

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΤΟΜΕΑΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΩΝ ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΩΝ

# ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

# Τρισδιάστατη Εκτύπωση Ικριωμάτων από PCL με Ετερογενή Μεγέθη Πόρων για την Αναγέννηση Ιστών

# ΜΑΝΟΥ ΝΙΚΟΛΕΤΤΑ

Επιβλέπων: Γ.Χ. Βοσνιάκος

Καθηγητής Ε.Μ.Π.

ΑΘΗΝΑ ΙΟΥΛΙΟΣ 2022

i

Υπεύθυνη δήλωση για λογοκλοπή και για κλοπή πνευματικής ιδιοκτησίας:

Έχω διαβάσει και κατανοήσει τους κανόνες για τη λογοκλοπή και τον τρόπο σωστής αναφοράς των πηγών που περιέχονται στον οδηγό συγγραφής Διπλωματικών Εργασιών. Δηλώνω ότι, από όσα γνωρίζω, το περιεχόμενο της παρούσας Διπλωματικής Εργασίας είναι προϊόν δικής μου εργασίας και υπάρχουν αναφορές σε όλες τις πηγές που χρησιμοποίησα.

Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σε αυτή τη Διπλωματική εργασία είναι του συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευθεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις της Σχολής Μηχανολόγων Μηχανικών ή του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

Μάνου Νικολέττα

Η εκπόνηση μιας διπλωματικής εργασίας αποτελεί ένα δημιουργικό ταξίδι που παράλληλα απαιτεί χρόνο και αφοσίωση. Φτάνοντας στο τέλος των σπουδών μου και ολοκληρώνοντας αυτό το τελευταίο κομμάτι, θα ήθελα να ευχαριστήσω εκείνους τους ανθρώπους που αποτέλεσαν για εμένα πηγή βοήθειας, δύναμης και υποστήριξης.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά των επιβλέποντα καθηγητή μου Γιώργο Χ. Βοσνιάκο, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλη την διάρκεια της παρούσας εργασίας. Η καθοδήγηση που έλαβα, σε συνδυασμό την ευγενική του παρουσία, συντέλεσαν στην δημιουργία μιας εξαιρετικής συνεργασίας, αλλά και στην ομαλή πραγματοποίηση αυτού του εγχειρήματος. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω των Δρ. Πρωτεσίλαο Κωστάζο για την ανιδιοτελή βοήθεια του και για την ανεκτίμητη συμβολή του στην πραγματοποίηση των μηχανικών δοκιμών.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Λεωνίδα Αλεξόπουλο που με δέχθηκε στο εργαστήριο του, αλλά και τα μέλη του εργαστηρίου, για τις συμβουλές και τις γνώσεις που μου προσέφεραν. Φυσικά, δεν θα μπορούσα να παραλείψω να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Έξαρχο, καθώς η πραγματοποίηση της κυτταρικής καλλιέργειας θα ήταν αδύνατη χωρίς εκείνον.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου για όλη την υποστήριξη και την αγάπη που μου προσέφεραν αυτά τα χρόνια, αλλά και τις αδελφές μου, που αποτελούν για εμένα πηγή δύναμης. Ένα μεγάλο ευχαριστώ ανήκει στον Γιώργο, στους φίλους και στους συμφοιτητές μου, που με συντρόφεψαν και με στήριξαν όλα αυτά τα όμορφα φοιτητικά χρόνια.

iv

# Περίληψη

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματεύεται τον σχεδιασμό και την κατασκευή ικριωμάτων (Scaffolds) Πολυκαπρολακτόνης (PCL) με ομοιογενή και ετερογενή μεγέθη πόρων, με τη μέθοδο του 3D Printing, στα πλαίσια του πεδίου της Αναγεννητικής Ιατρικής για την ενίσχυση της μηχανικής των οστών και την αναγέννηση οστού.

Τα ικριώματα ενεργούν ως μια προσωρινή συνθετική εξωκυττάρια μήτρα (ECM) που αλληλοεπιδρά με τα κύτταρα προς το σχηματισμό ενός νέου ιστού. Υπάρχει μια σειρά βασικών προϋποθέσεων κατασκευής λειτουργικών ικριωμάτων, όπως είναι η βιοσυμβατότητα, η βιοαποικοδόμηση, οι μηχανικές ιδιότητες και η αρχιτεκτονική του ικριώματος. Το PCL είναι ένα βιοπολυμερές, το οποίο αποτελεί ένα εξαιρετικό υλικό για βιοϊατρικές εφαρμογές, λόγω της βιοσυμβατότητας και του αργού ρυθμού βιοαποικοδόμησης του. Παράλληλα, εμφανίζει τις απαιτούμενες μηχανικές ιδιότητες καθιστώντας το ένα πολλά υποσχόμενο υλικό, για την επιδιόρθωση και αναγέννηση οστικού ιστού.

Για την διεκπεραίωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας σχεδιάστηκαν τρία είδη ικριωμάτων με ίδια αρχιτεκτονική δομή, αλλά με διαφορετικό μέγεθος πόρων, προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της κατανομής πόρων με διαφορετικό μέγεθος, στο μηχανικό και βιολογικό περιβάλλον του ικριώματος. Το πρώτο ικρίωμα αποτελείται από ομοιογενή μεγέθη πόρων 300μm, το δεύτερο από ομοιογενή μεγέθη πόρων 500μm, ενώ το τρίτο αποτελείται από τον συνδυασμό των δύο προαναφερθέντων πόρων 300μm - 500μm. Μετά τον σχεδιασμό των ικριωμάτων, ακολούθησε ο προσδιορισμός των βέλτιστων παραμέτρων εκτύπωσης, ύστερα από μια σειρά πειραματικών δοκιμών.

Στην συνέχεια, αφού σχεδιάστηκαν τα ικριώματα και δημιουργήθηκε το αρχείο G-code μέσα από το λογισμικό σχεδιασμού τροχιάς Ultimaker Cura, με την χρήση του 3D printer της εταιρίας Anycubic και ενός ακροφυσίου 0.3mm, εκτυπωθήκαντατρία είδη ικριωμάτων, προκειμένου να τεθούν σε μια σειρά δοκιμών και να ληφθούν απαιτούμενες μετρήσεις. Ο χαρακτηρισμός των ικριωμάτων εμπεριέχει τον υπολογισμό του πορώδους που εμφανίζουν και την παρατήρηση τους σε στερεοσκόπιο, ώστε να ληφθούν βασικές σχεδιαστικές παράμετροι των ικριωμάτων. Προκειμένου να αξιολογηθούν τα ικριώματα ως προς τις μηχανικές τους ιδιότητες, υποβλήθηκαν σε μηχανικές δοκιμές Θλίψης και Εφελκυσμού. Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν την επίδραση της ύπαρξης πόρων διαφορετικού μεγέθους στην μηχανική του ικριώματος. Το ικρίωμα που έχει κατανομή με διαφορετικό μέγεθος πόρων, εμφάνισε βελτιωμένες εφελκύστηκες ιδιότητες και ενθαρρυντικές θλιπτικές.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε κυτταρική καλλιέργεια με την χρήση της κυτταρικής σειράς HepG2, προκειμένου να αξιολογηθεί η απορροφητικότητα θρεπτικού υγρού, αλλά και η αποτελεσματικότητα εμφύτευσης των κυττάρων (seeding efficiency), μεταξύ των τριών διαφορετικών δομών. Η επίδραση των διαφορετικών πόρων μεταξύ των τριών δομών στην αποτελεσματικότητα εμφύτευσης των κυττάρων και στην απορροφητικότητα θρεπτικού υγρού, ήταν εμφανής και εκεί.

## Title: 3D Printing of PCL Scaffolds with Heterogenous Pore Size for Living tissue Regeneration

This thesis aims to design and manufacture Polycaprolactone (PCL) scaffolds with heterogenous pore size for bone tissue regeneration, with the method of 3D printing. PCL is a biopolymer which constitutes an excellent material for biomedical applications due to its biocompatibility and slow biodegradation rate, while exhibiting desirable mechanical properties, making it a promising material for bone tissue repair and regeneration.

In order to evaluate the influence of heterogenous pore size on the mechanical and biological behavior of the scaffolds, three types of scaffolds were designed with the same architectural structure and with different pore size. The first scaffold consists of homogeneous pores of 300 $\mu$ m, the second of homogeneous pores of 500 $\mu$ m, while the third one consists of the combination of the two aforementioned pores of 300 $\mu$ m - 500 $\mu$ m. Through a series of experimental tests, the optimal printing parameters were determined.

Afterwards, the G-code files were created for each one of the scaffolds with the usage of the Slicing Software Ultimaker Cura and the scaffolds were printed using an Anycubic 3D printer and a 0.3mm nozzle. The characterization of the scaffolds follows, which includes the calculation of their porosity and the observation in a stereoscope, in order to obtain basic design parameters of the scaffolds.

The mechanical properties of the scaffolds were determined after subjected them to Mechanical Compression and Tensile tests. The results confirmed the influence of heterogeneous pore size on the scaffolds's mechanical properties. Finally, a cell culture was held using the HepG2 cell line, in order to evaluate the liquid absorption and also the scaffolds's seeding efficiency, between the three different structures.

# Ακρωνύμια

3D	Three Dimensional
AM	Additive Manufacturing
CAD	Computer-aided Design
ECM	Extracellular Matrix
FD	Filament Distance
FDM	Fused Deposition Modeling
FG	Filament Gap
LG	Layer Gap
PCL	Polycaprolactone -Πολυκαπρολακτόνη
RP	Rapid Prototyping
RW	Road Width
ST	Slice Thickness
STL	Standard Triangle Language
TE	Tissue Engineering

# Πίνακας Περιεχομένων

Ευχαριστίες		iv
Περίληψη		vi
Abstract		viii
Ακρωνύμια		x
Ευρετήριο Εικ	όνων	xvi
Ευρετήριο Πιν	άκων	xx
Ευρετήριο Δια	γραμμάτων	xxii
1 Εισαγωγ	/ή	1
1.1 Αναγ	εννητική Ιατρική	1
1.2 Ootu	τή Αναγέννηση	3
1.3 Avat	ομία των Οστών	4
1.4 Ικριώ	ματα (Scaffolds)	6
1.4.1	Ικριώματα Αναγέννησης Ιστών σε Οστά	8
1.4.2	Βιοσυμβατότητα Ικριωμάτων	9
1.4.3	Βιοαποικοδόμηση Ικριωμάτων	9
1.5 Μέθο	δος ταχείας εκτύπωσης FDM	
1.5.1	Χρήση της μεθόδου FDM για Ικριώματα Βιοϊατρικών Εφαρμογών	11
1.6 Εστία	ιση Παρούσας Διπλωματικής εργασίας	
1.6.1	Επιλογή Υλικού: Πολυκαπρολακτόνη (PCL)	13
1.7 Ζήτη	ση Οστικών Εμφυτευμάτων	16
2 Βιβλιογρ	ραφική Ανασκόπηση	17
2.1 Дорик	κός σχεδιασμός ικριωμάτων	17
2.1.1	Μέγεθος των πόρων	
2.1.2	Πορώδες	19
2.1.3	Διασυνδεσιμότητα και Διαπερατότητα πόρων	20

2.1.4	Προσανατολισμός των στρώσεων ικριώματος	22
2.1.5	Διάταξη Ινών ικριώματος	25
2.1.6	Μορφολογία των πόρων	25
2.2 Επίδρ	ραση δομικού σχεδιασμού στην Μηχανική του ικριώματος	27
2.2.1	Πορώδες	27
2.2.2	Προσανατολισμός Ινών	28
2.2.3	Διάταξη Ινών ικριώματος	30
2.2.4	Αποστάσεις μεταξύ των Ινών	31
2.2.5	Διαπερατότητα	32
2.3 Ικανά	στητα Απορρόφησης Νερού	32
3 Πειραμα	ατικές Μέθοδοι	34
3.1 Χαρα	ικτηρισμός PCL εκτύπωσης	34
3.2 Σχεδι	ασμός Ικριώματος	35
3.2.1	Επιλογή Μεγέθους Πόρων	36
3.2.2	Επιλογή Εξωτερικών Διαστάσεων	38
3.2.3	Προσανατολισμός και Διάταξη Ινών	40
3.2.4	Σχεδιασμός πορώδους δομής	42
3.2.	4.1 Μορφολογία Πόρων	42
3.2.	4.2 Ποσοστό Πορώδους	44
3.2.	4.3 Διασυνδεσιμότητα και πόρων	45
3.3 Λογιο	σμικό Σχεδιασμού Τροχιάς Slicer	45
3.4 Ektu	τωτής 3D printing	48
3.4.1	Ακροφύσιο Εκτυπωτή	48
3.4.2	Παράμετροι εκτύπωσης	50
3.4.	2.1 Θερμοκρασία Εκτύπωσης	50
3.4.	2.2 Ταχύτητα Εκτύπωσης (Printing Speed)	51
3.4.	2.3 Ταχύτητα Διαδρομής (Travel Speed)	52

<i>3.4.2.4</i> Ύψος απόθεσης υλικού (Deposition of Height)	53
3.4.2.5 Θερμοκρασία πλατφόρμας εκτύπωσης (Heating Bed)	53
<i>3.4.2.6</i> Ανεμστήρας ψύξης	54
<i>3.4.2.7</i> Ανάσυρση Νήματος (Retraction)	54
3.4.3 Τελικές παράμετροι εκτύπωσης	56
3.5 Κατασκευή και Χαρακτηρισμός ικριωμάτων	57
3.5.1 Παρατήρηση στο Στερεοσκόπιο	58
3.5.2 Υπολογισμός Πορώδους	61
4 Μηχανικές Δοκιμές	63
4.1 Δοκιμή Εφελκυσμού	64
4.1.1.1 Σχεδιασμός Ικριωμάτων Δοκιμής Εφελκυσμού	65
4.1.1.2 Αποτελέσματα Δοκιμών Εφελκυσμού	67
4.2 Δοκιμή Θλίψης	72
4.3 Ανάλυση Αποτελεσμάτων	76
5 Κυτταρική Καλλιέργεια	80
5.1 Παραματική Καλλιέργαα Κυττάρων στα Ικριώματα	
5.2 Παραματική Ικανότητα Απορρόφησης Θρεπτικού Υγρού	
5.3 Ανάλυση Κυτταρικής Καλλιέργειας στα Ικριώματα	
6 Συμπεράσματα	91
6.1 Ευρήματα	91
6.2 Μελλοντικές Επεκτάσεις	94
7 Βιβλιογραφία	97
8 Παράρτημα	104
8.1 Πίνακες Μετρήσεων	
8.2 Κατασκευαστικά Σχέδια	

# Ευρετήριο Εικόνων

Εικόνα 1.1: (α) Άνω άκρο Μηριαίου Οστού (β) Εσωτερικό του οστού όπου διακρίνεται το συμπαγές και το σπογγώδες οστό
Εικόνα 1.2: (a) Ανατομία οστού. Διακρίνεται το δοκιδωτό και το σπογγώδες οστό.[9] (b) Άνω άκρο μηριαίου οστού (αριστερά) και σχηματική απεικόνιση της αρχιτεκτονικής δομής των δοκίδων του σπογγώδες οστού σε δυναμικές γραμμές (δεξιά). [10]:5
Εικόνα 1.3: Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου FDM κατά την κατασκευή ενός ικριώματος. Το τηκόμενο PCL σε μορφή νήματος εξωθείται μέσα από ένα ακροφύσιο για την κατασκευή 3 D ικριωμάτων.[19]
Εικόνα 1.4: Σχηματική απεικόνιση αναγέννησης οστικού ιστού με την χρήση βιοαποικοδομήσιμου ικριώματος. [23]
Εικόνα 2.1: Ποσοστό πορώδες για τα διαφορετικά μεγέθη πόρων που προέκυψαν κατά την έρευνα των Mantila Roosa et al.[32]
Εικόνα 2.2: Η χαμηλή διασυνδεσιμότητα των πόρων περιορίζει την διείσδυση των κυττάρων λόγω των τυφλών σημείων (εμφανίζουν το σύμβολο '*') και των απρόσιτων πόρων (εμφανίζουν το σύμβολο '#'), ενώ η υψηλότερη διασυνδεσιμότητα παρέχει βελτιωμένη διαπερατότητα και διείσδυση κυττάρων.21
Εικόνα 2.3: Σχηματική αναπαράσταση του προσανατολισμού των στρώσεων. [25]
Εικόνα 2.4: SEM Εικόνες από την έρευνα των Iwan Zein et al. (a)-(b) ικριώματα με προσανατολισμό στρώσεων 0°-90° και μέγεθος πόρων 0.5mm , (c)-(d) με προσανατολισμό στρώσεων 0°-90° και μέγεθος πόρων 0.7mm, (e)-(f) με προσανατολισμό στρώσεων 0°-60°-120° και μέγεθος πόρων 0.5mm, (g)-(h) με προσανατολισμό στρώσεων 0°-60°-120° και μέγεθος πόρων 0.7mm. [19]
Εικόνα 2.5: SEM εικόνες από την έρευνα των Μ. Yeo et al., όπου απεικονίζονται ικριώματα με διαφορετική διάταξη ινών. [46]25
Εικόνα 2.6: (a) κυβικοί πόροι (b) τριγωνικοί πόροι (c) σύνθετοι πολυγωνικοί πόροι. [15]26
Εικόνα 2.7: (a) Πόροι σφαιρικής μορφής. (b) κυψελοειδείς πόροι [19] [47]
Εικόνα 2.8: Εικόνες από την έρευνα των Lee et al.(α) lattice (b) stagger (c) triangle. [44]28
Εικόνα 2.9:Αποτελεσματα από την δοκιμή Θλίψης που πραγματοποιήσαν οι Iwan Zein et al. σε ικριώματα από PCL με διαφορετικό προσανατολισμό στρώσεων. (a) Μέτρο Ελαστικότητας (b) Όριο διαρροής. [19]

Εικόνα 2.10:(a) Διαστάσεις Ινών από την έρευνα των Moroni et al (b) Καμπύλη μέτρου ελαστικότητας
σε σχέση με την απόσταση μεταξύ των ινών. [49]32
Εικόνα 3.1: Παράμετροι Σχεδιασμού Ικριωμάτων. [15]36
Εικόνα 3.2: Ένδειξη των συμβόλων 'k' , 'm' και 'n' που χρησιμοποιήθηκαν στις Σχέσεις 3.1 - 3.3. Το
σύμβολο k αφορά των αριθμών των ινών που τοποθετήθηκαν κατά την κατεύθυνση Ζ. Τα σύμβολα
m και n, αφορούν αντίστοιχα των αριθμό των ινών που τοποθετήθηκαν κατά τις κατεύθυνσεις X κα
Υ
Εικόνα 3.3: Προσανατολισμός των στρώσεων που επιλέχθηκε κατά τον σχεδιασμό των ικριωμάτων.
[25]
Εικόνα 3.4: (a) Πλάγια δεξιά όψη του Scaffold 1. (b) 3D όψη του Scaffold 1
Εικόνα 3.5:a) Πλάγια δεξιά όψη του Scaffold 2. b) 3D όψη του Scaffold 2
Εικόνα 3.6: (a) Πλάγια δεξιά όψη του Scaffold 3. (b) 3D όψη του Scaffold 342
Εικόνα 3.7: Κάτοψη του Scaffold 143
Εικόνα 3.8:Κάτοψη του Scaffold 243
Εικόνα 3.9: a)Άνοψη του Scaffold 3. b) Κάτοψη του Scaffold 3
Εικόνα 3.10: Προσομοίωση της εκτύπωσης των ικριωμάτων στο πρόγραμμα Ultimaker Cura
Εικόνα 3.11: Αναπαράσταση της τροχιάς του ακροφυσίου κατά την εκτύπωση των ικριωμάτων μέσα
από το λογισμικό Ultimaker Cura (a)πρώτη στρώση ινών (k=1) ,(b) δεύτερη στρώση ινών (k=2)47
Εικόνα 3.12: (a)Εκτυπωτής Anycubic I3 Mega (b)Κατευθύνσεις Κίνησης των αξόνων Χ,Υ,Ζ του
Εκτυπωτή
Εικόνα 3.13: a)Παρατήρηση στο στερεοσκόπιο του ικριώματος με το μικρότερο δυνατό μέγεθος πόρων
με την χρήση ακροφυσίου 400μm που εκτυπώθηκε. b) Ακροφύσιο 300μm που χρησιμοποιήθηκε για
την εκτύπωση των ικριωμάτων
Εικόνα 3.14: Σχετική θέση ακροφυσίου-στρώσης (a) Λανθασμένη (b) Συνιστώμενη. [11]53
Εικόνα 3.15: (α) Εσωτερική δομή των ινών στα ικριώματα κατά την εκτύπωση (Line Infill Pattern) (b)
Κάθε ίνα των ικριωμάτων αποτελείται από 3 στρώσεις (layers) υλικού
Εικόνα 3.16: Παράδειγμα πολλαπλών παράλληλων εκτυπώσεων ικριωμάτων. [19]
Εικόνα 3.17: Τελικά ικριώματα που εκτυπώθηκαν a) Scaffold 1, b) Scaffold 2, c) Scaffold 3

Εικόνα 3.18: Εικόνα από το Στερεοσκόπιο του Scaffold 1 α)πλάγια δεξιά b)Κάτοψη58
Εικόνα 3.19: Εικόνα από το Στερεοσκόπιο του Scaffold 2 α)πλάγια δεξιά b)Κάτοψη58
Εικόνα 3.20: Εικόνα από το Στερεοσκόπιο του Scaffold 3 α)πλάγια δεξιά b)Κάτοψη c)Άνοψη
Εικόνα 4.1:Δοκιμή εφελκυσμού Scaffold 3 (a)Τοποθέτηση του επιμηκυνσιόμετρου μέχρι 10% της παραμόρφωσης b)Δημιουργία των πρώτων ανοιγμάτων στους πόρους c)Εξάπλωση των ανοιγμάτων d) Εδώ είναι εμφανής η μετάδοση των ανοιγμάτων κατά μήκος όλου του δοκιμίου e) Θραύση του δοκιμίου
Εικόνα 4.2: Εκτύπωση δοκιμίων εφελκυσμού66
Εικόνα 4.3: Εικόνα από το Στερεοσκόπιο για το δοκίμιο Εφελκυσμού του Scaffold 1 (a) πλάγια όψη ( b)κάτοψη
Εικόνα 4.4: Εικόνα από το Στερεοσκόπιο για το δοκίμιο Εφελκυσμού του Scaffold 2,a) πλάγια όψη b)κάτοψη
Εικόνα 4.5:Εικόνα από το Στερεοσκόπιο για το δοκίμιο Εφελκυσμού του Scaffold 3,a) πλάγια όψη b)κάτοψη67
Εικόνα 4.6: Θραύσμα από την δοκιμή Εφελκυσμού του Scaffold 1 (Στερεοσκόπιο)
Εικόνα 4.7: Θραύσμα από την δοκιμή Εφελκυσμού του Scaffold 2 (Στερεοσκόπιο)
Εικόνα 4.8: Θραύσμα από την δοκιμή Εφελκυσμού του Scaffold 3 (Στερεοσκόπιο)
Εικόνα 4.9: Δοκίμια κατά την δοκιμή Εφελκυσμού (a) Scaffold 1 (b) Scaffold 2 (c) Scaffold 370
Εικόνα 4.10: Πείραμα Δοκιμής Θλίψης Scaffold 3 στην μηχανή INSTRON 4482. (a) παραμόρφωση 0% (b) παραμόρφωση 13% (c) παραμόρφωση 27% (d) παραμόρφωση 45%. Οι πόροι 0.5mm είναι τοποθετημένοι στην πάνω πλευρά τον χαλύβδινων πλακών72
Εικόνα 4.11: Η πλήρης συμπίεση των δοκιμίων73
Εικόνα 4.12: Χαρακτηριστική καμπύλης τάσης - παραμόρφωσης ικριωμάτων από PCL.[62]74
Εικόνα 5.1:Αναπαράσταση την δομής των μικροϊνών από τις οποίες κατασκευάζονται τα ικριώματα (scaffolds) που χρησιμοποιούνται σε καλλιέργειες τριών διαστάσεων (3D) [56]
Εικόνα 5.2: α) Ικριώματα σε αιθανόλη για την αποστείρωση τους. b) Τα ικριώματα μετά την αποστείρωση τους τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό υλικό, ώστε να αποκτήσουν το ίδιο περιβάλλον με εκείνο των κυττάρων

# Ευρετήριο Πινάκων

Πίνακας 2.1: Αποτελέσματα των μηχανικών ιδιοτήτων των ικριωμάτων που εμφανίζουν διαφορετικό
προσανατολισμό ινών κατά την έρευνα των Lee et al. (Βλέπε Εικόνα 2.8) [44]
Πίνακας 3.1: Φυσικές και Χημικές Ιδιότητες από τον κατασκευαστή για το PCL που χρησιμοποιήθηκε 
Πίνακας 3.2: Επιλεγμένες παράμετροι σχεδιασμού των ικριωμάτων
Πίνακας 3.3: Σχεδιαστικά στοιχεία και διαστάσεις των ικριωμάτων
Πίνακας 3.4: Θεωρητικό πορώδες και θεωρητικοί όγκοι των ικριωμάτωνάτων το τ
Πίνακας 3.5: Πληροφορίες των αρχείων STL από τα 3D μοντέλα των ικριωμάτων46
Πίνακας 3.6: Βιβλιογραφικές αναφορές σε σχέση με τα διαφορετικά μεγέθη ακροφυσίων και διαφορετικών χαρακτηριστικών των ικριωμάτων49
Πίνακας 3.7: Εικόνες δοκιμών εκτύπωσης των ικριωμάτων κατά την διάρκεια των πειραμάτων, για διαφορετική θερμοκρασία εκτύπωσης
Πίνακας 3.8 Εικόνες δοκιμών εκτύπωσης των ικριωμάτων κατά την διάρκεια των πειραμάτων, για διαφορετική ταχύτητα εκτύπωσης
Πίνακας 3.9 Εικόνες δοκιμών εκτύπωσης των ικριωμάτων κατά την διάρκεια των πειραμάτων, για διαφορετική θερμοκρασία πλατφόρμας εκτύπωσης
Πίνακας 3.10: Εικόνες δοκιμών εκτύπωσης των ικριωμάτων κατά την διάρκεια των πειραμάτων, για διαφορετικές τιμές που σχετίζονται με την ανάσυρση του νήματος
Πίνακας 3.11: Τελικές παράμετροι εκτύπωσης των ικριωμάτων56
Πίνακας 3.12: Μετρήσεις διαστάσεων RW,FG,ST,LG,FG που ελήφθησαν μέσω του προγράμματος ImageJ
Πίνακας 3.13: Μέση τιμή και απόλυτα σφάλματα των μετρήσεων μάζας και εξωτερικών διαστάσεων για κάθε είδος των ικριωμάτων61
Πίνακας 3.14: Θεωρητικό και Πραγματικό πορώδες των ικριωμάτων
Πίνακας 4.1: Σχεδιαστικές πληροφορίες δοκιμίων Εφελκυσμού66
Πίνακας 4.2: Αποτελέσματα Μέτρου Ελαστικότητας και Ορίου Διαρροής των ικριωμάτων από την δοκιμή Εφελκυσμού

Πίνακας 8.1: Μετρήσεις μάζας, όγκων, πορώδους και εξωτερικών διαστάσεων για το Scaffol 1.....104

Πίνακας 8.3: Μετρήσεις μάζας, όγκων, πορώδους και εξωτερικών διαστάσεων για το Scaffold 2....105

Πίνακας 8.7: Μετρήσεις μάζας, όγκων, πορώδους και εξωτερικών διαστάσεων για το Scaffold 3....106

# Ευρετήριο Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 2.1: Καμπύλες τάσης - παραμόρφωσης που προέκυψαν κατά την έρευνα των Lee et al. [44] 31
Διάγραμμα 3.1: Προσδιορισμός κινδύνων του PCL σύμφωνα με τον κατασκευαστή
Διάγραμμα 3.2: Διαγραμματική απεικόνιση των μετρήσεωντων σχεδιαστικώνπαραμέτρων FD, FG,LG, RW, ST (a) Scaffold 1, (b) Scaffold 2, (c) Scaffold 3 πόροι 0.3mm, (d) Scaffold 3 πόροι 0.5mm. Οι κουκίδες αναπαριστούν τις θεωρητικές τιμές των παραμέτρων και τα σφάλματα παρουσιάζονται με τις κόκκινες γραμμές
Διάγραμμα 3.3: Πραγματικό πορώδες των ικριωμάτων που προέκυψε από τα 10 δοκίμια για κάθε είδος62
Διάγραμμα 4.1: Καμπύλη τάσης-παραμόρφωσης από την δοκιμή Εφελκυσμού του Scaffold 168
Διάγραμμα 4.2: Καμπύλη τάσης-παραμόρφωσης από την δοκιμή Εφελκυσμού του Scaffold 268
Διάγραμμα 4.3: Καμπύλη τάσης-παραμόρφωσης από την δοκιμή Εφελκυσμού του Scaffold 369
Διάγραμμα 4.4: Καμπύλες Τάσης-Παραμόρφωσης των ικριωμάτων από την δοκιμή Θλίψης
Διάγραμμα 4.5: Αποτελέσματα της δοκιμής Εφελκυσμού των ικριωμάτων α)Μέτρο Ελαστικότητας b) Όριο Διαρροής
Διάγραμμα 4.6: Συσχέτιση πορώδους με το μέτρο ελαστικότητας που προέκυψαν από την δοκιμή εφελκυσμού
Διάγραμμα 4.7: Αποτελέσματα της δοκιμής Θλίψης των ικριωμάτων α)Μέτρο Ελαστικότητας b) Όριο Διαρροής
Διάγραμμα 4.8: Συσχέτιση πορώδους με το μέτρο ελαστικότητας από την δοκιμή Θλίψης
Διάγραμμα 5.1: Απορροφητικότητα θρεπτικού υγρού των ικριωμάτων μετά το πέρας των 24 ωρών.86
Διάγραμμα 5.2: Αποτελέσματα του Seeding Efficiency για τα τρία είδη των ικριωμάτων, που ελήφθησαν από τις καλλιέργειες
Διάγραμμα 5.3: Συσχέτιση Seeding Efficiency - Πορώδους90

# 1 Εισαγωγή

# 1.1 Αναγεννητική Ιατρική

Ο όρος Αναγεννητική Ιατρική χρησιμοποιείται για να περιγράφει «Ο τομέας της Ιατρικής που αφορά την ανάπτυξη και τη χρήση στρατηγικών που στοχεύουν στην επισκευή ή την αντικατάσταση κατεστραμμένων, νοσούντων ή μεταβολικά ελλειμματικών οργάνων, ιστών και κυττάρων μέσω της μηχανικής ιστών, της μεταμόσχευσης κυττάρων και των τεχνητών οργάνων και των βιοτεχνητών οργάνων και ιστών». (National Library of Medicine,2004) [1]

Η Αναγεννητική Ιατρική ή αλλιώς η Μηχανική των Ιστών είναι ένας διεπιστημονικός τομέας που συνδυάζει τις γνώσεις και τις ικανότητες από τις επιστήμες της Βιολογίας, της Μηχανικής, της Ιατρικής, της Επιστήμης των Υλικών και της Γενετικής. Η απώλεια ή η ανεπάρκεια ενός οργάνου ή ιστού είναι αρκετά συχνή στον κόσμο της Ιατρικής και οι λόγοι που μπορεί να συμβεί αυτό ποικίλλουν. Αποτελεί ένα καταστροφικό και δαπανηρό πρόβλημα στην υγειονομική περίθαλψη. Έτσι, η ανάγκη εύρεσης υποκατάστατων προκειμένου να αντικατασταθεί ή να επιδιορθωθεί ο ιστός ή το όργανο, λόγω ασθένειας, τραύματος, ελαττώματος ή λόγου γήρας, αποτελεί μια επιτακτική ανάγκη.[1] Η Μηχανική των Ιστών έρχεται να δώσει μια νέα πνοή στην σύγχρονη Ιατρική για την αντιμετώπιση των παραπάνω προβλημάτων.

Μεγαλύτερη πρόκληση στην Μηχανική των Ιστών αποτελεί η εύρεση του κατάλληλου συνδυασμού κυττάρων, αυξητικού παράγοντα, συνθηκών καλλιέργειας και η επιλογή του κατάλληλου βιοϋλικού με τον βέλτιστο σχεδιασμό. Τα βιοϋλικά που χρησιμοποιούνται σε εφαρμογές της Μηχανικής των Ιστών έχουν την μορφή υδρογέλων, τρυβλίων ή ικριωμάτων. Αυτά μπορεί να είναι κατασκευασμένα από πολυμερή, κεραμικά, bioglass αλλά και σύνθετα υλικά ή πιο σπάνια μέταλλα φυσικής ή συνθετικής προέλευσης. [2]

Γενικές στρατηγικές για τη δημιουργία νέου ιστού της Μηχανικής των Ιστών είναι οι ακόλουθες:

- Μέθοδος Έγχυση Κυττάρων (Cell Injection Method)
- Μέθοδος Κλειστού Συστήματος (Closed-System Method)
- Μηχανική των Ιστών με χρήση Βιοϋλικών ως ικρίωμα (Tissue Engineering using Scaffold Biomaterials)

Η πιο πολλά υποσχόμενη προσέγγιση στην Μηχανική των Ιστών αποτελεί η διασπορά κυττάρων σε πορώδους δομές, οι οποίες είναι βιοαποικοδομήσιμες και βιοσυμβατές, προκειμένου να αναγεννηθεί ο ιστός. Η αναγεννητική ιατρική μπορεί να θεωρηθεί το επόμενο βήμα στην εξέλιξη της θεραπείας ή αντικατάστασης οργάνων. Οδηγείται σε μεγάλο βαθμό από τις ίδιες τις ανάγκες υγείας, όπως η μεταμόσχευση και αντικατάσταση, αλλά στοχεύει πολύ περισσότερα σε σχέση με τις παραδοσιακές προσεγγίσεις. Στοχεύει όχι μόνο την αντικατάσταση των δυσλειτουργικών ιστώνοργάνων, αλλά στο να προσφέρει τα απαραίτητα στοιχεία που απαιτούνται για την επισκευή in vivo, ώστε τα δημιουργήματα που απορρέουν από εκείνη, να ενσωματωθούν πλήρως με το ανθρώπινο σώμα.[1] Η βασική ιδέα πάνω στην οποία βασίζεται όλη η έρευνα, σύμφωνα με τον Haseltine [3], είναι ότι ο κάθε άνθρωπος έχει αναπτυχθεί από ένα μόνο κύτταρο, με την δυνατότητα να μεταμορφωθεί σε πλήρως διαμορφωμένο ενήλικα. Η κατανόηση και η αξιοποίηση αυτού του λανθάνοντος δυναμικού των κυττάρων, είναι η ουσία της Αναγεννητικής Ιατρικής. Αυτό συνεπάγεται την ανάγκη προσδιορισμού της πολυπλοκότητας της ανάπτυξης του ιστού και της ανάπτυξης των οργάνων.[1]

Τα βήματα που ακολουθούνται στην διαδικασία της Μηχανικής των Ιστών είναι τα εξής: [2]

- Τα κύτταρα ενός επιθυμητού τύπου απομονώνονται από έναν οργανισμό.
  Στην συνέχεια, μέσω τον κλασικών τεχνικών κυτταροκαλλιέργειας ενισχύονται και πολλαπλασιάζονται.
- 2. Αφού επιτευχθεί ο επιθυμητός αριθμός κυττάρων, εμποτίζονται σ' ένα σε βιοαποικοδομήσιμο ικρίωμα ή σε μια υδρογέλη. Το βιοϋλικό δίνει στα κύτταρα μια προσωρινή δομή στην οποία πολλαπλασιάζονται περαιτέρω και διαφοροποιούνται κατά σειρά, για τη δημιουργία λειτουργικών μονάδων που μοιάζουν με όργανα.

 Η ωρίμανση του κυττάρου-βιοϋλικού οδηγεί στην δημιουργία μιας λειτουργικής μάζας ιστού.

# 1.2 Οστική Αναγέννηση

Στην Αναγεννητική Ιατρική, η Αναγέννηση Ιστού προχωρά ένα βήμα παρά πέρα από την επιδιόρθωση του κατεστραμμένου ή του ιστού προς αντικατάσταση. Στην αναγέννηση το σώμα οδηγείται στην παραγωγή καινούργιων, νεαρών κυττάρων ιστών και οργάνων.[1]

Η δημιουργία νέου οστού επι ή πέριξ ενός μοσχεύματος, μπορεί να προέρχεται από κύτταρα του μοσχεύματος, δηλαδή από εκείνα που θα έχουν επιβιώσει πάνω στο μόσχευμα και μπορούν να δημιουργήσουν νέο ιστό ή από κύτταρα της δέκτριας περιοχής. Η βασική λειτουργία του σκελετικού συστήματος είναι να αντιστέκεται στην παραμορφωτική δράση λόγωτων μηχανικών φορτίσεων. [4] Κατά την ανάπτυξη του ιστού, εκτός από το βιολογικό περιβάλλον, σημαντική θέση κατέχει και το μηχανικό περιβάλλον, καθώς ο οστικός ιστός όπως και ο μαλακός, διαμορφώνεται και επαναπροσαρμόζεται μέσω κατάλληλων μηχανικών φορτίων. [5]

Τα οστά αποτελούνται από μη κυτταρικά και κυτταρικά συστατικά. Ο οστίτης ιστός περιέχει τέσσερις τύπους οστικών κυττάρων (bone cells). Σ' αυτούς ανήκουν τα αδιαφοροποίητα μεσεγχυματικά κύτταρα (stem cells), οι οστεοβλάστες (osteoblasts), οι οστεοκλάστες (osteoclasts) και τα οστεοκύτταρα (osteocytes).[6] Το οστό αποτελείται από τους οστεοβλάστες, συντηρείται από τα οστεοκύτταρα και αποδομείται από τους οστεοκλάστες. Τα αδιαφοροποίητα κύτταρα ευρίσκονται στα κανάλια των οστών, στο ενδόστεο και το περιόστεο, και με το κατάλληλο ερέθισμα διαφοροποιούνται σε οστεοβλάστες.[6] Ο οστίτης ιστός βρίσκεται αποκλειστικά στα οστά και αποτελείται από εξαιρετικά σκληρή μεσοκκυτάρια ουσία. Η ουσία αυτή περιέχει , στις κοιλότητες της, ινίδια κολλαγόνου, άλατα και κύτταρα του οστίτη ιστού, τα οστεοκύτταρα.

Η σκελετική ανάπτυξη αποτελείται από δύο ευρείς φάσεις. Η αρχική χαρακτηρίζεται ως φάση δέσμευσης κατά την οποία τα κύτταρα τα οποία θα σχηματίσουν το νέο οστό καθορίζονται σε χρόνο και χώρο. Κατά την επακόλουθη φάση πραγματοποιείται η επαγωγή των κυττάρων στους απαραίτητους κυτταρικούς

φαινοτύπους για την ουσιαστική δημιουργία του οστού (φάση δια φοροποίησης). Οι δύο αυτές φάσεις δεν αλληλοαναιρούνται. Αντιθέτως, τα κύτταρα ενός αναπτυσσόμενου ιστού διαφοροποιούνται, ανάλογα τα σήματα που δέχονται από τα γειτονικά κύτταρα ή από διάχυτους παράγοντες, καθώς και από τις αλληλοεπιδράσεις που δέχονται από την εξωκυττάρια μήτρα. [7]

# 1.3 Ανατομία των Οστών

Τα οστά, τα οποία αποτελούν τα ανθεκτικότερα βιολογικά υλικά, είναι ο κύριος στηρικτικός ιστός του σώματος. Προσφέρουν προστασία, ευελιξία, κινητικότητα και αντοχή στο ανθρώπινο σώμα. Τα οστά έχουν την ικανότητα να δέχονται μηχανικές πιέσεις πέντε φορές μεγαλύτερες από το βάρος του σώματος. Παρόλη την ανθεκτικότητα τους ωστόσο, είναι ιδιαιτέρα ελαφριά. Επιπλέον, αποτελούν ένα ζωντανό ιστό, ο οποίος μπορεί να επανορθώσει και να αναπλάσει τη δομή του όταν υποστεί εξωτερικές πιέσεις. [8]

Ανάλογα με την περιοχή που βρίσκονται και τη μηχανική λειτουργία που επιτελούν, τα οστά έχουν συγκεκριμένη μορφή. Τα βασικά είδη που διακρίνονται είναι σε μακρά και σε βραχέα αυλοειδή οστά και σε επίπεδα. Το σχήμα και η μορφή ενός οστού επηρεάζεται από τη μηχανική καταπόνηση που υφίσταται, ενώ υπάρχει δυνατότητα να υποστούν αλλαγές τα γεωμετρικά και αρχιτεκτονικά του χαρακτηριστικά, κατά την προσαρμογή του στις μεταβολές του μηχανικού του περιβάλλοντος.[4]

Με βάση τη αρχιτεκτονική των οστών, διακρίνονται σε δύο μορφές: το εξωτερικό **φλοιώδες** και συμπαγές οστούν (cortical bone) και το εσωτερικό, **σπογγώδες** και δοκιδώδες οστούν (trabecular bone). Το 80% των οστών αποτελείται από φλοιώδες οστούν. Ο συμπαγής ιστός εντοπίζεται στα τοιχώματα και στις εξωτερικές επιφάνειες του οστού. Σε περιπτώσεις ταχείας ανακατασκευής του εμφανίζεται αρχικά ως άμορφη και ακανόνιστη υφή, ως υφαντό (woven bone) που προοδευτικά αντικαθίσταται από ώριμο πεταλιώδη (lamellar) οστίτη ιστό. Ο σπογγώδης ιστός έχει κύριο χαρακτηριστικό την εμφάνιση κοιλοτήτων και δοκίδων , προσδίδοντας μια κυψελώδη μορφή στο οστό. Οι δοκίδες διατάσσονται προς διάφορες κατευθύνσεις ανάλογα με τα εκάστοτε μηχανικά φορτία και οι κοιλότητες που σχηματίζονται εξαιτίαςτων δοκίδων , περιέχουν μυελό των οστών ή λιπώδη ιστό. [4]



Εικόνα 1.1: (α) Άνω άκρο Μηριαίου Οστού (β) Εσωτερικό του οστού όπου διακρίνεται το συμπαγές και το σπογγώδες οστό.

Αυτό το είδος ιστού μπορεί να εντοπιστεί στα σώματα των σπονδύλων, στα άκρα των μακρών οστών, στα βραχέα οστά και ανάμεσα στις συμπαγείς επιφάνειες των πλατέων οστών. Ένα βασικό χαρακτηριστικό του σπογγώδους μέρος του οστού είναι ότι μπορεί να προσαρμόζει τη δομή του ως προς τις δυνάμεις που ασκούνται στον σκελετό, οι οποίες οφείλονται στην διάφορες κινήσεις του σώματος, ενώ το συμπαγές οστό δεν προσαρμόζεται. Ως αποτέλεσμα, οι δοκίδες του σπογγώδους οστού διατάσσονται κατά τις δυναμικές γραμμές των μηχανικών πιέσεων που επενεργούν στο οστό. [8][4] (Βλέπε Εικόνα 1.2b)



Εικόνα 1.2: (a) Ανατομία οστού. Διακρίνεται το δοκιδωτό και το σπογγώδες οστό. [9] (b) Άνω άκρο μηριαίου οστού (αριστερά) και σχηματική απεικόνιση της αρχιτεκτονικής δομής των δοκίδων του σπογγώδες οστού σε δυναμικές γραμμές (δεξιά). [10]:

Τα οστά παρ' ότι αποτελούνται από τον ίδιο οστίτη ιστό, παρουσιάζουν διαφορετική οστική πυκνότητα και αρχιτεκτονική (ανισότροπο υλικό), καθώς και διαφορετική συμπεριφορά στη μηχανική καταπόνηση. Η κυλινδρική κατασκευή των οστών συνδυάζει την αντοχή με την ελαφρότητα, ενώ τα μακρά οστά είναι μοχλοί

απαραίτητοι για την κίνηση, όπου απαιτείται ακαμψία, παρά ελαστικότητα. Ακόμη η δοκιδωτή κατασκευή λειτουργεί ως ελατήριο επιτρέποντας στα σπογγώδη οστά να απορροφούν μεγαλύτερη ενέργεια και να παραμορφώνονται περισσότερο. Η μέγιστη τάση του φλοιώδες οστού είναι 200 MPa σε συμπίεση, 135 MPa σε ελκυσμό και 70 MPa σε διάτμηση, ενώ το μέτρο ελαστικότητας του είναι της τάξης των 18 GPa στον επιμήκη άξονα, 12 Gpa σε εγκάρσια διεύθυνση και 3.3 GPa σε διάτμηση. Στο σπογγώδες οστό το μέτρο ελαστικότητας κυμαίνεται μεταξύ 0.1 και 3.5 Gpa. Οι ιδιότητες του σπογγώδους οστού είναι αρκετά πολύπλοκες, αφού εξαρτώνται από την ποσότητα και την σύνθεση του οστίτη ιστού αλλά και από την κατεύθυνση των δοκίδων, τον αριθμό, το είδος και την θέση των συνδετικών δοκίδων.[4]

# **1.4** Ικριώματα (Scaffolds)

Τα ικριώματα αποτελούν τεχνητές κατασκευές στις οποίες εμφυτεύονται ή σπέρνονται κύτταρα με σκοπό την υποστήριξη της τρισδιάστατης ανάπτυξη ιστών. Στην πραγματικότητα τα ικριώματα επενεργούν ως μια προσωρινή εξωκυττάρια μήτρα (Extracellular Matrix - ECM) που αλληλοεπιδρά με τα κύτταρα προς το σχηματισμό ενός νέου ιστού. Εκπροσωπούν το κυτταρικό περιβάλλον και επιτρέπουν στα κύτταρα να επηρεάζουν το μικρο-περιβάλλον τους. Τα ικριώματα παρουσιάζουν υψηλή αναλογία επιφάνειας προς όγκο, που μιμείται την φυσική εξωκυττάρια μήτρα. [11] Η εξωκυττάρια μήτρα αποτελεί ένα τρισδιάστατο δίκτυο που αποτελείται από εξωκυτταρικά μακρομόρια και μέταλλα, όπως κολλαγόνο, ένζυμα, γλυκοπρωτεΐνες και υδροξυαπατίτη που παρέχουν δομική και βιοχημική υποστήριξη στα γύρω κύτταρα.

Τα ικριώματα εξυπηρετούν τους εξής σκοπούς :

- Επιτρέπουν την προσκόλληση και την μετανάστευση των κυττάρων.
- Απελευθερώνουν και διατηρούν τα κύτταρα και τους βιοχημικούς παράγοντες.
- Κάνουν δυνατή τη διάχυση ζωτικών κυτταρικών, θρεπτικών στοιχείων και των προϊόντων τους.
- Ασκούν κάποια μηχανική και βιολογική επιρροή για να τροποποιήσουν τη συμπεριφοράτης κυτταρικής φάσης

Συγκεκριμένα η εισαγωγή του όρου Additive Manufacturing (AM), δηλαδή όλες εκείνες οι τεχνολογίες που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή τρισδιάστατων αντικειμένων ξεκινώντας από ένα επίπεδο και στην συνέχεια αναπτύσσοντας το αντικείμενο κατά επίπεδά- στρώσεις (layer-by-layer), πάνω από το αρχικό, δίνουν νέες δυνατότητες στην δημιουργία ικριωμάτων. Οι τεχνικές αυτές μπορούν να δημιουργήσουν σύνθετα 3D ικριώματα, με εσωτερική μορφολογία η οποία εύκολα μπορεί να αναπαραχθεί και να ελεγχθεί η αρχιτεκτονική της, ώστε να αυξηθεί η μεταφορά μάζας, οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών. [10] [11]

Από την επιστημονική μεριά της Μηχανικής των Ιστών, οι τεχνικές ΑΜ μπορούν να ομαδοποιηθούν σε δύο κατηγορίες: στις ακυττερικές τεχνικές, όπου τα κύτταρα δεν μπορούν να ενσωματωθούν στη διαδικασία παραγωγής, και στη βιοεκτύπωση, όπου ζωντανά κύτταρα συμπεριλαμβάνονται στην ακριβή τοποθέτηση του υλικού κατά την κατασκευή. Η βιοεκτύπωση περιλαμβάνει τη χρήση bioinks (=μελάνια με βιολογικό υλικό) τα οποία συνδυάζουν βιολογικά και συνθετικά υλικά. Οι υδρογέλες χρησιμοποιούνται συνήθως ως υλικό υποδοχής για τα bioinks. Τυπικά υπάρχουν τρείς μεμονωμένες ομάδες βιοϋλικών: τα κεραμικά, τα συνθετικά πολυμερή και τα φυσικά πολυμερή, που χρησιμοποιούνται στην κατασκευή ικριωμάτων για την μηχανική ιστών.[12] Τα πολυμερή όπως έχει αποδειχθεί από πολυάριθμές μελέτες αποτελούν μια εξαιρετική επιλογή για την δημιουργία ικριωμάτων. Ωστόσο, δεδομένου ότι τα θερμοπλαστικά υλικά παρουσιάζουν υψηλό σημείο τήξης, το οποίο είναι μεγαλύτερο από την φυσιολογική θερμοκρασία των ζωντανών κυττάρων γεγονός που θα έθετε σε κίνδυνο την βιωσιμότητα των κυττάρων, η πιο εφικτή προσέγγιση περιλαμβάνει την κατασκευή ικριωμάτων με την μέθοδο του 3D printing και την διασπορά κυττάρων σ' αυτά , εκ των υστέρων. [13]

Στο πλαίσιο της δημιουργίας ικριωμάτων υπάρχουν διάφορες τεχνικές οι οποίες έχουν αναπτυχθεί. Στην βιοϊατρική οι τεχνικές αυτές χωρίζονται από τους ερευνητές σε δύο κατηγορίες: στις «συμβατικές» και στις «μη συμβατικές» μεθόδους. Στην συνέχεια παρατίθενται οι κυριότερες συμβατικές τεχνικές δημιουργίας τρισδιάστατων ικριωμάτων από βιοδιασπώμενα πολυμερή [14][15]:

- Electrospinning
- Emulsion freeze-drying
- Gas foaming
- Particulate leaching

- Solvent Casting
- Solution Casting
- Fibre Bonding
- Melt Moulding
- Thermally induced phase separation

Ωστόσο οι συμβατικές τεχνικές κατασκευής ικριωμάτων δεν είναι σε θέση να ελέγξουν με ακρίβεια το μέγεθος και την γεωμετρία των πόρων, καθώς και την κατανομή τους με αποτέλεσμα η μικρο-αρχιτεκτονική των ικριωμάτων να καθίσταται μια πρόκληση. Παράλληλα, οι μη συμβατικές τεχνικές κατασκευής ικριωμάτων έρχονται να δώσουν νέες δυνατότητες στο πεδίο της βιοϊατρικής και να ξεπεράσουν τα προβλήματα που σχετίζονται με τις συμβατικές μεθόδους. Ως μη συμβατικές χαρακτηρίζονται οι παρακάτω μέθοδοι:[15]

- Ink-jet printing
- Fused Deposition Modelling
- Stereolithography
- Laser Sintering
- 3D Printing
- 3D Fibre-Disposition
- Rapid Prototyping (RP)

# 1.4.1 Ικριώματα Αναγέννησης Ιστών σε Οστά

Στις περιπτώσεις που ο οργανισμός δεν μπορεί να επουλώσει ένα τραύμα σε ένα οστό, το οποίο μπορεί να έχει προέλθει είτε από κάποιο τραυματισμό, είτε από παθολογικά αίτια, τότε η Ιατρική καθίσταται να βρει λύσεις για την διόρθωση του οστού. Μια σειρά βασικών προϋποθέσεων κατασκευής λειτουργικών ικριωμάτων είναι: η βιοσυμβατότητα, η βιοαποικοδόμηση, οι μηχανικές ιδιότητες και η αρχιτεκτονική του ικριώματος. [12]

Οι παράμετροι σχεδιασμού του ικριώματος μπορεί να ποικίλλουν προκειμένου να ικανοποιούν αυτές τις απαιτήσεις. Η ικανότητα του οστού να αντισταθεί στο κάταγμα, εξαρτάται από την οστική μάζα και την κατανομή της (μακρο- και μικροαρχιτεκτονική) και τις εγγενείς ιδιότητες των υλικών που το αποτελούν. Έτσι αποτελεί πολύ σημαντικό στοιχείο ο σωστός σχεδιασμός των ικριωμάτων, έτσι ώστε η δομή τους να πλησιάζει την δομή ενός πραγματικού οστού. Επιπλέον, τα ικριώματα πρέπει

να είναι βιοσυμβατά, οστεοαγώγιμα ή και οστεοεπαγωγικά. Τα οστεοεπαγωγικά ικριώματα διευκολύνουν την σύνδεση, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων. Τα ικριώματα με οστεοεπαγωγικές ιδιότητες ενισχύουν την ανάπτυξη του ιστού, για παράδειγμα, με την μεταφορά βιολογικών παραγόντων.

### 1.4.2 Βιοσυμβατότητα Ικριωμάτων

Ο πιο σημαντικός παράγοντας που διακρίνει ένα βιοϋλικό από οποιοδήποτε άλλο είναι η ικανότητα του να υπάρχει σε επαφή με ανθρώπινους ιστούς, χωρίς να προκαλεί μη αποδεκτό βαθμό βλάβης. [16] Σύμφωνα με τον Williams, «Η βιοσυμβατότητα αναφέρεται στην ικανότητα ενός υλικού να αποδίδει στην απόκριση ενός κατάλληλου ξενιστή σε μια συγκεκριμένη κατάσταση». [17] Η πιο σημαντική υποκείμενη αρχή στην βιοσυμβατότητα είναι ότι οι μηχανισμοί με τους οποίους τα υλικά και οι ανθρώπινοι ιστοί αλληλοεπιδρούν μεταξύ τους, δεν είναι μοναδικοί για μια συγκεκριμένη χρήση, αλλά αποτελούν παραλλαγές φυσικών διεργασιών που επέρχονται από την αλληλεπίδραση των υλικών με τις βιολογικές επιστήμες. [16] Το κλειδί μιας επιτυχούς βιοσυμβατότητας με οποιαδήποτε υλικό είναι να επιτευχθεί μια φυσική ή μηχανική λειτουργία, χωρίς να προκληθεί κάποια ασυνήθιστη απόκριση από τον σχετικό ιστό. Το υλικό πρέπει να σχεδιαστεί έτσι ώστε να τηρεί αυτές τις προϋποθέσεις. Επιπλέον, το βιοϋλικό θα πρέπει να είναι βιολογικά ενεργό με την έννοια ότι θα πρέπει να διαθέτει, εντός της μοριακής του δομής, τους κατάλληλους συνδέτες που είναι αναγνωρίσιμοι από τα γειτονικά κύτταρα και θα διατίθενται σ' αυτά με τη σωστή πυκνότητα και για το κατάλληλο χρονικό διάστημα. Έχουν πραγματοποιηθεί πολυάριθμες μελέτες για την ενίσχυση της βιοσυμβατότητας και των μηχανικών ιδιοτήτων των πολυμερών μέσω της ενσωμάτωσης προσθέτων, όπως άλλα πολυμερή, ανόργανα σωματίδια και ίνες. [18] Ακόμη, η βιοδραστικότητα συνθετικών πολυμερών μπορεί να ενισχυθεί με επιφανειακό εμβολισμό μορίων σ' αυτά, όπως είναι κατάλληλες αλληλουχίες πεπτιδίων ή αμινοξέων. [16]

#### 1.4.3 Βιοαποικοδόμηση Ικριωμάτων

Η βιο-αποικοδόμηση ενός ικριώματος αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα για μια επιτυχή εφαρμογή. Δεν έχει νόημα ο σχεδιασμός ενός ικριώματος που θα διευκολύνει την αναγέννηση πολύπλοκων ιστών, εάν αυτός ο ιστός τελικά καταστρέφεται από την εισροή φλεγμονωδών κυττάρων που σχετίζονται με τη διαδικασία αποδόμησης ή εάντο υλικό διεγείρει το ανοσοποιητικό σύστημα, καθώς αποδομείται και απελευθερώνει αντιγονικό υλικό. Το υλικό και τα προϊόντα

αποδόμησής του πρέπει να μην δημιουργήσουν καμία πιθανότητα μεταλλαξιογένεσης, γονοτοξικότητας, καρκινογένεσης, αναπαραγωγική τοξικότητα και άλλες ανεπιθύμητες συστημικές επιδράσεις. [16] Για να επιτρέπει η αποικοδόμηση παράλληλα με τον σχηματισμό ιστών, μια φλεγμονώδης απόκριση σε συνδυασμό με την ελεγχόμενη έγχυση κυττάρων, όπως είναι τα μακροφάγα, πολλές φορές καθίσταται απαραίτητη. [12]

Τα ικριώματα προτιμάται να απορροφούνται από τους γειτονικούς ιστούς χωρίς την ανάγκη χειρουργικής αφαίρεσης. Ο ρυθμός απορρόφησης πρέπει να συμπίπτει όσο το δυνατόν περισσότερο με εκείνον της ανάπτυξης των ιστών. Αυτό σημαίνει ότι όσο τα κύτταρα κατασκευάζουν το δικό τους φυσικό καλούπι γύρω τους, ενώ το ικρίωμα είναι ικανό να παρέχει κατασκευαστική ακεραιότητα μέσα στο σώμα. Σε τελικό στάδιο όταν πλέον αποσυντεθεί το ικρίωμα, θα επιτρέψει στον νέο ιστό να καταλάβει ολόκληρο το χώρο. [2]

# 1.5 Μέθοδος ταχείας εκτύπωσης FDM

Η μέθοδος Fused Deposition Modeling (FDM) αποτελεί μια από τις ευρέως χρησιμοποιούμενες τεχνικές εκτύπωσης 3D αντικειμένων. Η μέθοδος αυτή δημιουργεί 3D αντικείμενα από μοντέλα στερεών σωμάτων ή επιφανειών που σχεδιάζονται σ' έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή, όπως σε μια τυπική διαδικασία Rapid Prototype (RP). Τα μοντέλα αυτά μπορούν επίσης να προέρχονται από μαγνητική τομογραφία ή από σκαναρισμένα αντικείμενα, τα οποία στην συνέχεια έχουν ψηφιοποιηθεί. [19]

Βασική αρχή της μεθόδου FDM αποτελεί η χρήση ενός μικρού εξωθητή (extruder) ο οποίος βρίσκεται τοποθετημένος σε μια κεφαλή (carriage) και στον οποίο ελέγχεται η θερμοκρασία, προκειμένου να εξωθήσει ένα θερμοπλαστικό νήμα μέσω ενός θερμού ακροφυσίου (nozzle/hot end) και να εναποθέσει το πλεον τηγμένο νήμα σε μια πλατφόρμα εκτύπωσης (printing bed). Κατά την εξώθηση, το νήμα συμπιέζεται ελαφρώς και τοποθετείται σε στρώσεις (layers), οι οποίες συνενώνονται μεταξύ τους προς την δημιουργία του τρισδιάστατου αντικειμένου. Λόγω της σχετικής κίνησης της κεφαλής και της πλατφόρμας εκτύπωσης, το τηγμένο νήμα τοποθετείται καταλλήλως στις απαιτούμενες θέσεις του συστήματος συντεταγμένων X-Y-Z, ώστε η επαλληλία

των στρώσεων να δημιουργήσει την τελική και ζητούμενη γεωμετρία του μοντέλου.[20]

#### 1.5.1 Χρήση της μεθόδου FDM για Ικριώματα Βιοϊατρικών Εφαρμογών

Η συμβατική μέθοδος κατασκευής εμφυτευμάτων πριν την εισαγωγή της μεθόδου FDM στην Βιοϊατρική κατασκευή εμφυτευμάτων, αποτελούσε μια περίπλοκη, χρονοβόρα και ακριβή διαδικασία, καθώς αποτελούνταν από πολλά στάδια για την κατασκευή ενός μόνο εμφυτεύματος. Βασικές τεχνικές για την κατασκευή 3D ικριωμάτων αποτελούν οι salt leaching, gas foaming, fiber bonding, solvent casting, melt molding, electrospinning και phase separation. Ωστόσο οι τεχνολογίες αυτές κοινούς περιορισμούς, δεν μπορούν να δημιουργήσουν δομή έχουν διασυνδεδεμένων πόρων για την ανάπτυξη των κυττάρων ή να ελέγξουν το μέγεθος των πόρων για τη κυτταρική μετανάστευση και διάχυση. Επιπλέον η αρχιτεκτονική του ικριώματος πρέπει να είναι σχεδιασμένη και κατασκευασμένη, ώστε να ταιριάζει στις ανάγκες διαφορετικών εφαρμογών. Έτσι η τεχνολογία της ταχείας πρωτοτυποποιήσης έχει ξεχωρίσει ανάμεσα στις προηγούμενες μεθόδους, καθώς μπορεί να λύσει τις παραπάνω απαιτήσεις, λόγω της υψηλής δυνατότητας ελέγχου και επαναληψιμότητας μέσω του ηλεκτρονικού υπολογιστή, αλλά και εξαιτίας της προσέγγισης της κατασκευής των ικριωμάτων, στρώση-στρώση. Με την εισαγωγή της μεθόδου FDM, η διαδικασία κατασκευής ικριωμάτων μετατράπηκε σε μια πιο εύκολη, σύντομη και πιο οικονομική λύση, κατά την οποία επιτρέπεται η χρήση προσαρμοσμένου εμφυτεύματος για κάθε ασθενή. [21][22]

Βασικές απαιτήσεις για την δημιουργία βέλτιστων τρισδιάστατων (3D) ικριωμάτων στην Μηχανική των Ιστών αποτελούν η βιοσυμβατότητα και η βιοαποικοδομησιμότητα. Ακόμη το ικρίωμα πρέπει να εμφανίζει επαρκείς μηχανικές ιδιότητες για τη διατήρηση της 3D δομής, ενώ είναι πολύ σημαντική η δημιουργία επιφάνειας με την κατάλληλη χημεία και καλή υδροφιλικότητα για την προώθηση της πρόσφυσης των κυττάρων και η δημιουργία υψηλού πορώδους με μεγάλους διασυνδεδεμένους πόρους.

Με την 3D εκτύπωση δίνεται η δυνατότητα του σχεδιασμού ικριωμάτων από μια πληθώρα υλικών, με διαφορετικές διαστάσεις και διαφορετική μορφολογία πόρων, ώστε να επιτευχθεί το βέλτιστο αποτέλεσμα στην αναγέννηση ή επούλωση του ιστού. Τα ικριώματα που προέρχονται από την 3D εκτύπωση μπορούν να δημιουργηθούν σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα ακολουθώντας μια συνεχή παραγωγή, σε
αντίθεση με τις υπόλοιπες τεχνικές δημιουργίας ικριωμάτων αλλά και εξαλείφοντας την αναμονή που έκρυβαν οι παραδοσιακές τεχνικές μοσχευμάτων από ξένο δότη. Έτσι η χρήση της μεθόδου FDM κατέχει κυρίαρχη θέση στην δημιουργία ικριωμάτων για Βιοϊατρικές εφαρμογές.



Εικόνα 1.3: Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου FDM κατά την κατασκευή ενός ικριώματος. Το τηκόμενο PCL σε μορφή νήματος εξωθείται μέσα από ένα ακροφύσιο για την κατασκευή 3D ικριωμάτων.[19]

# 1.6 Εστίαση Παρούσας Διπλωματικής εργασίας

Σε πολλές περιπτώσεις τα τραυματισμένα οστά δεν είναι ικανά να επουλωθούν από μόνα τους. Για παράδειγμα σε περιπτώσεις που το οστικό τμήμα που τραυματίζεται ή αφαιρείται εξαιτίας ενός παθογενή παράγοντα, ξεπερνά ένα κρίσιμο μέγεθος, τότε καθίσταται αδύνατη η αυτοΐαση του οστού. Σε τέτοιες περιπτώσεις καθίστανται αναγκαία η χρήση της χειρουργικής ιατρικής, ώστε να διορθωθεί το τραυματισμένο οστό με πρόσθετο υλικό. Συνεπώς η εύρεση λύσεων για την γρήγορη και ανώδυνη επούλωση των τραυμάτων σε οστά, είναι αναγκαία. Η σύγχρονη Ιατρική εστιάζει στην εύρεση εναλλακτικών λύσεων έναντι των παραδοσιακών μεθόδων επιδιόρθωσης των οστών. Η Μηχανική των ιστών, με την δημιουργία ικριωμάτων έρχεται λοιπόν να δώσει μια αποτελεσματική λύση.



Εικόνα 1.4: Σχηματική απεικόνιση αναγέννησης οστικού ιστού με την χρήση βιοαποικοδομήσιμου ικριώματος. [23]

Η παρούσα διπλωματική εργασία έχει ως στόχο την δημιουργία ικριωμάτων τα οποία θα εφαρμοστούν στην αντικατάσταση τμήματος ενός οστού, τα οποία χρήζουν χειρουργικής διόρθωσης. Κύριος στόχος αποτελεί η διερεύνηση των πόρων ετερογενών μεγεθών, στην μηχανική και βιολογική συμπεριφορά των ικριωμάτων. Για τον σκοπό αυτό σχεδιάστηκαν τρία ήδη ικριωμάτων που εμφανίζουν διαφορετικό μέγεθος πόρων, όπως αναπτύσσεται στην Ενότητα 3.2.

## 1.6.1 Επιλογή Υλικού: Πολυκαπρολακτόνη (PCL)

Η επιλογή του υλικού κατασκευής των ικριωμάτων βασίζεται στα εξής χαρακτηριστικά: [2]

- Πρέπει οι μηχανικές και μεταβατικές ιδιότητες του υλικού να ταιριάζουν με εκείνες του χαμένου ιστού.
- 2. Το βιοϋλικό πρέπει να ενεργοποιεί ή ακόμη και να υποστηρίζει ενεργά τις κυτταρικές διεργασίες που δημιουργούν τον νέο ιστό και να παρουσιάζει στην επιφάνεια του το κατάλληλο χημικό περιβάλλον, ώστε να μπορούν να προσκολληθούν, να πολλαπλασιαστούν και να διαφοροποιηθούν τα κύτταρα.
- 3. Να μπορεί από αυτό να κατασκευαστεί μια 3D δομή, με διασυνδεδεμένους πόρους για την ανάπτυξη των κυττάρων και την ροή των θρεπτικών συστατικών. Η δομή πρέπει να προσφέρει την απαιτούμενη υποστήριξη για την ανάπτυξη του ιστού και να μεγιστοποιεί τον χώρο για την σωστή κυτταρική προσκόλληση, ανάπτυξη εξωκυττάριας μήτρας και μεταφοράς οξυγόνου.
- 4. Το υλικό πρέπει να μπορεί να βιοαποικοδομηθεί παράλληλα με την δημιουργία νέου ιστού. Ωστόσο, τα προϊοντα της βιοαποικοδόμησης δεν πρέπει να επηρεάζουν την αναγέννηση και την αναδιαμόρφωση των ιστών.
- Τέλος, το βιοϋλικό πρέπει να μπορεί να αποστειρωθεί για να αποφευχθεί η τοξική μόλυνση του οργανισμού.

Εφόσον τα ικριώματα θα κατασκευαστούν με την μέθοδο FDM και πρόκειται για ικριώματα που θα χρησιμοποιηθούν σε οστά, ως κατηγορία υλικού επιλέχθηκαν τα πολυμερή. Τα βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή έχουν ένα ευρύ φάσμα βιοϊατρικών εφαρμογών στην Ιστομηχανική και στην Αναγεννητική Ιατρική. Οι αλειφατικοί πολυεστέρες έχουν αποδειχθεί ως μία πολλά υποσχόμενη κατηγορία βιοϋλικών, καθώς συνδυάζουν τα χαρακτηριστικά της βιοαποικοδόμησης και της βιοσυμβατότητας, ενώ πολλές από τις φυσικές και χημικές ιδιότητες τους είναι ανάλογες με πολλά παραδοσιακά μη βιοδιασπώμενα πολυμερή. [24] Τα ικριώματα από συνθετικά βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή εμφανίζουν πλεονεκτήματα έναντι των ικριωμάτων από φυσικά υλικά στην μηχανική των ιστών, επειδή μπορεί να ελεγχθεί η δομή και ο χρόνος αποδόμησης τους ανάλογα με την ανάγκη του συγκεκριμένου ιστού. Στο πέρασμα του χρόνου πολλά βιοσυμβατά υλικά έχουν εκτυπωθεί επιτυχώς. Ωστόσο, ένα από τα πιο εξαιρετικά συνθετικά απορροφήσιμα πολυμερή είναι η πολυκαπρολακτόνη (PCL) λόγω της μηχανικής αντοχής και της ακαμψίας που εμφανίζει. (αρκετή έτσι ώστε να μην επηρεάσει τη συμπεριφορά των κυττάρων και την αποικοδόμηση).[11]

Μετά από ενδελεχή έρευνα στην βιβλιογραφία ως υλικό εκτύπωσης επιλέχθηκε το PCL, καθώς αποτελεί ένα υλικό που τηρεί τα προαπαιτούμενά για την αναγέννηση οστικού ιστού. Το PCL είναι ένας χαμηλού κόστους , βιοαποικοδομήσιμος πολυεστέρας, ο οποίος κατέχει σημαντική θέση στην χρήση της μεθόδου FDM . Το πολυμερές αυτό επανήλθε στην πρώτη γραμμή της επιστήμης εξαιτίας της ανάπτυξης της Μηχανικής των Ιστών και του 3D printing. Παρουσιάζει εξαιρετικές ρεολογικές και εξωδοελαστικές ιδιότητες κατά την θέρμανση του, που το καθιστούν ιδανικό υλικό για την 3D εκτύπωση. Ωστόσο, η ακαμψία και η σταδιακή αποικοδόμηση του εκτυπωμένου PCL , το καθιστούν χρήσιμο κυρίως για την εφαρμογή σε σκληρούς ιστούς.[25] Παραμένει σταθερό στο σώμα για πάνω από έξι μήνες και αποικοδομείται πλήρως και μη τοξικά σε διάστημα περίπου τριών ετών, παρέχοντας έτσι υποστήριξη στον ιστό κατά την διάρκεια της επούλωσης. [26] Το μέσο μοριακό του βάρος ανέρχεται στα 80,000 και έχει σημείο τήξης στους 60°C.

Παρ' όλο που το PCL δεν είναι οστεοαγωγικό, μπορεί να υποστεί τις κατάλληλες τροποποιήσεις προκειμένου να αυξηθεί η οστεοαγωγιμότητα και η οστεοεπαγωγική του ικανότητα. Ακόμη, καθίσταται αδύνατο να εκτυπωθεί PCL με ενσωματωμένα κύτταρα, καθώς η θερμοκρασία που εκτυπώνεται είναι υψηλή και δεν επιτρέπει την βιωσιμότητα των κύτταρων. Προκειμένου να αντιμετωπιστούν αυτές οι δυσκολίες,

14

ένα ικρίωμα μπορεί να κατασκευαστεί με αυξητικούς παράγοντες, με κύτταρα προσκολλημένα στην επιφάνεια του, με κύτταρα με μεταγωγή ή ακόμα και συνδυασμό των παραπάνω. Για τον λόγο αυτό, θα πραγματοποιηθεί έγχυση κυττάρων στα ικριώματα, αφού πρώτα εκτυπωθούν με την μέθοδο του 3D printing. Μελέτες έχουν δείξει σαφή κυτταρική εξάπλωση, προσκόλληση και σχηματισμό εξωκυτταρικής μήτρας πάνω στο ικρίωμα, μετά τον διασκορπισμό κυττάρων σε ικριώματα από PCL. [11]

Συνοπτικά οι κυριότεροι λόγοι που καθιστούν το PCL εξαιρετικό υλικό για την δημιουργία ικριωμάτων είναι: [27]

- Παρουσιάζει μεγάλη ευελιξία σε σχέση με άλλα πολυμερή.
- Μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μείγματα πολυμερών που χρησιμοποιούνται σε ιατρικές εφαρμογές.
- Παρουσιάζει καλή θερμική σταθερότητα και θερμοκρασία αποικοδόμησης που κυμαίνεται στους 280-370°C.
- Διαθέτει έγκριση από τον FDA, καθώς εμφανίζει συμβατότητα με μαλακούς και σκληρούς ιστούς, ενώ εμφανίζει ρυθμό αποικοδόμησης μεταξύ 24-36 μηνών.
- Έχει χαμηλό κόστος
- Είναι βιοαποικοδομήσιμο και βιοσυμβατό.
- Έχει τις απαιτούμενες μηχανικές ιδιότητες.

Ένα πολύ σημαντικό κριτήριο στην επιλογή υλικού για την κατασκευή ικριωμάτων αποτελεί και η δυνατότητα αποικοδόμησης του. Η βιο-αποικοδόμηση των αλειφατικών πολυεστέρων πραγματοποιείται εύκολα και επιπλέον τα προϊόντα της είναι υδατοδιαλυτά και τα αρχικά αντιδραστήρια (οξέα, υδροξυλικά οξέα ή διόλες), τα οποία είναι μη τοξικά και απομακρύνονται από τον οργανισμό μέσων των ούρων.[7] Το PCL μπορεί να αποικοδομηθεί τόσο από μικροοργανισμούς όσο και από υδρολυτικούς μηχανισμούς υπό τις φυσιολογικές συνθήκες του οργανισμού. Η αποικοδόμηση του είναι γνωστή και ως μεταβολισμός μέσω κύκλου τρικαρβοξυλικού οξέος (tricarboxylic acid cycle-TCA). [11] Κάτω από ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να αποικοδομηθεί ενζυματικά οδηγώντας στην δημιουργία ενζυματικής επιφάνειας. Επιπλέον, τα προϊόντα χαμηλού μοριακού βάρους του PCL που προκύπτουν από την αποικοδόμηση απορροφούνται από μακροφάγα και αποικοδομούνται ενδοκυτταρικά. [12]

# 1.7 Ζήτηση Οστικών Εμφυτευμάτων

Επί του παρόντος, οι ορθοπεδικές επεμβάσεις λόγω της ύπαρξης κάποιου τραύματος, όγκου, παραμόρφωσης, είτε λόγω εκφυλισμού των οστών και γήρατος του πληθυσμού, έχουν αυξηθεί δραματικά, προκαλώντας την ανάγκη της ταχείας προόδου στην τεχνολογία εμφυτευμάτων των οστών. Τα αλληλομοσχεύματα και ξενομοσχεύματα πέρα από την περιορισμένη προσφορά που εμφανίζουν, εγείρουν ανησυχίες μετάδοσης παθογόνων οργανισμών αλλά και μιας ενδεχόμενης ανοσολογικής επίθεσης κατά του μοσχεύματος. Οι σύγχρονες κλινικές πρακτικές στην ορθοπεδική έχουν αποδείξει ότι το αυτομόσχευμα παρουσιάζει υψηλά θετικά αποτελέσματα στην οστική σύντηξη και θεραπεία του οστού. Ως εκ τούτου, η ανάπτυξη συνθετικών υλικών για τη χρήση τους στη Μηχανική των μυοσκελετικών ιστών, κατέχει κυρίαρχη θέση στην έρευνα, προκειμένου να ικανοποιήσει την ακμάζουσα ζήτηση ορθοπεδικών εμφυτεύσεων.

Σήμερα η ανάγκη οστικών εμφυτευμάτων, αυξάνεται ξεπερνώντας τις 400.000 επεμβάσεις μοσχεύματος οστών που πραγματοποιούνται ετησίως στην Ευρώπη και περισσότερες από 600.000 στις Ηνωμένες Πολιτείες. [28] Σύμφωνα με την ετήσια αναφορά του Orthopaedic Industry Annual Report που δημοσιεύθηκε στο ORTHOWORLD [29], οι παγκόσμιες πωλήσεις σε ορθοπεδικά προϊόντα ανήλθαν σε 53 δισεκατομμύρια δολάρια το 2019, παρουσιάζοντας αύξηση 3,8% σε σχέση με το 2018. Ακόμη οι δαπάνες για υποκατάστατα μοσχευμάτων οστών στην αγορά των ΗΠΑ είχε ήδη φτάσει τα 1,3 δισεκατομμύρια δολάρια το 2010, με προβλεπόμενο ετήσιο ποσοστό αύξησης που ανέρχεται στο 7,4%. [28] Παράλληλα, ενώ έχουν σημειωθεί σημαντικές ανακαλύψεις και η οικονομική δραστηριότητα στον τομέα της μηχανικής των ιστών αυξάνεται εκθετικά, ο συνεχής αυξανόμενος αριθμός προϊόντων που εισέρχονται στην αγορά και οι κλινικές δοκιμές, οδηγούν τις πωλήσεις των αναγεννητικών Βιοϋλικών να υπερβαίνουν τα 240 εκατομμύρια δολάρια στις ΗΠΑ ετησίως. [30]

# 2.1 Δομικός σχεδιασμός ικριωμάτων

Το πορώδες καθώς και το μέγεθος των πόρων στα ικριώματα από βιοϋλικά παίζουν σημαντικό ρόλο στον σχηματισμό ιστών in vitro και in vivo. [31] Τα ικριώματα μηχανικής των ιστών που χρησιμοποιούνται σε οστά πρέπει να είναι σχεδιασμένα ώστε να επιτυγχάνεται η μεταφορά οστικής μάζας, η μετανάστευση των κυττάρων, ενώ παράλληλα να διατηρείται η μηχανική ακεραιότητα για τη διευκόλυνση και την ενίσχυση του νέου οστού. Αν και πολλές παράμετροι των ικριωμάτων μπορούν να τροποποιηθούν, ώστε να ικανοποιούνται οι παραπάνω απαιτήσεις, το μέγεθος των πόρων είναι ένα από τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά που πρέπει να ελεγχθεί αυστηρά κατά την έμμεση κατασκευή τους. [32]

Παράλληλα, ένα ικρίωμα με υψηλό πορώδες και με ένα δίκτυο υψηλά διασυνδεδεμένων πόρων είναι απαραίτητο για τη μεσολάβηση θρεπτικών ουσιών και για τη διάχυση απορριμμάτων, ώστε τελικά να επιτραπεί η ανάπτυξη και σύνδεση των ιστών. Ο σχεδιασμός του ικριώματος πρέπει επίσης να ενσωματώνει μια μικροαρχιτεκτονική που αποδίδει στο ικρίωμα επαρκή μηχανική αντοχή ώστε να αντέξει το φορτίο του οστού κατά την εμφύτευση , μέχρι να αναπτυχθεί ο καινούργιος ιστός. [33]

Παράλληλα με το μέγεθος των πόρων και το πορώδες, αρκετά ακόμα χαρακτηριστικά του ικριώματος, καθώς και σχεδιαστικές μεταβλητές έχουν σημαντικό ρόλο στην δημιουργία του νέου ιστού, όπως είναι η διασυνδεσιμότητα, η διαπερατότητα και το σχήμα των πόρων.[32]

Οι εφαρμογές του rapid prototyping και του 3D printing αποτελούν πανίσχυρα εργαλεία για τον σχεδιασμό σύνθετων και περίπλοκων ικριωμάτων με μοναδική μορφολογία πόρων, καθώς δίνουν την δυνατότητα του βέλτιστου ελέγχου στην αρχιτεκτονική των πόρων. [31] Στην συνέχεια, παρουσιάζονται οι βασικότερες παράμετροιγια την δημιουργία ενός ικριώματος με μοναδική αρχιτεκτονική πόρων.

#### 2.1.1 Μέγεθος των πόρων

Το μέγεθος του πόρου σ' ένα ικρίωμα για την εφαρμογή στην μηχανική των ιστών αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα που επηρεάζει την ποσότητα και τα χαρακτηριστικά του νεοσχηματισμένου ιστού. Ένα βέλτιστο μέγεθος για αυτά τα ικριώματα δεν μπορεί να είναι προκαθορισμένο. Μενέθη πόρων μεταξύ 10-2250μm έχουν χρησιμοποιηθεί σε ικριώματα μηχανικής του ιστών για οστά, έχοντας ως αποτέλεσμα ποικίλους βαθμούς ανάπτυξης ιστού. Μεγέθη πόρων 100-400μm προτείνονται ως βέλτιστα για οστεοαγωγιμότητα, και μεγέθη πόρων μεγαλύτερα από 300μm συνίστανται για την ενίσχυση του σχηματισμού των οστών μέσω αγγειοποίησης. Πορώδες με μέγεθος πόρων μικρότερο από 100μm μπορεί να μην επαρκεί όσο αναφορά την μεταφορά οστικής μάζας και τις κυτταρικής μετανάστευσης, ενώ μπορεί να προκαλέσει τον σχηματισμό χόνδρου πριν ξεκινήσει η οστεογένεση. Μεγαλύτερα μεγέθη πόρων μπορεί να οδηγήσουν σε υπερβολικό σχηματισμό κενών, διακινδυνεύοντας τις μηχανικές ιδιότητες του ικριώματος. Ωστόσο, πόροι μεγάλου μεγέθους είναι πιο ευνοϊκοί για τριχοειδής σχηματισμούς, που οδηγούν σε άμεση οστεογένεση. Συνεπώς, το μέγεθος των πόρων του ικριώματος πρέπει να είναι τόσο μικρό ώστε να διασφαλιστεί η μηχανική ακεραιότητα, αλλά και επαρκώς μεγάλο ώστε να μπορεί να επιτευχθεί η διάχυση θρεπτικών ουσιών και απορριμμάτων για τις ανάγκες του ιστού. [32][34]

Η ερευνητική ομάδα των Mantila Roosa et al. [32], κατασκεύασε τρία κυλινδρικά ικριώματα από PCL με ίδια μορφή πόρων και μεγέθη πόρων 350μm,550μm και 800μm αντίστοιχα, τα οποία εμφυτεύθηκαν σε ποντίκια αφού προηγουμένως είχαν προσκολληθεί σ' αυτά κύτταρα. Στην συγκεκριμένη έρευνα παρατηρήθηκε ότι ο όγκος των οστών αυξήθηκε σημαντικά στα ικριώματα με μέγεθος πόρων 800μm σε σχέση με εκείνα που είχαν 350μm ύστερα από 4 εβδομάδες εμφύτευσης. Ωστόσο, στην έρευνα αναφέρεται ότι η επιρροή που έχει το μέγεθος των πόρων εξαρτάται από αρκετούς παράγοντες. Επιπλέον, μεγαλύτερη επιρροή στην οστική αναγέννηση και για τα τρία ικριώματα παρατηρήθηκε κατά τις πρώτες 4 εβδομάδες, ενώ μετά τις 8 εβδομάδες η επιρροή αυτή ήταν ασήμαντη.

Το μέγεθος των πόρων έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των κύτταρων. Στην έρευνα των Im Gun I et al. [35] κατά την οποία ικριώματα από PCL εμποτίστηκαν με βλαστοκύτταρα, παρατηρήθηκαν τα εξής: ο πολλαπλασιασμός των κύτταρων ήταν υψηλότερος στα ικριώματα με μέγεθος πόρων

100 μm και 200μm, ενώ τα κύτταρα είχαν την τάση να συσσωρεύονται περισσότερο σε εκείνα μεγέθους πόρων 400μm. Παρ 'όλα αυτά, η παραγωγή πρωτεογλυκανών, καθώς και οι χονδρογονικοί δείκτες ήταν σημαντικά υψηλότερα στα ικριώματα μεγέθους πόρων 400μm σε σύγκριση εκείνα των 100 μm και 200μm.

Τέλος, κατά την έρευνα που πραγματοποιήσαν οι Se Heang Oh et al. [36], κατασκευάστηκαν ικριώματα από PCL με διαφορετικά μεγέθη πόρων 88μm-405μm, στα οποία καλλιεργήθηκαν διαφορετικά είδη κυττάρων (χονδροκύτταρα, οστεοβλάστες και ινοβλάστες). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι βέλτιστη ανάπτυξη χονδροκυττάρων για μέγεθος πόρων 380-405μm και οστεοβλάστες, 186-200μm για ινοβλάστες, ενώ 290-310μm για τον σχηματισμό νέου οστού. Αναφέρεται επίσης ότι για μέγεθος πόρων μεγαλύτερο από 400μm, σημειώνεται εξαιρετική ανάπτυξη οστού.

Συμπερασματικά, το μέγεθος των πόρων για ικριώματα που θα έχουν χρήση σε οστά θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 100μm, ενώ για μέγεθος πόρων μεγαλύτερο από 300μm, θα έχουμε άμεση οστεογένεση. [37] Δεδομένου των αποτελεσμάτων από τις παραπάνω έρευνες καθώς και όπως αναφέρεται στην βιβλιογραφία, η παρούσα διπλωματική εργασία στοχεύει στην δημιουργία ικριωμάτων με μέγεθος πόρων 300-500μm, προκειμένου να επιτευχθεί η βέλτιστη δημιουργία οστικού ιστού.

Ωστόσο, δεν είναι ακόμα σαφές εάν τα ικριώματα με ομοιογενή κατανομή μεγέθους των πόρων είναι πιο αποτελεσματικά, σε σχέση από εκείνα που έχουν πόρους ετερογενών μεγεθών.

# 2.1.2 Πορώδες

Ως πορώδες ορίζεται η ελεγχόμενη δημιουργία κενών εντός της δομής και δεν πρέπει να συγχέεται με μη επιθυμητούς πόρους που δημιουργούνται λόγω σφάλματος της κατεργασίας. Τα σκελετικά οστά παρουσιάζουν πορώδες το οποίο ανέρχεται στο 50%-90%. [38] Είναι γνωστό από την βιβλιογραφία ότι το πορώδες ενισχύει την βιοαποικοδόμηση, καθώς αυξάνει την ικανότητα των υγρών στοιχείων να διαπερνούν την εσωτερική δομή του ικριώματος. [31].

Στην έρευνα που πραγματοποιήσαν οι Mantila Roosa et al.[32] όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, παρατηρήθηκε ότι τα ικριώματα που είχαν μεγαλύτερο μέγεθος πόρων, παρουσίασαν μεγαλύτερο πορώδες.



Εικόνα 2.1: Ποσοστό πορώδες για τα διαφορετικά μεγέθη πόρων που προέκυψαν κατά την έρευνα των Mantila Roosa et al.[32]

Το μακροπορώδες στα ικριώματα κατέχει σημαντικό ρόλο στην αναγέννηση των κατεστραμμένων ιστών. Κύρια λειτουργία του μακροπορώδους αποτελεί η διευκόλυνση της διείσδυσης των κυττάρων, ώστε στην συνέχεια να ενεργοποιηθεί η λειτουργία του ξενιστή ιστού και να δημιουργηθεί νέος ιστός. Το μακροπορώδες μπορεί να εξασφαλιστεί με ένα πλήθος τεχνικών όπως είναι η ξήρανση με κατάψυξη (freeze drying), η χύτευση σε διαλύτη (solvent casting), η ταχεία δημιουργία πρωτότυπων (rapid prototyping ) και η σύντηξη με λέιζερ (laser sintering).

#### 2.1.3 Διασυνδεσιμότητα και Διαπερατότητα πόρων

Η διασυνδεσιμότητα των πόρων αποτελεί ένα κρίσιμο παράγοντα που πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν κατά τον σχεδιασμό των ικριωμάτων. Ένα ικρίωμα μπορεί να εμφανίζει υψηλό πορώδες, αλλά αν οι πόροι δεν διασυνδέονται μεταξύ τους (δηλαδή κενά που συνδέουν τον έναν πόρο με έναν άλλο), δεν εξυπηρετούν κανένα σκοπό και γίνονται περιττοί για το ικρίωμα.[39] Η υψηλή διασυνδεσιμότητα των πόρων επιτρέπει την κατανομή των κυττάρων σε όλο το υλικό, με υψηλή πυκνότητα στον πληθυσμό των κυττάρων και επιπλέον διευκολύνει την μετανάστευση και πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την αγγείωση και παρέχει χώρο για τους νεοσχηματιζόμενους ιστούς. [40] Ακόμη, τα ικριώματα που εμφανίζουν υψηλή διασυνδεσιμότητα των πόρων, μεγιστοποιώντας έτσι τη διάχυση και την ανταλλαγή των θρεπτικών συστατικών (πχ οξυγόνο) σε ολόκληρο τον όγκο πόρων του ικριώματος. [41]



Εικόνα 2.2: Η χαμηλή διασυνδεσιμότητα των πόρων περιορίζει την διείσδυση των κυττάρων λόγω των τυφλών σημείων (εμφανίζουν το σύμβολο '\*') και των απρόσιτων πόρων (εμφανίζουν το σύμβολο '#'), ενώ η υψηλότερη διασυνδεσιμότητα παρέχει βελτιωμένη διαπερατότητα και διείσδυση κυττάρων.

Η αρχιτεκτονική των ικριωμάτων μπορεί να σχεδιαστεί έτσι ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη διαπερατότητα. Η διαπερατότητα καθορίζει την μεταφορά μάζας, η οποία περιγράφει εγγενώς τις επιδράσεις που έχουν οι ιδιότητες του δομικού σχεδιασμού στην μεταφορά υγρών, εσωτερικά και εξωτερικά σε ένα ικρίωμα. Δεδομένου ότι τα οστά συσχετίζονται με πολλά αγγεία, τα ικριώματα που παρέχουν μεγάλη μεταφορά μάζας μπορούν να υποστηρίξουν αυξημένη αναγέννηση των οστών.[37] Υψηλή διαπερατότητα με κανονική αρχιτεκτονική προτείνεται για την αναγέννηση οστών. Η διαπερατότητα συσχετίζεται άμεσα με την διασυνδεσιμότητα των πόρων και έχει αποδειχθεί ότι παίζει κυρίαρχο ρόλο στην ικανότητα των υγρών και των κυττάρων να διεισδύουν, πράγμα που σημαίνει ότι χαμηλή διασυνδεσιμότητα μπορεί να εμποδίσει την επισκευή του ιστού. [31] Προκειμένου να αποδείξουν την σημασία της διαπερατότητας στην αναγέννηση των οστών, η ερευνητική ομάδα των Α. Mitsak et al. [37] κατασκεύασαν ικριώματα από PCL που είχαν διασυνδεσιμότητα πόρων 100%, αλλά κάποια είχαν χαμηλή διαπερατότητα (0.688 · 10<sup>-7</sup>m<sup>4</sup>/N-s) και κάποια υψηλή διαπερατότητα (3.991 · 10<sup>-7</sup>m<sup>4</sup>/N-s) πόρων. Ύστερα από την in vivo επεξεργασία τους, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μέση ανάπτυξη του οστικού όγκου μεταξύ τεσσάρων και οχτώ εβδομάδων για τα ικριώματα που είχαν υψηλή διαπερατότητα ήταν 106%, ενώ γι' αυτά που είχαν χαμηλή διαπερατότητα ήταν 62,3%. Έτσι η ερευνητική ομάδα πρότεινε ότι η αύξηση της διαπερατότητας μπορεί να οδηγήσει στην αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης και διείσδυσής της οστικής ανάπτυξης μεταξύ των εσωτερικών κενών στα ικριώματα.

Οι Jones et al. [42] με βάση την έρευνα που πραγματοποιήσαν πρότειναν ελάχιστη εγγενή διαπερατότητα ίση με  $3 \cdot 10^{-8}$  m<sup>4</sup>/N-s, ώστε να επιτραπεί η ανάπτυξη των οστών ανεξάρτητα την χρονική περίοδο. Επιπλέον κατά την έρευνα που πραγματοποιήσαν οι J. Kemppainen et al. [43], κατασκεύασαν ικριώματα από PCL τα

οποία παρουσίαζαν διαφορετική διαπερατότητα και στα οποία καλλιεργήθηκαν χονδροκύτταρα. Κατά την έρευνα τους οδηγήθηκαν στο εξής συμπέρασμα: μειώνοντας την διαπερατότητα σ' ένα ικρίωμα προκαλείται και η μείωση της τάσης του οξυγόνου τα οποία εν συνεχεία, ρυθμίζουν τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου (ROS). Προκείμενου να δημιουργηθεί εμβρυϊκός χόνδρος απαιτείται η παρουσία χαμηλού επιπέδου οξυγόνου(5%-10%), σε αντίθεση με την δημιουργία οστών που απαιτείται υψηλότερο ποσοστό (25%).

## 2.1.4 Προσανατολισμός των στρώσεων ικριώματος

Ο προσανατολισμός των στρώσεων σε ένα ικρίωμα μπορεί να επηρεάσει τόσο το πορώδες του όσο και την ικανότητα πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Ο προσανατολισμός των ικριωμάτων αφορά την μεταξύ κατεύθυνση που έχουν οι ίνες που ανήκουν σε διαφορετικές στρώσεις. Τα ικριώματα μπορούν να έχουν την μορφή πλέγματος, να είναι κλιμακωτά ή διασταυρούμενα. Οι πιο συνήθεις προσανατολισμοί των στρώσεων ,όπως παρουσιάζονται και στην Εικόνα 2.3, είναι:

- Προσανατολισμός Στρώσεων 0°-90°: Σε δύο διαδοχικές στρώσεις εναλλάσσεται ο προσανατολισμός κατά 90°.
- Προσανατολισμός Στρώσεων 0°-45°-90°-135° Cross Hatches: Σε δύο διαδοχικές στρώσεις εναλλάσσεται ο προσανατολισμός κατά 45°. Τα ικριώματα αυτά εμφανίζουν διασταυρούμενες στρώσεις.
- Προσανατολισμός Στρώσεων 0°-60°-120°: Σε δύο διαδοχικές στρώσεις εναλλάσσεται ο προσανατολισμός των ινών κατά 60°.
- Προσανατολισμός Στρώσεων 0°-30°-60°-90°-120°-150°: Σε δύο διαδοχικές στρώσεις εναλλάσσεται ο προσανατολισμός των ινών κατά 30°.



Εικόνα 2.3: Σχηματική αναπαράσταση του προσανατολισμού των στρώσεων. [25]

Ο προσανατολισμός των στρώσεων στα ικριώματα έχει άμεση συσχέτιση με την μορφολογία των πόρων, καθώς είναι αυτός που τελικά την καθορίζει. Τα ικριώματα που παρουσιάζουν πιο πολύπλοκες δομές συντελούν στην καλύτερη συγκράτηση των κυττάρων (seeding efficiency) στο ικρίωμα, καθώς οι πιο απλές δομές διευκολύνουν την διέλευση των κυττάρων ανάμεσα στους πόρους, με αποτέλεσμα να προσκολλώνται εκείνα στο πιάτο καλλιέργειας και όχι στο ικρίωμα. Ωστόσο, τα ικριώματα που εμφανίζουν παρόμοιο ποσοστό πορώδους και μέγεθος πόρων, έχει παρατηρηθεί ότι δεν εμφανίζουν σημαντική διαφορά στην κυτταρική δραστηριότητα. [44] Ακόμη ο προσανατολισμός των στρώσεων παρουσιάζει άμεση εξάρτηση με την διάταξη των ινών, καθώς επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό και το seeding efficiency των ικριωμάτων. Για παράδειγμα , οι Yilgor et al. κατά την έρευνα τους κατασκεύασαν ικριώματα από PCL με διαφορετικούς προσανατολισμούς ινών. Τα πορίσματα που προέκυψαν από την έρευνα έδειξαν ότι τα ικριώματα που είχαν διασταυρούμενες στρώσεις παρουσίασαν το υψηλότερο πορώδες και τον μεγαλύτερο πολλαπλασιασμό κυττάρων σε σχέση με εκείνα που παρουσίασαν την απλούστερη δομή 0°-90°. [45] Ωστόσο τα ικριώματα που είχαν προσανατολισμό στρώσεων 0°-90°, αλλά με διάταξη ινών που οι ίνες τους είχαν τοποθετηθεί σε κάθε δεύτερη στρώση ενδιάμεσα των ινών της προηγούμενης στρώσης, εμφάνισαν μεγαλύτερο seeding efficiency.



Εικόνα 2.4: SEM Εικόνες από την έρευνα των Iwan Zein et al. (a)-(b) ικριώματα με προσανατολισμό στρώσεων 0°-90° και μέγεθος πόρων 0.5mm, (c)-(d) με προσανατολισμό στρώσεων 0°-90° και μέγεθος πόρων 0.7mm, (e)-(f) με προσανατολισμό στρώσεων 0°-60°-120° και μέγεθος πόρων 0.5mm, (g)-(h) με προσανατολισμό στρώσεων 0°-60°-120° και μέγεθος πόρων 0.5mm, (g)-(h) με προσανατολισμό στρώσεων 0°-60°-120° και μέγεθος πόρων 0.7mm. [19]

## 2.1.5 Διάταξη Ινών ικριώματος

Η τοποθέτηση των ινών σε ένα ικρίωμα μεταξύ των στρώσεων έχει σημαντικό ρόλο, όχι μόνο στην ανάπτυξη των κυττάρων αλλά και στην μηχανική αντοχή του ικριώματος. Οι ίνες κάθε στρώσης μπορούν να τοποθετηθούν σε διαφορετικές αποστάσεις μεταξύ τους αλλά και σε διαφορετικές θέσεις, ανά δύο στρώσεις. Συνήθως τα ικριώματα σχεδιάζονται έτσι ώστε να παρουσιάζουν σταθερές αποστάσεις και στις δύο παραπάνω περιπτώσεις. Σε μια έρευνα που πραγματοποιήσαν οι Μ. Yeo et al. 2012 [46] χρησιμοποιήσαν ικριώματα από PCL με μέγεθος πόρων 100-500μm και κυβικό σχήμα, με διασυνδεσιμότητα 100% και πορώδες 62%, με σκοπό να ελέγξουν την επιρροή που έχει η τοποθέτηση των ινών. Για τον σκοπό αυτό σχεδιάστηκαν πέντε διαφορετικές μορφές ικριωμάτων , όπου κάθε μορφή παρουσίαζε διαφορετική τοποθέτηση των ινών. Στην εικόνα φαίνονται τα πέντε διαφορετικά ικριώματα (PT-0 – PT-100) της συγκεκριμένης έρευνας, που εμφανίζουν διαφορετικές διατάξεις ινών μεταξύ των στρώσεων.



Εικόνα 2.5: SEM εικόνες από την έρευνα των Μ. Yeo et al., όπου απεικονίζονται ικριώματα με διαφορετική διάταξη ινών. [46]

Τα αποτελέσματα από την παραπάνω έρευνα έδειξαν ότι τα ικριώματα που οι ίνες τους είχαν τοποθετηθεί σε κάθε δεύτερη στρώση, ενδιάμεσα των ινών της προηγούμενης στρώσης από αυτή που ενώνονται (PT-100), εμφάνιζαν την μεγαλύτερη κυτταρική βιωσιμότητα με μεγάλη διαφορά και ευνοούσαν περισσότερο τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, εξαιτίας της πολυπλοκότερης μορφής τους layer-bylayer, η οποία μπορεί να παρέχει υψηλή αποτελεσματικότητα στην εμφύτευση των κυττάρων. Παρόμοια αποτελέσματα δόθηκαν και από τα πειράματα που πραγματοποίησαν οι J. Lee et al. [44]

## 2.1.6 Μορφολογία των πόρων

Στα ικριώματα που χρησιμοποιούνται στην αναγέννηση ιστών για οστά, συνήθως εμφανίζονται πόροι τριγωνικής, κυλινδρικής, σφαιρικής, σύνθετης πολυγωνικής ή κυβικής μορφής, ανάλογα με την διάταξη και τον προσανατολισμό των ινών ή και

κατ' επιλογή του ερευνητή.[15] Στην συνέχεια περιγράφεται η βασικότερη μορφολογία των πόρων, όπως προκύπτει για τις διαφορετικές περιπτώσεις πόρων:

- Πόροι κυβικής μορφής: Το πορώδες που εμφανίζει πόρους κυβικής μορφής έχει μορφολογία στρώσεων με προσανατολισμό 0°-90° και διάταξη ινών οι οποίες στοιβάζονται ανά κάθε δεύτερη στρώση κάθετα, κάτω από την ίδια στήλη.
- Πόροι τριγωνικής μορφής: Προκύπτουν από προσανατολισμό στρώσεων 0°-60°-120°.
- Πόροι σύνθετης πολυγωνικής: Προκύπτουν από προσανατολισμό στρώσεων 0°-45°-90°-135°.
- Πόροι σφαιρικής μορφής: Τα ικριώματα αποτελούνται από ομοιόμορφους ή ακανόνιστα τοποθετημένους πόρους που έχουν μορφή σφαίρας.
- Πόροι κυψελοειδής μορφής: Τα ικριώματα αποτελούνται από εξαγωνικούς πόρους που περιβάλλονται από συμπαγείς επιφάνειες που φωλιάζουν και σχηματίζουν δομή παρόμοια με εκείνη της κηρήθρας. [19]
- Πόροι **τυχαίας μορφής**: Χαρακτηρίζονται ως ακανόνιστοι πόροι.



Εικόνα 2.6: (a) κυβικοί πόροι (b) τριγωνικοί πόροι (c) σύνθετοι πολυγωνικοί πόροι. [15]



Εικόνα 2.7: (a) Πόροι σφαιρικής μορφής. (b) κυψελοειδείς πόροι [19] [47]

# 2.2 Επίδραση δομικού σχεδιασμού στην Μηχανική του ικριώματος

Η πιο σπουδαία προϋπόθεση ενός ικριώματος στην μηχανική των ιστών για οστά, είναι η ανάγκη να προσφέρει επαρκή στήριξη και τις κατάλληλες μηχανικές ιδιότητες, οι οποίες θα είναι παρόμοιες με εκείνες των οστικών ιστών. Η ακαμψία και η αντοχή των οστών, είναι αποτέλεσμα της νανο-δομής και της εσωτερικής νανο- οργάνωσης τους. Ωστόσο οι μηχανικές ιδιότητες που προκύπτουν από τεχνικές ταχείας πρωτοτυποποιήσης θεωρείται ότι είναι πιο αδύναμες σε σχέση με εκείνες των οστών. Γι' αυτό τον λόγο ερευνάται η δυνατότητα ανάπτυξης ικριωμάτων με τις βέλτιστες μηχανικές ιδιότητες, καθώς μπορούν να ελεγχθούν από την εσωτερική αρχιτεκτονική των πόρων. [44] Τα ικριώματα για την αναγέννηση των οστών έχει υποστηριχθεί ότι πρέπει να έχουν ελάχιστη αντοχή σε θλίψη ίση με 2 MPa και ελάχιστο μέτρο ελαστικότητας ίσο με 50 MPa, τα οποία πλησιάζουν τα ελάχιστα όρια για ένα δοκιδωτό οστό. [37] Στην συνέχεια θα μελετηθούν ορισμένοι από τους παράγοντες που αναπτύχθηκαν στην Ενότητα 2.1 , δηλαδή στον δομικό σχεδιασμό των ικριωμάτων, ως προς την επιρροή που εμφανίζουν στις μηχανικές ιδιότητες τους.

## 2.2.1 Πορώδες

Το πορώδες των ικριωμάτων αποτελεί επιζήμιο παράμετρο για τις μηχανικές ιδιότητες τους, οι οποίες τείνουν να μειώνονται εκθετικά όταν το πορώδες αυξάνεται. Η εμφάνιση εξελιγμένων τεχνικών επεξεργασίας όπως είναι το 3D printing επιτρέπει τον έλεγχο κατά σχεδιασμό με αποτέλεσμα την σημαντική βελτίωση της ισορροπίας μεταξύ πορώδους και μηχανικών ιδιοτήτων. [31] Ορισμένες μελέτες έχουν δείξει ότι το μέτρο ελαστικότητας των φυσικών οστών γενικά μειώνεται καθώς το πορώδες τους αυξάνεται. Ένα ικρίωμα με υψηλό μέτρο ελαστικότητας μπορεί να παρέχει επαρκή μηχανική στήριξη στο οστό, ωστόσο, μπορεί επίσης να θέσει σε κίνδυνο τη μετανάστευση των κυττάρων στο μυελό των οστών, των βιομορίων και των ενζύμων, συνεπάγοντας την καθυστέρηση της απορρόφησης του ικριώματος και την επακόλουθη εμφάνιση σχισμής. Ως εκ τούτου, η σωστή ισορροπία μεταξύ του μέτρου ελαστικότητας και του πορώδες, θα επιταχύνουν την αναγέννηση των οστών. [28]

Η δημιουργία ικριωμάτων με αυξημένο πορώδες οδηγεί σε ικριώματα με μειωμένες μηχανικές ιδιότητες. Για παράδειγμα, όπως φαίνεται και στην βιβλιογραφία, κατά την έρευνα των των Α. Mitsak et al. [37], τα ικριώματα που είχαν μεγαλύτερο πορώδες (70%) και υψηλή διαπερατότητα δεν πληρούσαν τις προϋποθέσεις για το ελάχιστο

μέτρο ελαστικότητας (50MPa), χωρίς την ανάπτυξη του ιστού, σε σχέση με εκείνα που είχαν μικρότερο πορώδες (53,46%). Για τους παραπάνω λόγους, πρέπει να επιτευχθεί ισορροπία μεταξύ του πορώδους των ικριωμάτων και των μηχανικών ιδιοτήτων τους, καθώς εμφανίζουν άμεση αλληλεξάρτηση.

# 2.2.2 Προσανατολισμός Ινών

Η επίδρασης της μορφολογίας των πόρων σε σχέση με τις μηχανικές ιδιότητες ερευνήθηκε από τους Lee et al. [44] Στην συγκεκριμένη έρευνα κατασκευάστηκαν ικριώματα από πολυμερή PCL/PLGA με την τεχνική multihead deposition system (MHDS), τα οποία είχαν πόρους με διαφορετικές γεωμετρίες και διαφορετική κατεύθυνση στοίβαξης, οριζόντια (horizontally stacked scaffold - HSS) και κατακόρυφη (vertically stacked scaffold - VSS). Τα ικριώματα είχαν ίδιο πορώδες, ενώ οι γεωμετρίες που χρησιμοποιήθηκαν αποτελούνταν από πόρους σε μορφή δικτυωτού πλέγματος, συνδεδεμένους κλιμακωτά και υπό την μορφή τριγώνων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα ικριώματα που είχαν προσανατολισμό 0°-60°-120° (triangle type)παρουσίασαν την υψηλότερη αντοχή σε θλίψη και το μεγαλύτερο μέτρο ελαστικότητας. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε δοκιμή θλίψης κατά την κατακόρυφη και την οριζόντια διεύθυνση και στους δύο τύπους κατεύθυνσης στοίβαξης, όπου τα αποτελέσματα των δύο ικριωμάτων ήταν διαφορετικά, ανάλογα με την κατεύθυνση στοίβαξης ακόμα κι αν η αρχιτεκτονική των ικριωμάτων ήταν πανομοιότυπη. Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 2.1, κατά την οριζόντια κατεύθυνση παρουσιάζει μεγαλύτερη αντοχή η κατεύθυνση οριζόντιας στοίβαξης των ικριωμάτων, ενώ κατά την κατακόρυφη κατεύθυνση, της κατακόρυφης στοίβαξης. Συνεπώς προτάθηκε η κατεύθυνση της στοίβαξης των ικριωμάτων να είναι ίδια με την κατεύθυνση της δύναμης που επιβάλλεται στο ικρίωμα. Τέλος, μεγαλύτερη αντοχή σε θλίψη παρουσίασαν τα ικριώματα που είχαν οριζόντια κατεύθυνση στοίβαξης.



Εικόνα 2.8: Εικόνες από την έρευνα των Lee et al.(α) lattice (b) stagger (c) triangle. [44]

				Horizontal Direction		Vertical Direction	
Туре	Lattice	Stagger	Triangle	HSS	VSS	HSS	VSS
Compressive strength (MPa)	6.05	7.43	9.81	10.7	3.7	3.2	5.8
Compressive modulus (MPa)	120.2	122.3	178	110.2	78.4	78.3	117.9

HSS, horizontally stacked scaffold; VSS, vertically stacked scaffold.

Σύμφωνα με τους Cambre N. Kelly et al. [48] τα ικριώματα που έχουν στρώσεις διασταυρούμενης μορφής είναι αρκετά δημοφιλή για οστική αναγέννηση με την χρήση της μεθόδου FDM. Το γεγονός αυτό οφείλεται πιθανόν λόγω της απλότητας του σχεδιασμού τους και της διασυνδεόμενης φύσης τους, καθώς και τους εγγενείς περιορισμούς που απαιτεί η χρήση αυτών των μεθόδων εκτύπωσης.

Οι Cambre N. Kelly et al [48] αναφέρουν αρκετές έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί και αποδεικνύουν ότι τα ικριώματα που έχουν στρώσεις διασταυρούμενης μορφής με προσανατολισμό στρώσεων σε μορφή 0°-90° ήταν πιο άκαμπτα και λιγότερα πλαστικά σε σχέση με ικριώματα (cross-hatches) σε μορφή 0°-45°-90° -135° με διπλή στρώση, είτε σε προσανατολισμό 0°-90°, είτε σε 0°-45°-90°-135°. Πιο συγκεκριμένα κατά την έρευνα που πραγματοποίησαν οι Moroni et al. [49] συμπέραναν ότι η αύξηση των αλληλεπικαλυμμένων περιοχών μεταξύ των ινών που είχαν προσανατολισμό 0°-45°-90°-130° προκαλούσαν μείωση των τοπικών τάσεων, ενώ οι περιοχές με διπλές στρώσεις ήταν μηχανικά πιο αδύναμες. Επιπλέον, ένα ακόμη σημαντικό μειονέκτημα είναι ότι κατά τον προσανατολισμό 0°-45°-90°-135°, το διάστιχο που υπάρχει μεταξύ των στρώσεων που διατηρείται ίσο μεταξύ των επιπέδων, εξαλείφει τα συνεχή φορτία κατά το μήκος μιας διαδρομής μεταξύ των καταστάσεων των φορτίων και στην δημιουργία μιας πιο αδύναμης δομής.

Τέλος, κατά την έρευνα που πραγματοποιήσαν οι Iwan Zein et al. σε ικριώματα από PCL με προσανατολισμό στρώσεων 0°-90° και 0°-60°-120° [19], τα αποτελέσματα που ελήφθησαν έδειξαν ότι μεγαλύτερο μέτρο ελαστικότητας παρουσίασε η δομή με προσανατολισμό στρώσεων 0°-90°, ενώ μεγαλύτερο όριο διαρροής παρουσίασαν τα ικριώματα με προσανατολισμό στρώσεων

Πίνακας 2.1: Αποτελέσματα των μηχανικών ιδιοτήτων των ικριωμάτων που εμφανίζουν διαφορετικό προσανατολισμό ινών κατά την έρευνα των Lee et al. (Βλέπε Εικόνα 2.8) [44]

0°-60°-120°, πράγμα που αποδεικνύει την επιρροή που έχει ο προσανατολισμός των στρώσεων, στις μηχανικές ιδιότητες των ικριωμάτων.



Εικόνα 2.9:Αποτελεσματα από την δοκιμή Θλίψης που πραγματοποιήσαν οι Iwan Zein et al. σε ικριώματα από PCL με διαφορετικό προσανατολισμό στρώσεων. (a) Μέτρο Ελαστικότητας (b) Όριο διαρροής. [19]

## 2.2.3 Διάταξη Ινών ικριώματος

Από την έρευνα που πραγματοποίησαν οι Μ. Yeo et al. [46], όπως αναφέρθηκε και κατά τον δομικό σχεδιασμό στην Ενότητα 2.1.5, κατασκεύασαν ικριώματα από PCL τα όποια είχαν διαφορετική στοίβαξη των ινών τους σε κάθε δεύτερη στρώση. Μετά το πέρας της έρευνας, οι επιστήμονες συμπέραναν ότι τα ικριώματα στα οποία οι ίνες τους είχαν τοποθετηθεί σε κάθε δεύτερη στρώση ενδιάμεσα των ινών της προηγούμενης στρώσης από αυτή που ενώνονται (Βλέπε Εικόνα 2.5) PT-100, εμφάνισαν όχι μόνο τον υψηλότερο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αλλά παρουσίασαν και το μεγαλύτερο μέτρο ελαστικότητας, κατά 7.4% υψηλότερο σε σχέση με το ικρίωμα που είχε στοιβαγμένες ίνες κάθε δεύτερη στρώση κατά σειρά. Ωστόσο, ο συντελεστής εφελκυσμού ήταν παρόμοιος. Ακόμη παρατηρήθηκε ότι τα ικριώματα με πεπλεγμένη στοίβαξη ινών είναι πιο ανθεκτικά, στις περιοχές που έχουν

Συμπερασματικά η τροποποίηση της μικροδομής των ινών σε ένα ικρίωμα, μπορεί να ελέγξει τις μηχανικές ιδιότητες υπό συνθήκες ίδιου πορώδους.

Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και από την έρευνα των Lee et al. [44] όπου συμπέραναν ότι τα ικριώματα που οι ίνες τους είχαν τοποθετηθεί σε κάθε δεύτερη στρώση, ενδιάμεσα των ινών της προηγούμενης στρώσης από αυτή που ενώνονται (Stagger) παρουσίασαν μεγαλύτερο μέτρο ελαστικότητας και όριο διαρροής, σε σχέση με εκείνα που οι ίνες τους είχαν τοποθετηθεί κατακόρυφα στην ίδια γραμμή, ανάμεσα στις εναλλασσόμενες στρώσεις. (Lattice) (Βλέπε Πίνακα 2.1 και Εικόνα 2.8)



Διάγραμμα 2.1: Καμπύλες τάσης - παραμόρφωσης που προέκυψαν κατά την έρευνα των Lee et al. [44]

## 2.2.4 Αποστάσεις μεταξύ των Ινών.

Όπως στην παραπάνω αναφέρουσα έρευνα που πραγματοποιήσαν οι Moroni et al. [49], μελέτησαν και την επίδραση της απόστασης μεταξύ των ινών. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.10 η απόσταση αυτή ορίζεται ως d2. Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι όταν αυξάνεται αυτή η απόσταση υπάρχει σημαντική μείωση στο μέτρο Ελαστικότητας της δομής.



Εικόνα 2.10:(a) Διαστάσεις Ινών από την έρευνα των Moroni et al (b) Καμπύλη μέτρου ελαστικότητας σε σχέση με την απόσταση μεταξύ των ινών. [49]

## 2.2.5 Διαπερατότητα

Η υψηλή διαπερατότητα στα ικριώματα συντελεί στην καλύτερη μεταφορά μάζας. Ωστόσο μπορεί να μειώνει τις μηχανικές αντοχές των ικριωμάτων. Όπως αναφέρθηκε και στην Ενότητα 2.1.3, η ερευνητική ομάδα των Α. Mitsak et al. [37] κατασκεύασαν ικριώματα από PCL με χαμηλή διαπερατότητα (0.688 · 10<sup>-7</sup>m<sup>4</sup>/Ns) και κάποια υψηλή διαπερατότητα (3.991 · 10<sup>-7</sup>m<sup>4</sup>/Ns) πόρων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα ικριώματα με υψηλή διαπερατότητα δεν εμφάνισαν το απαιτούμενο μέτρο ελαστικότητας πριν πραγματοποιηθεί η ανάπτυξη ιστού. Παρ' όλα αυτά, μετά την καλλιέργεια κυττάρων και την ανάπτυξη ιστού, στο πέρας τεσσάρων και οχτώ εβδομάδων, οι μηχανικές ιδιότητες των ικριωμάτων με υψηλή διαπερατότητα αυξήθηκαν σημαντικά και τα ικριώματα μπορούσαν να αντέξουν μεγαλύτερο φορτίο σε σχέση με τα ικριώματα που δεν είχε πραγματοποιηθεί η καλλιέργεια. Συμφώνα με του ερευνητές, το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι τα ικριώματα που είχαν σχεδιαστεί με υψηλή διαπερατότητα, μπορούν να επωφελούν όχι μόνο στην ενίσχυση της ανάπτυξης του νέου οστού, σε σχέση με τα ικριώματα χαμηλής διαπερατότητας, αλλά και στην ενίσχυση των μηχανικών ιδιοτήτων, προκειμένου να στηρίξουν τον αναπτυσσόμενο και τους περιβάλλοντες ιστούς.

# 2.3 Ικανότητα Απορρόφησης Νερού

Η ικανότητα ενός ικριώματος να απορροφά νερό αποτελεί έναν από τους βασικότερους παράγοντες που επηρεάζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την δομική μορφολογία του ιστού που θα αναπτυχθεί. Επιπλέον η τα ικριώματα με αυξημένη απορροφητικότητα συντελούν στην πρόληψη της απώλειας σωματικών υγρών και θρεπτικών ουσιών σε καταστάσεις τόσο in vitro, όσο και in vivo. Όπως αποδείχθηκε και στην έρευνα που πραγματοποίησαν οι M. Yeo et al. [46], τα

ικριώματα του παρουσιάζουν πολυπλοκότερη δομή εμφανίζουν και μεγαλύτερη απορροφητικότητα νερού. Μάλιστα στην συγκεκριμένη έρευνα , η οποία έχει αναπτυχθεί περαιτέρω στην Ενότητα 2.1.5 , τα ικριώματα με πεπλεγμένη στοίβαξη ινών PT-100, εμφάνισαν αύξηση απορρόφησης νερού σε σχέση με τα ικριώματα PT- 0 που είχαν απλούστερη δομή. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στην στο γεγονός ότι τα ικριώματα PT-100 είχαν ευρύτερη περιοχή επαφής μεταξύ του νερού και του ικριώματος, λόγω της ελαφρώς πολυπλοκότερης δομής.

Παράλληλα τα ικριώματα με μεγάλους πόρους δυσχεραίνουν την αποτελεσματικότητα εμφύτευσης των κυττάρων που έχουν εγχυθεί σ' αυτά, καθώς διευκολύνεται η ροή των κυττάρων ανάμεσα στους πόρους. Το ίδιο συμβαίνει και στα ικριώματα που έχουν απλούστερη δομή. Τα ικριώματα με πεπλεγμένη δομή συντελούν στην διάδοση των κυττάρων ευρέως προς όλες τις κατευθύνσεις, εμφανίζοντας τις λιγότερες απώλειες του ρευστού. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να επηρεάσει την αποτελεσματικότητα και την κυτταρική διασπορά λόγω του αυξημένου χρόνος επαφής μεταξύτων κυττάρων και του οστεογονικού υγρού.

Παρ' ότι το PCL καθίσταται ένα εξαιρετικό υλικό για την κατασκευή εμφυτευμάτων, η κύρια δυσκολία στην χρήση του είναι η βελτιστοποίηση των παραμέτρων εκτύπωσης του, καθώς και η δημιουργία της κατάλληλης εσωτερικής δομής των ικριωμάτων, ώστε να επιτευχθεί η απαιτούμε αντοχή αλλά και οι ευνοϊκότερες συνθήκες για τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των κυττάρων. Στην συνέχεια θα αναπτυχθούν οι βασικότερες παράμετροι σχεδιασμού και εκτύπωσης των ικριωμάτων, όπως προσδιορίστηκαν κατά την διεκπεραίωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

# 3.1 Χαρακτηρισμός PCL εκτύπωσης

Το PCL που χρησιμοποιήθηκε για τις ανάγκες αυτής της διπλωματικής , είναι της εταιρίας eSun και παρέχεται στο εμπόριο με την ονομασία eMate. Εφόσον τα ικριώματα θα χρησιμοποιηθούν σε βιοϊατρικές εφαρμογές, καθίσταται απαραίτητο να μην είναι τοξικό για τον οργανισμό που θα τοποθετηθεί αλλά και για τα κύτταραιστό που θα φιλοξενήσει. Το PCL που χρησιμοποιήθηκε χαρακτηρίζεται ως μη τοξικό από τον κατασκευαστή και έχει πάρει έγκριση από τον οργανισμό FDA (Food and Drug Administration). Στο Διάγραμμα 3.1 παρουσιάζεται η αξιολόγηση των Κινδύνων του υλικού, όπως δόθηκε από τον κατασκευαστή. Το υλικό είναι σε μορφή νήματος διάμετρου 1.75mm. Επιπλέον χαρακτηριστικά για το υλικό αναφέρονται στον Πίνακα 3.1.



Διάγραμμα 3.1: Προσδιορισμός κινδύνων του PCL σύμφωνα με τον κατασκευαστή.

Ιδιότητες	Δεδομένα		
Προτεινόμενη Θερμοκρασία Εκτύπωσης	70 - 100 °C		
Θερμοκρασία Πλατφόρμας Εκτύπωσης	<40°C		
Πυκνότητα	1.16 g/cm <sup>3</sup>		
Θερμοκρασίας Θερμικής Παραμόρφωσης	45 (°C,0.45MPa)		
Δείκτης Ροής Τήξης	70/2.16kg (g/10min)		
Αντοχή σε Εφελκυσμό	18 MPa		
Θραύση κατά τον Εφελκυσμό	800 %		
Αντοχή στην Κάμψη	13 MPa		
Μέτρο Ελαστικότητας	345 MPa		

Πίνακας 3.1: Φυσικές και Χημικές Ιδιότητες από τον κατασκευαστή για το PCL που χρησιμοποιήθηκε.

# 3.2 Σχεδιασμός Ικριώματος

Κατά τον σχεδιασμό του ικριώματος πρέπει να επιτευχθεί ισορροπία μεταξύ δύο βασικών στόχων: της δημιουργίας ικριωμάτων με δομή που αυξάνει την οστική μάζα και την δημιουργία ικριωμάτων που έχουν τις απαραίτητες μηχανικές ιδιότητες. Οι δύο αυτοί στόχοι εξαρτώνται από την εσωτερική αρχιτεκτονική και το υλικό των ικριωμάτων. Για τον σχεδιασμό των ικριωμάτων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό SolidWorks.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι ο σχεδιασμός ικριωμάτων τα οποία πληρούν τις παραπάνω προϋποθέσεις και έχουν τα βέλτιστα αποτελέσματα στην δημιουργία ιστού. Για τον σκοπό αυτό σύμφωνα με την βιβλιογραφία και από προηγούμενες μελέτες, δημιουργήθηκαν ικριώματα τα οποία παρουσιάζουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά. Προκειμένου να γίνει κατανοητός ο σχεδιασμός των ικριωμάτων είναι σημαντικό πρώτα να ορισθούν ορισμένες παράμετροι σχεδιασμού. Η ορολογία που χρησιμοποιήθηκε είναι βασισμένη στην έρευνα των Μ. Domingos et al. και παρουσιάζεται στην συνέχεια. [15]



Εικόνα 3.1: Παράμετροι Σχεδιασμού Ικριωμάτων. [15]

Όπως φαίνεται και στην παραπάνω εικόνα, υπάρχουν πέντε βασικές παράμετροι για τον σχεδιασμό των ικριωμάτων:

- Road Width/Filament Diameter (RW): Χαρακτηρίζεται ως η διάμετρος των ινών από PCL στα ικριώματα.
- Filament Gap (FG): Χαρακτηρίζεται ως η απόσταση μεταξύ δύο διαδοχικών ινών, η οποία χαρακτηρίζει και το μέγεθος των πόρων.
- Slice Thickness (ST): Χαρακτηρίζεται ως η κάθετη απόσταση των κέντρων δύο διαδοχικών στρώσεων με διαφορετικό προσανατολισμό.
- Layer Gap (LG): Χαρακτηρίζεται ως η απόσταση μεταξύ δύο διαδοχικών στρώσεων που έχουν τον ίδιο προσανατολισμό.
- Filament Distance (FD): Χαρακτηρίζεται ως η οριζόντια απόσταση μεταξύ των κέντρων δύο διαδοχικών ινών.

# 3.2.1 Επιλογή Μεγέθους Πόρων

Κατά την έρευνα που πραγματοποιήσαν οι Se Heang Oh et al. [32], τα αποτελέσματα έδειξαν βέλτιστη ανάπτυξη χονδροκυττάρων για μέγεθος πόρων 380-405μm και οστεοβλάστες, 186-200μm για ινοβλάστες, ενώ 290-310μm για τον σχηματισμό νέου οστού. Αναφέρεται επίσης ότι για μέγεθος πόρων μεγαλύτερο από 400μm, σημειώνεται εξαιρετική ανάπτυξη οστού. Ωστόσο, δεν είναι ακόμα σαφές από την βιβλιογραφία, εάν τα ικριώματα με ομοιογενή κατανομή μεγέθους πόρων είναι πιο αποτελεσματικά, σε σχέση από εκείνα που έχουν πόρους ετερογενών μεγεθών. Έτσι,

δημιουργείται ένα ερώτημα προς διερεύνηση σχετικά με την επιρροή που εμφανίζουν οι πόροι με διαφορετικά μεγέθη στην μηχανική και βιολογική συμπεριφοράτων ικριωμάτων.

Προκειμένου να διερευνηθεί το παραπάνω ερώτημα, στην παρούσα διπλωματική εργασία, σχεδιάστηκαν ικριώματα με πόρους ετερογενών μεγεθών. Εφόσον πρόκειται για ικριώματα που στοχεύουν στην αναγέννηση οστίτη ιστού ή χόνδρου, επιλέχθηκε ο συνδυασμός διαφορετικών πόρων 300μm-500μm, που αποτελεί το **Scaffold 3**. Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση των πόρων ετερογενών μεγεθών, τόσο στην μηχανική αλλά και στην βιολογία των ικριωμάτων, σχεδιαστήκαν δύο ακόμη ικριώματα που έχουν ομοιογενή κατανομή πόρων, ικριώματα με μέγεθος πόρων 0.3mm το οποίο ονομάζεται **Scaffold 1**, ικριώματα με μέγεθος πόρων ίσο με 0.5mm με την ονομασία **Scaffold 2**. Τα συγκεκριμένα μεγέθη πόρων επιλέχθηκαν καθώς έχουν σημαντική διαφορά μεγέθους και σύμφωνα με την βιβλιογραφία, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, εμφανίζουν καλά αποτελέσματα ως προς την οστεογένεση.

Τα τρία είδη ικριωμάτων επιλέχθηκε να έχουν ίδια αρχιτεκτονική, ώστε να μελετηθεί η επίδραση των πόρων διαφορετικών μεγεθών και να μην επηρεαστεί από την εσωτερική αρχιτεκτονική. Η διάμετρος των ινών επιλέχθηκε και για τα τρία είδη να είναι ίδια και ίση με 0.600mm, καθώς επιθυμούμε τον περιορισμό άλλων παραγόντων όπως είναι το μέγεθος των ινών. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αναφέροντα μεγέθη, τα οποία έχουν επιλεχθεί, ώστε οι τρείς διαφορετικές δομές των ικριωμάτων να εμφανίζουν τα επιλεγμένα χαρακτηριστικά. Αφού επιλεχθούν το μέγεθος του πόρου FG και η διάμετρος των ινών RW, τότε τα μεγέθη ST, LG και FD εύκολα προκύπτουν.

	Μέγεθος πόρων (mm)	Road Width- RW (mm)	Filament Gap-FG Μέγεθος Πόρων (mm)	Slice Thickness- ST (mm)	Layer Gap- LG (mm)	Filament Distance-FD (mm)
Scaffold 1	0.300	0.600	0.300	0.600	0.600	0.900
Scaffold 2	0.500	0.600	0.500	0.600	0.600	1.100
Scoffold 2	0.300	0.600	0.300	0.600	0.600	0.900
Scarloid S	0.500	0.600	0.500	0.600	0.600	1.100

Πίνακας 3.2: Επιλεγμένες παράμετροι σχεδιασμού των ικριωμάτων.

#### 3.2.2 Επιλογή Εξωτερικών Διαστάσεων

Οι εξωτερικές διαστάσεις των τριών ικριωμάτων προκύπτουν όπως είναι φυσικό, από τις παραμέτρους που αναπτύχθηκαν στην Ενότητα 3.2.1. Βασική προϋπόθεση κατά την επιλογή των διαστάσεων στα ικριώματα, αποτελεί η δυνατότητα καλλιέργειας τους σε πιάτα καλλιεργειών (culture plates). Το πιάτο που επιλέχθηκε να καλλιεργηθούν τα ικριώματα είναι της εταιρίας Costar, με τον κωδικό 3513, του οποίου οι διαστάσεις φαίνονται στο Παράρτημα 8.2 και αποτελεί το Κατασκευαστικό Σχέδιο 8.2.1.

Το ύψος για όλα τα ικριώματα επιλέχθηκε να είναι ίσο με 7.8mm, ενώ το μήκος και το πλάτος, καθώς εξαρτούνται από το μέγεθος των πόρων και κάθε ικρίωμα παρουσιάζει διαφορετικό μέγεθος πόρων, επιλέχθηκαν ώστε να μην υπάρχει μεγάλη απόκλιση μεταξύ τους. Έτσι για το Scaffold 1 επιλέχθηκε το μήκος και το πλάτος να είναι ίσα με 11.40mm, ενώ για τα Scaffold 2 και Scaffold 3, επιλέχθηκαν να είναι ίσα με 11.60mm.Τα παραπάνω μεγέθη υπολογίστηκαν σε βάση τις σχεδιαστικές παραμέτρους, όπως αναπτύχθηκαν στην εισαγωγή της Ενότητας 3.2. Οι σχέσεις που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στην συνέχεια:

Σχέση 3.1

$$\mu \eta \kappa o \varsigma = m * RW + (m-1) * FG$$

Σχέση 3.2

$$πλ$$
άτος =  $n * RW + (n - 1) * FG$ 

Σχέση 3.3

Όπου:

k: ο αριθμός των κάθετων ινών - κατεύθυνση Ζ. m: ο αριθμός των οριζόντιων ινών - κατεύθυνση Χ. n: ο αριθμός των οριζόντιων ινών - κατεύθυνση Υ.

Οι κατευθύνσεις X-Y-Z και οι παράμετροι k,m,n μπορούν να γίνουν κατανοητές από την Εικόνα 3.2. Επιλέχθηκε ο ίδιος αριθμός ινών κατά την κατεύθυνση X με την κατεύθυνση Y (m=n). Έτσι το μήκος και το πλάτος που εξαρτώνται από τον αριθμό των ινών στις κατευθύνσεις X και Y αντίστοιχα, επιλέχθηκε να έχουν την ίδια τιμή, καθώς εμφανίζουν τον ίδιο αριθμό οριζόντιων ινών.



Εικόνα 3.2: Ένδειξη των συμβόλων 'k', 'm' και 'n' που χρησιμοποιήθηκαν στις Σχέσεις 3.1 - 3.3. Το σύμβολο k αφορά των αριθμών των ινών που τοποθετήθηκαν κατά την κατεύθυνση Ζ. Τα σύμβολαα m και n, αφορούν αντίστοιχα των αριθμό των ινών που τοποθετήθηκαν κατά τις κατεύθυνσεις Χ και Υ.

Χάριν ευκολίας, εφόσον ο αριθμός των ινών κατά την κατεύθυνση Χ και Υ είναι ο ίδιος (m=n), στην παρούσα διπλωματική εργασία στον σχεδιασμό των ικριωμάτων οι ίνες που τοποθετήθηκαν κατά τις κατευθύνσεις Χ και Υ ονομάζονται 'οριζόντιες' (οριζόντια κατεύθυνση). Αντίστοιχα οι ίνες που τοποθετήθηκαν κατά την κατεύθυνση Ζ με αριθμό k, χάριν ευκολίας θα αναφέρονται ως 'κάθετες' (κατακόρυφη κατεύθυνση).

# 3.2.3 Προσανατολισμός και Διάταξη Ινών

Προκειμένου να μελετηθεί η επιρροή των πόρων ετερογενών μεγεθών και στα τρία ικριώματα επιλέχθηκε να εναλλάσσεται ο προσανατολισμός μεταξύ δύο διαδοχικών στρώσεων κατά 90°, ώστε ο προσανατολισμός τον στρώσεων να μην επηρεάζει σε οποιοδήποτε παράγοντα το μηχανικό και βιολογικό περιβάλλον των ικριωμάτων. Συνεπώς, η σχέση μεταξύ δύο διαδοχικών στρώσεων των ικριωμάτων που σχεδιάστηκαν είναι 0°-90°.



Εικόνα 3.3: Προσανατολισμός των στρώσεων που επιλέχθηκε κατά τον σχεδιασμό των ικριωμάτων. [25]

Επιπλέον για τον ίδιο λόγο, επιλέχθηκε και τα τρία ικριώματα να έχουν την ίδια διάταξη Ινών. Στην συνέχεια σύμφωνα με τις Σχέσεις 3.1-3.3 και για τις επιλεγμένες διαστάσεις σχεδιάστηκαν τα ικριώματα στο SolidWorks.

# Scaffold 1

To Scaffold 1 σχεδιάστηκε με τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

- Προσανατολισμός στρώσεων 0°- 90°
- Αριθμός οριζόντιων ινών m=n: 13
- Αριθμός κάθετων ινών k: 13
- Ύψος=7.8mm , Μήκος=11.40mm, Πλάτος= 11.40mm



Εικόνα 3.4: (a) Πλάγια δεξιά όψη του Scaffold 1. (b) 3D όψη του Scaffold 1.

# Scaffold 2

To Scaffold 2 σχεδιάστηκε με τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

- Προσανατολισμός στρώσεων 0°- 90°
- Αριθμός οριζόντιων ινών m=n: 11
- Αριθμός κάθετων ινών k: 13
- Ύψος=7.8mm , Μήκος=11.60mm, Πλάτος= 11.60mm



Εικόνα 3.5:a) Πλάγια δεξιά όψη του Scaffold 2. b) 3D όψη του Scaffold 2.

# Scaffold 3

To Scaffold 3 έχει πόρους διαφορετικών μεγεθών και αποτελείται από τον συνδυασμό των πόρων των προηγούμενων δύο ικριωμάτων.

Το τμήμα που παρουσιάζει πόρους 0.300mm έχει τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

- Προσανατολισμός στρώσεων: 0° 90°
- Αριθμός οριζόντιων ινών m=n: 13
- Αριθμός κάθετων ινών k: 7
- Ύψος=4.20mm , Μήκος=11.40mm, Πλάτος= 11.40mm

Το τμήμα που παρουσιάζει πόρους 0.500mm έχει τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

- Προσανατολισμός στρώσεων: 0° 90°
- Αριθμός οριζόντιων ινών m=n: 11
- Αριθμός κάθετων ινών k: 6
- Ύψος=3.60mm , Μήκος=11.60mm, Πλάτος= 11.60mm



Εικόνα 3.6: (a) Πλάγια δεξιά όψη του Scaffold 3. (b) 3D όψη του Scaffold 3.

 Οι τελικές εξωτερικές διαστάσεις του Scaffold 3 είναι: Ύψος=7.80mm , Μήκος=11.60mm, Πλάτος= 11.60mm

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά των δια στάσεων και των ινών για τα τρία είδη ικριωμάτων. Τα κατασκευαστικά σχέδια των ικριωμάτων βρίσκονται στο Παράρτημα 8.2.

	Μέγεθος πόρων (mm)	Αριθμός Οριζόντιων Ινών (m=n)	Αριθμός Κάθετων Ινών (k)	Μήκος (mm)	Πλάτος (mm)	Ύψος (mm)
Scaffold 1	0.300	13	13	11.40	11.40	7.8
Scaffold 2	0.500	11	13	11.60	11.60	7.8
Cooffold 2	0.300	13	10	11.00	11.00	7.0
Scanold 3	0.500	11	13	11.60	11.60	7.8

Πίνακας 3.3: Σχεδιαστικά στοιχεία και διαστάσεις των ικριωμάτων.

## 3.2.4 Σχεδιασμός πορώδους δομής

## 3.2.4.1 Μορφολογία Πόρων

Η μορφολογία των πόρων καθορίζεται από την κατεύθυνση έγχυσης των κυττάρων, καθώς εκείνα προσκολλιούνται στα τοιχώματα του ικριώματος και αναπτύσσουν τον ιστό κατά τον πολλαπλασιασμό τους. Εξαιτίας του προσανατολισμού των στρώσεων 0° - 90° και της διάταξης των ινών, τα ικριώματα σύμφωνα με την βιβλιογραφική αναφορά [15], σχεδιάστηκαν με πόρους κυβικής μορφής.

Scaffold 1

To Scaffold 1 έχει ομοιογενή κατανομή πόρων κυβικής μορφής, μεγέθους 0.300mm.



Εικόνα 3.7: Κάτοψη του Scaffold 1.

Scaffold 2

To Scaffold 2 έχει ομοιογενή κατανομή πόρων κυβικής μορφής, μεγέθους 0.500mm.



Εικόνα 3.8:Κάτοψη του Scaffold 2.

Scaffold 3

To Scaffold 3 παρουσιάζει πόρους ετερογενών μεγεθών κυβικής μορφής, μεγέθους 0.300-0.500mm.



Εικόνα 3.9: a)Άνοψη του Scaffold 3. b) Κάτοψη του Scaffold 3.

## 3.2.4.2 Ποσοστό Πορώδους

Το ποσοστό του πορώδους των ικριωμάτων μπορεί να δοθεί σύμφωνα με την παρακάτωσχέση [50]:

$$p = \frac{V_{solid} - V}{V_{solid}} * 100\%$$

Σχέση 3.4

Όπου:

V<sub>solid</sub>: ο όγκος της συμπαγούς γεωμετρίας του ικριώματος V: ο όγκος του πορώδους ικριώματος

Για τα θεωρητικά μεγέθη η Σχέση 3.2.4.1 μπορεί να γραφτεί ως

$$p = \frac{V_{th,solid} - V_{th}}{V_{th,solid}} * 100\%$$

Σχέση 3.5

Προκειμένου να υπολογιστεί το θεωρητικό πορώδες των ικριωμάτων, πάρθηκε ο θεωρητικός όγκος τους **V**th μέσα από το σχεδιαστικό πρόγραμμα SolidWorks, όπου δίνεται η δυνατότητα υπολογισμού του, ενώ ο θεωρητικός όγκος των συμπαγών ικριωμάτων, υπολογίστηκε με βάση τις διαστάσεις τους από την παρακάτω σχέση:

## $V_{th,solid} = \mu$ ήκος \* πλάτος \* ύψος

Σχέση 3.6

Κατά αυτόν τον τρόπο και με βάση τις δύο παραπάνω σχέσεις υπολογίστηκε το θεωρητικό πορώδες για καθένα από τα ικριώματα, όπως παρουσιάζεται στον παρακάτωπίνακα.

	Μέγεθος πόρων (mm)	V <sub>th</sub> (mm³)	V <sub>th,solid</sub> (mm <sup>3</sup> )	Θεωρητικό Πορώδες (%)
Scaffold 1	0.300	544.73	1013.688	46.26
Scaffold 2	0.500	469.01	1049.568	55.32
Scaffold 3	0.300-0.500	514.93	1049.568	50.94

Πίνακας 3.4: Θεωρητικό πορώδες και θεωρητικοί όγκοι των ικριωμάτων.

Παρατηρείται ότι υψηλότερο ποσοστού θεωρητικού πορώδους, εμφανίζει το Scaffold 2, όπως είναι φυσικό, καθώς έχει το μεγαλύτερο μέγεθος πόρων. Ενδιάμεσο ποσοστό εμφανίζει το Scaffold 3 που έχει τα δύο μεγέθη πόρων και είναι μεγαλύτερο κατά 4.68% σε σχέση με το Scaffold 1.

# 3.2.4.3 Διασυνδεσιμότητα και πόρων

Ένα από βασικότερα χαρακτηριστικά των ικριωμάτων προκειμένου να έχουμε τον βέλτιστο πολλαπλασιασμό κυττάρων είναι να παρουσιάζουν υψηλή διασυνδεσιμότητα πόρων, καθώς όπως έχει αναφερθεί και στην Ενότητα 2.1.3 η υψηλή διασυνδεσιμότητα με κανονική αρχιτεκτονική προτείνεται για την αναγέννηση οστών. Σύμφωνα με τον σχεδιασμό του προσανατολισμού των στρώσεων, επιτυγχάνεται διασυνδεσιμότητα 100%. Μ' αυτό τον τρόπο εξασφαλίζονται:

- 1. Η εξάπλωση των κυττάρων κατά την έγχυση τους σε όλη την δομή.
- 2. Βέλτιστη παροχή οξυγόνου
- 3. Βέλτιστη παροχή θρεπτικού υλικού
- 4. Αποφυγή συσσώρευσης κυτταρικών αποβλήτων

# 3.3 Λογισμικό Σχεδιασμού Τροχιάς Slicer

Η σχεδίαση τρισδιάστατων μοντέλων μέσω υπολογιστή (Computer-aided Design-CAM) έχει βελτιώσει σημαντικά το σχεδιαστικό και κατασκευαστικό κομμάτι της

παραγωγικής διαδικασίας, αναπτύσσοντας μεθόδους RP, όπως είναι και το 3D printing. Το αντικείμενο σχεδιάζεται αρχικά μέσω ενός γεωμετρικού μοντελιστή και μέσω αλγορίθμων δημιουργείται μια απλή αναπαράσταση ορίων που καλύπτει την επιφάνεια του στερεού με γεωμετρικές οντότητες, και πιο συγκεκριμένα τρίγωνα. Κάθε τρίγωνο περιγράφεται από ένα κανονικό εξωτερικό τρίγωνο και από τις συντεταγμένες τριών διατεταγμένων σημείων. Αυτά τα τριγωνικά πλέγματα είναι αποθηκευμένα σε μορφή αρχείων Standard Triangle Language - STL. Στην πραγματικότητα, το τριγωνικό πλέγμα που δημιουργείται από τις οριακής επιφάνειας ενός τρισδιάστατου στερεού, είναι μια απλή αναπαράσταση επιφάνειας. Το πλέγμα πρέπει να περιέχει πληροφορίες για το ποια πλευρά ενός τριγώνου περιέχει το εσωτερικό του στερεού. [51]

Έτσι, αφού τα ικριώματα σχεδιάστηκαν στο SolidWorks, στην συνέχεια μέσα από αυτό μετατράπηκαν σε αρχεία STL, πληροφορίες των οποίων μπορούν να βρεθούν στον Πίνακα 3.5.

Scaffold	Μέγεθος Αρχείου (KB)	Αριθμός Τριγώνων STL
Scaffold 1	1240	25.376
Scaffold 2	1049	21.472
Scaffold 3	1679	34.380

Πίνακας 3.5: Πληροφορίες των αρχείων STL από τα 3D μοντέλα των ικριωμάτων.

Μετά την μετατροπή των 3D μοντέλων σε αρχεία STL, με την βοήθεια ενός προγράμματος Slicer δημιουργείται ο G-κώδικας για την 3D εκτύπωση. Τα λογισμικά Slicer χρησιμοποιούνται για την δημιουργία προκαθορισμένων τροχιών, που συνήθως αναφέροντες ως τροχιές εργαλείων (toolpaths). [52] Πιο συγκεκριμένα τα λογισμικά αυτά, χωρίζουν σε στρώσεις τα 3D μοντέλα, όπως προκύπτουν από την τομή μεταξύ του μοντέλου και ενός κινούμενου επιπέδου που μετατοπίζεται βηματικά. Για την κάθε στρώση, υπολογίζεται και σχεδιάζεται η τροχιά σύμφωνα με την παραμετροποίηση που έχει επιλέξει ο χρήστης. Στην συνέχεια, μετά τον υπολογισμό της κάθε στρώσης, κάθε τροχιά μετατρέπεται σε οδηγίες G-Code, τις οποίες ακολουθεί ο εκτυπωτής, οδηγώντας την κεφαλή του συστήματος, για την εκτύπωση των αντικειμένων. [20]

Διατίθενται αρκετά πακέτα Slicer λογισμικών, τα οποία παρέχουν μια σειρά από βασικές παραμέτρους για των σχεδιασμό και την εκτύπωση των 3D μοντέλων. Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Ultimaker Cura, το οποίο είναι συμβατό με τον εκτυπωτή που χρησιμοποιήθηκε και προτείνεται από τον κατασκευαστή του. Έτσι, τα αρχεία STL, μετατράπηκαν σε αρχεία G-Code, αφού τους δόθηκαν οι κατάλληλες παράμετροι εκτύπωσης, όπως θα αναπτυχθούν στην Ενότητα 3.4.



Εικόνα 3.10: Προσομοίωση της εκτύπωσης των ικριωμάτων στο πρόγραμμα Ultimaker Cura.

Το πρόγραμμα Ultimaker Cura εμπεριέχει ένα περιβάλλον προσομοίωσης της τροχιάς των εργαλείων, το οποίο διευκολύνει τον κατασκευαστή στην παρακολούθηση, προγραμματισμό και στην παραμετροποίηση των στρώσεων της εκτύπωσης. Στις παρακάτω εικόνες φαίνεται η τροχιά που ακολούθησε το ακροφύσιο κατά την εκτύπωση των ικριωμάτων. Αφού πρώτα ολοκληρώνεται η πρώτη στρώση ινών και για τα δύο ικριώματα, στην συνέχεια τοποθετείται πάνω από αυτή η νέα στρώση ινών, με προσανατολισμό περιστραμμένο κατά 90°.



Εικόνα 3.11: Αναπαράσταση της τροχιάς του ακροφυσίου κατά την εκτύπωση των ικριωμάτων μέσα από το λογισμικό Ultimaker Cura (a)πρώτη στρώση ινών (k=1) ,(b) δεύτερη στρώση ινών (k=2).
# **3.4** Εκτυπωτής 3D printing

Για τις ανάγκες της παρούσας διπλωματικής εργασίας, χρησιμοποιήθηκε για την εκτύπωση των ικριωμάτων ο εκτυπωτής Anycubic I3 Mega. Για τον συγκεκριμένο εκτυπωτή, δίνεται από τον κατασκευαστή ακρίβεια των στρώσεων (Layer Resolution) της τάξης των 0.05-0.3 mm, ακρίβεια θέσης των αξόνων X/Y ίση με 0.0125mm και του άξονα Z ίση με 0.002mm. Επιπλέον οι διαστάσεις της πλατφόρμας εκτύπωσης είναι 210mm×210mm×205mm. Προκειμένου να προσδιοριστούν οι παράμετροι εκτύπωσης, αρχικά εκτυπώθηκαν δοκίμια σε διαφορετικές διαστάσεις και με διαφορετικές τροποποιήσεις των παραμέτρων σε κάθε πείραμα.





#### 3.4.1 Ακροφύσιο Εκτυπωτή

Κατά την έρευνα που πραγματοποίησαν οι Park et al. [22] κατασκεύασαν ικριώματα από PCL με διαφορετικό μέγεθος πόρων και διαφορετική απόσταση μεταξύ των ινών. Μετά το πέρας της έρευνας συμπέραναν ότι μεγαλύτερο μέγεθος πόρων παρουσίασε το ικρίωμα που είχε κατασκευαστεί με το μεγαλύτερο μέγεθος ακροφυσίου (330 μm) και χαρακτηρίστηκε κατάλληλο για την ανάπτυξή κυττάρων, ενώ μεγαλύτερο μέτρο ελαστικότητας παρουσίασε το ικρίωμα που είχε κατασκευαστεί με ακροφύσιο μεγέθους 200 μm και απόσταση ινών 300 μm. Σε παρόμοια έρευνα που πραγματοποίησε ο Park [53] πριν από τη παραπάνω έρευνα είχε χρησιμοποιήσει ακόμα μεγαλύτερο μέγεθος ακροφυσίου ίσο με 400μm που είχε εμφανίσει μεγαλύτερο μέγεθος πόρων και πολύ υψηλό πορώδες. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται ενδεικτικά τα αποτελέσματα.

Ακροφύσιο	Απόσταση Ινών	Πορώδες	Μέγεθος Πόρων	Αναφορά
200 µm	300 µm	45–75%.	128 µm	[22]
250 μm	500 µm	45–75%.	240 µm	[22]
330 µm	700 µm	45–75%.	320 µm	[22]
400 µm	600 µm	91.15%	>600 µm	[53]

Πίνακας 3.6: Βιβλιογραφικές αναφορές σε σχέση με τα διαφορετικά μεγέθη ακροφυσίων και διαφορετικών χαρακτηριστικών των ικριωμάτων.

Κατά την αρχή των πειραμάτων εκτύπωσης χρησιμοποιήθηκε ακροφύσιο 400μm. Το ακροφύσιο πρέπει να μπορεί να εκτυπώσει σύμφωνα με τις προδιαγραφές που έχουν τεθεί κατά τον σχεδιασμό των ικριωμάτων. Η πιο μεγάλη πρόκληση που έπρεπε να αντιμετωπιστεί ήταν το μικρό μέγεθος πόρων (0.300mm-0.500mm) με καλή σχετική ακρίβεια, αλλά και η δημιουργία ινών με το ζητούμενο μέγεθος και μορφή. Με την χρήση του ακροφυσίου που ήταν ίσο με 400μm, το ελάχιστό μέγεθος πόρων που μπορούσε να επιτευχθεί, ήταν ίσο με 0.580mm, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.13a, καθώς κατά τις δοκιμές ικριωμάτων με μικρότερους πόρους, οι εκτυπωμένες ίνες συνενώνονταν μεταξύ τους , χωρίς να δημιουργείται πορώδες. Το γεγονός αυτό συνάδει και με τα αποτελέσματα των παραπάνω ερευνών, όπως παρουσιάζονται και στον παραπάνω Πίνακα 3.6.



Εικόνα 3.13: a)Παρατήρηση στο στερεοσκόπιο του ικριώματος με το μικρότερο δυνατό μέγεθος πόρων με την χρήση ακροφυσίου 400μm που εκτυπώθηκε. b) Ακροφύσιο 300μm που χρησιμοποιήθηκε για την εκτύπωση των ικριωμάτων.

Έτσι η ανάγκη αλλαγής ακροφυσίου με μικρότερη διάμετρο ήταν εμφανής, ώστε να γίνει δυνατή η εκτύπωση μικρότερου μέγεθους πόρων 0.3mm. Στην συνέχεια επιλέχθηκε το ακροφύσιο MK8για διάμετρο νήματος 1.75mm και διαμέτρου **0.3mm**.

Με το ακροφύσιο αυτό, μπόρεσαν να επιτευχθούν τα ζητούμενα μεγέθη πόρων. Επιπλέον το κωνικό σχήμα που έχει το συγκεκριμένο ακροφύσιο, αποτέλεσε ένα ακόμη προσόν για την δημιουργία των πόρων και την ακρίβεια των εκτυπώσεων, αφού αποφεύχθηκε η συνένωση των ινών στα σημεία των πόρων.

#### 3.4.2 Παράμετροι εκτύπωσης

Μια από τις βασικότερες προκλήσεις για την εκτύπωση των ικριωμάτων από PCL, αποτελεί η βελτιστοποίηση των παραμέτρων εκτύπωσης. Η ρύθμιση παραμέτρων όπως η θερμοκρασία εκτύπωσης και ρυθμός τροφοδοσίας έχουν άμεση επίδραση στις δυνατότητες εκτύπωσης του PCL. Όπως παρατηρήθηκε από την έρευνα των Abdul Haq et al. [21] οι βασικότερες παράμετροι εκτύπωσης του PCL είναι η θερμοκρασία εκτύπωσης και η ταχύτητα εκτύπωσης, γεγονός που επιβεβαιώθηκε και κατά τις δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο για τις ανάγκες της παρούσας διπλωματικής.

#### 3.4.2.1 Θερμοκρασία Εκτύπωσης

Εξαιτίας του χαμηλού σημείου τήξεως του PCL (60°C) έπρεπε αρχικά να εντοπιστεί η κατάλληλη θερμοκρασία εκτύπωσης. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε μια σειρά δοκιμών. Παρ' όλο που από τον κατασκευαστή προτείνεται μέγιστη θερμοκρασία εκτύπωσης 110°C, παρατηρήθηκε ότι σε εκείνη τη θερμοκρασία τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά, ενώ πολλές φορές προκύπταν προβλήματα κατά την εκτύπωση. Φυσικά το γεγονός αυτό ο οφείλεται στην λειτουργία του συγκεκριμένου εκτυπωτή και extruder.

Παρατηρήθηκε ότι καλύτερα αποτελέσματα προέκυψαν για θερμοκρασίες εκτύπωσης **180°C**, γεγονός που συνάδει με τα αποτελέσματα που προέκυψαν και από την έρευνα των Abdul Haq et al. [21]. Για θερμοκρασίες μικρότερες των 180°C, εμφανιζόταν πρόβλημα στην ροή του τηκόμενους νήματος. Επιπλέον από την μελέτη που πραγματοποιήσαν οι Cubo-Mateo και Nieves [13], η αποσύνθεση του PCL ξεκινά για θερμοκρασίες άνω των 392°C, οπότε η θερμοκρασία εκτύπωσης που επιλέχθηκε δεν θέτει σε κίνδυνο την ακεραιότητα του πολυμερούς. Στον παρακάτω πίνακα απεικονίζονται ορισμένα από τα βασικά σφάλματα που προέκυψαν κατά την διάρκεια δοκιμών σε διαφορετικές θερμοκρασίες εκτύπωσης (θερμοκρασία περιβάλλοντος 20 °C).

Εικόνα Σφάλματος	Θερμοκρασία εκτύπωσης	Παρατηρήσεις
	<170ºC	Κατά την εκτύπωση των ικριωμάτων σε Θερμοκρασίες μικρότερες των 170°C,παρατηρήθηκε απώλεια υλικού σε πολλά σημεία. Το γεγονός αυτό ενδεχομένως να οφείλεται στην μη αποτελεσματική εκροή του τηκόμενου νήματος λόγω χαμηλής Θερμοκρασίας.
	>210 °C	Κατά την εκτύπωση των ικριωμάτων σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 210 °C, παρατηρήθηκε η συνένωση των στρώσεων. Το φαινόμενο αυτό εμφανίζεται όταν οι εκτυπώμενες στρώσεις δεν προλαβαίνουν να ψυχθούν, με αποτέλεσμα την συνένωση τους.

Πίνακας 3.7: Εικόνες δοκιμών εκτύπωσης των ικριωμάτων κατά την διάρκεια των πειραμάτων, για διαφορετική θερμοκρασία εκτύπωσης.

# 3.4.2.2 Ταχύτητα Εκτύπωσης (Printing Speed)

Ως ταχύτητα εκτύπωσης, αναφέρεται η ταχύτητα κίνησης της κεφαλής του εκτυπωτή. Η ταχύτητα εκτύπωσης μπορεί να κυμαίνεται από 20mm/s μέχρι 100mm/s. Εξαιτίας του υψηλού ιξώδους που παρουσιάζει το PCL,πρέπει να εκτυπώνεται σε χαμηλή

ταχύτητα. Όπως παρατηρήθηκε και κατά την έρευνα που πραγματοποίησαν οι Abdul Haq et al. [21], καλύτερα αποτελέσματα στην δημιουργία ικριωμάτων από PCL δόθηκαν για ταχύτητα εκτύπωσης 20mm/s. Η επιλογή της ταχύτητας για την εκτύπωση των ικριωμάτων αποτελεί βασική παράμετρο και την δημιουργία ικριωμάτων με την βέλτιστη μορφή. Στο παρακάτωπίνακα απεικονίζονται ορισμένα σφάλματα που παρατηρήθηκαν κατά την διάρκεια των πειραμάτων.

Εικόνα Σφάλματος	Ταχύτητα εκτύπωσης	Παρατηρήσεις
	40 mm/s - 60 mm/s	Στις συγκεκριμένες ταχύτητες εκτύπωσης, το τηκόμενο υλικό δεν προλάβαινε να τοποθετηθεί σωστά στις στρώσεις, με αποτέλεσμα την ανομοιομορφία και την λανθασμένη δομή των εκτυπωμένων ικριωμάτων.

Πίνακας 3.8 Εικόνες δοκιμών εκτύπωσης των ικριωμάτων κατά την διάρκεια των πειραμάτων, για διαφορετική ταχύτητα εκτύπωσης.

# 3.4.2.3 Ταχύτητα Διαδρομής (Travel Speed)

Η ταχύτητα διαδρομής ορίζεται ως η ταχύτητα που κινείται η κεφαλή του εκτυπωτή όταν δεν εξωθεί το νήμα. Η υπερβολική αύξηση της ταχύτητας διαδρομής μπορεί να οδηγήσει στην μετατόπιση της στρώσης, στην λανθασμένη τοποθέτηση των ινών ή στην ύπαρξη νημάτων τα οποία επειδή δεν έχουν τοποθετηθεί σωστά ή προσκολλιούνται σε άλλα σημεία του ικριώματος. Ως βέλτιστη ταχύτητα διαδρομής ορίστηκε εκείνη των 20mm/s, γεγονός που συνάδει με τα αποτελέσματα των Haq et al. [21]

#### 3.4.2.4 Υψος απόθεσης υλικού (Deposition of Height)

Το ύψος εναπόθεσης υλικού σχετίζεται με την επιτυχή δημιουργία της μορφής και της δομής των στρώσεων και είναι ίσο με την απόσταση του hot end από την πλατφόρμα εκτύπωσης. Παραδείγματα λανθασμένου και σωστού ύψους απόθεσης υλικού φαίνονται στην Εικόνα 3.14. Το βέλτιστο ύψος απόθεσης υλικού προσδιορίστηκε ίσο με h=0.12mm, όπως και στην έρευνα των Haq et. al. [21]



Εικόνα 3.14: Σχετική θέση ακροφυσίου-στρώσης (a) Λανθασμένη (b) Συνιστώμενη. [11]

#### 3.4.2.5 Θερμοκρασία πλατφόρμας εκτύπωσης (Heating Bed)

Εξαιτίας του χαμηλού σημείου τήξης του PCL έπρεπε να επιλεγεί προσεκτικά η θερμοκρασία του heating bed. Παρατηρήθηκε ότι σε θερμοκρασία περιβάλλοντος 20°C, για θερμοκρασίες του heating bed άνω τον 45°C οι πρώτες στρώσεις του ικριώματος δεν προλάβαιναν να ψυχθούν σωστά, με αποτέλεσμα το γέμισμα των πόρων με υλικό και την συνένωση των στρώσεων, πράγμα που αποτελεί βασικό ελάττωμα για τις ανάγκες του ικριώματος. Από την άλλη πλευρά, χαμηλότερες θερμοκρασίες των 30°C, καθιστούσαν δύσκολη την σωστή πρόσφυση του τηκόμενου υλικού στην πλατφόρμα εκτύπωσης, με αποτέλεσμα να μην καθίσταται δυνατή η σωστή κατασκευή του ικριώματος κατά τον άξονα z και με συνέπεια την ακύρωση της εκτύπωσης. Ως βέλτιστη θερμοκρασία heating bed για θερμοκρασία περιβάλλοντος 20°C, ορίστηκαν οι 35°C.

Εικόνα Σφάλματος	Θερμοκρασία πλατφόρμας εκτύπωσης	Παρατηρήσεις
	25 °C	Στην συγκεκριμένη θερμοκρασία παρατηρήθηκε αποκόλληση της δεξιάς μεριάς του ικριώματος από το heating bed, με αποτέλεσμα να μην εκτυπωθεί σωστά.
	45 °C	Λόγω υψηλής θερμοκρασίας heating bed, οι πρώτες στρώσεις συνενώνονται μεταξύ τους επειδή δεν προλαβαίνουν να ψυχθούν.

Πίνακας 3.9 Εικόνες δοκιμών εκτύπωσης των ικριωμάτων κατά την διάρκεια των πειραμάτων, για διαφορετική θερμοκρασία πλατφόρμας εκτύπωσης.

#### 3.4.2.6 Ανεμιστήρας ψύξης

Ο εκτυπωτής που χρησιμοποιήθηκε διαθέτει δύο ανεμιστήρες ψύξης, έναν για τα αντικείμενα που εκτυπώνονται και ένα για το hot end. Καθώς το PCL έχει πολύ χαμηλό σημείο τήξης, απαιτείται καλή ψύξη κατά την εκτύπωση, ώστε να αποφευχθεί η συνένωση των εκτυπωμένων στρώσεων. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία [54] και μετά από δοκιμές, ορίστηκε η ταχύτητα του ανεμιστήρα ψύξης στο 100% για την σωστή στερεοποίηση του τηκόμενου νήματος.

#### 3.4.2.7 Ανάσυρση Νήματος (Retraction)

Μια ακόμη σημαντική παράμετρος ώστε να δημιουργηθούν σωστά οι πόροι, αποτελεί και η δυνατότητα ανάσυρσης του τηκόμενου νήματος. Τα λογισμικά slicer έχουν προκαθορισμένες τιμές για τις ελάχιστες αποστάσεις που απαιτείται να γίνει

retraction, ώστε να αποφευχθούν οι πλεονάζουσες εντολές στον εκτυπωτή. Για παράδειγμα, στο λογισμικό Cura που χρησιμοποιήθηκε για την διεκπεραίωση της συγκεκριμένης διπλωματικής, ως προκαθορισμένη τιμή ελάχιστης απόστασης (Retraction Minimum Travel) ήταν 1.5mm με αποτέλεσμα να μην δημιουργούνται σωστά οι πόροι στα τοιχώματα των ικριωμάτων. Έτσι ορίστηκε ως Retraction Minimum Travel ίσο με **0.2mm**, εφόσον οι μικρότεροι πόροι είναι ίσοι με 0.3mm.

Επιπλέον, είναι σημαντικό να οριστεί σωστά και το μήκος ανάσυρσης (Retraction Distance), καθώς μεγαλύτερο μήκος ανάσυρσης προκαλεί απώλεια υλικού από τις άκρες του εκτυπωμένου ικριώματος, ενώ μικρότερο μήκος οδηγεί στην συνένωση των πόρων στα τοιχώματα των ικριωμάτων. Έτσι μετά από δοκιμές ορίστηκε Retraction Distance ίσο με **6mm** και ταχύτητα ανάσυρσης (Retraction Speed) ίση με **100mm/s**.

Σφάλματα	Παρατηρήσεις
	Συνένωση των πόρων στα τοιχώματα του ικριώματος που παρατηρήθηκε λόγω λανθασμένηςτιμής Retraction Minimum Travel και στην περίπτωση λανθασμένηςτιμής Retraction Distance.
	Απώλεια υλικού στις γωνίες του ικριώματος λόγω μεγαλύτερης τιμής Retraction Distance από την ιδανική.

Πίνακας 3.10: Εικόνες δοκιμών εκτύπωσης των ικριωμάτων κατά την διάρκεια των πειραμάτων, για διαφορετικές τιμές που σχετίζονται με την ανάσυρση του νήματος.

#### 3.4.3 Τελικές παράμετροι εκτύπωσης

Παράμετροι Εκτύπωσης	Τιμές
Layer Height	0.2mm
Wall Thickness	0.2mm
Top/Bottom Thickness	0.2mm
Infill Density	20%
Infill Pattern	Lines
Printing Temperature	180 °C
Build Plate Temperature	35 °C
Printing Speed	20 mm/s
Travel Speed	20 mm/s
Fan Speed	100%
Retraction Speed	100 mm/s
Retraction Minimum Travel	0.2mm
Retraction Distance	6mm

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι πιο βασικές παράμετροι εκτύπωσης που ορίστηκαν για την εκτύπωση και των τριών ειδών ικριωμάτων.

Πίνακας 3.11: Τελικές παράμετροι εκτύπωσης των ικριωμάτων.

To infill pattern, δηλαδή το μοτίβο της εσωτερικής δομής του αντικειμένου που εκτυπώνεται, επιλέχθηκε να είναι lines (γραμμές). Δηλαδή κάθε ίνα των ικριωμάτων αποτελείται από ίνες του υλικού σε μορφή γραμμών, οι οποίες έχουν πάχος 0.2mm (wall thickness - top/bottom thickness). Κάθε ίνα συνεπώς του ικριώματος αποτελείται από 3 στρώσεις εκτυπωμένων ινών υλικού, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.15. Το ποσοστό πλήρωσης του υλικού (Infill Density) επιλέχθηκε να είναι ίσο με 20%. Ωστόσο στην πραγματικότητα το ποσοστό αυτό δεν έχει καμία επίδραση στο γέμισμα της δομής, καθώς οι διατομές είναι πολύ μικρές, με αποτέλεσμα την δημιουργία συμπαγών ινών, χωρίς να παρουσιάζουν ανάμεσα τους διάκενα.



Εικόνα 3.15: (α) Εσωτερική δομή των ινών στα ικριώματα κατά την εκτύπωση (Line Infill Pattern) (b) Κάθε ίνα των ικριωμάτων αποτελείται από 3 στρώσεις (layers) υλικού.

#### 3.5 Κατασκευή και Χαρακτηρισμός ικριωμάτων

Αφού σχεδιάστηκαν τα ικριώματα στο SolidWorks, στην συνέχεια μετατράπηκαν σε αρχείο STL και έπειτα μέσα από το πρόγραμμα Ultimaker Cura δόθηκαν οι κατάλληλες παράμετροι εκτύπωσης, όπως αναπτύχθηκαν στην Ενότητα 3.4 και δημιουργήθηκε το αρχείο G-Code για την εκτύπωση τους. Προκείμενου να επιταχυνθεί η διαδικασία εκτύπωσης τα ικριώματα εκτυπώνονται δύο την κάθε φορά. (Βλέπε Εικόνα 3.10)



Εικόνα 3.16: Παράδειγμα πολλαπλών παράλληλων εκτυπώσεων ικριωμάτων. [19]

Προκειμένου να παρατηρηθούν τα ικριώματα στο στερεοσκόπιο και να υπολογιστεί το πραγματικό πορώδες τους, εκτυπώθηκαν 10 ικριώματα από κάθε είδος, από τα οποία ελήφθησαν μετρήσεις. Αρχικά με την χρήση μικρόμετρου, μετρήθηκαν οι εξωτερικές διαστάσεις των ικριωμάτων, οι οποίες παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.13.

Οι αναλυτικές μετρήσεις για καθένα από τα 10 ικριώματα, καθώς και εκείνες που θα περιγράφουν στην συνέχεια βρίσκονται στο Παράρτημα 8.1.



Εικόνα 3.17: Τελικά ικριώματα που εκτυπώθηκαν a) Scaffold 1, b) Scaffold 2, c) Scaffold 3.

#### 3.5.1 Παρατήρηση στο Στερεοσκόπιο

Τα 10 ικριώματα από το κάθε είδος παρατηρήθηκαν στο στερεοσκόπιο, προκειμένου να παρθούν μετρήσεις για τις διαστάσεις FG,RW,ST,LG και FD και να συγκριθούν με τις θεωρητικές. Για να παρθούν οι συγκεκριμένες μετρήσεις, έγινε ανάλυση των εικόνων στο πρόγραμμα ImageJ.



Εικόνα 3.18: Εικόνα από το Στερεοσκόπιο του Scaffold 1 α)πλάγια δεξιά b)Κάτοψη.

# Scaffold 2



Εικόνα 3.19: Εικόνα από το Στερεοσκόπιο του Scaffold 2 α)πλάγια δεξιά b)Κάτοψη.

Scaffold 3



Εικόνα 3.20: Εικόνα από το Στερεοσκόπιο του Scaffold 3 α)πλάγια δεξιά b)Κάτοψη c)Άνοψη.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων των μορφολογικών χαρακτηριστικών των ικριωμάτων με τα απόλυτα σφάλματα τους φαίνονται στον Πίνακα 3.12 και η Διαγραμματική απεικόνιση των μετρήσεων μαζί με τις θεωρητικές τους τιμές στο Διάγραμμα 3.2.

Scaffold	Μέγεθος πόρων (mm)	Road Width RW (mm)	Filament Gap FG/ Μέγεθος Πόρων (mm)	Slice Thickness ST (mm)	Layer Gap LG (mm)	Filament Distance FD (mm)
Scaffold 1	0.3	0.630±0,008	0.321±0.003	0.623±0.008	0.544±0.012	0.954±0.010
Scaffold 2	0.5	0.652±0.010	0.509±0.003	0.615±0.014	0.599±0.012	1.161±0.018
Cooffold 2	0.3	0.590±0.009	0.326±0.009	0.580±0.008	0.568±0.011	0.893±0.011
Scarroid 3	0.5	0.609±0.008	0.503±0.006	0.606±0.006	0.569±0.011	1.091±0.011

Πίνακας 3.12: Μετρήσεις διαστάσεων RW,FG,ST,LG,FG που ελήφθησαν μέσω του προγράμματος ImageJ.



Διάγραμμα 3.2: Διαγραμματική απεικόνιση των μετρήσεων των σχεδιαστικών παραμέτρων FD, FG,LG, RW, ST (a) Scaffold 1, (b) Scaffold 2, (c) Scaffold 3 πόροι 0.3mm, (d) Scaffold 3 πόροι 0.5mm. Οι κουκίδες αναπαριστούν τις δεωρητικές τιμές των παραμέτρων και τα σφάλματα παρουσιάζονται με τις κόκκινες γραμμές.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν δείχνουν μικρές αποκλείσεις σε σχέση με τις θεωρητικές τιμές των σχεδιαστικών παραμέτρων. Το γεγονός αυτό οφείλεται αφενός στην ακρίβεια του εκτυπωτή και αφετέρου στις εγγενής ιδιότητες του υλικού, καθώς όταν ψύχεται αναμένεται η ορισμένη συρρίκνωση του. Μεγαλύτερη απόκλιση σε σχέση με την θεωρητική τιμή εντοπίζεται στην παράμετρο LG, η οποία ορίζεται ως η απόσταση μεταξύ δύο στρώσεων, όπου η πειραματική τιμή εμφανίζεται μικρότερη σε σχέση με την αναμενόμενη θεωρητική. Το γεγονός αυτό μπορεί να ερμηνευτεί λόγω του βάρους που δέχονται οι στρώσεις από τις προηγούμενες, κατά την εκτύπωση τους, με αποτέλεσμα την εμφάνιση μιας ελαφριάς συμπίεσης τους και κατ' επέκταση της μείωσης της τιμής LG. Η επιρροή αυτής της παραμέτρου συνεπάγεται και στην μείωση του πειραματικούς ύψους που προέκυψε και σχέση με το αναμενόμενο θεωρητικό. (Βλέπε Πίνακα 3.13)

#### 3.5.2 Υπολογισμός Πορώδους

Προκειμένου να υπολογιστεί η μάζα των ικριωμάτων χρησιμοποιήθηκε ζυγαριά ακριβείας. Τα δέκα (n=10) δοκίμια που μετρήθηκαν οι εξωτερικές τους διαστάσεις, ζυγίστηκαν για τον υπολογισμό του πραγματικού πορώδους τους.

Scaffold	Μέγεθος πόρων (mm)	Μάζα (gr)	Μήκος (mm)	Πλάτος (mm)	Ύψος (mm)
Scaffold 1	0.3	0.523±0.003	11.29±0.03	11.31±0.02	7.61±0.02
Scaffold 2	0.5	0.459±0.003	11.37±0.01	11.35±0.01	7.75±0.03
Scaffold 3	0.3-0.5	0.502±0.003	11.36±0.01	11.35±0.01	7.69±0.03

Πίνακας 3.13: Μέση τιμή και απόλυτα σφάλματα των μετρήσεων μάζας και εξωτερικών διαστάσεων για κάθε είδος των ικριωμάτων.

#### Πειραματικό Πορώδες

Το πραγματικό πορώδες των ικριωμάτων υπολογίστηκε σύμφωνα με την Σχέση 3.4. Ο όγκος της συμπαγής γεωμετρίας τους **V**<sub>solid</sub> υπολογίστηκε σύμφωνα με την Σχέση 3.6. με βάση τις εξωτερικές διαστάσεις τους, ενώ ο πραγματικός όγκος των ικριωμάτων **V** υπολογίστηκε από την μάζα τους, σύμφωνα με την παρακάτω σχέση:[55]

$$V = \frac{m}{\rho}$$

Σχέση 3.7

Όπου: m: μάζα [gr] ρ:πυκνότητα[ gr/mm³]

Η πυκνότητα θεωρήθηκε προσεγγιστικά ίση με 1.16g/cm<sup>3</sup>, σύμφωνα με τον κατασκευαστή του PCL και θεωρήθηκε ίδια για όλα τα ικριώματα, με γνώμονα την βιβλιογραφία. [49] Τα αποτελέσματα καθώς και η διαγραμματική τους απεικόνιση παρουσιάζονται στην συνέχεια. Όπως παρατηρείται και στον Πίνακα 3.14, μεγαλύτερο πορώδες εμφανίζει το Scaffold 2, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από την βιβλιογραφία, καθώς εμφανίζειτο μεγαλύτερο μέγεθος πόρων.



Διάγραμμα 3.3: Πραγματικό πορώδες των ικριωμάτων που προέκυψε από τα 10 δοκίμια για κάθε είδος.

Ωστόσο, το πραγματικό πορώδες των ικριωμάτων που προέκυψε είναι μεγαλύτερο απ' ότι το αναμενόμενο θεωρητικό. Το Scaffold 3 σε σχέση με τις θεωρητικές τιμές, παρουσιάζει μεγαλύτερο πορώδες από το Scaffold 1 της τάξης περίπου του 3%, πράγμα που σημαίνει ότι με το συνδυασμό των πόρων 0.3-0.5, επιτεύχθηκε η αύξηση του πορώδους, στο ικρίωμα που εμφανίζει το μικρότερο ποσοστό.

Scaffold	Μέγεθος πόρων (mm)	Θεωρητικό Πορώδες (%)	Πραγματικό Πορώδες (%)
Scaffold 1	0.3	46.26	53.61±0.35
Scaffold 2	0.5	55.32	60.43±0.28
Scaffold 3	0.3-0.5	50.94	56.31±0.34

Πίνακας 3.14: Θεωρητικό και Πραγματικό πορώδες των ικριωμάτων.

Η επίδραση του μεγέθους των πόρων είναι φανερή στο ποσοστό πορώδους των ικριωμάτων. Μεγαλύτεροι πόροι σημαίνει μεγαλύτερο πορώδες και οι μικρότεροι πόροι συντελούν στην μείωση του πορώδους. Το Scaffold 3 που αποτελείται από τον συνδυασμό των πόρων από τις δομές των Scaffold 1 και Scaffold 2, παρατηρούμε ότι παρουσιάζει ενδιάμεσο ποσοστό πορώδους.

# 4 Μηχανικές Δοκιμές

Η κύρια πρόκληση στην τρισδιάστατη εκτύπωση ικριωμάτων έγκειται στην ικανότητα σχεδιασμένου του ικριώματος να μιμείται την στοχευμένη δομή που απαιτεί αντικατάσταση ή πρόσθετη στήριξη. Τα κατασκευασμένα ικριώματα πρέπει να τηρούν ορισμένες ιδιότητες, όπως συζητήθηκαν στην Ενότητα 2. Κατά την ανάπτυξη του ιστού, εκτός από το βιολογικό περιβάλλον, σημαντική θέση κατέχει και το μηχανικό περιβάλλον, καθώς ο οστικός ιστός, διαμορφώνεται και επαναπροσαρμόζεται μέσω κατάλληλων μηχανικών φορτίων. [5]

Ως τάση (stress) ορίζεται η δύναμη που ασκείται ανά μονάδα επιφάνειας, ενώ η επιμήκυνση (strain) είναι η μεταβολή του μήκους του εξεταζόμενου υλικού σε σχέση με το αρχικό του μήκος.

Ως εκ τούτου οι πληροφορίες που λαμβάνονται από την καμπύλη τάσηςπαραμόρφωσης, παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για την μηχανική απόδοση του ικριώματος, το οποίο μπορεί να υποβληθεί σε δοκιμή Θλίψης ή Εφελκυσμού και είναι καθοριστικός παράγοντας για την επιβεβαίωση ότι το επιλεγμένο υλικό είναι κατάλληλο. Έτσι κατά την διεκπεραίωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας, τα ικριώματα που σχεδιάστηκαν και εκτυπώθηκαν, υποβλήθηκαν σε δοκιμές Εφελκυσμού και Θλίψης. Σκοπός των παραπάνω δοκιμών αποτελεί αφενός η διερεύνηση της καταλληλόλητας των εκτυπωμένων ικριωμάτων και αφετέρου η σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ των τριών διαφορετικών δομών, ως προς την μηχανική αντοχή των ικριωμάτων.

Στην γραμμική περιοχή η συμπεριφορά του υλικού θεωρείται ότι είναι η ελαστική, πράγμα που σημαίνει ότι εάν σταματήσει η εφαρμογή του φορτίου, το υλικό μπορεί να επανέλθει στην αρχική του κατάσταση. Στην περιοχή αύτη μπορεί να εφαρμοστεί ο νόμος του Hooke. Η κλίση της καμπύλης ονομάζεται ακαμψία (stiffness), η οποία εξαρτάται από το υλικό κι από τις πειραματικές συνθήκες. Στην συνέχεια η γραμμική περιοχή μεταπίπτει σε καμπύλη, οπότε το υλικό εισέρχεται στην πλαστική περιοχή, όπου η παραμόρφωση του υλικού καθίσταται μη αναστρέψιμη. Εάν η φόρτιση συνεχιστεί τότε το υλικό υφίσταται μηχανική αστοχία και θραύση. Το αντίστοιχο φορτίο και η παραμόρφωση αποκαλούνται φορτίο και παραμόρφωση θραύσης.

Προκειμένου να δημιουργηθούν οι καμπύλες παραμόρφωσης-τάσης, πρέπει πρώτα να υπολογιστούν τα συγκεκριμένα μεγέθη. Αφού πραγματοποιηθούν οι μηχανικές δοκιμές, τα δεδομένα του φορτίου και της επιμήκυνσης επεξεργάζονται με την χρήση των παρακάτω σχέσεων, ώστε να υπολογιστούν οι τάσεις και οι παραμορφώσεις.

Για τον υπολογισμό των τάσεων χρησιμοποιείται η σχέση: [56]

$$\sigma = \frac{P}{A}$$

Σχέση 4.1

Όπου:

P: το εφαρμοσμένο φορτίοA: το εμβαδόν της διατομής

Για τον υπολογισμό των παραμορφώσεων χρησιμοποιείται η σχέση [56]:

$$\varepsilon = \frac{\Delta l}{L}$$

Σχέση 4.2

Όπου: ΔΙ: η μεταβολή του μήκους L: το ενεργό μήκος

#### 4.1 Δοκιμή Εφελκυσμού

Η δοκιμή εφελκυσμού πραγματοποιήθηκε με την μηχανή INSTRON 4482 με φορτίο 100 KN και ταχύτητα 5mm/s, σύμφωνα με την βιβλιογραφία [57] [58]. Προκειμένου να παρθούν οι μετρήσεις τοποθετήθηκε στην αρχή των δοκιμών αξονικό επιμηκυνσιόμετρο της εταιρίας Epsilon Technology Corp, μέχρι περίπου 10%. της παραμόρφωσης. Το ενεργό μήκος και για τα τρία είδη δοκιμίων, δηλαδή το μήκος των δοκιμίων ανάμεσα στις αρπάγες, επιλέχθηκε να είναι ίσο με L=50mm.





Εικόνα 4.1:Δοκιμή εφελκυσμού Scaffold 3 (a)Τοποθέτηση του επιμηκυνσιόμετρου μέχρι 10% της παραμόρφωσης b)Δημιουργία των πρώτων ανοιγμάτων στους πόρους c)Εξάπλωση των ανοιγμάτων d) Εδώ είναι εμφανής η μετάδοση των ανοιγμάτων κατά μήκος όλου του δοκιμίου e) Θραύση του δοκιμίου.

#### 4.1.1.1 Σχεδιασμός Ικριωμάτων Δοκιμής Εφελκυσμού

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η δοκιμή εφελκυσμού, τα ικριώματα σχεδιαστήκαν εκ νέου, ώστε να μπορούν τα δοκίμια να τοποθετηθούν στις αρπάγες της μηχανής. [59] Ακολουθήθηκε οι ίδια τεχνική σχεδιασμού όπως την Ενότητα 3.2 και χρησιμοποιήθηκαν οι Σχέσεις 3.1 - 3.3. Οι νέες διαστάσεις παρατίθενται στην συνέχεια.

Scaffold	Μέγεθος πόρων (mm)	Πραγματικό Πορώδες (%)	Μήκος (mm)	Πλάτος (mm)	Ύψος (mm)	Αριθμός ινών κατά την κατεύθυνση Χ (m)	Αριθμός ινών κατά την κατεύθυνση Υ (n)	Αριθμός κάθετων ινών(k)
Scaffold 1	0.3	53.10±1.66	19.50	109.50	2.40	22	122	4
Scaffold 2	0.5	62.02±1.76	19.30	109.50	2.40	18	100	4
Scaffold	0.3		19.50	109.50	1.2	22	122	4
3	0.5	20.32∓1.03	19.30		1.2	18	100	4

Πίνακας 4.1: Σχεδιαστικές πληροφορίες δοκιμίων Εφελκυσμού.

Όπως παρατηρείται το πορώδες των ικριωμάτων που σχεδιάστηκαν για τις δοκιμές εφελκυσμού, είναι πολύ κοντά σε εκείνο των ικριωμάτων. (Βλέπε Πίνακα 3.14) Τα δοκίμια εφελκυσμού λόγω των μεγαλύτερων διαστάσεων που εμφανίζουν, εκτυπώνονταν ένα την κάθε φορά, με τις ίδιες παραμέτρους εκτύπωσης όπως ορίστηκαν στην Ενότητα 3.4. Τα δοκίμια παρατηρήθηκαν σε στερεοσκόπιο για να επιβεβαιωθούν οι διαστάσεις των πόρων.



Εικόνα 4.2: Εκτύπωση δοκιμίων εφελκυσμού.





Εικόνα 4.3: Εικόνα από το Στερεοσκόπιο για το δοκίμιο Εφελκυσμού του Scaffold 1 (a) πλάγια όψη ( b)κάτοψη.

Scaffold 2



Εικόνα 4.4: Εικόνα από το Στερεοσκόπιο για το δοκίμιο Εφελκυσμού του Scaffold 2,α) πλάγια όψη b)κάτοψη.

# a 0.5 mm b

Εικόνα 4.5:Εικόνα από το Στερεοσκόπιο για το δοκίμιο Εφελκυσμού του Scaffold 3,a) πλάγια όψη b)κάτοψη.

Από την παρατήρηση των δοκιμίων εφελκυσμού στο στερεοσκόπιο είναι πιο εύκολο να παρατηρήσουμε την μορφολογία και κατανομή των πόρων, στα Scaffold 1 και 2 είναι εμφανής η μορφολογία των πόρων και συγκρίνοντας τις Εικόνες 4.3-4.4 μεταξύ τους, μπορούν να διακρίνουμε την διαφορά στο μέγεθος των πόρων. Από την Εικόνα 4.5, μας δίνεται η δυνατότητα να παρατηρήσουμε τι πραγματικά συμβαίνει στις στρώσεις εναλλαγής των πόρων, δηλαδή από 0.3mm σε 0.5mm στο Scaffold 3. Αυτό που παρατηρείται είναι ότι προκύπτει μια ενδιαφέρουσα γεωμετρία, η οποία διαφέρει αρκετά σε σχέση με τις άλλες δύο δομές.

#### 4.1.1.2 Αποτελέσματα Δοκιμών Εφελκυσμού

Αφού πραγματοποιήθηκαν οι δοκιμές εφελκυσμού σε τέσσερα δοκίμια από το κάθε είδος ικριωμάτων, τα δεδομένα που προέκυψαν επεξεργάστηκαν σύμφωνα με τις Σχέσεις 4.1 και 4.2 για τον υπολογισμό των τάσεων και παραμορφώσεων. Στην συνέχεια δημιουργήθηκαν οι καμπύλες τάσης-παραμόρφωσης για καθένα από τα ικριώματα, όπως φαίνεται παρακάτω. Η μορφή των καμπύλων που προέκυψαν

# Scaffold 3

συνάδουν με τα αποτελέσματα εφελκυσμών ικριωμάτων, παρόμοιων ερευνών. [60][58]



Scaffold 1

Διάγραμμα 4.1: Καμπύλη τάσης-παραμόρφωσης από την δοκιμή Εφελκυσμού του Scaffold 1.



Εικόνα 4.6: Θραύσμα από την δοκιμή Εφελκυσμού του Scaffold 1 (Στερεοσκόπιο).



Διάγραμμα 4.2: Καμπύλη τάσης-παραμόρφωσης από την δοκιμή Εφελκυσμού του Scaffold 2.



Εικόνα 4.7: Θραύσμα από την δοκιμή Εφελκυσμού του Scaffold 2 (Στερεοσκόπιο).

Όπως μπορεί να παρατηρηθεί και από τις Εικόνες 4.6-4.7, οι πόροι της κάθε δομής έχουν υποστεί επιμήκυνση ίση τιμής αντίστοιχα. Μόλις επήλθε η θραύση μιας ίνας ακολούθησε και η θραύση των υπολοίπων που ανήκουν στην ίδια κατεύθυνση Χ (οι κατευθύνσεις μπορούν να γίνουν κατανοητές από την Εικόνα 4.2 ή Εικόνα 4.9), με αποτέλεσμα την συνολική θραύση του δοκιμίου.



Διάγραμμα 4.3: Καμπύλη τάσης-παραμόρφωσης από την δοκιμή Εφελκυσμού του Scaffold 3.



Εικόνα 4.8: Θραύσμα από την δοκιμή Εφελκυσμού του Scaffold 3 (Στερεοσκόπιο).

Από την Εικόνα 4.8 που αφορά το Scaffold 3, παρατηρείται ότι οι πόροι που είναι ίσοι με 0.5mm έχουν διαφορετική επιμήκυνση σε σχέση με τους πόρους που είναι ίσοι με 0.3mm. Κατά την δοκιμή, παρατηρήθηκε ότι περισσότερο επιμηκύνονταν εκείνοι που είναι ίσοι με 0.5mm. Το γεγονός αυτό μπορεί να γίνει καλύτερα κατανοητό από την Εικόνα 4.9c.



Εικόνα 4.9: Δοκίμια κατά την δοκιμή Εφελκυσμού (a) Scaffold 1 (b) Scaffold 2 (c) Scaffold 3.

Από τις καμπύλες τάσης παραμόρφωσης που προέκυψαν μπορεί να παρατηρηθούν τα εξής στοιχεία:

Οι ταλαντώσεις των τάσεων που εμφανίζονται, οφείλονται στην διάδοση των τάσεων στους διαφορετικούς πόρους, κατά μήκος των δοκιμίων. Πιο συγκεκριμένα αυτό που παρατηρήθηκε είναι ότι οι πόροι των ικριωμάτων επιμηκύνονται, με αποτέλεσμα να την δημιουργία των κενών ανοιγμάτων, όπως φαίνονται και στις Εικόνες 4.6-4.8 από το στερεοσκόπιο και στις Εικόνες 4.9. Κατά την έναρξη της επιμήκυνσης των πόρων απαιτείται μεγαλύτερη ενέργεια και συνεπώς αυξάνονται οι τάσεις. Οι κορυφές των ταλαντώσεων στις καμπύλες τάσης-παραμόρφωσης αντιστοιχούν στην έναρξη της επιμήκυνογία των ανοιγμάτων. Στα Scaffold 1 και Scaffold 2, μόλις ολοκληρώνονταν το άνοιγμα του ενός πόρου ή πλησίαζε στην μέγιστη επιμήκυνση του, ο οποίος εμφάνιζε την χαμηλότερη απαίτηση σε ενέργεια μέχρι μια συγκεκριμένη επιμήκυνση. Χ ή

και Υ. Γι' αυτό δικαιολογείται η ύπαρξη των ταλαντώσεων που αναφέρθηκαν προηγουμένως, καθώς αυξάνονται οι τάσεις κατά το άνοιγμα του πόρου, αλλά στην συνέχεια μειώνονταν καθώς μεγάλωνε το άνοιγμα και η δομή απαιτούσε μικρότερη ενέργεια προκειμένου να επιμηκυνθεί. Μόλις όμως, η απαίτηση σε ενέργεια αυξάνονταν λόγω της μέγιστης επιμήκυνσης ενός πόρου (χωρίς να επέλθει θραύση), τότε η επιμήκυνση μεταφερόταν σε έναν επόμενο πόρο.

- Ως αποτέλεσμα αυτού του μηχανισμού, η διάδοση των ανοιγμάτων στους πόρους κατά την κατεύθυνση Υ, πραγματοποιήθηκε κατά μήκος όλου του δοκιμίου. Από την παρατήρηση στο στερεοσκόπιο, οι όμοιοι πόροι στην κάθε δομή, αντίστοιχα στα δοκίμια Scaffold 1 και Scaffold 2, φαίνεται να υφίστανται την ίδια επιμήκυνση για καθένα από τα δοκίμια, με αποτέλεσμα την δημιουργία σχεδόν ίσων ανοιγμάτων αντίστοιχα στην κάθε δομή.
- Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, το Scaffold 3 εμφανίζει λίγο διαφορετικό μηχανισμό επιμήκυνσης των πόρων σε σχέση με τις άλλες δύο δομές. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι οι πόροι που ήταν ίσοι με ο.5mm σε μια στρώση είχαν την τάση να ανοίγουν, πριν από εκείνους που ήταν ίσοι με 0.3mm. (Βλέπε Εικόνα 4.9c) Αυτό το γεγονός συμβαίνει επειδή οι πόροι 0.5mm έχουν χαμηλότερες απαιτήσεις σε ενέργεια σε σχέση με τους 0.3mm, λόγω των μεγαλύτερων διακένων. Γι' αυτό τον λόγο αν παρατηρήσουμε και στο Διάγραμμα 4.3, οι τάσεις εμφανίζουν μια σχετική σταθερότητα στην τιμή τους και δεν αυξάνονται απότομα. Δηλαδή μόλις αυξάνονται οι τάσεις επειδή οι πόρων 0.3mm, με αποτέλεσμα οι τάσεις να διατηρούνται σχετικά σταθερές. Όπως αναπτύσσεται και στην Ενότητα 4.3, το Scaffold 3 εμφάνισε το μεγαλύτερο μέτρο ελαστικότητας και ενδεχομένως λόγω αυτού του μηχανισμού.
- Η θραύση των δοκιμίου επέρχεται κατά την κατεύθυνση Χ, αφού είχε προηγουμένως πραγματοποιηθεί το άνοιγμα τις πλειονότητας των πόρων κατά την κατεύθυνση Υ, μεταξύτων δύο αρπάγων. (Βλέπε Εικόνα 4.1)

Μέσα από τις καμπύλες τάσης παραμόρφωσης, στην ελαστική περιοχή υπολογίστηκαν το μέτρο ελαστικότητας **Ε**, και το όριο διαρροής **σ**<sub>y</sub> για κάθε δομή των ικριωμάτων. Το μέτρο ελαστικότητας **Ε**ορίζεται ως η κλίση της ευθείας στην ελαστική περιοχή και για το όριο διαρροής **σ**<sub>y</sub>, εφόσον η καμπύλη εμφανίζει μέγιστο, η τάση διαρροής αντιστοιχεί σε αυτό το μέγιστο. [61]

Scaffold	Μέτρο Ελαστικότητας Ε [MPa]	Όριο διαρροής σ <sub>γ</sub> [MPa]
Scaffold 1	167.83±3.77	3.42±0.10
Scaffold 2	157.51±2.69	2.86±0.18
Scaffold 3	175.04±4.63	3.42±0.09

Πίνακας 4.2: Αποτελέσματα Μέτρου Ελαστικότητας και Ορίου Διαρροής των ικριωμάτων από την δοκιμή Εφελκυσμού.

# 4.2 Δοκιμή Θλίψης

Κατά την πραγματοποίηση των πειραμάτων μονοαξονικής Θλίψης τα δοκίμια συμπιέστηκαν στην μονοαξονική μηχανή INSTRON 4482 σε ταχύτητα 1 mm/min, ανάμεσα σε δύο χαλύβδινες πλάκες σύμφωνα με την βιβλιογραφία.[19] [37] Τέσσερα από τα δοκίμια συμπιέστηκαν μέχρι ένα επίπεδο παραμόρφωσης περίπου 45% ενώ ένα δοκίμιο από την κάθε δομή συμπιέστηκε μέχρι τέλους.



Εικόνα 4.10: Πείραμα Δοκιμής Θλίψης Scaffold 3 στην μηχανή INSTRON 4482. (a) παραμόρφωση 0% (b) παραμόρφωση 13% (c) παραμόρφωση 27% (d) παραμόρφωση 45%. Οι πόροι 0.5mm είναι τοποθετημένοι στην πάνω πλευρά τον χαλύβδινων πλακών.

Παρατηρώντας την Εικόνα 4.10 μπορούμε να εντοπίσουμε την διαφορά στην αντοχή που εμφανίζουν οι πόροι 0.3mm και 0.5mm. Κατά την έναρξη της Θλίψης, στις Εικόνες 4.9 (b) και (c) φαίνεται ότι πρώτα συμπιέζονται οι πόροι 0.5mm λόγω της μικρότερης αντοχής που εμφανίζουν. Σε παραμόρφωση 27% βλέπουμε να έχουν συμπιεστεί σχεδόν πλήρως, ενώ οι πόροι 0.3mm έχουν υποστεί μικρή ακόμα συμπίεση. Όπως είναι φυσικό φτάνοντας στο τέλος της δοκιμής (Εικόνα 4.10 (d)) όλοι οι πόροι του ικριώματος έχουν παραμορφωθεί. Εάν συνεχιστεί κι άλλο η δοκιμή τότε η εικόνα που θα προκύψει είναι παρόμοια με της Εικόνας 4.11. Σε πλήρη συμπίεση τα δοκίμια παραμορφώνονται πλήρως, με αποτέλεσμα της δημιουργίας μια άμορφης μάζας από το υλικό. Σε κανένα από τα δοκίμια δεν πραγματοποιήθηκε θραύση. Το γεγονός αυτό οφείλεται στις εγγενείς ιδιότητες του PCL, καθότι ανήκει στην κατηγορία των πολυμερών.



Εικόνα 4.11: Η πλήρης συμπίεση των δοκιμίων.

Στο παρακάτω διάγραμμα απεικονίζεται μια χαρακτηριστική μορφή της καμπύλης τάσης - παραμόρφωσης των ικριωμάτων από PCL. Η καμπύλη αυτή αποτελείται από τρεις διακριτές περιοχές: στην πρώτη διακρίνεται η γραμμική - ελαστική περιοχή που ακολουθείται από ένα πλατό που αυξάνεται συνεχώς η τάση και καταλήγει σε μια απότομη αύξηση της τάσης.



Εικόνα 4.12: Χαρακτηριστική καμπύλης τάσης - παραμόρφωσης ικριωμάτων από PCL.[62]

Αφού πραγματοποιήθηκαν οι δοκιμές Θλίψης, ελήφθησαν τα αποτελέσματα φορτίου και μετατόπισης, τα οποία επεξεργάστηκαν σύμφωνα με τις Σχέσεις 4.1 και 4.2 για τον υπολογισμό των τάσεων και παραμορφώσεων και την δημιουργία των παρακάτω καμπύλων.



Διάγραμμα 4.4: Καμπύλες Τάσης-Παραμόρφωσης των ικριωμάτων από την δοκιμή Θλίψης.

Οι καμπύλες αποτελούνται από τρεις διακριτές περιοχές: στην πρώτη διακρίνεται η γραμμική - ελαστική περιοχή που ακολουθείται από ένα πλατό που αυξάνεται συνεχώς η τάση και καταλήγει σε μια απότομη αύξηση της τάσης. Και τα τρία ικριώματα εμφανίζουν τυπική συμπεριφορά ενός πορώδους ικριώματος PCL που υφίσταται παραμόρφωση, όπως περιγράφεται και στην βιβλιογραφία.[19] [32][62].

Η μορφή της καμπύλης που προέκυψε και για τα τρία ικριώματα είναι παρόμοια, με την διαφορά ότι υπάρχει κάθετη μετατόπιση των καμπυλών, που σχετίζεται με τις τάσεις. Κατά τη μηχανική φόρτιση του υλικού στην ελαστική περιοχή, οι ομοιοπολικοί δεσμοί των αλυσίδων τεντώνονται και παραμορφώνονται, δηλαδή υφίστανται ελαστική επιμήκυνση.[61]

Μετά την απομάκρυνση του φορτίου τα δοκίμια μετρήθηκαν, έτσι ώστε να επιβεβαιωθεί το τελικό τους ύψος. Αυτό που παρατηρήθηκε είναι ότι μετά τις δοκιμές πραγματοποιήθηκε μια επαναφορά του ύψους τους της τάξεως περίπου 28%, καθώς προέκυψε μεγαλύτερο από το αναμενόμενο, πράγμα το οποίο είναι απολύτως φυσικό και οφείλεται στις ιδιότητες των πολυμερών. Τα δοκίμια που συμπιέστηκαν μέχρι τέλους δεν υπέστησαν θραύση, πράγμα που οφείλεται στις εγγενείς ιδιότητες του υλικού και της δομής.

Από τις παραπάνω καμπύλες Θλίψης, ελήφθησαν τα αποτελέσματα των μέτρων ελαστικότητας και των ορίων διαρροής για καθένα από τα ικριώματα τα οποία παρουσιάζονται συγκεντρωμένα στον παρακάτω πίνακα. Το μέτρο ελαστικότητας **E** ορίζεται ως η κλίση της ευθείας στην ελαστική περιοχή και το όριο διαρροής **σ**<sub>γ</sub> από το σημείο τομής της καμπύλη σ-ε με την παράλληλη γραμμή η οποία έχει κλίση ίση με την αρχική της καμπύλης σ-ε, σε παραμόρφωση 2%. [61]

Scaffold	Μέτρο Ελαστικότητας	Όριο διαρροής
Scaffold 1	68.52±3.02	3.24±0.14
Scaffold 2	47.07±1.99	2.33±0.15
Scaffold 3	53.30±2.78	2.77±0.10

Πίνακας 4.3: Αποτελέσματα Μέτρου Ελαστικότητας και Ορίου Διαρροής των ικριωμάτων από την δοκιμή Θλίψης.

#### 4.3 Ανάλυση Αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν συνάδουν με εκείνα παρόμοιων ερευνών που πραγματοποιήθηκαν.[24,28,32,34,38,42]

#### Δοκιμή Εφελκυσμού

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από την δοκιμή εφελκυσμού, μεγαλύτερο μέτρο ελαστικότητας παρουσίασε το **Scaffold 3**, εμφανίζοντας αύξηση περίπου 4.5% από το Scaffold 1 και μικρότερο παρουσίασε το Scaffold 2. Το όριο διαρροής των **Scaffold 1** και **Scaffold 3** προέκυψε ίδιο, το οποίο είναι μεγαλύτερο κατά 16.4% σε σχέση με το Scaffold 2. Το Scaffold 2 εμφάνισε τις μικρότερες τιμές, γεγονός που οφείλεται στο αυξημένο πορώδες που έχει, καθώς όπως έχει αποδειχτεί και από την βιβλιογραφία, το αυξημένο πορώδες μειώνει την αντοχή του υλικού. [63]



Διάγραμμα 4.5: Αποτελέσματα της δοκιμής Εφελκυσμού των ικριωμάτων α)Μέτρο Ελαστικότητας b) Όριο Διαρροής.

Συνεπώς, το Scaffold 3 που παρουσιάζει πόρους ετερογενών μεγεθών, εμφάνισε βελτιωμένες εφελκύστηκες ιδιότητες σε σχέση με τα ικριώματα που έχουν ομοιογενείς πόρους, ενώ παράλληλα εμφάνισε μεγαλύτερο ποσοστό πορώδους σε σχέση με το Scaffold 1, που πλησιάζει την τιμή του μέτρου Ελαστικότητας και έχει το ίδιο όριο διαρροής με εκείνο. Το γεγονός αυτό γίνεται εύκολα αντιληπτό από το Διάγραμμα 4.6, όπου παρατηρείται ότι παρ' όλο που το πορώδες του Scaffold 3 (56.95% - δοκίμιο εφελκυσμού) αυξάνεται σε σχέση με εκείνο του Scaffold 1 (53.10% - δοκίμιο εφελκυσμού), το μέτρο ελαστικότητας αντί να μειώνεται που θα ήταν το αναμενόμενο, αυξάνεται. Οι αυξημένες εφελκύστηκες ιδιότητες του Scaffold 3, συνεπώς οφείλονται στην ύπαρξη διαφορετικού μεγέθους πόρων που συντελεί στην ύπαρξη διαφορετικού μηχανισμού επιμήκυνσης των πόρων, καθώς

πρώτα επιμηκύνονταν πλήρως οι πόροι 0.5mm, λόγω της χαμηλότερης απαίτησης τους σε ενέργεια και μετά επιμηκύνονταν πλήρως οι πόροι 0.3mm. Ο μηχανισμός αυτός συντελεί στην 'καθυστέρηση' της μετάδοσης της επιμήκυνσης από πόρο σε πόρο και συνεπώς και στη θραύση του δοκιμίου, συντελώντας στην αύξηση της συνολικής αντοχής της δομής.



Διάγραμμα 4.6: Συσχέτιση πορώδους με το μέτρο ελαστικότητας που προέκυψαν από την δοκιμή εφελκυσμού.

Οι εφελκύστηκες ιδιότητες (Μέτρο Ελαστικότητας και Όριο Διαρροής) που προέκυψαν και για τα τρία είδη ικριωμάτων, είναι παρόμοιες με τις τιμές που εμφανίζουν τα δοκιδωτά οστά σύμφωνα με την βιβλιογραφία [64] [65], καθιστώντας τα ικριώματα κατάλληλα ως προς τις συγκεκριμένες εφελκύστηκες ιδιότητες, για οστική αναγέννηση.

#### Δοκιμή Θλίψης

Κατά την δοκιμή Θλίψης, μεγαλύτερο μέτρο ελαστικότητας και όριο διαρροής εμφάνισε το **Scaffold 1**, γεγονός που δικαιολογείται και από την βιβλιογραφία, καθώς εμφανίζει και το μικρότερο ποσοστό πορώδους. Επιπλέον, ο μεγαλύτερος αριθμός ινών στο Scaffold 1 συντελούν στην αύξηση της συνολικής αντοχής του. Το **Scaffold 3** το οποίο παρουσιάζει ενδιάμεσο ποσοστό πορώδους, προέκυψε να εμφανίζει ενδιάμεση τιμή μέτρου ελαστικότητας και ορίου διαρροής, γεγονός που επιβεβαιώνει την εξάρτηση του πορώδους με τις μηχανικές ιδιότητες των ικριωμάτων. Παρ' όλα αυτά παρατηρούμε ότι με την κατασκευή του Scaffold 3 επιτεύχθηκε η αύξηση τους πορώδους σε σχέση με το Scaffold 1, αλλά και η αύξηση του μέτρου ελαστικότητας και του ορίου διαρροής, σε σχέση με το Scaffold 2.



Διάγραμμα 4.7: Αποτελέσματα της δοκιμής Θλίψης των ικριωμάτων α)Μέτρο Ελαστικότητας b) Όριο Διαρροής.

Η αρνητική επίδραση του πορώδους και των πόρων με μεγαλύτερο μέγεθος φαίνεται στο Διάγραμμα 4.8. Όπως παρατηρείται το πορώδες αποτελεί επιζήμιο παράμετρο για την αντοχή των ικριωμάτων, καθώς όταν αυξάνεται, συντελεί στην μείωση του μέτρου ελαστικότητας τους. Η ύπαρξη μεγάλου ποσοστού πορώδους είναι επιθυμητή για τα ικριώματα, καθώς σύμφωνα με την βιβλιογραφία ενισχύει την οστεογένεση, την διάχυση των κυττάρων και του θρεπτικού υλικού στο ικρίωμα, αλλά δρα αρνητικά για την αντοχή τους. Για τον λόγο αυτό πρέπει να επιτευχθεί ισορροπία μεταξύ του πορώδους και μηχανικών ιδιοτήτων των ικριωμάτων.



Διάγραμμα 4.8: Συσχέτιση πορώδους με το μέτρο ελαστικότητας από την δοκιμή Θλίψης.

Τα ικριώματα για την αναγέννηση των οστών έχει υποστηριχθεί ότι πρέπει να έχουν ελάχιστη αντοχή σε θλίψη ίση με 2 MPa και ελάχιστο μέτρο ελαστικότητας ίσο με 50 MPa, τα οποία πλησιάζουν τα όρια για ένα ώριμο δοκιδωτό οστό. [37] Τα τρία

είδη ικριωμάτων που κατασκευάστηκαν πληρούν την προϋπόθεση για το ελάχιστο όριο διαρροής. Παράλληλα τα Scaffold 1 ( $E_1$ =68.52 MPa) και Scaffold 3 (E<sub>3</sub>=53.30 MPa), πληρούν την προϋπόθεση του ελάχιστου μέτρου ελαστικότητας σε θλίψη (50 MPa). To Scaffold 2 (E<sub>2</sub>=47.07 MPa) δεν έχει το απαιτούμενο μέτρο ελαστικότητας, αλλά πλησιάζει την τιμή του. Ωστόσο, το γεγονός αυτό σύμφωνα με την βιβλιογραφία δεν είναι ανησυχητικό, καθώς η απαίτηση του ελάχιστου μέτρου ελαστικότητας σε θλίψη (50 MPa) αφορά ώριμα οστά και τα ικριώματα θα υποστηρίζουν πρωτίστως ανώριμα, αναπτυσσόμενα οστά. [37] Επιπλέον υπάρχουν και δοκιδωτά οστά που εμφανίζουν μικρότερες τιμές μέτρου ελαστικότητας από τις προαναφερθέντες απαιτούμενες.[64] Το μέτρο ελαστικότητας και το όριο διαρροής και για τα τρία είδη ικριωμάτων που προέκυψαν λοιπόν, ήταν παρόμοια με εκείνα των δοκιδωτών οστών, καθιστώντας τα κατάλληλα για εφαρμογές ικριωμάτων οστικού ιστού. Ωστόσο, βλέπουμε ότι το Scaffold 2 υστερεί ως προς τις μηχανικές ιδιότητες έναντι των άλλων δύο ικριωμάτων. Συνδυάζοντας τους πόρους του με εκείνους του Scaffold 1, δηλαδή με την κατασκευή του Scaffold 3, πραγματοποιήθηκε η αύξηση του ορίου διαρροής και του μέτρου Ελαστικότητας με αποτέλεσμα να πληρούνται και οι προϋποθέσεις του ελάχιστου μέτρου ελαστικότητας σε θλίψη για ικριώματα οστικής αναγέννησης.

# 5 Κυτταρική Καλλιέργεια

Τα κύτταρα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη ιστού σε ένα ικρίωμα μπορεί να προέρχονται από διάφορες πηγές όπως είναι οι παρακάτω:

- Κύτταρα του ίδιου του οργανισμού (αυτόλογα)
- Κύτταρα άλλου ανθρώπου-δότη (αλλογενή)
- Κύτταρα ζωικής προέλευσης (ξενογενή)
- Μη διαφοροποιημένα κύτταρα που περιέχουν πρόγονα ή βλαστικά κύτταρα.

Ο πιο σύνηθες τρόπος κυτταρικής καλλιέργειας περιλαμβάνει την χρήση τρυβλίων μονής στοιβάδας (δύο διαστάσεις-2D). Ο τρόπος αυτός όμως αντιπροσωπεύει ένα απλοποιημένο και τεχνητό μοντέλο της πραγματικής κατά στασης *in vivo*. Για τον λόγο αυτό, η ανάπτυξη και ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων εντός τρισδιάστατων (3D) δομών γίνεται όλο και περισσότερο διαδεδομένος. Η δημιουργία τρίτης διάστασης γίνεται εφικτή με την ανάπτυξη των κυττάρων σε εναιωρήματα των καλλιεργητικών μέσων, σε τεχνητά υποστρώματα τα οποία αποτελούν τα ικριώματα. Εκτενής συγκριτικές μελέτες μεταξύ καλλιεργειών 3D-2D, έχουν αποδείξει σημαντική βελτίωση σε επίπεδο λειτουργιών και συμπεριφοράς των κυττάρων αλλά και σε επίπεδο αλληλεπίδρασης κυττάρου-κυττάρου, τη μεταγωγή σήματος και την έκφραση των γονιδίων. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην δυνατότητα αναπαραγωγής και διατήρησης ορισμένων ειδικών λειτουργιών των οργάνων και των ιστών, που εξασφαλίζουν τα 3D μοντέλα.

Παρ' όλα αυτά η ύπαρξη της τρίτης διάστασης στα ικριώματα κρύβει μια σειρά από νέες προκλήσεις στην κυτταρική καλλιέργεια. Η ύπαρξη πολλών στρωμάτων κυττάρων εγείρουν ανησυχίες σχετικά με την επαρκή παροχή οξυγόνου και θρεπτικών ουσιών στον πυρήνα των κυτταρικών καλλιεργειών. Επιπλέον ενδέχεται η πιθανότητα συσσώρευσης τοξικών μεταβολιτών , γεγονός που θα μπορούσε να οδηγήσει σε νέκρωση των κυττάρων στο κέντρο της καλλιέργειας.[66]



Εικόνα 5.1:Αναπαράσταση την δομής των μικροϊνών από τις οποίες κατασκευάζονται τα ικριώματα (scaffolds) που χρησιμοποιούνται σε καλλιέργειες τριών διαστάσεων (3D) [56]

# 5.1 Πειραματική Καλλιέργεια Κυττάρων στα Ικριώματα

Προκειμένου να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα εμφύτευσης των κυττάρων (seeding efficiency) μεταξύ των τριών διαφορετικών δομών, πραγματοποιήθηκε κυτταρική καλλιέργεια σ' αυτά. Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν είναι της κυτταρικής σειράς HepG2, δηλαδή αποτελούν κύτταρα από ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Τα κύτταρα αυτά χρησιμοποιήθηκαν ως ένα βασικό βήμα προκειμένου μόνο να αξιολογηθεί το seeding efficiency των ικριωμάτων και δεν σχετίζονται με την φύση του ιστού για τον οποίο έχει πραγματοποιηθεί ο σχεδιασμός των συγκεκριμένων ικριωμάτων.

Για κάθε διαφορετική δομή χρησιμοποιήθηκαν 6 ικριώματα (n=6) και 3 control wells. Προκειμένου να μπορέσουν τα κύτταρα να εγχυθούν στα ικριώματα απαιτείται πρώτα να φτάσουν στον επιθυμητό αριθμό. Για τον λόγο αυτό πρώτα πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια σε φλάσκα.

#### Καλλιέργεια κυττάρων σε φλάσκα

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η απόψυξη των κυττάρων. Τα κύτταρα βρίσκονται παγωμένα σε κρυοφιαλίδια (αμπούλες). Τα κρυοφιαλίδια αφαιρούνται από το υγρό άζωτο και τοποθετούνται σε ένα στατό το οποίο στη συνέχεια τοποθετείται μέσα στο υδατόλουτρο στους 37°C μέχρις ότου οι αμπούλες ξεπαγώσουν. Τα κρυοφιαλίδια λαμβάνονται και αφότου πραγματοποιηθεί η απόψυξη τους, τοποθετείται σε αυτά θρεπτικό υλικό DMEM και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1500rpm για 5'. Το υπερκείμενο απορρίπτονταν και τα κύτταρα επαναδιαλύονταν σε θρεπτικό υλικό ξανά.

Στην συνέχεια τα κύτταρα θα καλλιεργηθούν σε φλάσκα των 75ml προκειμένου να αναπτυχθούν και να πολλαπλασιαστούν, πριν γίνει η καλλιέργεια τους στα

ικριώματα. Σε κάθε φλάσκα προστίθεται θρεπτικό υλικό DMEM, περίπου 15-20ml. Αφού αναδευτεί το περιεχόμενο κάθε αμπούλας με πιπέτα, μεταφέρεται στο εσωτερικό της φλάσκας. Τέλος η φλάσκα μεταφέρεται στον επωαστήρα στους 37°C και σε συνθήκες 5% CO<sub>2</sub>.

#### Αποστείρωση

Προηγουμένως, έχει αφεθεί για περίπου 1 ώρα η λάμπα UV στο θάλαμο νηματικής ροής, ώστε να αποστειρωθεί ο χώρος και να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα κάποιας μόλυνσης.

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η κυτταρική καλλιέργεια απαιτείται προηγουμένως τα ικριώματα να αποστειρωθούν. Κατά την έρευνα που πραγματοποιήσαν οι Lu, Lin Zhang et al [57], αφού τοποθέτησαν τα ικριώματα σε αιθανόλη για χρονικό διάστημα πέντε ημερών, παρατήρησαν ότι η ακεραιότητα των ικριωμάτων δεν επηρεάστηκε από την έκθεση τους σε αιθανόλη. Ωστόσο το μέτρο ελαστικότητας και η αντοχή τους επηρεάζονται σημαντικά. Για τον λόγο αυτό προτείνεται η ελαχιστοποίηση του χρονικού διαστήματος έκθεσης των ικριωμάτων σε αιθανόλη. Η διαδικασία αποστείρωσης που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

- Αρχικά τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες των 50ml σε αιθανόλη 70%
  για μια ώρα. Τα ικριώματα καλύπτονταν πλήρως με αιθανόλη.
- Στην συνέχεια, τα ικριώματα αφαιρέθηκαν από τους δοκιμαστικούς σωλήνες, που βρίσκονταν στο θάλαμο νηματικής ροής και τοποθετήθηκαν σε πιάτα καλλιέργειας. Προκειμένου να αποφευχθεί η ύπαρξη αιθανόλης πάνω στα ικριώματα καθώς είναι τοξική για τα κύτταρα, ξεπλύθηκαν 3 φορές με DPBS.
- Μετά το ξέπλυμα τους τοποθετήθηκαν σε καινούργιο πιάτο καλλιέργειας Costar 3513 με θρεπτικό υλικό DMEM 2ml , και τοποθετήθηκαν στο επωαστήραγια 15' προκειμένου το υλικό να αποκτήσει το ίδιο περιβάλλον με εκείνο των κυττάρων. Αυτή η τεχνική βοηθάει, ώστε να ελαχιστοποιηθεί το σοκ που υφίστανται τα κύτταρα από την αλλαγή περιβάλλοντος.



Εικόνα 5.2: α) Ικριώματα σε αιθανόλη για την αποστείρωση τους. b) Τα ικριώματα μετά την αποστείρωση τους τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό υλικό, ώστε να αποκτήσουν το ίδιο περιβάλλον με εκείνο των κυττάρων.

#### Θρυψινοποίηση κυττάρων

- Με μία πιπέτα Pasteur αναρροφάτε το θρεπτικό υλικό από τη φλάσκα που βρίσκονται τα κύτταρα και γίνεται ξέπλυμα με DPBS.
- Στην συνέχεια γίνεται αναρρόφηση του DPBS. Προστίθενται 2-3ml θρυψίνης και αφού γίνει ανάδευση, η φλάσκα τοποθετείται σε κλίβανο 37°C/5% CO<sub>2</sub> για χρονικό διάστημα 5-10΄, ώστε να δράσει η θρυψίνη. Πραγματοποιείται ελαφρό χτύπημα στα τοιχώματα της φλάσκας ώστε να υποβοηθηθεί η αποκόλληση των κυττάρων.
- Με την παρατήρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο ελέγχεται η ολοκλήρωση της θρυψινοποίησης και προστίθενται ml θρεπτικού υλικού. Το θρεπτικό υλικό έχει ορό FBS ο οποίος περιλαμβάνει αναστολέα της θρυψίνης και εμποδίζει την περαιτέρω δράση της.
- Τα κύτταρα μεταφέρονται σε σωλήνα, συμπληρώνεται θρεπτικό υλικό μέχρι τα 13ml και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση, για 5' στις 1500rpm. Μόλις τελειώσει η φυγοκέντρηση, αναρροφάτε το υπερκείμενο και το ίζημα των κυττάρων αραιώνεται ξανά σε 1ml θρεπτικού υλικού

#### Καλλιέργεια κυττάρων στα ικριώματα

 Το 1ml που πάρθηκε μετράτε σε αιμοκυτταρόμετρο σε θάλαμο Neubauer και επιλέγεται ο επιθυμητός αριθμός κυττάρων, στον επιθυμητό όγκο θρεπτικού. Για τις καλλιέργειες στα ικριώματα επιλέχθηκαν 1.2×10<sup>5</sup> κύτταρα σε 25μL
θρεπτικού DMEM<sup>1</sup>, για κάθε ικρίωμα. Το Scaffold 3 τοποθετήθηκε στο πιάτο καλλιέργειας με τους μικρότερους πόρους (0.3mm) να βρίσκονται στον πάτο του plate, προκειμένου να ενισχυθεί η συγκράτηση των κυττάρων στο ικρίωμα.

- Μετά το πέρας των 15΄, τα ικριώματα που είχαν τοποθετηθεί στο θρεπτικό υλικό αφαιρούνται από εκεί και τοποθετούνται σε νέο plate. Σε κάθε καινούργιο plate τοποθετείται διαφορετική δομή.
- Επιλέγονται 3 control wells και 6 ικριώματα για κάθε διαφορετική δομή, στα οποία πραγματοποιείται έγχυση 1.2×10<sup>5</sup> κύτταρων σε 25μL θρεπτικού. Στην συνέχεια τα plates τοποθετούνται στον επωαστήρα για 15'.
- Τέλος συμπληρώνεται σε κάθε καλλιέργεια 2ml θρεπτικού και τα plates τοποθετούνται στον επωαστήρα.



Εικόνα 5.3: Παρατήρηση των ικριωμάτων (Scaffold 1) στο μικροσκόπιο αμέσως μόλις τοποθετήθηκαν σε αυτά τα κύτταρα. Η μαύρη "σκιά" στην δεξιά πλευρά της εικόνας αποτελεί το ικρίωμα, όπου διακρίνεται και ο πόρος τετραγωνικής διατομής 0.3mm.

#### Αλλαγή θρεπτικού υλικού

Επιλέγεται το πιάτο με τις καλλιέργειες στα οποία θα γίνει αλλαγή θρεπτικού υλικού. Πραγματοποιείται μηχανική αναρρόφηση του θρεπτικού υλικού με μία πιπέτα Pasteur. Προστίθενται 2ml DPBS για το ξέπλυμα των κυττάρων. Τέλος γίνεται αναρρόφηση του DPBS και προστίθεται φρέσκο θρεπτικό υλικό.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Το DMEM εμπεριέχει 10 %FBS, 1% αντιβιοτικά ευρέως φάσματος (Pen-Str, πενικιλλίνηστρεπτομυκίνη) και 1% AmphB



Εικόνα 5.4: Τοποθέτηση των ικριωμάτων μετά την αποστείρωση σε plates ώστε να πραγματοποιηθεί η καλλιέργεια. Η πρώτη γραμμή στα plates περιλαμβάνει τα control wells και οι υπόλοιπες περιέχουν τα ικριώματα.

## 5.2 Πειραματική Ικανότητα Απορρόφησης Θρεπτικού Υγρού

Η ικανότητα απορρόφησης υγρού (*absorption*) δίνεται σύμφωνα με την παρακάτω σχέση: [67]

$$absorption(\%) = \frac{W_w - W_d}{W_d}$$

Σχέση 5.1

Όπου:

W<sub>w</sub>=το βάροςτων βρεγμένων ικριωμάτων W<sub>d</sub>= το βάρος των στεγνών ικριωμάτων

Προκειμένου να υπολογιστεί η ικανότητα απορρόφησης των ικριωμάτων, τα ικριώματα αφού πρώτα είχαν αποστειρωθεί με την διαδικασία που αναφέρθηκε παραπάνω, τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό υγρό και στην συνέχεια στον επωαστήρα για 24 ώρες. Μετά το πέρας των 24 ωρών μετρήθηκε το βάρος τους και υπολογίστηκε η ικανότητα απορρόφησης τους σύμφωνα με την παραπάνω σχέση. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν φαίνονται στο παρακάτω διάγραμμα:



Διάγραμμα 5.1: Απορροφητικότητα θρεπτικού υγρού των ικριωμάτων μετά το πέρας των 24 ωρών.

Μεγαλύτερη απορροφητικότητα θρεπτικού υλικού παρουσίασε το Scaffold 2 λόγω του μεγαλύτερου πορώδους που παρουσιάζει. Το θρεπτικό υλικό είναι πιο παχύρευστο απ' ότι το νερό, οπότε οι πόροι του Scaffold 2 μπόρεσαν και συγκράτησαν περισσότερη ποσότητα. Το Scaffold 1 παρουσίασε την μικρότερη απορροφητικότητα, ενώ το Scaffold 3 που παρουσιάζει και τα δύο μεγέθη πόρων παρουσίασε μεγαλύτερη απορροφητικότητα σε σχέση με το 1°, αλλά μικρότερη από το Scaffold 2. Συνεπώς η ύπαρξη διαφορετικών πόρων, έχει επίδραση στην απορροφητικότηταςτους.

### 5.3 Ανάλυση Κυτταρικής Καλλιέργειας στα Ικριώματα

Και στις 3 διαφορετικές δομές ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία. Προκειμένου να αξιολογηθεί το seeding efficiency των τριών διαφορετικών δομών, τα ικριώματα με τα κύτταρα αφέθηκαν στο επωαστήρα για 12 ώρες και ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία, σύμφωνα με την βιβλιογραφία. [68] Το χρονικό διάστημα κρίνεται ικανό ώστε να προλάβουν τα κύτταρα να κολλήσουν στα ικριώματα, αλλά παράλληλα ο ρυθμός πολλαπλασιασμού τους θεωρείται χαμηλός, ανεξαρτήτως ικριώματος. Έτσι η συμβολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στα wells αγνοήθηκε.

To seeding efficiency των τριών διαφορετικών δομών υπολογίστηκε λαμβάνοντας υπόψιν τον αρχικό αριθμό των κυττάρων που προστέθηκαν στα ικριώματα και τον υπολειπόμενο αριθμό των κυττάρων που προσκόλλησαν στο αντίστοιχο well. Αυτή η τεχνική μπορεί να προσφέρει μια έγκυρη σύγκριση μεταξύ της αποτελεσματικότητας της εμφύτευσης των κυττάρων στα διαφορετικού τύπου ικριώματα, χρησιμοποιώντας της ίδια τεχνική διασποράς των κυττάρων, των ίδιο αριθμό

κυττάρων στην ίδια ποσότητα θρεπτικού υλικού. Έτσι οι διαφορές που θα προκύψουν θα οφείλονται στις διαφορετικές δομές των ικριωμάτων. Το seeding efficiency στα ικριώματα δίνεται από την παρακάτω σχέση: [68]

Seeding efficiency (%) =  $\frac{\text{cells added to scaffold} - \text{cells in wells}}{\text{cells added to scaffold}}$ 

Σχέση 5.2

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν είναι τα εξής:

- Μετά το πέρας των 12 ωρών, τα plates με τα ικριώματα και τα κύτταρα αφαιρέθηκαν από τον επωαστήρα και αναρροφήθηκε το θρεπτικό υλικό σε κάθε μια από τις καλλιέργειες των ικριωμάτων και των control wells.
- Τα ικριώματα τοποθετήθηκαν σε νέο plate και τους προστέθηκε 2 ml θρεπτικό υλικό DMEM. M' αυτόν τον τρόπο, στο παλιό plate έχουμε την καλλιέργεια από τα control wells και από τα κύτταρα που έχουν κολλήσει στον πάτο των wells και δεν κόλλησαν στα ικριώματα.
- Σε καθένα από τα παραπάνω wells προστέθηκαν 500μL DPBS για το ξέπλυμα των κυττάρων.
- Για την θρυψινοποίηση των κυττάρων προστέθηκαν 200μL Θρυψίνης και μετά το πέρας των περίπου 5΄ και αφού επιβεβαιώθηκε μέσω μικροσκοπίου η αποκόλληση τους από τα wells, τοποθετήθηκε σ΄ αυτά 800 μL θρεπτικού.
- Το 1ml πάρθηκε ώστε να πραγματοποιηθεί η μέτρηση των κυττάρων από την κάθε καλλιέργεια, στο αιμοκυτταρόμετρο (Neubauer).



Εικόνα 5.5: a) Παρατήρηση στο μικροσκόπιο του πηγαδιού από τα οποία έχει αφαιρεθεί το Scaffold 1. Στην εικόνα αυτή υπάρχει εμφανής περιοχή όπου δεν υπάρχουν κύτταρα, καθώς εκεί βρισκόταν το ικρίωμα και έχουν προσκολληθεί σε αυτό. b) Εικόνα από το μικροσκόπιο του control well από το Scaffold 1. Εδώ είναι εμφανής

μεγαλύτερη ποσότητα κυττάρων σε σχέση με την αριστερή εικόνα, στην οποία το ικρίωμα έχει συγκρατήσει κύτταρα.



Εικόνα 5.6: a) Παρατήρηση στο μικροσκόπιο του well από τα οποία έχει αφαιρεθεί το Scaffold 2. b) Εικόνα από το μικροσκόπιο του control well από το Scaffold 2. Συγκρίνοντας τις δύο εικόνες και σε αυτή την περίπτωση είναι εμφανής η διαφορά στον πληθυσμό των κυττάρων. Στην αριστερή εικόνα που βρισκόταν το ικρίωμα τα κύτταρα είναι λιγότερα, ενώ υπάρχουν και περιοχές χωρίς κύτταρα. Στην δεξιά τα κύτταρα είναι περισσότερα και συγκεντρωμένα μαζί.



Εικόνα 5.7: Παρατήρηση στο μικροσκόπιο του well από τα οποία έχει αφαιρεθεί το Scaffold 3. b) Εικόνα από το μικροσκόπιο του control well από το Scaffold 3. Παρόμοια εικόνα με τις 5.5-5.6. έχουμε και σε αυτή την περίπτωση. Τα κύτταρα είναι λιγότερα στο well που βρισκόταν το Scaffold 3 (αριστερή) σε σχέση με το control well (δεξιά).

Αφού τα κύτταρα μετρήθηκαν, μέσα από την Σχέση 5.2 θεωρώντας τα κύτταρα που τοποθετήθηκαν στα ικριώματα ίσα με τον αριθμό εκείνων που βρίσκονται στα control wells, ενώ τα κύτταρα που δεν κόλλησαν στα ικριώματα είναι εκείνα που είχαν κολλήσει στα wells από τα οποία αφαιρέθηκαν τα ικριώματα, υπολογίστηκε το seeding efficiency των τριών διαφορετικών δομών, όπως φαίνεται στο Πίνακα 5.1.

Scaffold	Seeding Efficiency
Scaffold 1	35.56±3.93
Scaffold 2	22.87±2.09
Scaffold 3	30.28±0.41

Πίνακας 5.1: Αποτελέσματα του Seeding Efficiency που ελήφθησαν από την καλλιέργεια 1.2×10<sup>5</sup> κυττάρων στις τρείς διαφορετικές δομές ικριωμάτων, χρησιμοποιώντας την ίδια τεχνική.

Στο σημείο αυτό να αναφερθεί ότι το Seeding Efficiency των ικριωμάτων που υπολογίστηκε δεν αντικατοπτρίζει το βέλτιστο ποσοστό τους, καθώς αυτό εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως είναι ο αριθμός των κυττάρων που θα εγχυθούν, η ποσότητα του θρεπτικού που βρίσκονται τα κύτταρα, καθώς και ο τρόπος διασποράς των κυττάρων στα ικριώματα. Επιπλέον ένας ακόμη σημαντικός παράγοντας αποτελεί και η διαβροχή ή μη του ικριώματος πριν την καλλιέργεια αλλά και η χρονική διάρκεια που παραμένουν τα ικριώματα στον επωαστήρα αφού τους εγχυθούν τα κύτταρα ώστε να κολλήσουν σε αυτά, πριν τους προστεθεί επιπλέον θρεπτικό υλικό. Έτσι, προκειμένου να βελτιωθεί το Seeding Efficiency πρέπει να πραγματοποιηθούν πολλές δοκιμές, αλλάζοντας κάθε φορά τους προαναφερθέντες παράγοντες. Ωστόσο σκοπός της συγκεκριμένης έρευνας δεν ήταν να εντοπιστεί η βέλτιστη αποτελεσματικότητα εμφύτευσης κυττάρων των δομών, αλλά να συγκριθούν οι δομές με βάση μια συγκεκριμένη τεχνική καλλιέργειας (ποσότητα κυττάρων/θρεπτικού υλικού, τρόπος διασποράς κ.ο.κ.).



Διάγραμμα 5.2: Αποτελέσματα του Seeding Efficiency για τα τρία είδη των ικριωμάτων, που ελήφθησαν από τις καλλιέργειες.

Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν κατά την συγκεκριμένη μελέτη όπως παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 5.2, υπάρχει φανερή διαφορά μεταξύ των τριών διαφορετικών δομών. Μεγαλύτερο ποσοστό seeding efficiency παρουσιάζει το Scaffold 1, στην συνέχεια ακολουθεί το Scaffold 3 καιτέλος το Scaffold 2. Το γεγονός αυτό ερμηνεύεται λόγω της ύπαρξης μικρότερου ποσοστού πορώδους του Scaffold 1, καθώς φαίνεται να μπορεί να συγκρατεί μεγαλύτερο αριθμό κυττάρων. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν συνάδουν με εκείνα που ελήφθησαν από παρόμοιες έρευνες στην βιβλιογραφία. [68] (Seeding Efficiency 25-35% [69])



Διάγραμμα 5.3: Συσχέτιση Seeding Efficiency - Πορώδους.

Αυτό που παρατηρείται επιπλέον από το Διάγραμμα 5.3 είναι ότι οι πόροι ετερογενών μεγεθών που παρουσιάζει το Scaffold 3, έχουν επιρροή στην αποτελεσματικότητα εμφύτευσης των κυττάρων. Το Scaffold 3 που παρουσιάζει ποσοστό πορώδους 56.31%, πλησιάζει την τιμή του πορώδους του Scaffold 2 καθώς διαφέρουν κατά 4.12%, αλλά παρουσιάζει σημαντική αύξηση του seeding efficiency κατά 7.41% σε σχέση με το Scaffold 2. Έτσι με την δημιουργία ικριωμάτων με πόρους ετερογενών μεγεθών, μπορεί να επιτευχθεί η αύξηση της αποτελεσματικότητας εμφύτευσης των κυττάρων σε ικριώματα που εμφανίζουν μεγάλους πόρους, όπως το Scaffold 2-500μm, με τον κατάλληλο συνδυασμό πόρων.

# 6 Συμπεράσματα

## 6.1 Ευρήματα

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η επιρροή που εμφανίζουν οι πόροι διαφορετικών μεγεθών σε ικριώματα αναγέννησης οστίτη ιστού, στην μηχανική και βιολογική συμπεριφορά τους. Ολοκληρώνοντας την παρούσα εργασία τα συμπεράσματα που προκύπτουν είναι τα εξής:

Αρχικά παρατηρείται ότι η κατασκευή ικριωμάτων με την μέθοδο ταχείας εκτύπωσης FDM, προσφέρει μια πληθώρα δυνατοτήτων στον σχεδιασμό και την κατασκευή τους. Πιο συγκεκριμένα, με την χρήση αυτής της μεθόδου μπορεί να ελεγχθεί σε σημαντικό βαθμό η γεωμετρία και το μέγεθος των πόρων, αλλά και η αρχιτεκτονική δομή και οι διαστάσεις των ικριωμάτων. Αυτό αποτελεί ένα ελπιδοφόρο γεγονός, καθώς δίνεται η δυνατότητα δημιουργίας ικριωμάτων που είναι προσαρμοσμένα για κάθε ασθενή. Ακόμη, με την μέθοδο του FDM επιταχύνεται η παραγωγική διαδικασία κατασκευής ικριωμάτων, καθώς δίνεται η δυνατότητα της παράλληλης εκτύπωσης περισσοτέρων του ενός ικριωμάτων.

Ως προς την διαδικασία εκτύπωσης των ικριωμάτων, παρατηρείται ότι ικριώματα από PCL μπορούν να εκτυπωθούν επιτυχώς από ένα συμβατικό FDM 3D printer, ο οποίος δεν είναι απαραίτητα κατασκευασμένος για την χρήση του συγκεκριμένου υλικού, καθώς αποτελεί ένα υλικό που παρουσιάζει χαμηλό σημείο τήξης (60°C), σε σχέση με τα υλικά που έχει κατασκευαστεί να χρησιμοποιεί ο εκτυπωτής (PLA, ABS, HIPS). Κατ' επέκταση, η κατασκευή ικριωμάτων μπορεί πραγματοποιηθεί από έναν οικονομικό εκτυπωτή, ο οποίος δεν είναι εξειδικευμένος ώστε να εκτυπώνει τέτοιου είδους κατασκευές, όπως είναι ένας bioprinter. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι η εκτύπωση ικριωμάτων που εμφανίζουν αρκετά μικρούς πόρους (300μm), είναι δυνατή με την χρήση κατάλληλου ακροφυσίου και ύστερα από τον προσδιορισμό των κατάλληλων παραμέτρων εκτύπωσης.

Κατά τον χαρακτηρισμό των ικριωμάτων, επιβεβαιώθηκε η εξάρτηση του μεγέθους των πόρων με το ποσοστό πορώδους που εμφανίζουν. Πιο συγκεκριμένα, το ικρίωμα με τους μικρότερους πόρους (Scaffold 1 - 300μm) εμφάνισε το μικρότερο ποσοστό πορώδους, σε αντίθεση με το ικρίωμα με τους μεγαλύτερους πόρους (Scaffold 2 - 500μm), που εμφάνισε το μεγαλύτερο ποσοστό. Το Scaffold 3 που

αποτελείται από τον συνδυασμό των πόρων 300μm - 500μm, εμφάνισε ενδιάμεσο ποσοστό πορώδους μεταξύ των Scaffold 1 και Scaffold 2, επιβεβαιώνοντας την επιρροή που εμφανίζουν οι πόροι ετερογενών μεγεθών, στο πορώδες των ικριωμάτων.

Η δημιουργία ικριωμάτων με πόρους ετερογενών μεγεθών αποδείχθηκε ότι έχει επιρροή στην μηχανική συμπεριφορά τους. Πιο συγκεκριμένα, με την δημιουργία του Scaffold 3 επιτεύχθηκε η αύξηση του μέτρου ελαστικότητας σε εφελκυσμό σε σχέση με τις δομές που είχαν ομοιόμορφη κατανομή μεγέθους πόρων, καθώς παρουσίασε το μεγαλύτερο μέτρο ελαστικότητας. Τα Scaffold 1 και Scaffold 3 παρουσίασαν την ίδια τιμή opίου διαρροής σε εφελκυσμό, η οποία ήταν και η μέγιστη. Ωστόσο παρ' όλο που το Scaffold 3 έχει μεγαλύτερο ποσοστό πορώδους από το Scaffold 1, εμφάνισε μεγαλύτερο μέτρο ελαστικότητας και όριο διαρροής σε εφελκυσμό εμφάνισε το Scaffold 2, επιβεβαιώνοντας την αρνητική επίδραση του πορώδους, στην μηχανική αντοχή των ικριωμάτων. Τέλος, οι τιμές του ορίου διαρροής και του μέτρου ελαστικότητας που προέκυψαν κατά την δοκιμή εφελκυσμού είναι παρόμοιες με εκείνες του δοκιδωτού οστού, καθιστώντας τα ικριώματα κατάλληλα ως προς τις συγκεκριμένες εφελκύστηκες ιδιότητες, για την αναγέννηση οστικού ιστού.

Κατά την δοκιμή Θλίψης, τα αποτελέσματα που ελήφθησαν έδειξαν ότι το ικρίωμα που παρουσίαζε πόρους διαφορετικών μεγεθών (Scaffold 3), εμφάνισε ενδιάμεσες τιμές μέτρου ελαστικότητας και ορίου διαρροής, επιβεβαιώνοντας την επιρροή που εμφανίζουν οι πόροι ετερογενών μεγεθών και το πορώδες, στις μηχανικές ιδιότητες των ικριωμάτων. Μεγαλύτερο μέτρο ελαστικότητας και όριο διαρροής σε θλίψη εμφάνισε το Scaffold 1, λόγω των μικρότερων πόρων, του μεγαλύτερου αριθμού ινών και του μικρότερου ποσοστού πορώδους που έχει. Εν αντιθέσει, το Scaffold 2 που παρουσίασε το μεγαλύτερο πορώδες, εμφάνισε τις μικρότερες αντίστοιχες τιμές. Επιπλέον τα τρία είδη ικριωμάτων πληρούν τις προϋποθέσεις για το ελάχιστο απαιτούμενο όριο διαρροής σε θλίψη (2 MPa), που πρέπει να έχουν τα ικριώματα για την αναγέννηση των οστών, το οποίο είναι παρόμοιο με τις τιμές ελάχιστες τιμές ενός ώριμου δοκιδωτού οστού. Ωστόσο, μόνο τα Scaffold 1 και Scaffold 3 πληρούν τις αντίστοιχες προϋποθέσεις του ελάχιστου μέτρου ελαστικότητας σε θλίψη, ενώ το Scaffold 2 εμφάνισε μικρότερη από την απαιτούμενη τιμή. Εντούτοις, το γεγονός αυτό σύμφωνα με την βιβλιογραφία δεν είναι ιδιαίτερα ανησυχητικό, καθώς η απαίτηση του ελάχιστου μέτρου ελαστικότητας σε θλίψη (50 MPa) αφορά ώριμα

δοκιδωτά οστά και τα ικριώματα θα υποστηρίζουν πρωτίστως ανώριμα, αναπτυσσόμενα οστά.

Παρατηρείται λοιπόν, ότι το Scaffold 2 υστερεί ως προς τις μηχανικές ιδιότητες (Μέτρο Ελαστικότητας - Όριο Διαρροής) έναντι των άλλων δύο ικριωμάτων. Συνδυάζοντας τους πόρους του με εκείνους του Scaffold 1, δηλαδή με την κατασκευή του Scaffold 3, πραγματοποιήθηκε η αύξηση του ορίου διαρροής και του μέτρου Ελαστικότητας, με αποτέλεσμα να πληρούνται και οι προϋποθέσεις του ελάχιστου μέτρου ελαστικότητας σε θλίψη, για ικριώματα οστικής αναγέννησης σε ώριμα δοκιδωτά οστά. Επομένως μπορεί να επιτευχθεί η αύξηση της αντοχής των ικριωμάτων που εμφανίζουν μεγάλους πόρους, όπως το Scaffold 2 (500μm), με τον κατάλληλο συνδυασμό μικρότερων πόρων. Συνεπώς, η τεχνική δημιουργίας ικριωμάτων με διαφορετικά μεγέθη πόρων μπορεί να χρησιμοποιηθεί, όταν απαιτείται η βελτίωση των συγκεκριμένων μηχανικών ιδιοτήτων, χωρίς να μειώνεται σημαντικά το πορώδες.

Τέλος, ενθαρρυντικά αποτελέσματα προέκυψαν ως προς την δυνατότητα εμφύτευσης κυττάρων (Seeding Efficiency). Πιο συγκεκριμένα, το Scaffold 3 σημείωσε σημαντική αύξηση του Seeding Efficiency κατά 7.41% σε σχέση με το Scaffold 2, παρ' όλο που το ποσοστό πορώδους τους διαφέρει κατά 4.12%. Επομένως μπορεί να επιτευχθεί η αύξηση της αποτελεσματικότητας εμφύτευσης των κυττάρων σε ικριώματα που εμφανίζουν μεγάλους πόρους, όπως το Scaffold 2, με τον κατάλληλο συνδυασμό πόρων. Μεγαλύτερο Seeding Efficiency παρουσίασε το ικρίωμα με τους μικρότερους πόρους (Scaffold 1), πράγμα που σημαίνει ότι οι μικρότεροι πόροι είναι πιο αποτελεσματικοί στην συγκράτηση των κυττάρων. Η επίδραση των πόρων ετερογενών μεγεθών συνεπώς, είναι φανερή και στο seeding efficiency των ικριωμάτων.

### 6.2 Μελλοντικές Επεκτάσεις

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε μια πρώτη μελέτη πάνω στην επιρροή διαφορετικού μεγέθους πόρων σε ικριώματα που στοχεύουν στην δημιουργία οστικού ιστού. Ωστόσο η κατασκευή ικριωμάτων στα πλαίσια της Μηχανικής των Ιστών, αποτελεί ένα συνεχώς αναπτυσσόμενο κομμάτι, με πολλά ερωτήματα προς επίλυση. Για τον λόγο αυτό, στην συνέχεια παρατίθενται ορισμένες προτάσεις προς διερεύνηση.

- Επεξεργασία της επιφάνειας των ικριωμάτων για την ενίσχυση της υδροφιλικότητας και της μεγαλύτερης προσκόλλησης των κυττάρων.
- 2. Επιλογή διαφορετικού υλικού για την δημιουργία των ικριωμάτων ή ακόμη και σύνθετων πολυμερών, ώστε να βελτιωθούν οι μηχανικές ιδιότητες του υλικού. Για παράδειγμα, θα μπορούσε να δοκιμαστεί η δομή του Scaffold 3, κατασκευασμένο από υλικό που έχει προέλθει από την ανάμειξη PCL και υδροξυλαπατίτη (hydroxylapatite HA).
- 3. Δημιουργία ικριωμάτων τα οποία θα εμφανίζουν πόρους ετερογενών μεγεθών, αλλά και διαφορετικής μορφής και διερεύνηση της επιρροής τους στην μηχανική και στην βιολογία του ικριώματος.
- 4. Μελέτη της συγκεκριμένης δομής για δημιουργία διαφορετικού τύπου ιστού.
- Ολική δημιουργία οστού ή χόνδρου με την συγκεκριμένη δομή των ικριωμάτων (Scaffold 3).
- Κατασκευή ικριωμάτων με πόρους διαφορετικού μεγέθους από 0.3-05mm και μελέτη ως προς τις μηχανικές τους ιδιότητες.
- 7. Μελέτη της επιρροής της δομής σε σχέση με την κυτταρική διαφοροποίηση, μετανάστευση ή πολλαπλασιασμό στο Scaffold 3 που παρουσιάζει συνδυασμό πόρων διαφορετικών μεγεθών και ειδικά στην επιφάνεια εναλλαγής των δύο πόρων.
- Διερεύνηση της βέλτιστης ποσότητας κυττάρων και θρεπτικού υλικού, προκειμένου να αυξηθεί το seeding efficiency των ικριωμάτων.
- 9. Διερεύνηση της αποτελεσματικότητας διαβροχής των ικριωμάτων, πριν πραγματοποιηθεί η έγχυση των κυττάρων, σχετικά με την προσκόλληση των κυττάρων. Για παράδειγμα θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί έγχυση των κυττάρων και σε στεγνά ικριώματα.
- Πραγματοποίηση καλλιέργειας με μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα,
   οστεροκύτταρα ή χονδροκύτταρα, προκειμένου να παρθούν αποτελέσματα

που αφορούν την δημιουργία οστίτη ιστού, όπως μέτρηση πρωτεϊνών και δεικτών οστικής παραγωγής όπως είναι:

- Οστική αλκαλική φωσφατάση (bone specific alkaline phosphatase-BAP).
- Οστεοκαλσίνη (osteocalcin -OCT).
- Συγκέντρωση του αμινοτελικού (tP1NP) και καρβοξυτελικού (P1CP) προπεπτιδίου του προκολλαγόνου τύπου 1.

- [1] Abdallah S.Daar and HeatherL.Greenwood 2007 A proposed definition of regenerative medicine. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **1** 179–84
- [2] Eisenbarth E 2007 Biomaterials for tissue engineering *Adv. Eng. Mater.* **9** 1051–60
- [3] Haseltine W A 2004 The Emergence of Regenerative Medicine: A New Field and a New Society *J. Regen. Med.* **2–2001**
- [4] Papaefthymiou M A, Bakoula C, Sarra A, Papassotiriou I, Chrousos G P and Bacopoulou F 2014 Μέτρηση οστικής πυκνότητας και δεικτών οστικού μεταβολισμού σε αρρένεσ εφήβους. 27 1–177
- [5] Ε. ΣΤΥΛΙΑΝΕΣΗ, Γ.ΣΑΠΚΑΣ Σ Π Μεταμόσχευση ιστών του Μυοσκελετικού συστήματος Εμβιομηχανική των Εμφυτευμάτων της Σπονδυλικής Στήλης pp 91–104
- [6] Γιαννοπούλου Αγγελική, Κορρές Νεκτάριος Ζ-ΒΦ2019 Βιολογικές Διαδικασίες
   Πώρωσης Κατάγματος Ελληιική Νοσοκομειακή Οδοντιατρική 12 17–26
- [7] Franceschi R T 2005 CRITICAL REVIEWS IN ORAL BIOLOGY & MEDICINE Biological Approaches to Bone Regeneration by Gene Therapy DEVELOPMENT AND FRACTURE REPAIR ARE OF MULTIPLE SOLUBLE AND Crit. Rev. Oral Biol. Med. 1093–103
- [8] Βαλάκος, Ευστράτιος. Νικήτα, Ευθυμία Παπαβασιλείου Σ 2015 ΓΕΝΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥΣΚΕΛΕΤΟΥ Κεφάλαιο 1
- [9] Anon Human Anatomy Atlas 2022
- [10] Anon Αποθετήριο Κάλλιπος
- [11] Ortega E S, Sanz-Garcia A, Pernia-Espinoza A and Escobedo-Lucea C 2019 Efficient fabrication of polycaprolactone scaffolds for printing hybrid tissueengineered constructs *Materials (Basel)*. **12** 1–18
- [12] O'Brien F J 2011 Biomaterials & scaffolds for tissue engineering Mater. Today 14 88–95
- [13] Cubo-mateo N 2020 Design of Thermoplastic 3D-Printed Sca ff olds for Bone Tissue Engineering : Influence of Parameters of "Hidden " Importance in the Physical Properties of Sca ff olds
- [14] Σφακιανού Π 2014 Νανοϊνώδη Ικριώματα Πολυκαπρολακτόνης

ενσωματωμένα με Νανοσωματίδια Αργύρου με την Electrospray Deposition ( ESD ) τεχνική

- [15] Domingos M, Intranuovo F, Russo T, Santis R De, Gloria A, Ambrosio L, Ciurana J and Bartolo P 2013 The first systematic analysis of 3D rapid prototyped poly(εcaprolactone) scaffolds manufactured through BioCell printing: The effect of pore size and geometry on compressive mechanical behaviour and in vitro hMSC viability *Biofabrication* 5
- [16] Williams D F 2008 On the mechanisms of biocompatibility *Biomaterials* 29 2941–53
- [17] DF W 1987 Definitions in biomaterials *Elsevier*
- [18] Lee J, Lee H, Cheon K H, Park C, Jang T S, Kim H E and Jung H Do 2019 Fabrication of poly(lactic acid)/Ti composite scaffolds with enhanced mechanical properties and biocompatibility via fused filament fabrication (FFF)-based 3D printing *Addit. Manuf.* **30** 100883
- [19] Zein I, Hutmacher D W, Tan K C and Teoh S H 2002 Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications *Biomaterials* 23 1169–85
- [20] Papazetis G 2020 NATIONAL TECHNICAL UNIVERSITY OF ATHENS Extrusionbased additive manufacturing: trajectory design and material deposition optimisation trajectory design and material deposition optimisation
- [21] Abdul Haq R H, Faizan Marwah O M, Abdol Rahman M N, Haw H F, Abdullah H and Ahmad S 2019 3D Printer parameters analysis for PCL/PLA filament wire using Design of Experiment (DOE) *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* 607
- [22] Park S, Kim G, Jeon Y C, Koh Y and Kim W 2009 3D polycaprolactone scaffolds with controlled pore structure using a rapid prototyping system J. Mater. Sci. Mater. Med. 20 229–34
- [23] Adachi T, Osako Y, Tanaka M, Hojo M and Hollister S J 2006 Framework for optimal design of porous scaffold microstructure by computational simulation of bone regeneration *Biomaterials* 27 3964–72
- [24] Rezwan K, Chen Q Z, Blaker J J and Boccaccini A R 2006 Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering *Biomaterials* 27 3413–31
- [25] Hoque M E, Hutmacher D W, Feng W, Li S, Huang M H, Vert M and Wong Y S 2005 Fabrication using a rapid prototyping system and in vitro characterization of PEG-PCL-PLA scaffolds for tissue engineering J. Biomater. Sci. Polym. Ed. 16 1595–610

- [26] Guvendiren M, Molde J, Soares R M D and Kohn J 2016 Designing Biomaterials for 3D Printing ACS Biomater. Sci. Eng. **2** 1679–93
- [27] Varntanian S 2017 Bioengineering Individual Investigative Project 3D Printing of Polycaprolactone Scaffolds Stefanos Varntanian *Doi.Org*
- [28] Wu S, Liu X, Yeung K W K, Liu C and Yang X 2014 Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering *Mater. Sci. Eng. R Reports* **80** 1–36
- [29] Orthoworld 2021 THE ORTHOPAEDIC INDUSTRY ANNUAL REPORT
- [30] Michael J. Lysaght, Ana Jaklenec and E D 2008 Great Expectations: Private Sector Activity in Tissue Engineering, Regenerative Medicine, and Stem Cell Therapeutics *Tissue Engineering Part A*. vol 14 pp 305–15
- [31] Perez R A and Mestres G 2016 Role of pore size and morphology in musculoskeletal tissue regeneration *Mater. Sci. Eng. C* 61 922–39
- [32] Mantila Roosa S M, Kemppainen J M, Moffitt E N, Krebsbach P H and Hollister S J 2010 The pore size of polycaprolactone scaffolds has limited influence on bone regeneration in an in vivo model J. Biomed. Mater. Res. - Part A 92 359– 68
- [33] Hollister SJ, Lin CY, Saito E, Lin CY, Schek RD, Taboas JM, Williams JM, Partee B, Flanagan CL, Diggs A, Wilke E N, Van Lenthe GH, Müller R, Wirtz T, Das S, Feinberg S E and Krebsbach P H 2005 Engineering craniofacial scaffolds Orthod. Craniofacial Res. 8 162–73
- [34] Bružauskaitė I, Bironaitė D, Bagdonas E and Bernotienė E 2016 Scaffolds and cells for tissue regeneration: different scaffold pore sizes — different cell effects Cytotechnology 68 355–69
- [35] Im G I, Ko J Y and Lee J H 2012 Chondrogenesis of adipose stem cells in a porous polymer scaffold: Influence of the pore size *Cell Transplant*. **21** 2397–405
- [36] Oh S H, Park I K, Kim J M and Lee J H 2007 In vitro and in vivo characteristics of PCL scaffolds with pore size gradient fabricated by a centrifugation method *Biomaterials* 28 1664–71
- [37] Mitsak A G, Kemppainen J M, Harris M T and Hollister S J 2011 Effect of polycaprolactone scaffold permeability on bone regeneration in vivo *Tissue Eng. Part A* **17** 1831–9
- [38] Karageorgiou V and Kaplan D 2005 Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis *Biomaterials* **26** 5474–91
- [39] Aldemir Dikici B and Claeyssens F 2020 Basic Principles of Emulsion Templating and Its Use as an Emerging Manufacturing Method of Tissue Engineering

Scaffolds Front. Bioeng. Biotechnol. 8

- [40] Izquierdo R, Garcia-Giralt N, Rodriguez M T, Cáceres E, García S J, Gómez Ribelles J L, Monleón M, Monllau J C and Suay J 2008 Biodegradable PCL scaffolds with an interconnected spherical pore network for tissue engineering J. Biomed. Mater. Res. - Part A 85 25–35
- [41] Clemens A. Van Blitterswijk J D B 2014 Scaffold Design and Fabrication *Tissue* Engineering (Second Edition), pp 311–46
- [42] Jones A C, Arns C H, Hutmacher D W, Milthorpe B K, Sheppard A P and Knackstedt M A 2009 Biomaterials The correlation of pore morphology, interconnectivity and physical properties of 3D ceramic scaffolds with bone ingrowth *Biomaterials* **30** 1440–51
- [43] Kemppainen J M and Hollister S J 2010 Differential effects of designed scaffold permeability on chondrogenesis by chondrocytes and bone marrow stromal cells *Biomaterials* **31** 279–87
- [44] Lee J S, Cha H Do, Shim J H, Jung J W, Kim J Y and Cho D W 2012 Effect of pore architecture and stacking direction on mechanical properties of solid freeform fabrication-based scaffold for bone tissue engineering J. Biomed. Mater. Res. -Part A 100 A 1846–53
- [45] Yilgor P, Sousa R A, Reis R L, Hasirci N and Hasirci V 2008 3D plotted PCL scaffolds for stem cell based bone tissue engineering *Macromol. Symp.* 269 92– 9
- [46] Yeo M, Simon C G and Kim G 2012 Effects of offset values of solid freeform fabricated PCL-β-TCP scaffolds on mechanical properties and cellular activities in bone tissue regeneration J. Mater. Chem. 22 21636–46
- [47] Dias M R, Fernandes P R, Guedes J M and Hollister S J 2012 Permeability analysis of scaffolds for bone tissue engineering *J. Biomech.* **45** 938–44
- [48] Kelly C N, Miller A T, Hollister S J, Guldberg R E and Gall K 2018 Design and Structure–Function Characterization of 3D Printed Synthetic Porous Biomaterials for Tissue Engineering Adv. Healthc. Mater. 7 1–16
- [49] Moroni L, De Wijn J R and Van Blitterswijk C A 2006 3D fiber-deposited scaffolds for tissue engineering: Influence of pores geometry and architecture on dynamic mechanical properties *Biomaterials* 27 974–85
- [50] Jiao Z, Luo B, Xiang S, Ma H, Yu Y and Yang W 2019 3D printing of HA / PCL composite tissue engineering scaffolds *Adv. Ind. Eng. Polym. Res.* **2** 196–202
- [51] Szilvási-Nagy M and Mátyási G 2003 Analysis of STL Files Math. Comput. Model.38 945–60

- [52] Ravi P 2020 Understanding the relationship between slicing and measured fill density in material extrusion 3D printing towards precision porosity constructs for biomedical and pharmaceutical applications *3D Print. Med.* **6** 1–10
- [53] Park S A, Lee S H and Kim W D 2011 Fabrication of porous polycaprolactone/hydroxyapatite (PCL/HA) blend scaffolds using a 3D plotting system for bone tissue engineering *Bioprocess Biosyst. Eng.* 34 505–13
- [54] Wang F, Tankus E B, Santarella F, Rohr N, Sharma N, Märtin S, Michalscheck M, Maintz M, Cao S and Thieringer F M 2022 Fabrication and Characterization of PCL/HA Filament as a 3D Printing Material Using Thermal Extrusion Technology for Bone Tissue Engineering *Polymers (Basel)*. 14
- [55] El-Ayoubi R, Eliopoulos N, Diraddo R, Galipeau J and Yousefi A-M 2008 Design and Fabrication of 3D Porous Scaffolds to Facilitate Cell-Based Gene Therapy *Tissue Eng. Part A* **0** 080422095744451
- [56] Applications W H 2017 Electrospun Polycaprolactone / Aloe Vera \_ Chitosan
- [57] Lu L, Zhang Q, Wootton D M, Chiou R, Li D, Lu B, Lelkes P I and Zhou J 2014 Mechanical study of polycaprolactone-hydroxyapatite porous scaffolds created by porogen-based solid freeform fabrication method J. Appl. Biomater. Funct. Mater. 12 145–54
- [58] Eshraghi S and Das S 2010 Mechanical and microstructural properties of polycaprolactone scaffolds with one-dimensional, two-dimensional, and threedimensional orthogonally oriented porous architectures produced by selective laser sintering *Acta Biomater*. **6** 2467–76
- [59] Han Q, Li L, Hillier D J, Lanz T, Cloud M, Walborn N R and Lennon D J 2018 A Review of Mechanical Properties of Scaffold in Tissue Engineering : Aloe Vera Composites A Review of Mechanical Properties of Scaffold in Tissue Engineering : Aloe Vera Composites
- [60] Lokesh Karthik Narayanan R A S Characterization and Finite Element Modeling of the E ff ects of 3D Bioplotting Process Parameters on Structural and Tensile Properties of Polycaprolactone (PCL) Sca ff olds *Appl. Sci.*
- [61] Μανωλάκος ΔΙδιότητες Πολυμερών, Διδακτικές Διαλέξεις "Τεχνικά Υλικά ΙΙ"
- [62] Hoque M E, San W Y, Wei F, Li S, Huang M H, Vert M and Hutmacher D W 2009
   Processing of polycaprolactone and polycaprolactone-based copolymers into 3D scaffolds, and their cellular responses *Tissue Eng. Part A* 15 3013–24
- [63] Shor L, Güçeri S, Wen X, Gandhi M and Sun W 2007 Fabrication of threedimensional polycaprolactone/hydroxyapatite tissue scaffolds and osteoblastscaffold interactions in vitro *Biomaterials* 28 5291–7

- [64] Goldstein S A 1987 The mechanical properties of trabecular bone: Dependence on anatomic location and function *J. Biomech.* **20** 1055–61
- [65] Røhl L, Larsen E, Linde F, Odgaard A and Jørgensen J 1991 Tensile and compressive properties of cancellous bone *J. Biomech.* **24** 1143–9
- [66] Κρητικός Α 2014 Πανεπιστήμιο Πατρών Τμήμα Φαρμακευτικής Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης
- [67] Seyedsalehi A, Daneshmandi L, Barajaa M, Riordan J and Laurencin C T 2020 Fabrication and characterization of mechanically competent 3D printed polycaprolactone - reduced graphene oxide scaffolds Sci. Rep. 1–14
- [68] Sobral J M, Caridade S G, Sousa R A, Mano J F and Reis R L 2011 Threedimensional plotted scaffolds with controlled pore size gradients: Effect of scaffold geometry on mechanical performance and cell seeding efficiency Acta Biomater. 7 1009–18
- [69] ANDREAS PFISTER, RU'DIGER LANDERS, 1ANDRES LAIB, UTE HU'BNER, RAINER SCHMELZEISEN R M'LHAUPT1 2004 Biofunctional Rapid Prototyping for Tissue-EngineeringApplications: 3D Bioplotting versus 3D Printing J. Polym. Sci. 42 624–638



# 8.1 Πίνακες Μετρήσεων

Scaffold 1	m (gr)	p (gr/mm³)	V (mm³)	Vsolid (mm³)	Vth (mm <sup>3</sup> )	Vth.solid (mm³)	P (%)	Pth (%)	Мήкоς (mm)	Πλάτος (mm)	აიტ <i>\</i>
1	0.518	0.00116	446.552	943.737	502.83	1013.688	52.68	50.40	11.22	11.20	7.51
2	0.538	0.00116	463.793	967.343	502.83	1013.688	52.05	50.40	11.24	11.25	7.65
œ	0.534	0.00116	460.345	999.849	502.83	1013.688	53.96	50.40	11.47	11.38	7.66
4	0.525	0.00116	452.586	970.777	502.83	1013.688	53.38	50.40	11.23	11.30	7.65
ъ	0.503	0.00116	433.621	979.005	502.83	1013.688	55.71	50.40	11.30	11.34	7.64
9	0.510	0.00116	439.655	963.629	502.83	1013.688	54.38	50.40	11.29	11.29	7.56
7	0.530	0.00116	456.897	968.249	502.83	1013.688	52.81	50.40	11.21	11.41	7.57
8	0.524	0.00116	451.724	974.226	502.83	1013.688	53.63	50.40	11.22	11.38	7.63
6	0.515	0.00116	443.966	962.336	502.83	1013.688	53.87	50.40	11.30	11.25	7.57
10	0.528	0.00116	455.172	982.406	502.83	1013.688	53.67	50.40	11.39	11.26	7.66

Πίνακας 8.1: Μετρήσεις μάζας, όγκων, πορώδους και εξωτερικών διαστάσεων για το Scaffol 1.

Scaffold 1	RW (mm)	FG (mm)	ST (mm)	(mm) DI	FD (mm)
1	0.622	0.317	0.622	0.540	0.915
2	0.658	0.306	0.634	0.549	0.988
œ	0.623	0.317	0.622	0.537	0.988
4	0.622	0.329	0.635	0.549	0.963
ъ	0.598	0.317	0.635	0.525	0.939
9	0.659	0.329	0.646	0.500	0.975
7	0.610	0.333	0.622	0.549	0.988
8	0.612	0.317	0.598	0.549	0.902
6	0.622	0.330	0.567	0.507	0.920
10	0.673	0.318	0.646	0.634	0.963

Πίνακας 8.2:Μετρήσεις των σχεδιαστικών παραμέτρων RW, FG,ST,LG,FD όπως υπολογίστηκαν από το πρόγραμμα Imagel ύστερα από παρατήρηση στο στερεοσκόπιο για το Scaffold 1.

Scaffold 2	m (gr)	p (gr/mm³)	V (mm³)	Vsolid	Vth (mm³)	Vth.solid	P (%)	Pth (%)	Мήкоς (mm)	Πλάτος ()	λψος (2010)
				('''''')		(-11111)			(11111)	(11111)	(11111)
H	0.460	0.00116	396.552	987.223	469.01	1049.568	59.83	55.314	11.39	11.33	7.65
7	0.448	0.00116	386.207	983.369	469.01	1049.568	60.73	55.314	11.40	11.38	7.58
ŵ	0.456	0.00116	393.103	1011.422	469.01	1049.568	61.13	55.314	11.41	11.35	7.81
4	0.448	0.00116	386.207	998.912	469.01	1049.568	61.34	55.314	11.34	11.25	7.83
ß	0.474	0.00116	408.621	1011.834	469.01	1049.568	59.62	55.314	11.38	11.37	7.82
9	0.465	0.00116	400.862	1000.876	469.01	1049.568	59.95	55.314	11.34	11.33	7.79
7	0.451	0.00116	388.793	997.138	469.01	1049.568	61.01	55.314	11.38	11.35	7.72
80	0.460	0.00116	396.552	998.511	469.01	1049.568	60.29	55.314	11.37	11.42	7.69
6	0.465	0.00116	400.862	1002.156	469.01	1049.568	60.00	55.314	11.36	11.31	7.80
10	0.465	0.00116	400.862	1012.635	469.01	1049.568	60.41	55.314	11.34	11.39	7.84

Πίνακας 8.3: Μετρήσεις μάζας, όγκων, πορώδους και εξωτερικών διαστάσεων για το Scaffold2.

Scaffold 2	RW (mm)	FG (mm)	ST (mm)	(mm) DI	FD (mm)
1	0.610	0.500	0.623	0.610	1.158
2	0.671	0.501	0.597	0.646	1.207
m	0.634	0.512	0.671	0.625	1.184
4	0.597	0.519	0.683	0.561	1.122
ŋ	0.689	0.500	0.537	0.556	1.164
9	0.674	0.506	0.622	0.580	1.122
7	0.634	0.512	0.585	0.598	1.244
ø	0.658	0.524	0.585	0.610	1.061
6	0.652	0.512	0.640	0.548	1.116
10	0.697	0.508	0.610	0.659	1.231
Πίνακας 8.4	: Μετρήσεις τι	ην σχεδιαστικώ	ν παραμέτρων	, RW,FG,ST,LG,	FD όπως
ηπολογί	στηκαν από το	<i>πρόγραμμα Im</i>	agel ύστερα α	πό παρατήρησ	η στο
	ΟTE	ερεοσκόπιο γιο	to Scaffold 2.		

8. Παράρτημα

Scaffold 3	m (gr)	p (gr/mm3)	V (mm³)	Vsolid (mm³)	Vth (mm³)	Vth.solid (mm³)	P (%)	Pth (%)	Μήκος (mm)	Πλάτος (mm)	(աա) Նօփ,
1	0.511	0.00116	440.517	996.343	514.93	1049.568	55.79	50.94	11.39	11.39	7.68
2	0.510	0.00116	439.655	970.444	514.93	1049.568	54.70	50.94	11.30	11.30	7.60
ŝ	0.513	0.00116	442.241	986.805	514.93	1049.568	55.18	50.94	11.38	11.35	7.64
4	0.501	0.00116	431.897	966.157	514.93	1049.568	55.30	50.94	11.39	11.31	7.50
S	0.492	0.00116	424.138	991.964	514.93	1049.568	57.24	50.94	11.33	11.40	7.68
9	0.509	0.00116	438.793	1005.691	514.93	1049.568	56.37	50.94	11.39	11.32	7.80
7	0.498	0.00116	429.310	999.106	514.93	1049.568	57.03	50.94	11.30	11.35	7.79
8	0.480	0.00116	413.793	1007.605	514.93	1049.568	58.93	50.94	11.39	11.40	7.76
6	0.511	0.00116	440.517	1000.653	514.93	1049.568	55.98	50.94	11.38	11.39	7.72
10	0.498	0.00116	429.310	988.893	514.93	1049.568	56.59	50.94	11.37	11.31	7.69
Scaffold 3 0.3mm	RW (mm)	FG (mm)	ST (mm)	LG (mm)	FD (mm)	Scaffold 3 0.5mm	RW (mm)	FG (mm)	ST (mm)	LG (mm)	FD (mm)
1	0.562	0.301	0.537	0.507	0.864	1	0.605	0.501	0.599	0.525	1.068
2	0.617	0.321	0.568	0.564	0.932	7	0.574	0.494	0.562	0.538	1.086
£	0.544	0.297	0.596	0.580	0.915	ñ	0.617	0.495	0.632	0.581	1.099
4	0.596	0.323	0.593	0.595	0.901	4	0.632	0.519	0.605	0.618	1.149
ы	0.556	0.296	0.617	0.580	0.827	ß	0.63	0.523	0.630	0.543	1.050
9	0.622	0.346	0.556	0.593	0.889	9	0.642	0.494	0.607	0.583	1.099
7	0.618	0.371	0.571	0.544	0.889	7	0.589	0.458	0.606	0.617	1.148
8	0.580	0.370	0.605	0.514	0.852	8	0.617	0.497	0.611	0.574	1.081
6	0.582	0.332	0.556	0.593	0.938	6	0.611	0.519	0.618	0.596	1.062
10	0.625	0.300	0.601	0.613	0.920	10	0.568	0.525	0.593	0.519	1.069

Πίνακας 8.5: Μετρήσεις των σχεδιαστικών παραμέτρων RW,FG,ST,LG,FD όπως υπολογίστηκαν από το πρόγραμμα Imagel ύστερα από παρατήρηση στο στερεοσκόπιο για το Scaffold 3/0.500mm.

Πίνακας 8.6: Μετρήσεις των σχεδιαστικών παραμέτρων RW,FG,ST,LG,FD όπως υπολογίστηκαν από το πρόγραμμα Imagel ύστερα από παρατήρηση στο στερεοσκόπιο για το Scaffold 3/0.300mm.

## 8.2 Κατασκευαστικά Σχέδια



Κατασκευαστικό Σχέδιο 8.1: Culture Plate Costar 3513





F E		00 
E D D D D D D D D D D D D D D D D D D D		$-\frac{\dot{\Theta} \cdot \dot{\Theta} \cdot \dot{\Theta}$
7,80	$\begin{array}{c c c c c c c c c c c c c c c c c c c $	$- \begin{array}{c} & & & & & & & \\ & & & & & & \\ & & & & $
	- <del>\$\dots\$\dot\$\dots\$\dot</del>	
С		
B UNLESS OTHERWISE SPECIFIED: DIMENSIONS ARE IN MILLIMETE SURFACE FINISH: TOLERANCES: I INFAP:	ERS FINISH:	2 AND SHARP DO NOT SCALE DRAWING REVISION
ANGULAR: ANGULAR: DRAWN CHK'D APPV'D MFG Q.A 	SIGNATURE DATE  SIGNATURE DATE	DWG NO. A4