δευτερευόντως μπορεί να γίνει εναπόθεση υλικού με τη μορφή τήγματος. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, χρησιμοποιείται κάποιο θερμοπλαστικό πολυμερές (π.χ. PLA) υπό μορφή νήματος το οποίο απαιτεί τη χρήση θερμαινόμενης κεφαλής υψηλής θερμοκρασίας (ανάλογα το είδος του πολυμερούς) ώστε να εκβάλει από αυτή. Όπως και στην περίπτωση (i), μπορεί να επιλεγθεί η κατάλληλη εσωτερική διάμετρος της κεφαλής (ενδεικτικά 0.20 – 0.60 mm).



**Σχήμα 19:** Διάταξη εκτυπωτή τριδιάστατης εκτύπωσης (κέντρο), συστήματος ψύξης-θέρμανσης (αριστερά) και λογισμικού χρήσης (δεξιά).

Το βασικά στοιχεία του συστήματος τριδιάστατης εκτύπωσης Regemat V1 συνοψίζονται ως εξής:

1. Κύριος σκελετός της συσκευής επί του οποίου προσαρτώνται τα απαραίτητα εξαρτήματα για την τριδιάστατη εκτύπωση.
2. Βασικός άξονας κίνησης με δυνατότητα μετατόπισης και στις τρεις διαστάσεις του χώρου, επί του οποίου βρίσκονται βηματικοί κινητήρες και οδηγοί.
3. Κεφαλές και πλατφόρμα εκτύπωσης.
4. Συμπληρωματικά στοιχεία που δρουν υποβοηθώντας τη διαδικασία εκτύπωσης:

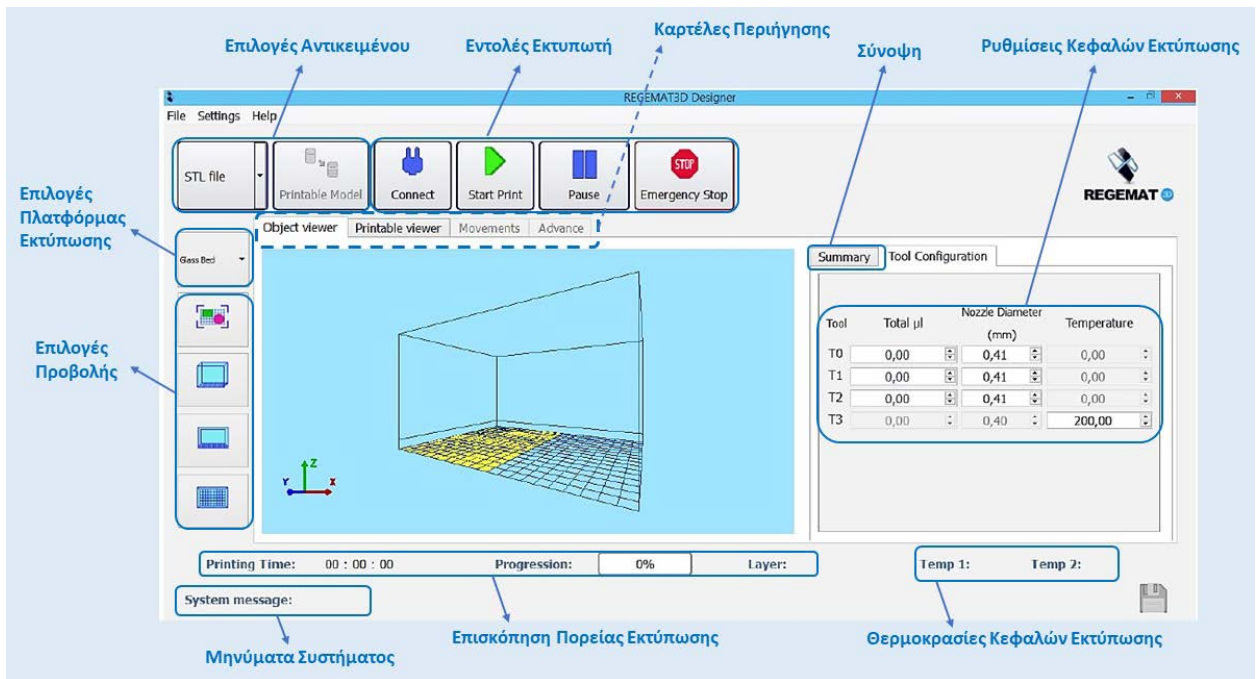
- Μονάδα ελέγχου θερμοκρασίας της κεφαλής και της πλατφόρμας εκτύπωσης με θερμοκρασία λειτουργίας από -25 °C έως 150 °C και ακρίβεια  $\pm 0,03$  °C.
  - Πηγή υπεριώδους ακτινοβολίας (UV Light Lamb).
5. Μονάδα Ελέγχου Κίνησης (Engine Control Unit – ECU), συνδεδεμένη με αισθητήρες και μηχανισμούς κίνησης.
  6. Διεπαφή χρήστη (User Interface) και λογισμικό που είναι υπεύθυνο για την αποστολή πληροφοριών στην Μονάδα Ελέγχου Κίνησης.

### Παρουσίαση λογισμικού και μεθοδολογία 3D εκτύπωσης

Το λογισμικό χρήσης του βιοεκτυπωτή (Regemat3D Designer) επιτρέπει στο χρήστη τη φόρτωση οποιουδήποτε αρχείου τύπου STL και το τοποθετεί αυτόματα εντός του εικονικού όγκου εκτύπωσης (printing volume). Ακολούθως, ο χρήστης έχει τη δυνατότητα να αλλάξει τη θέση του μοντέλου εντός του εικονικού χώρου, να ορίσει/τροποποιήσει τις παραμέτρους εκτύπωσης και εν τέλει να δώσει την εντολή εκτύπωσης.

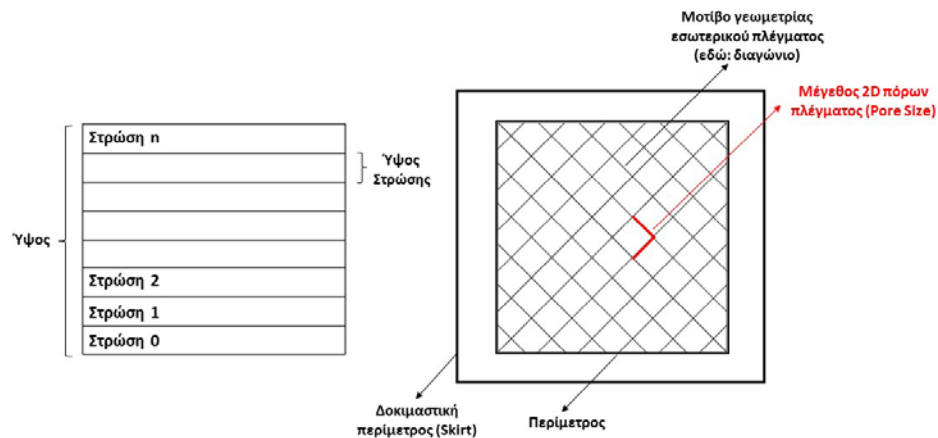
Η διαδικασία προετοιμασίας του 3D μοντέλου παρουσιάζεται αναλυτικά παρακάτω:

- I. **Δημιουργία 3D μοντέλου ικρίώματος:** Το πρώτο βήμα της διαδικασίας της 3D εκτύπωσης, είναι η φόρτωση του αρχείου STL που κωδικοποιεί τα εκάστοτε γεωμετρικά χαρακτηριστικά. Το λογισμικό επιτρέπει τη χρήση προσχεδιασμένων γεωμετριών (ψηφιακή βιβλιοθήκη) ή τη φόρτωση αρχείου STL κατασκευασμένο από κάποιο λογισμικό τύπου CAD (Computer Aided Design). Το 3D μοντέλο παρουσιάζεται εντός ενός εικονικού όγκου εκτύπωσης, ο οποίος αντιστοιχεί κατά αναλογία στον όγκο της διάταξης του εκτυπωτή, όπου μπορούν να κινηθούν οι κεφαλές εκτύπωσης, κατασκευάζοντας το εκάστοτε 3D αντικείμενο. Όταν το τελευταίο φορτωθεί στον εικονικό χώρο του λογισμικού, ο χρήστης δύναται να αλληλεπιδράσει με αυτό, μετακινώντας το στην επιθυμητή θέση ή/και τροποποιώντας τα χαρακτηριστικά του. Εξάλλου μπορεί να προσθέσει επιπλέον 3D αντικείμενα και να τα αναδιατάξει στο χώρο.
- II. **Διαμόρφωση χαρακτηριστικών αντικειμένου:** Όταν το 3D μοντέλο τοποθετηθεί στην επιθυμητή θέση, ο χρήστης μπορεί να αλληλεπιδράσει με αυτό, διαμορφώνοντας τα βασικά του χαρακτηριστικά (configuration). Η διαμόρφωση (Σχήμα 22) περιλαμβάνει αρχικά, ρυθμίσεις σχετικά με την κατασκευή του ικρίωματος (βλ. 1. *Scaffold*). Δίνεται η δυνατότητα μεταβολής των τιμών των γεωμετρικών του χαρακτηριστικών (πεδίο: *Size*) για δεδομένο σχήμα, καθώς και του είδους και μεγέθους του εσωτερικού πλέγματος και των διάκενων του (πεδία: *Infill Pattern*, *Pore Size*). Επιπλέον ο χρήστης μπορεί να επιλέξει το ύψος της εναποτιθέμενης στρώσης υλικού (πεδίο: *Layer Height*), καθώς και τον αριθμό των περιμέτρων κάθε στρώσης (πεδίο: *Perimeters*).



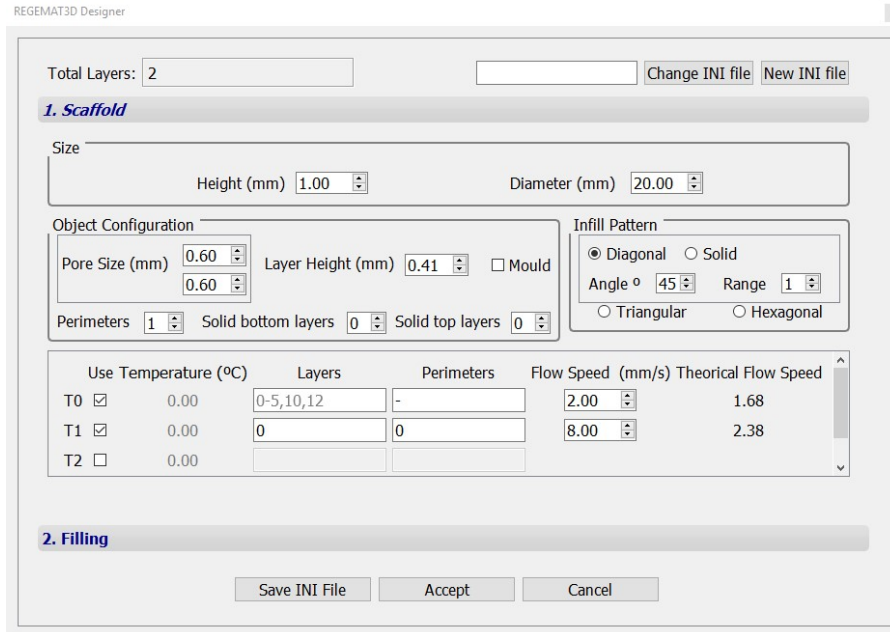
Σχήμα 20: Παρουσίαση κύριου παραθύρου του λογισμικού REGEMAT3D Designer.

Στη συνέχεια, ο χρήστης επιλέγει την κεφαλή (ή τις κεφαλές) εκτύπωσης που θα χρησιμοποιηθεί για την 3D εκτύπωση του κριώματος (πεδίο: *Use*), καθώς και την ταχύτητα ροής του υλικού που θα εφαρμόζεται σε αυτή (πεδίο: *Flow Speed*). Καλείται επίσης να επιβεβαιώσει τον αριθμό των στρώσεων (πεδίο: *Layers*) και των περιμέτρων κάθε στρώσης (πεδίο: *Perimeters*). Το λογισμικό παρέχει τη δυνατότητα θεωρητικού υπολογισμού της ταχύτητας ροής (*Theoretical Flow Speed*), την οποία και μπορεί να συμβουλευτεί ο χρήστης. Η θεωρητική τιμή υπολογίζεται με βάση το επιθυμητό ύψος στρώσης και την εσωτερική διάμετρο του ακροφυσίου (nozzle diameter), την οποία έχει νωρίτερα εισάγει ως πληροφορία ο χρήστης στο λογισμικό.



Σχήμα 21: Πλάγια όψη και κάτοψη 3D αντικειμένου.

Όταν ολοκληρωθεί η εισαγωγή των κατασκευαστικών πληροφοριών, ο χρήστης συνεχίζει στον προσδιορισμό των χαρακτηριστικών πλήρωσης πόρων (βλ. 2. *Filling*). Δεδομένου ότι η συγκεκριμένη επιλογή δεν αποτέλεσε αντικείμενο της παρούσας εργασίας, οι δυνατότητες της, προς το παρόν δεν έχουν διερευνηθεί. Η επισκόπηση της επομένως, παραλείπεται.



**Σχήμα 22:** Παράθυρο τροποποίησης χαρακτηριστικών 3D αντικειμένου.

Τέλος, ο χρήστης μπορεί να αποθηκεύσει τα χαρακτηριστικά του ικριώματος σε μορφή αρχείου για μελλοντική χρήση (*Save INI File*). Όλες οι προαναφερθείσες επιλογές χαρακτηριστικών παρατίθενται συνοπτικά στον Πίνακα 1.

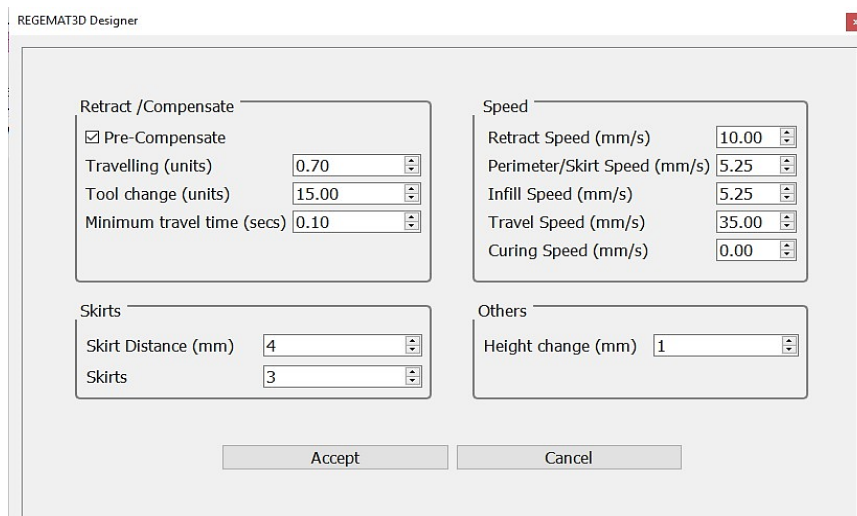
**Πίνακας 1:** Επεξήγηση χαρακτηριστικών 3D αντικειμένου

Total Layers	Αριθμός στρώσεων που υπολογίζεται αυτόματα βάσει του ύψους και του ύψους στρώσης
Height, Diameter (mm)	Ύψος και διάμετρος ικριώματος (χρησιμοποιήθηκαν κυλινδρικά μοντέλα)
Pore Size (mm)	Μέγεθος πόρων δισδιάστατου εσωτερικού πλέγματος
Layer Height (mm)	Ύψος στρώσης
Perimeters	Αριθμός περιμέτρων κάθε στρώσης
Solid bottom/top layers	Αριθμός συμπαγών στρώσεων βάσης και κορυφής
Diagonal/Solid/Triangular/Hexagonal	Γεωμετρία σχεδιασμού δισδιάστατου εσωτερικού πλέγματος
Angle/Range	Γωνία/Εύρος δισδιάστατου εσωτερικού πλέγματος
Layers*	Αριθμός στρώσεων*



Perimeters**	Αριθμός περιμέτρων**
Flow Speed	Ταχύτητα Ροής
Theoretical Flow Speed	Θεωρητική Ταχύτητα Ροής

III. **Διαμόρφωση παραμέτρων εκτύπωσης:** Πέραν των χαρακτηριστικών που προσδίδει ο χρήστης στο ικρίωμα αλληλεπιδρώντας μαζί του, υπάρχει η δυνατότητα ρύθμισης επιπρόσθετων χαρακτηριστικών της 3D εκτύπωσης από το πεδίο *Settings* → *Extra Settings* του κύριου παραθύρου του λογισμικού (Σχήμα 23). Οι επιπλέον παράμετροι εκτύπωσης στους οποίους δίνει πρόσβαση η εν λόγω επιλογή, παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.



**Σχήμα 23:** Παράθυρο παραμέτρων 3D εκτύπωσης.

Στο σημείο αυτό, θα πρέπει να αναφερθεί μια ιδιαιτερότητα του λογισμικού Regemat3D Designer. Κατά την εισαγωγή των προδιαγραφών του ικρίωματος από τον χρήστη, θα πρέπει να δοθεί προσοχή στα πεδία *Layers\** και *Perimeters\*\** (βλ. Πίνακα 1). Ειδικότερα, ο χρήστης με βάση τα πεδία *Total Layers* (συμπληρώνεται αυτόματα) και *Perimeters* (συμπληρώνεται από τον χρήστη), θα πρέπει να εισάγει το πλήθος υπό μορφή εύρους, με αριστερό άκρο πάντα την τιμή «0» και δεξί, πάντα μία μονάδα μικρότερη από την κανονική τιμή (π.χ. για 5 στρώσεις (*Layers*) θα πρέπει να εισάγει 0-4). Στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται παραπάνω από μία κεφαλές εκτύπωσης, οι στρώσεις που εναποθέτει κάθε μία από αυτές, διαχωρίζονται με κόμματα (βλ. Σχήμα 21)

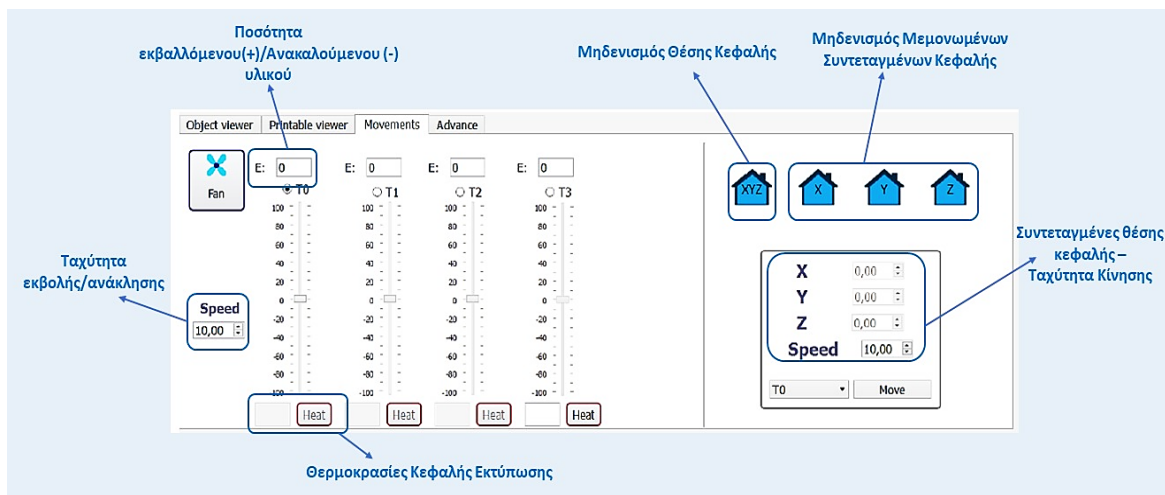
**Πίνακας 2:** Επεξήγηση παραμέτρων 3D εκτύπωσης.

Retract Speed (mm/s)	Ταχύτητα απομάκρυνσης κεφαλής όταν ολοκληρωθεί η εναπόθεσή της εκάστοτε στρώσης
Perimeter/Skirt Speed (mm/s)	Ταχύτητα κίνησης κεφαλής κατά την εναπόθεση της περιμέτρου κάθε

	στρώσης (perimeter) και της δοκιμαστικής περιμέτρου (skirt)
Infill Speed (mm/s)	Ταχύτητα κίνησης κεφαλής κατά την εναπόθεση του εσωτερικού πλέγματος του 3D αντικειμένου
Travel Speed (mm/s)	Ταχύτητα μετακίνησης κεφαλής όταν δεν εναποθέτει υλικό
Curing Speed (mm/s)	Ταχύτητα μετακίνησης της λυχνίας UV πάνω από την εκάστοτε στρώση του 3D αντικειμένου
Skirt Distance (mm)	Απόσταση δοκιμαστικής περιμέτρου από το αντικείμενο
Skirts	Αριθμός δοκιμαστικών περιμέτρων
Height change (mm)	Μετατόπιση πλατφόρμας εκτύπωσης μετά από την ολοκλήρωση κάθε στρώσης

**IV. Βαθμονόμηση Κεφαλής & Έλεγχος Υλικού:** Πριν την έναρξη της 3D εκτύπωσης, ο χρήστης οφείλει να ελέγξει ενδελεχώς την απόσταση της κεφαλής εκτύπωσης από την επιφάνεια εκτύπωσης (πλατφόρμα εκτύπωσης, τρυβλίο petri), όπως και τη ρεολογική συμπεριφορά του υλικού. Αμφότερα μπορούν να συμβούν μέσω της καρτέλας «Κινήσεις» (Movements) που βρίσκεται στο κύριο παράθυρο του λογισμικού. Η απόσταση κεφαλής-επιφάνειας πρέπει να είναι η ελάχιστη δυνατή ώστε το υλικό να εναποτεθεί χωρίς να αποκολλάται και παράλληλα να μην αλλοιώνεται από την κίνηση της κεφαλής. Στη συνέχεια, ελέγχεται η ρεολογική συμπεριφορά του υλικού για δεδομένη ταχύτητα εκβολής. Ο χρήστης μπορεί να επιλέξει την ποσότητα του υλικού που θα εκβάλει (ή θα ανακαλέσει) από το ακροφύσιο της κεφαλής και την ταχύτητα που αυτό θα συμβεί. Στην περίπτωση που γίνεται χρήση της κεφαλής FDM (εναπόθεση τήγματος πολυμερούς), μπορεί να επιλεγθεί η θερμοκρασία (°C) που θα αναπτυχθεί στην εν λόγω κεφαλή, ώστε να τηχθεί το εκάστοτε πολυμερές.

Εξάλλου, παρέχονται επιπλέον δυνατότητες αναφορικά με τις κινήσεις της κάθε κεφαλής εκτύπωσης. Η τελευταία, δύναται να μετατοπιστεί εντός του χώρου που της επιτρέπει ο όγκος εκτύπωσης εισάγοντας τις επιθυμητές συντεταγμένες θέσης. Όλες οι συντεταγμένες ή κάθε μία ξεχωριστά μπορούν να μηδενιστούν με χρήση συγκεκριμένων εντολών (homing).



Σχήμα 24: Καρτέλα κινήσεων (Movements Tab) 3D εκτυπωτή.

- V. **Δημιουργία G-κώδικα & 3D Εκτύπωση:** Πριν την έναρξη της 3D εκτύπωσης είναι απαραίτητη η μετατροπή όλων των παραμέτρων της καθώς και των χαρακτηριστικών του 3D αντικειμένου, σε G-κώδικα. Ο G-κώδικας αποτελεί τη γλώσσα προγραμματισμού που χρησιμοποιείται για την καθοδήγηση των κινητών τμημάτων των συσκευών 3D εκτύπωσης. Η μετατροπή γίνεται μέσω της εντολής «Printable Model» που βρίσκεται στο κύριο παράθυρο του λογισμικού. Στη συνέχεια μπορεί να ξεκινήσει η εκτύπωση (εντολή: Start Print). Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας, ο χρήστης έχει τη δυνατότητα να παύσει προσωρινά (εντολή: Pause) ή να διακόψει οριστικά την εκτύπωση (εντολή: Stop). Τέλος, το λογισμικό ενημερώνει σε πραγματικό χρόνο για την πορεία της εκτύπωσης, τη στρώση που εναποτίθεται, καθώς και τη θερμοκρασία της κεφαλής που χρησιμοποιείται. Μετά το πέρας της 3D εκτύπωσης, η κεφαλή επιστρέφει αυτόματα στη μηδενική θέση (homing).

### 6.2.2 Βελτιστοποίηση Παραμέτρων Εκτύπωσης

Βασικό πλεονέκτημα της 3D εκτύπωσης έναντι των συμβατικών μεθόδων παραγωγής ικριωμάτων, είναι η δυνατότητα κατασκευής ενός 3D ικριώματος με προσχεδιασμένες γεωμετρικές προδιαγραφές και μικροαρχιτεκτονική. Οι εν λόγω σχεδιαστικές προδιαγραφές μπορεί να είναι ιδιαίτερα απαιτητικές, αναλόγως τη φύση του «μελανιού» που χρησιμοποιείται. Στην παρούσα εργασία, το «μελάνι» αποτέλεσε η υβριδική υδρογέλη υδροξυαπατίτη-χιτοζάνης-L-αργινίνης, χημικά διασυνδεδεμένη με γενιπίνη. Η ρεολογία της υδρογέλης τροποποιήθηκε με χρήση του διαλύματος οξικού οξέος-ζελατίνης, ώστε να καταστεί δυνατή η εκβολή της από το ακροφύσιο του εκτυπωτή. Ωστόσο, η βελτίωση της ρεολογίας του «μελανιού» δεν επαρκεί ώστε να αποδοθεί αποτελεσματικά η 3D δομή του ικριώματος, αλλά αποτελεί το πρώτο καθοριστικό βήμα προς την επίτευξη αυτού του στόχου. Στην παράγραφο αυτή θα παρουσιαστούν όλες οι παράμετροι που ρυθμίζονται μέσω της διάταξης του 3D εκτυπωτή και επηρεάζουν την ποιότητα κατασκευής του 3D ικριώματος.

## Ταχύτητες Κεφαλής Εκτύπωσης

Ανάλογα το εκάστοτε σύστημα 3D εκτύπωσης, υπάρχουν διάφορα είδη ταχυτήτων που επηρεάζουν την κατασκευή του αντικειμένου. Το σύστημα του Regemat V1 δίνει τη δυνατότητα τροποποίησης 6 διαφορετικών ειδών ταχυτήτων. Στο σημείο αυτό, και για την ορθή κατανόηση της σημασίας κάθε ταχύτητας, θα πρέπει να γίνει αναφορά στο 3D μοντέλο του ικριώματος. Το μοντέλο (στην περίπτωση μας κυλινδρικού σχήματος) χωρίζεται σε στρώσεις (layers) και κατασκευάζεται με τη διαδοχική εναπόθεση κάθε στρώσης. Κάθε στρώση που κατασκευάζεται χωρίζεται σε δύο περιοχές: (α) την περίμετρο (perimeter), δηλαδή τα «τοιχώματα» της κατασκευής και (β) το εσωτερικό (infill), το οποίο μπορεί είτε να καλυφθεί εξολοκλήρου από υλικό, είτε επιλεκτικά υπό τη μορφή πλέγματος συγκεκριμένης γεωμετρίας. Η δεύτερη επιλογή ήταν και αυτή που επιλέχθηκε για την κατασκευή όλων των ικριωμάτων, τόσο για να ελεγχθεί η ποιότητα εκτύπωσης, όσο και για λόγους λειτουργικότητας του ικριώματος. Ακολούθως επεξηγούνται συνοπτικά οι ταχύτητες εκτύπωσης.

- Ταχύτητα Ροής Υλικού (Flow Speed): Είναι η βασική ταχύτητα εκτύπωσης και αποτελεί αναπόσπαστο χαρακτηριστικό όλων των διατάξεων 3D εκτύπωσης. Πρόκειται για την ταχύτητα με την οποία το υλικό εξέρχεται από το ακροφύσιο της κεφαλής και παραμένει σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια της 3D εκτύπωσης.
- Ταχύτητα Κατασκευής Περιμέτρου/Δοκιμαστικής Περιμέτρου (Perimeter/Skirt Speed): Είναι η ταχύτητα κίνησης της κεφαλής εκτύπωσης κατά τη διάρκεια κατασκευής της περιμέτρου κάθε στρώσης και της δοκιμαστικής περιμέτρου που προηγείται της κύριας εκτύπωσης. Η δοκιμαστική περίμετρος (skirt) κατασκευάζεται ώστε να εξομαλυνθεί η ροή του υλικού και να αποκτήσει την απαραίτητη συνέχεια και ομοιογένεια για την επακόλουθη κατασκευή του 3D ικριώματος.
- Ταχύτητα Κατασκευής Εσωτερικού Πλέγματος (Infill Speed): Αντίστοιχα με προηγουμένως, είναι η ταχύτητα κίνησης της κεφαλής κατά τη διάρκεια εναπόθεσης του υλικού για την κατασκευή του εσωτερικού πλέγματος του ικριώματος.
- Ταχύτητα Μετακίνησης (Travel Speed): Είναι η ταχύτητα που κινείται η κεφαλή όταν δεν πραγματοποιείται εκβολή υλικού. Η ταχύτητα αυτή χαρακτηρίζει την κεφαλή πριν και μετά την 3D εκτύπωση, αλλά και κατά την διάρκεια αυτής. Ειδικότερα, στα χρονικά διαστήματα μεταξύ της κατασκευής κάθε στρώσης του ικριώματος, η κεφαλή μετατοπίζεται στην κατάλληλη θέση με τη συγκεκριμένη ταχύτητα.
- Ταχύτητα Ανάκλισης (Retract Speed): Είναι η ταχύτητα με την οποία η κεφαλή απομακρύνεται από την περιοχή κάθε στρώσης (περίμετρος ή εσωτερικό πλέγμα) όταν ολοκληρωθεί η κατασκευή του.
- Ταχύτητα Σκλήρυνσης (Curing Speed): Όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, ανάλογα το είδος «μελανιού», ο 3D εκτυπωτής παρέχει τη δυνατότητα ακτινοβολίας κάθε στρώσης υλικού με ακτινοβολία UV προς ενίσχυση της δομικής σταθερότητας του τελικού αντικειμένου. Η λυχνία UV βρίσκεται προσαρτημένη στο κινητό τμήμα του εκτυπωτή, σε θέση αντίστοιχη των κεφαλών εκτύπωσης. Η εν λόγω ταχύτητα αντιστοιχεί στην μετακίνηση της λυχνίας πάνω από κάθε στρώση.

### **Εξοπλισμός Κεφαλής Εκτύπωσης**

Ο 3D εκτυπωτής διαθέτει δύο ειδών κεφαλές εκτύπωσης: (α) διαλύματος/αιωρήματος και (β) πολυμερικού τήγματος υπό μορφή νήματος. Για την κατασκευή των 3D ικριωμάτων χρησιμοποιήθηκε η κεφαλή διαλύματος/αιωρήματος. Πρόκειται ουσιαστικά για μία σύριγγα (χωρητικότητας 3, 5, ή 10 ml) που εξωθεί το υλικό από ένα ακροφύσιο (nozzle tip) με τη βοήθεια ενός εμβόλου (piston). Ανάλογα τα χαρακτηριστικά του υλικού, επιλέγεται και το κατάλληλο ακροφύσιο από πλευράς γεωμετρίας και εσωτερικής διαμέτρου. Συγκεκριμένα, υπάρχει η δυνατότητα χρήσης ακροφυσίου τύπου κώνου (tapered tip) ή βελόνας (needle tip). Αντίστοιχα, υπάρχει πληθώρα επιλογών και από πλευράς εμβόλων ανάλογα το υλικό. Αμφότερες οι δύο κατηγορίες εξαρτημάτων, όπως και οι σύριγγες παρέχονται από την εταιρία Nordson (Οχάιο, ΗΠΑ).

### **Θερμοκρασία Εκτύπωσης**

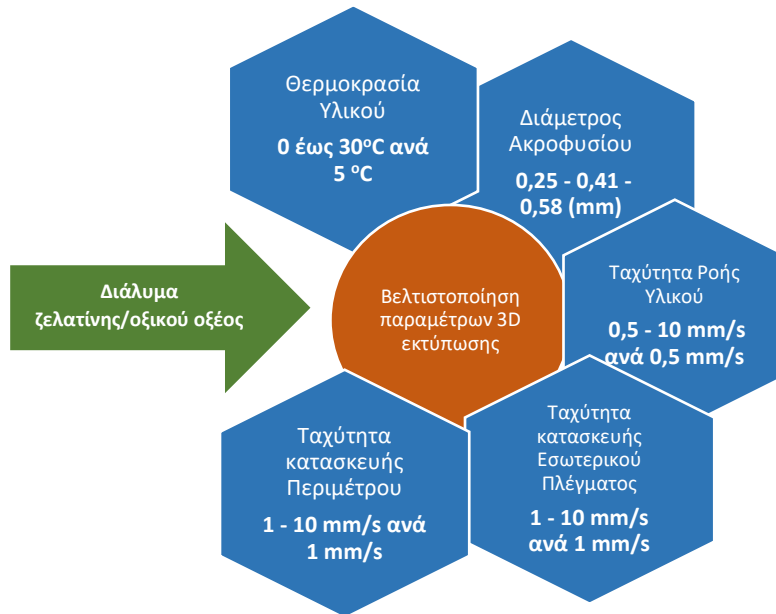
Το σύστημα του 3D εκτυπωτή, πέραν της διάταξης εκτύπωσης, είναι εξοπλισμένο και με σύστημα ελέγχου θερμοκρασίας CORIO CD-300F Refrigerated/Heating Circulator της εταιρίας Julabo (Σίλμπαχ, Γερμανία). Το σύστημα επιτρέπει την εφαρμογή συγκεκριμένης θερμοκρασίας τόσο στη σύριγγα που περιέχει το υλικό, όσο και στην πλατφόρμα επί της οποίας αυτό εναποτίθεται. Ειδικότερα, ο χρήστης μπορεί να επιλέξει αν η ψύξη/θέρμανση θα γίνει μεμονωμένα ή ταυτόχρονα στα δύο προαναφερθέντα εξαρτήματα. Η εφαρμογή συγκεκριμένης θερμοκρασίας στο υλικό ή/και στην πλατφόρμα εκτύπωσης, δύναται να βελτιώσει την ποιότητα εκτύπωσης, τόσο ως προς τη ρεολογία του υλικού, όσο και ως προς τη γεωμετρική ακρίβεια του 3D ικριώματος.

### **6.2.3. Τριδιάστατη Εκτύπωση Ικριωμάτων**

Για την 3D εκτύπωση του ικριώματος, είναι καταρχάς απαραίτητο να σχεδιαστεί το επιθυμητό 3D μοντέλο του και στη συνέχεια να τροποποιηθεί κατά βούληση. Επιλέχθηκε η χρήση προσχεδιασμένου μοντέλου κυλινδρικού σχήματος από την βιβλιοθήκη του λογισμικού, και στη συνέχεια διαμορφώθηκαν τα χαρακτηριστικά του. Όσον αφορά στα γεωμετρικά του χαρακτηριστικά, η διάμετρος του ορίστηκε 15 mm και το ύψος του 1 ή 2 mm ανάλογα τις ανάγκες του ικριώματος. Αμφότερα διατηρήθηκαν σταθερά καθ' όλη τη διάρκεια των 3D εκτυπώσεων. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, το 3D μοντέλο περιέχει εσωτερικό πλέγμα (infill) το γεωμετρικό μοτίβο του οποίου επιλέχθηκε να είναι διαγώνιας μορφής. Όσον αφορά στο μέγεθος των 2D πόρων του μοτίβου, μεταβλήθηκαν ανάλογα τις ανάγκες της κάθε εκτύπωσης όπως θα εξηγηθεί στη συνέχεια. Για την ορθότητα της διαδικασίας, το ύψος στρώσης (layer height) επιλέχθηκε να είναι ακέραιος διαιρέτης του ύψους του ικριώματος. Επιπλέον, κάθε 3D εκτύπωση συνοδευόταν από την εναπόθεση δύο δοκιμαστικών περιμέτρων (skirt) του αντικειμένου, με στόχο την εξομάλυνση της ροής του υλικού.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η εκτυπωτική συμπεριφορά της υβριδικής υδρογέλης για διάφορες τιμές ταχυτήτων εκτύπωσης, διαμέτρων ακροφυσίου και θερμοκρασίας με στόχο να δημιουργηθεί το καλύτερο δυνατό πρωτόκολλο 3D εκτύπωσης. Εξετάστηκαν οι **ταχύτητες: (α) ροής υλικού, (β) κατασκευής περιμέτρου/δοκιμαστικής περιμέτρου και (γ) κατασκευής εσωτερικού πλέγματος**. Αντίθετα, οι ταχύτητες μετακίνησης και ανάκλησης κεφαλής παρέμειναν σταθερές και ίσες με 35.00 mm/s και 10.00 mm/s αντίστοιχα. Χρησιμοποιήθηκε επίσης **ακροφύσιο κωνικού τύπου**, ώστε η ροή του

υλικού στο εσωτερικό του να είναι όσο το δυνατό πιο ομαλή και να αποφευχθούν φαινόμενα φραγής της εξόδου ή διόγκωσης του υλικού κατά την εκβολή του. Πραγματοποιήθηκαν 3D εκτυπώσεις με χρήση ακροφυσίων **εσωτερικών διαμέτρων 0,58, 0,41 και 0,25 mm**.



**Σχήμα 25:** Παρουσίαση παραμέτρων 3D εκτύπωσης που εξετάστηκαν κατόπιν τροποποίησης της ρεολογίας της υβριδικής υδρογέλης.

Για πρακτικούς λόγους, όλες οι 3D εκτυπώσεις πραγματοποιήθηκαν εντός τρυβλίου petri, ώστε να μεταφερθούν στη συνέχεια στο μηχάνημα λυοφιλίωσης (προς αποβολή των περιεχόμενων διαλυτών και δημιουργία μικροπορώδους δομής). Το γεγονός αυτό, κατέστησε ασύμφορη την εφαρμογή θερμοκρασίας στην πλατφόρμα εκτύπωσης, με αποτέλεσμα όλα τα ικρίσματα να κατασκευαστούν σε θερμοκρασία δωματίου (~25 °C). Ωστόσο, στα πλαίσια περαιτέρω βελτίωσης της ρεολογίας της υδρογέλης, εφαρμόστηκε θερμοκρασία στη σύριγγα στην οποία περιεχόταν. Δεδομένου ότι η υδρογέλη περιείχε φυσικά βιοϋλικά, η θερμοκρασία δεν ξεπέρασε την φυσιολογική του οργανισμού (~37 °C). Εξάλλου ελήφθη υπόψη και η μετάβαση λύματος-πηκτής της ζελατίνης που αναμίχθηκε με την αρχική υδρογέλη προς βελτίωση της ρεολογίας της.

## 7. Χαρακτηρισμός Δομής και Μηχανικών Ιδιοτήτων

### 7.1. Υπολογιστική Μικροτομογραφία Ακτίνων-Χ (X-ray computed microtomography)

Με τον όρο «τομογραφία» εννοείται η απεικόνιση ενός αντικειμένου από εγκάρσιες τομές (slices) με δεδομένα που έχουν προκύψει είτε από μετάδοση είτε από ανάκλαση. Συνήθης τρόπος συλλογής των δεδομένων είναι η ακτινοβολήση του αντικειμένου κατά μήκος διαφορετικών κατευθύνσεων. Με αυτόν τον τρόπο, καθίσταται δυνατή η εσωτερική αναπαράσταση (ανακατασκευή) της μορφολογίας του αντικειμένου χωρίς να είναι αναγκαίος ο φυσικός τεμαχισμός του. Η ανακατασκευή επιτυγχάνεται με τη σύνθεση πολλαπλών προβολών εγκάρσιων τομών του ίδιου αντικειμένου. Η Υπολογιστική Τομογραφία (Computed Tomography, CT) είναι ένα είδος μη καταστρεπτικής μεθόδου απεικόνισης που χρησιμοποιεί ακτίνες-Χ για την εσωτερική αναπαράσταση αντικειμένων. Η τεχνική έχει επικρατήσει ως απαραίτητη απεικονιστική μέθοδος στην κλινική πράξη, καθώς παρέχει εικόνες υψηλότερης αντίθεσης σε σχέση με τη συμβατική ακτινογραφία στην οποία οι διάφορες δομές επικαλύπτονται.

Η Υπολογιστική Μικροτομογραφία (Computed Microtomography, m-CT) αποτελεί παραλλαγή της κλασσικής μεθόδου, αλλά στη μικροκλίμακα. Οι σημαντικές τεχνικές διαφορές ενός μικροτομογράφου σε σχέση με έναν υπολογιστικό τομογράφο είναι δύο και αποτελούν τον λόγο για τον οποίο επιτυγχάνεται καλύτερη ποιότητα και ανάλυση στις προβολικές εικόνες του μικροτομογράφου.

- Αυξημένη ανάλυση σε επίπεδο pixel, της τάξης των 5 μm ή και μικρότερη, κυρίως λόγω του μικρού μεγέθους εστίασης της πηγής (5-10 μm). Οι κλινικοί τομογράφοι διαθέτουν τυπικά ανάλυση περίπου 0,5 mm λόγω του μεγαλύτερου μεγέθους εστίασης (μερικά mm).
- Αποφυγή μηχανικών δονήσεων που προκαλούνται από την περιστροφή του ζεύγους πηγή ακτίνων Χ – ανιχνευτή λόγω βάρους και όγκου. Στον υπολογιστικό μικροτομογράφο το ζεύγος παραμένει ακίνητο και το δείγμα περιστρέφεται.

#### Πειραματική διάταξη Υπολογιστικής Μικροτομογραφίας Ακτίνων-Χ

Ο υπολογιστικός τομογράφος και μικροτομογράφος, αντίθετα με την απλή ακτινογραφία όπου διοχετεύει μία δέσμη ακτίνων-Χ διαμέσου του υπό εξέταση αντικειμένου, εκπέμπουν ταυτόχρονα διάφορες δέσμες ακτίνων-Χ από διαφορετικές γωνίες του επιμήκη άξονα το δείγματος, έτσι ώστε να ακτινοβολείται ένα νοητό επίπεδο («φέτα») του υλικού. Οι δέσμες των ακτίνων, μετά τη διόδό τους διαμέσου του αντικειμένου, ανιχνεύονται και στη συνέχεια υπολογίζεται η έντασή του, δηλαδή ο βαθμός απορρόφησης τους. Με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή, υπολογίζεται η σχετική πυκνότητα των υλικών που εξετάστηκαν. Κάθε μέτρηση που πραγματοποιείται είναι στην ουσία το αποτέλεσμα μιας διαδρομής κατά μήκος του αντικειμένου. Τα επεξεργασμένα δεδομένα εκτίθενται υπό τη μορφή δισδιάστατης (2D) εικόνας επί της οθόνης.

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, κατά την εξέταση ενός αντικειμένου στον κλινικό τομογράφο το ζεύγος πηγή-ανιχνευτής περιφέρονται γύρω από αυτό, ενώ στην περίπτωση του μικροτομογράφου, το ζεύγος παραμένει σταθερό και το αντικείμενο περιστρέφεται. Η εσωτερική μορφολογία των τριδιάστατα εκτυπωμένων ικριωμάτων μελετήθηκε με τη συσκευή SkyScan 1272 της εταιρίας Bruker.

## 7.2 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM)

Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης χρησιμοποιείται ευρέως στη μελέτη της μικροδομής των υλικών. Το προς εξέταση δείγμα τοποθετείται σε θάλαμο κενού και η επιφάνεια του σαρώνεται από δέσμη ηλεκτρονίων. Η τελευταία παράγεται από θερμιοική εκπομπή ενός νήματος βολφραμίου και επιταχύνεται από ένα ηλεκτρικό πεδίο τάσης 5-30 kV. Η προσπίπτουσα δέσμη δύναται να εισχωρήσει σε βάθος της τάξης του 1 μm και προκαλεί παράλληλα την εκπομπή νέων ηλεκτρονίων (δευτερογενή και οπισθοσκεδαζόμενα) και ακτίνων-Χ από το δείγμα. Η ένταση των εκπεμπόμενων ηλεκτρονίων επηρεάζεται από τα χαρακτηριστικά της επιφάνειας.

Τα δευτερογενή ηλεκτρόνια διεγείρονται από την επιφάνεια του δείγματος και έχουν χαρακτηριστικό μήκος κύματος. Συλλέγονται από τον αντίστοιχο ανιχνευτή και δίνουν τη δυνατότητα σχηματισμού εικόνων που παρέχουν πληροφορίες για την τοπογραφία του εκάστοτε δείγματος. Τα οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια προέρχονται από το βάθος του δείγματος με αποτέλεσμα να απορροφώνται από τη μάζα του επειδή είναι χαμηλής ενέργειας. Συλλέγονται από διαφορετικό ανιχνευτή που τοποθετείται πλησίον της επιφάνειας του δείγματος. Προσφέρουν πληροφορία σχετικά με τον μέσο ατομικό αριθμό της περιοχής από την οποία προέρχονται. Οι εικόνες που παράγονται από τα οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια παρουσιάζουν αντίθεση που οφείλεται στον μέσο ατομικό αριθμό. Ειδικότερα, όσο μικρότερος ο μέσος ατομικός αριθμός, τόσο πιο σκουρόχρωμη είναι η αντίθεση, ενώ σε αντίθετη περίπτωση η αντίθεση είναι ανοιχτόχρωμη. Επιπλέον, με την εφαρμογή συστήματος ανίχνευσης της διασποράς των παραγόμενων ακτίνων-Χ, μπορεί να γίνει ημιοσοτική στοιχειακή ανάλυση του υλικού.

### Πειραματική διάταξη Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Σάρωσης

Τα βασικά τμήματα που αποτελούν το μικροσκόπιο είναι το σύστημα παραγωγής και κατεύθυνσης της δέσμης ηλεκτρονίων, το σύστημα ανίχνευσης και το σύστημα κενού.

- Σύστημα παραγωγής και κατεύθυνσης της δέσμης ηλεκτρονίων: Τα ηλεκτρόνια παράγονται (συνήθως) από νήμα βολφραμίου που λειτουργεί ως κάθοδος. Το νήμα διαρρέεται από ρεύμα, η ένταση του οποίου αυξάνεται, προκαλώντας την εκπομπή ηλεκτρονίων που κατευθύνονται προς την άνοδο όπου εφαρμόζεται δυναμικό 5-30 kV. Στη συνέχεια επιταχύνονται και διέρχονται από ηλεκτρομαγνητικό φακό συμπύκνωσης (condenser lens) που τα μετατρέπει σε δέσμη.
- Σύστημα ανίχνευσης: Περιλαμβάνει τους διάφορους ανιχνευτές που καταγράφουν τις αλληλεπιδράσεις δέσμης – δείγματος και τις μετατρέπουν σε εικόνα. Στις διατάξεις SEM χρησιμοποιούνται συνήθως ανιχνευτές δευτερογενών ηλεκτρονίων, ευρέως πεδίου, ανιχνευτής διόδου στερεάς φάσης για τα οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια, καθώς και ανιχνευτής διόδου λιθίου-πυριτίου για την καταγραφή της ενεργειακής διασποράς ακτίνων-Χ.
- Σύστημα κενού: Κατά τη χρήση του SEM, ο θάλαμος πρέπει να βρίσκεται υπό υψηλό κενό για να μπορεί να παραχθεί και να διατηρηθεί σταθερή η δέσμη των ηλεκτρονίων. Σε αντίθετη περίπτωση τα ηλεκτρόνια συγκρούονται με τα μόρια του αέρα και απορροφώνται. Το κενό επιτυγχάνεται με χρήση αντλίας κενού.



### 7.3 Μέτρηση Νανομηχανικών Ιδιοτήτων – Νανοδιείσδυση (Nanoindentation)

Η σημειακή νανοδιείσδυση ή νανοσκληρομέτρηση αποτελεί την πλέον διαδεδομένη και εύχρηστη τεχνική προσδιορισμού των μηχανικών ιδιοτήτων των υλικών. Η σκληρότητα ενός υλικού ορίζεται ως η αντίσταση που προβάλλει σε κάθετη τοπική πλαστική παραμόρφωση της επιφάνειάς του από ένα άλλο σώμα. Με βάση τον παραπάνω ορισμό, η σκληρότητα ενός υλικού υπολογίζεται, μετρώντας την αντίσταση που προβάλλει στη διείσδυση ενός σώματος, το οποίο πιέζεται με κατάλληλη δύναμη κάθετα στην επιφάνεια του υλικού. Τα πρώτα πειράματα διείσδυσης πραγματοποιήθηκαν από τον Brinell στις αρχές του προηγούμενου αιώνα και ως εγχαράκτες χρησιμοποιήθηκαν λείες σφαίρες. Κατά τα συμβατικά πειράματα εφαρμόζεται συγκεκριμένο φορτίο σε έναν θεωρητικά άκαμπτο εγχαράκτη, ο οποίος εισχωρεί στο προς μέτρηση υλικό. Μετά το πέρας εφαρμογής του φορτίου, καταγράφεται το αποτύπωμα του εγχαράκτη στο δείγμα και υπολογίζεται η σκληρότητα του υλικού. Η τιμή αυτή προκύπτει ως ο λόγος του εφαρμοζόμενου φορτίου προς το εμβαδόν της επιφάνειας του αποτυπώματος.

Οι σύγχρονες διατάξεις σημειακής νανοδιείσδυσης βασίζονται στην ίδια λογική με τη διαφορά ότι χρησιμοποιούν εγχαράκτες με αιχμές κυρτότητας ( $R$ ), λίγων δεκάδων νανομέτρων, των οποίων το αποτύπωμα είναι αδύνατο να καταγραφεί από οπτικό μικροσκόπιο. Επιπλέον, πέραν του ασκούμενου φορτίου ( $P$ ), καταγράφεται και η κάθετη προς το επίπεδο του δείγματος μετατόπιση ( $h$ ) του εγχαράκτη, η οποία μπορεί να είναι λίγες δεκάδες νανόμετρα. Επομένως, ένα πείραμα νανοδιείσδυσης αφορά στην άσκηση συγκεκριμένου φορτίου από έναν άκαμπτο εγχαράκτη και την καταγραφή της μετατόπισής του κάθετα στην επιφάνεια του δείγματος. Γνωρίζοντας τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά του εγχαράκτη μέσω ειδικών διαδικασιών βαθμονόμησης και τη μετατόπιση αυτού κάθετα στο επίπεδο της επιφάνειας, είναι δυνατό να υπολογιστεί η επιφάνεια επαφής ( $A$ ) εγχαράκτη – δείγματος. Ακολουθώντας, μπορούν να προσδιοριστούν πειραματικά οι μηχανικές ιδιότητες του εκάστοτε υλικού.

#### Πειραματική διάταξη Νανοδιείσδυσης

Ο έλεγχος των νανομηχανικών ιδιοτήτων χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Hysitron Tribolab Nanomechanical Test Instrument. Η διάταξη επιτρέπει τη χρήση φορτίων από 1 έως 10.000  $\mu\text{N}$  και την καταγραφή του βάθους διείσδυσης ακίδας διαμαντιού στο ελεγχόμενο δείγμα συναρτήσει του εφαρμοζόμενου φορτίου, με ανάλυση φορτίου 1nN και μέγιστο βάθος διείσδυσης 0,04 nm.

Μετακινώντας τον δειγματοφορέα, μετακινείται η στήλη στην οποία στηρίζεται ο εγχαράκτης επάνω από το δείγμα. Η επιφάνεια του υλικού εμποτεύεται με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο ανίχνευσης (scan size 10-20 nm, scan rate 1-2 Hz) και επιλέγονται οι θέσεις στις οποίες θα πραγματοποιηθεί η διείσδυση. Η κίνηση του εγχαράκτη ελέγχεται από πηνίο, το οποίο ενεργοποιείται μέσω μεταβλητής πηγής ρεύματος. Όταν η ακίδα εγχαράξης βρεθεί πάνω από την προεπιλεγμένη περιοχή του δείγματος, εφαρμόζεται σε αυτή φορτίο, το οποίο μεταβάλλεται σύμφωνα με το ρεύμα φόρτισης του πηνίου, ακολουθώντας τις συνθήκες εκτέλεσης του πειράματος. Το βάθος διείσδυσης της ακίδας προσδιορίζεται από χωρικό αισθητήρα μετατόπισης, η έξοδος του οποίου συνδέεται με αισθητήρα μετατόπισης συνεχούς ρεύματος (DC). Ο τελευταίος ψηφιοποιεί το DC σήμα μετατόπισης και το οδηγεί σε ψηφιακό βολτόμετρο συνδεδεμένο με τον υπολογιστή.

Ο εγχαράκτης είναι μια στήλη τοποθετημένη στο σώμα της διάταξης. Η ακίδα εγχάραξης βρίσκεται συνδεδεμένη στο κάτω ελεύθερο άκρο του εγχαράκτη. Η ακίδα είναι ένα διαμάντι γεωμετρίας Berkovich (πυραμίδα τριών επιπέδων).

Υπολογισμός μέτρου ελαστικότητας,  $E_r$  και σκληρότητας,  $H$

Στο Σχήμα 26 παρουσιάζεται σχηματικά το πείραμα νανοσκληρομέτρησης. Τα μεγέθη που μετρούνται σε ένα πείραμα διείδυσης είναι:

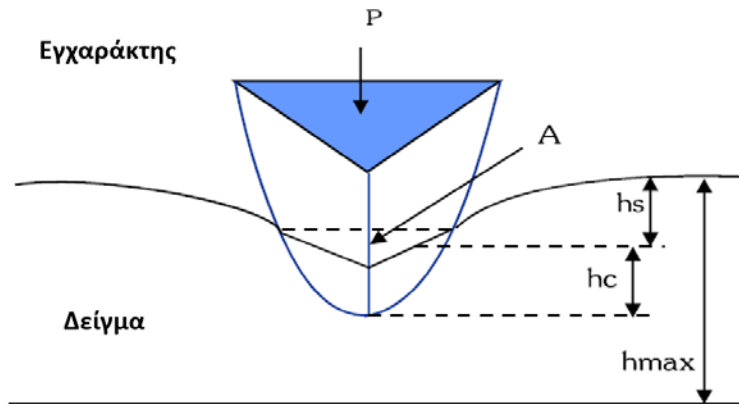
$h_{max}$ : μέγιστο βάθος διείδυσης της ακίδας

$h_f$ : τελικό παραμένον βάθος διείδυσης στο υλικό μετά την αποφόρτιση

$h_c$ : βάθος επαφής υλικού και ακίδας εγχάραξης μετά την αποφόρτιση

$h_e$ : ελαστική μετατόπιση της επιφάνειας του δείγματος κατά την αποφόρτιση

$h_s$ : ελαστική μετατόπιση της επιφάνειας του δείγματος χωρίς επαφή με την ακίδα



Σχήμα 26: Αναπαράσταση πειράματος νανοδιείδυσης.

Το **ποσοστό ακαμψίας (Stiffness)** της επαφής δείγματος – ακίδας ορίζεται από την σχέση:

$$S = \frac{dP}{dh}$$

και είναι η κλίση του γραμμικού τμήματος της καμπύλης αποφόρτισης.

Μέσω της ακαμψίας υπολογίζεται τόσο το **μέτρο ελαστικότητας,  $E_r$**  όσο και η **σκληρότητα,  $H$**  των υλικών.

Το μέτρο ελαστικότητας,  $E_r$  υπολογίζεται από τη σχέση:

$$S = \beta \cdot \left( \frac{2}{\sqrt{\pi}} \right) \cdot \sqrt{A} \cdot E_r$$

όπου  $S$  είναι η ακαμψία,  $A$  η επιφάνεια επαφής η οποία είναι συνάρτηση του βάθους επαφής,  $h_c$  και  $\beta$  μια σταθερά που καθορίζεται από τη γεωμετρία της επιφάνειας επαφής. Η συγκεκριμένη σχέση προέκυψε από θεώρηση κυλινδρικής ακίδας και εφαρμόζεται σε περιπτώσεις που το αρχικό τμήμα (10%) της αποφόρτισης είναι γραμμικό. Το **βάθος διείδυσης**,  $h_c$  υπολογίζεται από τη σχέση:

$$h_c = h_{\max} - h_s$$

Η σκληρότητα υπολογίζεται από την σχέση:

$$H = \frac{P_{\max}}{A}$$

όπου  $P_{\max}$  είναι το μέγιστο φορτίο που εφαρμόζεται στην ακίδα εγχάραξης και  $A$  είναι η προκύπτουσα επιφάνεια επαφής, που όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως είναι συνάρτηση του βάθους διείδυσης,  $h_c$ .

## 8. Μελέτες Βιολογικής Συμπεριφοράς Ικριωμάτων

### 8.1. Ανάπτυξη κυτταρικών καλλιιεργειών

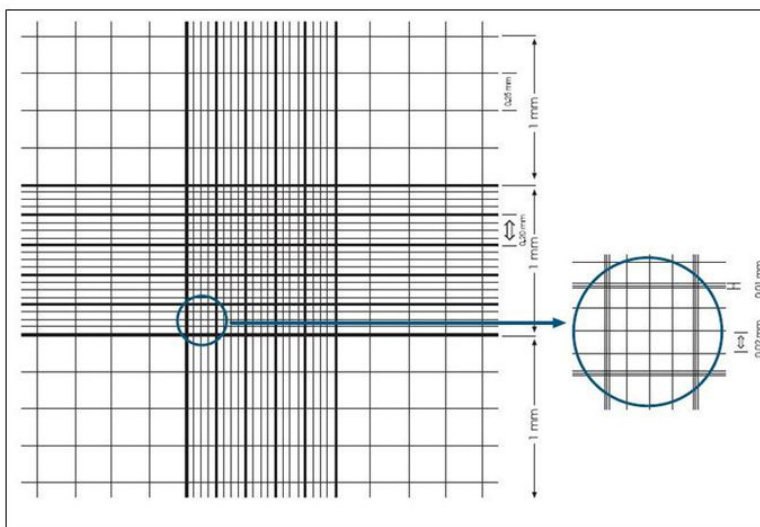
Για τη μελέτη της βιολογικής συμπεριφοράς των τριδιάστατα εκτυπωμένων ικριωμάτων αναπτύχθηκαν κυτταρικές καλλιέργειες με πρώιμους οστεοβλάστες. Οι τελευταίοι προέρχονται από τα αρχέγονα μεσεγχυματικά κύτταρα και συναντώνται στο σπογγώδες οστό. Συνθέτουν το οργανικό τμήμα της εξωκυττάριας μήτρας του οστού και συμβάλλουν στην εναπόθεση των ανόργανων συστατικών. Όταν εγκλωβιστούν στο οστεοειδές μετατρέπονται σε οστεοκύτταρα. Είναι κυβοειδή κύτταρα με έναν έκκεντρο πυρήνα, περιέχουν μεγάλο αριθμό οργανιδίων, εκτεταμένο ενδοπλασματικό δίκτυο και μεμβράνες τύπου Golgi.

Για τον έλεγχο της βιοσυμβατότητας των ικριωμάτων χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά MG-63 (πρώιμοι νεοπλαστικοί οστεοβλάστες) στο τέταρτο στάδιο ανακαλλιέργειας, η οποία προέρχεται από μυελό των οστών. Η προμήθεια της κυτταρικής σειράς MG63 έγινε από την εταιρεία ATCC (American Type Culture Collection, LGC, Germany) σύμφωνα με το πρότυπο ISO 10993-5:2009(E) και αποθηκεύτηκε σε φιαλίδια μέσα σε υγρό άζωτο σε θερμοκρασία  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , σε θρεπτικό υλικό το οποίο περιείχε υλικό κρουπροστασίας (Dymethyl Sulfoxide). Για την καλλιέργεια των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε στείρο θρεπτικό υλικό DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) χωρίς τον δείκτη κόκκινο της φαινόλης και με χαμηλή περιεκτικότητα σε γλυκόζη, εμπλουτισμένο με 10% v/v ορό αίματος βόειου εμβρύου FBS (Fetal Bovine Serum) και 0,2 mM L-γλουταμίνη. Για την προστασία των καλλιιεργειών από μικροβιακούς παράγοντες, χρησιμοποιήθηκαν αντιβιοτικά σε συγκεντρώσεις των 100 IU/mL πενικιλίνη και 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  στρεπτομυκίνη. Οι κυτταρικές καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε ελεγχόμενες συνθήκες, θερμοκρασία  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , υγρασία 95%, παρουσία  $\text{CO}_2$  (5%) (Thermo Fisher Scientific Waltham MA).

### 8.1.1. Πρωτόκολλο διατήρησης της κυτταροκαλλιέργειας

Αρχικά πραγματοποιήθηκε απόψυξη των κυττάρων σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37 °C, όπου και παρέμειναν για λίγη ώρα μέχρι να αρχίσει η απόψυξη. Στη συνέχεια, μεταφέρθηκαν σε απαγωγό, σε φλάσκα 75 cm<sup>2</sup> που περιείχε το θρεπτικό υλικό και απλώθηκαν σε αυτή με ήπια ανάδευση με τη βοήθεια μικρο-πιπέτας. Η φλάσκα μεταφέρθηκε στον κλίβανο επώασης στους 37 °C. Η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε εντός του κλιβάνου επώασης σε θερμοκρασία 37 °C και περιβάλλον 5% CO<sub>2</sub>. Ανά διάστημα 2 ημερών πραγματοποιείται αλλαγή του θρεπτικού μέσου των κυττάρων με αφαίρεση του υπερκείμενου μέσου και δύο εκπλύσεις με 5 ml διαλύματος PBS (Phosphate Buffer Solution). Στη συνέχεια προστίθεται 12 ml καινούργιου θρεπτικού διαλύματος. Η κατάσταση των κυττάρων στη φλάσκα ελέγχεται καθημερινά με οπτικό μικροσκόπιο.

Η μέτρηση του κυτταρικού πληθυσμού έγινε με χρήση του αιμοκυτταρόμετρου Neubauer. Το όργανο αποτελείται από γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα με ορθογώνια οδόντωση που δημιουργεί ένα θάλαμο. Με τη βοήθεια λέιζερ χαράζεται επί της πλάκας πλέγμα κάθετων και οριζόντιων γραμμών, που οριοθετεί τον θάλαμο. Η επιφάνεια όπως και το βάθος του θαλάμου οριοθετούνται από γραμμές, καθιστώντας δυνατή την καταμέτρηση του αριθμού των κυττάρων σε δεδομένο όγκο ρευστού. Ακολούθως γίνεται αναγωγή στον συνολικό όγκο του εναιωρήματος και υπολογίζεται έμμεσα η συγκέντρωση των κυττάρων στο συνολικό υγρό.



**Σχήμα 27:** Η πλάκα Neubauer. Περιέχει 4x16=64 τετράγωνα επιφάνειας 1 mm<sup>2</sup> το κάθε ένα. Το βάθος της πλάκας είναι 1/10 mm.

Τα δοκίμια μεταφέρθηκαν σε τρυβλία καλλιέργειας, μέσα σε απαγωγό νηματικής ροής υπό άσηπτες συνθήκες και υπέστησαν αποστείρωση με υπεριώδη ακτινοβολία για 15 λεπτά σε κάθε όψη τους. Ακολούθως, τα δείγματα εμβάπτιστηκαν σε διάλυμα αιθανόλης 70% για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν εκπλύσεις με αποστειρωμένο ρυθμιστικό διάλυμα PBS εις τριπλούν για να απομακρυνθεί πλήρως η αλκοόλη και ακολούθησε η καλλιέργεια των δειγμάτων με πρώιμους οστεοβλάστες της σειράς MG63. Σε κάθε ικρίωμα καλλιεργήθηκαν 10.000 κύτταρα/cm<sup>2</sup> για χρονικό

διάστημα 1, 2, 3, και 7 ημερών. Παράλληλα καλλιεργήθηκαν κύτταρα και σε κενά τρυβλία καλλιέργειας (TPCs) τα οποία χρησιμοποιήθηκαν σαν εσωτερικοί μάρτυρες (δείγματα ελέγχου – control samples). Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν για κάθε πείραμα και επαναλήφθηκαν τρεις φορές.

## **8.2. Έλεγχος κυτταρικής βιωσιμότητας – Μέθοδος MTT (MTT Assay)**

Η μέθοδος MTT είναι μία διαδικασία μέτρησης της βιωσιμότητας των κυττάρων και χρησιμοποιείται είτε για έλεγχο του πολλαπλασιασμού, είτε για δοκιμές κυτταροτοξικότητας. Το MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium) είναι ένα ευδιάλυτο άλας τετραζόλης, κίτρινου χρώματος. Η δοκιμασία κυτταροτοξικότητας βασίζεται στην παρατήρηση ότι το εν λόγω άλας ανάγεται από μεταβολικώς ενεργά κύτταρα, λόγω της δράσης της ηλεκτρικής αφυδρογονάσης των μιτοχονδρίων. Σχηματίζονται έτσι αδιάλυτοι κρύσταλλοι φορμαζάνης ιώδους χρώματος, που απελευθερώνονται από τα κύτταρα και σταθεροποιούνται με προσθήκη ισοπροπανόλης. Το ποσοστό της χρωστικής σχετίζεται με την δραστηριότητα των μιτοχονδρίων και συνεπώς τη μεταβολική ικανότητα των κυττάρων. Η παραγωγή κρυστάλλων είναι ευθέως ανάλογη του αριθμού των ζωντανών κυττάρων και αντιστρόφως ανάλογη της τοξικότητας του υλικού.

Οι κρύσταλλοι της φορμαζάνης είναι δυνατό να διαλυτοποιηθούν με τη βοήθεια κατάλληλων οργανικών διαλυτών και να προσδιοριστεί φασματομετρικά (οπτική απορρόφηση) η έκταση της αντίδρασης. Συγκεκριμένα η οπτική απορρόφηση, που καταγράφεται σε μήκος κύματος 570-600nm, είναι ευθέως ανάλογη του αριθμού των ζωντανών κυττάρων. Στο σημείο αυτό, αξίζει να αναφερθεί ότι η μέθοδος MTT μπορεί να επηρεαστεί από τη φυσιολογική κατάσταση των κυττάρων, όπως και τη μιτοχονδριακή δραστηριότητα της αφυδρογονάσης σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων. Παραμένει όμως χρήσιμη τεχνική για μελέτη της κυτταρικής ανάπτυξης σε απόκριση προς παράγοντες ανάπτυξης, μελέτες κυτταροτοξικότητας και την κατασκευή καμπυλών ανάπτυξης των κυττάρων.

Αναλυτικά, η μέθοδος MTT περιλαμβάνει αρχικά την απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού από τις καλλιέργειες με μικρο-πιπέτα Pasteur και στη συνέχεια την προσθήκη 200 μl διαλύματος MTT (με 5 mg/ml DMEM χωρίς κόκκινο της φαινόλης) σε κάθε τρυβλίο καλλιέργειας καθώς και 1,8 ml από θρεπτικό υλικό DMEM(χωρίς τον δείκτη κόκκινο της φαινόλης). Τα δείγματα αφήνονται για επώαση στους 37 °C και σε παροχή 5% CO<sub>2</sub>, για 4 ώρες. Μετά το πέρας της επώασης οι κρύσταλλοι της φορμαζάνης, που σχηματίστηκαν διαλύονται σε 2 ml διάλυμα ισοπροπανόλης 96% και HCl 1N. Ακολούθως, γίνεται μεταφορά του περιεχομένου κάθε τρυβλίου στα αντίστοιχα δοχεία του ELISA Reader (VersaMax ELISA Microplate Reader, Biotocompare, USA) και καταγράφεται η απορρόφηση στα 570 nm. Παράλληλα, σε ένα τρυβλίο τοποθετείται και η αντίστοιχη ποσότητα διαλύματος ισοπροπανόλης και MTT, το οποίο χρησιμοποιείται σαν δείγμα αναφοράς και σύμφωνα με το δείγμα αναφοράς πραγματοποιείται η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων.

## **8.3. Έλεγχος κυτταρικής απόπτωσης με χρήση δύο φθορίζουσών ουσιών (FDA/PI)**

Ο καθορισμός της κυτταρικής απόπτωσης είναι ιδιαίτερα σημαντικός σε καλλιέργειες ιστών και σε μελέτες κυτταροτοξικότητας υλικών και κατ' επέκταση έχει αναπτυχθεί πληθώρα χρωματομετρικών δεικτών για τη χρώση των κυττάρων. Μια από τις πιο χρηστικές και υψηλής ευαισθησίας μέθοδος για τον καθορισμό των ζωντανών και νεκρών κυττάρων σε μία καλλιέργεια αποτελεί η ταυτόχρονη χρώση των κυττάρων με διοξική φλουορεσεκίνη (FDA) και προπίδιο του ιωδίου (PI). Ο ταυτόχρονος

χρωματισμός με δύο δείκτες επιτρέπει τη διάκριση λόγω διχρωμίας ανάμεσα στα ζωντανά και νεκρά κύτταρα. Η συγκεκριμένη μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί σε κύτταρα που έχουν προσκολληθεί σε κάποια επιφάνεια, σε ανεξάρτητα κύτταρα ενσωματωμένα σε εξωκυτάρια μήτρα καθώς και σε ολόκληρους κυτταρικούς σχηματισμούς.

Η διοξική φλουορεσκεΐνη ( $C_{24}H_{16}O_7$ ) απορροφάται από τα κύτταρα που στη συνέχεια τη μετατρέπουν μέσω του μεταβολισμού τους στην πράσινη φθορίζουσα φλουορεσκεΐνη ( $C_{20}H_{12}O_5$ ). Εξετάζεται έτσι τόσο η μεταβολική δραστηριότητα των κυττάρων, που απαιτείται για την ενεργοποίηση του φθορισμού, όσο και η ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης που απαιτείται για την ενδοκυτταρική συγκρότηση των φθοριζόντων προϊόντων. Ο φθορισμός είναι ευθέως ανάλογος με τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων της εκάστοτε καλλιέργειας και έχουν χρωματιστεί πράσινα. Απεναντίας, το προπιδίο του ιωδίου ( $C_{27}H_{34}I_2N_4$ ) δε μπορεί να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη των ζωντανών κυττάρων, εξ' ου και η χρήση του για τον εντοπισμό των νεκρών. Η δράση του βασίζεται στο γεγονός ότι τα αποπτωτικά κύτταρα έχουν κατακερματισμένο DNA και κατ' επέκταση πυρηνικό DNA. Η ουσία διαπερνάει τη μεμβράνη μέσω κατεστραμμένων περιοχών και προσδέεται στη διπλή έλικα του DNA, σηματοδοτώντας το. Η αλληλεπίδραση της ουσίας με τα νουκλεϊκά οξέα, καταγράφεται ως κόκκινος φθορισμός και αντιστοιχεί στον αριθμό των νεκρών κυττάρων.

Για την ανίχνευση της κυτταρικής απόπτωσης των οστεοβλαστών, οι οποίοι καλλιεργήθηκαν στην επιφάνεια των υβριδικών ικριωμάτων του υδροξυαπατίτη, προστέθηκαν 50  $\mu$ l διαλύματος διοξικής φλουορεσκεΐνης και προπιδίου του ιωδίου (FDA/PI) σε κάθε δείγμα μετά από την καλλιέργεια. Το διάλυμα αυτό διατηρήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά, σε απόλυτο σκοτάδι και παρουσία υγρασίας. Η καταμέτρηση του φθορισμού πραγματοποιήθηκε με μικροσκόπιο φθορισμού Olympus BX51, (USA). Τα βιώσιμα κύτταρα δίνουν πράσινο φθορισμό, όπως αναφέρθηκε λόγω της χρώσης τους με FDA, υπό διέγερση με μπλε φως, ενώ τα νεκρά κύτταρα δίνουν κόκκινο φθορισμό, λόγω της χρώσης τους με PI, υπό διέγερση με πράσινο φως. Οι εικόνες των κυττάρων που λαμβάνονται με αυτό τον τρόπο αναλύονται ώστε να προσδιοριστεί η βιωσιμότητα του εκάστοτε δείγματος. Το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων καθορίζεται με χρωματικό κώδικα του προγράμματος ImageJ και τα ποσοστά βιωσιμότητας εξάγονται από 5-10 διαφορετικά τυχαία σημεία επάνω στο δείγμα.

#### **8.4. Οπτική παρακολούθηση μορφολογίας κυττάρων μέσω Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Σάρωσης**

Η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση της συμπεριφοράς των κυττάρων κατά την καλλιέργεια τους επί των τριδιάστατα εκτυπωμένων ικριωμάτων υδροξυαπατίτη. Οι πληροφορίες που αντλούνται αφορούν την προσκόλληση, τη διασπορά και τη μορφολογία των κυττάρων, στην επιφάνεια και στο εσωτερικό του ικριώματος. Για την αποτελεσματική παρατήρηση των καλλιεργειών, πρέπει τα δείγματα που φέρουν τα κύτταρα να περάσουν το στάδιο της μονιμοποίησης και αφυδάτωσης. Στόχος της μονιμοποίησης είναι η διατήρηση της μορφολογίας των κυττάρων με όσο δυνατό μικρότερες αλλοιώσεις της πραγματικής τους μορφής. Επιτυγχάνεται αναστολή όλων των κυτταρικών λειτουργιών, επιτρέποντας έτσι την παρατήρηση με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, στη μορφή που είχαν τη στιγμή της μονιμοποίησης.

#### 8.4.1. Πρωτόκολλο Μονιμοποίησης

Το ιδανικό μέσο μονιμοποίησης επιδρά σε όλα τα συστατικά του κυττάρου, επομένως πρέπει να δρα αρκετά γρήγορα, προκαλώντας τις λιγότερες δυνατές αλλοιώσεις. Αυτό εξαρτάται τόσο από την ικανότητα διείσδυσης της ουσίας εντός του κυττάρου, όσο και από το μοριακό της βάρος, που συνήθως είναι μικρό. Τα υγρά μονιμοποίησης ανάλογα τη δράσης τους, μπορούν είτε να προκαλούν πήξη (π.χ. αιθανόλη), είτε όχι (π.χ. γλουταραλδεΐδη, φορμαλδεΐδη, τετροξειδίο του οσμίου, κ.ά.). Η γλουταραλδεΐδη είναι η πλέον κατάλληλη, γιατί μονιμοποιεί τα περισσότερα από τα κύτταρα, ενώ το τετροξειδίο του οσμίου δρα επιπρόσθετα, γιατί συσσωματώνεται με τα κύτταρα που μονιμοποιεί. Ο συνδυασμός των δύο ουσιών εμφανίζει τα καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με όλα τα γνωστά είδη μονιμοποίησης.

Τα ικρίωματα, με τα κύτταρα καλλιεργημένα σε αυτά, μονιμοποιήθηκαν με διάλυμα γλουταραλδεΐδης 2% v/v σε ρυθμιστικό διάλυμα κακοδυλικού νατρίου με pH 7,4, στο οποίο παρέμειναν για 60 λεπτά στους 4 °C. Μετά από αυτό το στάδιο, πραγματοποιήθηκε έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο μετατράπηκε σε ισοτονικό με μη πολικό μόριο σακχαρόζης 4% σε 0,1 M ρυθμιστικού διαλύματος κακοδυλικού νατρίου στους 4 °C για 10 λεπτά. Η έκπλυση εξυπηρετεί στην απομάκρυνση του αδέσμευτου μονιμοποιητή. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται εκ νέου μονιμοποίηση με τετροξειδίο του οσμίου σε υδατικό διάλυμα 1% για χρονικό διάστημα 60 λεπτών στους 4 °C, ενώ αμέσως μετά πραγματοποιείται έκπλυση όπως ακριβώς και στην προηγούμενη περίπτωση. Τέλος, πραγματοποιείται αφυδάτωση των δειγμάτων με στόχο την απομάκρυνση του περιεχόμενου νερού. Η απομάκρυνση του νερού από τα κύτταρα γίνεται σταδιακά με υδατικό διάλυμα αιθανόλης γεωμετρικά αυξανόμενης συγκέντρωσης σε αλκοόλη. Συγκεκριμένα, προστέθηκαν ανά 10 λεπτά διαλύματα αιθανόλης με συγκέντρωση 25%, 50%, 70%, 80%, 95%, και 100% v/v στους 4 °C. Τέλος, τα κύτταρα στην επιφάνεια των ικριωμάτων αφήνονται για ξήρανση σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες.

Σε κάθε περίπτωση, πριν από την παρατήρηση των δειγμάτων στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, τα δείγματα τοποθετούνται σε συσκευή επιχρύσωσης και καλύπτονται με λεπτή επίστρωση χρυσού, ώστε να καταστεί η επιφάνεια τους αγωγίμη και να είναι δυνατή η παρατήρηση του στο SEM με χαμηλή ένταση δέσμης ηλεκτρονίων (20 kV).

### III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 9. Ανάπτυξη τριδιάστατων ικριωμάτων

Η τριδιάστατη εκτύπωση της υβριδικής υδρογέλης υδροξυαπατίτη – χιτοζάνης – L-αργινίνης αποτελεί μία περίπλοκη διαδικασία λόγω του εκτεταμένου φάσματος παραγόντων. Η μελέτη των τελευταίων χωρίστηκε σε αρκετά στάδια, ώστε να μπορέσει να προσδιοριστεί όσο το δυνατόν καλύτερα ένα πρωτόκολλο 3D εκτύπωσης του εν λόγω «μελανιού». Δεδομένης της απουσίας πρότερων βιβλιογραφικών αναφορών σχετικά με την 3D εκτύπωση της συγκεκριμένης υδρογέλης, η μελέτη της βασίστηκε σε μια προσέγγιση δοκιμής-σφάλματος. Στην παρούσα ενότητα παρουσιάζονται όλες οι παράμετροι που εξετάστηκαν από τη στιγμή σύνθεσης της υδρογέλης μέχρι την 3D εκτύπωση της.

##### Μελέτη υδρογέλης χωρίς προσθήκη διαλύματος ζελατίνης/οξικού οξέος

Η υδρογέλη μελετήθηκε αρχικά αυτούσια χωρίς την προσθήκη υλικών που θα μετέβαλαν την ρεολογική της συμπεριφορά. Οι δοκιμές εκτύπωσης είχαν ως αφετηρία τη χρήση ακροφυσίου εσωτερικής διαμέτρου 0,58 mm και θερμοκρασία υλικού 25 °C (room temp). Η ταχύτητα ροής του υλικού εξετάστηκε με αφετηρία την τιμή 0,1 mm/s και πέρασε την τιμή 1,5 mm/s. Οι ταχύτητες κατασκευής περιμέτρου και πλέγματος δεν θα λαμβάνονταν υπόψη μέχρι να επιτευχθεί η ορθή εκβολή του υλικού. Ωστόσο, η τελευταία δεν κατέστη τελικώς δυνατή.

Στα πλαίσια αυτής της προσπάθειας, η θερμοκρασία του υλικού εξετάστηκε μεταξύ 25 – 35 °C χωρίς να επιφέρει αισθητή αλλαγή στη ρεολογία του υλικού. Κρίθηκε επίσης άσκοπο να μελετηθούν θερμοκρασίες κάτω από τους 25 °C, καθώς θα αδρανοποιούσε ακόμα περισσότερο το πολυμερικό δίκτυο της υδρογέλης. Προφανώς η διάμετρος του ακροφυσίου παρέμεινε αμετάβλητη καθώς η όποια μείωση θα δυσχέραινε τη διαδικασία. Τέλος, εξετάστηκε η ταχύτητα ροής του υλικού, επίσης χωρίς ουσιώδες αποτέλεσμα. Μοναδική παρατήρηση υπήρξε η βίαιη και σπασμωδική εκβολή ποσοτήτων υλικού από το ακροφύσιο στο μεταξύ των ταχυτήτων 1,3 – 1,5 mm/s. Πραγματοποιήθηκαν προσπάθειες βελτίωσης της ομοιογένειας του υλικού τόσο με μηχανική ανάδευση, όσο και με χρήση υπερήχων. Η ρεολογία του υλικού παρέμεινε ίδια και κρίθηκε αναγκαία η τροποποίηση της με χρήση δοκιμαστικού διαλύματος ζελατίνης/οξικού οξέος κατόπιν μελέτης σχετικής βιβλιογραφίας.

##### Μελέτη υδρογέλης με προσθήκη διαλύματος ζελατίνης/οξικού οξέος

Οι δοκιμές 3D εκτύπωσης της - τροποποιημένης πλέον - υβριδικής υδρογέλης είχαν ως αφετηρία την εφαρμογή ακροφυσίου εσωτερικής διαμέτρου 0,58 mm και θερμοκρασία υλικού 25 °C (room temp). Αντίστοιχα με την προηγούμενη περίπτωση, μελετήθηκε η ταχύτητα ροής του υλικού. Η εκβολή του υλικού από το ακροφύσιο σε αυτή την περίπτωση, όπου είχε επιτευχθεί μεταβολή της ρεολογίας, πραγματοποιήθηκε επιτυχώς. Το υλικό ήταν ιδιαίτερα υδαρές και δεν επέτρεψε την ποιοτική απόδοση του 3D μοντέλου που είχε σχεδιαστεί. Εντούτοις, έχοντας επιτύχει τον πρώτο στόχο της μελέτης που ήταν η επιτυχής εκβολή, αποφασίστηκε να μην γίνει νέα τροποποίηση της υδρογέλης με το διάλυμα ζελατίνης/οξικού οξέος.



Η βελτίωση της ποιότητας της 3D εκτύπωσης, πραγματοποιήθηκε μέσω της διεξοδικής μελέτης των παραμέτρων του συστήματος, οι οποίοι αναφέρθηκαν σε προηγούμενη ενότητα. Για τη μελέτη των 3D εκτυπώσεων σχεδιάστηκε κυλινδρικό μοντέλο αποτελούμενο από δύο στρώσεις υλικού (layers). Η διάμετρος ορίστηκε 15 mm ενώ το ύψος 1mm. Στη συνέχεια παρουσιάζονται ομαδοποιημένοι όλοι οι συνδυασμοί των παραμέτρων που εξετάστηκαν. Πριν την παράθεση των αποτελεσμάτων, για την αμεσότερη κατανόηση του, οι μεταβλητές θα επεξηγηθούν με συντομογραφία.

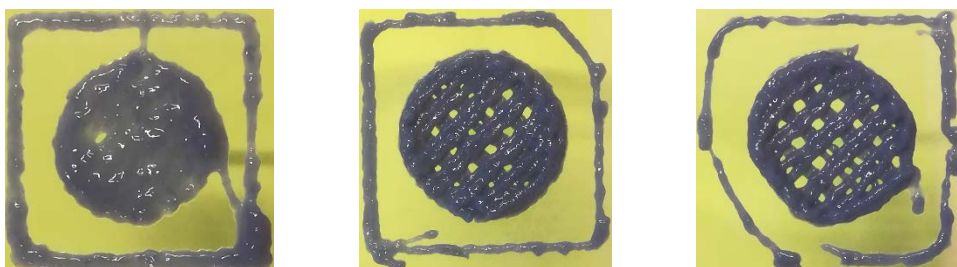
**Πίνακας 3:** Παράμετροι 3D εκτύπωσης

Όνομασία μεταβλητής	Συντομογραφία
Θερμοκρασία Υλικού (°C)	T
Εσωτερική Διάμετρος Ακροφυσίου (mm)	D
Μέγεθος 2D πόρων (μm)	PS
Ταχύτητα Ροής (mm/s)	F
Ταχύτητα Κατασκευής Εσωτερικού Πλέγματος (mm/s)	I
Ταχύτητα Κατασκευής Περιμέτρου/Δοκιμαστικής Περιμέτρου (mm/s)	P

#### **Μελέτη Περίπτωσης 1: T = 25 °C | D = 0,58 mm | PS = 600 μm**

Η μελέτη των παραμέτρων εκτύπωσης της υβριδικής υδρογέλης ξεκίνησε διατηρώντας το υλικό σε θερμοκρασία δωματίου και χρησιμοποιώντας τη μέγιστη δυνατή διάμετρο ακροφυσίου (0,58mm). Το μέγεθος πόρων του 2D πλέγματος ορίστηκε 600 μm ώστε να γίνει όσο το δυνατό καλύτερη εκτίμηση της κατασκευής του. Όπως παρουσιάζεται και στον Πίνακα 4, υψηλές τιμές ταχύτητας ροής οδήγησαν σε εκβολή υπερβολικής ποσότητας υλικού, με αποτέλεσμα την υποβάθμιση της ποιότητας του 3D αντικειμένου (ενδεικτικά παρουσιάζεται η περίπτωση ροής 5 mm/s). Η μείωση της ροής σε τιμές κάτω των 5 mm/s οδήγησε σε ακριβέστερη απόδοση της προσχεδιασμένης γεωμετρίας, τόσο από πλευράς σχήματος όσο και εσωτερικού πλέγματος. Επιπλέον, οι επιμέρους ταχύτητες διατηρήθηκαν σε υψηλές τιμές (5-6 mm/s) για την αποφυγή εναπόθεσης παραπάνω ποσότητας υλικού από την αναγκαία. Ωστόσο, η εκβολή του υλικού εξακολουθούσε να είναι εκτεταμένη. Επιπλέον, μετά την εναπόθεση του, το μελάνι φάνηκε να εξαπλώνεται, καλύπτοντας αρκετούς από τους 2D πόρους του πλέγματος. Παράλληλα διαπιστώθηκε καθίζηση του εσωτερικού πλέγματος σε σχέση με το επίπεδο που βρίσκονταν οι περίμετροι της εκάστοτε στρώσης.

**Πίνακας 4:** Τριδιάστατα εκτυπωμένες υδρογέλες με παραμέτρους  $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $D = 0,58\text{ mm}$ ,  $PS = 600\text{ }\mu\text{m}$ .

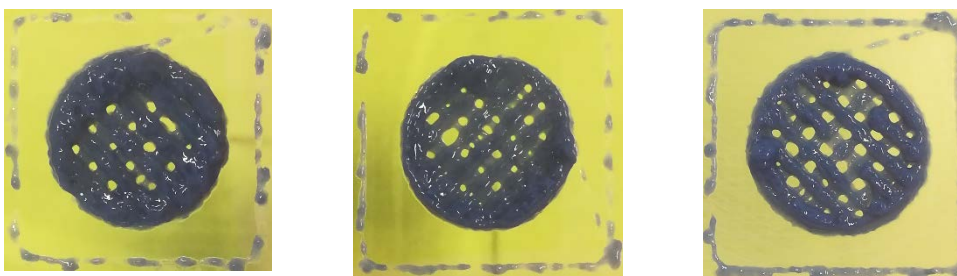


<b>F</b>	5,0	3,0	3,0
<b>I</b>	5,0	5,0	6,0
<b>P</b>	5,0	5,0	6,0

### Μελέτη Περίπτωσης 2: $T = 15\text{ }^{\circ}\text{C}$ | $D = 0,58\text{ mm}$ | $PS = 600\text{ }\mu\text{m}$

Κατόπιν των προηγούμενων παρατηρήσεων εφαρμόστηκε θερμοκρασία  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$  στο μελάνι, ενώ τόσο η διάμετρος ακροφυσίου όσο και το μέγεθος των πόρων παρέμεινε αμετάβλητο. Με τη μείωση της θερμοκρασίας, στόχος ήταν ο περιορισμός του φαινομένου εξάπλωσης του υλικού και η συνολική βελτίωση της αυτοτελούς δομής του 3D αντικειμένου. Ωστόσο, ικανοποιητικά αποτελέσματα προσέφεραν οι δοκιμές με ροή της τάξης των  $1,5\text{ mm/s}$  (Πίνακας 5). Οι τιμές των επιμέρους ταχυτήτων παρέμειναν στα ίδια επίπεδα με την προηγούμενη περίπτωση. Στις συγκεκριμένες 3D εκτυπώσεις, το εσωτερικό πλέγμα είναι ξεκάθαρα πιο ευδιάκριτο από τις προηγούμενες περιπτώσεις, ενώ το φαινόμενο καθίζησης μειώθηκε ελαφρώς.

**Πίνακας 5:** Τριδιάστατα εκτυπωμένες υδρογέλες με παραμέτρους  $T = 15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $D = 0,58\text{ mm}$ ,  $PS = 600\text{ }\mu\text{m}$ .

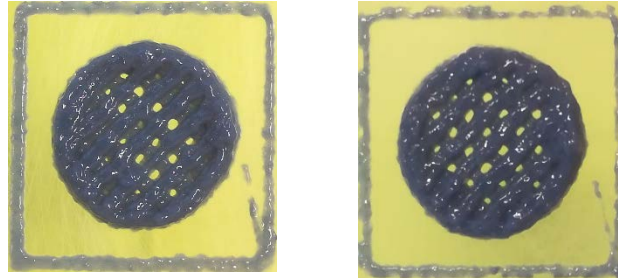


<b>F</b>	3,0	2,0	1,5
<b>I</b>	5,0	5,0	5,0
<b>P</b>	5,0	5,0	5,0

Τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα ώθησαν στην τροποποίηση του εσωτερικού πλέγματος και μείωση του μεγέθους πόρων από  $600\text{ }\mu\text{m}$  σε  $400\text{ }\mu\text{m}$  (Πίνακας 6) για περαιτέρω εκτίμηση της ποιότητας εκτύπωσης. Παρά όλα αυτά, δε σημειώθηκε κάποια αισθητή διαφορά ποιότητας. Τα 3D αντικείμενα με ταχύτητα ροής  $1,5\text{ mm/s}$  φάνηκαν να πλησιάζουν περισσότερο το προσχεδιασμένο μοντέλο, ενώ παράλληλα ήταν απαραίτητες μεγαλύτερες τιμές των ταχυτήτων κατασκευής περιμέτρου και εσωτερικού πλέγματος. Συμπερασματικά, κρίθηκε αναγκαία περαιτέρω μείωση της θερμοκρασίας, η οποία εντούτοις, δεν

μπόρεσε να εφαρμοστεί στην πράξη, καθώς το υλικό παρουσίασε δυσκολία στην εκβολή του από το ακροφύσιο. Επόμενο βήμα είναι η μείωση της διαμέτρου του ακροφυσίου.

**Πίνακας 6:** Τριδιάστατα εκτυπωμένες υδρογέλες με παραμέτρους  $T = 15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $D = 0,58\text{ mm}$ ,  $PS = 400\text{ }\mu\text{m}$ .

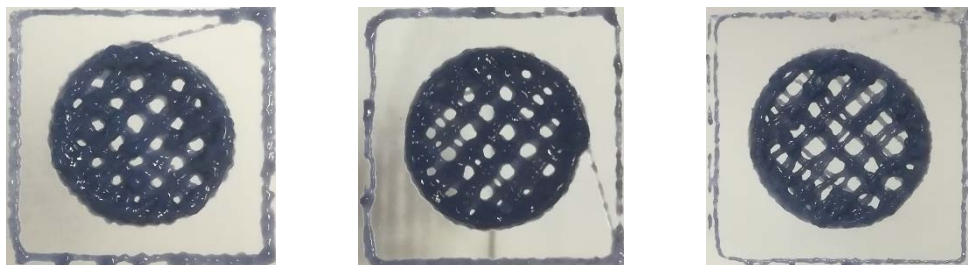


F	1,5	1,5
I	4,5	5,0
P	4,5	5,0

### Μελέτη Περίπτωσης 3: $T = 15\text{ }^{\circ}\text{C}$ | $D = 0,25\text{ mm}$ | $PS = 600\text{ }\mu\text{m}$

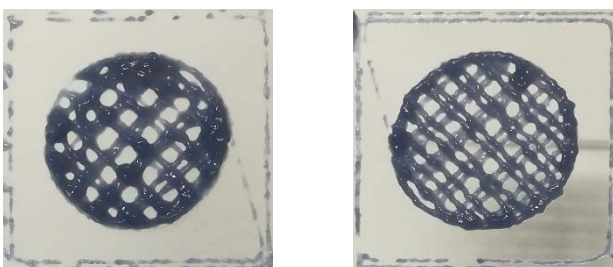
Η διάμετρος του ακροφυσίου μειώθηκε στην ελάχιστη δυνατή (0,25mm), ενώ θερμοκρασία και μέγεθος 2D πόρων παρέμειναν σταθερά. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης προσέγγισης φάνηκαν αρκετά ενθαρρυντικά. Ο λόγος είναι ότι το μελάνι κατάφερε να εκβάλει από το ακροφύσιο με χρήση της ίδιας ταχύτητας ροής, παρά τη δραστική μείωση της διαμέτρου του. Το εσωτερικό πλέγμα και οι περιμέτροι κατασκευάστηκαν σε υψηλές ταχύτητες, αποδίδοντας ευδιάκριτη δομή. (Πίνακες 7 και 8). Ωστόσο, κατά τη διάρκεια διεξαγωγής των 3D εκτυπώσεων, η ρεολογική συμπεριφορά του υλικού υποβαθμίστηκε. Κάτι τέτοιο πιθανότατα οφείλεται στις διατμητικές τάσεις που αναπτύχθηκαν στο μέρος του υλικού που βρισκόταν στα τοιχώματα της σύριγγας και του ακροφυσίου από την επιβολή της μηχανικής πίεσης του εμβόλου. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την αρκετά μικρή εσωτερική διάμετρο του ακροφυσίου συνετέλεσαν στη διόγκωση του υλικού κατά την έξοδο του από αυτό. Χαρακτηριστικές είναι οι 3D εκτυπώσεις με μέγεθος πόρων 400  $\mu\text{m}$ , όπου εξαιτίας της διόγκωσης του υλικού το εσωτερικό πλέγμα έχει εξαφανιστεί και τη θέση του έχει πάρει ένα συμπαγές υλικό (Πίνακας 9).

**Πίνακας 7:** Τριδιάστατα εκτυπωμένες υδρογέλες με παραμέτρους  $T = 15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $D = 0,25\text{ mm}$ ,  $PS = 600\text{ }\mu\text{m}$ ,  $F=1,5$ .



F	1,5	1,5	1,5
I	4,5	5,0	5,0
P	4,5	5,0	5,5

**Πίνακας 8:** Τριδιάστατα εκτυπωμένες υδρογέλες με παραμέτρους  $T = 15 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $D = 0,25 \text{ mm}$ ,  $PS = 600 \text{ }\mu\text{m}$ ,  $F=1,5$  (συνέχεια).



F	1,5	1,5
I	5,5	6,0
P	5,5	6,0

Η ένταση του φαινομένου αυξήθηκε με τελικό αποτέλεσμα να αλλάξει αναντίστρεπτα η ρεολογική συμπεριφορά του υλικού και να καταστραφεί. Για να αντιμετωπιστεί το εν λόγω πρόβλημα, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές με χρήση ακροφυσίου διαμέτρου ενδιάμεσης των 0,58 και 0,25 mm που είχαν χρησιμοποιηθεί ως τώρα.

**Πίνακας 9:** Τριδιάστατα εκτυπωμένες υδρογέλες με παραμέτρους  $T = 15 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $D = 0,25 \text{ mm}$ ,  $PS = 400 \text{ }\mu\text{m}$ ,  $F=1,5$ .



F	1,5	1,5	1,5
I	5,0	5,5	6,0
P	5,0	5,5	6,0

#### Μελέτη Περίπτωσης 5: $T = 15 \text{ }^\circ\text{C}$ | $D = 0,41 \text{ mm}$ | $PS = 600 \text{ }\mu\text{m}$

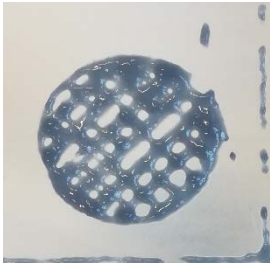
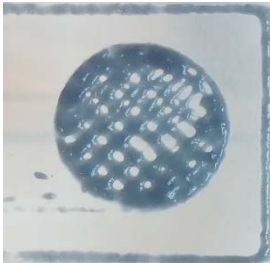
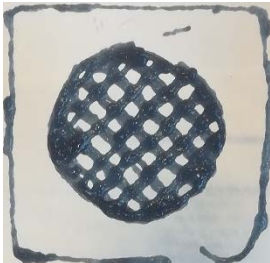
Η χρήση ακροφυσίου εσωτερική διαμέτρου 0,41 mm επέφερε τα πιο ικανοποιητικά αποτελέσματα από άποψη ποιότητας 3D εκτύπωσης. Λόγω της αυξημένης διαμέτρου αποφεύχθηκαν φαινόμενα διόγκωσης του υλικού κατά την εκβολή του από το ακροφύσιο. Επιπλέον, η διάμετρος του τελευταίου επέτρεψε την διεξαγωγή 3D εκτυπώσεων με ταχύτητες ροής υλικού χαμηλότερες των προηγούμενων μελετών. Ειδικότερα, το υλικό εκτυπώθηκε σε εύρος ταχυτήτων 0,8 έως και 1,5 mm/s, αποφέροντας δείγματα ολοκληρωμένου σχήματος με ατέλειες μόνο στο εσωτερικό πλέγμα σε συγκεκριμένες περιπτώσεις. Όπως είναι λογικό η μεταβολή της ταχύτητας ροής θα πρέπει να συνδυάζεται με ανάλογη μεταβολή των ταχυτήτων κατασκευής περιμέτρου και πλέγματος, με στόχο την αποτελεσματικότερη απόδοση του 3D μοντέλου.

Επιπλέον, η ευκολία διαχείρισης του μελανιού υπό τις συνθήκες της παρούσας μελέτης, επέτρεψε την εξαγωγή επιπλέον συμπερασμάτων. Το βασικότερο εξ' αυτών είναι η **ποιοτική σχέση που πρέπει να υπάρχει μεταξύ των ταχυτήτων εκτύπωσης**. Όσον αφορά την κύρια ταχύτητα (ροής) θα πρέπει να είναι **αρκετά χαμηλότερη** από τις αντίστοιχες επιμέρους ταχύτητες (περιμέτρου και πλέγματος). Το γεγονός αυτό φαίνεται πως οφείλεται στη ρεολογική συμπεριφορά του υλικού, καθώς παρά την επιβολή χαμηλής θερμοκρασίας, το υλικό εξακολουθεί και εξαπλώνεται μετά την εναπόθεση του, σε μικρότερο όμως βαθμό από τις προηγούμενες μελέτες.

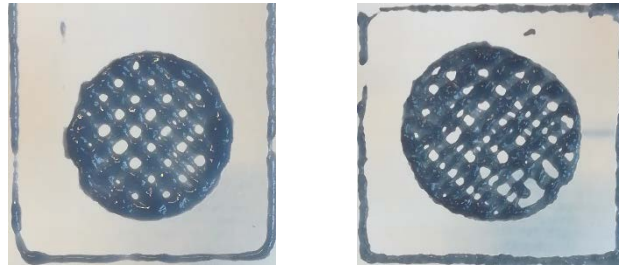
Επιπλέον, μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με τις ταχύτητες κατασκευής πλέγματος και περιμέτρου. Το συγκεκριμένο 3D μοντέλο χαρακτηρίζεται από κυκλική περίμετρο και διαγώνιο εσωτερικό πλέγμα. Αυτό σημαίνει ότι η **εναπόθεση της περιμέτρου γίνεται χωρίς την παρεμβολή γωνιών σε αντίθεση με το πλέγμα που απαιτεί συχνή αλλαγή κατεύθυνσης της κεφαλής λόγω της κατασκευής των «ράβδων» (rods) του πλέγματος**. Η διαπίστωση αυτή, άλλαξε τον τρόπο μελέτης των επιμέρους ταχυτήτων, προγραμματίζοντας 3D εκτυπώσεις όπου η ταχύτητα κατασκευής πλέγματος είναι μικρότερη από την αντίστοιχη της περιμέτρου. Εκ του αποτελέσματος, όπως παρουσιάζεται σε όλους τους πίνακες της μελέτης, φαίνεται ότι η **διαφορά των ταχυτήτων πλέγματος και περιμέτρου πρέπει να είναι της τάξης των 0,5 – 1,00 mm/s με μεγαλύτερη αυτή της περιμέτρου**.

Με βάση τα παραπάνω συμπεράσματα, στους πίνακες που ακολουθούν παρουσιάζονται οι 3D εκτυπώσεις που προσέγγισαν με τη μεγαλύτερη δυνατή ακρίβεια το πρότυπο 3D μοντέλο. Στους Πίνακες 10 και 11 παρουσιάζονται οι υβριδικές υδρογέλες που εκτυπώθηκαν μελετώντας την ταχύτητα ροής, διατηρώντας σταθερές τις τιμές των ταχυτήτων πλέγματος και περιμέτρου. Η ταχύτητα ροής κυμαίνεται μεταξύ 0,8 και 1,2 mm/s ενώ οι ταχύτητες κατασκευής πλέγματος και περιμέτρου διατηρήθηκαν στις τιμές 4,00 και 5,00 mm/s αντίστοιχα. Όπως γίνεται αντιληπτό, ο συνδυασμός που επιφέρει το ποιοτικότερο αποτέλεσμα είναι **F = 1 mm/s | I = 4,00 mm/s | P = 5,00 mm/s**.

**Πίνακας 10:** Τριδιάστατα εκτυπωμένες υδρογέλες με παραμέτρους  $T = 15\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $D = 0,41\text{ mm}$ ,  $PS = 600\text{ }\mu\text{m}$  και  $F$  από 0,8 έως 1,0mm/s.

			
<b>F</b>	0,8	0,9	1,0
<b>I</b>	4,0	4,0	4,0
<b>P</b>	5,0	5,0	5,0

**Πίνακας 11:** Τριδιάστατα εκτυπωμένες υδρογέλες με παραμέτρους  $T = 15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $D = 0,41\text{ mm}$ ,  $PS = 600\text{ }\mu\text{m}$  και τιμές  $F$  από 1,1 και 1,2mm/s.

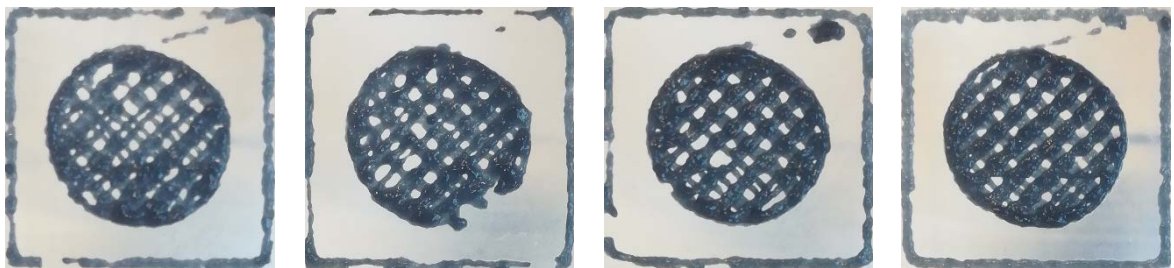


<b>F</b>	1,1	1,2
<b>I</b>	4,0	4,0
<b>P</b>	5,0	5,0

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 10, ταχύτητες κάτω από 1,0 mm/s δεν είναι ικανές να κατασκευάσουν πιστά την προσχεδιασμένη δομή, ενώ το υλικό αυτό καθαυτό, δεν εναποτίθεται υπό μορφή «ράβδων», λόγω ανεπαρκούς ποσότητας. Πιο ουσιαστικά αποτελέσματα για τις συγκεκριμένες ταχύτητες, πιθανότατα θα επέφερε η μείωση των επιμέρους ταχυτήτων για αυξηθεί η ποσότητα υλικού που εναποτίθεται στον ίδιο χρόνο. Ταχύτητες ροής ίσες και μεγαλύτερες των 1,00 mm/s επέφεραν ποιοτικότερες 3D εκτυπώσεις με εναπόθεση ολοκληρωμένων «ράβδων» υλικού.

Στους πίνακες που ακολουθούν παρατίθενται ενδεικτικά ορισμένα 3D εκτυπωμένα δείγματα με τον συνδυασμό ταχυτήτων που προσέγγισε καλύτερα τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά του 3D μοντέλου. Οι συνδυασμοί ταχυτήτων κάθε περίπτωσης δεν ακολουθούν κάποιο μοτίβο, γεγονός που φανερώνει ότι η 3D εκτύπωση του συγκεκριμένου μελανιού μπορεί να πραγματοποιηθεί σε ικανοποιητικό βαθμό σε μεγάλο εύρος ταχυτήτων. Χαρακτηριστικά είναι τα δείγματα του Πίνακα 13. Τα συγκεκριμένα, παρά το γεγονός ότι έχουν διαφορετική ταχύτητα ροής (1,4 και 1,2 mm/s), παρουσιάζουν αρκετά μεγάλη κατασκευαστική ομοιότητα τόσο μεταξύ τους.

**Πίνακας 12:** Τριδιάστατα εκτυπωμένες υδρογέλες με παραμέτρους  $T = 15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $D = 0,41\text{ mm}$ ,  $PS = 600\text{ }\mu\text{m}$  για διάφορες τιμές ταχυτήτων εκτύπωσης.



<b>F</b>	1,5	1,5	1,4	1,2
<b>I</b>	5,0	5,5	4,5	4,5
<b>P</b>	5,5	6,0	5,5	5,5

Με βάση τις παραπάνω μελέτες περιπτώσεων, η τελευταία περίπτωση αναλύθηκε πιο διεξοδικά από τις υπόλοιπες λόγω της βελτίωσης της ρεολογίας της υδρογέλης με χρήση κατάλληλης θερμοκρασίας και διαμέτρου ακροφυσίου. Συνεπώς, προσφέρει μεγαλύτερο περιθώριο περαιτέρω διερεύνησης των παραμέτρων 3D εκτύπωσης. Εξαιτίας αυτού, τα ικρίσματα της συγκεκριμένης μελέτης είναι τα μόνα που χαρακτηρίστηκαν από πλευράς μηχανικών ιδιοτήτων, πορώδους δομής και βιοσυμβατότητας.

Για την μελέτη της καταλληλότητας των 3D εκτυπωμένων υδρογελών ως ικρίσματα οστικού ιστού, απαραίτητη προϋπόθεση είναι η αποβολή του νερού που περιέχεται εντός του πολυμερικού δικτύου. Για να συμβεί αυτό, οι υδρογέλες αρχικά διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  για 24 ώρες. Στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε λυοφιλίωση για 24 ώρες (θερμοκρασία  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  και υποπίεση  $0,1-1\text{ mbar}$ ). Η απομάκρυνση του νερού θα καταστήσει δυνατή τη μελέτη των μηχανικών ιδιοτήτων και παράλληλα θα δημιουργήσει το μικροπορώδες που απαιτείται για την προσκόλληση και συνεπώς τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.

## 10. Χαρακτηρισμός πορώδους δομής και μηχανικών ιδιοτήτων ικριωμάτων

### 10.1 Υπολογιστική Μικροτομογραφία Ακτίνων – Χ

Μέσω των μετρήσεων πορώδους που πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια της υπολογιστικής μικροτομογραφίας ακτίνων – Χ, εξήχθησαν αποτελέσματα και συμπεράσματα για το είδος, το μέγεθος και το ποσοστό του πορώδους σε διαφορετικά ικριώματα. Η συγκεκριμένη τεχνική χαρακτηρισμού μπορεί εν δυνάμει να συνεισφέρει και στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τη μελέτη των μηχανικών ιδιοτήτων και βιοσυμβατότητας των ικριωμάτων.

Για την αποτελεσματική μελέτη των ικριωμάτων μέσω του μCT ήταν απαραίτητη η αύξηση του όγκου τους. Όπως φάνηκε και στην μελέτη της 3D εκτύπωσης της υβριδικής υδρογέλης που πραγματοποιήθηκε με δύο στρώσεις υλικού, τα δείγματα έχουν αρκετά μικρό όγκο και είναι ιδιαίτερα ευπαθή για να τοποθετηθούν στο θάλαμο του μCT. Τα δείγματα που εκτυπώθηκαν για την μελέτη του πορώδους, διέθεταν ταχύτητες ροής από 0,8 έως και 1,2 mm/s. Οι ταχύτητες κατασκευής πλέγματος και περιμέτρου διατηρήθηκαν σταθερές και ίσες με 4,00 mm/s και 5,00 mm/s αντίστοιχα. Όλα τα δείγματα κατασκευάστηκαν με ύψος 2 mm και διάμετρο 15 mm. Το ύψος στρώσης ορίστηκε 0,40 mm συνεπώς τα δείγματα αποτελούνταν από 5 στρώσεις υλικού.

Οι παράμετροι που εισήχθησαν για την διεξαγωγή της σάρωσης καθώς και η περαιτέρω παραμετροποίηση που πραγματοποιήθηκε κατά την ανακατασκευή των τριδιάστατων μοντέλων (λογισμικό NRecon) και την ανάλυση των δειγμάτων (λογισμικό CTAn) αναγράφονται στον Πίνακα 13.

*Πίνακας 13: Παραμετροποίηση σάρωσης ανακατασκευής και ανάλυσης πορώδους.*

<b>Παράμετροι Σάρωσης (Λογισμικό SkyScan1272)</b>
Image Resolution = 4096 x 2160
Image Rotation = 0.08200
Source Voltage (kV) = 40
Source Current (uA) = 250
Image Pixel Size (um) = 3.950008
Reference Intensity = 57000
Filter = No Filter
<b>Παράμετροι Ανακατασκευής Τριδιάστατου μοντέλου (Λογισμικό NRecon)</b>
Post alignment = -23.00
Angular Step (deg) = 0.1000
Smoothing = 0
Ring Artifact Correction = 5
Beam Hardening Correction (%) = 37
<b>Παράμετροι Ανάλυσης Αποτελεσμάτων (Λογισμικό CTAn)</b>



Grey Thresholding = 35-255
Pixel size (um) = 3.950009
Remove Black Despecles in 2D space <20pixels
Remove Black Despecles in 2D space<20pixels

*Πίνακας 14: Ποσοστά πορώδους για 3D εκτυπωμένα ικρίσματα με διαφορετικές ταχύτητες ροής υλικού.*

Porosity Type\Sample	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2
Open	61,5%	74.8%	83,6%	91,2%	92,7%
Close	0.032 %	0.100%	0.003%	0.142%	0.001%
<b>Total</b>	<b>61.5%</b>	<b>74.9%</b>	<b>83.6%</b>	<b>91.3%</b>	<b>92.7%</b>

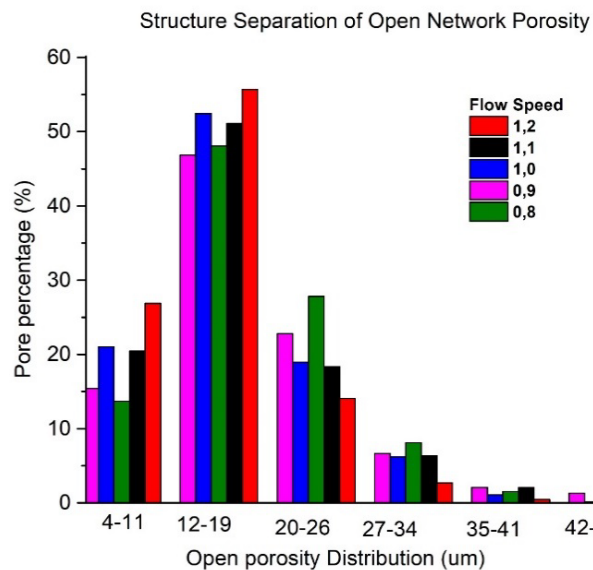
Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 14, το κλειστό πορώδες όλων των ικριωμάτων παρουσιάζεται σε εμφανώς μικρό ποσοστό (μέχρι 0.14%). Όσον αφορά στα ποσοστά ανοιχτού πορώδους, παρατηρείται πως η αύξηση της ροής του υλικού επιφέρει αύξηση των ανοιχτών πόρων του υλικού που δημιουργήθηκαν στο ικρίωμα λόγω της διαδικασίας λυοφιλίωσης. Δεδομένου ότι οι υπόλοιπες σχεδιαστικές (Σχήμα δείγματος, Μέγεθος Πόρων) και κατασκευαστικές παράμετροι (ταχύτητες κατασκευής πλέγματος και περιμέτρου) παρέμειναν σταθερές, πιθανότητα η αύξηση του πορώδους οφείλεται στην αύξηση της μάζας του υλικού στο ικρίωμα. Ωστόσο, θα πρέπει να τονιστεί ότι τα συγκεκριμένα ποσοστά ανοιχτού πορώδους περιλαμβάνουν και τους 2D πόρους του εσωτερικού πλέγματος. Δεν μπορούν να αποτελέσουν επομένως μέτρο σύγκρισης των μηχανικών αντοχών, καθώς το μηχανικό φορτίο εφαρμόστηκε σημειακά σε διασταυρώσεις του πλέγματος και όχι σε ολόκληρο τον όγκο των ικριωμάτων. Λαμβάνοντας υπόψη το πορώδες του φυσικού σπογγώδους οστού, το οποίο κυμαίνεται μεταξύ 50-90%, παρατηρείται ότι τα ικρίσματα που κατασκευάστηκαν με ταχύτητες ροής 0,8 – 1,00 mm/s έχουν ποσοστά εντός του συγκεκριμένου εύρους (61,5%, 74,8% και 83,6% αντίστοιχα). Τα

υπόλοιπα ικρίσματα (1,1mm/s και 1,2 mm/s) έχουν και αυτά συγκρίσιμο ποσοστό πορώδους με το σπογγώδες οστό (91,2% και 92,7%).<sup>[113]</sup>

Ακριβέστερος υπολογισμός των ανοιχτών πόρων που αφορούν αποκλειστικά τη δομή του υλικού παρατίθεται στο Σχήμα 28. Στο τελευταίο παρουσιάζονται τα εύρη τιμών μέσου μεγέθους των πόρων, ως προς το ποσοστό κατάληψης του χώρου εντός του ικρίματος. Παρατηρείται ότι η πλειοψηφία των πόρων σε όλα τα ικρίσματα κυμαίνονται μεταξύ 4 και 26 μm (δεδομένου ότι η διακριτική ικανότητα του οργάνου δεν επιτρέπει ανίχνευση πόρων χαμηλότερης διαμέτρου), με κυρίαρχο το εύρος 12-19 μm όπου τα ποσοστά όλων των δειγμάτων ξεπερνούν το 45%. Όσον αφορά συγκριτικά τα ποσοστά μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων υπάρχουν μικρές διαφορές της τάξης των 2-5% που δεν μπορούν να αποδοθούν στη διαφορετική ταχύτητα ροής υλικού, καθώς δεν μπορεί να υπάρξει συσχέτιση. Οι εν λόγω διαφορές ίσως να οφείλονται σε σφάλμα κατά τη διαδικασία λυοφιλίωσης που υπέστησαν τα δείγματα πριν χαρακτηριστούν. Φαίνεται πως τα υψηλά ποσοστά πορώδους διαμέτρου 4 έως 26 μm επηρεάζονται από τη σύσταση του υλικού που είναι όμοια σε όλα τα δείγματα και όχι από τις διαφορετικές ταχύτητες ροής.

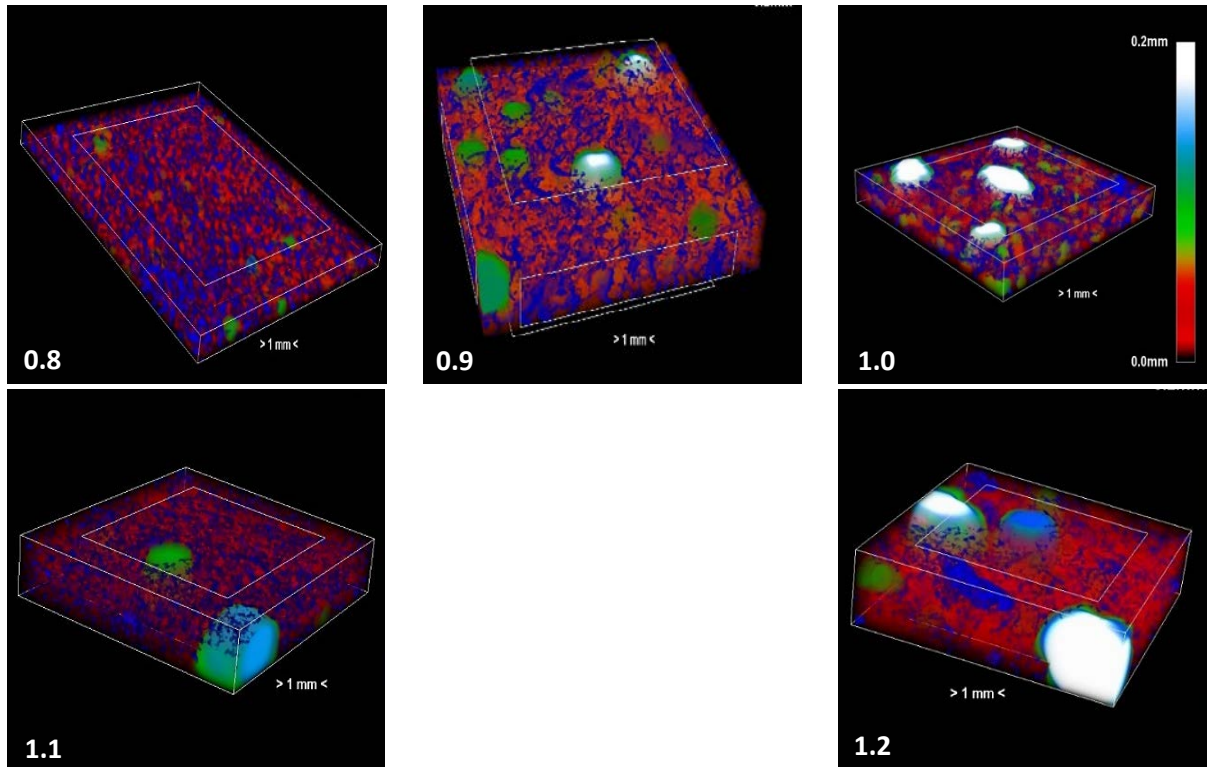
Επιπλέον η μικρή διάμετρος των πόρων θεωρείται ευνοϊκή για τη βιοσυμβατότητα των ικριωμάτων. Συγκεκριμένα, η μείωση του μεγέθους πόρων οδηγεί σε αύξηση της διαθέσιμης επιφάνειας ικρίματος επί της οποίας μπορούν να προσδεθούν συνδέτες (ligands) και εν συνεχεία να αλληλεπιδράσουν με τα κύτταρα. Εξάλλου πόροι με διάμετρο της τάξης των 10 μm ενισχύουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρων και ικρίματος, γεγονός που οδηγεί σε οστεογένεση.<sup>[114,115]</sup> Τα αυξημένα ποσοστά πόρων διαμέτρων 4-26 μm θεωρούνται λοιπόν ευνοϊκά για την διείσδυση των κυττάρων στη δομή του ικρίματος και την αποίκηση του εσωτερικού πορώδους δικτύου. Επιπλέον τα δείγματα 1,0 και 1,2 παρουσιάζουν αυξημένα ποσοστά πορώδους σε μικρότερα μεγέθη πόρων έναντι των υπολοίπων ικριωμάτων. Η διαπίστωση αυτή δικαιολογεί την καλύτερη μηχανική συμπεριφορά που παρουσίασαν τα ικρίσματα από πλευράς μέτρου ελαστικότητας (1,75 GPa και 0,77 GPa αντίστοιχα).

Μια ενδεικτική εικόνα για την κατανομή του πορώδους εντός της δομής του ικρίματος δίνεται από το Σχήμα 28. Η δομή των ικριωμάτων απεικονίζεται με μπλε χρώμα, ενώ το μέγεθος πόρων αποδίδεται ποιοτικά με χρωματική διακύμανση για μεγέθη έως 0,2 mm. Όλα τα 3D εκτυπωμένα ικρίσματα παρουσιάζουν εκτεταμένο δίκτυο πόρων διαμέτρου κάτω των 100 μm με την πλειοψηφία να κυμαίνεται σε ακόμα χαμηλότερες τιμές (κόκκινο χρώμα). Στα ικρίσματα 0,9, 1,0 και 1,2 παρατηρούνται και πόροι μεγαλύτερης διαμέτρου που βάσει της κλίμακας αντιστοιχούν σε τιμές της τάξης των 0,2 mm, δηλαδή



**Σχήμα 28:** Κατανομή μεγέθους πόρων για τα 3D εκτυπωμένα ικρίσματα με ταχύτητες 0,8-1,2 mm/s.

200  $\mu\text{m}$ . Το συγκεκριμένο μέγεθος πιθανότατα αντιστοιχεί σε πόρους του 2D πλέγματος του ικρίωματος ή σε ανομοιογένειες του υλικού κατά τη διαδικασία της 3D εκτύπωσης.

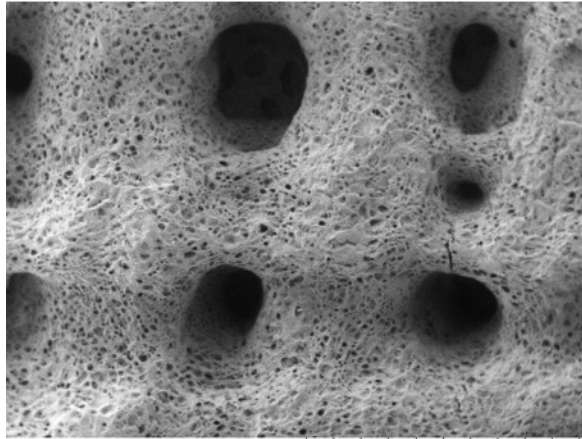


**Σχήμα 29:** Ποιοτική αναπαράσταση δομής και μεγέθους πόρων των 3D εκτυπωμένων ικριωμάτων με ταχύτητες ροής 0,8 – 1,2 mm/s.

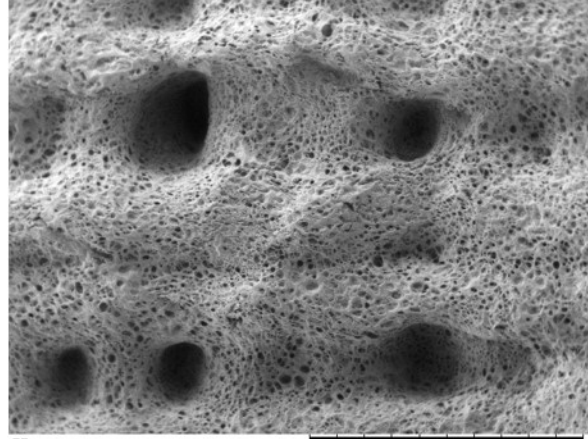
### 10.3 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης

Εκτός από τη χρήση της υπολογιστικής μικροτομογραφίας, χρησιμοποιήθηκε και η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης για τη μελέτη του πορώδους των 3D εκτυπωμένων ικριωμάτων. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε το ικρίωμα που επέδειξε τις καλύτερες μηχανικές ιδιότητες έναντι των υπολοίπων. Οι εικόνες SEM που ακολουθούν αντιπροσωπεύουν το ικρίωμα που κατασκευάστηκε με  $F = 1,00 \text{ mm/s}$ ,  $I = 4 \text{ mm/s}$  και  $P = 5 \text{ mm/s}$ . Επιπλέον, το ικρίωμα εκτυπώθηκε με εναπόθεση 5 διαδοχικών στρώσεων υλικού ύψους  $0,40 \text{ mm}$ . Το σχήμα του είναι κυλινδρικό με ύψος  $2 \text{ mm}$ , διάμετρο  $15 \text{ mm}$  και εσωτερικό πλέγμα με 2D πόρους μεγέθους  $600 \mu\text{m}$ .

Στο Σχήμα 32 παρατηρείται η πορώδης δομή του ικρίωματος σε διάφορες μεγεθύνσεις. Ειδικότερα παρατηρούνται οι πόροι του εσωτερικού πλέγματος που κατασκευάστηκαν κατά την 3D εκτύπωση του ικρίωματος (Σχήμα 30 πάνω), όσο και οι πόροι που προέκυψαν από τη διαδικασία της λυοφιλίωσης του ικρίωματος (Σχήμα 30 κάτω). Στο Σχήμα 31 παρουσιάζονται ενδεικτικές μετρήσεις των διαμέτρων των πόρων του εσωτερικού πλέγματος και της δομής του υλικού. Φαίνεται ότι οι πόροι του εσωτερικού πλέγματος δε διατήρησαν την προσχεδιασμένη διάμετρο ( $600 \mu\text{m}$ ), γεγονός που οφείλεται στη ρεολογία του μελανιού κατά την 3D εκτύπωση. Όσον αφορά τους μικροπόρους του ικρίωματος, παρουσιάζουν διαμέτρους μικρότερες των  $100 \mu\text{m}$ , όπως καταγράφηκε και από τις μετρήσεις του  $\mu\text{-CT}$ .



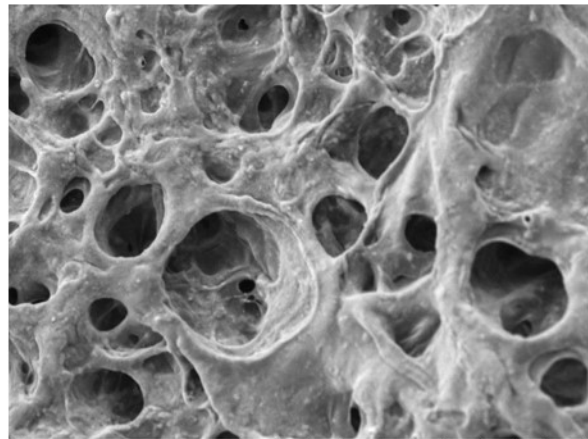
Test5122 2019/09/19 HL UD6.1 x40 2 mm  
Hitachi TM3030Plus



Test5120 2019/09/19 HL UD6.1 x40 2 mm  
Hitachi TM3030Plus

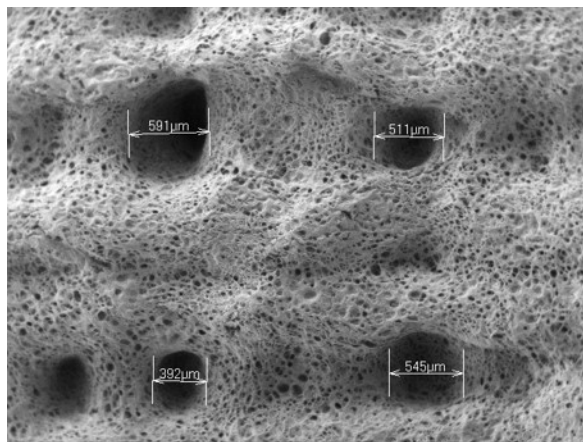


Test5125 2019/09/19 HL UD6.4 x200 500 μm  
Hitachi TM3030Plus

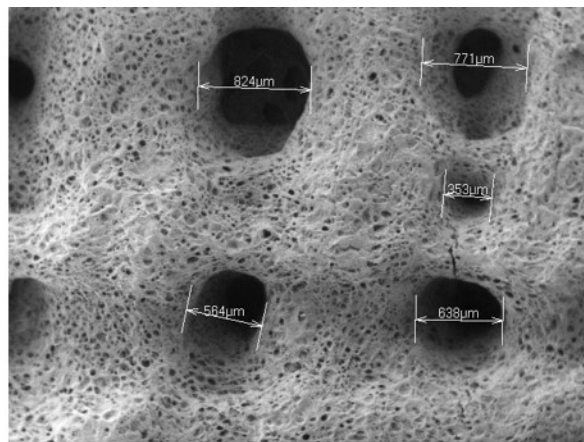


Test5126 2019/09/19 HL UD6.7 x500 200 μm  
Hitachi TM3030Plus

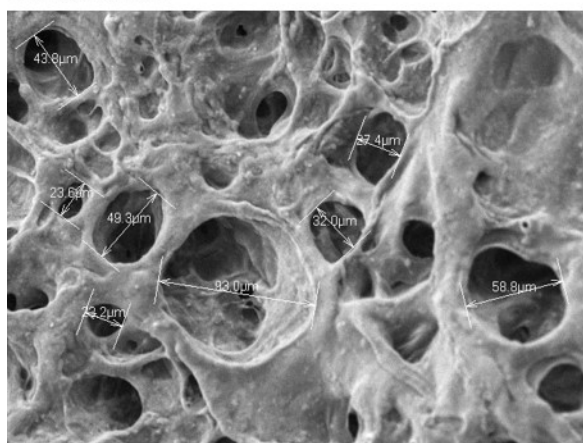
**Σχήμα 30:** Εικόνες SEM του 3D εκτυπωμένου κριώματος που κατασκευάστηκε με ταχύτητα ροής 1,00 mm/s.



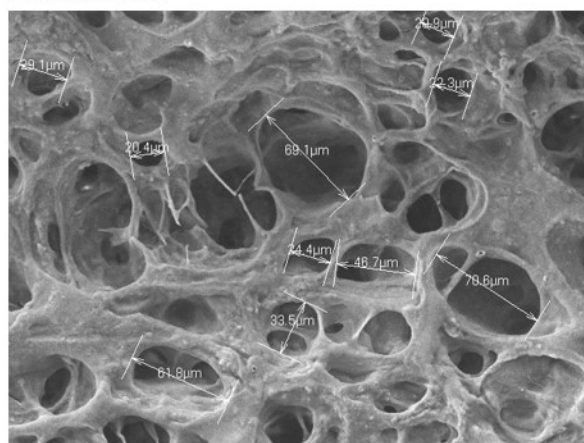
Test5121 2019/09/19 HL UD6.1 x40 2 mm  
Hitachi TM3030Plus



Test5123 2019/09/19 HL UD6.1 x40 2 mm  
Hitachi TM3030Plus



Test5127 2019/09/19 HL UD6.7 x500 200 μm  
Hitachi TM3030Plus



Test5130 2019/09/19 HL UD6.3 x500 200 μm  
Hitachi TM3030Plus

**Σχήμα 31:** Εικόνες SEM του με ενδεικτικές μετρήσεις διαμέτρου πόρων εσωτερικού πλέγματος (πάνω) και υλικού (κάτω) του 3D εκτυπωμένου ικρίωματος που κατασκευάστηκε με ταχύτητα ροής 1,00 mm/s.

## 10.2 Μέτρηση Νανομηχανικών Ιδιοτήτων – Νανοδιείσδυση (Nanoindentation)

Από τα ικρίωματα που παρατέθηκαν στην προηγούμενη ενότητα, επιλέχθηκαν να μελετηθούν ως προς τις μηχανικές τους ιδιότητες αυτά που απέδωσαν με μεγαλύτερη ακρίβεια την προσχεδιασμένη γεωμετρία και αρχιτεκτονική πλέγματος του 3D μοντέλου. Συνεπώς, εξετάστηκαν τα ικρίωματα που προέρχονται από 3D εκτυπώσεις σε θερμοκρασία 15 °C και με χρήση ακροφυσίου εσωτερικής διαμέτρου 0,41 mm. Η μηχανική συμπεριφορά καθώς και η τοπική παραμόρφωση των ικριωμάτων μελετήθηκε χρησιμοποιώντας διάταξη νανοδιείσδυσης, κατάλληλης για τον προσδιορισμό της σκληρότητας και του μέτρου ελαστικότητας των υλικών.

Οι μετρήσεις νανοδιείσδυσης πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο Oliver-Pharr. Μέσω της μετατόπισης της επιφάνειας του δείγματος κατά την διείσδυση,  $h$ , καταγράφεται η παραμόρφωση που

προκαλείται στο δείγμα. Για τον υπολογισμό της μέγιστης μετατόπισης,  $h_{\max}$  πρέπει να ληφθεί υπόψη και η παραμόρφωση του εντυπωτή. Θεωρώντας άκαμπτο εντυπωτή, η μέγιστη μετατόπιση προκύπτει ως άθροισμα της ελαστικής και πλαστικής μετατόπισης. Προκειμένου να υπολογιστεί η σκληρότητα, χρειάζεται να προσδιοριστεί η επιφάνεια του αποτυπώματος μετά την αποφόρτιση. Για να συμβεί αυτό, γίνονται οι εξής παραδοχές:<sup>[116,117]</sup>

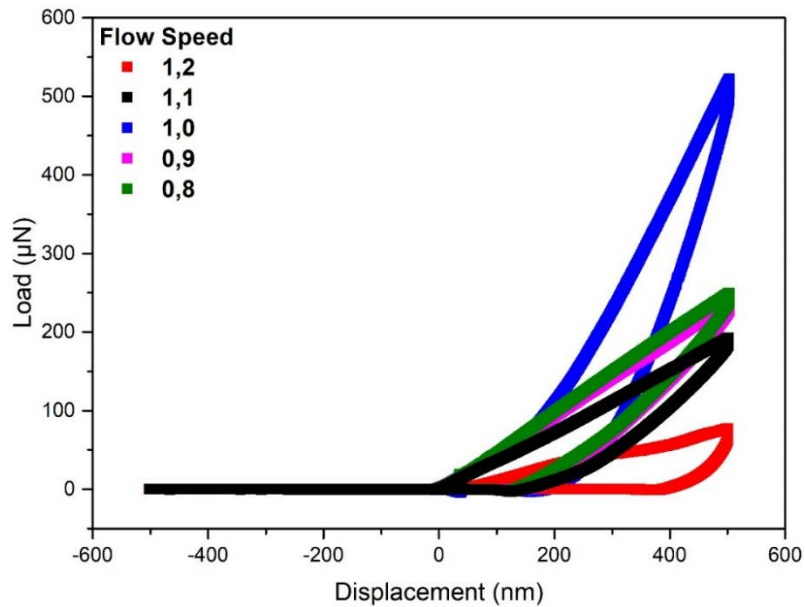
- Η επιφάνεια επαφής υπό μέγιστη φόρτιση και η επιφάνεια αποτυπώματος μετά την αποφόρτιση θεωρούνται ίσες, δεν υπάρχει δηλαδή ελαστική αποκατάσταση στο επίπεδο επαφής.
- Οι πλαστικές και ελαστικές παραμορφώσεις δεν επηρεάζονται μεταξύ τους. Η ελαστική παραμόρφωση πάνω από την περιοχή επαφής είναι ίδια ανεξάρτητα από την πλαστική παραμόρφωση. Το μέτρο ελαστικότητας του Young είναι ίδιο τόσο για τις παραμορφωμένες όσο και για τις απαραμορφωτες περιοχές του υλικού.
- Η τραχύτητα της επιφάνειας, τα φαινόμενα συσσώρευσης και πλαστικής βύθισης θεωρούνται αμελητέα.
- Ο εντυπωτής είναι άκαμπτος.

Στο πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε η ακίδα γεωμετρίας Berkovich από διαμάντι ( $E = 1140 \text{ GPa}$  και  $\nu = 0,07$ ) πλησιάζει το δείγμα ξεκινώντας από απόσταση 500 nm πάνω από την επιφάνεια. Στη συνέχεια διεισδύει στο δείγμα, φτάνει στο προκαθορισμένο μέγιστο βάθος διείσδυσης που ορίστηκε στα 500 nm (στάδιο φόρτισης) και στη συνέχεια απομακρύνεται από το δείγμα (στάδιο αποφόρτισης), με ίδιο ρυθμό.

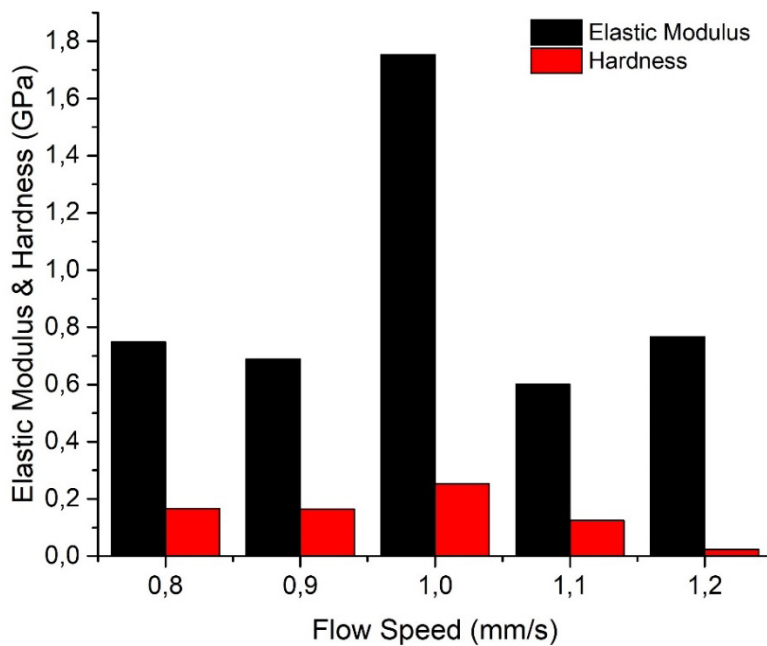
Η μέτρηση των νανομηχανικών ιδιοτήτων κάθε ικρίωματος πραγματοποιήθηκε στην εξωτερική πλευρά του και συγκεκριμένα στα σημεία διασταύρωσης των «ράβδων» του εσωτερικού πλέγματος. Για την ορθότητα των μετρήσεων και την ακριβή εύρεση των σημείων διασταύρωσης, εκτυπώθηκαν δείγματα ύψους 0,8 mm αποτελούμενα από δύο στρώσεις υλικού πάχους 0,40 mm. Η κατασκευή ικριωμάτων περισσότερων στρώσεων θα έθετε υπό αμφισβήτηση την αξιοπιστία των μετρήσεων, καθώς κατά τις 3D εκτυπώσεις είχαν παρατηρηθεί φαινόμενα καθίζησης του εσωτερικού πλέγματος. Κριτήριο σύγκρισης των ικριωμάτων ορίστηκε η ταχύτητα ροής του υλικού κατά την 3D εκτύπωση. Ειδικότερα, χαρακτηρίστηκαν ικρίωματα με ταχύτητες κατασκευής πλέγματος και περιμέτρου της τάξης των 4,00 mm/s και 5,00 mm/s αντίστοιχα και εύρος ταχυτήτων ροής από 0,8 mm/s έως και 1,2 mm/s με βήμα 0,1 mm/s. Στο Σχήμα 32 παρουσιάζονται οι καμπύλες φόρτισης – αποφόρτισης των ικριωμάτων, οι οποίες προσέγγισαν όσο το δυνατό καλύτερα το μοντέλο Oliver – Pharr που εφαρμόστηκε. Παρατηρείται ότι το δείγμα 1,0 υπέμεινε το μεγαλύτερο φορτίο μέχρι το βάθος των 500 nm, όπου και σταμάτησε η επιβολή του. Συγκεκριμένα το εφαρμοζόμενο φορτίο έφτασε στην τιμή των 520  $\mu\text{N}$  για να διεισδύσει στο εν λόγω βάθος, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα ικρίωματα όπου χρειάστηκαν πολύ χαμηλότερα φορτία της τάξης των 75 – 250  $\mu\text{N}$ .

Μέσω του μοντέλου Oliver – Pharr υπολογίστηκε το μέτρο ελαστικότητας (Elastic Modulus) και η σκληρότητα (Hardness) των 3D εκτυπωμένων ικριωμάτων (Σχήμα 33). Παρατηρείται ότι όλα τα δείγματα χαρακτηρίζονται από μέτρο ελαστικότητας μεγαλύτερο των 0,6 GPa, εντός δηλαδή του εύρους τιμών του μέτρου ελαστικότητας του φυσικού σπογγώδους οστού που κυμαίνεται μεταξύ 0,1 και 2 GPa.<sup>[118,119]</sup> Μεταξύ των δειγμάτων, το ικρίωμα που εκτυπώθηκε με ταχύτητα ροής 1,0 mm/s επέδειξε το υψηλότερο μέτρο ελαστικότητας με τιμή 1,75 GPa. Όσον αφορά στη σκληρότητα των δειγμάτων κυμάνθηκε σε χαμηλές τιμές, ένδειξη της παρουσίας εκτεταμένου εσωτερικού πορώδους δικτύου στο εσωτερικών των

δομών. Ωστόσο, μεταξύ των ικριωμάτων, μεγαλύτερη τιμή σκληρότητας παρουσίασε το 1,0 με 0,25 GPa, έναντι των υπολοίπων. Με βάση τη βιβλιογραφική ανασκόπηση που πραγματοποιήθηκε κατά τη διάρκεια διεξαγωγής της παρούσας εργασίας, σημειώνεται ότι οι τιμές του μέτρου ελαστικότητας των 3D εκτυπωμένων ικριωμάτων είναι υψηλότερες από αντίστοιχες περιπτώσεις όπου χρησιμοποιήθηκαν φυσικά βιοϋλικά και γενικότερα σε μελέτες όπου χρησιμοποιήθηκε υδροξυαπατίτης.<sup>[120-123]</sup>



Σχήμα 32: Καμπύλες φόρτισης-αποφόρτισης για 3D εκτυπωμένα ικριώματα με ταχύτητες ροής 0,8 - 1,2 mm/s.



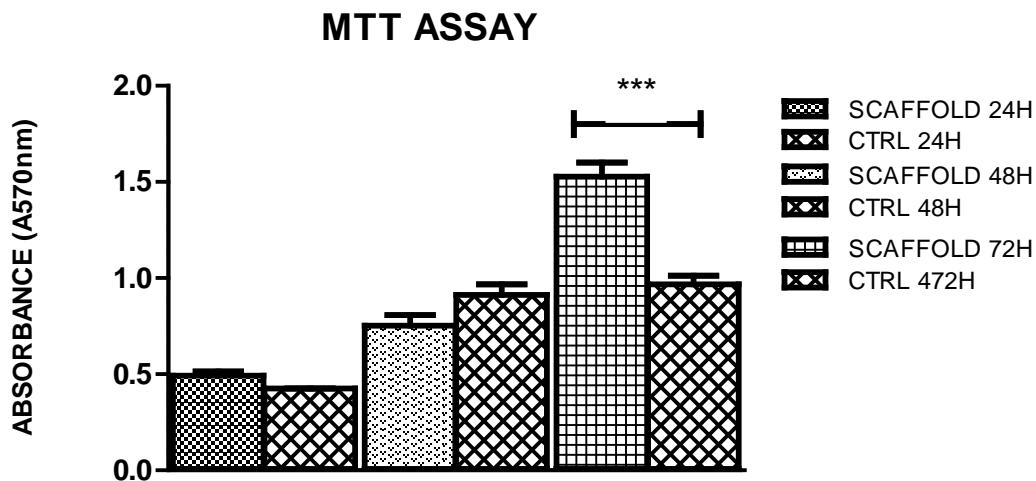
Σχήμα 33: Μέτρο ελαστικότητας και σκληρότητα των 3D εκτυπωμένων ικριωμάτων με ταχύτητες ροής 0,8 – 1,2 mm/s.

## 11. Βιολογική συμπεριφορά ικριωμάτων

Στα τριδιάστατα υβριδικά ικρίωματα παρουσιάζει ενδιαφέρον η μελέτη της συμπεριφοράς των κυττάρων στο εσωτερικό τους, ώστε να ελεγχθεί αφενός εάν επηρεάζεται η φιλική ως προς τα κύτταρα συμπεριφορά των αιωρημάτων του υδροξυαπατίτη και αφετέρου εάν η βιωσιμότητα των κυττάρων εξαρτάται από το έντονο πορώδες δίκτυο που έχει αναπτυχθεί σε αυτά. Δεδομένου ότι οι μετρήσεις των νανομηχανικών ιδιοτήτων ανέδειξαν το ικρίωμα με κατασκευαστική ταχύτητα ροής υλικού 1,00 mm/s ως το καλύτερο εκ των εξεταζόμενων ( $E = 1.75$  GPa,  $H = 0.25$  GPa) κρίθηκε ορθή η εξέταση της βιοσυμβατότητας των κυττάρων σε ικρίωματα των συγκεκριμένων κατασκευαστικών προδιαγραφών. Εκτυπώθηκαν τριδιάστατα ικρίωματα κυλινδρικού σχήματος, ύψους 2 mm, διαμέτρου 15 mm και ύψους στρώσης 0.40 mm. Συνεπώς τα ικρίωματα εκτυπώθηκαν με εναπόθεση 5 στρώσεων υλικού.

### 11.1 Μέθοδος MTT

Η βιωσιμότητα των οστεοβλαστών που καλλιεργήθηκαν, στα τριδιάστατα εκτυπωμένα ικρίωματα, μελετήθηκε μέσω της χρωματομετρικής μεθόδου MTT. Για να θεωρηθούν τα ικρίωματα που αναπτύχθηκαν βιοσυμβατά υλικά, ικανά να αποτελέσουν την τριδιάστατη μήτρα πάνω στην οποία τα κύτταρα θα προσκολληθούν, θα πολλαπλασιαστούν και στη συνέχεια θα διαφοροποιηθούν προς οστεοκύτταρα με απώτερο στόχο την ανάπτυξη νέου ιστού, θα πρέπει τα κύτταρα που καλλιεργούνται σε αυτά να είναι μεταβολικώς ενεργά. Η μεταβολική δραστηριότητα των οστεοβλαστών μεταφράζεται σε απορρόφηση χρωστικής, συνεπώς, όσο μεγαλύτερη οπτική απορρόφηση καταγράφεται, τόσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων στην καλλιέργεια. Η ικανότητα των κυττάρων να πολλαπλασιάζονται επάνω στα ικρίωματα επηρεάζεται τόσο από τη χημική σύσταση του ικριώματος (η οποία επηρεάζεται λόγω της τροποποίησης της ρεολογίας της υβριδικής υδρογέλης που ακολουθήθηκε) όσο και από την εσωτερική δομή των ικριωμάτων που αναπτύχθηκαν.



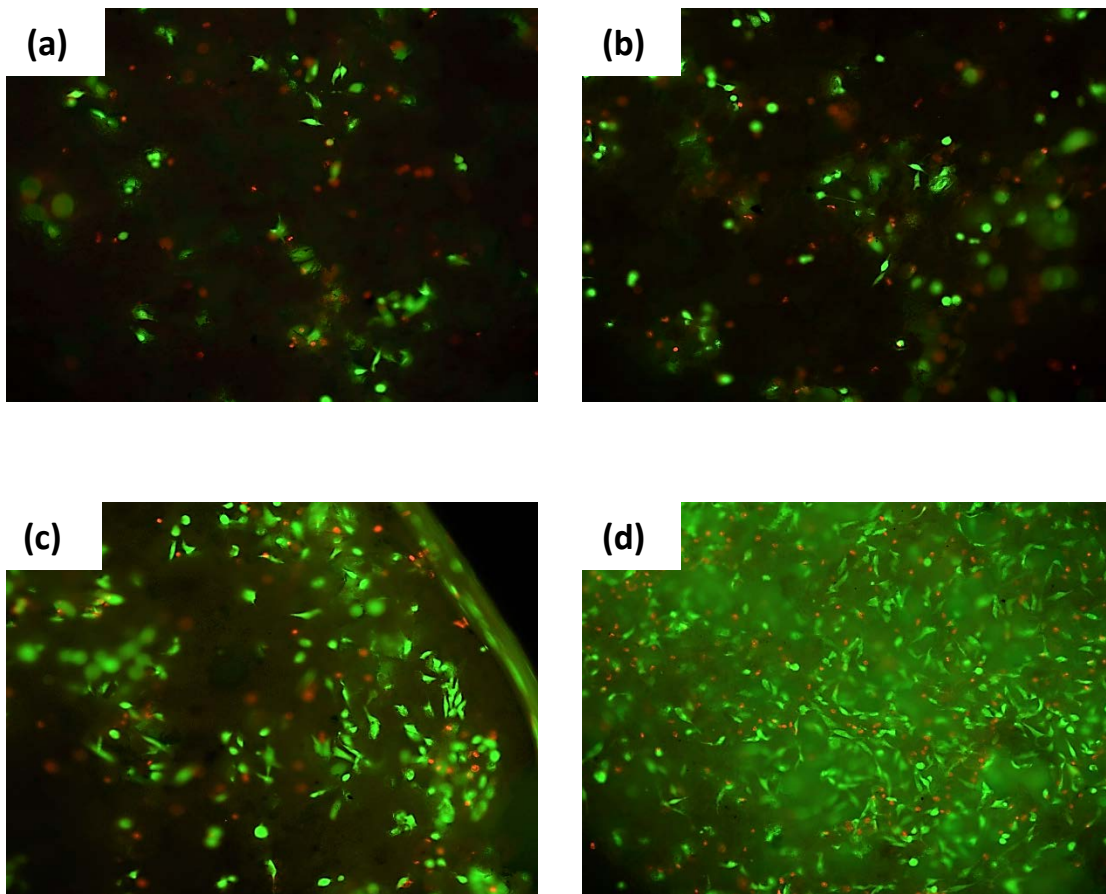
Σχήμα 34: Έλεγχος πολλαπλασιασμού των οστεοβλαστών σε 3D εκτυπωμένα ικρίωματα, μέσω της χρωματομετρικής μεθόδου MTT.



Στο Σχήμα 34 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ανάλυση με ΜΤΤ για τη βιωσιμότητα των οστεοβλαστών σε τριδιάστατα εκτυπωμένα ικριώματα, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα αποτελέσματα για τα δείγματα αναφοράς, δηλαδή το πλαστικό των τρυβλίων καλλιέργειας (TPCs). Από τα αποτελέσματα αυτά, παρατηρείται μία ξεκάθαρη τάση των κυττάρων για πολλαπλασιασμό επάνω στα ικριώματα, γεγονός που αποδεικνύει ότι το υλικό που εκτυπώθηκε είναι πλήρως βιοσυμβατό. Παρόλο που οι τιμές απορρόφησης των κυττάρων, τα οποία έχουν καλλιεργηθεί για 24 ώρες είναι χαμηλές, δεν παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές με τις τιμές απορρόφησης των κυττάρων που έχουν καλλιεργηθεί στις επιφάνειες των τρυβλίων (TPCs) για το ίδιο χρονικό διάστημα. Το γεγονός αυτό πιθανώς αποτελεί ένδειξη ότι οι οστεοβλάστες που καλλιεργούνται χρειάζονται ένα χρονικό διάστημα, ώστε να προσαρμοστούν στο καινούριο περιβάλλον στο οποίο βρέθηκαν πριν ξεκινήσουν τις μεταβολικές τους δραστηριότητες. Μετά από 48 ώρες καλλιέργειας, ο πληθυσμός των ζωντανών κυττάρων στις καλλιέργειες των ικριωμάτων αυξήθηκε σημαντικά. Ωστόσο, ο μέγιστος αριθμός βιώσιμων κυττάρων σημειώθηκε μετά από καλλιέργεια 3 ημερών και οι τιμές που καταγράφηκαν ήταν στατιστικά σημαντικές ( $p < 0,05$ ). Αξίζει να σημειωθεί ότι ο αριθμός των βιώσιμων κυττάρων σε αυτό το σημείο ελέγχου είναι αισθητά μεγαλύτερος του αντίστοιχου δείγματος αναφοράς, γεγονός που ενισχύει τον ισχυρισμό ότι τα ικριώματα συνιστούν ευνοϊκό περιβάλλον για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.

## 11.2 Μέθοδος φθοριζουσών ουσιών FDA/PI

Οι οστεοβλάστες που καλλιεργήθηκαν στα ικριώματα, εξετάστηκαν ως προς τη βιωσιμότητά τους μέσω ανίχνευση της κυτταρικής απόπτωσης με ταυτόχρονη διπλή χρώση των κυττάρων. Η διοξική φλουορεσκεΐνη (FDA) και το προπίδιο του ιωδίου (PI) χρησιμοποιήθηκαν για τον διαχωρισμό των ζωντανών και των νεκρών κυττάρων, καθώς τα ζωντανά βιώσιμα κύτταρα χρωματίζονται έντονο πράσινο ενώ τα νεκρά χρωματίζονται κόκκινα. Η κυτταρική απόπτωση των οστεοβλαστών, οι οποίοι καλλιεργήθηκαν στα ικριώματα μελετήθηκε με μικροσκόπιο φθορισμού μετά από 1, 2, 3 και 7 ημέρες καλλιέργειας (Σχήμα 35). Στην περίπτωση αυτή, οι καλλιέργειες των οστεοβλαστών πραγματοποιήθηκαν σε πολύ λεπτές τομές από τα εκάστοτε ικριώματα, ώστε να είναι δυνατή η παρακολούθηση των χρωματισμένων κυττάρων στο μικροσκόπιο φθορισμού.



**Σχήμα 35:** Εικόνες από μικροσκόπιο φθορισμού των κυτταρικών 3D εκτυπωμένα ικριώματα, έπειτα από καλλιέργεια για: (a) 24h, (b) 48h, (c) 72h και (d) 7 ημέρες.

Από τις εικόνες του μικροσκοπίου φθορισμού, αποδεικνύεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα του MTT, ότι τα ικριώματα παρέχουν ένα φιλικό ως προς τα κύτταρα περιβάλλον, το οποίο επιτρέπει υψηλά ποσοστά βιωσιμότητας. Ο πληθυσμός των πράσινων/ζωντανών οστεοβλαστών που καταμετρήθηκε είναι πολύ μεγαλύτερος από αυτόν των κόκκινων/αποπτωτικών κυττάρων σε όλα τα σημεία ελέγχου (1, 2, 3 ή 7 ημέρες καλλιέργειας). Επιπλέον, παρατηρείται ότι τα κύτταρα εμφανίζουν μία τάση αύξησης του πληθυσμού τους από τις 24 h μέχρι τις 7 ημέρες καλλιέργειας, καθώς ο αριθμός των πράσινων κυττάρων είναι σχετικά μικρός μετά από 24 ώρες αλλά αυξάνεται σημαντικά μετά από παραμονή σε συνθήκες

καλλιέργειας για 7 ημέρες. Η καθυστέρηση αυτή των οστεοβλαστών να ξεκινήσουν τη διαδικασία του πολλαπλασιασμού τους, οφείλεται και σε αυτή την περίπτωση στον χρόνο που απαιτείται ώστε να προσαρμοστούν τα κύτταρα στο καινούριο για αυτά περιβάλλον.

Με την ολοκλήρωση της καλλιέργειας έπειτα από 7 ημέρες, το ικρίωμα έχει αποικηθεί πλήρως από ζωντανά κύτταρα και ο πληθυσμός των βιώσιμων οστεοβλαστών που καταγράφεται είναι ιδιαίτερα αυξημένος. Αποδεικνύεται με αυτόν τον τρόπο ότι η προσθήκη του διαλύματος ζελατίνης/οξικού οξέος, η οποία βελτιώνει σημαντικά τη ρεολογική συμπεριφορά της υδρογέλης, δεν επηρεάζει αρνητικά τις κυτταρικές δραστηριότητες των οστεοβλαστών.

### **11.3 Μορφολογία κυττάρων**

Στη συνέχεια, με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης πραγματοποιήθηκε οπτική παρατήρηση των οστεοβλαστών που καλλιεργήθηκαν στα υβριδικά ικρίσματα για χρονικό διάστημα έως και 7 ημερών. Οι πληροφορίες που λαμβάνονται με την τεχνική αυτή αφορούν την προσκόλληση των κυττάρων στην επιφάνεια των ικριωμάτων καθώς και την εξάπλωση τους στο εσωτερικό του πορώδους δικτύου των ικριωμάτων. Επιπλέον, παρατηρείται η μορφολογία των οστεοβλαστών κατά την προσπάθεια τους να αποικήσουν τα υβριδικά ικρίσματα.

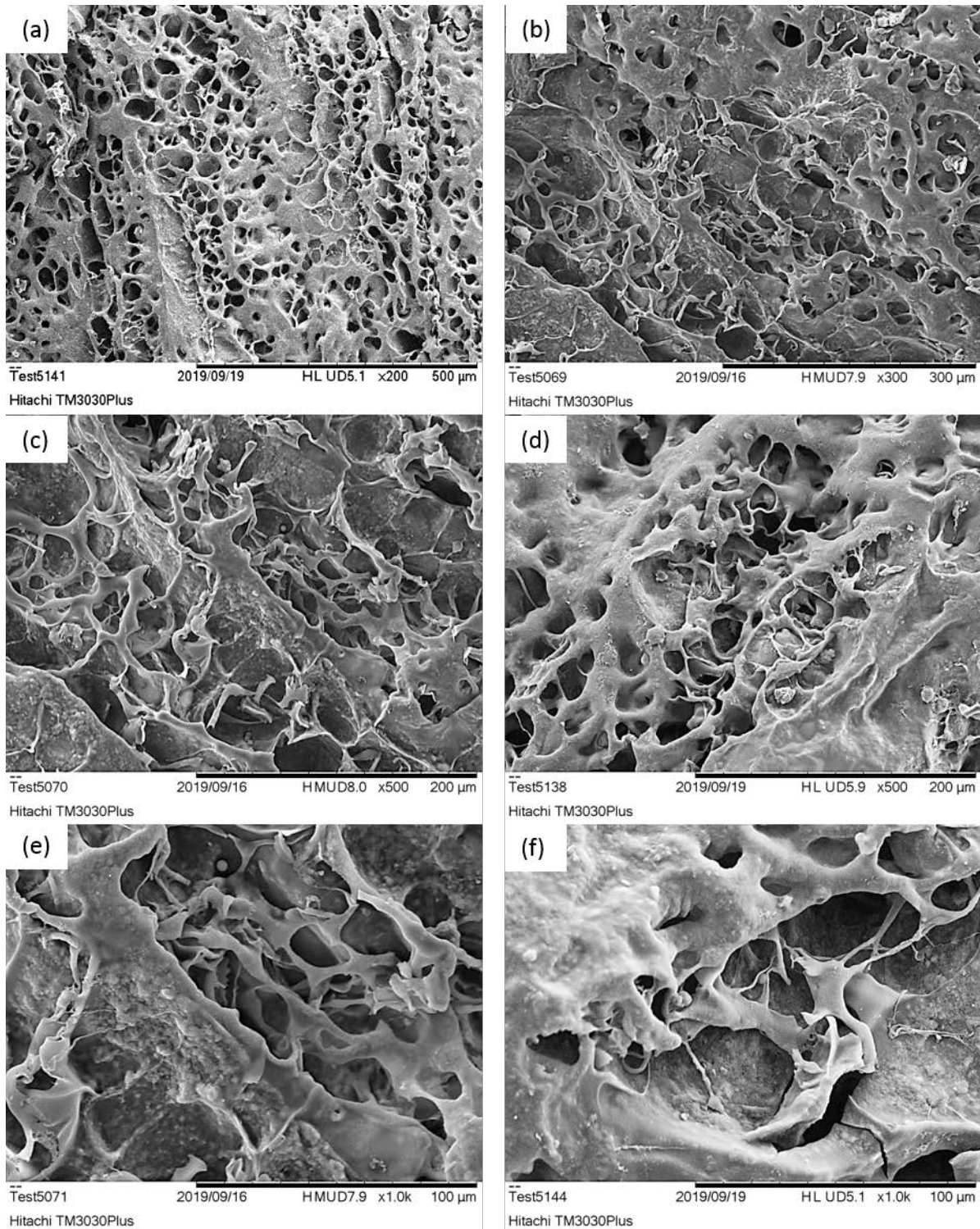
Από τις εικόνες αυτές αποδεικνύεται ότι τα τριδιάστατα εκτυπωμένα ικρίσματα, εμφανίζουν κυτταροσυμβατότητα και ενισχύουν την προσκόλληση και τον *in vitro* πολλαπλασιασμό των οστεοβλαστών που καλλιεργήθηκαν. Μετά από 48 ώρες καλλιέργειας (Σχήμα 37), η επιφάνεια του ικριώματος καλύφθηκε στο μεγαλύτερο μέρος της από ζωντανά, υγιή κύτταρα. Οι οστεοβλάστες έχουν εισχωρήσει στο εσωτερικό του πορώδους δικτύου των ικριωμάτων, όπως φαίνεται από τις εικόνες του SEM μεγαλύτερης μεγέθυνσης, χωρίς να χάσουν το τυπικό ιστοειδικό σχήμα τους και έχουν αποικήσει τους πόρους του υλικού.

Η ανάπτυξη των οστεοβλαστών συνέχισε να αυξάνεται με κάθε επιπλέον μέρα παραμονής στις συνθήκες καλλιέργειας, υποδεικνύοντας έτσι τον δραστικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε πλήρη συμφωνία με τα αντίστοιχα του ελέγχου της κυτταρικής απόπτωσης. Μετά το πέρας 7 ημερών από την καλλιέργεια των κυττάρων, οι οστεοβλάστες έχουν αποικήσει πλήρως το ικρίωμα (Σχήμα 39).

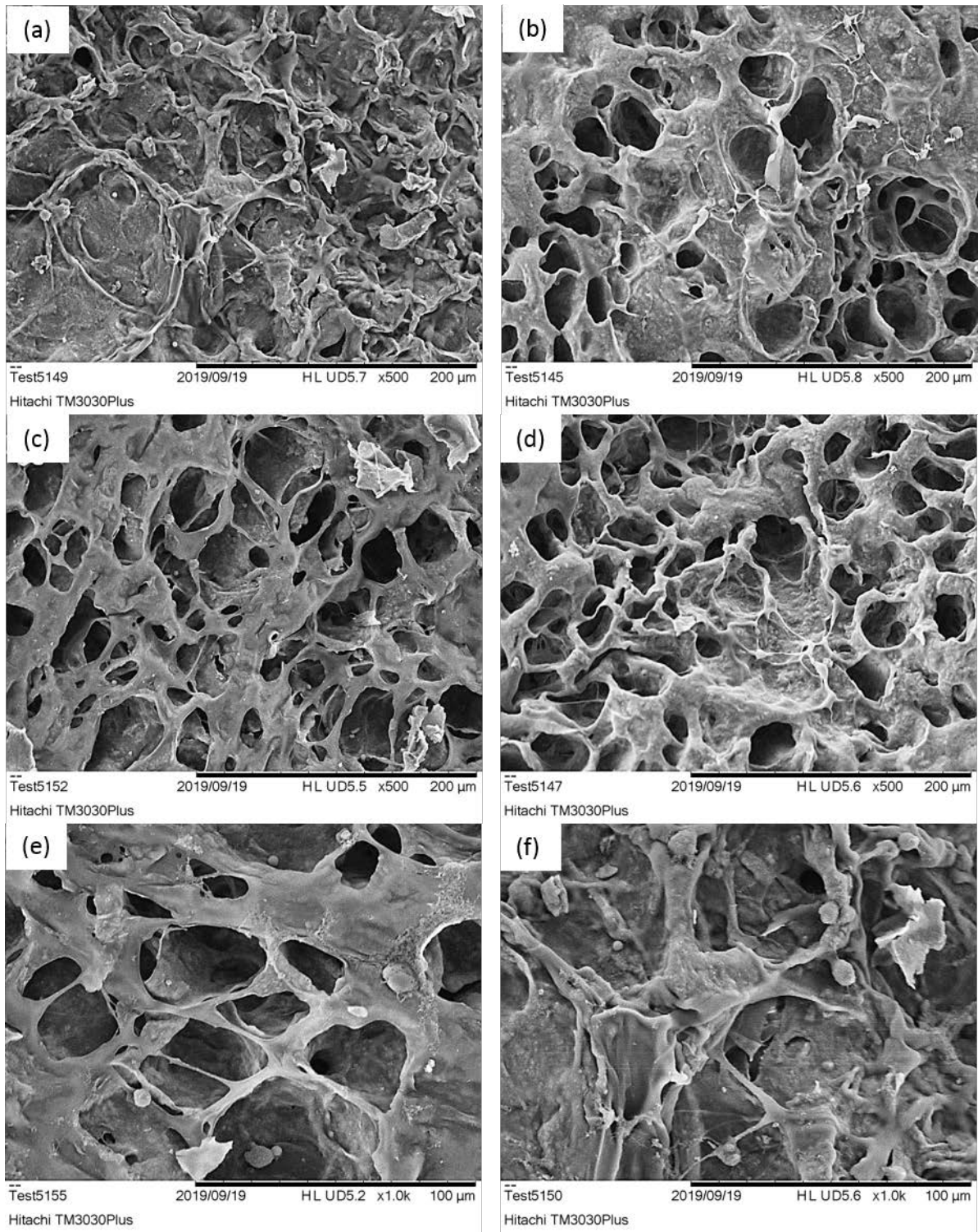
Συγκεκριμένα, παρατηρείται ότι μετά από τις 7 ημέρες, τα κύτταρα έχουν δημιουργήσει ένα λεπτό στρώμα κατά την εξάπλωση τους επάνω στα ικρίσματα. Συμπεραίνεται λοιπόν, ότι οι οστεοβλάστες εναποθέτουν κυτταρικά προϊόντα στην επιφάνεια του υλικού ώστε να δημιουργηθεί η εξωκυττάρια μήτρα. Επιπλέον, από την οπτική παρατήρηση μέσω SEM, φαίνεται ότι τα κύτταρα που έχουν καλλιεργηθεί έχουν αναπτύξει διασυνδέσεις μεταξύ τους, κατά την αποίκηση τους στο εσωτερικό του ικριώματος, μέσω συνένωσης των κυτταροπλασματικών τους προεκτάσεων. Αποδεικνύεται δηλαδή ότι οι οστεοβλάστες έχουν προσδεθεί ισχυρά στην επιφάνεια των ικριωμάτων και έχουν ξεκινήσει τη διαδικασία διαφοροποίησής τους προς οστεοκύτταρα.

Τα αποτελέσματα αυτά επέδειξαν ότι τα υβριδικά ικρίσματα που εξετάστηκαν, αποικήθηκαν από κύτταρα σε όλη την έκτασή τους. Τα κύτταρα κατά την εξάπλωση και τον πολλαπλασιασμό τους, διατήρησαν την τυπική μορφολογία τους, ενώ δεν παρατηρήθηκαν καθόλου περιοχές με

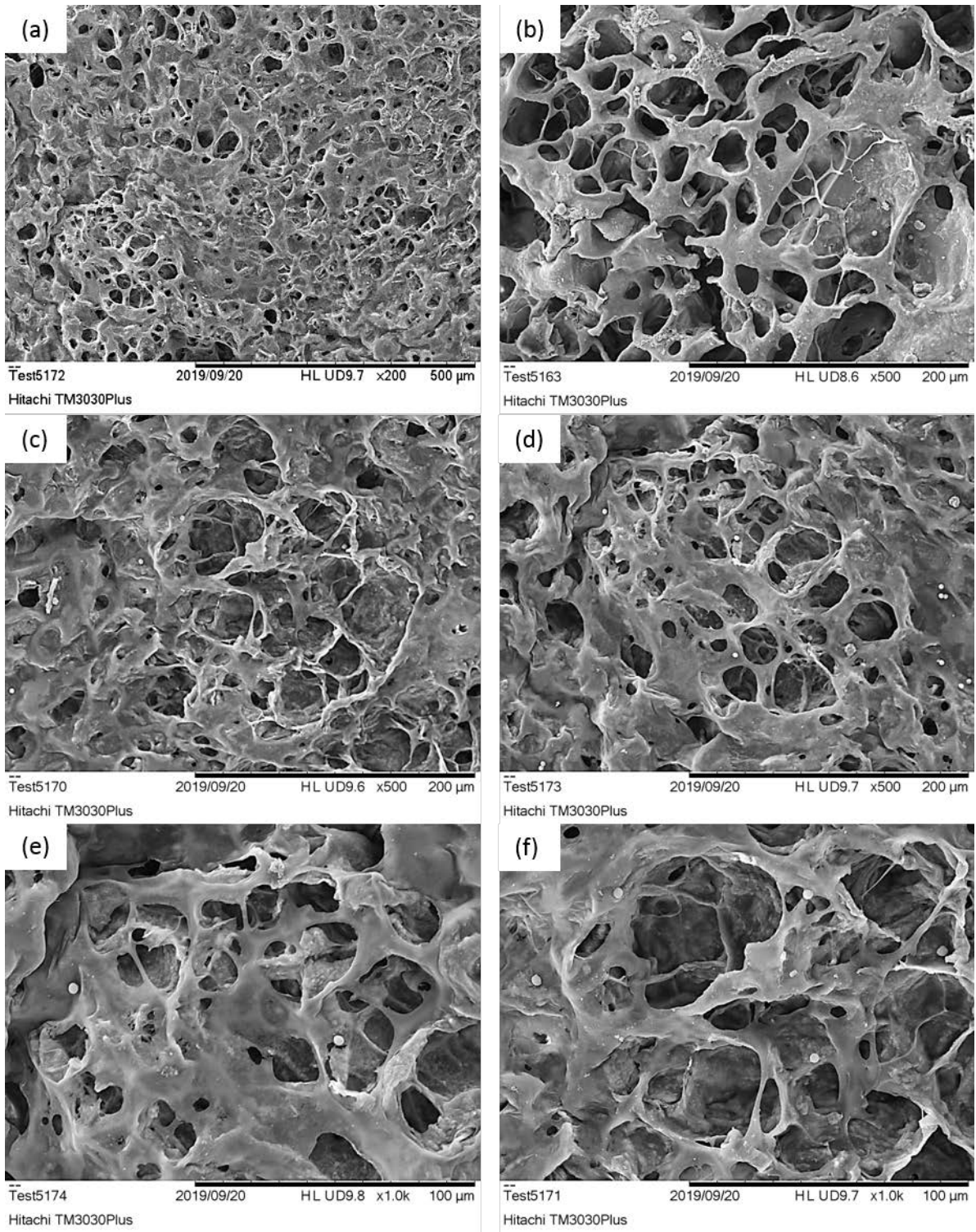
ταλαιπωρημένα ή/και αλλοιωμένα κύτταρα. Κατ' επέκταση, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η αρχιτεκτονική των τριδιάστατα εκτυπωμένων ικρωμάτων, είναι ευνοϊκή για την προσκόλληση των κυττάρων, την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό τους.



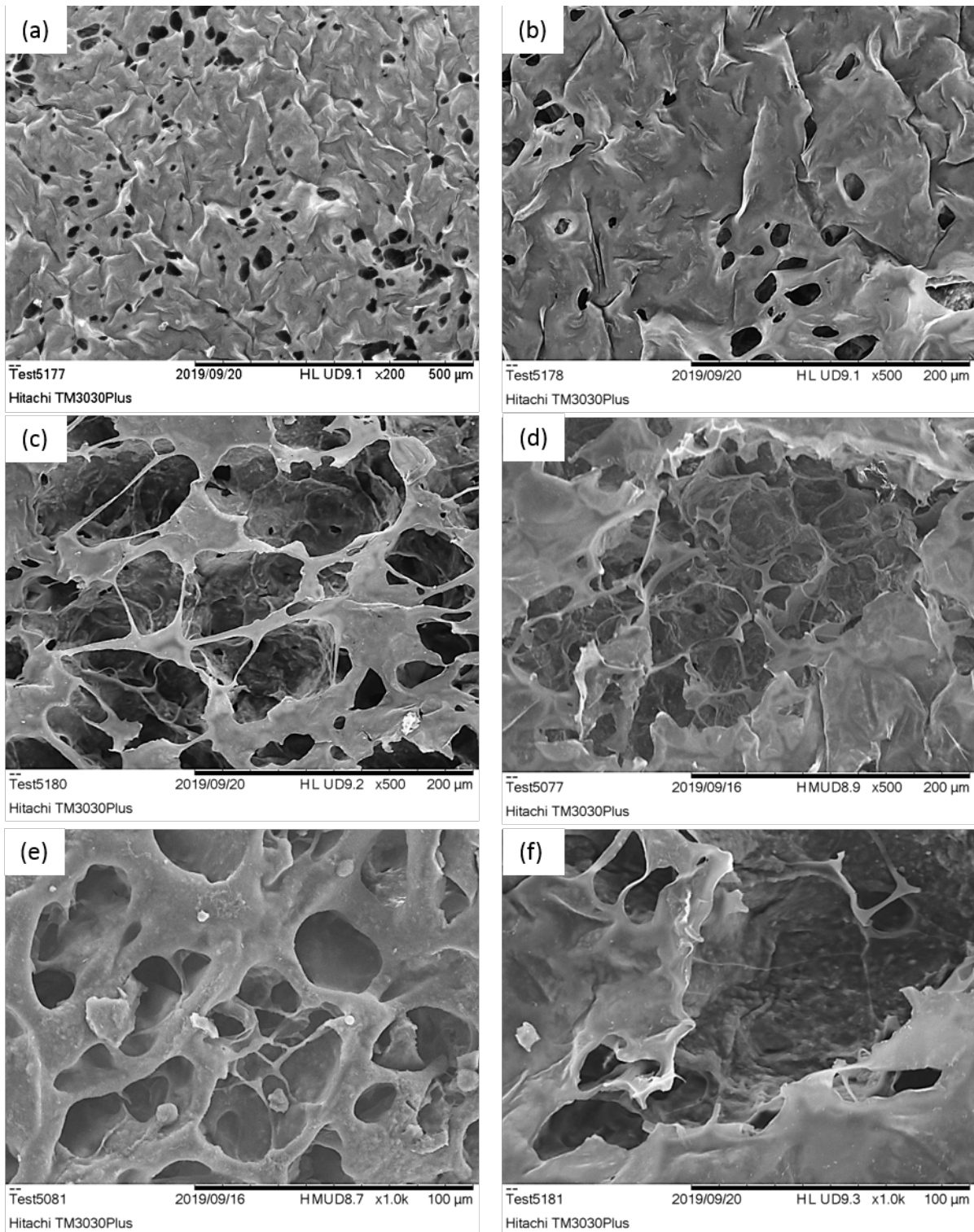
**Σχήμα 36:** Εικόνες SEM από καλλιέργειες MG-63 κυττάρων για 24 ώρες.



**Σχήμα 37:** Εικόνες SEM από καλλιέργειες MG-63 κυττάρων για 48 ώρες.



**Σχήμα 38:** Εικόνες SEM από καλλιέργειες MG-63 κυττάρων για 72 ώρες.



**Σχήμα 39:** Εικόνες SEM από καλλιέργειες MG-63 κυττάρων για 7 ημέρες.

## IV. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η ανάπτυξη τριδιάστατων υβριδικών ικριωμάτων υδροξυαπατίτη-χιτοζάνης-L-αργινίνης, χημικά διασυνδεμένων με γενιπίνη, μέσω τριδιάστατης εκτύπωσης, με στόχο την αξιολόγηση τους ως ικριώματα για την αναγέννηση του οστικού ιστού. Το πρόδρομο αιώρημα που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη αυτή αποτελείται από ναοκρυστάλλους υδροξυαπατίτη που αναπτύχθηκαν παρουσία του βιομορίου χιτοζάνη και του αμινοξέος L-αργινίνη. Πρόκειται για βιομημητική σύνθεση, η οποία έχει αποδειχθεί σε προηγούμενες μελέτες ότι οδηγεί στην ανάπτυξη κρυστάλλων υδροξυαπατίτη με σχήμα και διαστάσεις παρόμοια με τους αντίστοιχους κρυστάλλους που απαντώνται εντός του φυσικού οστού. Για την επίτευξη κατάλληλης ρεολογικής συμπεριφοράς του αιωρήματος, ώστε να αξιοποιηθεί ως πρώτη ύλη για την τριδιάστατη εκτύπωση, χρησιμοποιήθηκε διάλυμα ζελατίνης/οξικού οξέος. Η ζελατίνη αποτελεί ένα πλήρως βιοσυμβατό υλικό, ενώ το οξικό οξύ χρησιμοποιήθηκε σε χαμηλή περιεκτικότητα για την αποφυγή φαινομένων κυτταροτοξικότητας. Η ζελατίνη δρα ως πηκτικός παράγοντας αυξάνοντας το ιξώδες του μελανιού εκτύπωσης με αποτέλεσμα την επιτυχή τριδιάστατη εκτύπωση των ικριωμάτων.

Η τριδιάστατη εκτύπωση εμπεριέχει πληθώρα παραγόντων που επηρεάζουν τόσο τη ρεολογική συμπεριφορά του μελανιού όσο και τη σχεδιαστική ακρίβεια και τις ιδιότητες του τελικού ικριώματος. Οι κατασκευαστικές παράμετροι που εξετάστηκαν ως προς την επίδρασή τους στην ακρίβεια του τελικού προϊόντος και κυρίως του εσωτερικού πλέγματος των ικριωμάτων ήταν η ταχύτητα ροής υλικού (F) και οι ταχύτητες κατασκευής πλέγματος και περιμέτρου (I και P αντίστοιχα). Επιπλέον, δεδομένης της απουσίας βιβλιογραφικού υποβάθρου για τη εκτυπωτική συμπεριφορά του εν λόγω μελανιού, μελετήθηκαν επιπλέον οι παράμετροι της θερμοκρασίας του υλικού (T) και της εσωτερικής διαμέτρου του ακροφυσίου της κεφαλής εκτύπωσης (D). Κατόπιν μελέτης διαφορετικών συνδυασμών των προαναφερθέντων παραγόντων, κατασκευάστηκαν ικριώματα με σχεδιαστική ακρίβεια που πλησιάζει την προσχεδιασμένη. Για να επιτευχθεί το παραπάνω, εφαρμόστηκε θερμοκρασία 15 °C στο υλικό και ακροφύσιο με εσωτερική διάμετρο 0,41 mm. Πραγματοποιήθηκαν εκτυπώσεις με διαφορετικές ταχύτητες ροής υλικού και σταθερές τις επιμέρους ταχύτητες πλέγματος και περιμέτρου. Τα συγκεκριμένα ικριώματα χαρακτηρίστηκαν από πλευράς μηχανικών ιδιοτήτων και πορώδους δομής, ενώ το επικρατέστερο από πλευράς μηχανικής συμπεριφοράς μελετήθηκε και ως προς τη βιοσυμβατότητα του.

Η μελέτη των μηχανικών ιδιοτήτων των 3D εκτυπωμένων ικριωμάτων απέδειξε ότι η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε, οδήγησε σε αρκετά υψηλές τιμές μέτρου ελαστικότητας, συμβαδίζοντας με τις αντίστοιχες τιμές του φυσικού σπογγώδους οστού. Η συμπεριφορά αυτή, αποδίδεται στην απουσία πόρων μεγάλης διαμέτρου στο εσωτερικό της δομής του ικριώματος. Απεναντίας, υπήρχε μεγάλο ποσοστό πόρων μικρής διαμέτρου, αποτέλεσμα της λυοφιλίωσης που υπέστησαν τα ικριώματα για την πλήρη ξήρανση τους. Η σκληρότητα των ικριωμάτων που καταγράφηκε, παρέμεινε σε χαμηλές τιμές λόγω του μεγάλου ποσοστού πορώδους που υπήρχε στη δομή του υλικού. Παρόλα αυτά, οι τιμές του μέτρου ελαστικότητας που επιτεύχθηκαν, είναι υψηλότερες από αυτές που σημειώνονται σε αντίστοιχες



περιπτώσεις ανάπτυξης ικριωμάτων με χρήση φυσικών βιοϋλικών, όπως αυτό αποδεικνύεται από τη βιβλιογραφική ανασκόπηση που διεξήχθη κατά τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας εργασίας.

Η μελέτη της πορώδους δομής των 3D εκτυπωμένων ικριωμάτων, με υπολογιστική μικροτομογραφία, υπέδειξε ότι όλα τα ικριώματα διέθεταν μεγάλα ποσοστά πόρων μικρής διαμέτρου (4 - 26 μm) στο εσωτερικό τους. Επιπλέον, όλα τα ικριώματα χαρακτηρίζονται από εσωτερικό δίκτυο μικροπόρων το οποίο οφείλεται στη διαδικασία της λυοφιλίωσης. Το συνολικό ποσοστό πορώδους των ικριωμάτων (συμπεριλαμβανομένων και των προσχεδιασμένων πόρων του πλέγματος) κυμάνθησαν σε τιμές που εμπίπτουν με το αντίστοιχο εύρος ποσοστού πορώδους του σπογγώδους οστού (50-90%). Τα συγκεκριμένα χαρακτηριστικά θεωρούνται ιδανικά για την αποτελεσματική ενσωμάτωση του ικριώματος στον πάσχοντα οστικό ιστό, καθώς ενισχύουν την αλληλεπίδραση των κυττάρων με τη δομή του ικριώματος (μικροπόροι), ενώ εν δυνάμει επιτρέπουν την αγγείωση του ικριώματος (πόροι εσωτερικού πλέγματος).

Η βιολογική συμπεριφορά των 3D εκτυπωμένων ικριωμάτων μελετήθηκε με την ανάπτυξη κυτταροκαλλιεργειών από πρώιμους οστεοβλάστες (MG63) στην επιφάνεια τους για χρονικό διάστημα 7 ημερών. Η καθημερινή παρακολούθηση των καλλιεργειών απέδειξε ότι τα ικριώματα που αναπτύχθηκαν αποτελούν πλήρως βιοσυμβατά υλικά καθώς επιτεύχθηκε η προσκόλληση αλλά και ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων σε αυτά. Συγκεκριμένα, μετά από 3 ημέρες καλλιέργειας ο αριθμός των βιώσιμων κυττάρων που ανιχνεύθηκε ήταν αισθητά μεγαλύτερος του αντίστοιχου δείγματος αναφοράς, γεγονός που ενισχύει τον ισχυρισμό ότι τα ικριώματα συνιστούν ευνοϊκό περιβάλλον για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Το συμπέρασμα αυτό ενισχύθηκε και από τα αποτελέσματα της μελέτης των μεταβολικών δραστηριοτήτων των οστεοβλαστών. Τα ικριώματα παρουσίασαν υψηλό ποσοστό βιωσιμότητας, καθώς τα κύτταρα που προσκολλήθηκαν στην επιφάνεια εμφάνισαν μία ξεκάθαρη τάση αύξησης του πληθυσμού τους και μετά από 7 ημέρες καλλιέργειας και τα ικριώματα αποικήθηκαν πλήρως από βιώσιμα κύτταρα.

Η οπτική παρατήρηση των κυτταρικών καλλιεργειών απέδειξε επίσης ότι τα κύτταρα κατά την καλλιέργεια τους στα ικριώματα πολλαπλασιάστηκαν και εισχώρησαν ακόμα και στο εσωτερικό των πόρων της δομής. Συμπεραίνεται ότι η μικροαρχιτεκτονική των ικριωμάτων (οι πόροι της επιφάνειας αλλά και το εσωτερικό πορώδες δίκτυο) είναι και αυτή ευνοϊκή για την προσκόλληση, ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Έπειτα από 7 ημέρες καλλιέργειας, διαπιστώθηκε οπτικά ότι τα κύτταρα ανέπτυξαν διασυνδέσεις μεταξύ τους μέσω συνένωσης των κυτταροπλασματικών τους προεκτάσεων. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι οι οστεοβλάστες έχουν ξεκινήσει τη διαδικασία εναπόθεσης εξωκυττάριας μήτρας.

### **Προτάσεις για μελλοντική έρευνα**

- Χαρακτηρισμός της ρεολογικής συμπεριφοράς της υβριδικής υδρογέλης (π.χ. μέσω μετρήσεων ιξώδους).
- Περαιτέρω διερεύνηση και βελτιστοποίηση της ρεολογικής συμπεριφοράς της υβριδικής υδρογέλης με χρήση νέων πρόσθετων βιομορίων ή/και διασυνδετών ή τροποποίηση των ήδη υπαρχόντων.

- Τριδιάστατη εκτύπωση ικριωμάτων με γεωμετρία και μικροαρχιτεκτονική μεγαλύτερης πολυπλοκότητας.
- Ανάπτυξη παρόμοιων ικριωμάτων με χρήση άλλων φυσικών βιοπολυμερών, όπως π.χ. κολλαγόνο τύπου I για ακριβέστερη προσέγγιση της χημικής σύστασης του φυσικού οστού.
- Μελέτη της βιολογικής συμπεριφοράς των ικριωμάτων για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα καθώς και έλεγχος της κυτταρικής διαφοροποίησης στην επιφάνεια των ικριωμάτων.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Vacanti JP., Langer R., Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation, *Lancet*. (1999)
2. Jeanie L. Drury, David J. Mooney, Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications, *Biomaterials*, pp 4337-4351, (2003)
3. Burr D., Bone Morphology and Organization, *Basic and Applied Bone Biology*, pp 3-26, (2019)
4. Howard G.A, Schiller P.C., *Biology of Bone, Osteoporosis in Older Persons*, pp 1-21, (2016)
5. Cameron R. M. Black & Vitali Goriainov & David Gibbs & Janos Kanczler & Rahul S. Tare & Richard O. C. Oreffo, *Bone Tissue Engineering, Molecular Biology of Skeletal Tissue Engineering*, pp 132-140 (2015)
6. Adele L. Boskey & Pamela G. Robey, *The Composition of Bone, Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, pp 84-95, (2019)
7. Johnathan Ng, Kara Spiller, Jonathan Bernhard, and Gordana Vunjak-Novakovic, *Biomimetic Approaches for Bone Tissue Engineering, Tissue Engineering*, pp 480-484, (2017)
8. Livia Roseti, Valentina Parisi, Mauro Petretta, Carola Cavallo, Giovanna Desando, Isabella Bartolotti, Brunella Grigolo, *Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives, Materials Science and Engineering C*, pp 1246-1262, (2017)
9. Sergey V. Dorozhkin, *Nanodimensional and Nanocrystalline Apatites and Other Calcium Orthophosphates in Biomedical Engineering, Biology and Medicine, Materials*, pp 1975-2045, (2009)
10. Shruthy Kuttappan, Dennis Mathew, Manitha B. Nair, *Biomimetic composite scaffolds containing bioceramics and collagen/gelatin for bone tissue engineering - A mini review, International Journal of Biological Macromolecules*, p 1390-1401, (2016)
11. Sergey V. Dorozhkin, *Calcium Orthophosphates in Nature, Biology and Medicine, Materials*, pp 399-498, (2009)
12. Oftadeh R, Perez-Viloria M, Villa-Camacho JC, Vaziri A, Nazarian A, *Biomechanics and mechanobiology of trabecular bone: a review, J. Biomech. Eng.*, (2015)
13. <https://www.chemtube3d.com/sshydroxyapatite/>
14. Fernandez-Yague MA, Abbah SA, McNamara L, Zeugolis DI, Pandit A, Biggs MJ, *Biomimetic approaches in bone tissue engineering: Integrating biological and physicochemical strategies, Adv. Drug Deliv. Rev.*, pp 1-29, (2015)
15. LeGeros RZ, *Apatites in Biological Systems, Prog. Crystal Growth Charact.*, pp 1-45, (1981)
16. M. Dutour Sikirić, H. Füredi-Milhofer, *The influence of surface-active molecules on the crystallization of biominerals in solution, Advances in Colloid and Interface Science*, pp 135-158, (2006)
17. Dimitris Tsiourvas, Athena Tsetsekou, Maria-Izoldi Kammenou, Nikos Boukos, *Biomimetic synthesis of ribbon-like hydroxyapatite employing poly(L-arginine), Materials Science and Engineering*, pp 1225 – 1231, (2016)
18. Jahromi MT, Yao G, Cerruti M, *The importance of amino acid interactions in the crystallization of hydroxyapatite, J R Soc Interface*, (2012)
19. Lauren J.Auerbach, Brittney K. De Clerk, C.Garrison Fathman, Geoffrey C. Gurtner, Paul S.Auerbach. *Poly-L-Arginine Topical Lotion Tested in a Mouse Model for Frostbite Injury, Wilderness and Environmental Medicine*, (2014)

20. Shohda A. El-Maraghy , Noha Ali Mehana ,Modulatory effects of L-arginine and soy enriched diet on bone homeostasis abnormalities in streptozotocin-induced diabetic rats, *Chemico – Biological Interactions*, pp9-16, (2015)
21. Sundarraj Saranya, Selvaraj Joseph, Samuel Justin, Rajadurai Vijay, Solomon Paul Wilson, L-arginine directed and ultrasonically aided growth of nanocrystalline hydroxyapatite particles with tunable morphology, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, pp 270-279, (2018)
22. Hannah C. Bygd, Dana Akilbekova, Adam Munoz, Kiva D. Forsmark, Kaitlin M. Bratlie, Poly-L-arginine based materials as instructive substrates for fibroblast synthesis of collagen, *Biomaterials*, pp 47-57, (2015)
23. Gómez S., Vlad MD., López J., Fernández E., Design and properties of 3D scaffolds for bone tissue engineering, *Acta Biomater.*, pp 341-350, (2016)
24. Canelón SP., Wallace JM.,  $\beta$ -Aminopropionitrile-Induced Reduction in Enzymatic Crosslinking Causes In Vitro Changes in Collagen Morphology and Molecular Composition, *PLoS One*, (2016)
25. David Miranda-Nieves, Elliot L. Chaikof, Collagen and Elastin Biomaterials for the Fabrication of Engineered Living Tissues, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, pp 694 – 711, (2017)
26. A. Tsetsekou, D. Brasinika, V. Vaou, E. Chatzitheodoridis, On the synthesis of tailored biomimetic hydroxyapatite nanoplates through a bioinspired approach in the presence of collagen or chitosan and L-arginine, *Materials Science and Engineering C*, pp 555-565, (2014)
27. Rainer Detsch and Aldo R. Boccaccini, The role of osteoclasts in bone tissue engineering, *J Tissue Eng Regen Med*, pp 1133-1149, (2015)
28. Lu T, Li Y, Chen T, Techniques for fabrication and construction of three-dimensional scaffolds for tissue engineering, *Int J Nanomedicine*, (2013)
29. Park JY, Park SH, Kim MG, Park SH, Yoo TH, Kim MS. Biomimetic Scaffolds for Bone Tissue Engineering, *Adv Exp Med Biol*, pp 109-121, (2018)
30. Carletti E, Motta A, Migliaresi C, Scaffolds for tissue engineering and 3D cell culture, *Methods Mol Biol.* (2011)
31. Ikada Y. ,*Tissue Engineering: Fundamentals and Applications*, Interface Science and Technology, (2006)
32. Narayan R, Bose S, Bandyopadhyay, *Biomaterials Science: Processing, Properties, and Applications V*, Ceramic Transactions, (2015)
33. Ramalingam M., *Integrated Biomaterials in Tissue Engineering*, Biomaterials Science, Engineering and Technology, (2012)
34. Wang M., *Biomaterials for Implants and Scaffolds*, Biomaterials Science and Engineering, (2017)
35. Susmita Bose, Mangal Roy, and Amit Bandyopadhyay, Recent advances in bone tissue engineering scaffolds, *Trends Biotechnol.*, pp 546-554, (2012)
36. Jan Henkel, Maria A. Woodruff, Devakara R. Epari, Roland Stec, Vaida Glatt, Ian C. Dickinson, Peter F.M. Choong, Michael A. Schuetz, Dietmar W. Hutmacher, Bone Regeneration Based on Tissue Engineering Conceptions – A 21st Century Perspective, *Bone Research*, pp 216-248, (2013)
37. Qiu Li Loh and Cleo Choong, Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering Applications: Role of Porosity and Pore Size, *Tissue Eng Part B Rev.*, pp 485-502, (2013)
38. Zhang L. G., Fisher J. P., Leong K. W., *3D Bioprinting and Nanotechnology in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, (2015)

39. Turksen K., Bioprinting in Regenerative Medicine, *Stem Cell Biology and Regenerative Medicine*, (2015)
40. Atala A., Yoo J. J., *Essentials of 3D Biofabrication and Translation*, (2015)
41. Huang Y., Leu M. C., Mazumder J., Donmez A., *Additive Manufacturing: Current State, Future Potential, Gaps and Needs, and Recommendations*, *J. Manufact. Sc Eng.*, (2015)
42. B. Athayde Malafaya, M.C. Marques, I.A. Ferreira, M.M.F. Machado, G.A.R. Caldas, J. Belinha, F.J.L. Alves, R.M. Natal Jorge, *Additive Manufacturing from a Biomedical Perspective*, 6th IEEE Portuguese Meeting on Bioengineering, (2019)
43. Mohd. Javaid Abid Haleem, *Additive manufacturing applications in medical cases: A literature based review*, *Alexandria Journal of Medicine*, pp 411-422, (2018)
44. Gardan J., *Additive Manufacturing Technologies: State of the Art and Trends*, *Int J Production Research*, pp 3118-3132, (2016)
45. Carlos Mota, Dario Puppi, Federica Chiellini, Emo Chiellini, *Additive manufacturing techniques for the production of tissue engineering constructs*, *J Tissue Eng Regen Med*, (2012)
46. Levy RA, Chu TM, Halloran JW, *CT-generated porous hydroxyapatite orbital floor prosthesis as a prototype bioimplant*. *J Neuroophthalmol* pp 1522–152, (1999)
47. Sharda Gupta & Akalabya Bissoyi & Arindam Bit, *A Review on 3D Printable Techniques for Tissue Engineering*, *BioNanoScience*, pp 868-883,(2018)
48. Vivian K. Lee, and Guohao Dai, *Printing of Three-Dimensional Tissue Analogs for Regenerative Medicine*, *Ann Biomed Eng*, pp 115-131, (2017)
49. Yan Li , Dichen Li , Bingheng Lu , Dajing Gao , Jack Zhou, *Current status of additive manufacturing for tissue engineering scaffold*, *Rapid Prototyping Journal*, (2015)
50. Gianluca Ciardelli, Valeria Chiono Giovanni Vozzi, Mariano Pracella, Arti Ahluwalia, Niccoletta Barbani, Caterina Cristallini, and Paolo Giusti, *Blends of Poly-(E-caprolactone) and Polysaccharides in Tissue Engineering Applications*, *Biomacromolecules*, pp 1961-1976, (2005)
51. Xiaohong Wang , Qiang Ao, Xiaohong Tian, Jun Fan, Yujun Wei, Weijian Hou, Hao Tong and Shuling Bai ,*3D Bioprinting Technologies for Hard Tissue and Organ Engineering*, *Materials*, (2016)
52. Xin Wang, Man Jiang, Zuowan Zhou, Jihua Gou, David Hui, *3D printing of polymer matrix composites: A review and prospective*, *Composites*, pp 442-458, (2016)
53. Mohsen Soori, *Applications of Additive Manufacturing to Tissue Engineering*, (2019)
54. Skardal A, Atala A., *Biomaterials for Integration with 3-D Bioprinting*, *Annals of Biomedical Engineering*, pp 730–746, (2015)
55. Daniel Tang, Rahul S. Tare, Liang-Yo Yang, David F. Williams, Professor Keng-Liang Ou, Professor Richard O.C. Oreffo, *Biofabrication of bone tissue: Approaches, challenges and translation for bone regeneration*, *Biomaterials*, (2015)
56. Domingos M., Chiellini F., Bartolo P., Chiellini E., *Effect of process parameters on the morphological and mechanical properties of 3D Bioextruded poly(1-caprolactone) scaffolds*, *Rapid Prototyping Journal*, pp 56-67, (2012)
57. Ibrahim M. El-Sherbiny, Magdi H. Yacoub, *Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges*, *Global Cardiology Science and Practice*, (2013)
58. Tae-Sik Jang, Hyun-Do Jung, Houwen Matthew Pan, Win Tun Han, Shengyang Chen, Juha Song *3D printing of hydrogel composite systems: Recent advances in technology for tissue engineering*, *Int J Biorprint*, (2017)

59. Baroli B. Hydrogels for tissue engineering and delivery of tissue-inducing substances, *J Pharm Sci* pp 2197-2223, (2007)
60. Jabran Saroia, Wang Yanen, Qinghua Wei, Kun Zhang, Tingli Lu, Bo Zhang, A review on biocompatibility nature of hydrogels with 3D printing techniques, tissue engineering application and its future prospective, *Bio Design and Manufacturing*, pp 265 – 279, (2018)
61. Fatemeh Asghari, Mohammad Samiei, Khosro Adibkia, Abolfazl Akbarzadeh & Soodabeh Davaran, Biodegradable and biocompatible polymers for tissue engineering application: a review, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, (2017)
62. Maissa Jafari, Zahrasadat Paknejad, Maryam Rezai Rad, Saeed Reza Motamedian, Mohammad Jafar Eghbal, Nasser Nadjmi Arash Khojasteh, Polymeric scaffolds in tissue engineering: a literature review, *J Biomed Mater Res*, pp 431-459, (2017)
63. Stuart Kyle, Zita M. Jessop, Ayesha Al-Sabah, and Iain S. Whitaker, 'Printability' of Candidate Biomaterials for Extrusion Based 3D Printing: State-of-the-Art, *Adv Healthcare Mater*, (2017)
64. Tomasz Jungst<sup>\*,†,§</sup> Willi Smolan<sup>†,§</sup> Kristin Schacht<sup>‡</sup> Thomas Scheibel<sup>‡</sup> and Jürgen Groll<sup>\*,†</sup> Strategies and Molecular Design Criteria for 3D Printable Hydrogels, *Chem Rev*, pp 1496-1539, (2016)
65. Udayabhanu Jammalamadaka \* and Karthik Tappa, Recent Advances in Biomaterials for 3D Printing and Tissue Engineering. *J Funct Biomat*, (2018)
66. Tyler K. Merceron, and Sean V. Murphy, Hydrogels for 3D Bioprinting Applications, (2015)
67. Murat Guvendiren<sup>\*,†,‡</sup>, Joseph Molde<sup>†,‡</sup>, Rosane M.D. Soares<sup>§</sup>, and Joachim Kohn<sup>‡</sup>, Designing Biomaterials for 3D Printing, *Biomater Sci Eng*, pp 1679-1693, (2016)
68. S. Kyle<sup>\*</sup>, Z.M. Jessop<sup>\*,†</sup>, S.P. Tarassoli<sup>‡</sup>, A. Al-Sabah<sup>\*</sup>, I.S. Whitaker, Assessing printability of bioinks, *3D Bioprinting for Reconstructive Surgery*, (2018)
69. Chang CC, Boland ED, Williams SK, Hoying JB. Direct-write bioprinting three-dimensional biohybrid systems for future regenerative therapies. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2011;98(1):160–70.
70. Hockaday LA, Kang KH, Colangelo NW, Cheung PY, Duan B, Malone E, et al. Rapid 3D printing of anatomically accurate and mechanically heterogeneous aortic valve hydrogel scaffolds. *Biofabrication* 2012;4(3):035005.
71. Zhengyi Zhang, Yifei Jin, Jun Yin, Changxue Xu, Ruitong Xiong Kyle Christensen, Bradley R. Ringeisen, Douglas B. Chrisey, and Yong Huang, Evaluation of bioink printability for bioprinting applications, *Applied Physics Reviews*, (2018)
72. Huijun Li, Cavin Tan, Lin Li, Review of 3D printable hydrogels and constructs, *Materials and Design*, (2018)
73. He Y, Yang F, Zhao H, Gao Q, Xia B, Fu J. Research on the printability of hydrogels in 3D bioprinting. *Sci Rep* 2016;6:29977.
74. Sanjay Tiwari, Rahul Patil and Pratap Bahadur, Polysaccharide Based Scaffolds for Soft Tissue Engineering Applications, *Polymers*, (2019)
75. Ferdous Khan,\* Sheikh Rafi Ahmad, Polysaccharides and Their Derivatives for Versatile Tissue Engineering Application, *Macromol Biosci*, pp 395-421, (2013)
76. Anamika R. Pandey & Upasana S. Sing & Munira Momin & Chintan Bhavsar, Chitosan: Application in tissue engineering and skin grafting, *J Polym Res*, (2016)
77. Shakeel Ahmed, Annu, Javed Sheikh, Akbar Ali, A review on chitosan centred scaffolds and their applications in tissue engineering, *Biological Macromolecules*, (2018)

78. M. Dasha, F. Chiellini, R.M. Ottenbrite, E. Chiellini, Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications, *Progress in Polymer Science*, pp 981-1014, (2011)
79. Sheeny K. Lan Levengood and Miqin Zhang, Chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering, *J Mater Chem*, (2014)
80. A. Muxika, A. Etxabide, J. Uranga, P. Guerrero, K. de la Caba, Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications, *International Journal of Biological Macromolecules*, pp 1358-1368, (2017)
81. Florence Croisier, Christine Jérôme, Chitosan-based biomaterials for tissue engineering, *European Polymer Journal*, pp 780-792, (2013)
82. Anupriya Baranwal, Ashutosh Kumar, A. Priyadarshini, Gopi Suresh Oggu, Ira Bhatnagar, Ananya Srivastava, Pranjal Chandra, Chitosan: An undisputed bio-fabrication material for tissue engineering and bio-sensing applications, *International Journal of Biological Macromolecules*, pp 110-123, (2018)
83. Hu Q, Li B, Wang M, Shen J. Preparation and characterization of biodegradable chitosan/hydroxyapatite nanocomposite rods via in situ hybridization: a potential material as internal fixation of bone fracture. *Biomaterials* 2004;25:779–85.
84. Demirtaş TT1, Irmak G, Gümüşderelioğlu M, A bioprintable form of chitosan hydrogel for bone tissue engineering, *Biofabrication*, (2017)
85. Stone CA, Wright H, Devaraj VS, Clarke T, Powell R, Healing at skin graft donor sites dressed with chitosan *Brit J Plast Surg* 53:601–606, (2000)
86. Soon Mo Choi, Prerna Chaudhry, Sun Mi Zo, and Sung Soo Han *Advances in Protein-Based Materials: From Origin to Novel Biomaterials, Cutting-Edge Enabling Technologies for Regenerative Medicine, Advances in Experimental Medicine and Biology*, pp 161-210, (2018)
87. Alexandra L. Rutz and Ramille N. Shah, Protein-Based Hydrogels, *Polymeric Hydrogels as Smart Biomaterials*, pp 73 – 105, (2016)
88. C. F. Marques, G. S. Diogo, S. Pina, J. M. Oliveira, T. H. Silva, R. L. Reis, Collagen-based bioinks for hard tissue engineering applications: a comprehensive review, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, (2019)
89. Xiaohong Wang,, Qiang Ao, Xiaohong Tian, Jun Fan, Hao Tong , Weijian Hou and Shuling Bai, Gelatin-Based Hydrogels for Organ 3D Bioprinting, *Polymers*, (2017)
90. Josias H. Hamman, Chitosan Based Polyelectrolyte Complexes as Potential Carrier Materials in Drug Delivery Systems, *Mar Drugs*, pp 1305 – 1322, (2010)
91. Jaipan P., Nguyen A., Narayan R., Gelatin-based hydrogels for biomedical applications, *MRS Communications*, pp 416-426, (2017)
92. Thomas Billiet, Elieen Gevaert, Thomas De Schryver, Maria Cornelissen, Peter Dubruel, The 3D printing of gelatin methacrylamide cell-laden tissue-engineered constructs with high cell viability, *Biomaterials*, pp 49 – 62, (2014).
93. Kai Su . Chunming Wang, Recent advances in the use of gelatin in biomedical research, *Biotechnol Lett*, pp 2139-2145, (2015)
94. M.C. Echave , P. Sanchez, J.L. Pedraz, G. Orive, Progress of gelatin-based 3D approaches for bone regeneration, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, pp 63-74, (2017)
95. I.R. Serra, R. Fradique, M.C.S. Vallejo, T.R. Correia, S.P. Miguel, I.J. Correia, Production and characterization of chitosan/gelatin/ $\beta$ -TCP scaffolds for improved bone tissue regeneration, *Materials Science and Engineering*, pp 592-604, (2015)

96. Jaya Maitra\*, Vivek Kumar Shukla, Cross-linking in Hydrogels - A Review, *American Journal of Polymer Science*, pp 25-31, (2014)
97. Weikang Hu,†a,b Zijian Wang,†c,d Yu Xiao,c,d Shengmin Zhanga and Jianglin Wang,Advances in crosslinking strategies of biomedical hydrogels, *Biomaterials Science*, (2018)
98. Narendra Reddy, Roopa Reddy, and Qiuran Jiang, Crosslinking biopolymers for biomedical applications, *Cell Press*, (2015)
99. W.E. Hennink, C.F. van Nostrum, Novel crosslinking methods to design hydrogels, *Advanced Drug Delivery Reviews*, pp 223-236, (2012)
100. Ahmad Oryan, Amir Kamali, Ali Moshiri, Hossien Baharvand, Hamed Daemi, Chemical crosslinking of biopolymeric scaffolds: Current knowledge and future directions of crosslinked engineered bone scaffolds, *International Journal of Biological Macromolecules*, (2017)
101. Bencha Thongnuanchan, Rattanawadee Ninjan, Ekwipoo Kalkornsurapranee, Natinee Lopattananon, Charoen Nakason, Glutaraldehyde as Ambient Temperature Crosslinking Agent of LatexmFilms from Natural Rubber Grafted with Poly(diacetone acrylamide), *Journal of Polymers and the Environment*, (2018)
102. 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 pp 741-771, (1987)
103. Carsten Englert, Torsten Blunk, Rainer Mülle, Sabine Schulze von Glasser, Julia Baumer, Johann Fierlbeck, Iris M Heid, Michael Nerlich and Joachim Hammer, Bonding of articular cartilage using a combination of biochemical degradation and surface cross-linking, *Arthritis Research & Therapy* (2007)
104. Riccardo A. A. Muzzarelli , Mohamad El Mehtedi, Carlo Bottegoni, Alberto Aquili and Antonio Gigante, Genipin-Crosslinked Chitosan Gels and Scaffolds for Tissue Engineering and Regeneration of Cartilage and Bone, *Mar Drugs*, pp 7314-7338, (2015)
105. Butler M., Yiu-Fai NG., Pudney P., Mechanism and Kinetics of the Crosslinking Reaction between Biopolymers Containing Primary Amine Groups and Genipin, *Journal of Polymer Science*, pp 3941-3963, (2003)
106. 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 pp 1571-1578, (1994)
107. 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 pp 1985–2000, (2005)
108. 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, pp 63–78, (1999)
109. W.H. Chang, Y. Chang, P.H. Lai, H.W. Sung. A genipin-crosslinked gelatin membrane as wound-dressing material: in vitro and in vivo studies, *J. Biomater. Sci. Polymer Edit.* 14 pp 481-495, (2003)
110. M.E. Frohbergh, A. Katsman, G.P. Botta, P. Lazarovici, C.L. Schauer, U.G.K. Wegst, P.I. Lelkes, Electrospun hydroxyapatite-containing chitosan nanofibers crosslinked with genipin for bone tissue engineering, *Biomaterials*, (2012)



111. Yao C.-H., Liu B.-S., Hsu, S.-H., Chen, Y.-S., & Tsai, C.-C. Biocompatibility and biodegradation of a bone composite containing tricalcium phosphate and genipin crosslinked gelatin. *Journal of Biomedical Materials Research*, pp 709–717, (2004)
112. 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.
113. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. Karageorgiou, V. and D. Kaplan, *Biomaterials*, 2005. 26(27): p. 5474-5491
114. 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering Gareth Turnbull, Jon Clarke, Frederic Picard Philip Riches, Luanluan Ji, Fengxuan Han, Bin Li, Wenmiao Shu
115. Biofabrication of bone tissue: Approaches, challenges and translation for bone regeneration Daniel Tang, Rahul S. Tare, Liang-Yo Yang, David F. Williams, Professor Keng-Liang Ou, Professor Richard O.C. Oreffo
116. Χαριτίδης, Κ.Α., *Νανοδομές και Νανοϋλικά: Σύνθεση, Ιδιότητες και Εφαρμογές*. 2007, Αθήνα: Εκδόσεις ΕΜΠ. σσ.107-142.
117. Chudoba, T., Measurement of Hardness and Young’s Modulus by Nanoindentation, in *Book Nanostructured Coatings*, ed. A.C.a.J.T.M.D. Hosson. 2006: Springer
118. Development of gelatin-chitosan hydroxyapatite based bioactive bone scaffold with controlled pore size and mechanical strength Kanchan Maji, Sudip Dasgupta, Biswanath Kundu & Akalaby Bissoyi
119. Mechanical properties of porous ceramic scaffolds: Influence of internal dimensions I. Sabree, J.E. Gough, B. Derby
120. Low temperature additive manufacturing biomimic three-dimensional hydroxyapatite/collagen scaffolds for bone regeneration Kai-Feng Lin, Shu He, Yue Song, Chun-Mei Wang, Yi Gao, Jun-Qin Li, Peng Tang, Zheng Wang, Long Bi, and Guo-Xian Pei
121. Bone Tissue Engineering: 3D PCL-based nanocomposite scaffolds with tailored properties Dante Ronca, Francesco Langella, Marianna Chierchia, Ugo D’Amora, Teresa Russo, Marco Domingos, Antonio Gloria, Paulo Bartolo, Luigi Ambrosio
122. Micro-porous composite scaffolds of photocrosslinked poly(trimethylene carbonate) and nano-hydroxyapatite prepared by low temperature extrusion-based additive manufacturing Mike A. Gevena, Christoph Sprecherb, Olivier Guillaumeb, David Eglinb and Dirk W. Grijpma
123. Direct 3D Printing of High Strength Biohybrid Gradient Hydrogel Scaffolds for Efficient Repair of Osteochondral Defect Fei Gao, Ziyang Xu, Qingfei Liang, Bo Liu, Haofei Li, Yuanhao Wu, Yinyu Zhang, Zifeng Lin, Mingming Wu, Changshun Ruan,\* and Wenguang Liu

## Βιογραφικό Σημείωμα

Ζαφείρη Κωνσταντίνου

Φυσικός Εφαρμογών Ε.Μ.Π.

### Προσωπικές Πληροφορίες

Ημερομηνία Γέννησης	22- 11- 1992
Τόπος Γέννησης	Αθήνα, Ελλάδα
Οικογενειακή Κατάσταση	Άγαμος
Διεύθυνση Κατοικίας	Ιωάννου Πολέμη 6, Μαρούσι, Αθήνα, 15126
Τηλέφωνα	210 – 8055468, 6973608940
E-mail	kostaszafeiris@gmail.com

### Επαγγελματική Εμπειρία

01.09.2017-31.10.2017

#### Πρακτική Άσκηση

Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών  
Ινστιτούτο Θεωρητικής και Φυσικής Χημείας,  
Εργαστήριο Φασματοσκοπικών Εφαρμογών,  
Αθήνα (Ελλάδα)  
*Μη-παρεμβατική συλλογή δεδομένων και εφαρμογή τους σε προβλήματα χαρακτηρισμού βιομηχανικών υλικών με χρήση τεχνικών δονητικής φασματοσκοπίας.*

### Εκπαίδευση

2017-σήμερα

ΔΠΜΣ «Επιστήμη και Τεχνολογία Υλικών»,  
Σχολή Χημικών Μηχανικών, Ε.Μ.Π.

2010-2017

Σχολή Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και  
Φυσικών Επιστημών, Ε.Μ.Π.  
Βαθμός Πτυχίου: Λίαν καλώς 7.07  
Κατεύθυνση: Φυσικό Εφαρμογών  
Ροές: Προηγμένα Τεχνολογικά Υλικά,  
Πυρηνική Φυσική και Στοιχειώδη Σωματίδια  
**Πτυχιακή Εργασία**  
Τίτλος: *Μελέτη μοριακής δυναμικής και μεταπτώσεων φάσης σε ενυδατωμένα υβριδικά δίκτυα ζελατίνης και υαλουρονικού οξέος*

Επιβλέπων: Κυρίτσης Απόστολος,  
Αν. Καθηγητής  
Βαθμός: 10

2007-2010

6<sup>ο</sup> Ενιαίο Λύκειο Αμαρουσίου  
Βαθμός απολυτηρίου: 18.2

## Γλώσσες

1. Ελληνικά (Μητρική)
2. Αγγλικά (Certificate of Proficiency)
3. Γαλλικά (B2)

## Δημοσιεύσεις

### Επιστημονικά Περιοδικά

- **Dynamics of hydration water in gelatin and hyaluronic acid hydrogels.** *S.Kripotou, K. Zafeiris, M. C. Martinez, G. G. Ferrer, A. Kyritsis, The European Physical Journal E, Polymers and Polyelectrolytes, 42:109 (2019), IF: 3.770*  
<https://doi.org/10.1140/epje/i2019-11871-2>
- **Morphology and molecular dynamics investigation of low molecular weight PDMS adsorbed onto Stober, fumed, and sol-gel silica nanoparticles.** *P. Klonos, Yu. Bolbukh, C.S. Koutsiara, K. Zafeiris, O.D. Kalogeri, D. Sternik, A. Deryło - Marczevska, V. Tertykh, P. Pissis, Polymer 148, 1-13 (2018), IF: 1.440*  
<https://doi.org/10.1016/j.polymer.2018.06.019>

### Συνέδρια

- **ΜΕΛΕΤΗ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΤΡΙΔΙΑΣΤΑΤΗΣ ΕΚΤΥΠΩΣΗΣ, ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΚΑΙ ΒΙΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ ΥΒΡΙΔΙΚΩΝ ΥΔΡΟΓΕΛΩΝ ΩΣ ΙΚΡΙΩΜΑΤΑ ΟΣΤΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ**  
*K. Ζαφείρης, Α. Καρατζά, Δ. Μπρασινίκα, Κ. Κυριακίδου, Η. Κούμουλος, Κ. Χαριτίδης (12<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Επιστημονικό Συνέδριο Χημικής Μηχανικής (20-31 Μαΐου Αθήνα, 2019-Αναρτημένη Εργασία)*

Η παραπάνω αναρτημένη εργασία προέκυψε κατά την διεκπεραίωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας.