

Strutture reticolari graduate in acciaio inossidabile 316L prodotte per costruzione additiva per applicazioni di ingegneria tissutale

M.L. Gatto, P. Mengucci, E. Santecchia, M. Cabibbo, S. Spigarelli, R. Groppo

L'impianto di scaffold è una pratica emergente nel trattamento della rigenerazione tissutale. Per permettere la ricrescita del tessuto osseo e il recupero delle sue funzionalità, lo scaffold deve essere biocompatibile e rispondere alle esigenze biomeccaniche dell'osso. Le geometrie reticolari graduate rappresentano una potenziale soluzione per soddisfare tali esigenze, poiché forniscono alla struttura un gradiente poroso adattativo, permettono di progettare il comportamento a deformazione dello scaffold e, a lungo termine, la sua vascolarizzazione. Le tecnologie di costruzione additiva sono adatte alla produzione di strutture reticolari graduate. In particolare, la tecnica di fusione a letto di polvere con sorgente laser permette di raggiungere un livello elevato di accuratezza anche in caso di pattern intricati e strutture micrometriche. Tra i vari metalli usati per la rigenerazione del tessuto osseo, la soluzione con maggior costo-efficacia per impianti a breve termine è l'acciaio inossidabile 316L, ampiamente usato nella sostituzione della coppa acetabolare nell'articolazione dell'anca, piastre e viti e innesti orali. In questo lavoro, scaffold ossei con due differenti reticoli graduati sono stati prodotti in 316L tramite fusione a letto di polvere. Le prestazioni biomeccaniche delle impalcature sono state valutate sperimentalmente e i risultati sono stati correlati alla micro e macro struttura degli scaffold. I risultati hanno evidenziato che geometrie reticolari graduate permettono di progettare il comportamento meccanico e biologico di scaffold per applicazioni tissutali ossee.

PAROLE CHIAVE: COSTRUZIONE ADDITIVA; SCAFFOLD RETICOLARI GRADUATI;
ACCIAIO INOSSIDABILE; TESSUTO OSSEO

INTRODUZIONE

Le tecnologie di costruzione additiva per la produzione di dispositivi biomedicali in 316L potrebbero mitigare il rischio di fallimento dell'impianto, migliorando il comportamento a corrosione del biomateriale. Infatti il 316L prodotto additivamente ha dimostrato una biocompatibilità superiore in ambienti biologici aggressivi rispetto al 316L forgiato [1]. In particolare, l'elevata resistenza alla corrosione del campione prodotto da fusione a letto di polvere con sorgente laser ha limitato il rilascio di ioni tossici nell'ambiente biologico, con conseguente miglioramento della vitalità e proliferazione delle cellule pre-osteoblastiche, come studiato da Al-Mamun et al. [1]. Inoltre, Kong et al. [2] hanno riscontrato un aumento della concentrazione e della proliferazione

M.L. Gatto, P. Mengucci, E. Santecchia,
M. Cabibbo, S. Spigarelli

Università Politecnica delle Marche

R. Groppo

3D4MEC S.r.l, Sasso Marconi

cellulare in corrispondenza dell'aumento della potenza laser e, a circa 200 W, i campioni hanno mostrato una biocompatibilità notevolmente superiore rispetto al 316L lavorato con tecniche tradizionali.

In strutture reticolari graduate, la gradazione funzionale (variazione delle dimensioni, della tipologia, del materiale o del diametro dello strut) consente di progettare il meccanismo di rottura dello scaffold, attraverso il controllo della densità relativa locale delle cellule unitarie. In questo modo, il riempimento graduato consente di progettare un impianto ortopedico con una rigidità localmente corrispondente a quella dell'osso target [3]. Lo scopo di questo studio è progettare il comportamento meccanico e biologico di scaffold in acciaio inossidabile 316L prodotti mediante fusione a letto di polvere con sorgente laser, per applicazioni cliniche a breve termine.

MATERIALI E METODI

Le geometrie degli scaffold a reticolo graduato dense-in e dense-out sono state progettate con Autodesk Netfabb (Inc., San Rafael, CA) e riportate in Figura 1. Gli scaffold cubici con lato di 10 mm, sono stati ottenuti ripetendo nello spazio una cella elementare dodecaedrica rombica. La struttura graduata è stata ottenuta variando le dimensioni degli strut della cella elementare strato per strato lungo la direzione di costruzione (Figura 1). Sono stati utilizzati valori di spessore degli strut compresi tra 0.25 e 0.75 mm, con un passo di 0.25 mm. Nella geometria dense-in le dimensioni degli strut diminuiscono dal centro al bordo, mentre nella geometria dense-out le dimensioni degli strut aumentano dal centro al bordo (Figura 1). Entrambe le geometrie sono state costruite con simmetria speculare rispetto all'asse orizzontale centrale, quindi gli scaffold sono composti da un totale di cinque strati, come osservabile in Figura 1.

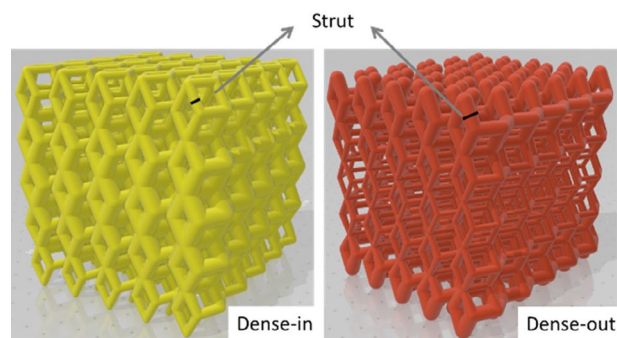


Fig.1 - Illustrazione degli scaffold reticolari graduati con geometria dense-in e dense-out / Schematics of dense-in and dense-out graded lattice scaffold geometries.

La porosità totale degli scaffold dense-in e dense-out ricavata dal file STL è rispettivamente del 58% e del 72%. Gli scaffold sono stati realizzati a partire da polvere di acciaio inossidabile 316L (LPV CARPENTER technology) mediante fusione a letto di polvere con sorgente laser, con un sistema 3D4steel (3D4Mec Srl, Sasso Marconi, Italia), utilizzando parametri di stampa ottimizzati all'interno delle finestre operative di seguito riportate: Potenza laser 200 – 270 W, Velocità di scansione 400 – 1000 mm/s, Distanza di hatching 0.10 - 0.14 mm, Spessore dello strato 0.02 - 0.06 mm.

La caratterizzazione strutturale e meccanica degli scaffold è stata eseguita mediante tecniche di microscopia elettronica a scansione, spettroscopia a dispersione

di energia, diffrazione di raggi X, micro-tomografia computerizzata a raggi X e test meccanici a compressione. Le prestazioni biologiche degli scaffold sono state testate mediante vitalità di cellule di osteosarcoma umano MG-63 a 24 ore e 7 giorni di incubazione, con saggio MTT.

RISULTATI E DISCUSSIONE

La composizione chimica della polvere e degli scaffold dense-in e dense-out, valutata tramite spettroscopia a dispersione di energia, è comparata in Tabella 1. Gli scaffold mostrano un lieve aumento di manganese e silicio rispetto alla polvere, mentre la quantità di cromo e molibdeno (stabilizzatori della ferrite) e nichel (stabilizzatori dell'austenite) rimane pressoché invariata.

Tale fenomeno è noto e Salman et al. [4] concludono che l'acciaio inossidabile 316L prodotto per fusione a letto di polvere con sorgente laser, contenga nano-precipitati amorfi sferici ricchi di Mn-Si.

Tab.1 - Composizione chimica (% in peso) della polvere e degli scaffold reticolari graduati dense-in e dense-out, valutata mediante spettroscopia a dispersione di energia. / Experimental chemical composition (wt.%) from energy dispersive spectroscopy of raw powder, dense-in and dense-out graded lattice scaffolds.

Campione/Elemento	Cr (% in peso)	Mn (% in peso)	Mo (% in peso)	Ni (% in peso)	Si (% in peso)	Fe
Polvere	17.7 ± 0.2	1.6 ± 0.2	2.30 ± 0.03	12.0 ± 0.3	0.74 ± 0.05	Bilanciato
Dense-in	17.7 ± 0.2	2.5 ± 0.4	2.0 ± 0.2	12.1 ± 0.1	1.3 ± 0.4	
Dense-out	18.0 ± 0.5	2.3 ± 0.5	2.1 ± 0.2	11.9 ± 0.2	1.5 ± 0.5	

I diffrattogrammi degli scaffold dense-in e dense-out sono riportati in Figura 2 insieme al pattern di diffrazione della polvere, per comparazione. In Figura 2 i pattern sono graficati nell'intervallo angolare $2\theta = 35^\circ - 80^\circ$ in scala di radice quadrata dell'intensità ($[Intensità]^{1/2}$). I

risultati mostrano chiaramente la presenza di α -Fe (ferrite) solo nella polvere, mentre gli scaffold sono interamente formati da γ -Fe (austenite). Dall'analisi Rietveld eseguita con il software MAUD, la quantità di α -Fe (ferrite) stimata nella polvere è circa il 3% in peso.

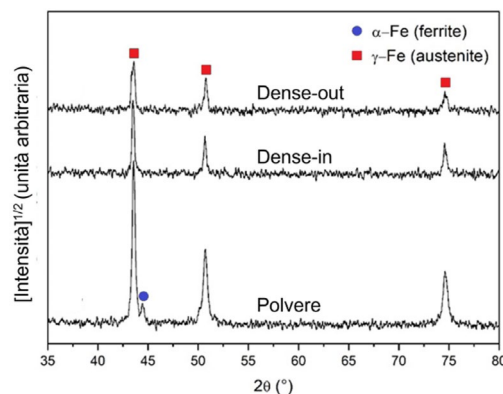


Fig.2 - Pattern di diffrazione dei raggi X di polvere e scaffold reticolari graduati dense-in e dense-out. / X-rays diffraction patterns of powder, dense-in and dense-out graded lattice scaffolds.

I parametri morfometrici degli scaffold, come porosità chiusa e aperta, ottenuti dall'analisi micro-tomografica a raggi X, sono elencati in Tabella 2. La micro-porosità all'interno del materiale bulk è responsabile della porosità chiusa, che a sua volta determina la densità del materiale. D'altra parte i macro-pori sono legati alla geometria della cella elementare unitaria e costituiscono la porosità aperta [5]. Quindi, mentre la porosità aperta è determinata dal design della cella elementare unitaria, la porosità chiusa è influenzata dai parametri di stampa e dal rate di raffreddamento durante il processo produttivo.

Il mismatch tra i valori di porosità forniti dal file STL e quelli sperimentali della geometria dense-in sono dovuti principalmente alla presenza di polvere residua rimasta intrappolata nel centro dello scaffold durante il processo produttivo.

I valori di porosità chiusa di entrambe le geometrie confermano che l'ottimizzazione dei parametri di stampa ha permesso la realizzazione di strutture pienamente dense.

Tab.2 - Parametri morfometrici degli scaffold, ottenuti tramite analisi micro-tomografica a raggi X. / Scaffold morphometric parameters obtained from X-rays micro-computed tomography analysis.

Parametro	Dense-in	Dense-out
Porosità chiusa [%]	0.3	0.2
Porosità aperta [%]	50	71

Le prestazioni meccaniche a compressione degli scaffold reticolari graduati dense-in e dense-out sono illustrate in Figura 3 come carico su deformazione a compressione. Come evidenziato in Figura 3, il comportamento meccanico degli scaffold può essere descritto da 4 regimi: regime lineare elastico, plateau, regime plastico e densificazione. Le osservazioni al microscopio elettronico a scansione dopo le prove di compressione sono mostrate in Figura 3. I risultati meccanici mostrano che la deformazione plastica di dense-in e dense-out coinvolge inizialmente le celle elementari con spessore degli strut più sottili (0.25 mm), a causa dell'elevata concentrazione degli stress sulle giunzioni degli strut [6]. Questo significa che nella geometria dense-in la deformazione plastica a seguito della compattazione delle celle, avviene negli strati più esterni di entrambi i lati dello scaffold. Al contrario, nella

geometria dense-out, la deformazione e la compattazione riguardano le celle all'interno dello scaffold con spessore degli strut inferiore.

A prescindere dalla geometria, l'assenza di oscillazioni nelle curve di compressione suggerisce che quando gli strut più sottili raggiungono la fase di densificazione, gli strut più spessi sono ancora in regime di plateau; pertanto differenti meccanismi di deformazione sono attivi simultaneamente durante la compressione di strutture reticolari graduate.

La massima resistenza a compressione risulta 255 ± 15 MPa per la geometria dense-in e 80 ± 6 MPa per dense-out; tale valore è prossimo al valore sperimentale dell'osso corticale [7].

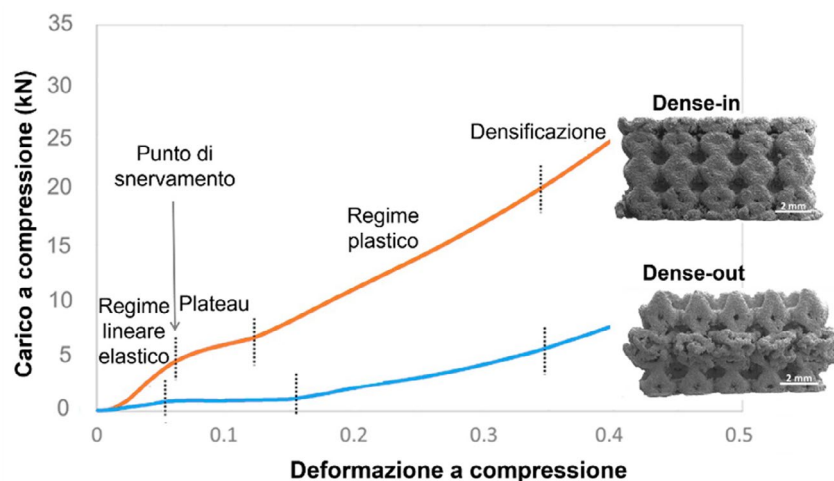


Fig.3 - Comportamento meccanico a compressione degli scaffold reticolari graduati dense-in (curva arancione) e dense-out (curva celeste). Quattro diversi regimi meccanici sono indicati nelle curve. Immagini al microscopio elettronico a scansione dopo il test di compressione sono riportate per gli scaffold dense-in e dense-out. / Mechanical behavior under compression of dense-in (orange) and dense-out (light blue) graded lattice scaffolds. Four different mechanical regimes are indicated in the curves. Scanning electron microscope images of scaffolds after compression test are reported for both the scaffold geometries.

A seguito della semina cellulare, la vitalità cellulare è stata investigata dopo 24 ore e 7 giorni di coltura sugli scaffold dense-in e dense-out (Figura 4). A 24 ore non si rilevano differenze significative tra gli scaffold, mentre dopo 7

giorni di incubazione, un maggiore livello di vitalità è individuato nella geometria dense-out, dove le cellule risultano metabolicamente più attive.

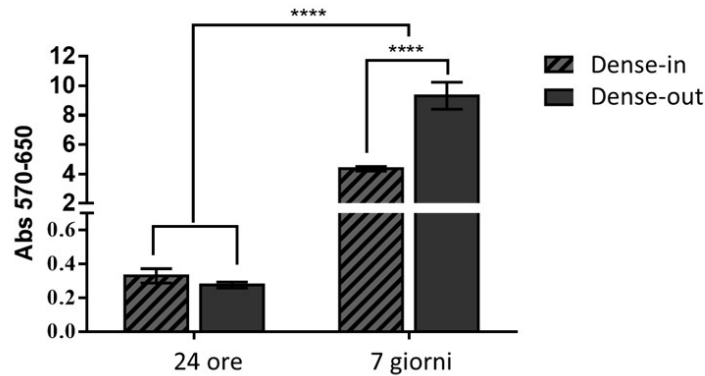


Fig.4 - Test di vitalità cellulare a 24 ore e 7 giorni sugli scaffold reticolari graduati dense-in e dense-out. / Viability of cells seeded on dense-in and dense-out graded lattice scaffolds after 24 hours and 7 days of incubation.

CONCLUSIONI

Allo scopo di studiare la progettazione di scaffold con migliori prestazioni biomeccaniche per la rigenerazione del tessuto osseo, sono state prodotte due diverse strutture reticolari graduate in acciaio inossidabile 316L mediante fusione a letto di polvere con sorgente laser. Variando strato per strato la dimensione degli strut della cella elementare rombica dodecaedrica nella direzione di costruzione, sono stati prodotti scaffold con geometria dense-in e dense-out. La dimensione degli strut decresce in dense-in e aumentata in dense-out dal centro al bordo, con simmetria speculare rispetto allo strato centrale. È stata eseguita una caratterizzazione strutturale e meccanica e una validazione biologica degli scaffold e i risultati principali possono essere riassunti come segue:

- La fusione a letto di polvere con sorgente laser è una tecnologia adatta alla produzione di strutture reticolari graduate con un elevato livello di precisione.
- Le prove di compressione hanno evidenziato che la deformazione plastica nei reticoli graduati coinvolge in primo luogo gli strut di dimensioni minori. Pertanto, la sequenza temporale della deformazione subisce uno shift dipendente delle dimensioni dei strut.

Gli strut più sottili raggiungono la densificazione quando quelli più spessi risultano ancora in regime di plateau, determinando così il diverso comportamento meccanico dei reticoli graduati dense-in e dense-out. La geometria dense-out mostra proprietà meccaniche vicine all'osso corticale;

- La validazione biologica dopo 24 ore e 7 giorni di incubazione mostra che la geometria dense-out migliora la proliferazione cellulare rispetto a dense-in. Questo effetto è dovuto principalmente alla maggiore dimensione dei pori nel centro della struttura 3D, che facilita la diffusione di nutrienti e ossigeno alle cellule. In conclusione, grazie soprattutto alle proprietà biologiche e meccaniche, gli scaffold reticolari graduati in acciaio inossidabile 316L, possono essere considerati per la rigenerazione del tessuto osseo. È possibile migliorare le prestazioni biomeccaniche degli scaffold controllando adeguatamente i parametri di produzione nel processo di fusione a letto di polvere con sorgente laser e la geometria delle celle elementari delle strutture graduate.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Al-Mamun, N. S., Deen, K. M., Haider, W., Asselin, E., & Shabib, I. (2020). Corrosion behavior and biocompatibility of additively manufactured 316L stainless steel in a physiological environment: The effect of citrate ions. *Additive Manufacturing*, 34, 101237.
- [2] Kong, D., Ni, X., Dong, C., Lei, X., Zhang, L., Man, C., ... & Li, X. (2018). Bio-functional and anti-corrosive 3D printing 316L stainless steel fabricated by selective laser melting. *Materials & Design*, 152, 88-101.
- [3] Al-Ketan, O. (2021). Programmed Plastic Deformation in Mathematically-Designed Architected Cellular Materials. *Metals*, 11(10), 1622.
- [4] Salman, O. O., Gammer, C., Chaubey, A. K., Eckert, J., & Scudino, S. (2019). Effect of heat treatment on microstructure and mechanical properties of 316L steel synthesized by selective laser melting. *Materials Science and Engineering: A*, 748, 205-212.
- [5] Gatto, M. L., Furlani, M., Giuliani, A., Bloise, N., Fassina, L., Visai, L., & Mengucci, P. (2021). Biomechanical performances of PCL/HA micro-and macro-porous lattice scaffolds fabricated via laser powder bed fusion for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 128, 112300.
- [6] Onal, E., Frith, J. E., Jurg, M., Wu, X., & Molotnikov, A. (2018). Mechanical properties and in vitro behavior of additively manufactured and functionally graded Ti6Al4V porous scaffolds. *Metals*, 8(4), 200.
- [7] Gatto, M. L., Groppo, R., Bloise, N., Fassina, L., Visai, L., Galati, M., Iuliano, L., & Mengucci, P. (2021). Topological, Mechanical and Biological Properties of Ti6Al4V Scaffolds for Bone Tissue Regeneration Fabricated with Reused Powders via Electron Beam Melting. *Materials*, 14(1), 224.

Graded lattice scaffolds in 316L stainless steel by additive manufacturing for tissue engineering

Scaffold implantation is an emerging practice in tissue regeneration field. Scaffold must be biocompatible and meet the biomechanical requirements of bone, for allowing tissue regrowth and recovery of its functionalities. Graded lattice geometry is a potential solution to fulfill these needs, since it provides an adaptive porous gradient, allowing the designing of scaffold deformation behavior and, in long term, its vascularization. Additive manufacturing technologies are suitable for the production of graded lattice scaffold. In particular, laser powder bed fusion technique permits to achieve a high level of accuracy, even in the case of intricate patterns and micro-architectures. Among the various metals used for bone tissue regeneration, the most cost-effective solution for short-term implants is 316L stainless steel, which is widely used in acetabular cup replacement in the hip joint, plates and screws, and oral grafts. In this work, bone scaffolds with two different graded lattice geometries were fabricated in 316L by laser powder bed fusion technology. The biomechanical performances of scaffolds were experimentally evaluated, and the results were correlated with the micro and macro structure of the scaffolds. The results showed that graded lattice geometries allow designing the mechanical and biological behavior of scaffolds for bone tissue applications.

KEYWORDS: ADDITIVE MANUFACTURING; GRADED LATTICE SCAFFOLD;
STAINLESS STEEL; BONE TISSUE

[TORNA ALL'INDICE >](#)