

ΜΕΛΕΤΗ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΤΡΙΔΙΑΣΤΑΤΗΣ ΕΚΤΥΠΩΣΗΣ, ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΚΑΙ ΒΙΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ ΥΒΡΙΔΙΚΩΝ ΥΔΡΟΓΕΛΩΝ ΩΣ ΙΚΡΙΩΜΑΤΑ ΟΣΤΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ

Κ. Ζαφείρης¹, Α. Καρατζά¹, Δ. Μπρασινικά¹, Κ. Κυριακίδου^{1,2}, Η. Κούμουλος¹, Κ. Χαριτίδης^{1,*}

¹Εργαστήριο Προηγμένων και Σύνθετων Υλικών, Νανοϋλικών, Νανοδιεργασιών και Νανοτεχνολογίας, Σχολή Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ, Αθήνα, Ελλάδα

²Σχολή Οδοντιατρικής, ΕΚΠΑ, Αθήνα, Ελλάδα

(*charitidis@chemeng.ntua.gr)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε τριδιάστατη εκτύπωση υβριδικών ικριωμάτων με υψηλής ακρίβειας μικροαρχιτεκτονική, ικανά να προσομοιάζουν επιτυχώς το φυσικό περιβάλλον των κυττάρων και να υποστηρίξουν την ανάπλαση οστικού ιστού. Τα ικριώματα αποτελούνται από νανο-κρυστάλλους υδροξυαπατίτη (HAp) με μορφολογία παρόμοια αυτής του φυσικού οστού, οι οποίοι αναπτύχθηκαν παρουσία χιτοζάνης με τη συνεργιστική δράση του αμινοξέος L-αργινίνη. Για να επιτευχθεί η εκτυπωσιμότητα της υδρογέλης, χρησιμοποιήθηκε επικουρικά διάλυμα ζελατίνης και οξικού οξέος για τη ρύθμιση της ρεολογικής συμπεριφοράς. Εξετάστηκε η επίδραση κατασκευαστικών παραμέτρων, όπως η ταχύτητα εξώθησης και η ταχύτητα εναπόθεσης. Οι γεωμετρικές παράμετροι ορίστηκαν μέσω του λογισμικού του 3D εκτυπωτή, ενώ για την επίτευξη του εσωτερικού μικροπορώδους, τα δείγματα υποβλήθηκαν σε λυοφιλίωση. Τα 3D εκτυπωμένα ικριώματα που προέκυψαν μελετήθηκαν ως προς τις μηχανικές ιδιότητες μέσω της τεχνικής της νανο-διείσδυσης ενώ το εσωτερικό πορώδες δίκτυο αξιολογήθηκε με μικρο-υπολογιστική τομογραφία. Τέλος, η βιοσυμβατότητα των υβριδικών ικριωμάτων εξετάστηκε μέσω ανάπτυξης κυτταρικών καλλιιεργειών.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το φυσικό οστό είναι ένας σύνθετος ιστός αποτελούμενος από ανόργανες και οργανικές φάσεις και ειδικότερα, από κρυστάλλους HAp (πλάτους 2-5 nm και μήκους 70 nm) και ίνες κολλαγόνου τύπου I αντίστοιχα. Τα δύο συστατικά δρουν συνεργιστικά στις μηχανικές ιδιότητες του οστού, καθώς το πρώτο ενισχύει την αντοχή σε θλίψη, ενώ το δεύτερο παρέχει προστασία από εφελκυστικές και καμπτικές τάσεις^[1]. Δεδομένου ότι ο οστικός ιστός αποτελεί ένα πολυσύνθετο υλικό, η πιο αποτελεσματική προσέγγιση της προσομοίωσης του είναι μέσω ενός υβριδικού ικριώματος, ικανό να αποδώσει επαρκώς, τη φυσική δομή του οστού. Μια αρκετά υποσχόμενη κατηγορία υλικών που μπορούν να εξυπηρετήσουν στον σχεδιασμό σύνθετων υλικών είναι οι υδρογέλες, οι οποίες μπορούν να αποτελέσουν το υπόστρωμα όπου θα αναπτυχθεί ο οστικός ιστός^[2]. Ωστόσο, οι μηχανικές ιδιότητες των πολυμερικών αυτών δικτύων δεν συνάδουν με τις απαιτήσεις του εν λόγω ιστού. Λαμβάνοντας υπόψη τη σύσταση του φυσικού οστού, η προσθήκη ενός κεραμικού υλικού όπως ο HAp, μπορεί να ενισχύσει τις μηχανικές ιδιότητες και την κατεργασιμότητα της υδρογέλης^[3]. Για την περαιτέρω ενίσχυση των μηχανικών αντοχών, εφαρμόζονται μέθοδοι χημικής διασύνδεσης (π.χ. με γλουταραλδεΐδη) ή προσθήκης πολυμερικών διαλυμάτων.

Τα τελευταία χρόνια, η τριδιάστατη εκτύπωση ικριωμάτων για την ανάπλαση ιστών, αποκτά αυξανόμενο ενδιαφέρον, καθώς δύναται να κατασκευαστούν αντικείμενα με προκαθορισμένα και πολύπλοκα γεωμετρικά χαρακτηριστικά^[4]. Τα 3D εκτυπωμένα ικριώματα μπορούν να μιμηθούν την περιπλοκότητα του σχήματος και των συστατικών των φυσικών ιστών, καθιστώντας την εν λόγω μέθοδο πολύτιμο εργαλείο σε βιοϊατρικές εφαρμογές με στόχο την ανάπλαση ιστού^[5]. Η δημιουργία νέου ιστού θα αποφέρει καλύτερα αποτελέσματα για τον ασθενή όσον αφορά στην ποιότητα ζωής του και στη λειτουργία του ιστού γύρω από την περιοχή του τραυματισμού. Για τον λόγο αυτό, ο σχεδιασμός και η κατασκευή ικριωμάτων με ιδανική σύσταση, μηχανικές ιδιότητες

και ελεγχόμενη βιοαποικοδόμηση, αποτελεί τη βασική πρόκληση για την επιτυχή εφαρμογή των ικριωμάτων. Η χρήση της 3D εκτύπωσης προσφέρει το πλεονέκτημα παρασκευής εμφυτευμάτων με κατάλληλη πορώδη εσωτερική μικροδομή, ικανή να προάγει την ανάπτυξη αγγειακού δικτύου στο εσωτερικό του ικριώματος το οποίο θα μεταφέρει οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά στον αναγεννώμενο ιστό, προάγοντας τη γρήγορη επούλωση και θεραπεία του ασθενή. Στα συγκεκριμένα ικριώματα καλλιεργούνται *in vitro* κύτταρα από τον ίδιο τον ασθενή, μειώνοντας έτσι τις πιθανές κλινικές επιπλοκές (π.χ. απόρριψη από τον οργανισμό ή εκδήλωση φλεγμονής). Στην περίπτωση μεγάλων οστικών ελλειμάτων, η γρήγορη ενσωμάτωση των συγκεκριμένων ικριωμάτων οδηγεί αντίστοιχα σε γρήγορη επανάκτηση της πλήρους λειτουργίας.

Η παρούσα εργασία αφορά την 3D εκτύπωση υβριδικής υδρογέλης καθορισμένων γεωμετρικών χαρακτηριστικών και μικρο-αρχιτεκτονικής, αποτελούμενης από χημικά σταυροδεμένη χιτοζάνη και HAρ. Οι τριδιάστατα εκτυπωμένες υδρογέλες, υποβάλλονται σε λυοφιλίωση, με στόχο την απομάκρυνση του περιεχόμενου νερού. Τέλος, χαρακτηρίζονται από πλευράς μηχανικών ιδιοτήτων και βιοσυμβατότητας για να εκτιμηθεί η καταλληλότητα τους ως ικριώματα οστικού ιστού.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σύνθεση υβριδικής υδρογέλης και βελτίωση ρεολογικής συμπεριφοράς

Η πρώτη ύλη της 3D εκτύπωσης, αποτελείται από μία υβριδική υδρογέλη HAρ-χιτοζάνης-αργινίνης, η οποία έχει υποστεί χημική διασύνδεση με χρήση γλουταραλδεϋδης. Η διαδικασία σύνθεσης και χημικής διασύνδεσης βασίζεται σε πρότερο εργαστηριακό έργο^[6,7]. Κατόπιν της σύνθεσης, η υδρογέλη φυγοκεντρήθηκε με στόχο την απομάκρυνση της περίσσειας νερού (χρονικό διάστημα 5 min, συχνότητα 5000 rpm). Για τη βελτίωση της ρεολογικής συμπεριφοράς, έγινε ανάμιξη με υδατικό διάλυμα 5% v/v οξικού οξέος και διαφορετικές περιεκτικότητες ζελατίνης. Πραγματοποιήθηκαν δοκιμές με περιεκτικότητες ζελατίνης 4%, 6% και 8% w/v. Επιπλέον, μελετήθηκε η αραίωση της υδρογέλης από το διάλυμα σε ποσοστά 10%, 15% και 20%. Για την πλήρη δράση του διαλύματος ζελατίνης και την ομογενοποίηση του, το προς εκτύπωση υλικό παρέμεινε σε θερμοκρασία 5 °C για διάστημα 72 h.

Τριδιάστατη εκτύπωση υδρογελών

Για την τριδιάστατη εκτύπωση των υδρογελών χρησιμοποιήθηκε ο 3D εκτυπωτής Regemat V1 (Regemat 3D, Spain) με ακρίβεια θέσης 150 μm κατά τους άξονες X-Y και 400 nm κατά τον Z άξονα. Η υβριδική τροποποιημένη υδρογέλη τοποθετήθηκε σε σύριγγες χωρητικότητας 5 ml (διάμετρος ακροφυσίου 0.58 mm) και εξωθήθηκε κατά τους τρεις άξονες X-Y-Z κατασκευάζοντας κυλινδρικά δείγματα ύψους 2 mm και διαμέτρου 15 mm. Οι εκτυπώσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C). Το ύψος στρώσης παρέμεινε σταθερό και ίσο με 0.40 mm, με αποτέλεσμα το τελικό αντικείμενο να αποτελείται από 4 στρώσεις υλικού. Έγινε μελέτη των ταχυτήτων εξώθησης και εναπόθεσης του υλικού (mm/sec) με στόχο τη βελτιστοποίηση των συνθηκών εκτύπωσης. Τα εκτυπωμένα δείγματα ψύχθηκαν σε θερμοκρασία -4 °C και ακολούθως υποβλήθηκαν σε διαδικασία λυοφιλίωσης για την απομάκρυνση του περιεχόμενου νερού.

Μελέτη μηχανικών ιδιοτήτων και πορώδους ικριωμάτων

Η σκληρότητα των εκτυπωμένων ικριωμάτων εξετάστηκε με την τεχνική της νανοδιείσδυσης. Η μέτρηση εκτελείται από διαμάντι προκαθορισμένης γεωμετρίας (ακίδα Berkovich) που ασκεί πίεση στην επιφάνεια του υλικού σε βάθος 500 nm. Για τον έλεγχο των νανομηχανικών ιδιοτήτων των ικριωμάτων χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Hysitron Tribolab (Hysitron, USA) που επιτρέπει χρήση φορτίων 1 – 10000 μN και καταγραφή βάθους διείσδυσης ακίδας διαμαντιού με ανάλυση φορτίου 1 nN.

Το πορώδες των ικριωμάτων υπολογίστηκε με την τεχνική της μικροϋπολογιστικής τομογραφίας (SkyScan 1272, Bruker, USA). Η ανασυγκρότηση/ανακατασκευή των εικόνων της τομογραφίας έγινε μέσω λογισμικού της ίδια εταιρίας (Nrecon) ενώ η μετρήσεις και η ανάλυση του πορώδους πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του λογισμικού CTan. Η ελάχιστη διαστατική διακριτική ικανότητα των μετρήσεων μετά τις παραπάνω επεξεργασίες είναι 6.5 μm (pixel size).

Μελέτες βιοσυμβατότητας ικριωμάτων

Για τη μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος MTT. Σε κάθε τρυβλίο καλλιέργειας προστίθενται 200 μl διαλύματος MTT (με 5 mg/ml DMEM) και 1,8 ml από DMEM. Τα δείγματα αφήνονται για επώαση στους 37 °C και σε παροχή 5% CO₂, για 4 ώρες. Οι κρύσταλλοι φορμαζάνης, που σχηματίστηκαν διαλύονται σε 2 ml διάλυμα ισοπροπανόλης 96% και HCl 1N και στη συνέχεια μέσω ELISA Reader (VersaMax ELISA Microplate Reader, Biocompare, USA) καταγράφεται η απορρόφηση στα 560 nm. Σε κάθε δείγμα καλλιεργήθηκαν 10.000 κύτταρα/cm² για χρονικό διάστημα 1, 2, 3 και 7 ημέρων. Επιπλέον καλλιεργήθηκαν κύτταρα στο πλαστικό των τρυβλίων καλλιέργειας (TPCs), σαν εσωτερικοί μάρτυρες (control).

Η κυτταρική απόπτωση μελετήθηκε μέσω διαδικασίας ταυτόχρονης διπλής χρώσης. Χρησιμοποιήθηκαν οι χρωματομετρικοί δείκτες διοξική φλουορεσκεΐνη (FDA) και προπίδιο του ιωδίου (PI) με αποτέλεσμα τα ζωντανά κύτταρα να φθορίζουν έντονο πράσινο κατόπιν διέγερσης με μπλε φως, ενώ τα νεκρά να φθορίζουν κόκκινο έπειτα από διέγερση με πράσινο φως. Η καταμέτρηση του φθορισμού πραγματοποιήθηκε με μικροσκόπιο Olympus BX51 (Olympus, USA). Οι εικόνες των κυττάρων που λαμβάνονται με αυτό τον τρόπο αναλύονται ώστε να προσδιοριστεί η βιωσιμότητα του εκάστοτε δείγματος. Το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων καθορίζεται με χρωματικό κώδικα του προγράμματος Image J και τα ποσοστά βιωσιμότητας εξάγονται από 5-10 διαφορετικά τυχαία σημεία.

Η αξιολόγηση της συμπεριφοράς των κυττάρων κατά την καλλιέργειά τους στα ικρίωματα, πραγματοποιήθηκε με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM). Πριν την χρήση της, τα κύτταρα υφίστανται μονιμοποίηση ώστε να διατηρηθεί η μορφολογία τους και να καταστεί δυνατή η παρατήρησή τους, με χρήση διαλύματος γλουταραλδεΐδης 2% v/v και ακολούθως με τετροξείδιο του οσμίου σε υδατικό διάλυμα 1%. Πριν την παρατήρηση, τα δείγματα επικαλύφθηκαν με λεπτή στρώση χρυσού ώστε να καταστεί η επιφάνειά τους αγώγιμη.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

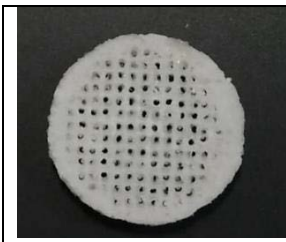
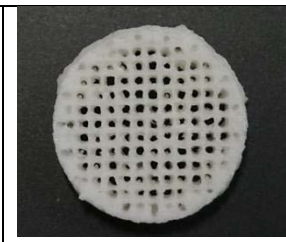
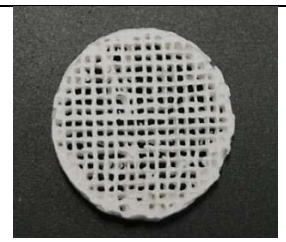
Τριδιάστατη εκτύπωση υδρογελών

Παρατηρήθηκε ότι η αρχική υβριδική υδρογέλη δεν είναι ικανή να αποτελέσει αυτόνομο υλικό εκτύπωσης, καθώς οι διατμητικές τάσεις που ασκούνται από το ακροφύσιο του εκτυπωτή προκαλούν διαχωρισμό φάσης στο υλικό με αποτέλεσμα να προηγείται η ανεπιθύμητη εκβολή νερού, καθιστώντας αδύνατη την ομαλή και ομοιόμορφη εκτύπωση υλικού. Για τη βελτίωση της ρεολογικής συμπεριφοράς της υδρογέλης, χρησιμοποιήθηκε διάλυμα οξικού οξέος/ζελατίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις ζελατίνης και ποσοστά αραιώσεως. Η ζελατίνη χρησιμοποιείται σαν πηκτικός παράγοντας καθώς εμφανίζει ιδιότητες διαλυτότητας και πηκτωματοποίησης. Είναι διαλυτή στο νερό και η προσθήκη της σε οποιοδήποτε διάλυμα προκαλεί μετατροπή της δομής της από υγρή σε πήγμα (γέλη). Συνεπώς, η προσθήκη διαλύματος ζελατίνης, επέφερε αύξηση του ιξώδους του^[8] προσδίδοντας στην μελετώμενη υδρογέλη ομοιογένεια.

Κατόπιν δοκιμών, η υδρογέλη απέκτησε την επιθυμητή ρεολογική συμπεριφορά με αραιώση σε ποσοστό 10% με διάλυμα περιεκτικότητας 6% w/v σε ζελατίνη. Εξετάστηκε η ποιότητα εκτύπωσης για συνδυασμούς ταχυτήτων εξώθησης και εναπόθεσης υδρογέλης 10, 15 και 20 mm/sec. Στη συνέχεια αφαιρέθηκε το νερό στο εσωτερικό των υδρογελών μέσω λυοφυλίωσης και μελετήθηκε η ποιότητα της εκτύπωσης. Οι εκτυπωμένες υδρογέλες με αραιώσεις 15 και 20% δεν διατήρησαν τη γεωμετρία τους, ωστόσο μελετήθηκαν από πλευράς μηχανικών ιδιοτήτων. Στον Πίνακα 1

παρουσιάζονται τα εκτυπωμένα δείγματα που παρουσίασαν τη μεγαλύτερη ακρίβεια δομής και εσωτερικής μικρο-αρχιτεκτονικής (10% αραιώση με διάλυμα 6% w/v σε ζελατίνη).

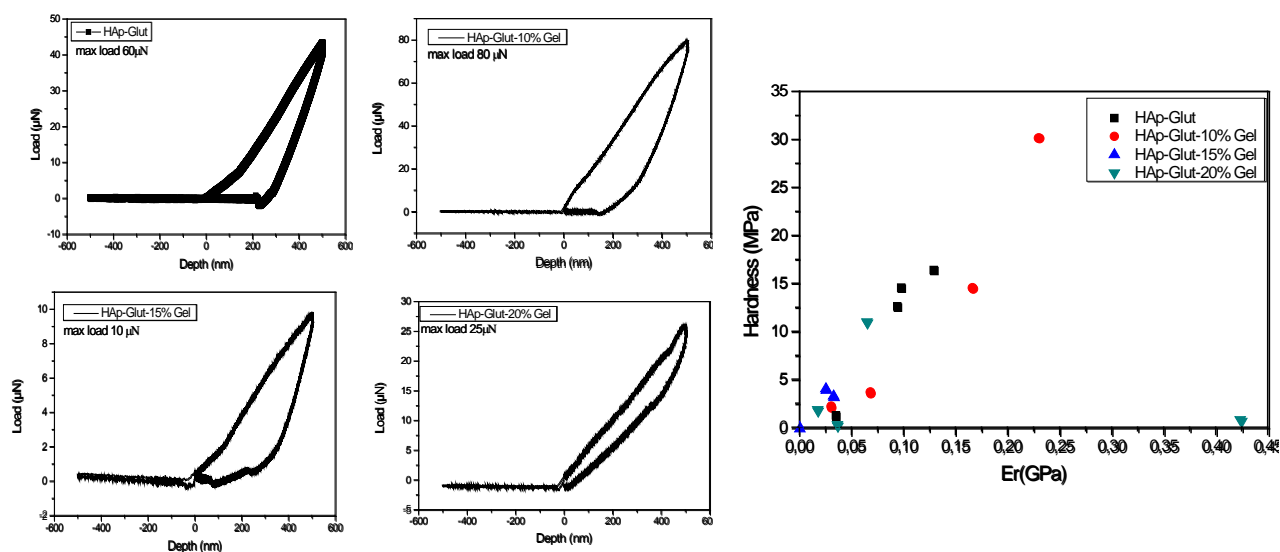
Πίνακας 1. Τριδιάστατα εκτυπωμένα ικρίωματα κατόπιν λυοφιλίωσης για διαφορετικούς συνδυασμούς ταχυτήτων εξώθησης και εναπόθεσης υλικού.

			
Ταχύτητα Εξώθησης (mm/sec)	15	15	20
Ταχύτητα Εναπόθεσης (mm/sec)	10	15	15

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, φαίνεται ότι ένας συνδυασμός υψηλής ταχύτητας εξώθησης και εναπόθεσης είναι ικανός να αποδώσει ικανοποιητικά την προκαθορισμένη γεωμετρία και εσωτερική δομή (πλέγμα) του ικρίωματος. Αιτία είναι το υψηλό ιξώδες που παρουσιάζει το υλικό, μετά και την τροποποίησή του με υδατικό διάλυμα οξικού οξέος/ζελατίνης, απαιτώντας μεγαλύτερη πίεση άρα και ταχύτητα για να εκβάλλει από το ακροφύσιο του εκτυπωτή. Επιπλέον, κατά την εκτύπωση παρατηρήθηκε διόγκωση του εκβαλλόμενου υλικού, γεγονός που οδήγησε στην αύξηση της ταχύτητας εναπόθεσης, ούτως ώστε να μην αλλοιωθεί η προσχεδιασμένη μικρο-αρχιτεκτονική. Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 1, ταχύτητα εξώθησης 20 mm/sec σε συνδυασμό με ταχύτητα εναπόθεσης 15 mm/sec παρήγαγαν ικρίωμα με τη μεγαλύτερη γεωμετρική ακρίβεια. Αντιθέτως, συνδυασμοί μικρότερων ταχυτήτων, αλλοίωσαν την εσωτερική δομή του τελικού αντικειμένου.

Έλεγχος νανομηχανικών ιδιοτήτων - Νανοδιείσδυση

Τα πειράματα νανοδιείσδυσης πραγματοποιήθηκαν σε συγκεκριμένες συνθήκες περιβάλλοντος, στους 37 °C και με σχετική υγρασία 45%. Για στατιστικούς λόγους, πραγματοποιήθηκαν 10 μετρήσεις ανά 50 μm απόσταση μεταξύ τους και χρησιμοποιώντας το μοντέλο Oliver-Pharr, υπολογίστηκαν οι τιμές του μέτρου ελαστικότητας (E) και της σκληρότητας (H) των ικριωμάτων από τις καμπύλες φόρτισης – αποφόρτισης.



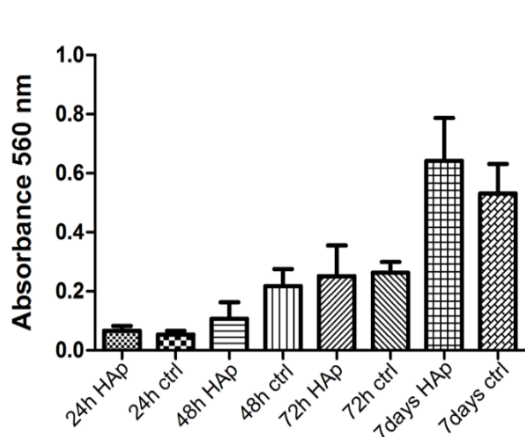
Σχήμα 1. Καμπύλες φόρτισης-αποφόρτισης (αριστερά) για τα ικρίωματα που έχουν διασυνδεθεί με γλουταραλδεΐδη και έχει προστεθεί διάλυμα ζελατίνης με ποσοστό αραιώσης 10%, 15% και 20% αντίστοιχα– Διάγραμμα σκληρότητας -μέτρου ελαστικότητας για τα αντίστοιχα ικρίωματα (δεξιά).

Οι καμπύλες φόρτισης-αποφόρτισης που προέκυψαν, αποδεικνύουν ότι στο σύνολο τους τα ικρίωματα εμφανίζουν ελαστοπλαστική συμπεριφορά. Ωστόσο, τα δείγματα όπου, εκτός από τη χημική διασύνδεση με γλουταραλδεΐδη, έχει προστεθεί και διάλυμα ζελατίνης με ποσοστό αραιώσεως 10%, εμφανίζουν τις μεγαλύτερες τιμές τόσο σκληρότητας όσο και μέτρου ελαστικότητας. Αυξάνοντας το ποσοστό αραιώσεως του διαλύματος της ζελατίνης, οι τιμές αυτές μειώνονται, το οποίο μπορεί να αποδοθεί στην αύξηση του προστιθέμενου νερού (Σχήμα 1).

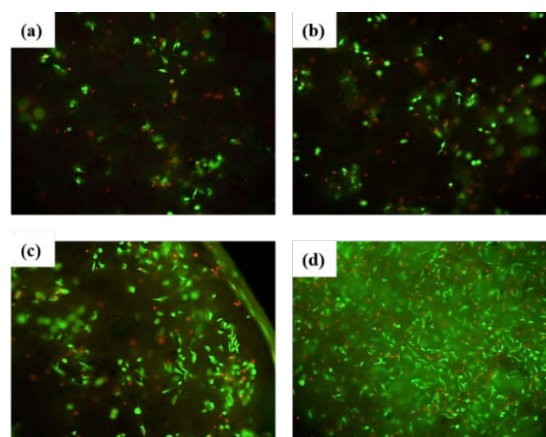
Μέσω μικροϋπολογιστικής τομογραφίας, το ολικό πορώδες των ικριωμάτων υπολογίστηκε 83.2% επί του συνολικού όγκου. Το ανοιχτό πορώδες της δομής αποτελεί το 83.1% με 0.1% κλειστό πορώδες προσδίδοντας την δυνατότητα αποίκησης του ικριώματος από κύτταρα όχι μόνο στην εξωτερική επιφάνεια αλλά και στο εσωτερικό ανοιχτό πορώδες δικτύωμα, το οποίο ενισχύεται και από τις εικόνες SEM (Σχήμα 4).

Μελέτες βιοσυμβατότητας ικριωμάτων

Τα αποτελέσματα της μεθόδου MTT παρουσιάζονται στο Σχήμα 2. Παρατηρείται ξεκάθαρη αύξηση των κυττάρων για πολλαπλασιασμό επάνω στα ικρίωματα. Οι τιμές απορρόφησης των κυττάρων για 24 και 48 ώρες είναι αρκετά χαμηλές, χωρίς ωστόσο να παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές με τις αντίστοιχες αυτών που καλλιεργήθηκαν στις επιφάνειες TCPs στα ίδια χρονικά διαστήματα. Παρατηρείται ότι ύστερα από 72 ώρες καλλιέργειας, ο πληθυσμός των ζωντανών κυττάρων αυξήθηκε σημαντικά σε σχέση με τον αντίστοιχο αριθμό μετά από 24 και 48 ώρες. Εντούτοις, ο μέγιστος αριθμός βιώσιμων κυττάρων σημειώθηκε μετά από καλλιέργεια νεοπλαστικών νεοβλαστών για 7 ημέρες και οι τιμές που καταγράφηκαν ήταν στατιστικά σημαντικές ($p < 0.05$).



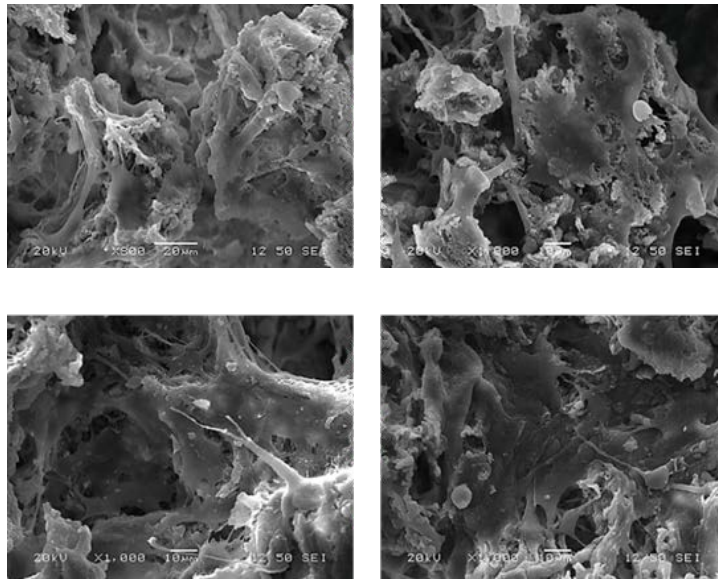
Σχήμα 2. Έλεγχος πολλαπλασιασμού οστεοβλαστών μέσω της χρωματομετρικής μεθόδου MTT.



Σχήμα 3. Εικόνες από μικροσκόπιο φθορισμού των κυτταρικών πληθυσμών στα ικρίωματα, έπειτα από καλλιέργεια (α) 24h, (β) 48h, (γ) 72h και (δ) 7 ημέρες.

Στο Σχήμα 3 παρουσιάζονται εικόνες του μικροσκοπίου φθορισμού, όπου αποδεικνύεται ότι τα ικρίωματα παρέχουν ένα φιλικό ως προς τα κύτταρα περιβάλλον, επιτρέποντάς υψηλά ποσοστά βιωσιμότητας. Ο πληθυσμός των ζωντανών (πράσινα) οστεοβλαστών που καταμετρήθηκε είναι πολύ μεγαλύτερος από τον αντίστοιχο των αποπτωτικών (κόκκινα) κυττάρων σε όλα τα σημεία του ελέγχου (1, 2, 3, και 7 ημέρες καλλιέργειας). Έπειτα από 7 ημέρες καλλιέργειας, το ικρίωμα έχει αποικηθεί πλήρως από ζωντανά κύτταρα και ο πληθυσμός των βιώσιμων οστεοβλαστών είναι ιδιαίτερα αυξημένος. Η βιωσιμότητα των τελευταίων δεν επηρεάζεται παρά τον υπερπληθυσμό, καθώς εντοπίζονται ελάχιστα αποπτωτικά κύτταρα όπως φαίνεται και στην εικόνα d στο Σχήμα 3. Από τις εικόνες SEM (Σχήμα 4) αποδεικνύεται η κυτταροσυμβατότητα των ικριωμάτων και η ενισχυμένη προσκόλληση και πολλαπλασιασμός των κυττάρων. Μετά από 7 ημέρες, η επιφάνεια των ικριωμάτων έχει καλυφθεί στο μεγαλύτερο μέρος της από ζωντανά κύτταρα. Οι οστεοβλάστες έχουν εισχωρήσει και αποικήσει στο εσωτερικό του πορώδους του δικτύου χωρίς απώλεια του ιστοειδικού τους σχήματος. Τα αποτελέσματα βρίσκονται σε πλήρη συμφωνία με τα αντίστοιχα

του ελέγχου της κυτταρικής απόπτωσης. Επιπλέον, τα κύτταρα αναπτύχθηκαν και ανάμεσα στους πόρους, τείνοντας να καλύψουν τα ενδιάμεσα κενά.



Σχήμα 4. Εικόνες SEM από καλλιέργειες κυττάρων για 7 ημέρες στα ικριώματα σε διάφορες μεγεθύνσεις.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία εφαρμόστηκε η μέθοδος της τριδιάστατης εκτύπωσης για την κατασκευή ικριωμάτων οστικού ιστού. Τα τελευταία συνδυάζουν τις ιδιότητες του HAρ και της χιτοζάνης με την κατασκευαστική ακρίβεια που προσφέρει η τριδιάστατη εκτύπωση. Τα ικριώματα χαρακτηρίστηκαν από υψηλή βιοσυμβατότητα και κυτταρική βιωσιμότητα. Μελλοντικές μελέτες είναι απαραίτητες για την περαιτέρω ενίσχυση των μηχανικών τους ιδιοτήτων, καθώς και την ανάπτυξη εσωτερικού πορώδους δικτύου με διπλή κατανομή μεγέθους πόρων, χαρακτηριστικό απαραίτητο για την ανάπτυξη νέου ιστού και την αγγειογένεση.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] R.Y. Basha, T.S.S. Kumar, M.Doble. *Mat. Sci. Eng: C* 57 (2015) 452-463.
- [2] A.R. Short, D. Koralla, A. Deshmukh, B. Wissel, B. Stocker, M. Calhoun, D. Dean, J.O. Winter. *J. Mater. Chem. B Mater. Biol. Med.* 3(40) (2015) 7818-7830.
- [3] N. Kantharia, S. Naik, S. Apte, M. Kheur, S. Kheur, B. Kale. *J. Dent. Res. Sci. Dev.* 1 (2014) 15-19.
- [4] N.A. Sears, D.R. Seshadri, P. Dhavalikar, E.C. Hernandez. *Tissue Eng. Part B Rev.* 22(4) (2016) 298-310.
- [5] J.P. Temple, D. Hutton, B. Hung, P. Huri, C. Cook, R. Kondragunta, X. Jia, W.L. Grayson. *J. Biomed Mater. Res. A* 102(12) (2014) 4317-4325.
- [6] D. Brasinika, O. Tsigkou, A. Tsetsekou, Y. Missirlis. *J. Biom. Mat. Res B Appl. Biom.* 104(3) (2016) 459-469.
- [7] A. Tsetsekou, D. Brasinika, V. Vaou, E. Chatzitheodoridis. *Mat. Sci. Eng: C* 43 (2014) 555-565.
- [8] M.C. Echave, P. Sanchez, J.L. Pedraz, G. Orive. *J. Drug Deliv. Sci. Tech.* 42 (2017) 63-74.