

**UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA**



**DIPARTIMENTO  
DI INGEGNERIA  
DELL'INFORMAZIONE**

**DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE**

**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN BIOINGEGNERIA**

**“ANALISI MECCANICA DI SCAFFOLD BIOCERAMICI PER LA  
RIGENERAZIONE DEL TESSUTO OSSEO: UN CONFRONTO TRA  
MODELLI TPMS E NUOVI DESIGN”**

**Relatore: Prof. Bernardo Enrico**

**Laureando: Rampazzo Alessandro**

**Correlatore: Prof. Elsayed Hamada**

**ANNO ACCADEMICO 2023 – 2024**

**Data di laurea 16/10/2024**



# Indice

## SOMMARIO

<b>1 INTRODUZIONE.....</b>	<b>5</b>
<b>2 STATO DELL'ARTE.....</b>	<b>7</b>
2.1 Tessuto osseo.....	7
2.1.1 Composizione cellulare.....	7
2.1.2 Matrice extracellulare.....	9
2.1.3 Organizzazione strutturale.....	10
2.1.4 Rimodellamento e rigenerazione ossea.....	10
2.1.5 Patologie del tessuto osseo.....	14
2.1.6 Infezioni ossee ed approcci terapeutici.....	18
2.2 Nuove soluzioni, sviluppo di sostituti ossei.....	20
2.2.1 Scaffold a base di fosfato di calcio.....	20
2.2.2 Triply Periodic Minimal Surface scaffold.....	22
2.2.3 Stampa 3D.....	23
<b>3 MATERIALI E METODI.....</b>	<b>25</b>
3.1 Produzione degli scaffold.....	25
3.1.1 TMPS.....	26
3.1.2 Stampa degli scaffold: DLP.....	27
3.2 Caratterizzazione meccanica e misure di densità.....	29
3.2.1 Densità geometrica, apparente e porosità.....	30
3.2.2 Prove di compressione.....	30
3.3 Materiali fragili: modulo di Weibull.....	32
<b>4 RISULTATI.....</b>	<b>36</b>
4.1 Resistenza apparente di Gibson-Ashby.....	36
4.2 Modulo di Weibull.....	41
<b>5 CONCLUSIONI.....</b>	<b>45</b>
<b>6 BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>47</b>

## SOMMARIO

Questo lavoro si pone l'obiettivo di mettere a confronto dei modelli di scaffold bioceramici a base di  $\beta$ -TCP, ottenuti in laboratorio durante un precedente lavoro, con alcuni modelli presi dalla letteratura scientifica. Dopo una breve descrizione del tessuto osseo e delle sue proprietà, vengono presentati i modelli in letteratura e poi confrontati in base al valore della resistenza apparente a flessione, dato dalle misure di porosità e di resistenza a compressione. Infine i modelli ottenuti in laboratorio vengono valutati in base al modulo di Weibull lungo le tre componenti principali.

# CAPITOLO 1

## INTRODUZIONE

Le malattie ossee degenerative e le fratture sono note per colpire milioni di persone nel mondo. Sebbene il tessuto osseo abbia una notevole capacità di rimodellarsi, per pazienti con capacità rigenerative limitate, come coloro affetti da diabete o da malnutrizione, queste sono molto più lente e non soddisfano le necessità del caso. La rigenerazione ossea naturale comporta la formazione di nuovo tessuto osseo anziché tessuto fibrotico, comune nel processo di rigenerazione di altri tessuti corporei. Il meccanismo di ripristino osseo è notevolmente influenzato da fattori fisiologici, cellulari e genetici.

Attualmente i trattamenti clinici si basano sulla sostituzione dell'osso perso con innesti ossei autogeni, osso allogenico conservato in banca o fonti xenogeniche, nonché sostituti ossei sintetici. Tuttavia questi metodi hanno un grado limitato di recupero strutturale e funzionale.

Per superare questi ostacoli sono stati condotti diversi studi nell'area dell'ingegneria del tessuto osseo, il cui obiettivo principale è produrre sostituti funzionali per tessuti danneggiati. Finora sono stati prodotti diversi scaffold tridimensionali che permettono la crescita del nuovo tessuto e il ripristino di quello danneggiato.

Tuttavia lo scaffold ideale deve essere ancora ottenuto poiché deve possedere proprietà che consentano il ripristino della struttura e delle funzionalità del tessuto nativo. Proprietà come biocompatibilità, biodegradabilità, comportamento meccanico, dimensione dei pori e carica superficiale sono molto importanti per consentire l'adesione e la proliferazione cellulare, la diffusione di nutrienti e gas e il successo della rigenerazione tissutale.

Negli ultimi anni le tecnologie assistite dal computer (CAx) e i relativi strumenti di ricerca sono stati incorporati nell'ingegneria tissutale, creando un campo chiamato ingegneria tissutale assistita dal computer (CATE). La progettazione assistita (CAD) aiuta a ridurre le prove sperimentali e i tempi di produzione degli scaffold.

La progettazione degli scaffold utilizzando dati individuali del paziente consente la produzione di modelli più accurati e specifici, capaci di adattarsi perfettamente al difetto osseo del paziente. Utilizzando tecnologie per l'acquisizione delle immagini, come la tomografia computerizzata (CT) o la risonanza magnetica (MRI), è possibile ottenere un modello anatomico tridimensionale accurato del tessuto di interesse.

Per la rigenerazione ossea i materiali più utilizzati sono i bioceramici, una categoria di ceramici contraddistinti per le eccellenti capacità biologiche: sono infatti biocompatibili, bioattivi, osteoconduttivi e hanno una composizione molto simile a

quella della matrice minerale dell'osso umano. I bioceramici più usati in questo campo sono i fosfati di calcio, i vetri bioattivi e i silicati di calcio. Il principale limite dei materiali bioceramici è dovuto alla loro difficile lavorabilità, a causa dei legami ionici e covalenti che rendono la struttura duttile ma fragile.

Essendo l'idrossiapatite (HA) la principale fase minerale presente nell'osso, solitamente è la prima scelta nella produzione di scaffold. Tuttavia, il basso livello di biodegradabilità dell'idrossiapatite rappresenta uno svantaggio per la sostituzione ossea. Uno dei rimedi che è stato preso in considerazione nei lavori analizzati è quello di mescolare la polvere di HA con quella di  $\beta$ -TCP, ovvero fosfato tricalcico, per ottenere una polvere bioceramica bifasica, riuscendo a bilanciare la stabilità strutturale con la capacità di riassorbimento. In un singolo caso preso in esame anziché con HA, la polvere di  $\beta$ -TCP è stata invece mescolata con ossido di magnesio (MgO).

## **CAPITOLO 2**

### **STATO ATTUALE DELL'ARTE**

L'osso è un tessuto attivo e viene rimodellato in continuazione. In particolare, è un tipo speciale di tessuto connettivo che svolge funzioni fondamentali per il corpo quali la locomozione, il supporto e la protezione per gli organi interni e dei tessuti molli. Inoltre, l'osso funge da deposito per i minerali, come calcio e fosfato, e come sede per il midollo osseo. Con l'avanzare delle conoscenze nel campo della salute è aumentata di pari passo l'aspettativa di vita, che ha comportato un numero maggiore di individui affetti dal deterioramento dei tessuti legato all'invecchiamento. Questi eventi portano ad una riduzione della qualità della vita poiché possono comportare una riduzione della capacità di eseguire compiti basilari, come la deambulazione, o addirittura causare problemi sociali o psicologici. Pertanto è di fondamentale importanza riuscire a superare questo problema.

Il tessuto osseo è il secondo tessuto più trapiantato al mondo con circa 2.2 milioni di interventi eseguiti ogni anno. Data la sua importanza risulta quindi fondamentale conoscerne la biologia strutturale, molecolare e funzionale per comprendere meglio questo tessuto come un'unità multicellulare con una struttura dinamica.

## **2.1 TESSUTO OSSEO**

### **2.1.1 COMPOSIZIONE CELLULARE**

L'osso è composto da 4 tipi di cellule: osteoblasti, osteociti, osteoclasti e cellule di rivestimento dell'osso [1]. Queste differiscono rispetto all'origine e alla funzione, come si può notare dalla Figura 2.1.

Gli osteoblasti [2] sono cellule di forma poliedrica e rappresentano circa il 4% delle cellule totali dell'osso, sono inoltre noti per la loro capacità di costruire l'osso. Derivano da cellule staminali mesenchimali e possono ulteriormente differenziarsi in osteociti o cellule di rivestimento osseo. Morfologicamente sono caratterizzati da un reticolo endoplasmatico ruvido e da varie vescicole secretorie. Gli osteoblasti sono responsabili della secrezione dell'osteoido, ovvero la matrice ossea organica non

mineralizzata, che si forma prima della maturazione del tessuto osseo. Questa matrice contiene una grande quantità di collagene (94%), diverse proteine, fattori di crescita e consente la mineralizzazione del tessuto.

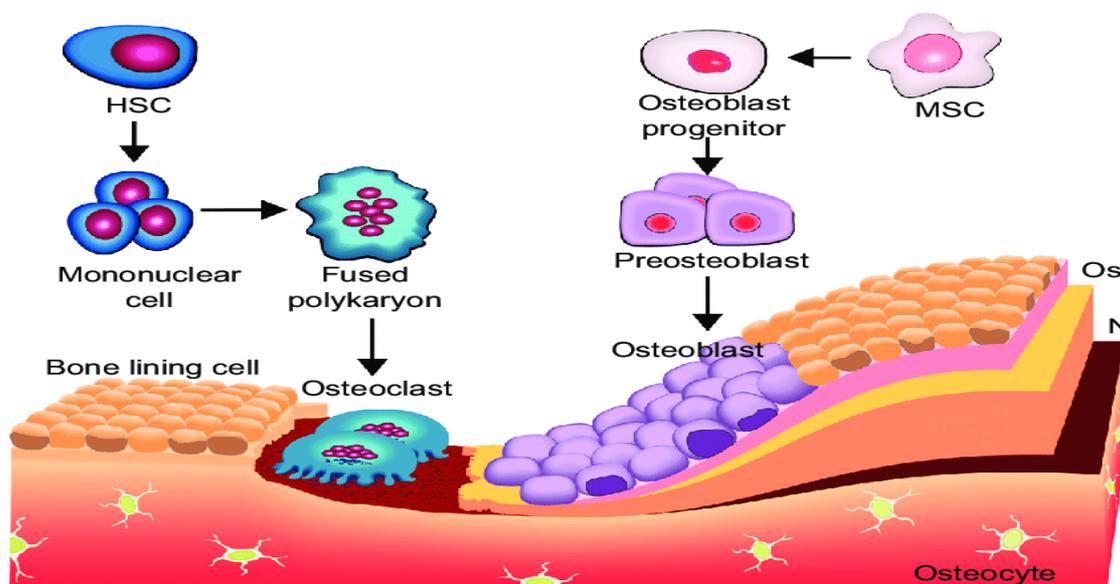


FIGURA 2.1 Una rappresentazione schematica delle cellule ossee e delle loro diverse origini

Gli osteociti rappresentano circa il 95% delle cellule totali dell'osso e sono quelle con la maggiore durata di vita, ovvero 25 anni [3]. Sono incapsulati nella matrice ossea mineralizzata e si formano quando un determinato numero di osteoblasti si trova circondato dalla matrice (alla fine del ciclo di formazione ossea). Queste cellule sono strettamente collegate tra di loro mediante delle giunzioni comunicanti a formare un reticolo tridimensionale sepolto nella matrice ossea. Questa caratteristica permette loro di avere la funzione di rilevare e trasmettere eventuali segnali agendo come meccanoriceptori, poiché la loro rete interconnessa ha la capacità di rilevare pressioni e carichi meccanici aiutando l'adattamento dell'osso alle forze meccaniche quotidiane. Inoltre l'apoptosi, ovvero la morte cellulare programmata, degli osteociti gioca un ruolo chiave nel riassorbimento osseo, agendo come segnale chemiotattico (infatti durante questo processo gli osteociti apoptotici sono fagocitati dagli osteoclasti). In questo modo agiscono come orchestratori del rimodellamento osseo attraverso la regolazione delle attività di osteoblasti ed osteoclasti.

Le cellule di rivestimento dell'osso (BLC) sono sottili, di forma allungata, ricoprono le superfici ossee inattive, cioè quelle che non sono in fase di rimodellamento, e sono collegate tra loro o agli osteociti tramite estensioni citoplasmatiche o giunzioni comunicanti. Derivano da osteoblasti non più attivi che entrano in una fase

quiescente [4] e per questo vengono anche definite "osteoblasti a riposo". In effetti le BLC possono differenziarsi in osteoblasti capaci di produrre osteoide e vescicole della matrice, responsabili del processo di mineralizzazione.

Gli osteoclasti sono cellule multinucleate, responsabili del riassorbimento osseo durante il rimodellamento. Derivano dalle cellule staminali ematopoietiche, in particolare dalla linea monocito-macrofagica [5], e diventano differenziati quando stimolati da due fattori essenziali: il fattore stimolante delle colonie di monociti/macrofagi (M-CSF) e il recettore di attivazione del ligando NF- $\kappa$ B (RANKL). L'equilibrio tra formazione e distruzione ossea è fondamentale per avere una massa ossea adeguata, quindi mantenere un bilanciamento tra le attività di osteoblasti e osteoclasti. Questo avviene non solo mediante fattori sistemici ma anche grazie al mantenimento della comunicazione tra osteoblasti ed osteoclasti, affinché questi ultimi producano i fattori che stimolano la differenziazione e la funzione degli osteoblasti.

## 2.1.2 MATRICE EXTRACELLULARE

La matrice cellulare (ECM) è composta da una miscela di proteine strutturali e funzionali disposte in una struttura tridimensionale ed è in grado non solo di legare le cellule insieme ma anche di assicurarsi la loro sopravvivenza, sviluppo, forma e comportamento migratorio [6]. L'ECM è composta da una parte organica (il 65% del peso totale del tessuto osseo) e da una parte inorganica (Figura 2.2).

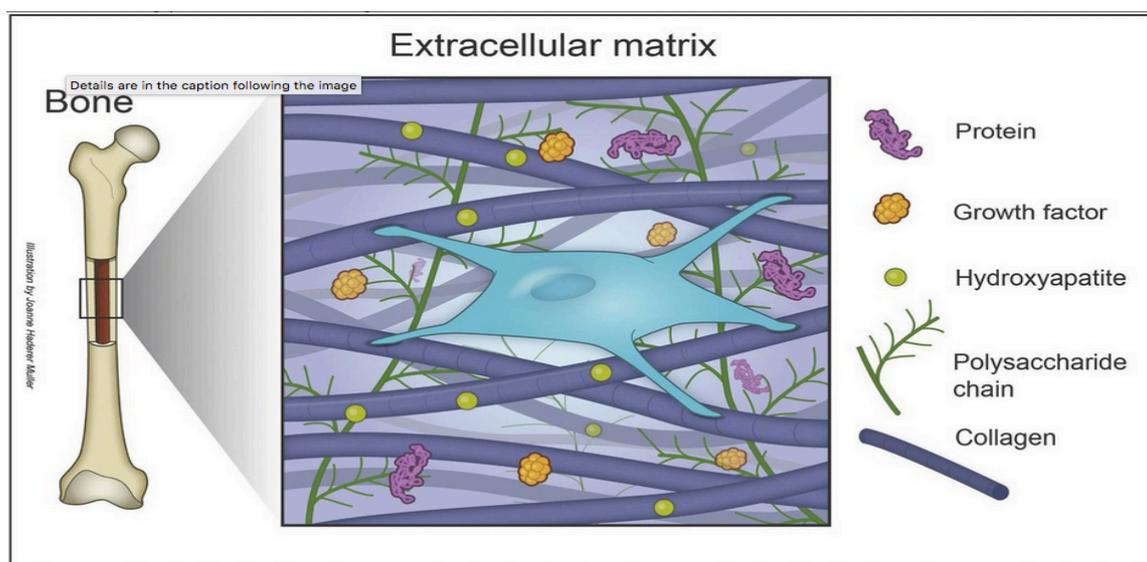


FIGURA 2.2 Componenti principali della matrice extracellulare ossea

La componente organica contiene proteine collagenose (90%), principalmente collagene di tipo I, e proteine non collagenose (osteocalcina, osteonectina, osteopontina, fibronectina e sialoproteina ossea II), proteine morfologiche ossee, fattori di crescita e polisaccaridi. È inoltre anche composta da piccoli proteoglicani ricchi di leucina.

La matrice inorganica è composta da sali minerali, principalmente ioni calcio e fosfato, i quali sono responsabili della formazione dei cristalli di idrossiapatite.

Questi due tipi di matrice sono responsabili della rigidità e resistenza del tessuto osseo poichè il collagene e le proteine non collagenose formano un'impalcatura per la deposizione dell'idrossiapatite, la quale indurisce questo tessuto connettivo.

### 2.1.3 ORGANIZZAZIONE STRUTTURALE

Lo scheletro adulto è composto per l'80% da osso corticale (compatto) e per il restante 20% da osso trabecolare (spugnoso). Questi due tipi di tessuto osseo hanno la stessa composizione e struttura ma differiscono in termini di densità, porosità e posizione nello scheletro [7].

L'osso corticale comprende il guscio tubolare esterno delle ossa lunghe e la superficie esterna delle ossa piccole e piatte, mentre l'osso trabecolare si trova vicino alle estremità delle ossa lunghe, nell'interno delle ossa piccole e tra le ossa piatte (Figura 2.3). Inoltre l'osso corticale è più resistente, denso e meno poroso rispetto a quello spugnoso. Le sue unità funzionali fondamentali sono gli osteoni, chiamati anche sistemi di Havers, da cui corrono i vasi sanguigni permettendo la diffusione dei nutrienti nell'osso [8].

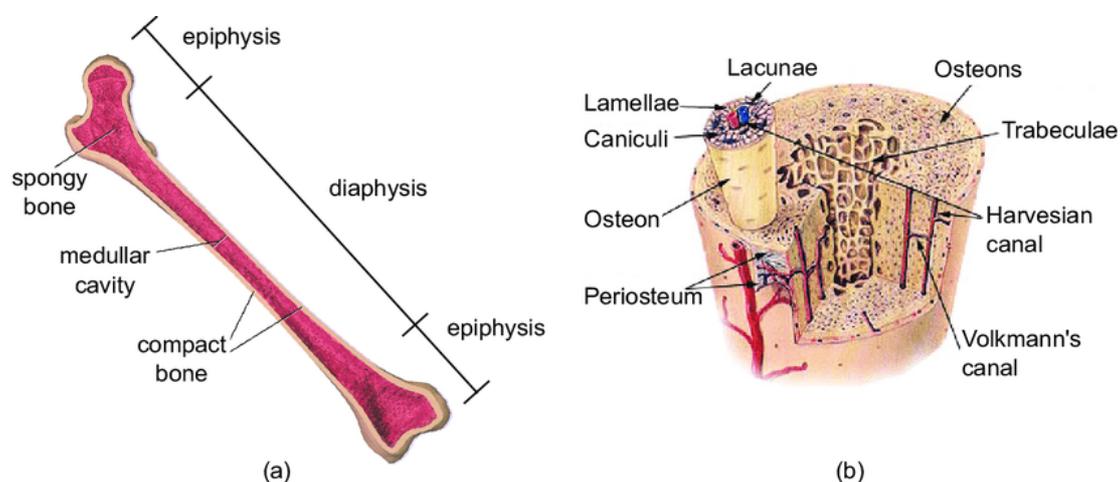


FIGURA 2.3 Composizione del tessuto osseo

L'osso trabecolare è caratterizzato da una rete interconnessa di piccole trabecole ossee, allineate nella direzione dello sforzo di carico. Questa specifica forma ha un'alta porosità (50-90%) e i pori sono riempiti con midollo osseo e cellule. A causa di ciò fornisce meno supporto meccanico rispetto all'osso corticale [9].

È possibile supporre, essendo l'osso trabecolare maggiormente esposto in termini di superficie al midollo osseo e avvenendo il riassorbimento e formazione ossea sulla superficie, che l'osso trabecolare mostri un'attività metabolica maggiore. Da questo si può concludere che l'osso corticale sia responsabile delle funzioni meccaniche e protettive mentre quello trabecolare sia responsabile di quelle metaboliche (omeostasi ad esempio) e della trasmissione dei carichi.

#### **2.1.4 RIMODELLAMENTO E RIGENERAZIONE OSSEA**

L'osso è un tessuto dinamico che viene costantemente rinnovato attraverso un processo attivo e dinamico chiamato rimodellamento osseo. Questo processo si basa sul corretto equilibrio tra il riassorbimento osseo da parte degli osteoclasti e la deposizione ossea da parte degli osteoblasti, affinché si mantenga una massa ossea costante [10]. Si tratta di un ciclo altamente complesso (rappresentato in Figura 2.4) che comprende anche l'attività di osteociti e cellule di rivestimento osseo. Questa attività, oltre alla loro formazione, proliferazione e differenziazione, è mediata da fattori locali e sistemici. I fattori locali includono fattori di crescita, citochine, prostaglandine prodotte dalle cellule ossee e fattori della matrice rilasciati durante il riassorbimento osseo. I fattori sistemici includono l'ormone paratiroideo (PTH), la calcitonina, il calcitriolo, gli androgeni e gli estrogeni. Ad esempio, gli osteoclasti sono in grado di produrre clastochine che controllano l'attività degli osteoblasti durante il rimodellamento, quindi clastochine e fattori della matrice svolgono ruoli complementari nel reclutamento degli osteoblasti [11].

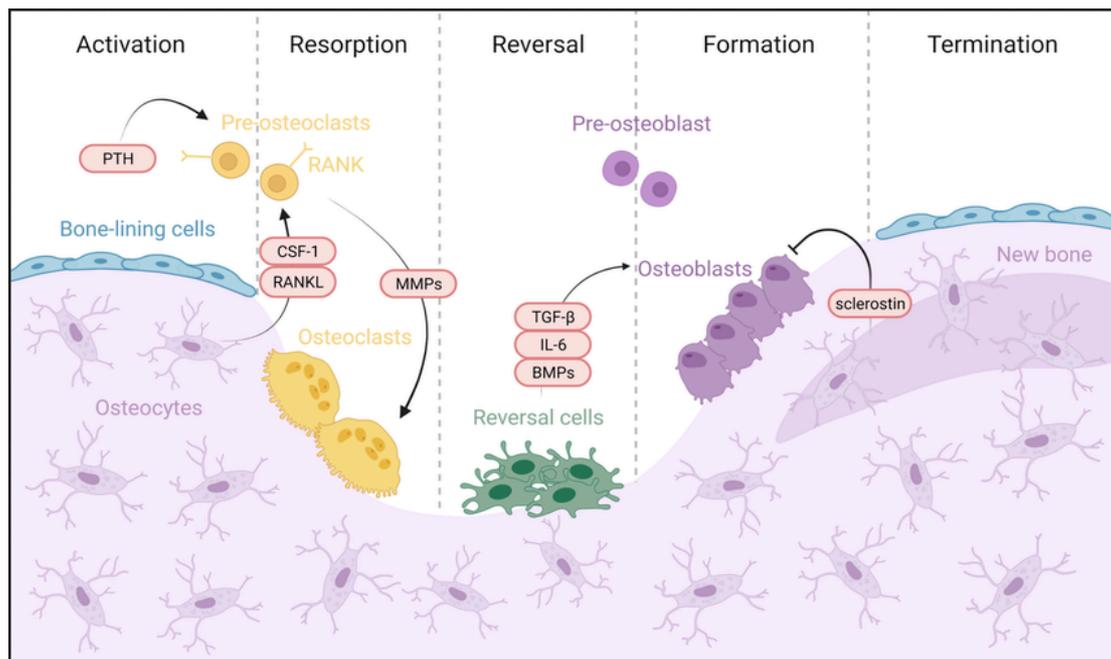


FIGURA 2.4 Le cinque fasi del processo di rimodellazione dell'osso

Durante la fase di attivazione, gli osteociti rilevano diversi stimoli (come microfratture o un'alterazione del carico meccanico), o alcuni fattori vengono rilasciati nel microambiente osseo (come il fattore di crescita insulino-simile, il fattore di necrosi tumorale, l'ormone paratiroideo e l'interleuchina-6), i quali possono attivare le cellule di rivestimento e, quando interagiscono con i preosteoclasti, questi si fondono e si differenziano in osteoclasti multinucleati.

Successivamente, nella fase di riassorbimento, gli osteoblasti richiamano i preosteoclasti nel sito di rimodellamento, in risposta ai segnali generati dagli osteociti o ai segnali diretti di attivazione endocrina. Dopo la differenziazione, gli osteoclasti aderiscono alla superficie ossea e iniziano a dissolvere l'osso. Una volta compiuto questo compito gli osteoclasti vanno incontro ad apoptosi per evitare un eccessivo riassorbimento osseo.

La fase di inversione è eseguita dalle cellule di inversione, ovvero cellule simili a macrofagi che rimuovono i detriti prodotti durante la degradazione della matrice, come la matrice collagenica demineralizzata non digerita. Successivamente, queste cellule preparano la superficie dell'osso per la formazione ossea mediata dagli osteoblasti.

Nella fase di formazione, durante il riassorbimento della matrice ossea, viene rilasciata una serie di fattori di crescita che sono responsabili del reclutamento degli osteoblasti nell'area riassorbita. Dopo il loro reclutamento, questi secernono proteine collageniche (principalmente collagene di tipo I), proteine non collageniche (osteocalcina, osteonectina, sialoproteina ossea II e osteopontina) e proteoglicani (come decorina e biglicano), producendo una nuova matrice ossea. Questa matrice,

chiamata osteoide, non è inizialmente calcificata ma in seguito gli osteoblasti sono in grado di promuoverne la mineralizzazione attraverso la sintesi di cristalli di idrossiapatite, completando così il processo di rimodellamento osseo.

Infine, la fase di terminazione avviene quando la quantità di osso riassorbito è stata sostituita, il che indica la cessazione della formazione ossea. Dopo la mineralizzazione, gli osteoblasti maturi vanno incontro ad apoptosi, ritornano a un fenotipo di cellule di rivestimento osseo o rimangono incorporati nella matrice mineralizzata, differenziandosi in osteociti. Questo indica che la superficie ossea è tornata a uno stato di riposo, che sarà mantenuto fino all'inizio del prossimo ciclo di rimodellamento [12].

Un'altra caratteristica importante dell'osso è la sua capacità di rigenerazione. Questo è un processo fisiologico che consiste in una sequenza molto precisa di induzione e conduzione ossea, la quale coinvolge diversi tipi di cellule e di vie di segnalazione molecolare, intracellulari ed extracellulari, che seguono una sequenza temporale e spaziale definita, con l'obiettivo di ottimizzare la riparazione scheletrica e ripristinare la funzione scheletrica [13]. Questo processo è coinvolto nella guarigione delle fratture, nei difetti creati da traumi, infezioni, anomalie congenite e rigenerazione compromessa o insufficiente. In ambito clinico, la guarigione delle fratture è la forma più comune di rigenerazione ossea e può essere divisa in guarigione primaria e secondaria. La prima avviene quando c'è un piccolo gap nella frattura e nessun movimento nel sito della frattura, e il processo che porta alla guarigione è lo stesso del normale rimodellamento osseo. La seconda, che è la forma di guarigione più frequente, si verifica in assenza di fissazione rigida e consiste in un processo organizzato di eventi che mirano ad attivare più tipi di cellule per preparare il sito della frattura alla sua consolidazione, a ripristinare la vascolarizzazione e a produrre un ambiente meccanico stabile che porti all'ossificazione dell'area (processo descritto in Figura 2.5). A differenza di quanto accade in altri tessuti, la maggior parte delle fratture ossee può guarire senza la formazione di tessuto cicatriziale, dove l'osso di nuova formazione è rigenerato con le proprietà preesistenti dell'osso ed è indistinguibile dall'osso circostante non lesionato.

Nonostante la notevole capacità di ripararsi, quando si tratta di rigenerare una frattura e di rimanere un organo attivo attraverso un continuo rimodellamento durante tutta la vita adulta, a volte la rigenerazione ossea sembra necessaria in quantità maggiore e potrebbe persino richiedere interventi clinici a causa della gravità di alcuni difetti o fratture [14]. In effetti, ci sono diverse strategie di rigenerazione e riparazione ossea per migliorare le procedure ricostruttive chirurgiche, tra cui l'uso di materiali alloplastici e allogenici o di scaffold osteoconduttivi. Essendo l'innesto osseo autologo il gold standard, questo è ampiamente utilizzato per la guarigione di difetti ossei di dimensioni critiche.

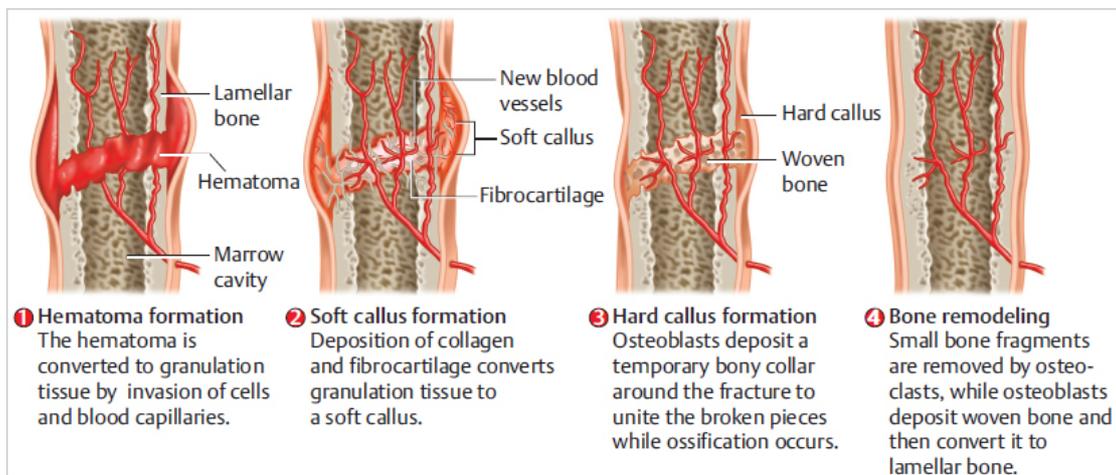


Figura 2.5 Le quattro fasi del processo di guarigione secondaria

## 2.1.5 PATOLOGIE DEL TESSUTO OSSEO

Una frattura ossea si verifica quando una forza applicata a un osso è superiore alla sua soglia di sopportazione. Esistono diversi tipi di fratture ossee (in base alla forza e alla direzione del trauma, all'osso specifico coinvolto, all'età del paziente e alla sua salute generale) che possono derivare da varie cause, come incidenti traumatici quali infortuni sportivi, incidenti automobilistici e cadute, condizioni come l'osteoporosi e alcuni tipi di cancro che rendono le ossa più fragili.

L'osteoporosi è riconosciuta come il disturbo osseo più diffuso al mondo. È una condizione caratterizzata da una riduzione della forza e della densità ossea, oltre a una microgeometria e architettura microscopica alterate (Figura 2.6) che comportano un aumento del rischio di frattura ossea.

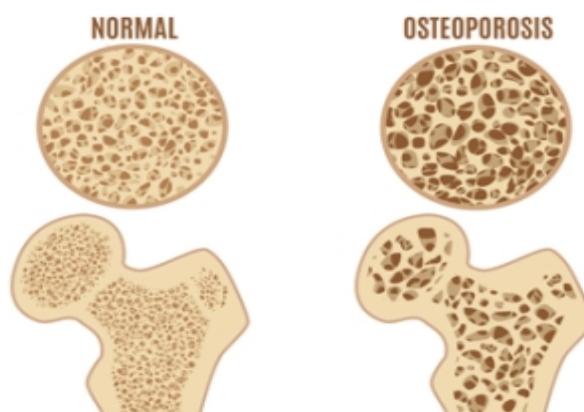


Figura 2.6 Differenza tra osso sano e osso affetto da osteoporosi

Si stima infatti che l'osteoporosi causi più di 8,9 milioni di fratture all'anno e queste rappresentano una causa principale di morbidità e disabilità nelle persone anziane e possono persino portare a una morte prematura, soprattutto in caso di fratture dell'anca. Un'altra importante conseguenza di queste fratture è il considerevole onere economico imposto ai servizi sanitari di tutto il mondo. Nonostante siano più comuni nelle donne (61% delle fratture osteoporotiche si verificano nelle donne, colpendo 200 milioni di donne a livello mondiale), il rischio aumenta drammaticamente con l'età in entrambi i sessi poiché le ossa diventano più fragili e il rischio di caduta aumenta. A causa dell'inevitabile invecchiamento della popolazione mondiale, si prevede che la prevalenza dell'osteoporosi e della bassa massa ossea aumenterà: entro il 2050, l'incidenza globale delle fratture dell'anca nelle donne dovrebbe aumentare del 240% e del 310% negli uomini.

Gli approcci clinici attuali per la riparazione dell'osso includono l'osteogenesi distrazionale e il trasporto osseo, oltre all'uso di diversi metodi di innesto, come gli innesti ossei autologhi (autoinnesti), gli alloinnesti, i sostituti ossei o fattori di crescita. Inoltre, ci sono anche metodi non invasivi di stimolazione biofisica (come l'ultrasuono pulsato a bassa intensità e i campi elettromagnetici pulsati), che possono essere utilizzati come complemento per migliorare la rigenerazione ossea.

Il trattamento ritenuto migliore è l'innesto osseo autologo, in cui diversi siti ossei possono essere utilizzati per il prelievo dell'innesto. Le creste iliache anteriori e posteriori del bacino sono i siti donatori più comunemente utilizzati, poiché presentano tutti gli elementi necessari per la guarigione ossea: osteoinduzione (fattori di crescita), osteogenesi e osteoconduzione (scaffold) (Figura 2.7) [15].

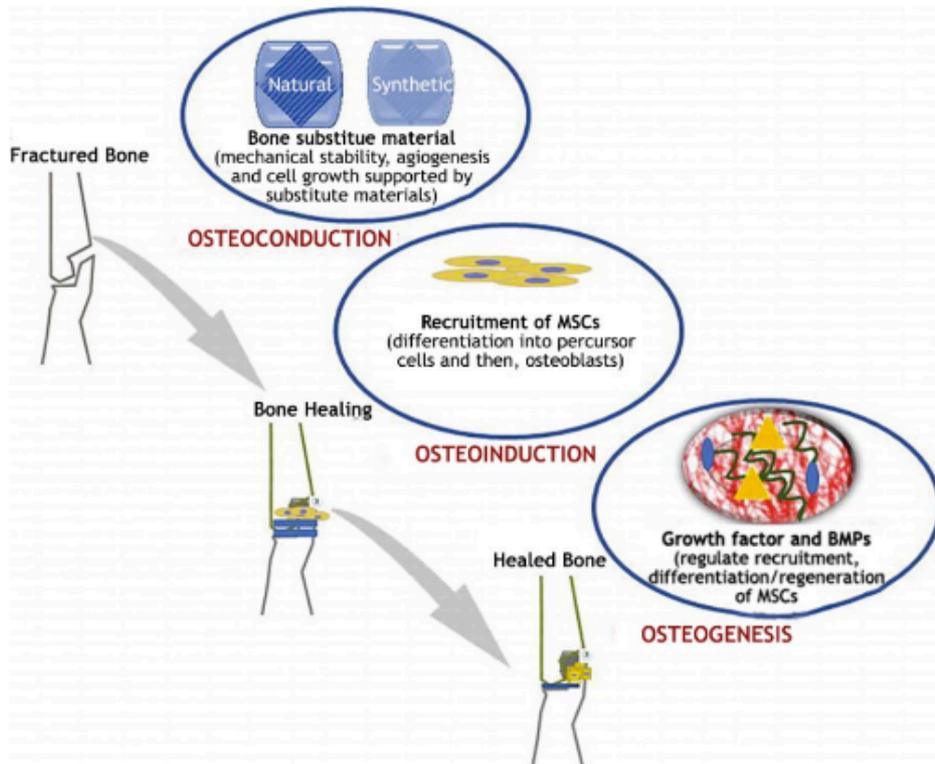


Figura 2.7 Rappresentazione schematica del processo di guarigione dell'osso mediante scaffold per innesto osseo

Nonostante tutti i progressi ottenuti negli ultimi decenni, ci sono ancora molti svantaggi nell'uso degli innesti ossei. L'uso degli autoinnesti può essere limitato dal volume di osso possibile da prelevare, inoltre l'autoinnesto trapiantato può causare complicazioni a causa delle dimensioni del difetto. Altri svantaggi includono la morbosità del sito di prelievo, l'ematoma locale e i problemi di rimodellamento dell'osso impiantato. Per quanto riguarda gli alloinnesti (innesti prelevati da un altro individuo della stessa specie), la loro applicazione può essere ostacolata dall'integrazione del tessuto osseo da parte dell'ospite e dalla vascolarizzazione del tessuto. Per quanto riguarda l'osteogenesi distrazionale, dove l'osso viene rigenerato a seguito della separazione graduale di due bordi osteotomizzati, può trattarsi di un processo doloroso. La fase di distrazione, che richiede di superare la resistenza di un tessuto molle (come la pelle), implica l'uso di una forza che induce dolore. Questo può anche verificarsi a causa di una consolidazione prematura dell'osso. Inoltre, questa tecnica è anche associata a una cattiva guarigione, di conseguenza, c'è ancora bisogno di sviluppare nuovi trattamenti come alternative o come adiuvanti ai metodi standard attualmente utilizzati per la rigenerazione ossea, poiché è necessaria una strategia di trattamento più sostenibile a lungo termine. A tal fine, i sostituti ossei (BGS) potrebbero essere la risposta per aiutare la guarigione compromessa delle fratture.

Le tre forme più comuni di tumori ossei primari sono l'osteosarcoma, i tumori della famiglia del sarcoma di Ewing e il condrosarcoma, con l'osteosarcoma come il più comune tra questi. L'osteosarcoma ha un'incidenza mondiale di 3,4 per milione di persone all'anno ed è il terzo tumore più comune in adolescenza, colpendo più frequentemente individui tra i 10 e i 25 anni [16]. È caratterizzato dalla produzione di osteoide da parte delle cellule maligne e può insorgere in qualsiasi tipologia di osso, ma si verifica più frequentemente nelle regioni giustae-pifisarie delle ossa come il femore distale, la tibia prossimale e l'omero prossimale, con più della metà che si origina intorno al ginocchio. Oltre a questi siti primari comuni, questo tumore tende a produrre metastasi sistemiche precoci. La struttura è disorganizzata e può apparire come un fine pattern trabecolare a rete o come aggregati irregolari di osteoide (figura 2.8).

Questo cancro inizia come un processo osseo midollare che progredisce per distruggere l'osso corticale, associato a un grande componente di tessuto molle. Il trattamento attualmente utilizzato per questo tipo di cancro include la chemioterapia preoperatoria seguita dalla rimozione chirurgica di tutta la malattia rilevabile e la chemioterapia postoperatoria. Un'altra opzione terapeutica per il trattamento locale dei tumori è rappresentata dalla radioterapia, anche se l'osteosarcoma è generalmente considerato resistente all'applicazione di dosi di radiazioni.

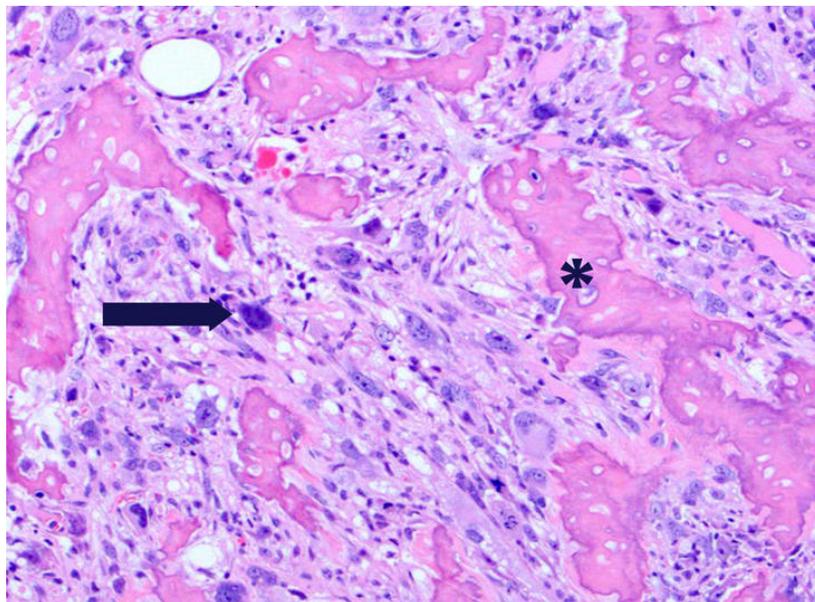


Figura 2.8 Rappresentazione al microscopio di osteosarcoma patologico

Il sarcoma di Ewing è una neoplasia ed è il secondo tumore osseo più comune nei bambini e negli adolescenti, colpendo principalmente nella prima trentina di anni di

vita. I siti più comuni per questo tumore sono le ossa lunghe tubolari, con l'incidenza più alta nel femore. Il trattamento del sarcoma di Ewing prevede come approccio iniziale sei cicli di chemioterapia neoadiuvante seguiti da tre fasi di trattamento: si inizia con una citoreduzione iniziale per eradicare la malattia micrometastatica e facilitare le misure di controllo locale efficace, poi si esegue una terapia radiante o chirurgica definitiva per eliminare tutta la malattia nota. Infine, si utilizza una terapia di consolidamento per ridurre la probabilità di recidiva del tumore, come la chemioterapia adiuvante.

Il condrosarcoma è un tumore mesenchimatoso maligno caratterizzato da diverse cellule differenziate che producono matrice condroidale. Si manifesta principalmente negli adulti, con la maggior parte dei casi che si verifica in persone di età superiore ai 40 anni [17]. Per quanto riguarda il trattamento, la resezione chirurgica è il tipo di trattamento primario e preferito per i pazienti con malattia localizzata, mentre la radioterapia viene principalmente utilizzata per trattare siti chirurgicamente difficili da raggiungere e nella palliazione dei sintomi locali, richiedendo dosi relativamente alte per la cura. La chemioterapia è considerata inefficace nel trattamento di questo cancro, tuttavia, potrebbe essere considerata in alcuni sottotipi di condrosarcoma, come i sottotipi dedifferenziato e mesenchimatoso.

Considerando tutto ciò, è possibile concludere che la chirurgia, la chemioterapia e la radioterapia sono gli approcci principali per il trattamento dei tumori ossei. Queste terapie presentano alcuni svantaggi che devono essere presi in considerazione: gli effetti collaterali tossici a breve e lungo termine dell'uso della chemioterapia e, nel caso degli osteoblastomi, esiste la possibilità di indurre resistenza agli agenti chemioterapici. Per quanto riguarda la radioterapia, ad esempio nel trattamento dei sarcomi di Ewing (che sono abbastanza radiosensibili), questa modalità viene utilizzata meno frequentemente a causa dei potenziali effetti di questo approccio, come le neoplasie secondarie e gli effetti avversi sulla crescita ossea. Per questi motivi è urgente trovare nuove modalità terapeutiche e trattamenti più selettivi per i tumori ossei.

### **2.1.6 INFEZIONI OSSEE E APPROCCI TERAPEUTICI**

I difetti ossei possono verificarsi a causa di diverse condizioni congenite o acquisite. Le anomalie ossee congenite di solito derivano dall'assenza o dal malsviluppo delle ossa, mentre i difetti ossei acquisiti appaiono spesso a seguito di un trauma, infezione, cancro o intervento chirurgico. Alcune condizioni osteodegenerative,

come l'osteoartrite, possono anche essere responsabili della perdita ossea nel tempo, causando un altro tipo di difetto osseo. La ricostruzione dei difetti ossei rappresenta ancora una considerevole sfida clinica, specialmente in caso di infezione. È spesso associata a un rimodellamento osseo anomalo a causa di una massiccia distruzione ossea nel sito dell'infezione, in risposta a batteri e tossine batteriche. Sfortunatamente, questo fenomeno non è raro poiché la regione dell'osso difettoso e la maggior parte dei sostituti ossei sintetici sono inclini all'adesione batterica e alla successiva formazione di biofilm, che a sua volta favorisce la progressione dell'infezione. Il 9-36% dei pazienti che subiscono interventi ortopedici soffre di infezioni profonde postoperatorie dopo interventi chirurgici per tumori ossei e di solito è necessario un intervento chirurgico aggiuntivo [18]. Inoltre, l'uso prolungato di antibiotici e i ritardi nei trattamenti programmati (come la chemioterapia) possono portare a infezioni. Le chirurgie traumatiche possono anche causare infezioni dopo la fissazione delle fratture (IAFF), che è una delle complicazioni più impegnative in chirurgia traumatologica. Può portare a non-unione, guarigione ritardata, perdita funzionale permanente e persino amputazione dell'arto colpito. Questo tipo di infezione può verificarsi, con minor estensione nelle fratture chiuse (1-2%) e con maggiore estensione nelle fratture aperte (fino al 30%), risultando in una prolungata ospedalizzazione e un aumento del carico economico per i pazienti [19]. Per quanto riguarda il trattamento dell'IAFF, la maggior parte dei concetti applicati è emersa dagli algoritmi di trattamento delle infezioni delle articolazioni protesiche (PJ). Nonostante abbiano proprietà cliniche simili, ci sono differenze tra i pazienti con artroplastica elettiva e i pazienti traumatici, in termini di rischio di infezione alla chirurgia primaria e nelle opzioni di trattamento. La principale differenza tra IAFF e infezione PJ è che la prima è caratterizzata dalla presenza di una frattura, quindi è necessaria una stabilità biomeccanica per la guarigione. Infatti, la stabilità della costruzione è importante non solo per la prevenzione, ma anche per il trattamento dell'IAFF. Gli obiettivi principali del trattamento dell'IAFF sono la consolidazione della frattura, l'eradicazione dell'infezione o, in alcuni casi, la soppressione dell'infezione fino al raggiungimento della consolidazione della frattura, della guarigione del tessuto molle circostante, della prevenzione dell'osteomielite cronica e del ripristino della funzionalità ossea. È importante considerare che trattare l'infezione non è sempre la priorità, poiché il dispositivo di fissazione interna può essere rimosso dopo la consolidazione quindi la guarigione dell'osso è solitamente l'obiettivo principale. In alcuni casi, può essere stabilita una terapia soppressiva con antibiotici e il materiale deve essere rimosso dopo questo trattamento per evitare il rischio di recidiva dell'infezione o osteomielite cronica. Questa è un'infezione progressiva che porta a distruzione infiammatoria, necrosi e neoformazione ossea, che può progredire a uno stadio

cronico e persistente, con la possibilità di diventare una malattia cronica a vita. Sebbene esistano tecniche chirurgiche per trattare questa condizione (come i trapianti muscolari e i cementi ossei antibiotici), le infezioni ossee rappresentano ancora una sfida. Pertanto, è necessario migliorare sia la prevenzione che il trattamento, al fine di ottenere una migliore assistenza ai pazienti. Tali miglioramenti potrebbero essere un'aumentata biodisponibilità di dispositivi medici funzionalizzati antimicrobici (impianti funzionalizzati antibatterici) o la funzionalizzazione degli impianti con peptidi antimicrobici (AMP), poiché questi ultimi non inducono resistenza nei patogeni dopo esposizione, come fanno gli antibiotici [20].

## **2.2 NUOVE SOLUZIONI, SVILUPPO DI SOSTITUTI DELL'OSSO**

Le lesioni ossee sono molto comuni e causano seri cambiamenti nella qualità della vita dei pazienti. Possono limitare la capacità di svolgere compiti basilari, come camminare, e possono anche causare problemi sociali e psicologici. Come spiegato nella sezione precedente, le soluzioni attualmente disponibili per questi problemi sono essenzialmente l'uso di trapianti ossei (autologhi, allogenici e xenogenici), metodi di trasporto osseo e impianti basati su diversi tipi di materiali. Questi tipi di interventi sono necessari per garantire la rigenerazione dell'osso e il ripristino della sua funzionalità. Quando l'osso non è in grado di rigenerarsi autonomamente, l'ingegneria dei tessuti ossei mostra un grande potenziale terapeutico, poiché le sfide associate alle attuali soluzioni ortopediche possono essere risolte dallo sviluppo di materiali osteobiologici adatti. Questi dovrebbero sostituire gli innesti allogenici, autologhi e xenogenici convenzionali, servendo come materiali impiantabili per la riparazione o

### **2.2.1 SCAFFOLD A BASE DI FOSFATO DI CALCIO**

Tra la classe dei materiali ceramici per applicazioni biomediche, e in particolare per scaffolds ossei, i ceramici a base di Fosfato di Calcio (CaP) sono i più utilizzati. Essi sono disponibili in una varietà di prodotti, grazie alla possibilità di modificare la loro composizione chimica (rapporti Ca/P) e le forme. (Figura 2.9) I CaP sono minerali composti da cationi di calcio e anioni di fosfato, che sono noti per essere il principale materiale inorganico in tutte le ossa umane native (circa il 60%) e per essere biocompatibili, osteoinduttivi e osteoconduttivi, il che li rende un strategici per la rigenerazione ossea. Hanno anche un'elevata affinità per le proteine di adesione e i

fattori di crescita, come la proteina morfogenetica ossea 2 (BMP-2), che stimola la proliferazione e la differenziazione delle cellule osteoprogenitrici [21]. In questo modo i CaP possono svolgere un ruolo importante come trasportatori di fattori di crescita e cellule staminali, senza modificare la loro superficie chimica. Tuttavia, l'uso di additivi o rivestimenti superficiali negli scaffolds CaP può cambiare le loro proprietà per migliorare l'angiogenesi e l'osteogenesi. Cementi ossei, scaffolds, impianti e tecniche di rivestimento sono alcune delle applicazioni ossee che utilizzano i ceramici CaP, e alcuni di essi sono stati persino commercializzati.

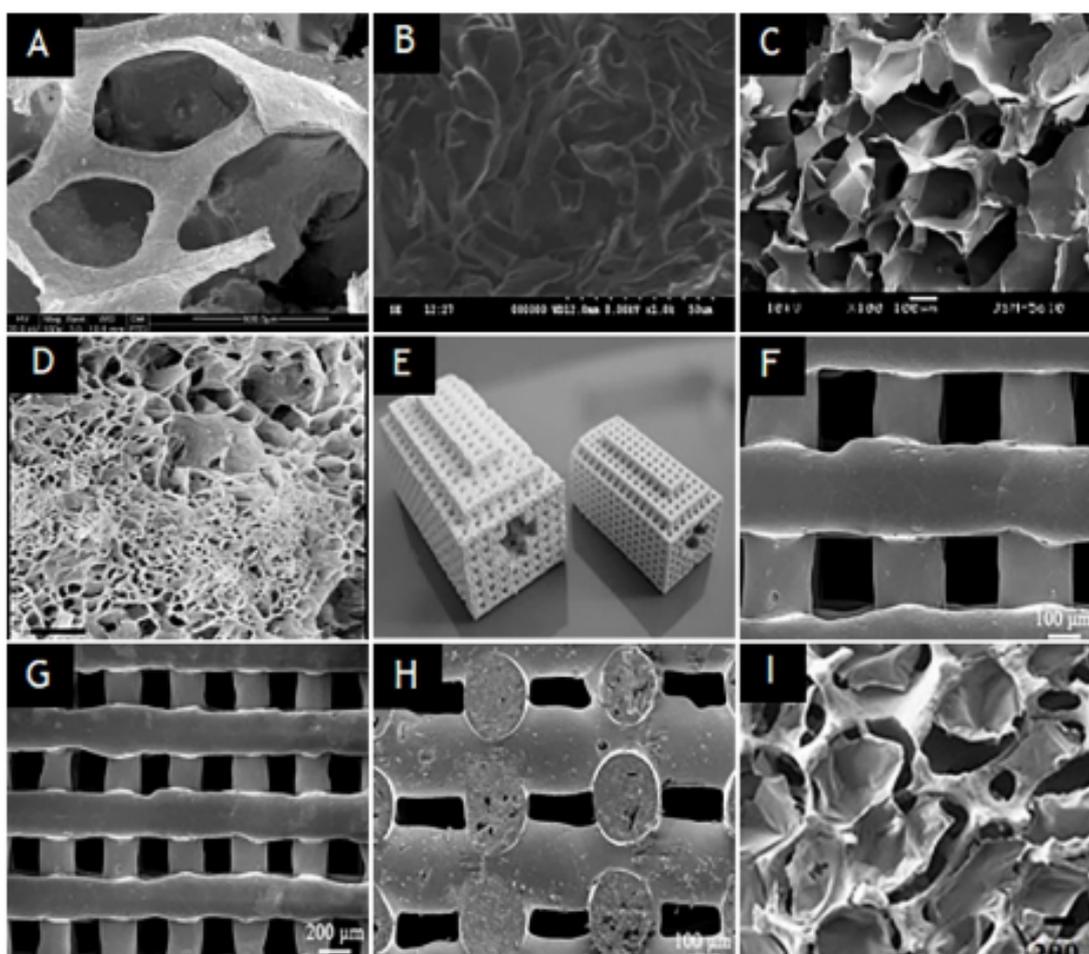


Figura 2.9 Differenti scaffold a base di CaP

Poiché l'osteconduttività e l'osteoinibizione dei CaP dipendono dalle loro caratteristiche fisiche/chimiche (ad esempio la chimica della superficie e la carica influenzano l'adsorbimento delle proteine, la rugosità superficiale influisce sull'adesione delle proteine sulla superficie del fosfato di calcio e la porosità del CaP può avere un effetto sulla bioattività), è importante scegliere il tipo di fosfato di calcio che meglio si adatta all'applicazione desiderata. In questo modo, basato sulla composizione, alcuni dei CaP più utilizzati sono l'idrossiapatite (HA), il

Tricalciofosfato e i Calciofosfati Bifasici (BCP) (una combinazione di diverse concentrazioni di HA e  $\beta$ -TCP), con i BCP considerati oggi come il gold standard dei sostituti ossei nella chirurgia ricostruttiva.

HA e TCP hanno una composizione chimica molto simile alla sezione organica presente nell'osso ma l'HA ha come difetto principale le scarse proprietà meccaniche. Il TCP invece ha una maggiore resistenza alla frattura tuttavia questa è inferiore a quella dell'osso corticale

### **2.2.2 TRIPLY PERIODIC MINIMAL SURFACE SCAFFOLD**

Il processo di guarigione dell'osso è un fenomeno complesso e prolungato, che può durare mesi se non anni. Di conseguenza, per migliorare il processo e ottenere un miglior risultato di guarigione, è necessario fornire un ambiente meccanicamente stabile per ospitare tutte le molecole segnalatrici e permettere a quelle cellule essenziali di proliferare. Con lo sviluppo e l'avanzamento della manifattura additiva (anche nota come stampa 3D) è emerso un candidato eccellente per questo ruolo: le impalcature basate su superfici minimali periodiche tripliche (TPMS).

Le TPMS sono superfici di area minima, con un contorno definito da una curva chiusa. Le impalcature TPMS si basano su queste superfici, dove ogni cella unitaria è formata conferendo uno spessore alla superficie e poi combinata per formare l'impalcatura finale con simmetria cubica, che contiene la ripetizione periodica di pori interconnessi (in natura l'osso trabecolare ha una struttura simile). Gli studi hanno dimostrato che queste strutture porose TPMS sono ottime per ottimizzare la rigenerazione ossea, in quanto non solo sono meccanicamente sufficientemente robuste per supportare la formazione ossea, ma sono anche in grado di imitare i tessuti ossei biologici, integrandosi bene con il tessuto circostante e promuovendo molti processi cellulari come la diffusione dell'ossigeno, lo scambio ionico e il trasporto di nutrienti. Questa combinazione di proprietà meccaniche e morfologiche permette alle impalcature basate sulla struttura TPMS di fornire un ambiente ottimizzato per la crescita del tessuto osseo, attirando così grande interesse nel campo della medicina rigenerativa [22].

Quindi ottimizzando le proprietà fisiche delle impalcature TPMS, i ricercatori possono amplificare i benefici delle impalcature TPMS e sfruttare ulteriormente tali strutture per promuovere e assistere meglio il processo di rigenerazione ossea.

Le TPMS hanno due principali vantaggi rispetto ad altre strutture: la struttura porosa può essere descritta mediante espressioni matematiche, permettendo di ricavare

proprietà come la porosità direttamente dai parametri della funzione, e la superficie è liscia, quindi priva di punti di interconnessione o curve strette.

### **2.2.3. STAMPA 3D**

La manifattura additiva (AM) si riferisce a una serie di tecniche caratterizzate dalla fusione, legatura o solidificazione di materiali (come resina liquida e polveri), creando oggetti in modo stratificato [23]. Gli strati sono formati sotto il controllo del computer per sviluppare prodotti 3D, il che significa che le informazioni geometriche tridimensionali dell'oggetto progettato sono determinate da modelli CAD (Computer-Aided Design) delle parti dell'oggetto, oppure scannerizzando oggetti in due dimensioni e processando i dati acquisiti in un modello 3D. Altri termini possono essere utilizzati per descrivere i processi AM, come stampa 3D (3DP), prototipazione rapida (RP), produzione digitale diretta (DDM), produzione rapida (RM) e fabbricazione solida a forma libera (SFF).

Questo tipo di tecnica è un approccio migliore rispetto alle strategie tradizionali, poiché si osserva una relazione superiore struttura-funzione quando un oggetto viene stampato in 3D e forma compositi con un'eterogeneità spaziale controllata. Questa caratteristica ha reso la stampa 3D uno strumento estremamente utile sia nel campo della ricerca biomedica sia nell'ingegneria tissutale, grazie alla capacità di replicare l'architettura intrinseca e l'eterogeneità cellulare dei tessuti e degli organi. In termini di innesti ossei, la capacità di stampare geometrie biocompatibili e specifiche per il paziente, con macro e micropori controllati, creando impianti personalizzati, e la possibilità di incorporare farmaci e proteine, ha reso questa tecnologia ideale per applicazioni ortopediche. Inoltre, altri vantaggi includono la riduzione del tempo e dei costi per la realizzazione di impianti campione o modelli fisici, uno alla volta o anche in piccoli lotti, e il miglioramento della comunicazione medico-paziente, aiutando i chirurghi ad avere una migliore valutazione preoperatoria della condizione, consentendo la progettazione di piani operativi più ragionevoli.

In termini di ingegneria tissutale, alcune tecniche AM attualmente disponibili per la fabbricazione di impalcature ossee sono la stampa 3D, varie forme di scrittura diretta, come l'assemblaggio/scrittura diretta robotizzata, la sinterizzazione laser selettiva (SLS), la stereolitografia (SLA) e la modellazione a deposizione fusa (FDM) [24][25]. La tecnica della stereolitografia si basa su un laser UV a bassa potenza ma altamente focalizzato, utilizzato per tracciare sezioni trasversali successive di un oggetto tridimensionale, in una vasca di polimero fotosensibile liquido.

La tecnica della modellazione a deposizione fusa utilizza un materiale plastico o ceroso, che viene riscaldato ed estruso attraverso un ugello che traccia la geometria della sezione trasversale dell'oggetto, strato dopo strato.

Per quanto riguarda la sinterizzazione laser selettiva, questa tecnologia utilizza un raggio laser in movimento per tracciare e sinterizzare selettivamente il materiale desiderato in sezioni trasversali successive di una parte tridimensionale, che viene costruita su una piattaforma. Questa piattaforma regola la sua altezza in base allo spessore dello strato in costruzione.

Nel processo di stampa 3D, che è una tecnologia basata sulla stampa a getto d'inchiostro, la testa del getto d'inchiostro stampa un legante liquido su sottili strati di polveri, basandosi sui profili dell'oggetto generati da un software.

Infine, la tecnica di robocasting consiste nella deposizione robotizzata di sospensioni colloidali altamente concentrate, in grado di sostenere il proprio peso durante l'assemblaggio. Per questo motivo, è necessario un inchiostro con proprietà reologiche adeguate per la stampa con questa tecnica.

# **CAPITOLO 3**

## **MATERIALI E METODI**

In questo terzo capitolo verranno descritti i materiali, la strumentazione e i fondamenti teorici che sono stati impiegati per la realizzazione dei provini, insieme alle tecniche e procedure utilizzate per la modellazione, stampa e caratterizzazione degli scaffold. Tutte le risorse menzionate sono state fornite dai dipartimenti di Ingegneria Industriale e Fisica Tecnica dell'Università di Padova.

### **3.1 PRODUZIONE DEGLI SCAFFOLD**

Per la rigenerazione del tessuto osseo malato o danneggiato, gli scaffold devono soddisfare requisiti specifici in termini di caratteristiche morfologiche, strutturali e meccaniche. Poiché l'osso è un tessuto metabolicamente attivo e in continuo rimodellamento, l'impianto che verrà inserito nel sito della lesione deve integrarsi in maniera armoniosa per stimolare la rigenerazione del tessuto senza alterare omeostasi o altre funzionalità dell'osso stesso. Risulta quindi fondamentale utilizzare materiali biocompatibili, in modo da evitare eventuali reazioni immunitarie avverse. Inoltre i materiali devono essere bioattivi e biodegradabili, per permettere all'impianto di degradarsi gradualmente e di essere sostituito con tessuto osseo sano e nuovo.

Come discusso precedentemente, per il successo dell'impianto osseo è cruciale scegliere attentamente le caratteristiche strutturali e geometriche quali lo spessore delle pareti, la dimensione dei pori e delle celle unitarie. Questa accortezza serve per evitare che il modello stampato presenti delaminazioni dei layers o difetti strutturali che ne compromettano le proprietà meccaniche. La struttura tridimensionale interna inoltre deve essere interconnessa per permettere un ottimale scambio di nutrienti, metaboliti e un'adeguata crescita cellulare.

Gli scaffold prodotti in laboratorio e analizzati in questa tesi sono ottenuti partendo dalle polveri di materiali ceramici (HA e TCP) unite con un monomero liquido che si solidifica mediante polimerizzazione quando esposto a luce UV. Il verde ottenuto da questo processo viene pulito con specifici solventi e sottoposto a crosslinking e trattamenti termici ad alta temperatura per permetterne la sinterizzazione delle polveri.

### 3.1.1 TPMS

Con la sigla TPMS si intendono le "Triply Periodic Minimal Structures", ovvero superfici geometriche che si ripetono periodicamente nelle tre direzioni spaziali, formando una struttura continua e senza intersezioni all'interno di uno spazio tridimensionale [26]. Queste strutture sono molto utilizzate in ambito biomedico per via dei numerosi vantaggi, ad esempio sono descritte da funzioni matematiche che, una volta cambiate, possono modificarne la curvatura, le dimensioni dei pori, lo spessore e la densità. Godono di eccellenti proprietà meccaniche e di migliore resistenza alla fatica. Hanno una permeabilità maggiore e una migliore rispetto a strutture a pori casuali. I modelli costruiti in laboratorio e analizzati in questa tesi sono: Gyroid, IWP, Diamond Surface, Primitive Surface e Neovius Surface, descritti matematicamente dalle funzioni in Figura 3.1 e rappresentati in Figura 3.2.

TPMS Structures	Equations
Primitive	$\cos\left(\frac{2\pi}{L}x\right) + \cos\left(\frac{2\pi}{L}y\right) + \cos\left(\frac{2\pi}{L}z\right) = c$
Gyroid	$\sin\left(\frac{2\pi}{L}x\right)\cos\left(\frac{2\pi}{L}y\right) + \sin\left(\frac{2\pi}{L}y\right)\cos\left(\frac{2\pi}{L}z\right) + \sin\left(\frac{2\pi}{L}z\right)\cos\left(\frac{2\pi}{L}x\right) = c$
Diamond	$\cos\left(\frac{2\pi}{L}x\right)\cos\left(\frac{2\pi}{L}y\right)\cos\left(\frac{2\pi}{L}z\right) - \sin\left(\frac{2\pi}{L}x\right)\sin\left(\frac{2\pi}{L}y\right)\sin\left(\frac{2\pi}{L}z\right) = c$
Neovius	$3\left(\cos\left(\frac{2\pi}{L}x\right) + \cos\left(\frac{2\pi}{L}y\right) + \cos\left(\frac{2\pi}{L}z\right)\right) + 4\left(\cos\left(\frac{2\pi}{L}x\right)\cos\left(\frac{2\pi}{L}y\right)\cos\left(\frac{2\pi}{L}z\right)\right) = c$
IWP	$2\left(\cos\left(\frac{2\pi}{L}x\right)\cos\left(\frac{2\pi}{L}y\right) + \cos\left(\frac{2\pi}{L}y\right)\cos\left(\frac{2\pi}{L}z\right) + \cos\left(\frac{2\pi}{L}z\right)\cos\left(\frac{2\pi}{L}x\right)\right) - \left(\cos\left(\frac{2\pi}{L}2x\right) + \cos\left(\frac{2\pi}{L}2y\right) + \cos\left(\frac{2\pi}{L}2z\right)\right) = c$

Figura 3.1 Funzioni matematiche nelle tre coordinate cartesiane  $f(x,y,z)$  che descrivono le cinque strutture TPMS scelte per la realizzazione dei provini

I parametri geometrici fondamentali nella realizzazione degli scaffold sono stati: porosità (dipendente dalla densità relativa delle strutture), dimensioni dei pori e spessore delle pareti.



Figur 3.2 Modelli geometrici dei provini: da sinistra a destra: Neovius, Gyroid, IWP, Diamond e Primitive. I cubi hanno lato di 10mm (ripetizione di quattro celle unitarie) e la porosità è dell'85%.

### 3.1.2 STAMPA DEGLI SCAFFOLD: DLP

Il Digital Light Process (DLP) (Figura 3.3) è una delle categorie di stereolitografia basate su processi di polimerizzazione localizzata, che avviene grazie ad una luce ultravioletta che solidifica strati successivi di liquido viscoso formato da resina fotosensibile combinata con altri elementi [27].

La DLP permette di polimerizzare un intero strato in una sola volta anziché, come fanno le stampanti SLA, tracciare un percorso specifico mediante il laser. Questa tecnica consente di produrre rapidamente scaffold dotati di geometrie complesse ad alti tassi di precisione e il tutto a prezzi più vantaggiosi.

Gli scaffold prodotti in laboratorio e presi in analisi in questo lavoro sono stati ottenuti mediante una stampante Original Prusa SL1S appartenente alla categoria PSL (Projection-Based Stereolithography) e dotata di pannello LCD (Liquid Crystal Display) come maschera. Questa tipologia permette di avere il vantaggio di generare la maschera direttamente sullo schermo eliminando la distorsione ottica e garantendo un'ottima risoluzione. L'approccio usato dalla Prusa SL1S è di tipo bottom-up: il fondo del serbatoio contenente la resina liquida fotosensibile è trasparente in modo tale che possa passare la luce, la piattaforma si abbassa fino a lasciare sul fondo del serbatoio una quantità di resina pari allo spessore del layer desiderato [28]. Il campione viene stampato rivolto verso il basso con la base sulla piattaforma che viene sollevata di volta in volta dallo spessore del nuovo layer. I parametri che l'utente può regolare sono: spessore del layer, tempo di esposizione alla luce del primo layer e di quelli successivi.

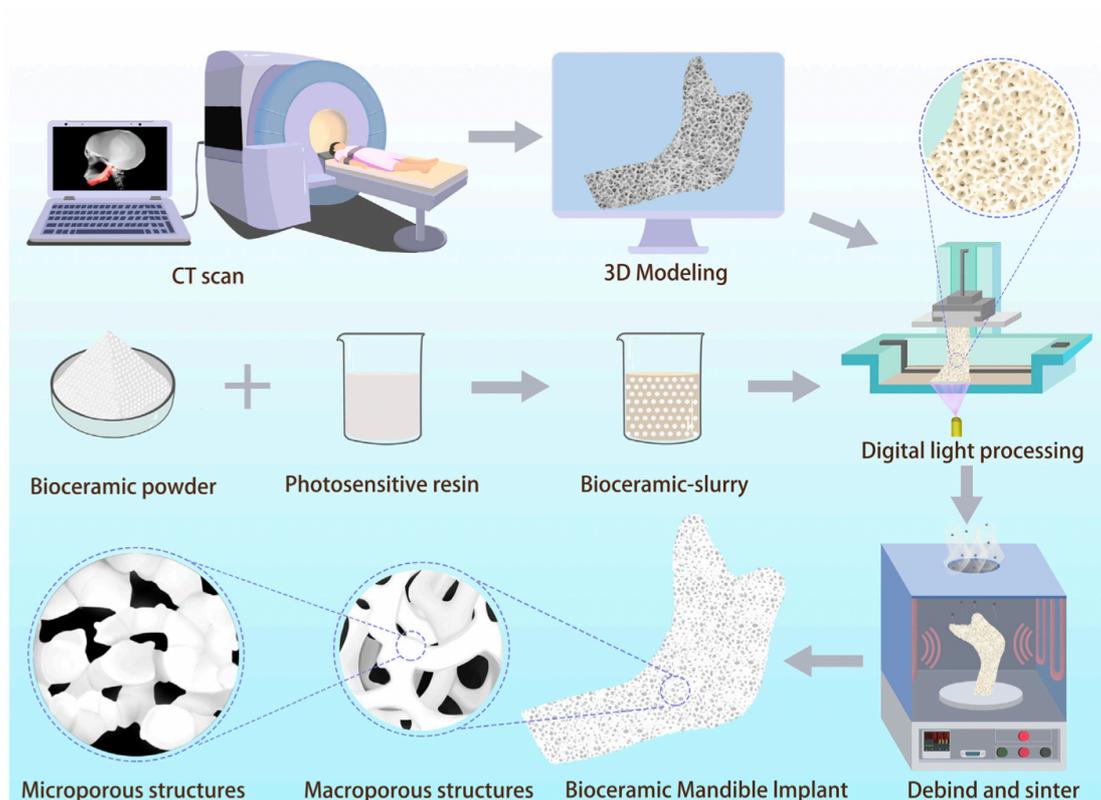


Figura 3.3 Rappresentazione schematica del processo DLP per scaffold

I modelli vengono stampati a partire da file di modelli geometrici convertiti in formato .slls mediante il programma PrusaSlicer, il quale, "affettando" il modello tridimensionale, genera una serie di immagini bidimensionali dei vari layer illuminati dal proiettore. Una volta terminata la stampa i provini (Figura 3.4) sono stati lavati con isopropanolo per eliminare i residui di resina ed esposti a luce ultravioletta per permettere la reticolazione delle catene polimeriche e migliorare le proprietà meccaniche.

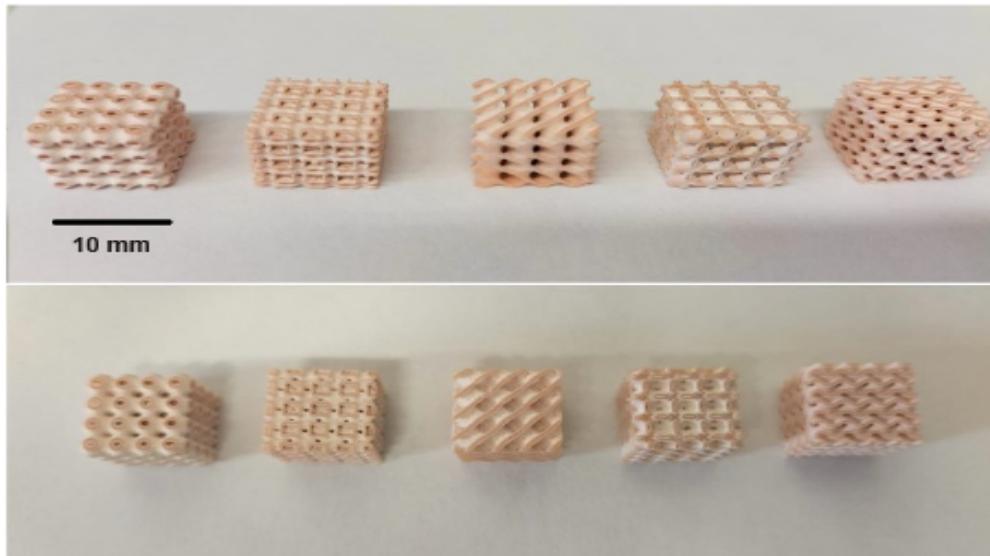


Figura 2.5 Provini dopo la stampa e il cross-linking

Per questo processo è stato utilizzato il dispositivo CW1S, ovvero Curing and Washing machine (Figura 3.5)



Figura 3.5 Macchina CW1S di PrusaResearch per cross linking con luce UV

### **3.2 CARATTERIZZAZIONE MECCANICA E MISURE DI DENSITA'**

Tra i campioni stampati sono stati selezionati 5 provini per ogni modello (compresi 5 modelli ulteriori basati sulla tipologia più performante, alla quale è stata poi modificata densità relativa e dimensione della cella cubica unitaria, per un totale di 10 modelli) e si sono ricavate le misure di densità e di resistenza alla compressione. Da questi due parametri si può ricavare facilmente la resistenza apparente a

flessione, ovvero la misura di riferimento che in seguito verrà utilizzata per confrontare i modelli ottenuti in laboratorio con quelli ricavati dalla letteratura.

### 3.2.1 DENSITA' GEOMETRICA, APPARENTE E POROSITA'

Le misure di densità sono state realizzate mediante un calibro digitale, una bilancia analitica e un picnometro. Per ricavare la resistenza apparente a flessione è prima necessario definire le seguenti grandezze:

- densità geometrica  $\rho_{GEOM}$ : rapporto tra la massa del campione misurata mediante bilancia analitica e il suo volume, ottenuto come prodotto delle lunghezze dei lati misurati mediante calibro digitale.
- densità apparente  $\rho_{APP}$ : rapporto tra la massa del campione e la differenza tra il suo volume e quello della porosità aperta, misurata utilizzando il picnometro sui provini interi.
- densità vera  $\rho_{VERA}$ : rapporto tra la massa del campione e la differenza tra il suo volume e quello della porosità totale (somma di aperta e chiusa), misurata utilizzando il picnometro sulle polveri.
- densità relativa  $\rho_{REL}$ : rapporto tra la densità geometrica e la densità vera, equivale alla differenza tra 1 e la porosità totale del campione
- porosità totale percentuale: porosità totale del campione moltiplicata per 100.

### 3.2.2 PROVE DI COMPRESSIONE

I provini sinterizzati, dopo la misurazione della densità geometrica ed apparente, sono stati sottoposti a prove di compressione con l'ausilio di una pressa Quasar 25. Per valutare l'effetto della porosità sulle proprietà meccaniche della struttura e i risultati delle prove di compressione è stato utilizzato il modello matematico di Gibson-Ashby per un una risposta bending-dominated con costante di G-A pari a 0,2 [29].

Definite le seguenti grandezze (vedi Figura 3.6)

- $E^*$ : modulo elastico della struttura porosa
- $E_S$ : modulo elastico del materiale che compone la struttura cellulare, considerato come un solido senza porosità (bulk material).

- C: costante di Gibson-Ashby, determinata in maniera empirica e dipendente dalla tipologia delle celle e dalla geometria della struttura.
- $\sigma^*$ : resistenza della struttura cellulare
- $\sigma_{y,s}$ : tensione di snervamento del bulk material della struttura

Response type	Mechanical property	Formula	Equation number
Bending-dominated	Modulus (E)	$\frac{E^*}{E_s} = C \left( \frac{\rho^*}{\rho_s} \right)^2$	3
	Strength ( $\sigma$ )	$\frac{\sigma^*}{\sigma_{y,s}} = C \left( \frac{\rho^*}{\rho_s} \right)^{\frac{3}{2}}$	4
Stretch-dominated	Modulus (E)	$\frac{E^*}{E_s} = C \left( \frac{\rho^*}{\rho_s} \right)$	5
	Strength ( $\sigma$ )	$\frac{\sigma^*}{\sigma_{y,s}} = C \left( \frac{\rho^*}{\rho_s} \right)$	6

Figura 3.6 Equazioni del modello di Gibson-Ashby che descrivono il comportamento meccanico di una struttura cellulare

si può notare che il rapporto  $(\rho^*/\rho_s)$  è equivalente alla densità relativa definita precedentemente, il che permette di riscrivere l'equazione come:

$$\sigma_{COMP} = 0,2 \times \sigma_{SOLIDO} \times (\rho_{REL})^{3/2}$$

Si noti che:

- $\sigma_{COMP}$  è il valore della resistenza a compressione misurato con l'ausilio della pressa meccanica.
- $\rho_{REL}$  è appunto la densità relativa.
- $\sigma_{SOLIDO}$  è il valore della resistenza del bulk material dei campioni, ovvero la resistenza apparente a flessione.

Una volta ottenuti due parametri (in questo caso densità relativa e resistenza a compressione) per via sperimentale è quindi immediato ricavare il terzo.

### 3.3 MATERIALI FRAGILI: MODULO DI WEIBULL

Per caratterizzare la variabilità della resistenza meccanica dei materiali, in particolare quelli fragili come ceramiche o vetri, uno strumento statistico di vitale importanza è il modulo di Weibull, introdotto dall'omonimo matematico nel 1931.

Questo modulo fa parte della distribuzione di Weibull, una funzione probabilistica utilizzata per modellare la distribuzione delle proprietà meccaniche in funzione della probabilità di rottura sotto carico  $P_R$  [30].

Nel contesto della meccanica dei materiali fornisce un'indicazione della dispersione dei valori di resistenza del materiale: un valore elevato del modulo implica una minore dispersione e quindi una maggiore affidabilità del materiale, un valore più basso implica una maggiore variabilità e di conseguenza una probabilità maggiore di difetti critici. Per capirne l'importanza può essere utile un esempio pratico: il gesso utilizzato per scrivere alla lavagna è un tipico materiale fragile e non è irrealistico pensare che ad un primo utilizzo questo possa rompersi il 30% delle volte, quindi con  $P_R$  pari a 0,3. E se questo numero nel caso di un gessetto può apparire accettabile visto il costo, nel caso di un utensile da taglio ceramico un valore accettabile può essere 0,01 mentre nel caso di una camera sottovuoto, la cui rottura può causare lesioni gravi agli utilizzatori, il valore scende a  $10^{-6}$ .

Fatta questa doverosa premessa, è possibile ora passare alla descrizione del metodo statistico descritto precedentemente: definita la probabilità di sopravvivenza  $P_S(V_0)$  (pari a  $1-P_R$ ) come la frazione di campioni uguali di volume  $V_0$  che sopravvivono ad uno sforzo  $\sigma$ , Weibull ha ricavato la seguente relazione:

$$P_S(V_0) = e^{-\left(\frac{\sigma}{\sigma_0}\right)^m}$$

nella quale  $m$  è un parametro detto modulo di Weibull e  $\sigma_0$  è un parametro di normalizzazione indicato come resistenza caratteristica. È immediato notare come nel caso in cui lo sforzo al quale è sottoposto il campione valesse 0, la probabilità di sopravvivenza sarebbe pari a 1, mentre all'aumentare del valore di sforzo questo valore tenderebbe a 0.

Come si può notare dalla Figura 3.7, il parametro  $\sigma_0$  è indipendente da  $m$  ed è legato ad un valore fisso di probabilità di sopravvivenza pari a 0,37 (infatti se  $\sigma_0 = \sigma$  si ha  $1^{-m}$  che risulta uguale ad 1 per ogni valore di  $m$ ).

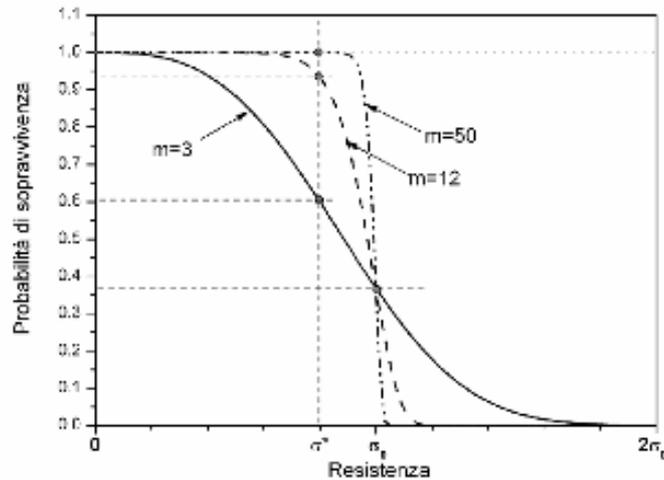


Figura 3.7 Esempi di distribuzione di Weibull

I valori di  $m$  bassi, sotto a 10, sono tipici dei vetri ovvero dei materiali meno affidabili poiché la propagazione della frattura è incontrollata. Nel caso di un valore di  $m$  elevato invece, circa 50, i campioni subiscono la rottura se lo sforzo è vicino a  $\sigma_0$ . Questo è un comportamento tipico dei materiali metallici.

Dalla figura è inoltre possibile notare la diversa affidabilità al variare di  $m$ , infatti applicando uno sforzo pari a  $0,8\sigma_0$  si ha una probabilità di sopravvivenza di poco superiore al 60% per un  $m$  pari a 3, di circa il 94% per un  $m$  pari a 12 e praticamente del 100% per un  $m$  pari a 50. Ergo è inutile la conoscenza del solo parametro di normalizzazione nel caso si volesse caratterizzare la probabilità di sopravvivenza di un materiale.

Talvolta due materiali possono avere un parametro di normalizzazione diverso: come dimostrato in Figura 3.8, scegliere il materiale con  $\sigma_0$  maggiore non è sempre la soluzione migliore. Il materiale con parametro di normalizzazione  $\sigma_0$  e  $m$  pari a 12 a  $\sigma^*$  è affidabile al 94% mentre il materiale con parametro di normalizzazione più alto  $\sigma_0' > \sigma_0$  (parametro di normalizzazione aumentato del 30%) ma con modulo di Weibull più basso,  $m$  pari a 3, a  $\sigma^*$  è affidabile solo all'80%. Scegliere solo in base al valore di  $\sigma_0$  è pericoloso.

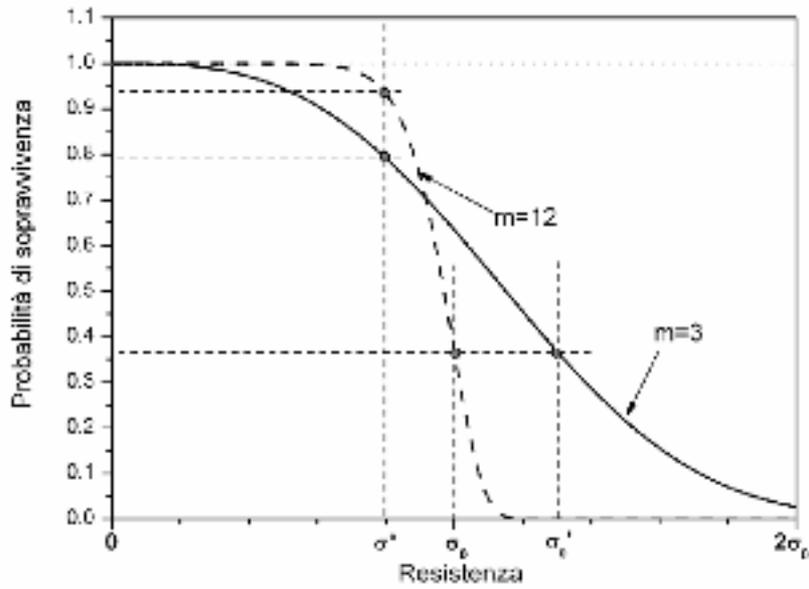


Figura 3.8 Distribuzioni di Weibull per diversi valori di m

L'individuazione dei parametri necessari alla caratterizzazione meccanica richiede la trasformazione della formula iniziale in una forma logaritmica:

$$P_S(V_0) = e^{\left(-\left(\frac{\sigma}{\sigma_0}\right)^m\right)}$$

$$\ln(P_S(V_0)) = -\left(\frac{\sigma}{\sigma_0}\right)^m$$

$$\ln\left(\frac{1}{P_S(V_0)}\right) = \left(\frac{\sigma}{\sigma_0}\right)^m$$

$$\ln\left(\ln\left(\frac{1}{P_S(V_0)}\right)\right) = m \times \ln\left(\frac{\sigma}{\sigma_0}\right)$$

$$\ln\left(\ln\left(\frac{1}{P_S(V_0)}\right)\right) = m \times \ln\sigma - m \times \ln\sigma_0$$

Una volta compiuto questo processo, considerando un piano cartesiano la cui ordinata  $y$  sia il valore di  $\ln\left(\ln\left(\frac{1}{P_s(V_0)}\right)\right)$  e la cui ascissa  $x$  sia il valore di  $\ln\sigma$ , si ottiene una classica retta  $y=mx+q$  di pendenza  $m$  e intercetta  $q=-m \ln\sigma_0$  (Figura 3.9). I parametri possono quindi essere identificati mediante interpolazione lineare, una volta che si è associato ad ogni valore di sforzo il corrispondente livello di probabilità di sopravvivenza. Per fare ciò in questo lavoro si è usato il semplice modello che ordina in senso crescente  $N$  valori di sforzo sperimentali e, ad uno sforzo  $j$ -esimo con  $j$  da 1 a  $N$ , associa un livello di probabilità di sopravvivenza  $P_j = 1 - ((j - 0,3)/(N + 0,4))$

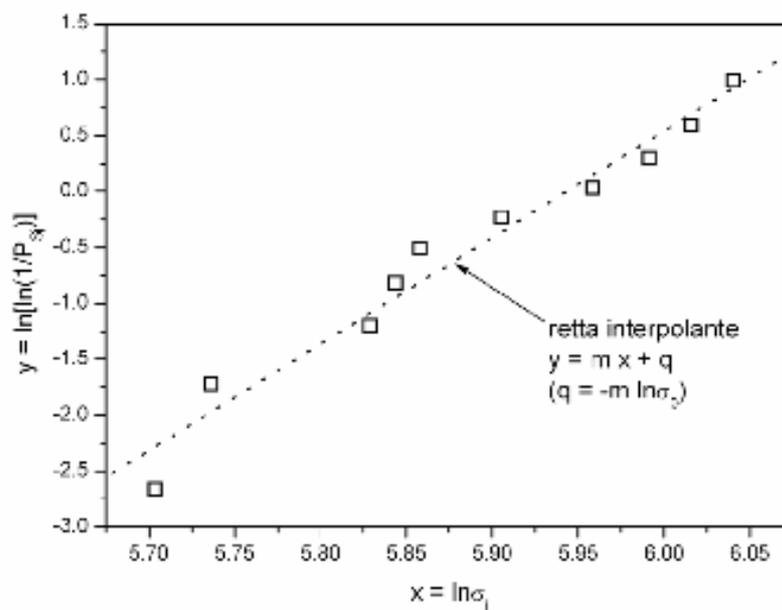


Figura 3.9 Distribuzione linearizzata di Weibull

# CAPITOLO 4

## RISULTATI

Il quarto capitolo di questa tesi è dedicato alla raccolta e al commento dei dati ricavati precedentemente. In particolare si analizzeranno i 10 modelli sperimentali con 10 modelli presi dalla letteratura scientifica in base alla resistenza apparente secondo il modello di Gibson-Ashby e successivamente si analizzeranno solo i 5 modelli sperimentali iniziali secondo il modulo di Weibull.

### 4.1 RESISTENZA APPARENTE DI GIBSON-ASHBY

I 10 modelli creati in laboratorio sono stati messi a confronto con altri 10 modelli di scaffold presi dalla letteratura scientifica. Prima di procedere al confronto vero e proprio verranno descritti brevemente.

Questi modelli sono accomunati dalle caratteristiche viste e descritte in precedenza, ovvero avere come componente principale la polvere di  $\beta$ -TCP, mescolata con resina fotosensibile e disperdente, e la realizzazione di scaffold mediante la stampa 3D con tecnologia DLP. Le caratteristiche che li differenziano invece vengano adesso descritte nella caratterizzazione di ogni modello.

MS: La sigla indica la configurazione dei pori, in questo caso minimal surface (TPMS) e nello specifico Gyroid. La polvere di  $\beta$ -TCP è stata mescolata con la resina fotosensibile in proporzione 60-40 wt%. Di questa tipologia vengono analizzati due modelli con differenti porosità.

PMMA40: Gyroid in fosfato di calcio bifasico (BCP) composto da  $\beta$ -TCP e HA in proporzione 50-50 wt%. La sigla fa riferimento alle microsferiche di PMMA che vengono aggiunte alla composizione (40 vol%), utilizzate come agente porogeno all'interno del materiale ceramico.

EL60: Gyroid in fosfato di calcio bifasico composto da  $\beta$ -TCP e HA in proporzione 50-50 wt%. La sigla si riferisce ad un successivo allungamento della struttura lungo l'asse z, in questo caso del 60%, secondo la formula:  $\%EL = 100 \times (l_e - l_0) / l_0$ .

G-S: Gyroid in cui al  $\beta$ -TCP viene aggiunto del biovetro in proporzione 85-15 wt%. La sigla fa riferimento sia alla struttura TPMS dello scaffold (G) e alla grandezza dei pori del modello in esame scelto (S, ovvero small).

G-Mg: Gyroid con composizione di  $\beta$ -TCP e ossido di magnesio (MgO) in proporzione 97-3 wt%.

GG: Composto di  $\beta$ -TCP e HA in proporzione 50-50 wt%. La sigla fa riferimento alla doppia struttura dello scaffold, una interna e una esterna: in questo caso entrambe sono del tipo gyroid. Di questa tipologia vengono analizzati quattro modelli con differenti porosità.

Dopo aver introdotto i modelli della letteratura è possibile procedere con il confronto vero e proprio. Ogni modello preso in analisi è stato inserito in un grafico cartesiano (si noti che le scale degli assi sono logaritmiche), nel quale l'asse delle ascisse rappresenta la densità relativa calcolata dello scaffold (questa può variare solamente da 0 a 1) mentre l'asse delle ordinate rappresenta il reciproco della resistenza a compressione dello scaffold. Questo grafico è molto utile per confrontare modelli con diverse porosità e non essere quindi ingannati nel credere che un modello sia migliore di un altro solo perchè mostra una maggiore resistenza a compressione a scapito di una maggiore densità relativa. Il modello migliore è quindi quello che si trova nell'angolo in basso a sinistra del grafico, ovvero che a medesima densità relativa ha una resistenza a compressione migliore oppure a medesima resistenza a compressione ha una minore densità relativa. Come si può vedere in Figura 4.1 e in Figura 4.2, tra i modelli sperimentali il migliore è il Neovius, che infatti nel lavoro analizzato era stato il modello sul quale si erano basati i 5 successivi, mentre gli altri sono decisamente meno performanti. I modelli successivi sono mediamente migliori di quelli iniziali ma non raggiungono le prestazioni del Neovius iniziale, il che non è sorprendente visto che l'obiettivo principale era studiare la relazione che hanno dimensione delle celle e porosità con le proprietà meccaniche, piuttosto che quello di ottenere modelli particolarmente performanti. I modelli presi dalla letteratura sono mediamente più resistenti (vedi Figura 4.3) rispetto al Neovius iniziale ( $\sim 285$  N/mm<sup>2</sup> contro i  $\sim 230$  N/mm<sup>2</sup>) ma bisogna considerare che i modelli non sono stati scelti casualmente bensì accuratamente selezionati scartando quelli caratterizzati da proprietà meccaniche non interessanti. Si può quindi asserire che il modello Neovius abbia proprietà meccaniche paragonabili ai modelli che si trovano nella letteratura scientifica del suo ambito di utilizzo.



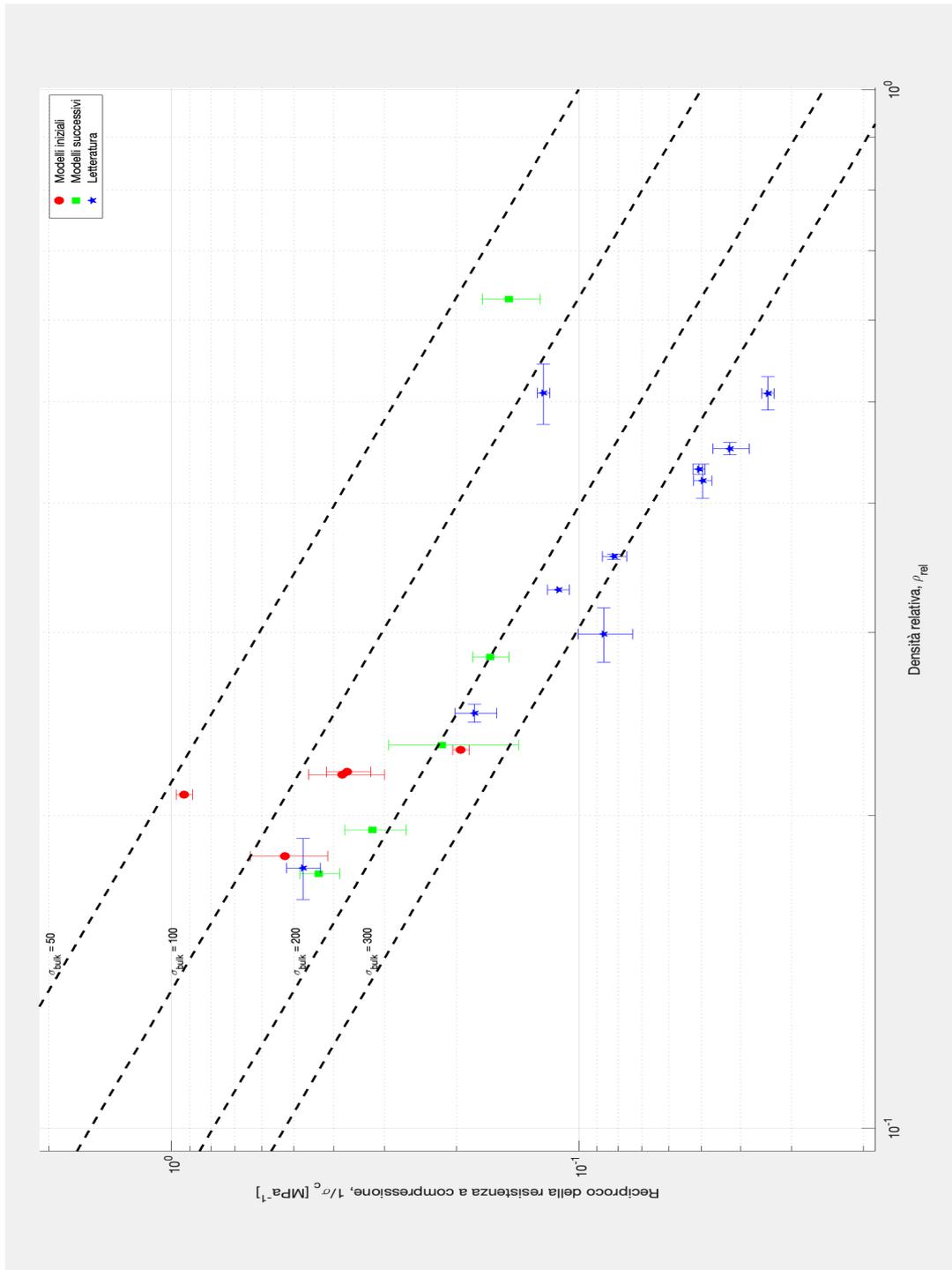


Fig. 4.2 Grafico identico al precedente ma per maggiore chiarezza sono stati rappresentati i modelli in base alla "categoria" di appartenenza

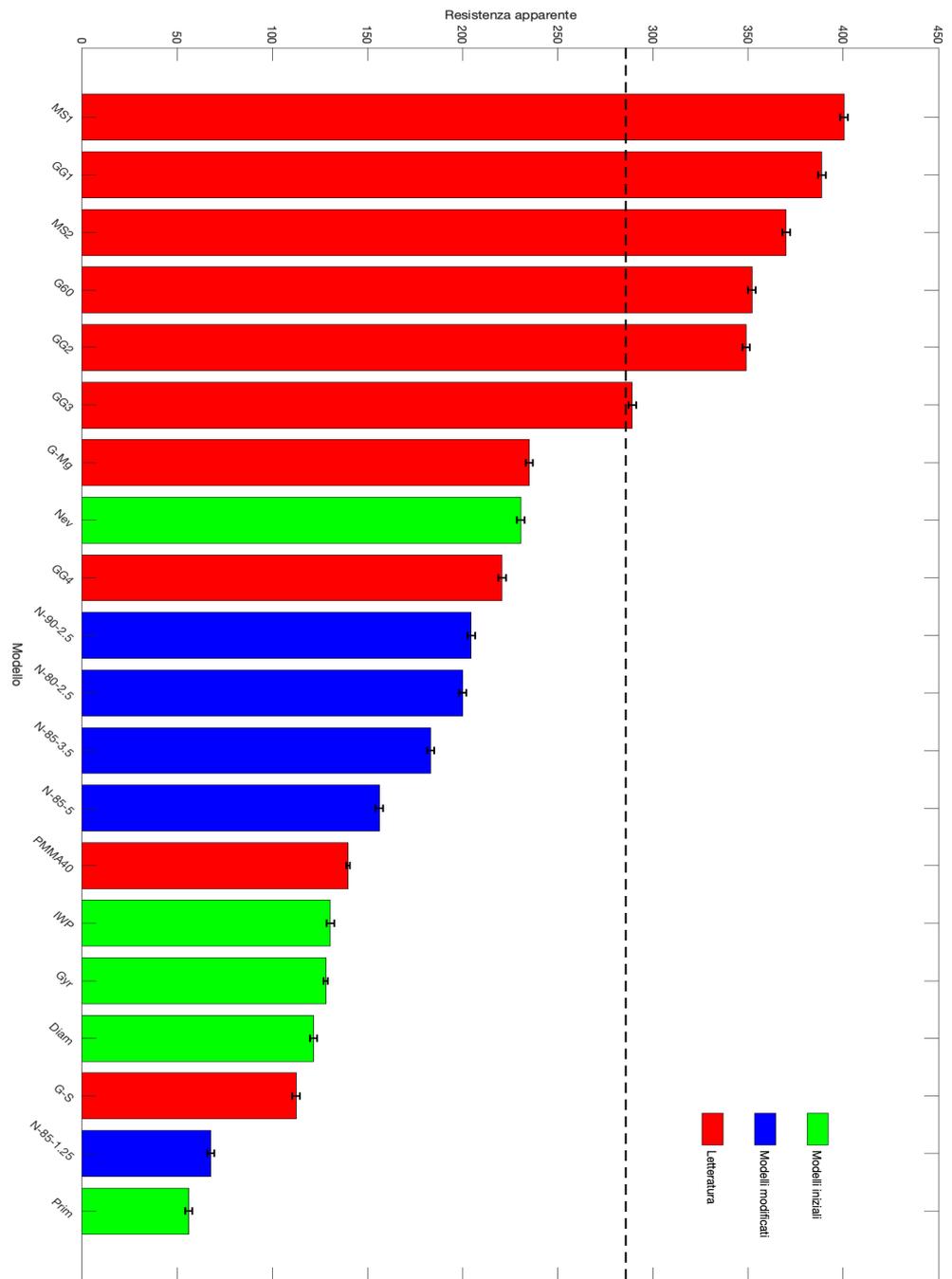


Fig 4.3 I valori di resistenza apparente sono rappresentati in ordine decrescente in base al valore di resistenza apparente indicando a quale "categoria" appartengono. La media del valore dei modelli dalla letteratura è rappresentata dalla linea tratteggiata

## 4.2 MODULO DI WEIBULL

Nella seconda parte di questo paragrafo si sono calcolati i parametri della funzione cumulativa della distribuzione di Weibull descritti precedentemente. Per ognuno dei 5 modelli sperimentali iniziali di scaffold sono stati ricavati in laboratorio dagli 8 ai 10 valori di rottura a compressione lungo le tre direzioni principali (x, y e z) e da questi, mediante regressione logistica, si sono ottenute le 15 coppie di parametri  $\sigma_0$  e m necessarie alla caratterizzazione meccanica degli stessi, come si può vedere in Figura 4.4.

Una volta ricavate le 15 coppie di parametri è possibile ottenere (vedi in Figura 4.5a e 4.5b) le 15 curve che rappresentano la probabilità di sopravvivenza  $P_s$  in funzione di  $\sigma$ .

Si ricordi che questa può assumere un valore compreso tra 0 e 1 e che  $\sigma_0$  è il valore per il quale questa probabilità vale 0,367.

Infine, dopo aver ricavato queste funzioni, è possibile caratterizzare i 5 differenti modelli scegliendo un valore fisso di  $P_s$  e valutare (Figura 4.6) i valori di  $\sigma$  che ottengono tale valore. In questo caso specifico si è scelto un valore pari a 0.9.

Come si vede dal grafico, il modello migliore sotto il profilo della resistenza a compressione è l'IWP mentre il peggiore è il Primitive, che risultava essere il peggiore pure riguardo la resistenza apparente a flessione, che si conferma il meno performante dei 5 analizzati. Il Nevius, che si era visto essere il modello sperimentale con il valore di resistenza apparente a flessione più alto in questa situazione viene superato dall'IWP ma rimane comunque il secondo miglior modello sperimentale. Lo seguono, in ordine, Gyroid e Diamond.

Di quasi tutti i modelli, tranne il peggiore, la direzione con i valori più bassi risulta essere la z mentre le altre due sono circa alla pari, con 3 modelli su 5 aventi come migliore direzione la y mentre 2 aventi la x.

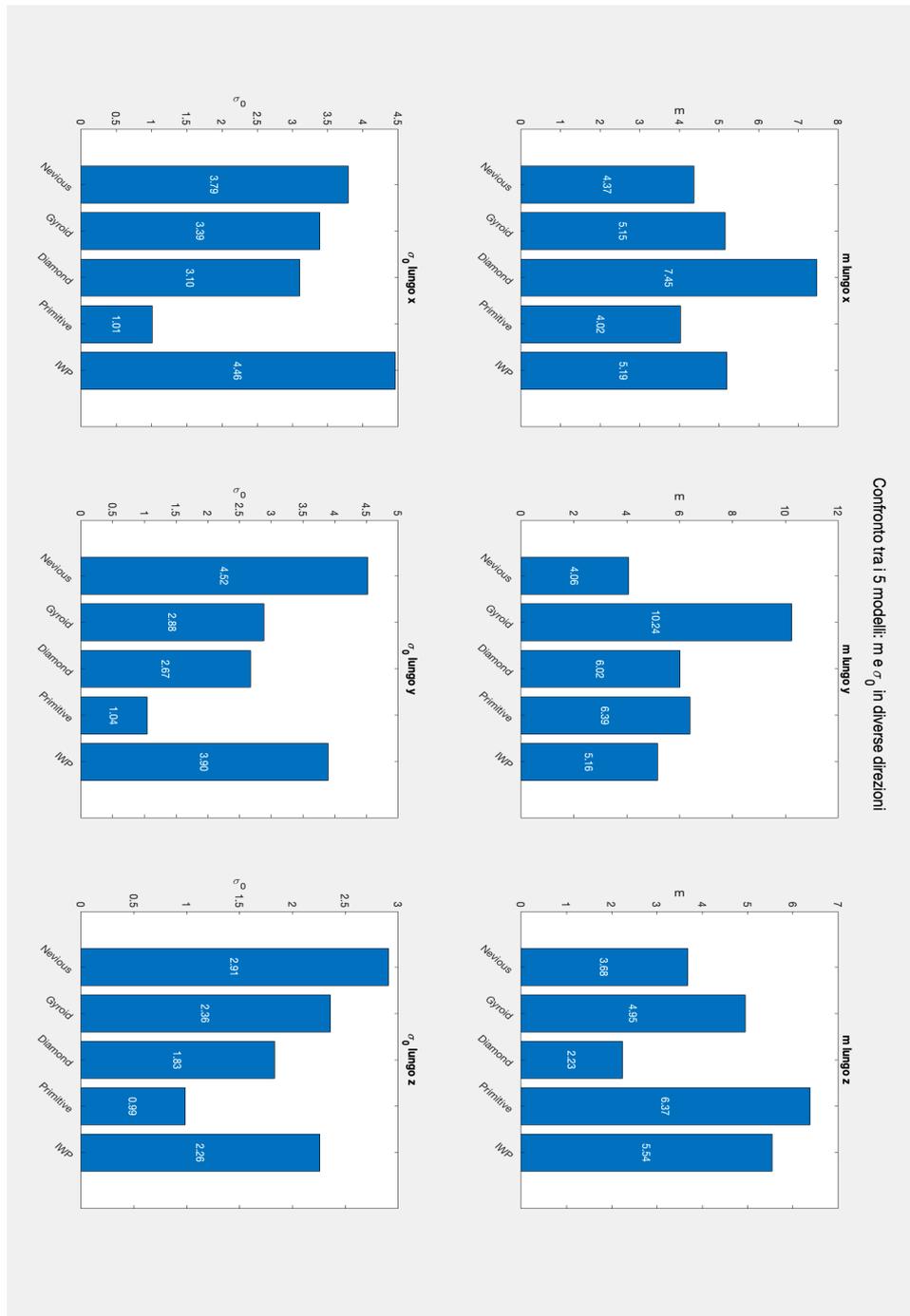


Fig. 4.4 Rappresentazione dei valori di  $\sigma_0$  e  $m$  per i 5 modelli in analisi e per ognuna delle tre direzioni principali

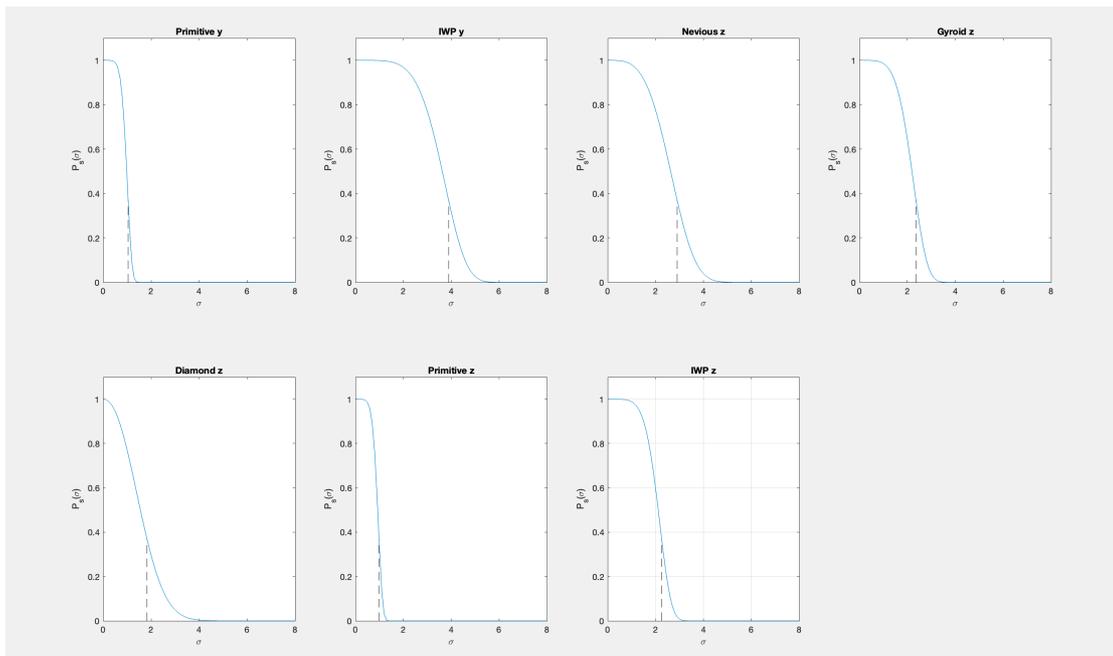
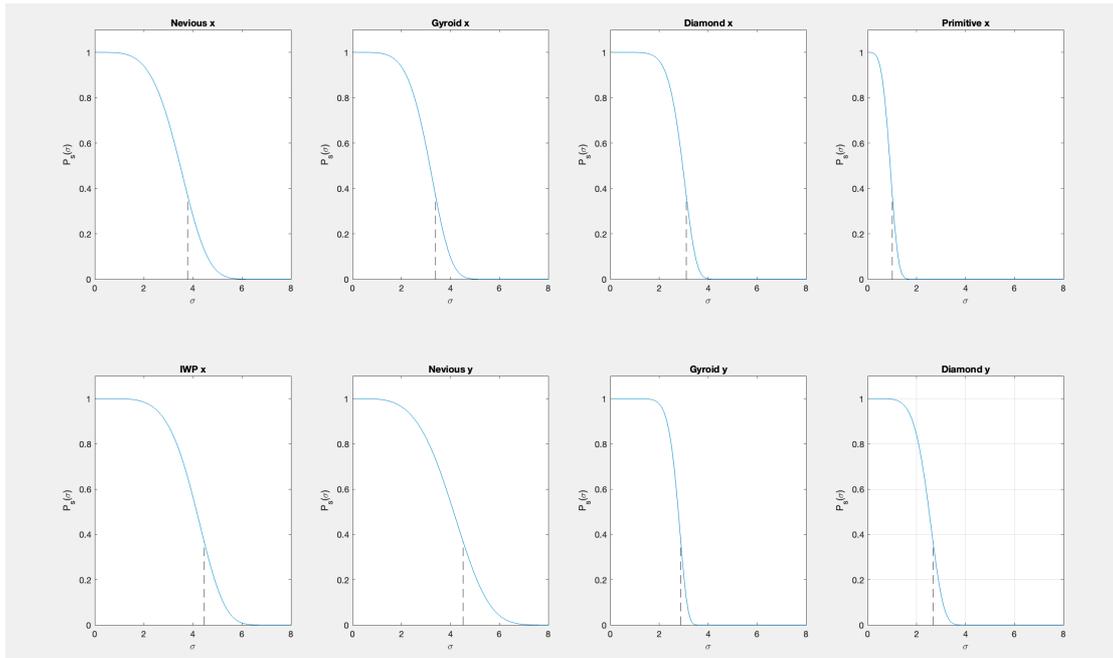


Fig 4.5a e Fig 4.5b Rappresentazione della probabilità di sopravvivenza per ogni modello e per ogni direzione principale. Per ogni funzione il valore specifico di  $\sigma_0$  è indicato con una linea tratteggiata

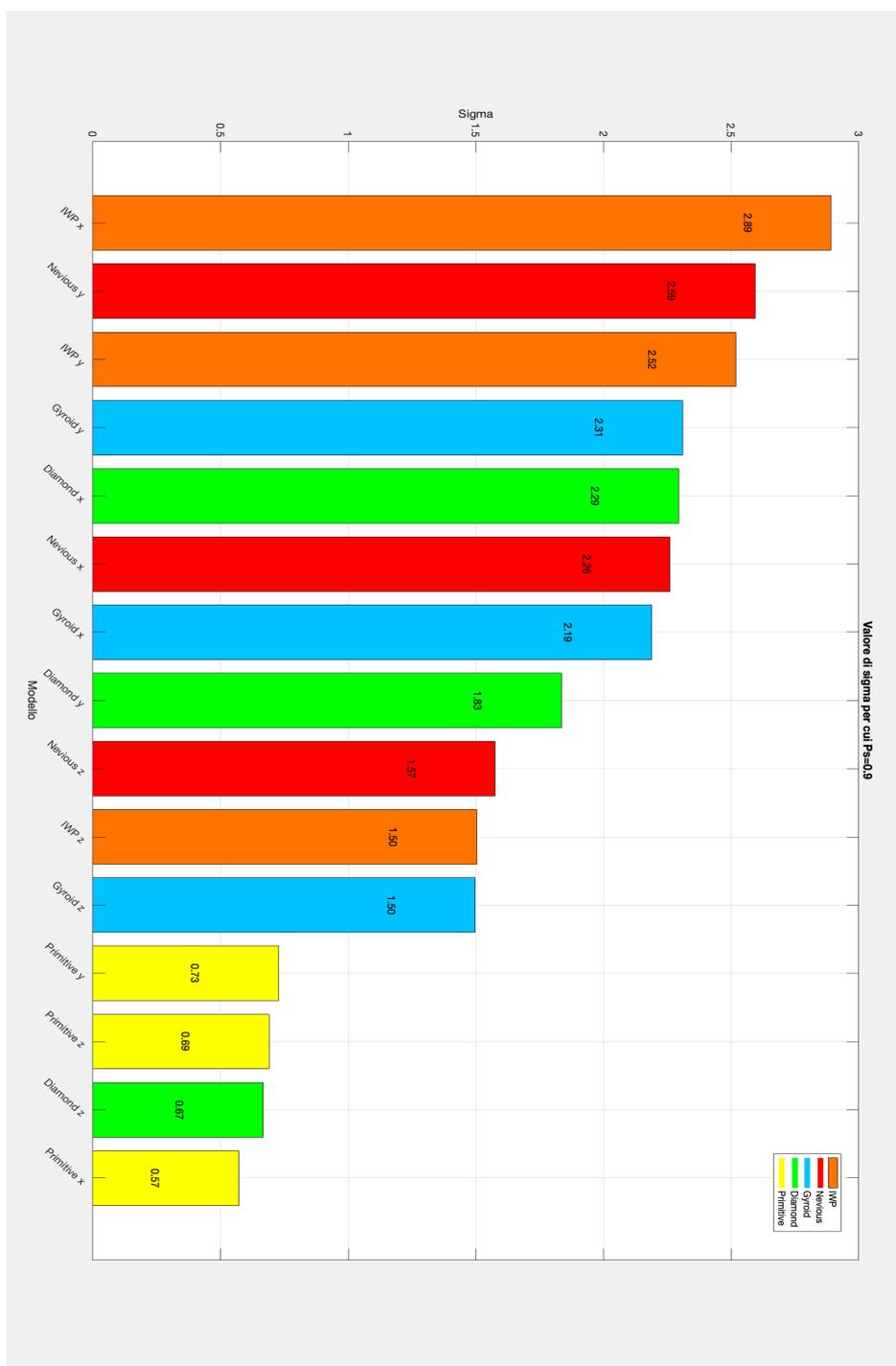


Fig 4.6 I valori di sigma sono stati ordinati in maniera decrescente, indicando, per comodità, l'appartenenza di ognuno al modello specifico

## CAPITOLO 5

### CONCLUSIONI

Milioni di persone ogni anno soffrono di specifiche patologie o traumi del tessuto osseo, casi nei quali l'unico trattamento possibile è il trapianto. Per sopperire alla domanda crescente di questo tessuto negli ultimi anni sono stati sviluppati diversi sostituti sintetici che simulano, per composizione, struttura e porosità l'osso naturale. Questi sostituti devono essere realizzati con materiali biocompatibili, biorassorbibili e bioattivi, e devono avere caratteristiche strutturali e meccaniche che favoriscano la rigenerazione e la deposizione di nuovo tessuto osseo. Le TPMS (Triply Periodical Minimal Structure) sono una classe di strutture reticolari che presentano una cella unitaria ripetuta nello spazio tridimensionale con curvatura media nulla in ogni punto locale. Queste particolari geometrie possiedono numerosi vantaggi: sono descritte da funzioni matematiche che possono quindi essere manipolate per modificarne la curvatura, le caratteristiche geometriche (dimensioni dei pori e spessore superficiale) e le proprietà fisiche (rapporto superficie-volume e densità). Presentano inoltre eccellenti proprietà meccaniche e ottima resistenza alla fatica. Queste strutture possono essere impiegate nella progettazione di innesti e scaffold per la rigenerazione del tessuto osseo grazie ai progressi ottenuti negli ultimi anni nelle tecniche di stampa 3D. Le potenzialità e le possibili applicazioni delle tecniche di additive manufacturing sono infatti sconfinite. Fra queste, la stereolitografia è quella che garantisce le migliori performance dal punto di vista della risoluzione e dell'accuratezza della stampa. Nell'ottica di una medicina sempre più paziente-specifica, cioè personalizzata sulle esigenze del singolo individuo, le tecniche di stampa 3D e la tissue engineering rappresentano un connubio vincente per la produzione di impianti e innesti. La possibilità di ottenere un modello di innesto totalmente su misura del paziente, basandosi sulle immagini tridimensionali raccolte con le comuni tecniche di imaging clinico e utilizzando un qualunque software di modellazione CAD, rappresenta un passo in avanti enorme in termini di riduzione dei costi e di aumento della precisione.

In questa tesi si sono analizzate le proprietà meccaniche di 5 diverse tipologie di scaffold TPMS (IWP, Neovius, Gyroid, Diamond e Primitive) stampate mediante Digital Light Processing. I parametri usati per questa valutazione sono stati due: la resistenza apparente a flessione, calcolata a partire da porosità e resistenza a compressione, secondo il modello di Gibson-Ashby e la probabilità di sopravvivenza secondo il modello di Weibull.

I modelli analizzati si sono rivelati meno performanti di quelli presenti in letteratura, con la sola eccezione dello scaffold Neovius iniziale che si è dimostrato avere

proprietà meccaniche simili a quelle degli scaffold teorici. Secondo il modello di Weibull invece il modello di Weibull invece il Neovius si classifica solamente al secondo posto, superato di poco dall'IWP. Seguono, con una differenza di performance non indifferente, Gyroid e Diamond mentre il modello Primitive si conferma il peggiore dei 5 modelli sperimentali anche sotto questo aspetto.

In vista di un futuro impiego delle TPMS per la produzione di scaffold destinati all'ingegneria tissutale dell'osso, è di fondamentale importanza studiare l'interazione tra le cellule e queste strutture in vitro. Come dimostrano numerosi studi in letteratura, queste particolari topologie sono in grado di favorire e stimolare l'adesione, la migrazione e la proliferazione cellulari permettendo quindi, una volta inserite in ambiente biologico, la rigenerazione del tessuto osseo nel sito dell'impianto. Studi futuri in vitro e in vivo più approfonditi e dettagliati chiariranno completamente il comportamento e le caratteristiche di queste strutture e ne valuteranno l'eventuale applicazione sicura ed efficace sull'uomo. Le prospettive future della bioingegneria nella rigenerazione del tessuto osseo sono rappresentate dal lavoro sinergico tra l'ingegneria dei materiali, le biotecnologie, la chimica e la medicina per migliorare e formulare soluzioni innovative che permettano, un giorno, di risolvere il problema della carenza di tessuto da donatore e che consentano la commercializzazione di sostituti ossei paziente-specifico più economici, veloci da produrre ed efficaci.

## CAPITOLO 6

### BIBLIOGRAFIA

- [1] P.A.Downey, M.I.Siegel, *Bone biology and the clinical implications for osteoporosis*, Pubmed, 2006
- [2] M.Capulli, N.Rucci, *Osteoblast and osteocyte: games without frontiers* ,Pubmed, 2014
- [3] T.A.Franz-Odendaal, P.E.Witten, *Buried alive: how osteoblasts become osteocytes*, Pubmed, 2006
- [4] F.Johannesdottir, M.L. Bouxsein, *Bone structure and biomechanics*, Encycl.Endocr.Dis, 2018
- [5] N.Takahashi, Y.Kobayashi, *Osteocalcins*, Princ.Bone Biol, 2019
- [6] R.Cancedda, *Cartilage and bone extracellular matrix*, Curr.Pharm.Des, 2009
- [7] J.A.Buckwalter, R.R.Cooper, *Bone biology*, J.Bone Jt.Surg, 1995
- [8] A.S. Mistry, A.G.Mikos, *Tissue engineering strategies for bone regeneration*, Adv.Biochem.Eng.Biotechnol, 2005
- [9] T.M.Keaveny, E.F.Morgan, *Biomechanics of trabecular bone*, Annu.Rev.Biomed.Eng, 2001
- [10] N.Rucci, *Molecular biology of bone remodelling*, Clin.Bone.Metab, 2008
- [11] H.Drissi, A.Sanjay, *The multifaced osteoclast: far and beyond bone resorption*, J.Cell.Biochem, 2016
- [12] L.J.Raggatt, N.C.Partridge, *Cellular and molecular mechanisms of bone remodelling*, J.Biol.Chem, 2010
- [13] J.B.Chang, J.C.Lee, *Circulating progenitor cells in regenerative technology*, Int.J.Stem Cell Res.Ther, 2016
- [14] A.Majidinia, B.Yousefi, *The role of signaling pathways in bone repair*, J.Cell.Physiol, 2018
- [15] R.Dimitrou, E.Jones, *Bone regeneration: current concepts and future directions*, BMC Med, 2011
- [16] A.Misaghi, A.Goldin, *Osteosarcoma: a comprehensive review*, SICOT-J, 2018
- [17] R.Rajani, C.P.Gibbs, *Treatment of bone tumors*, Surg.Pathol.Clin, 2012
- [18] S.Miwa, T.Shirai, *Risk factors for postoperative deep infection in bone tumors*, PLoS One, 2017
- [19] R.Kuehl, T.F.Moriarty, *Infection after fracture fixation: current surgical and microbiological concepts*, Injury, 2018
- [20] L.S.Jorge, A.G.Chueire, *Osteomyelitis: a current challenge*, Brazilian.J.Infect.Dis, 2010
- [21] A.Hasan, B.Byambaa, *Advances in osteobiologic materials for bone substitutes*, J.Tissue.Eng.Regen.Med, 2018

- [22] J.Fu, F.Jiawei, *Triply periodic minimal surface porous structures: from mutiscale design to multidisciplinary applications*, Int.J.Extrem.Manuf, 2022
- [23] G.Yang, L.Zhang, *3D printed scaffold and material selection for bone repair*, Acta Biomater, 2019
- [24] G.Savio, R.Meneghello, *Geometric modeling of cellular materials for additive manufacturing in biomedical field*, Appl Bionics Biomech, 2018
- [25] D.Montroni, D.Hao, *Direct ink write printing of chitin based gel fibers with customizable fibril alignment, porosity and mechanical properties for biomedical applications*, J Funct Biomater, 2022
- [26] T.Poltue, C.Karuna, *Design exploration of 3D printed TPMS scaffolds for bone implants*, International Journal of Mechanical Sciences, 2021
- [27] S.Xu, Y.Xiong, *Fabrication and biological evaluation of porous B-TCP bioceramics produced using digital light process*, Proc Inst Mech Eng H, 2022
- [28] Original Prusa SL1SSPEED 3DPrinter, Specifications: Technical Parameters and List of Features. <https://www.prusa3d.com/product/original-prusa-sl1s-speed-3d-printer/#specs>
- [29] P.Ozog, D.Galusek, *Engineering of silicone based blends for masked stereolithography of biosilicate/carbon composite scaffolds*, Journal of European Ceramic Society, 2022
- [30] D.J.Green, *An introduction of the mechanical properties of ceramics*, Cambridge University Press, 1998