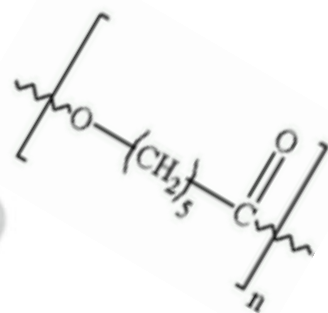
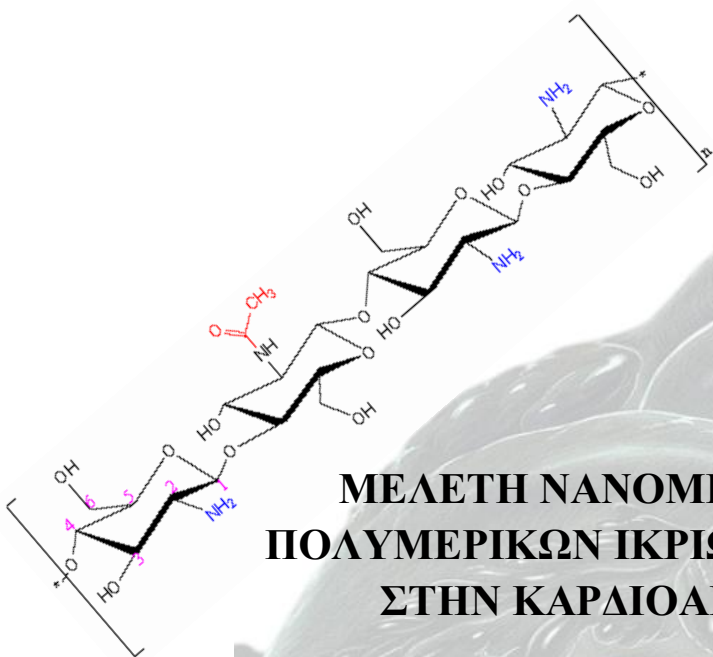




ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

**ΤΟΜΕΑΣ ΙΙΙ: ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΙΚΗ
ΤΩΝ ΥΛΙΚΩΝ**



**ΜΕΛΕΤΗ ΝΑΝΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ
ΠΟΛΥΜΕΡΙΚΩΝ ΙΚΡΙΩΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ
ΣΤΗΝ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΗ ΑΝΑΠΛΑΣΗ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ονοματεπώνυμο φοιτήτριας: ΘΛΙΒΙΤΗ ΒΑΡΒΑΡΑ

Επιβλέπων: ΧΑΡΙΤΙΔΗΣ Α. ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ,

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Ε.Μ.Π.

ΑΘΗΝΑ

2013



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

**ΤΟΜΕΑΣ ΙΙΙ: ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΩΝ
ΥΛΙΚΩΝ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΝΑΝΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ
ΠΟΛΥΜΕΡΙΚΩΝ ΙΚΡΙΩΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ
ΣΤΗΝ ΚΑΡΔΙΟΑΓΓΕΙΑΚΗ ΑΝΑΠΛΑΣΗ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΒΑΡΒΑΡΑΣ ΘΛΙΒΙΤΗ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Κ.Α. ΧΑΡΙΤΙΔΗΣ, Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Α. ΖΟΥΜΠΟΥΛΑΚΗΣ, Επικ. Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Π. ΤΑΡΑΝΤΙΑΝΗ, Επικ. Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

ΑΘΗΝΑ, ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ 2013

Σε Εκείνον που τα γνωρίζει όλα...

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία με τίτλο «Μελέτη νανομηχανικών ιδιοτήτων πολυμερικών ικτιωμάτων για εφαρμογές στην καρδιοαγγειακή ανάπλαση» εκπονήθηκε στη Σχολή Χημικών Μηχανικών (Ε.Μ.Π.) στην Εργαστηριακή Μονάδα Νανομηχανικής και Νανοτεχνολογίας του Τομέα Επιστήμης και Τεχνικής των Υλικών.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον επιβλέποντα καθηγητή της Σχολής Χημικών Μηχανικών κ. Κ.Α. Χαριτίδη, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το θέμα αυτό καθώς και για τη συνεχή επίβλεψη και στήριξή του.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την υποψήφια διδάκτορα Α. Σκαρμούτσου, για τη βοήθεια της στην πραγματοποίηση των πειραματικών μετρήσεων, τις πολύτιμες παρατηρήσεις της καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας και για τη συνεχή στήριξη και ενθάρρυνση της.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τις κα Μ. Βαμβακάκη και κα Μ. Χατζηνικολαΐδου (Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Υλικών - Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ινστιτούτο Ηλεκτρονικής Δομής & Λείζερ – Ίδρυμα Τεχνολογίας & Έρευνας) για τη συνεργασία και την προετοιμασία των δειγμάτων.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου Αναστασία και Κωνσταντίνο και τα αδέρφια μου Αλεξάνδρα, Παντελή και Ιωσήφ για την αμέριστη και ανιδιοτελή στήριξή τους, την υπομονή και αγάπη τους, που ο καθένας ξεχωριστά με βοήθησε να ωριμάσω ως άνθρωπος και επιστήμονας, δίνοντας μου δύναμη να πραγματοποιήσω τους στόχους μου. Καθώς επίσης και τις φίλες μου Ελένη, Εύη, Μαρία που βρίσκονταν στο πλευρό μου τα πέντε χρόνια φοίτησής μου, κάνοντας ευχαρίστες τις σπουδές μου αλλά και δίνοντας μου τη δυνατότητα, μέσα από τις πολλές συνεργασίες που είχαμε, να εκφραστώ και να αναπτύξω ικανότητες οι οποίες θα είναι εφόδια για το επαγγελματικό μου μέλλον, αλλά και για τη ζωή γενικότερα.

Σας ευχαριστώ

Βαρβάρα

Περίληψη

Η ανάγκη για την αντιμετώπιση ιατρικών προβλημάτων του ανθρώπου που σχετίζονται με την ανεπάρκεια ή και τη μη σωστή λειτουργία ιστών και οργάνων, οδήγησε στην **ανάγκη παραγωγής ιστών**, με την οποία ασχολείται το πεδίο της Ιστικής Μηχανικής. Για την παραγωγή των ιστών απαραίτητη είναι η **χρήση των ικριωμάτων**, πάνω στα οποία αναπτύσσονται τα κύτταρα. Το ικρίωμα θα πρέπει να έχει συγκεκριμένες ιδιότητες όπως είναι για παράδειγμα η βιοσυμβατότητα και η βιοαποικοδομησιμότητα. Οι ιδιότητες των ικριωμάτων εξαρτώνται από το βιοϋλικό που θα χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή τους καθώς και από τα χαρακτηριστικά της κατασκευής τους, όπως είναι το πορώδες. Αυτές οι ιδιότητες επηρεάζουν τη διαφοροποίηση των κυττάρων και τη διαμόρφωση του ιστού στη δομή του ικριώματος. **Ο ιστός που αναπτύσσεται τελικά επηρεάζεται από τις μηχανικές ιδιότητες του ικριώματος** όπου εναποτίθενται ο κυτταρικός πληθυσμός. Στην εργασία αυτή μελετώνται οι νανομηχανικές ιδιότητες του ικριώματος το οποίο είναι κατασκευασμένο από το **συμπολυμερές χιτοζάνης και πολυκαπρολακτόνης**, και έχει δείξει αρχικές θετικές ενδείξεις για την ανάπτυξη ιστού του μυοκαρδίου. Για την καλύτερη κατανόηση των ιδιοτήτων του μελετώνται παράλληλα και δισκία των πολυμερών χιτοζάνης και πολυκαπρολακτόνης.

Παρουσιάζονται οι **τιμές σκληρότητας και σύνθετου μέτρου ελαστικότητας** των δειγμάτων καθώς επίσης μελετάται η **χρονοεξαρτώμενη και ιξωδοελαστική συμπεριφορά** τους. Στη συνέχεια στο δείγμα συμπολυμερούς όπως παράχθηκε και σε δείγματα του συμπολυμερούς τα οποία είχαν εμβαπτισθεί για 6 εβδομάδες σε ρυθμιστικό φωσφορικό διάλυμα, πραγματοποιήθηκαν **δοκιμές επαναλαμβανόμενων κύκλων φόρτισης** που προσομοιάζουν τη δοκιμή κόπωσης και διαχωρίζουν την ιξώδη από την ελαστική και πλαστική παραμόρφωση. Έπειτα ακολούθησε **εμβάπτιση** του δείγματος του συμπολυμερούς και των πολυμερών σε θρεπτικό μέσο α -MEM για 4 εβδομάδες, προσομοιάζοντας έτσι τον ανθρώπινο οργανισμό. Πραγματοποιήθηκαν δοκιμές ανά συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα για τον υπολογισμό της σκληρότητας και του σύνθετου μέτρου ελαστικότητας, κατά τη διάρκεια αποδόμησης των υλικών. Το συμπολυμερές παρουσίασε **απότομη μείωση των μηχανικών ιδιοτήτων** του από την αρχή της εμβάπτισης, **πλησιάζοντας** όμως έτσι, τις **επιδιωκόμενες τιμές** και παρουσίασε **σταθερότητα υπό την επιβολή φορτίων**.

Abstract

Tissue loss or organ failure is a major health care problem which has resulted in the need of tissue replacement, which is the task of Tissue Engineering. For the production of tissue, the use of scaffolds is necessary, onto which the cells are grown. The scaffolds should have specific properties such as biocompatibility and biodegradability. The properties of the scaffolds depend on the biomaterial that is used for their production and the characteristics of their construction, such as their porosity. The cellular differentiation and the formation of the tissue which is developed on the scaffold are affected by the properties of the scaffold. Consequently, the tissue that eventually grows is affected by the mechanical properties of the scaffold on which cell population is seeded. In the present thesis, the nanomechanical properties of innovative chitosan-grafted-poly(ϵ -caprolactone) scaffold, which has shown initial positive indications for the development of myocardial tissue, is studied. Meanwhile, the properties of chitosan and poly(ϵ -caprolactone) samples are studied in order to understand better the properties of the grafted copolymer.

Hardness and reduced modulus of all samples are presented, as well as it is studied their time-dependent and viscous behavior. Then, additional experiments under different dynamic conditions for the grafted copolymer as synthesized and after submersion in phosphate buffer saline under static and stirring conditions for six weeks, were performed in order to mimic fatigue test, and separate the viscous response from the elastic and plastic deformation. Finally, the sample of grafted copolymer and the samples of chitosan and poly(ϵ -caprolactone) were submerged in α -MEM buffer for four weeks at 37°C and nanoindentation tests were performed in specific times, -in order to estimate the values of hardness and reduced modulus during the degradation of the materials. In conclusion, the grafted copolymer presented a sharp decrease of its mechanical properties in the first hours of submersion, but after four weeks of degradation it revealed sufficient stability under mechanical stresses and elastic properties close to the intended ones.

Πίνακας περιεχομένων

ΕΞΩΦΥΛΛΟ (*σημείωση για την εικόνα που χρησιμοποιείται: Patrick J. Lynch, ιατρικός εικονογράφος και C. Carl Jaffe, MD, καρδιολόγος).....	1
Πίνακας αντιστοίχισης αγγλικής-ελληνικής ορολογίας και των συντομεύσεων που χρησιμοποιούνται στην εργασία.....	9
Ευρετήριο διαγραμμάτων.....	10
Κεφάλαιο 1. Θεωρητικό Μέρος.....	11
1.1. Ιστική Μηχανική.....	11
1.1.1 Γενικά για την ιστική μηχανική (<i>Tissue Engineering</i>).....	11
1.1.2 Ιδιότητες ικτριωμάτων.....	13
1.1.3 Υλικά Ικτριωμάτων.....	14
1.1.4 Πώς κατασκευάζονται τα ικτριώματα.....	16
1.1.4.1 Διαχωρισμός φάσεων.....	16
1.1.4.2 Απομάκρυνση σωματιδίων (<i>Particulate leaching</i>).....	17
1.1.4.3 Ξήρανση με κατάψυξη - λυοφιλίωση (<i>Freeze drying</i>).....	18
1.1.4.4 Αφρισμός με χρήση αερίου.....	18
1.1.4.5 Ηλεκτροστατική Εναπόθεση (<i>Electrospinning</i>).....	18
1.1.4.6 Ταχεία προτυποποίηση (<i>rapid prototyping</i>).....	19
1.2. Πολυμερή: Χιτοζάνη, Πολυκαπρολακτόνη και το συμπολυμέρες τους.....	19
1.2.1. Χιτοζάνη (<i>chitosan</i>).....	19
1.2.2. Πολυκαπρολακτόνη (<i>poly(ε-caprolactone)</i>).....	20
1.2.3. Συμπολυμερές (<i>chitosan-graft- poly(ε-caprolactone)</i>).....	21
1.3. Νανοδιείσδυση.....	21
1.3.1. Τα πλεονεκτήματα της νανοδιείσδυσης.....	21
1.3.2. Βασικές αρχές και μεγέθη της νανοδιείσδυσης.....	22
1.3.3. Υπολογισμός σκληρότητας και μέτρου ελαστικότητας – Θεωρία <i>Oliver-Pharr</i>	24
1.3.4. Ακίδες – Επιφάνεια επαφής <i>A</i>	25
1.3.5. Παράγοντες που επηρεάζουν τα αποτελέσματα της νανοδιείσδυσης.....	27
1.3.5.1. Ιδιαιτερότητες των πολυμερών.....	29
Κεφάλαιο 2. Πειραματικό μέρος.....	32
2.1 Δοκίμια.....	32
2.1.1 Υλικά.....	32
2.1.2 Σύνθεση/Παρασκευή δοκιμίων.....	32
2.2 Νανοδιείσδυση.....	34
Κεφάλαιο 3. Παρουσίαση και Συζήτηση Πειραματικών Αποτελεσμάτων... 36	
3.1 Αποτελέσματα Σκληρότητας (<i>H</i>) και Σύνθετου Μέτρου Ελαστικότητας (<i>E_f</i>) .36	

3.2 Καμπύλες φόρτισης αποφόρτισης.....	37
3.3 Ερπυσμός.....	40
3.4 Σύγκριση δειγμάτων μετά από εμβάπτιση σε θρεπτικό υλικό για 6 εβδομάδες (μετά από ξήρανση).....	43
3.5 Σύγκριση δειγμάτων μετά από εμβάπτιση σε θρεπτικό υλικό για 4 εβδομάδες (με περιεχόμενη υγρασία).....	47
Κεφάλαιο 4. Συμπεράσματα.....	51
Βιβλιογραφία	53

Πίνακας αντιστοίχισης αγγλικής-ελληνικής ορολογίας και των συντομεύσεων που χρησιμοποιούνται στην εργασία

Αγγλική ονομασία	Ελληνική ονομασία	Συμβολισμός/ Συντόμευση
ε-Caprolactone	ε-Καπρολακτόνη	ε-CL
Poly(ε-caprolactone) / polycaprolactone	Πολυκαπρολακτόνη	PCL
Chitosan	Χιτοζάνη	CS
Chitosan-graft-poly(ε-caprolactone)	Συμπολυμερές των CS και PCL	CS-g-PCL
Tin(II) 2-ethylhexanoate / stannous 2- ethyl-hexanoate	2-αιθυλ-εξανοϊκό κασσίτερο (II)	Sn(Oct) ₂
Glycolic acid	Γλυκολικό οξύ	
Sodium dodecyl sulfate	Δωδεκυλοθειικό νάτριο	SDS
N,N' dicyclohexylcarbodiimide	N,N-δικυκλοεξυλκαρβοδιμίδιο	DCC
Nhydroxysuccinimide	N- υδροξυηλεκτριμίδιο	NHS
Tetrahydrofuran	Τετραϋδροφουράνιο	THF
Methanol	Μεθανόλη	
	Σύμπλοκο μεταξύ CS και SDS	SCC
Acetic acid	Οξικό οξύ	
Dimethylformamide	Διμεθυλοφορμαμίδιο	DMF
N-methylpyrrolidinone	N-μεθυλοπυρρολιδινόνη	
Dimethyl sulfoxide	Διμεθυλοσουλφοξείδιο	DMSO
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	Τρις(υδροξυμεθυλ)αμινομεθάνιο	Tris
a-Minimal Essential Medium	Θρεπτικό μέσο	a-MEM
Fetal Bovine Serum	Βόειος Ορός Πλάσματος	FBS
Phosphate Buffered Saline	Ρυθμιστικό φωσφορικών σε ισότονο διάλυμα	PBS
	Συμπολυμερές CS-g-PCL που εμβαπτίσθηκε σε PBS (pH 7,4) για 6 εβδομάδες υπό στατικές συνθήκες	6STC
	Συμπολυμερές CS-g-PCL που εμβαπτίσθηκε σε PBS (pH 7,4) για 6 εβδομάδες υπό αναδευόμενες συνθήκες	6STR
Nanoindentation	Νανοδιείσδυση	
Degradation	Αποδόμηση	
Load	Φορτίο	<i>P</i>
Stiffness	Ακαμψία	<i>S</i>
Indentation Depth	Βάθος διείσδυσης	<i>h</i>
Reduced elastic modulus	Σύνθετο μέτρο ελαστικότητας	<i>E_r</i>
Young's modulus	Μέτρο ελαστικότητας	<i>E</i>
Hardness	Σκληρότητα	<i>H</i>

Ευρετήριο διαγραμμάτων

<i>Διάγραμμα 1:</i> Σύγκριση τιμών (a) H και (b) E_r για τα δείγματα CS, PCL, CS-g-PCL	37
<i>Διάγραμμα 2:</i> Καμπύλες φόρτισης αποφόρτισης για CS, PCL, CS-g-PCL, για ρυθμούς φόρτισης (a) 5 $\mu\text{N/s}$, (b) 25 $\mu\text{N/s}$ και (c) 50 $\mu\text{N/s}$	38
<i>Διάγραμμα 3:</i> Καμπύλες φόρτισης αποφόρτισης στους διαφορετικούς ρυθμούς φόρτισης (5 $\mu\text{N/s}$, 25 $\mu\text{N/s}$ και 50 $\mu\text{N/s}$) για τα δείγματα (a) CS, (b) PCL και (c) CS-g-PCL.....	39
<i>Διάγραμμα 4:</i> (a) Τιμές σκληρότητας H , (b) τιμές σύνθετου μέτρου ελαστικότητας E_r και (c) τιμές αποθηκευμένης ενέργειας για τα δείγματα CS, PLC και CS-g-PCL, για διαφορετικούς ρυθμούς φόρτισης (5, 25, 50 $\mu\text{N/sec}$).....	40
<i>Διάγραμμα 5:</i> Βάθος διείσδυσης συναρτήσε του χρόνου παραμονής στο μέγιστο επιβαλλόμενο φορτίο για διαφορετικούς ρυθμούς φόρτισης (5, 25 και 50 $\mu\text{N/s}$) για τα δείγματα CS, PCL και CS-g-PCL. ...	41
<i>Διάγραμμα 6:</i> Βάθος διείσδυσης συναρτήσε του χρόνου παραμονής στο μέγιστο επιβαλλόμενο φορτίο για τα δείγματα CS, PCL και CS-g-PCL και για χρόνους 1, 10 και 100 s.	42
<i>Διάγραμμα 7:</i> Καμπύλες φόρτισης αποφόρτισης με διαφορετικούς ρυθμούς φόρτισης για τα δείγματα CS-g-PCL μετά από εμφύσηση 6 εβδομάδων σε PBS υπό (a) στατικές συνθήκες και (b) ανάδευση. ...	44
<i>Διάγραμμα 8:</i> Βάθος διείσδυσης συναρτήσε του χρόνου παραμονής στο μέγιστο επιβαλλόμενο φορτίο για διαφορετικούς ρυθμούς φόρτισης για τα δείγματα CS-g-PCL (a) πριν την εμφύσηση, μετά από εμφύσηση 6 εβδομάδων σε PBS υπό (b) στατικές συνθήκες και (c) ανάδευση.....	45
<i>Διάγραμμα 9:</i> (a) Επαναλαμβανόμενοι κύκλοι φόρτισης του δείγματος CS-g-PCL. (b) Τιμές H (c) τιμές E_r και (d) τιμές ενέργειας για τα τρία δείγματα CS-g-PCL πριν και μετά την εμφύσηση στο θεραπευτικό υλικό για κάθε κύκλο φόρτισης.....	46
<i>Διάγραμμα 10:</i> Καμπύλες φόρτισης-αποφόρτισης του δείγματος PCL όπως παράχθηκε και μετά από εμφύσηση 2 και 504 h εμφύσησης.....	48
<i>Διάγραμμα 11:</i> Καμπύλες φόρτισης-αποφόρτισης του δείγματος CS-g-PCL όπως παράχθηκε και μετά από εμφύσηση 2 και 504 h εμφύσησης.....	48
<i>Διάγραμμα 12:</i> Δοκιμή πρόσφυσης για το δείγμα του συμπολυμερούς όπως παράχθηκε.....	49
<i>Διάγραμμα 13:</i> a) Οι τιμές σύνθετου μέτρου ελαστικότητας (E_r) των δειγμάτων PCL και CS-g-PCL για διάφορες χρονικές στιγμές κατά τη διάρκεια εμφύσησής τους σε θεραπευτικό μέσο α -MEM στους 37°C. b) Αντίστοιχα, οι τιμές σκληρότητας (H) για τα ίδια δείγματα.	49

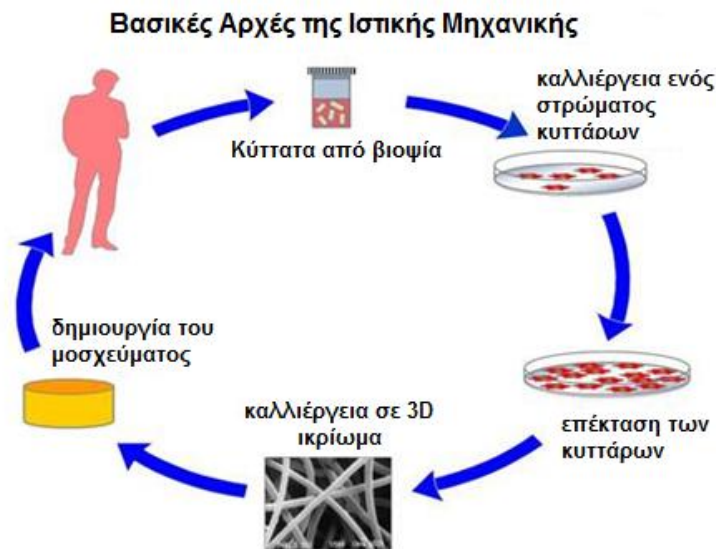
Κεφάλαιο 1. Θεωρητικό Μέρος

1.1. Ιστική Μηχανική

1.1.1 Γενικά για την ιστική μηχανική (Tissue Engineering)

Ένα από τα πιο συχνά, καταστροφικά και πολυδάπανα προβλήματα υγείας που αντιμετωπίζουν οι άνθρωποι είναι η απώλεια ή η αστοχία ενός οργάνου ή ιστού. Η ιστική μηχανική εφαρμόζει τις αρχές της βιολογίας και της μηχανικής για την ανάπτυξη λειτουργικών υποκατάστατων των καταστρεμμένων ιστών. Πρόκειται για ένα σχετικά νέο και υποσχόμενο κλάδο. Η πρώτη αναφορά του όρου αυτού έγινε το 1987 από τον Fung και το 1988 χρησιμοποιήθηκε επίσημα από το Εθνικό Ίδρυμα Επιστήμης των Ηνωμένων Πολιτειών (National Science Foundation) [1]. Οι μέχρι τώρα λύσεις για τη θεραπεία των κατεστραμμένων ή και των μη υπαρχόντων ιστών, όπως είναι οι μηχανικές ιατρικές συσκευές ή τεχνητές προσθέσεις, παρουσιάζουν μειονεκτήματα, καθώς δεν επιδιορθώνουν τον καταστραμμένο ιστό και όταν χρησιμοποιούνται για μεγάλο χρονικό διάστημα υπάρχει πιθανότητα να υποστούν φθορά και να προκαλέσουν φλεγμονή στον άνθρωπο [2]. Ενώ στις περιπτώσεις μεταμόσχευσης όπου ένα υγιές όργανο ή ιστός μεταμοσχεύεται σε έναν ασθενή, ή από ένα υγιές όργανο του ασθενούς μεταφέρεται ιστός σε άλλο σημείο που νοσεί, παρουσιάζονται σημαντικά μειονεκτήματα. Αυτά μπορεί να είναι ο περιορισμός των μεταμοσχεύσεων λόγω του αριθμού των δωρητών, ή όταν πρόκειται για τη μεταφορά ενός ιστού του ίδιου ασθενή από ένα σημείο σε άλλο για να πραγματοποιηθεί η επανόρθωση, συχνά συνεπάγεται ατελές ταίριασμα των ιστών [3]. Έτσι λοιπόν, η Ιστική Μηχανική είναι μία εναλλακτική μέθοδος θεραπείας που έχει ως στόχο τη δημιουργία, ανάπλαση ή και αντικατάσταση ιστών και οργάνων με τη χρήση κυττάρων, βιοϋλικών ή και βιολογικά ενεργών μορίων [4]. Η κατασκευή του ιστού μπορεί να γίνει εργαστηριακά και πρόκειται είτε για πλήρως λειτουργικό ιστό την ώρα που θα εμφυτευθεί, είτε για ιστό ο οποίος έχει τη δυνατότητα να ολοκληρωθεί και να αποκτήσει τις επιθυμητές ιδιότητες αφού εμφυτευθεί [2]. Στην Ιστική Μηχανική για την κατασκευή των ιστών χρησιμοποιούνται τρισδιάστατα προσωρινά ικριώματα (scaffolds) τα οποία δημιουργούν το κατάλληλο περιβάλλον για την καθοδήγηση του νέου ιστού, την υποστήριξη της ανάπτυξής του, την εξάπλωση και τη διαφοροποίηση των εμφυτευμένων κυττάρων σε κύτταρα του επιθυμητού ιστού και καθορίζουν τον πιθανό χώρο τον οποίο θα αναπτυχθεί ο καινούργιος ιστός. Επίσης, τα ικριώματα πρέπει να διατηρούν μία κατάλληλη απόσταση μεταξύ των κυττάρων που εμφυτεύονται έτσι ώστε να είναι πραγματοποιήσιμη η διάχυση αερίων και θρεπτικών ουσιών και η ανάπτυξη αγγειακού συστήματος. Προσφέρουν έτσι μια μηχανικά σταθερή και πορώδη δομή που επιτρέπει στα κύτταρα να μεταναστεύουν μέσα στο περιβάλλον και έτσι να προωθήσουν την ανακατασκευή του ιστού, τόσο μέσα στον οργανισμό όσο και σε τεχνητό περιβάλλον [3,5]. Δηλαδή τα ικριώματα παρέχουν τη δομή πάνω στην οποία θα αναπτυχθούν τα κύτταρα. Η Ιστική Μηχανική βασίζεται στο ότι κατάλληλες ποικιλίες κυττάρων απομονώνονται από τον άνθρωπο και αναπτύσσονται σε επαρκή αριθμό, επεκτείνονται δηλαδή τα κύτταρα σε μία

καλλιέργεια κυττάρων και στη συνέχεια, αφού έχει επιλεγεί ένα κατάλληλο βιοϋλικό για την παραγωγή του ικρίωματος με το επιθυμητό σχήμα και μέγεθος, εμφυτεύονται τα κύτταρα σε αυτό, ώστε να αναπτυχθεί ο επιθυμητός ιστός με τις επιθυμητές ιδιότητες. Στη συνέχεια η κατασκευή αυτή –ικρίωμα και ιστού, ολοκληρωμένου ή μη- τοποθετείται στην κατάλληλη θέση στον ασθενή. Ανάλογα με τη θέση και την δομή της κατασκευής μπορεί να είναι απαραίτητη να γίνει αγγειακή δικτύωση [6]. Η παραπάνω διαδικασία παρουσιάζεται σχηματικά στην Εικόνα 1.

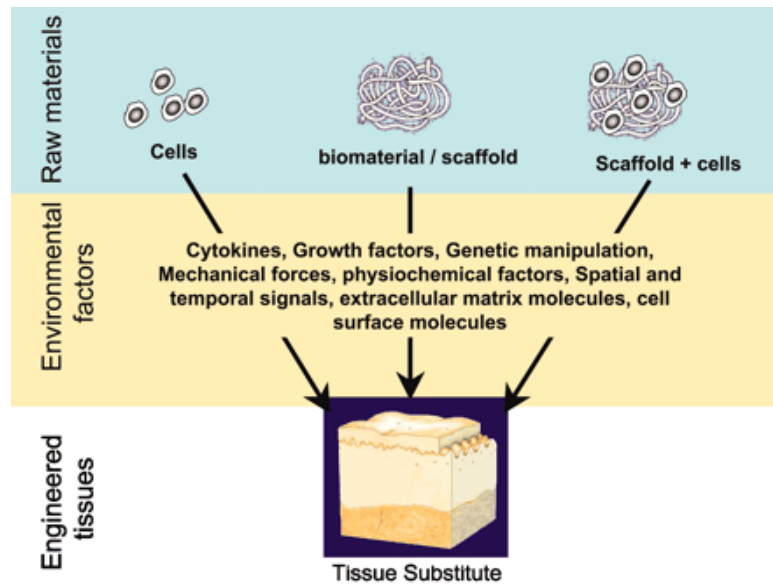


Εικόνα 1: Βασική αρχή της Ιστικής Μηχανικής [7].

Τέσσερα είναι τα κριτήρια για την επιτυχημένη κατασκευή ενός ιστού μέσω της Ιστικής μηχανικής:

- Ο τύπος των κυττάρων που θα απομονωθούν και θα χρησιμοποιηθούν,
- οι αυξητικοί παράγοντες που θα χρησιμοποιηθούν, οι οποίοι βοηθούν στη σωστή, επιθυμητή διαφοροποίηση των κυττάρων,
- το ικρίωμα,
- και το μηχανικό περιβάλλον στο οποίο θα βρεθεί το ικρίωμα με τα κύτταρα, το οποίο μπορεί και αυτό να διευκολύνει την κατάλληλη έκφραση του φαινοτύπου. [8]

Παρακάτω στην Εικόνα 2 συνοψίζονται οι παράγοντες που συνεισφέρουν στην παραγωγή ενός ιστού μέσω της Ιστικής Μηχανικής.



Εικόνα 2: Παράγοντες που λαμβάνουν χώρα στην παραγωγή ενός ιστού [9].

Στη συγκεκριμένη εργασία κύριο ενδιαφέρον είναι η μηχανική συμπεριφορά των ικριωμάτων υπό την επιβολή μικρών φορτίων στην αρχική φάση σύνθεσης τους αλλά και κατά τη διάρκεια αποδόμησης τους σε θρεπτικά υλικά.

1.1.2 Ιδιότητες ικριωμάτων

Κάποια από τα βασικά χαρακτηριστικά που πρέπει να έχει το ιδανικό ικρίωμα είναι: βιοσυμβατότητα, να είναι βιοαποδομήσιμο, να έχει τις κατάλληλες μηχανικές ιδιότητες, το κατάλληλο πορώδες και να είναι εμπορεύσιμο. Αυτά εξαρτώνται από την επιλογή του βιοϋλικού από το οποίο θα παραχθεί το ικρίωμα.

- Βιοσυμβατότητα

Αυτό είναι το πρώτο κριτήριο για οποιοδήποτε ικρίωμα. Τα κύτταρα θα πρέπει να μπορούν να προσκολληθούν στην επιφάνεια του ικριώματος, να λειτουργούν φυσιολογικά, αλλά και να μεταναστεύουν επάνω στην επιφάνεια του ικριώματος καθώς και τελικά μέσα από αυτό, να πολλαπλασιάζονται και να αναπτυχθεί έτσι ο ιστός. [10]

- Βιοαποικοδόμηση - χρόνος ζωής των ικριωμάτων

Ο στόχος της Ιστικής μηχανικής είναι να επιτρέψει στα κύτταρα του σώματος, με την πάροδο του χρόνου, να αντικαταστήσουν τελικά το εμφυτευμένο ικρίωμα. Θα πρέπει επομένως το ικρίωμα να παραμένει σταθερό μέχρι την ανάπτυξη μίας συνεχής εξωκυτταρικής μήτρας (extra-cellular matrix ECM) από τα εμφυτευμένα κύτταρα και στην συνέχεια να αποδομηθεί (degrade) σταδιακά καθώς η μήτρα αυτή θα αναπτύσσεται [8]. Τα παραπροϊόντα αυτής της βιοαποδόμησης θα πρέπει να είναι μη-τοξικά, να μην μειώνουν την ικανότητα ανάπτυξης των εμφυτευμένων κυττάρων και να μπορούν να διαφύγουν από το σώμα χωρίς να υπάρχει ανάμειξη με άλλα όργανα [8,10]. Ο ρυθμός όμως ανάπτυξης των ιστών του ανθρώπου εξαρτάται από την ηλικία του. Στα νεαρά άτομα ο ρυθμός ανάπτυξης είναι ταχύτερος από ότι αυτός των μεγαλύτερων σε ηλικία ανθρώπων, με αποτέλεσμα τα προσωρινά ικρίωματα να μην

είναι κατάλληλα για τη δεύτερη περίπτωση αφού παρουσιάζεται αναντιστοιχία μεταξύ του ρυθμού ανάπτυξης των ιστών και του ρυθμού αποδόμησης των ικριωμάτων αυτών. Αυτό έχει ως συνέπεια για τέτοιους ασθενείς να απαιτούνται πιο σκληρά ικριώματα που είτε θα είναι μόνιμα είτε θα έχουν πάρα πολύ αργό ρυθμό αποδόμησης [11].

- Μηχανικές ιδιότητες

Ιδανικά, το ικρίωμα θα πρέπει να έχει μηχανικές ιδιότητες παρόμοιες με αυτές του ιστού που θα αναπτυχθεί έτσι ώστε να μην φθείρεται διαφορετικά από τους γύρω ιστούς και, από πρακτική άποψη, θα πρέπει να είναι σκληρό αρκετά για να είναι δυνατός ο χειρισμός του κατά τη διάρκεια της χειρουργικής επέμβασης για την εμφύτευση [8,10]. Επίσης, οι μηχανικές ιδιότητες των ικριωμάτων επηρεάζουν τη διαφοροποίηση των κυττάρων που εμφυτεύονται [12]. Ένα σημαντικό και δύσκολο σημείο είναι ότι θα πρέπει να επιτευχθούν οι αρχικά κατάλληλες μηχανικές ιδιότητες αλλά και να διατηρηθούν κατά το διάστημα της επούλωσης, το διάστημα που αναπτύσσεται ο νέος ιστός μέχρι την τελική αποδόμηση του ικριώματος [13]. Είναι επομένως, ιδιαίτερα σημαντικό να γίνεται η μελέτη των μηχανικών ιδιοτήτων των ικριωμάτων, τόσο όπως παράχθηκαν αλλά και κατά το διάστημα που βρίσκονται στον ανθρώπινο οργανισμό, πραγματοποιώντας εμβαπτίσεις των ικριωμάτων σε συνθήκες που προσομοιάζουν τον ανθρώπινο οργανισμό, όπως έχει γίνει και σε αυτή τη διπλωματική εργασία.

- Κατασκευή των ικριωμάτων - πορώδες

Τα ικριώματα θα πρέπει να έχουν δίκτυο ανοιχτών πόρων που να επικοινωνούν και υψηλό πορώδες για να διασφαλιστεί η κυτταρική διείσδυση και η επαρκής διάχυση των θρεπτικών συστατικών στα κύτταρα τόσο σε όσων βρίσκονται εντός του ικριώματος αλλά και σε όσων έχουν ήδη διαμορφώσει την εξωκυτταρική μήτρα. Επιπλέον το πορώδες αυτό είναι απαραίτητο για να επιτρέπεται η διάχυση των αποβλήτων από το ικρίωμα. Ένα από τα προβλήματα που παρουσιάζονται στον τομέα της Ιστικής Μηχανικής είναι η αποδόμηση του πυρήνα λόγω της έλλειψης αγγειακού συστήματος και απομάκρυνσης των αποβλήτων. Ένα άλλο βασικό σημείο για το ικρίωμα, είναι το μέγεθος των πόρων. Για οποιοδήποτε ικρίωμα υπάρχει μία κρίσιμη περιοχή η οποία εξαρτάται από τον τύπο των κυττάρων που χρησιμοποιείται. Είναι απαραίτητος λοιπόν, ο σωστός συνδυασμός των κατάλληλων μηχανικών ιδιοτήτων και του κατάλληλου πορώδους [10].

- Εμπορευσιμότητα

Ένα ικρίωμα για να είναι κλινικά και εμπορικά βιώσιμο, θα πρέπει να είναι οικονομικά αποτελεσματικό και να είναι δυνατό να μεταφερθεί η παραγωγή από εργαστηριακή κλίμακα σε παραγωγή μικρών παρτίδων. [10]

1.1.3 Υλικά Ικριωμάτων

Ανάλογα με τις ανάγκες που προκύπτουν, δηλαδή ανάλογα με τον ιστό που είναι επιθυμητός να αναπτυχθεί, θα πρέπει να χρησιμοποιείται και το κατάλληλο βιοϋλικό. Θα μπορούσαν τα βιοϋλικά που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ικριώματος να χωριστούν σε τρεις κατηγορίες: τα μεταλλικά, τα κεραμικά και τα πολυμερή.

Μεταλλικά

Τα μέταλλα για χρήση ως ικρίωματα παρουσιάζουν μειονεκτήματα όπως την περιορισμένη δυνατότητα κατεργασίας τους και συνήθως δεν είναι αποδομήσιμα σε βιολογικό περιβάλλον [14]. Υπάρχει όμως ένα αυξημένο ενδιαφέρον για τη χρήση βιοαποδομήσιμων μετάλλων σε βιοϊατρικές εφαρμογές. Καθώς η εκ φύση αντοχή, η ολκιμότητα και οι υψηλές μηχανικές ιδιότητες των μετάλλων τα καθιστούν ιδιαίτερα ελκυστικά για εφαρμογές σκληρών ιστών, όπως είναι τα κόκκαλα [13,15]. Παραδείγματα μετάλλων για χρήση ως ικρίωματα είναι το μαγνήσιο (Mg) και τα κράματά του που συνδυάζονται οι εξαιρετικές μηχανικές ιδιότητες τους και η δυνατότητα αποδόμησης. Καθώς επίσης και ο σίδηρος (Fe) με τα κράματά του, αν και υπάρχει ελάχιστη βιβλιογραφία αυτή τη στιγμή για αυτά [13].

Βιοκεραμικά

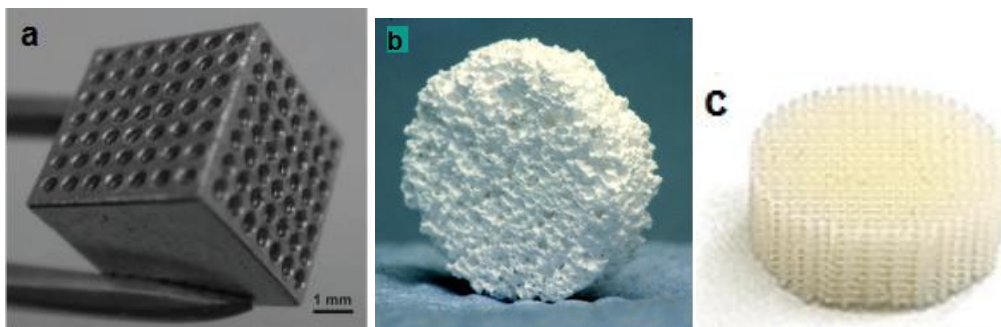
Τα κεραμικά έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στην οδοντιατρική και ορθοπεδική. Έρευνες για συνθετικά και φυσικά ανόργανα κεραμικά υλικά, όπως είναι ο υδροξυαπατίτης (HA) και το φωσφορικό ασβέστιο (TCP), έχουν γίνει για τη χρήση τους ως ικρίωματα κυρίως στο πεδίο της Ιστικής Μηχανικής των οστών. Αυτό οφείλεται κυρίως στο ότι αυτά τα κεραμικά μοιάζουν με τα φυσικά ανόργανα συστατικά των οστών και έχουν την ιδιότητα να παροτρύνουν την ανάπτυξη οστικού ιστού (osteoconductivity), καθιστώντας τα ελκυστικά ως επιλογή υλικού για κατασκευή ικρίωματος. Το οστό είναι ένα σύνθετο υλικό που αποτελείται από πολυμερική μήτρα –πρωτεΐνη κολλαγόνο 30% σε ξηρή βάση- ενισχυμένη με κεραμικά σωματίδια –υδροξυαπατίτη 70% σε ξηρή βάση [16-17]. Παρόλα αυτά, τα κεραμικά υλικά είναι εκ φύσεως ψαθυρά, παρουσιάζουν χαμηλή αντοχή σε εφελκυσμό, με αποτέλεσμα να μην ταιριάζουν με τις μηχανικές ιδιότητες των οστών, και εμφανίζουν πολύ αργή αποδόμηση, η οποία όμως μπορεί να αλλάξει με την προσθήκη πολυμερών. Επίσης ακόμα ένα μειονέκτημα για τη χρήση τους ως υλικό για ικρίωμα είναι η δύσκολη κατεργασιμότητά τους σε υψηλές πορώδεις δομές [14,16-17].

Πολυμερή

Τα μεταλλικά και τα κεραμικά υλικά δεν αναμένεται να είναι κατάλληλα για την ανάπτυξη μαλακών ιστών (για παράδειγμα μυϊκού ιστού της καρδιάς) σε αντίθεση με τα πολυμερή. Η χρήση βιοαποδομήσιμων πολυμερών για την παραγωγή πορωδών ικριωμάτων έχει παρουσιάσει επιτυχία όσον αφορά την ανάπτυξη ιστών [18]. Κάποια από τα πλεονεκτήματα που εμφανίζουν τα πολυμερή είναι ότι είναι εύκολα στην κατεργασία τους και μπορούν να λάβουν σχήμα και μέγεθος κατάλληλο ώστε να προσαρμόζεται το ικρίωμα στην απαιτούμενη ανάγκη. Είναι επίσης βιοαποδομήσιμα· κάποια μπορούν να αποδομηθούν είτε μέσω υδρόλυσης όταν εκτεθούν σε υδατικό περιβάλλον μέσα στο σώμα, είτε μέσω κυτταρικών ή ενζυματικών οδών [14-15]. Ενώ όσον αφορά τα μειονεκτήματα των πολυμερών, σε αυτά ανήκουν η παρουσία υδρόφοβων επιφανειών καθώς και η τοπική μείωση pH κατά την αποδόμηση, τα

οποία είναι επιζήμια για την παραγωγή του ιστού [18]· και οι χαμηλές μηχανικές ιδιότητες τους, με αποτέλεσμα να μην είναι η καλύτερη επιλογή σε περιπτώσεις όπου πρέπει να αντέχουν τη μηχανική φόρτιση. Επίσης θα πρέπει να δίνεται προσοχή καθώς υπάρχει περίπτωση κατά τη διάρκεια της αποδόμησης τους, τα πολυμερή να χάσουν ξαφνικά μάζα και τη μηχανική ακεραιότητά τους [13,18]. Παρόλα αυτά τα συνθετικά και φυσικά πολυμερή είναι μία ελκυστική επιλογή για την ανάπτυξη των περισσότερων ιστών [17].

Παρακάτω στην Εικόνα 3 παρουσιάζονται διάφορα παραδείγματα ικριωμάτων.



Εικόνα 3: Παραδείγματα ικριωμάτων: a) μεταλλικό [13], b) κεραμικό [19], c) πολυμερικό [20].

1.1.4 Πώς κατασκευάζονται τα ικριώματα

Έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές για την κατασκευή των ικριωμάτων. Οι τεχνικές αυτές θα μπορούσαν να διαχωριστούν σε τρεις κατηγορίες: (α) τεχνικές οι οποίες χρησιμοποιούν διάφορους παράγοντες μέσα στα βιοϋλικά για τη δημιουργία πόρων, (β) τεχνικές που χρησιμοποιούν υφάνσιμες ή μη υφάνσιμες ίνες και (γ) τεχνικές που δε χρησιμοποιούν στερεά. Στη συνέχεια ακολουθεί περιγραφή κάποιων τεχνικών κατασκευής ικριωμάτων.

1.1.4.1 Διαχωρισμός φάσεων

Πορώδεις δομές σε πολυμερή μπορούν να παραχθούν με τη μέθοδο του διαχωρισμού φάσεων. Σε αυτήν τη μέθοδο το πολυμερές διαλύεται σε κάποιο διαλύτη και στη συνέχεια προκαλείται με κάποιο τρόπο διαχωρισμός φάσεων. Προκύπτουν δύο φάσεις, μία πλούσια σε πολυμερές και με μικρή ποσότητα διαλύτη και μία φτωχή σε πολυμερές και με μεγάλο ποσοστό διαλύτη. Στη συνέχεια απομακρύνεται ο διαλύτης από την πλούσια σε πολυμερές φάση (π.χ. με εξάτμιση) και έτσι δημιουργούνται οι πόροι και παγιώνονται κατά τη στερεοποίηση του πολυμερούς. Ο διαχωρισμός φάσεων μπορεί να προκύψει είτε λόγω αλλαγής της θερμοκρασίας είτε με την προσθήκη ενός μη διαλύτη του πολυμερούς. Μειονεκτήματα είναι το μέγεθος των πόρων –της τάξης μερικών μικρών- και η ανομοιόμορφη κατανομή τους που δεν είναι κατάλληλη για εφαρμογές της Ιστικής Μηχανικής [21-22].

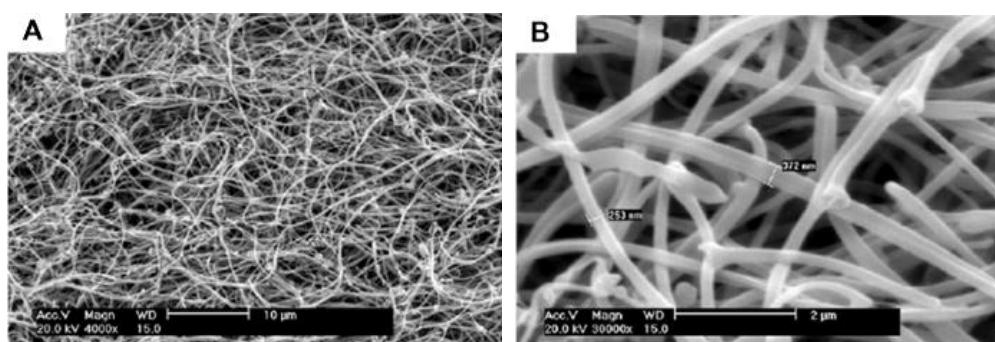
Διαχωρισμός φάσεων που προκαλείται θερμικά

- **Διαχωρισμός φάσης υγρού-στερεού (Solid-liquid phase separation)**

Διαχωρισμός φάσης μπορεί να προέλθει από τη μείωση της θερμοκρασίας ώστε να προκληθεί κρυσταλλοποίηση του διαλύτη από ένα πολυμερικό διάλυμα (στερεή φάση μέσα σε υγρή). Μετά την απομάκρυνση των κρυστάλλων του διαλύτη δημιουργείται κενό κι αυτοί είναι οι πόροι. Αυτός ο τρόπος χρησιμοποιείται για να κατασκευαστούν ικρίωματα από πολυμερή διάφορων ειδών και από σύνθετα πολυμερικά υλικά και με τις κατάλληλες συνθήκες για το διαχωρισμό των φάσεων, πορώδεις δομές μπορούν να κατασκευαστούν [22].

- **Διαχωρισμός υγρής-υγρής φάσης (Liquid-liquid phase separation)**

Αυτός συμβαίνει μόνο στα διαλύματα πολυμερών τα οποία παρουσιάζουν σημείο άνω κρίσιμης θερμοκρασίας. Μειώνοντας τη θερμοκρασία δημιουργείται ο διαχωρισμός της υγρής-υγρής φάσης. Μια τέτοια διαδικασία οδηγεί στον σχηματισμό μιας συνεχόμενης δομής, δηλαδή μίας δομής που αποτελείται συνεχόμενα από τη φάση πλούσια σε πολυμερές και από αυτή φτωχή σε αυτό και τελικά μετά την απομάκρυνση του διαλύτη, σχηματίζεται μια δομή με ανοικτούς πόρους [21-22].



Εικόνα 4: Εικόνες από SEM νανοϊνών χιτοζάνης που παρασκευάστηκαν με διαχωρισμό φάσεων. Η μπάρα είναι κλίμακας A) 10μm B) 2μm [22].

1.1.4.2 Απομάκρυνση σωματιδίων (Particulate leaching)

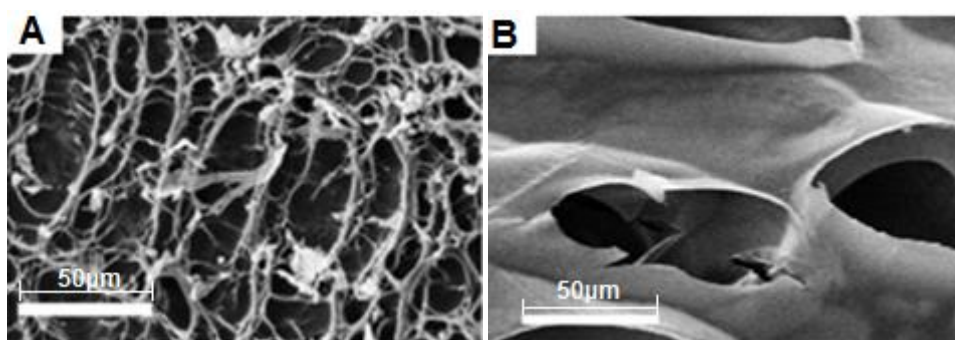
Μία πιο απλή μέθοδος για την κατασκευή ικρίωμάτων είναι η απομάκρυνση σωματιδίων. Σε αυτήν τη μέθοδο, διάλυμα πολυμερούς τοποθετείται σε ένα καλούπι που περιέχει στερεά σωματίδια. Εξατμίζεται ο διαλύτης και έτσι προκύπτει ένα στερεό πολυμερές με διεσπαρμένα σωματίδια. Το υλικό αυτό στη συνέχεια ξεπλένεται με νερό και απομακρύνονται έτσι τα σωματίδια, με αποτέλεσμα να σχηματίζονται πόροι στις θέσεις όπου πριν υπήρχαν αυτά.

Ως σωματίδια χρησιμοποιείται συνήθως μαγειρικό αλάτι (χλωριούχο νάτριο). Η μέθοδος αυτή παρέχει τη δυνατότητα άμεσου ελέγχου του μεγέθους των πόρων, ανάλογα με το μέγεθος των σωματιδίων που χρησιμοποιούνται και του πορώδους από την αναλογία σωματιδίων-πολυμερούς που θα χρησιμοποιηθεί. Επίσης είναι απλή καθώς δεν απαιτείται κάποια ειδική διάταξη ή συσκευή και ούτε απαιτούνται

ασυνήθιστες πιέσεις ή θερμοκρασίες. Μειονέκτημα της μεθόδου είναι η δυσκολία ελέγχου του σχήματος των πόρων και της διασύνδεσής τους. Επίσης η μέθοδος αυτή δεν εφαρμόζεται με επιτυχία σε υδρόφιλα πολυμερή [21,23].

1.1.4.3 Ξήρανση με κατάψυξη - λυοφιλίωση (Freeze drying)

Αυτή η μέθοδος στηρίζεται στην αρχή της εξάχνωσης. Αρχικά δημιουργείται ένα διάλυμα του πολυμερούς, επιθυμητής συγκέντρωσης. Στη συνέχεια το διάλυμα καταψύχεται σε χαμηλές θερμοκρασίες (-70°C με -80°C) και ο διαλύτης απομακρύνεται μέσω εξάχνωσης κάτω από υψηλό κενό. Έτσι δημιουργείται το ικρίωμα με υψηλό πορώδες και πόρους που επικοινωνούν. Το μέγεθος των πόρων μπορεί να ελεγχθεί μέσω κάποιων παραμέτρων όπως είναι ο ρυθμός ψύξης και το pH. Οι υψηλοί ρυθμοί ψύξης έχουν ως συνέπεια τη δημιουργία μικρών πόρων [22,24].



Εικόνα 5: Εικόνες από SEM πορώδους ικριώματος που παρασκευάστηκε μέσω ξήρανσης με κατάψυξη, A) υπό 6.5 mbar και υπό B) 0,1mbar πίεση [22].

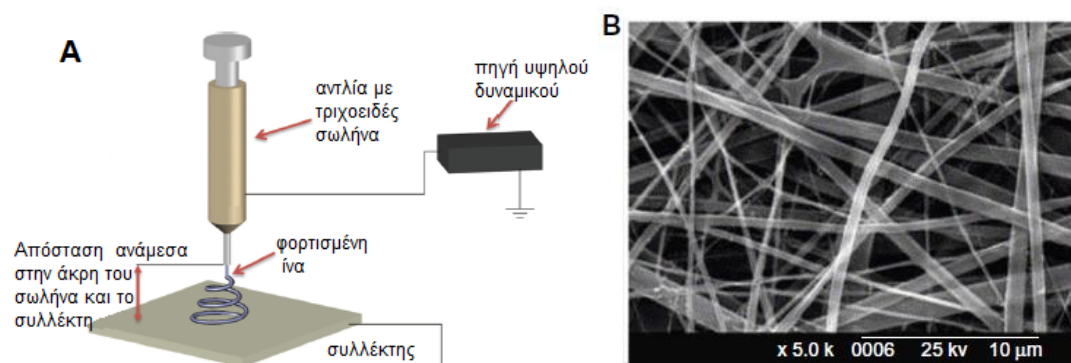
1.1.4.4 Αφρισμός με χρήση αερίου

Πολλές τεχνικές κατασκευής ικριωμάτων απαιτούν τη χρήση οργανικών διαλυτών και υψηλής θερμοκρασίας. Για την εξάλειψη της ανάγκης οργανικών διαλυτών, καθώς τα υπολείμματα αυτών που παραμένουν είναι βλαβερά για τα κύτταρα και τους ιστούς, αναπτύχθηκε μία νέα τεχνική η οποία σχετίζεται με τη χρήση αερίου για τη δημιουργία πόρων. Κατά την τεχνική αυτή το πολυμερές εκτίθεται σε υψηλή πίεση και ατμόσφαιρα διοξειδίου του άνθρακα έτσι ώστε να επιτραπεί ο κορεσμός του πολυμερούς σε διοξείδιο του άνθρακα. Στη συνέχεια με τη μείωση της πίεσης σε ατμοσφαιρική πραγματοποιείται απελευθέρωση του διοξειδίου του άνθρακα δημιουργώντας στο πολυμερές πόρους. [24-25]

1.1.4.5 Ηλεκτροστατική Εναπόθεση (Electrospinning)

Η ηλεκτροστατική εναπόθεση είναι μία τεχνική που χρησιμοποιείται για την παραγωγή ινών με διάμετρο που κυμαίνεται από τη νάνο και μικρο κλίμακα. Κατά τη μέθοδο αυτή χρησιμοποιείται ένα ηλεκτρικό πεδίο. Το διάλυμα πολυμερούς ή το τήγμα του τοποθετείται σε μία αντλία με τριχοειδές σωλήνα, με το πολυμερές να βρίσκεται στην άκρη λόγω της επιφανειακής τάσης. Στη συνέχεια όταν ενεργοποιείται το ηλεκτρικό πεδίο, η δύναμη που δημιουργείται υπερνικάει την

επιφανειακή τάση ξεκινώντας έτσι τη δημιουργία των ινών, ενώ παράλληλα αρχίζει η εξάτμιση του διαλύτη.[22,24]



Εικόνα 6: Ηλεκτροστατική εναπόθεση. Α) Σχηματική διάταξη της τεχνικής. Β) Εικόνες από SEM νανοϊνών κολλαγόνου που κατασκευάστηκαν με τη τεχνική αυτή. [22]

1.1.4.6 Ταχεία προτυποποίηση (rapid prototyping)

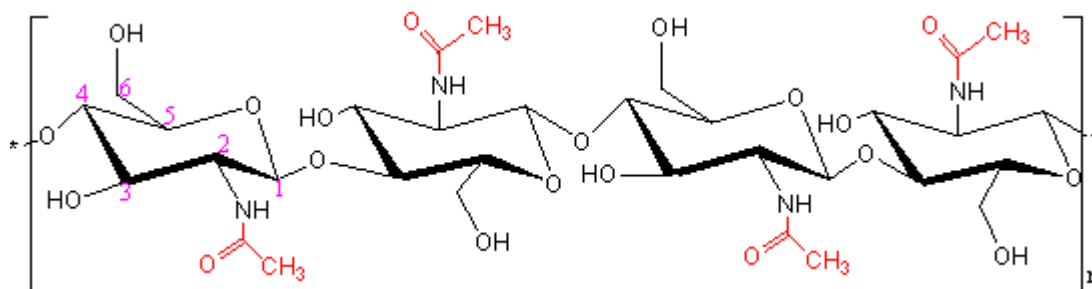
Η τεχνική αυτή ονομάζεται και αλλιώς ως τεχνική ελεύθερη από στερεά (solid free-form technique). Βασίζεται στην προηγμένη ανάπτυξη της τεχνολογίας των υπολογιστών και της κατασκευαστικής βιομηχανίας. Η κατασκευή των 3D ικριωμάτων ελέγχεται από τον υπολογιστή και συγκεκριμένα χρησιμοποιείται το πρόγραμμα σχεδιασμός-με-τη-βοήθεια-υπολογιστή [computer-aided design (CAD)]. Επομένως, είναι δυνατή η κατασκευή σύνθετων προϊόντων. Στην τεχνική αυτή, το μηχάνημα ταχείας προτυποποίησης αφήνει ένα στρώμα υλικού κάθε φορά και τοποθετεί το επόμενο από πάνω, δημιουργώντας έτσι το ικρίωμα, ξεκινώντας από κάτω προς τα πάνω ένα στρώμα τη φορά [24,26]

1.2. Πολυμερή: Χιτοζάνη, Πολυκαπρολακτόνη και το συμπολυμερές τους

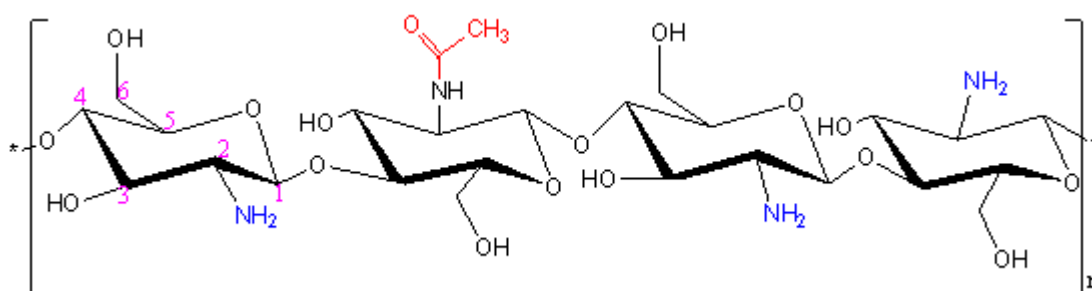
1.2.1. Χιτοζάνη (chitosan)

Διάφορα φυσικά και συνθετικά πολυμερή έχουν μελετηθεί για την καταλληλότητά τους ως υλικά για ικριώματα. Η χιτοζάνη (Chitosan, CS) και η πολυκαπρολακτόνη (poly(ϵ -caprolactone), PCL) έχουν ευρέως μελετηθεί λόγω των πλεονεκτημάτων που παρουσιάζουν. Η χιτοζάνη είναι ένας φυσικός, ιδιαίτερα βασικός πολυσακχαρίτης και προέρχεται από την αποκετυλίωση (de-N-acetylation) της χιτίνης (chitin) υπό παρουσία θερμότητας και αλκαλίου. Είναι μία γραμμική πολυαμίνη, ή όπως θα μπορούσε να υπωθεί πρόκειται για συμπολυμερές της γλυκοζαμίνης (glucosamine) και της Ν-ακετυλο-γλυκοζαμίνης (N-acetyl-glucosamine). Επομένως, περιλαμβάνει δραστικές αμινο και υδροξύλο ομάδες οι οποίες είναι υπεύθυνες για τις χημικές και τις βιολογικές ιδιότητες της. Η χιτοζάνη έχει χρησιμοποιηθεί σε πληθώρα βιοϊατρικών εφαρμογών όπως είναι τα συστήματα απελευθέρωσης φαρμάκου, απορροφήσιμα, ράμματα, τεχνητό δέρμα καθώς και στην Ιστική Μηχανική, αφού η χιτοζάνη μπορεί εύκολα να κατεργασθεί για τη δημιουργία πορώδων ικριωμάτων. Χρησιμοποιείται ευρέως λόγω της βιοσυμβατότητά της, τη δυνατότητα

βιοαποδομησης σε φυσιολογικά συστατικά του σώματος, τη μη τοξικότητα, του γεγονότος ότι παρουσιάζει μηχανική σταθερότητα και εμφανίζει ελάχιστες αντιδράσεις ως ξένο σώμα στον ανθρώπινο οργανισμό. Επίσης, έχει βρεθεί ότι η πολυκατιονική της φύση ενισχύει την έλξη των κυττάρων σε αυτήν και εξαρτάται από το βαθμό αποκετυλίωσης της χιτοζάνης. Παρόλα αυτά, οι εφαρμογές της χιτοζάνης είναι περιορισμένες λόγω της μη διαλυτότητας της σε κοινούς οργανικούς διαλύτες και πλήρη διάλυσης σε υδατικά διαλύματα σε φυσιολογικό και όξινο pH, το οποίο είναι αποτέλεσμα των ισχυρών ενδομοριακών και διαμοριακών δυνάμεων υδρογόνου που λαμβάνουν χώρα. Επομένως, οι επιθυμητές λειτουργίες της για συγκεκριμένες εφαρμογές μπορούν να επιτευχθούν με χημικές τροποποιήσεις όπως είναι το εμβόλιασμα με συνθετικά πολυμερή. [5, 27-30]



Εικόνα 7: Χημική δομή της χιτίνης (chitin) [31].



Εικόνα 8: Χημική δομή της χιτοζάνης (chitosan) [31].

1.2.2. Πολύκαπρολακτόνη (poly(ϵ -caprolactone))

Η πολυκαπρολακτόνη (PCL) είναι ένας συνθετικός, γραμμικός, ημικρυσταλλικός, θερμοπλαστικός, βιοσυμβατός αλειφατικός πολυεστέρας και δημιουργείται μέσω πολυμερισμού, ανοίγοντας το δακτύλιο της ϵ -καπρολακτόνης. Είναι επίσης, βιοαποδομήσιμη και λόγω της αργής αποδόμησης της σε σχέση με άλλα πολυμερή, είναι πιο κατάλληλη για μακροπρόθεσμες εφαρμογές. Η πολυκαπρολακτόνη και τα προϊόντα αποδόμησης της, τα οποία είναι όξινα μονομερή και μπορούν να αφαιρεθούν από τον οργανισμό μέσω φυσιολογικών μεταβολικών οδών, είναι μη τοξικά, αν και τα προϊόντα αυτά της αποδόμησης μπορούν να οδηγήσουν σε παρενέργειες. Η πολυκαπρολακτόνη έχει θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης κοντά στους -60°C , χαμηλό σημείο τήξεως \sim περίπου 60°C , εξαρτάται από την κρυσταλλικότητα της- και μικρό ιζώδες, παραγόντες στους οποίους οφείλεται η δυνατότητα που διαθέτει για εύκολη κατεργασία. Χρησιμοποιείται στο χώρο της βιοϊατρικής ειδικά σε ιατρικές συσκευές, σε συστήματα απελευθέρωσης φαρμάκων

και ως υλικό για ικρίωμα στην Ιστική Μηχανική, όπου συχνά χρησιμοποιείται ως το κύριο συστατικό για την δημιουργία ιστών χόνδρου και οστών. Παρόλα αυτά, τα κύρια μειονεκτήματα της πολυκαπρολακτόνης είναι η έλλειψη λειτουργικών ομάδων και η υδροφοβικότητα, η οποία την αποτρέπει από την απορρόφηση πρωτεϊνών, την κυτταρική προσκόλληση και την κινητικότητα. Για να ξεπεραστούν τα εμπόδια αυτά η πολυκαπρολακτόνη μπορεί να αναμειχθεί με ένα φυσικό υδρόφιλο πολυμερές όπως είναι η χιτοζάνη. [32-35]



Εικόνα 9: Σχηματισμός της πολυκαπρολακτόνης μέσω ανοίγματος του δακτυλίου της ε-καπρολακτόνης [25].

1.2.3. Συμπολυμερές (chitosan-graft- poly(ε-caprolactone))

Επομένως, ο συνδυασμός της χιτοζάνης και της πολυκαπρολακτόνης προς σχηματισμό του συμπολυμερούς chitosan-graft-poly(ε-caprolactone) (CS-g-PCL) είναι πολλά υποσχόμενος, καθώς είναι αμφιφίλο αφού αποτελείται από υδρόφιλα μέρη της χιτοζάνης και υδρόφοβα μέρη της πολυκαπρολακτόνης. Αυτό το καινοτόμο συμπολυμερές είναι βιοσυμβατό και βιοαποδομήσιμο. Επίσης, παρουσιάζει κατιονική επιφάνεια η οποία συμβάλλει στην προσκόλληση των κυττάρων, καθώς επίσης παρουσιάζει διαλυτότητα σε υδατικά διαλύματα ή σε πολικούς ή μη πολικούς οργανικούς διαλύτες. Επιπλέον, η χιτοζάνη μπορεί αποτελεσματικά να ρυθμίσει τα όξινα προϊόντα της αποδόμησης της πολυκαπρολακτόνης. [28-29,33]

1.3. Νανοδιείσδυση

1.3.1. Τα πλεονεκτήματα της νανοδιείσδυσης

Οι τεχνικές διείσδυσης από τις οποίες μπορούν να διεξαχθούν αποτελέσματα για τις μηχανικές ιδιότητες των υλικών παρουσιάζουν πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλες παραδοσιακές τεχνικές.

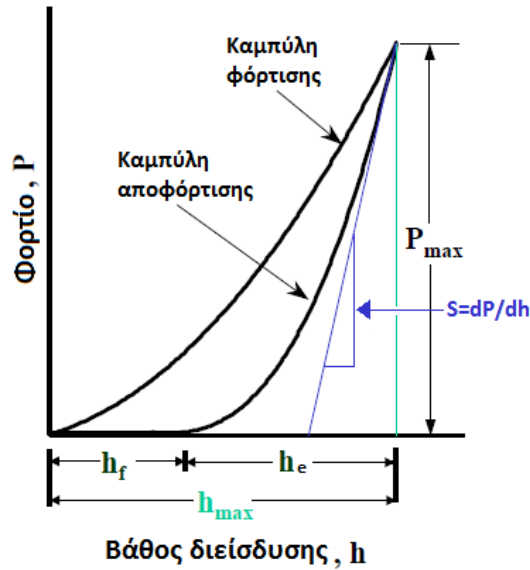
- Πολλά βιολογικά υλικά, ή και βιοϊατρικά όπως είναι τα ικρίωματα, είναι δύσκολο να τροποποιηθούν ώστε να έχουν την κατάλληλη γεωμετρία και τις κατάλληλες διαστάσεις για να πραγματοποιηθούν οι δοκιμές των μηχανικών ιδιοτήτων με πιο παραδοσιακές τεχνικές. Καθώς στην περίπτωση των παραδοσιακών τεχνικών η προετοιμασία αυτή του δείγματος μπορεί να έχει ως συνέπεια να επηρεάσει κατά πολύ το υλικό και τις ιδιότητες του σε αντίθεση με τη τεχνική της νανοδιείσδυσης.
- Για την τεχνική της νανοδιείσδυσης απαιτείται ελάχιστη προετοιμασία δείγματος και συνήθως είναι μη καταστρεπτικές [36].

- Τα βιολογικά υλικά και βιοϋλικά είναι ανομοιογενή. Η τεχνική της νανοδιείσδυσης παρέχει τη δυνατότητα της τοπικής χαρτογράφησης της ανομοιογένειας των υλικών αυτών, όπως είναι ανομοιογενείς ιστοί και τα πορώδη ικρίσματα.
- Τα κύτταρα έχουν διάμετρο περίπου 10 μm . Επομένως, λόγω της χρήσης της νάνο και μικρο κλίμακας, η τεχνική αυτή είναι κατάλληλη για τη μελέτη διεργασιών καθοδηγούμενων από τα κύτταρα, καθώς παρέχεται η δυνατότητα ανάλυσης τοπικού περιβάλλοντος των κυττάρων.
- Ακόμα, λόγω του μικρού όγκου δείγματος που απαιτείται από την τεχνική αυτή για τον προσδιορισμό των μηχανικών ιδιοτήτων, είναι ιδιαίτερα χρήσιμη στην περίπτωση εξέτασης πολύτιμων δειγμάτων όπως είναι τα απολιθώματα. [37]
- Επίσης, τα περισσότερα συστήματα που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη των νανομηχανικών ιδιοτήτων παρέχουν ένα σύστημα ελέγχου κατά το οποίο δίνεται η δυνατότητα για μελέτη διαφορετικών τρόπων επιβολής φορτίων αλλάζοντας τις πειραματικές παραμέτρους, όπως για παράδειγμα τη γεωμετρία της ακίδας και τις συνθήκες φόρτισης. [38]

1.3.2. Βασικές αρχές και μεγέθη της νανοδιείσδυσης

Κατά τη διάρκεια των τεχνικών νανοδιείσδυσης, που βασίζονται στη διείσδυση ακίδας στο δείγμα, πραγματοποιείται διαρκής καταγραφή του επιβαλλόμενου φορτίου και του βάθους διείσδυσης. Στόχος των περισσότερων δοκιμών νανοδιείσδυσης είναι ο προσδιορισμός του μέτρου ελαστικότητας και της σκληρότητας του υλικού του δείγματος. Στα πειράματα χρησιμοποιούνται ακίδες γνωστής γεωμετρίας με αποτέλεσμα να είναι δυνατός ο υπολογισμός του μεγέθους του αποτυπώματος που αφήνει η ακίδα στο δείγμα και στη συνέχεια ο προσδιορισμός της σκληρότητας του. Επίσης, μπορεί να υπολογιστεί το μέτρο ελαστικότητας αφού είναι δυνατός ο προσδιορισμός της ακαμψίας του υλικού από τα δεδομένα που λαμβάνονται κατά τη δοκιμή της νανοδιείσδυσης. [39]

Κατά τη νανοδιείσδυση όπως αναφέρθηκε πραγματοποιείται καταγραφή των δεδομένων φόρτισης και του βάθους διείσδυσης· αυτά τα δεδομένα αποτυπώνονται στις τυπικές καμπύλες φόρτισης–αποφόρτισης, οι οποίες είναι καμπύλες του εφαρμοζόμενου φορτίου (P) συναρτήσει του βάθους διείσδυσης (h) της ακίδας, όπως φαίνεται στην Εικόνα 10. Η ανάλυση των καμπυλών αυτών συνήθως βασίζεται στη θεωρία των Oliver και Pharr, οι οποίοι βασίστηκαν στις σχέσεις που ανέπτυξε ο Sneddon. Από τις καμπύλες αυτές μπορεί να προσδιοριστεί η ακαμψία (S) του υλικού του δείγματος και στη συνέχεια οι μηχανικές ιδιότητες του. [40]



Εικόνα 10: Τυπική καμπύλη φόρτισης – αποφόρτισης και απεικόνιση βασικών μεγεθών. [39-40]

Βασικά στοιχεία που απεικονίζονται στην Εικόνα 10.

P_{max} : το μέγιστο φορτίο που επιβάλλεται στο δείγμα

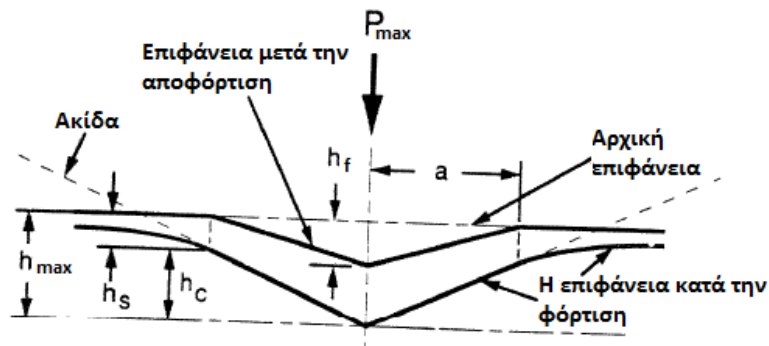
h_{max} : το μέγιστο βάθος διείδυσης της ακίδας

h_f : το τελικό βάθος διείδυσης που παραμένει μετά την απομάκρυνση της ακίδας.

Ισοδυναμεί με το βάθος διείδυσης που οφείλεται στην πλαστική παραμόρφωση

h_e : η μετατόπιση που σχετίζεται με την ελαστική επαναφορά κατά την αποφόρτιση

Παρακάτω στην Εικόνα 11 απεικονίζεται η μορφή που λαμβάνει το δείγμα κατά την νανοδιείδυση και κάποια χαρακτηριστικά μεγέθη όπως είναι το βάθος επαφής (contact depth) h_c το οποίο δηλώνει το βάθος διείδυσης στο οποίο έρχεται η ακίδα σε επαφή με το δείγμα. Το μέγεθος αυτό είναι αρκετά σημαντικό για τον υπολογισμό των νανομηχανικών ιδιοτήτων. Δεν είναι άμεσα μετρήσιμο, αλλά υπολογίζεται έμμεσα. Το μέγεθος h_s είναι η μετατόπιση της επιφάνειας περιμετρικά της ακίδας, όπως φαίνεται στην εικόνα. Ως a στην εικόνα συμβολίζεται η ακτίνα της ακίδας.



Εικόνα 11: Απεικόνιση διατομής της ακίδας κατά τη νανοδιείδυση, και κάποιων χαρακτηριστικών στοιχείων της γεωμετρίας του αποτυπώματος. [41]

1.3.3. Υπολογισμός σκληρότητας και μέτρου ελαστικότητας – Θεωρία Oliver-Pharr

Η σχέση στην οποία βασίστηκαν αρκετά οι Oliver και Pharr ήταν η σχέση μεταξύ βάθους διείδυσης και φορτίου, η οποία για απλές γεωμετρίες ακίδων, είναι:

$$P = a (h - h_f)^m \quad (1)$$

Όπου a είναι σταθερά και m σταθερά που σχετίζεται με τη γεωμετρία της ακίδας.

Η ακαμψία (S) προσδιορίζεται από τα πειραματικά δεδομένα. Υπολογίζεται από το άνω τμήμα της καμπύλης αποφόρτισης. Είναι ίση με την κλίση του γραμμικού τμήματος, δηλαδή της περιοχής που αντιστοιχεί στο ελαστικό τμήμα.

$$S = \frac{dP}{dh} \quad (2)$$

Ο προσδιορισμός του σύνθετου μέτρου ελαστικότητας (E_r) του συστήματος ακίδα-δείγμα πραγματοποιείται από τη σχέση (3) στην οποία η τιμή της ακαμψίας που χρησιμοποιείται προκύπτει από τη σχέση (2).

$$E_r = \frac{\sqrt{\pi}}{2} \cdot \frac{S}{\sqrt{A}} \quad (3)$$

Όπου A είναι το εμβαδόν της επιφάνεια επαφής στο μέγιστο βάθος διείδυσης.

Η σχέση (3) προέρχεται από τη θεωρία της ελαστικής επαφής και αρχικά προσδιορίστηκε για κωνική ακίδα, αλλά στη συνέχεια διαπιστώθηκε ότι ισχύει και για την κυλινδρική και για τη σφαιρική. Ενώ για ακίδες οι οποίες δεν παρουσιάζουν αξονοσυμμετρία –όπως είναι η τριγωνικής και τετράγωνης διατομής- χρησιμοποιείται ένας διορθωτικός παράγοντας β και η σχέση (3) λαμβάνει τη μορφή:

$$E_r = \frac{\sqrt{\pi}}{2\beta} \cdot \frac{S}{\sqrt{A}} \quad (4)$$

Από το σύνθετο μέτρο ελαστικότητας (E_r) είναι δυνατός ο προσδιορισμός του μέτρου ελαστικότητας του υλικού χρησιμοποιώντας την παρακάτω σχέση (5):

$$\frac{1}{E_r} = \frac{(1-\nu^2)}{E} + \frac{(1-\nu_i^2)}{E_i} \quad (5)$$

Όπου E και ν είναι το μέτρο ελαστικότητας και ο λόγος Poisson του δείγματος αντίστοιχα, ενώ E_i και ν_i είναι το μέτρο ελαστικότητας και ο λόγος Poisson του υλικού της ακίδας αντίστοιχα.

Επομένως, για τον υπολογισμό του σύνθετου μέτρου ελαστικότητας από την εξίσωση (3) –ή (4)- αρκεί να υπολογισθεί το εμβαδόν της επιφάνειας επαφής στο μέγιστο βάθος διείδυσης. Το εμβαδόν A αυτό, καθορίζεται από τη γεωμετρία της ακίδας και το βάθος επαφής h_c . Δεδομένου ότι η ακίδα δεν παραμορφώνεται σημαντικά το εμβαδόν A μπορεί να θεωρηθεί ότι είναι μία συνάρτηση του βάθους επαφής. Δηλαδή,

$$A = F(h_c) \quad (6)$$

Αρκεί επομένως να υπολογισθεί το βάθος επαφής h_c , που όπως αναφέρθηκε παραπάνω δεν είναι άμεσα μετρήσιμο μέγεθος, για να μπορέσει να γίνει ο υπολογισμός του σύνθετου μέτρου ελαστικότητας και στη συνέχεια της σκληρότητας (H).

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 11, για το βάθος επαφής ισχύει:

$$h_c = h_{\max} - h_s \quad (7)$$

Το μέγιστο βάθος διείσδυσης h_{max} μετρείται πειραματικά, άρα το ζήτημα υπάγεται τώρα στον υπολογισμό του h_s , το οποίο εξαρτάται από τη γεωμετρία της ακίδας. Ο Sneddon το υπολόγισε για κωνική ακίδα και χρησιμοποιώντας τις σχέσεις του είναι δυνατή η συσχέτιση του h_s με το μέγιστο επιβαλλόμενο φορτίο και την ακαμψία:

$$\left. \begin{aligned} h_s &= \frac{(\pi-2)}{\pi} (h - h_f) \\ (h - h_f) &= 2 \frac{P}{S} \end{aligned} \right\} h_s = \varepsilon \frac{P_{max}}{S} \quad (8)$$

όπου $\varepsilon = \frac{2}{\pi}(\pi - 2) = 0,72$ για κωνική ακίδα. Ενώ έχει δειχθεί ότι η σχέση (8) ισχύει και για διαφορετικές γεωμετρίες ακίδων (για την σφαιρική $\varepsilon=0,75$ [42]).

Έχοντας τις σχέσεις (8) και (7) είναι δυνατός ο υπολογισμός του εμβαδού της επιφάνειας επαφής A και κατά συνέπεια ο υπολογισμός του σύνθετου μέτρου ελαστικότητας (σχέση (4)).

Σύμφωνα με το μοντέλο Oliver – Pharr, η σκληρότητα, που ορίζεται ως η μέση πίεση που θα υποστηρίξει το υλικό κάτω από την επιβολή φορτίου, υπολογίζεται από τη παρακάτω σχέση (9), χρησιμοποιώντας τα πειραματικά δεδομένα και τη σχέση (6):

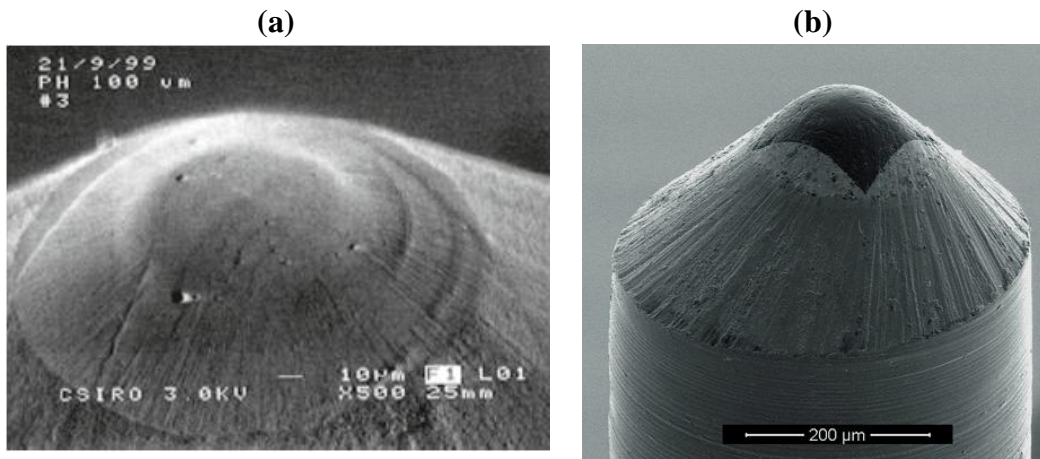
$$H = \frac{P_{max}}{A} \quad (9)$$

Όπου P_{max} είναι το μέγιστο επιβαλλόμενο φορτίο και A είναι το εμβαδόν της προκύπτουσας επιφάνειας επαφής. Όπως φαίνεται από τη σχέση (9) η τιμή της σκληρότητας αυτής υπολογίζεται με βάση την επιφάνεια επαφής στο μέγιστο φορτίο. Αυτό έχει ως συνέπεια κάποιες φορές η τιμή της σκληρότητας αυτής να διαφέρει από τη συμβατική σκληρότητα, διότι στην περίπτωση της συμβατικής σκληρότητας μετρείται άμεσα η επιφάνεια από παρατήρηση του αποτυπώματος, με αποτέλεσμα στις περιπτώσεις που είναι έντονη η ελαστική επαναφορά το εμβαδόν να είναι μικρότερο. [40-41,43]

1.3.4. Ακίδες – Επιφάνεια επαφής A

Κάποιες από τις πιο δημοφιλείς ακίδες που χρησιμοποιούνται για τη νανοδιείσδυση είναι η ακίδα Berkovich (τρίπλευρη πυραμίδα), η Vickers (τετράπλευρη πυραμίδα), η κωνική – κωνοσφαιρική, η σφαιρική και η κυλινδρική.

Για τη μελέτη των μαλακών υλικών με την τεχνική της νανοδιείσδυσης –όπως είναι και τα πολυμερή- η βιβλιογραφία προτείνει τη χρήση επίπεδων ακίδων για τη δημιουργία μεγαλύτερων επιφανειών επαφής που έχει ως αποτέλεσμα την αποφυγή της θραύσης του δείγματος [44], καθώς επίσης και τον καλύτερο προσδιορισμό της επιφάνειας επαφής μεταξύ ακίδας και δείγματος. Επίσης, προτείνεται η χρήση σφαιρικών ακίδων διότι μειώνεται η πλαστική παραμόρφωση και η συγκέντρωση των τάσεων γύρω από το αποτύπωμα της ακίδας [45]. Οι ακίδες αυτές προσφέρουν μία ομαλή μετάβαση από την ελαστική στην ελαστο-πλαστική επαφή. Για ευκολία στερέωσης τους είναι συνήθως φτιαγμένες ως κωνοσφαιρικές και κατά τη νανοδιείσδυση χρησιμοποιείται η άκρη της ακίδας που είναι σφαιρική [39] όπως φαίνεται στην Εικόνα 12. Χρησιμοποιώντας όποτε κωνοσφαιρικές ακίδες βελτιστοποιείται η νανοδιείσδυση αφού ελαττώνεται ο κίνδυνος καταστροφής του δείγματος ή η πλαστική παραμόρφωση του δείγματος [46].



Εικόνα 12: a) Κωνοσφαιρική ακίδα ακτίνας 100 μm, (μπάρα κλίμακας 10μm) [39]. b) Κωνοσφαιρική ακίδα ακτίνας 100μm (μπάρα κλίμακας 200μm) [47].

Στη συνέχεια ακολουθούν οι σχέσεις (10), (11) του εμβαδού της επιφάνειας επαφής A και του βάθους διείσδυσης h_c , για ιδανικές σφαιρικές και κωνικές ακίδες αντίστοιχα [39,48].

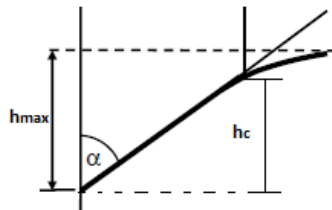
Για σφαιρικές ακίδες: $A = F(h_c) = \pi(2Rh_c - h_c^2)$ και στην περίπτωση που το βάθος διείσδυσης είναι μικρό σε σχέση με την ακτίνα της ακίδας γίνεται απλοποίηση και χρησιμοποιείται η εξής σχέση:

$$A = 2\pi R h_c \quad (10)$$

Για κωνικές ακίδες: $A = F(h_c) \Rightarrow A = \pi h_c^2 \tan^2 a$

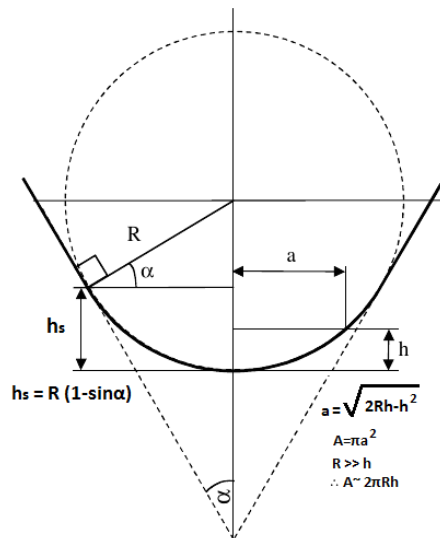
$$(11)$$

Όπου a είναι η γωνία όπως φαίνεται στην παρακάτω Εικόνα 13.



Εικόνα 13: Διατομή κωνικής ακίδας κατά τη νανοδιείσδυση, απεικόνιση της γωνίας a .

Στη συνέχεια στην Εικόνα 14 παρουσιάζεται κωνοσφαιρική ακίδα και οι σχέσεις του εμβαδού της επιφάνειας επαφής, για την οποία ισχύουν. Όπου h_s το βάθος διείσδυσης στο οποίο αλλάζει η συμπεριφορά της ακίδας από σφαιρική σε κωνική. Και h είναι οποιοδήποτε βάθος διείσδυσης το οποίο είναι μικρότερο από το h_s και όπως φαίνεται ισχύουν οι σχέσεις της σφαιρικής ακίδας.



Εικόνα 14: Κωνοσφαιρική ακίδα.

1.3.5. Παράγοντες που επηρεάζουν τα αποτελέσματα της νανοδιείσδυσης

Κατά τη νανοδιείσδυση μπορούν να προκύψουν διάφορα σφάλματα τα οποία συνδέονται με την τεχνική διαδικασία αλλά και με τη μέθοδο ανάλυσης. Στη συνέχεια ακολουθούν κάποιοι από τους παράγοντες που επηρεάζουν τα αποτελέσματα της νανοδιείσδυσης.

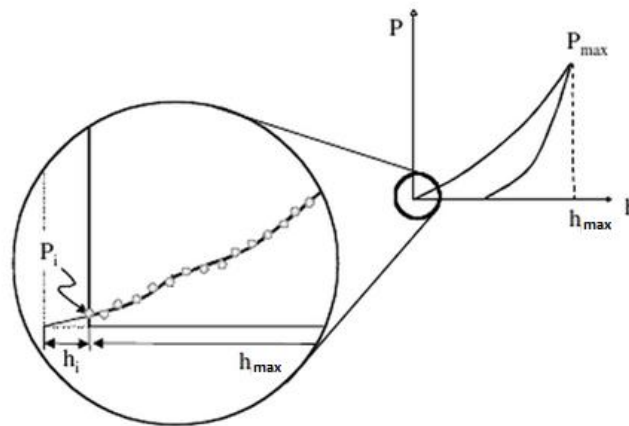
- Θερμική μετατόπιση:

Ένα φαινόμενο κατά το οποίο παρατηρείται μεταβολή του βάθους διείσδυσης υπό σταθερά επιβαλλόμενο φορτίο είναι η θερμική μετατόπιση (thermal drift). Ο λόγος εμφάνισης του είναι η θερμική διαστολή ή συστολή της συσκευής, με αποτέλεσμα να προκαλείται λάθος στην καταμέτρηση του πραγματικού βάθους διείσδυσης του υλικού του δείγματος. Για την αποφυγή σφαλμάτων λόγω του φαινομένου αυτού υπολογίζεται ο ρυθμός της θερμικής μετατόπισης από την πειραματική καταμέτρηση του ρυθμού αλλαγής του βάθους διείσδυσης υπό σταθερό επιβαλλόμενο φορτίο. Είναι προτιμότερο το σταθερά επιβαλλόμενο φορτίο να είναι χαμηλό καθώς είναι λιγότερο πιθανή η εμφάνιση ερπυσμού. Αν όμως, μελετώνται οι ιδιότητες του ερπυσμού τότε είναι προτιμότερο το σταθερά επιβαλλόμενο φορτίο να είναι το μέγιστο. Μετά τον υπολογισμό του ρυθμού θερμικής μετατόπισης, αυτός χρησιμοποιείται για την εξάλειψη των σφαλμάτων. [49]

- Αρχικό βάθος διείσδυσης:

Ιδανικά η καταμέτρηση του βάθους διείσδυσης θα πρέπει να ξεκινάει από την ελεύθερη επιφάνεια του δείγματος, όμως στην πράξη θα πρέπει η ακίδα πρώτα να έρθει σε πραγματική επαφή με την επιφάνεια του δείγματος για είναι δυνατή η δημιουργία σημείου αναφοράς. Κατά την πειραματική διαδικασία στόχος είναι το όσο το δυνατόν μικρότερο αρχικό βάθος διείσδυσης, επομένως επιβάλλεται όσο το δυνατόν μικρότερο φορτίο για την αρχική επαφή. Όσο μικρό όμως και αν είναι το φορτίο αυτό, πάντα λαμβάνει χώρα κάποια μετατόπιση όπως φαίνεται στην

Εικόνα 15. Το αρχικό αυτό βάθος διείδυσης h_i θα πρέπει στη συνέχεια να προστεθεί σε όλες τις τιμές βάθους διείδυσης που λήφθηκαν με βάση το εσφαλισμένο σημείο αναφοράς. [49]



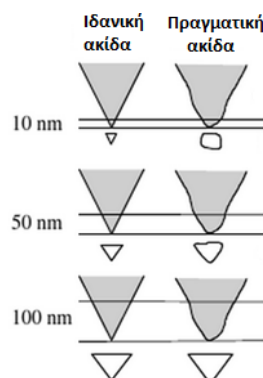
Εικόνα 15: Παρουσίαση του αποτελέσματος του αρχικού βάθους διείδυσης στις τυπικές καμπύλες φόρτισης-αποφόρτισης. P_i το αρχικό επιβαλλόμενο φορτίο για την πραγματοποίηση της αρχικής επαφής, h_i το αρχικό βάθος διείδυσης. [49]

- Βαθμονόμηση του συστήματος:

Πρέπει να πραγματοποιηθεί σωστή βαθμονόμηση του συστήματος, για τη δύναμη και τη μετατόπιση και σχετίζεται με την εύρεση της ενδοτικότητας (compliance) του συστήματος. [49]

- Πραγματική γεωμετρία της ακίδας:

Παραπάνω έχουν δοθεί οι σχέσεις (10), (11) οι οποίες αφορούν την επιφάνεια ιδανικών ακίδων. Στην πραγματικότητα όμως αυτές οι γεωμετρίες των ακίδων δεν είναι απόλυτα εφικτές. Ένας από τους λόγους που μπορεί να επηρεάσει τη γεωμετρία τους είναι η ανισοτροπία των κρυστάλλων του διαμαντιού. Στην παρακάτω Εικόνα 16 απεικονίζεται η διαφορά ανάμεσα στο αποτύπωμα που αφήνει μία ιδανική ακίδα από την πραγματική μη ιδανική. Θα πρέπει επομένως να συμπεριληφθεί κάποιος διορθωτικός παράγοντας στις σχέσεις (10) και (11), αλλά και γενικώς για όλες τις γεωμετρίες ακίδων, ώστε να γίνει ο σωστός προσδιορισμός της πραγματικής επιφάνειας επαφής και στη συνέχεια ο σωστός υπολογισμός των νανομηχανικών ιδιοτήτων.



Εικόνα 16: Σχηματική αναπαράσταση της διαφοράς του αποτυπώματος ιδανικής και πραγματικής ακίδας κωνικής γεωμετρίας και σε σχέση με το βάθος διείδυσης. [49]

Η εύρεση του διορθωτικού παράγοντα μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με τη βοήθεια χρήσης των οργάνων AFM ή SEM, ή χρησιμοποιώντας μία έμμεση μέθοδο προσδιορισμού. Κατά την έμμεση μέθοδο χρησιμοποιείται ένα πρότυπο υλικό με γνωστό μέτρο ελαστικότητας και λόγο Poisson και πραγματοποιούνται πολλές μετρήσεις σε αυτό για διάφορα μέγιστα επιβαλλόμενα φορτία. Στη συνέχεια χρησιμοποιώντας την εξίσωση (4) και λύνοντας ως προς A , υπολογίζεται η πραγματική επιφάνεια. Έχοντας αρκετά δεδομένα από πολλές μετρήσεις, είναι δυνατή η εύρεση μίας σχέσης μεταξύ της επιφάνειας επαφής της ιδανικής ακίδας και αυτής της πραγματικής. Η σχέση αυτή χρησιμοποιείται ως διορθωτικός παράγοντας στις σχέσεις εύρεσης του μέτρου ελαστικότητας και σκληρότητας. [49]

- Φαινόμενα *pile-up* και *sink-in*, δηλαδή η ανασήκωση ή η βύθιση του υλικού γύρω από την ακίδα, φαινόμενο που παρατηρείται κυρίως σε αξονοσυμμετρικές ακίδες:

Η μέθοδος Oliver-Pharr, λαμβάνει υπόψη το φαινόμενο *sink-in* αλλά όχι την περίπτωση του φαινομένου *pile-up*. Αυτό έχει ως συνέπεια αν λαμβάνει χώρα το δεύτερο φαινόμενο να υπάρξουν πιθανώς σφάλματα [50].

- Η τραχύτητα της επιφάνειας:

Ο λόγος που προκαλούνται σφάλματα λόγω της φυσικής τραχύτητας των πραγματικών επιφανειών, είναι επειδή η επιφάνεια επαφής A υπολογίζεται έμμεσα από το βάθος διείσδυσης, οπότε τελικά υπολογίζεται με σφάλματα. Υπάρχουν τρόποι αντιμετώπισης των σφαλμάτων. Επίσης έχει προταθεί και η χρήση ενός καινούριου μέτρου: H/E^2 που είναι μέτρο της αντίστασης του υλικού στην πλαστική παραμόρφωση και είναι λιγότερο ευαίσθητο στις επιδράσεις της τραχύτητας της επιφάνειας. [49]

- Παραμένουσες τάσεις:

Υπάρχει περίπτωση τα υλικά των δειγμάτων να παρουσιάζουν παραμένουσες τάσεις, θλιπτικές ή εφελκυστικές. Έχουν αναπτυχθεί κάποιες μέθοδοι για τον προσδιορισμό του επιπέδου των παραμενουσών τάσεων και μία από αυτές είναι η εξέταση του σχήματος του *pile-up* που δημιουργείται στις άκρες του κύκλου επαφής. [49]

- Παράγοντες οι οποίοι σχετίζονται με τις ιδιαιτερότητες των υλικών.

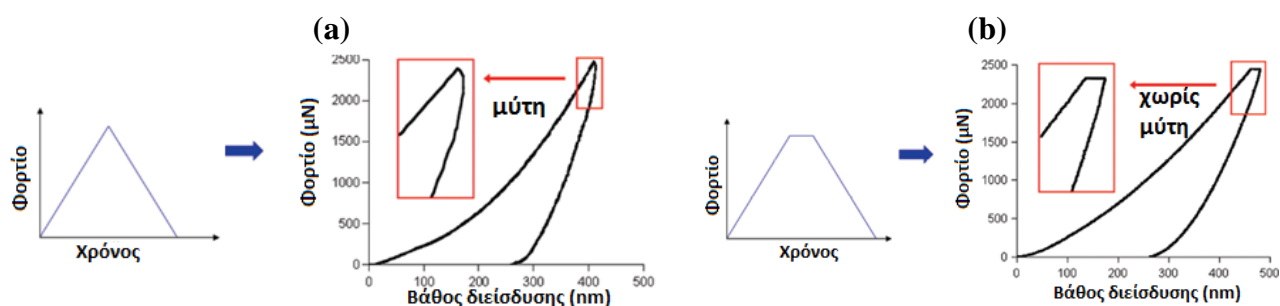
1.3.5.1. Ιδιαιτερότητες των πολυμερών

Τεχνικές ανάλυσης οι οποίες βασίζονται στον υπολογισμό της σκληρότητας και του μέτρου ελαστικότητας από τη καμπύλη αποφόρτισης, όπως είναι και η μέθοδος των Oliver – Pharr, μπορεί να οδηγήσουν σε μεγάλα σφάλματα όταν πρόκειται για υλικά με χρονοεξαρτώμενη μηχανική συμπεριφορά στα οποία εμφανίζεται το φαινόμενο του ερπυσμού [51]. Τέτοια υλικά μπορούν να είναι και τα πολυμερή. Συγκεκριμένα τα σφάλματα που μπορούν να προκληθούν είναι υπερεκτίμηση του μέτρου ελαστικότητας και λάθη στον προσδιορισμό της συνάρτησης του εμβαδού της επιφάνειας επαφής κατά τη διάρκεια της βαθμονόμησης [36]. Η μέθοδος των Oliver – Pharr αναπτύχθηκε για ελαστικά και ελαστο-πλαστικά υλικά, για αυτό και παρουσιάζονται σφάλματα όταν χρησιμοποιείται για την ανάλυση ιξωδοελαστικών υλικών, όμως το σύνθετο μέτρο ελαστικότητας που υπολογίζεται αναμένεται να

μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως σχετικό μέτρο της ακαμψίας για διαφορετικά υλικά τα οποία μετρήθηκαν κάτω από τις ίδιες συνθήκες φόρτισης [52].

Φαινόμενο «μύτης»

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, κάποια πολυμερή παρουσιάζουν χρονοεξαρτώμενη ή ιξωδοελαστική συμπεριφορά της οποίας το πιο εύκολα παρατηρήσιμο αποτέλεσμα είναι ο ερπυσμός. Όταν ο ερπυσμός είναι πιο έντονος από την ελαστική ανταπόκριση του υλικού τότε παρουσιάζεται αρνητική ακαμψία [51] καθώς στην καμπύλη αποφόρτισης στο άνω άκρο παρατηρείται το φαινόμενο «μύτης» (“nose effect”). Παρατηρείται δηλαδή, ότι μετά την επιβολή του μέγιστου φορτίου και κατά τα αρχικά στάδια της αποφόρτισης, το βάθος διείσδυσης αυξάνεται λόγω του ερπυσμού καθώς ο ρυθμός του είναι μεγαλύτερος από αυτό του ρυθμού αποφόρτισης, όπως φαίνεται στην Εικόνα 17a. Επομένως, αυτό καθιστά τον υπολογισμό του μέτρου ελαστικότητας με τη μέθοδο που συζητήθηκε παραπάνω μη αποδεκτή. Για την αποφυγή του φαινομένου «μύτης» και τον υπολογισμό του μέτρου ελαστικότητας χωρίς σημαντικά σφάλματα, χρησιμοποιείται μία πειραματική μέθοδος, κατά την οποία προστίθεται χρόνος παραμονής του υλικού στο μέγιστο επιβαλλόμενο φορτίο έτσι ώστε να φθάσει σε ισορροπία ο ρυθμός ερπυσμού πριν ξεκινήσει η αποφόρτιση. Το διάστημα του χρόνου παραμονής εξαρτάται από το ρυθμό ερπυσμού και αυτόν της αποφόρτισης. Από παραδείγματα στη βιβλιογραφία, ο χρόνος παραμονής ήταν από 3s έως 120s. Τελικά δηλαδή, η συνάρτηση του επιβαλλόμενου φορτίου σε σχέση με το χρόνο λαμβάνει τραπεζοειδή μορφή, όπως φαίνεται στην Εικόνα 17b. Πέρα από την πειραματική μέθοδο που εξηγήθηκε –η οποία χρησιμοποιήθηκε και στην εργασία αυτή– υπάρχουν και άλλες μέθοδοι οι οποίες πραγματοποιούνται με τη χρήση διαφόρων μαθηματικών μοντέλων [45].

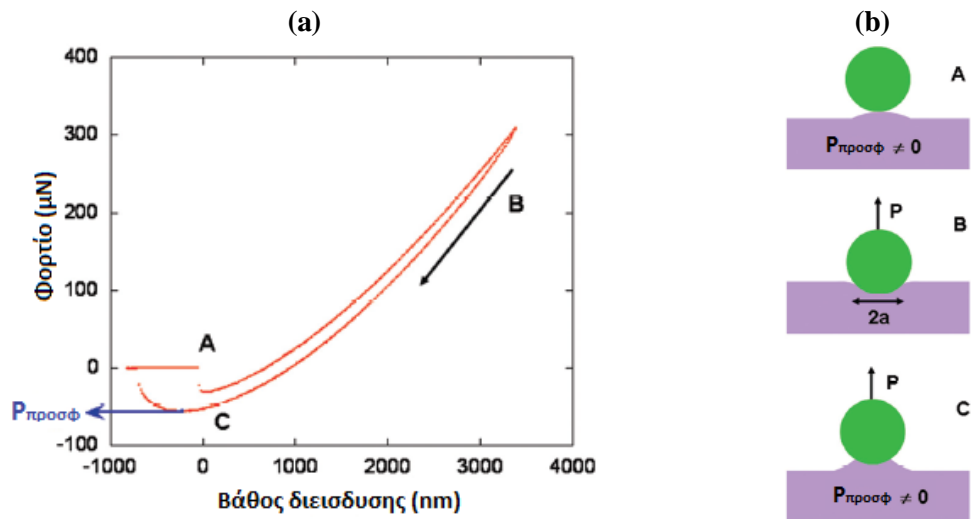


Εικόνα 17: a) Τριγωνική συνάρτηση επιβολής φορτίου σε σχέση με το χρόνο με αποτέλεσμα το φαινόμενο «μύτης». b) Τραπεζοειδής συνάρτηση επιβολής φορτίου σε σχέση με το χρόνο με αποτέλεσμα την αποφυγή του φαινομένου «μύτης». [45]

Πρόσφυση

Ένα άλλο φαινόμενο που μπορεί να παρατηρηθεί στα πολυμερή, είναι αυτό της πρόσφυσης. Σε αυτή την περίπτωση υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ της ακίδας και του δείγματος, με συνέπεια η τιμή του μέτρου ελαστικότητας που υπολογίζεται σύμφωνα με την παραπάνω μέθοδο να μην είναι ακριβής αλλά να είναι υπερεκτιμημένη στην περίπτωση που η πρόσφυση είναι σημαντική. Όπως φαίνεται

στην Εικόνα 18a, διαπιστώνεται η ύπαρξη της πρόσφυσης όταν στις τυπικές καμπύλες φόρτισης-αποφόρτισης εμφανίζεται αρνητικό φορτίο [53]. Για την αποφυγή σφάλματος στον υπολογισμό του μέτρου ελαστικότητας χρησιμοποιούνται μαθηματικά μοντέλα που έχουν αναπτυχθεί. [45]



Εικόνα 18: Πρόσφυση. a) Καμπύλη φόρτισης-αποφόρτισης στην οποία παρατηρείται το φαινόμενο της πρόσφυσης. b) Σχηματική αναπαράσταση της αλληλεπίδρασης ακίδας-δείγματος, δηλαδή του φαινομένου πρόσφυσης.

Κεφάλαιο 2. Πειραματικό μέρος

2.1 Δοκίμια

2.1.1 Υλικά

Η ϵ -Caprolactone αγοράστηκε από τη Fluka. Η chitosan (MW=110-150 kDa, με βαθμό αποκετυλίωσης DD=75% όπως προσδιορίστηκε από ^1H NMR) [54], ενώ από τη Sigma αγοράστηκαν τα: Tin(II) 2-ethylhexanoate [$\text{Sn}(\text{Oct})_2$], glycolic acid, sodium dodecyl sulfate (SDS), N,N' dicyclohexylcarbodiimide (DCC) και Nhydroxysuccinimide (NHS). Όλα τα υπόλοιπα χημικά και οι διαλύτες ήταν αναλυτικής καθαρότητας και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

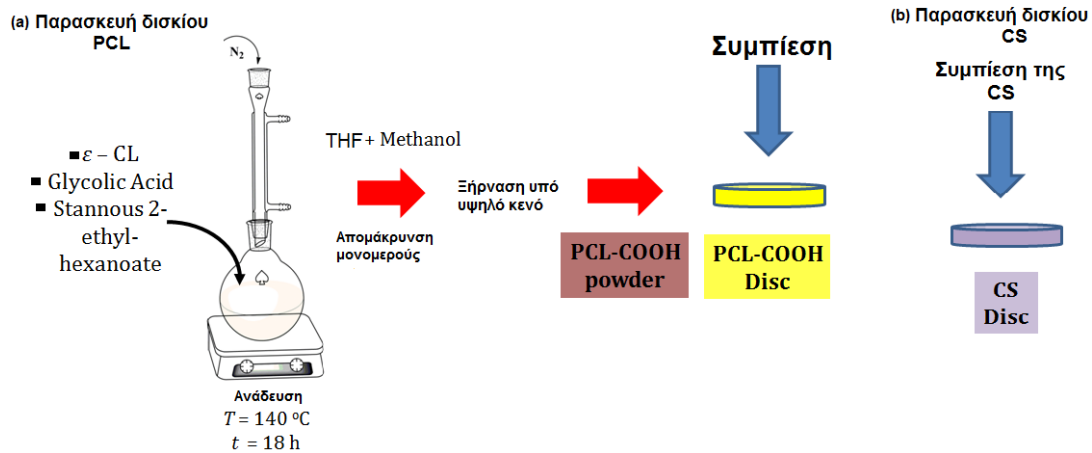
2.1.2 Σύνθεση/Παρασκευή δοκιμίων

Παρασκευή της πολυκαπρολακτόνης: Σε στρογγυλή φιάλη προστέθηκαν ϵ -Caprolactone (ϵ -CL) (10.0 g, 87.6 mmol), glycolic acid (0.22 g, 2.9 mmol) και stannous 2-ethyl-hexanoate (0.0048 g, 0.012 mmol). Στη συνέχεια η φιάλη υπο ατμόσφαιρα N_2 θερμάνθηκε στους 140°C για 18 h και βρισκόταν υπο συνεχή ανάδευση. Το στερεό που λήφθηκε αφού έλαβε τη θερμοκρασία δωματίου διαλύθηκε μέσα σε tetrahydrofuran (THF) και χύθηκε μέσα σε methanol για να απομακρυνθεί το μονομερές που δεν αντέδρασε. Έπειτα το προϊόν ξηράνθηκε υπό υψηλό κενό και ληφθήκε σκόνη PCL με ομάδες καρβοξυλικού οξέος στα άκρα. Στη συνέχεια η σκόνη αυτή υπέστη μηχανική πίεση για να παραχθεί το δισκίο της PCL.

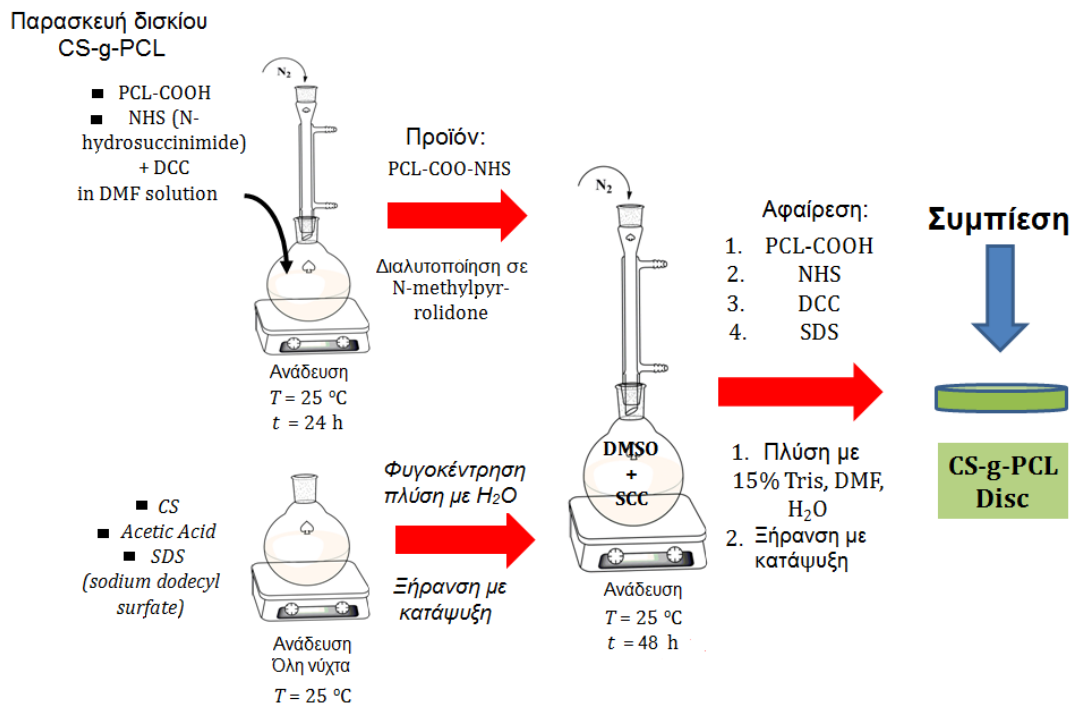
Παρασκευή της χιτοζάνης: Στη συνέχεια μετά τη σύνθεση της PCL-COOH, ακολουθεί η σύνθεση της χιτοζάνης. Για τη σύνθεση του δισκίου χιτοζάνης η εμπορικά διαθέσιμη σκόνη χιτοζάνης συμπιέστηκε μηχανικά προς την παρασκευή του δείγματος.

Παρασκευή του συμπολυμερούς: Για τη σύνθεση του δισκίου του συμπολυμερούς πραγματοποιήθηκε η τροποποίηση της χιτοζάνης σε πρώτη φάση, και ακολούθησε η περαιτέρω μορφοποίηση της PCL-COOH, για να γίνει εφικτή η σύνδεση των δυο υλικών. Αρχικά ετοιμάστηκε ένα σύμπλοκο μεταξύ CS και SDS (SCC) διαλύοντας τη χιτοζάνη (0.8 g, 4.9 mmol της επαναλαμβανόμενης μονάδας) σε 200 ml διάλυμα 2 % v/v acetic acid. Μετά την πλήρη διαλυτοποίηση, προστέθηκε sodium dodecyl sulfate (SDS) (2.8 g, 9.8 mmol) στο διάλυμα της χιτοζάνης και αφέθηκε όλη τη νύχτα σε θερμοκρασία δωματίου, υπό συνεχή ανάδευση. Έπειτα το ίζημα συλλέχθηκε μέσω φυγοκέντρησης και ξεπλύθηκε αρκετές φορές με υπερκαθαρό νερό. Με ξήρανση με κατάψυξη λήφθηκε ένα λευκό σπογγώδες προϊόν. Στη συνέχεια, δημιουργήθηκε η μορφή του ενεργού εστέρα του PCL-COOH, διαλύοντας PCL-COOH ($0,16\text{g}, 3.1 \times 10^{-5}$ mol), N-hydroxysuccinimide (NHS) (7.1 mg, 6.2×10^{-5} mol) και 1,3-dicyclohexylcarbodiimide (DCC, 13 mg, 6.3×10^{-5} mol) σε 50 ml dimethylformamide (DMF). Το μείγμα αυτό αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου υπό ατμόσφαιρα N_2 για 24 h και στη συνέχεια διηθήθηκε. Το διήθημα ξηράνθηκε υπό κενό για να δώσει δραστικό παράγωγο εστέρα (PCL-COO-NHS). Το παραπάνω προϊόν έπειτα,

επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 5 ml N-methylpyrrolidinone και μετά προστέθηκε σε διάλυμα των SCC σε dimethyl sulfoxide (DMSO) ενώ ήταν υπό συνεχή ανάδευση. Η αντίδραση ήταν συνεχής υπό ατμόσφαιρα N₂ σε θερμοκρασία δωματίου για 48 h και μετά πραγματοποιείται διαπήδηση (dialysis) με χρήση DMSO (μεμβράνη MWCO 8000) για να αφαιρεθούν PCL-COOH που δεν αντέδρασε και περίσσεια των NHS και DCC. Τελικά, το SDS αφαιρέθηκε από το συμπολυμερές SCC-g-PCL με καθίζηση μέσα σε υδατικό διάλυμα 15% tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris). Το ίζημα απομονώθηκε μέσω φυγοκέντρησης, ξεπλύθηκε αρκετές φορές με 15% Tris διάλυμα, DMF και υπερκαθαρό νερό και τελικά ξηράνθηκε με κατάψυξη για να ληφθεί το συμπολυμερές CS-g-PCL. Στη συνέχεια η σκόνη αυτή υπέστη μηχανική πίεση και λήφθηκε έτσι το δισκίο του συμπολυμερούς CS-g-PCL.



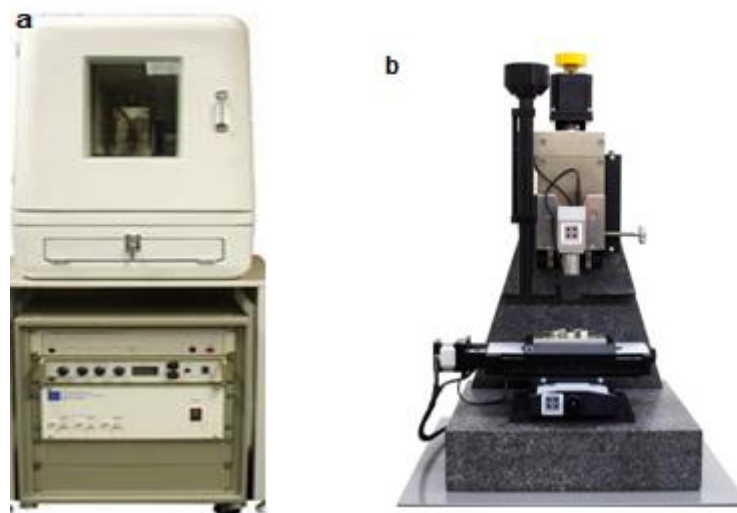
Εικόνα 19: Σχηματικά η σύνθεση του δισκίου (a) PCL και (b) CS.



Εικόνα 20: Σχηματικά η σύνθεση του δισκίου του συμπολυμερούς CS-g-PCL.

2.2 Νανοδιείσδυση

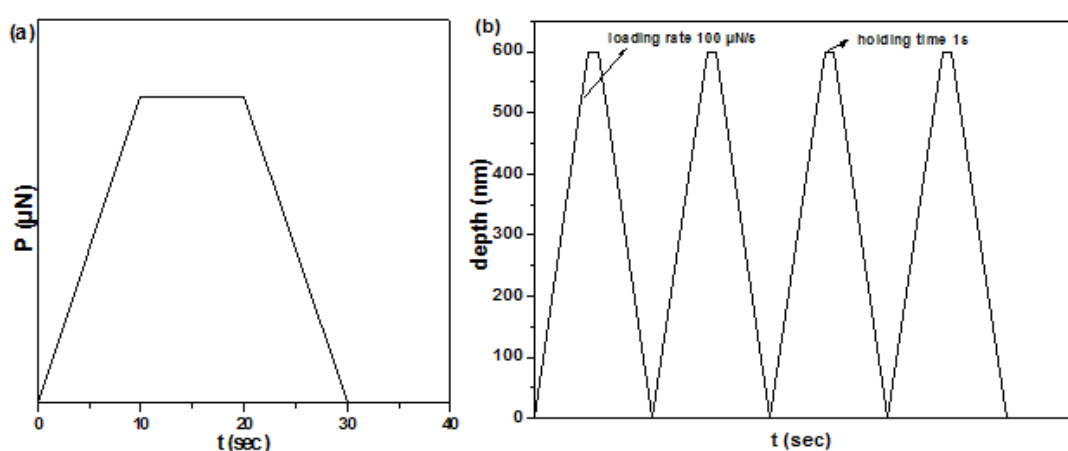
Οι δοκιμές νανοδιείσδυσης πραγματοποιήθηκαν με το όργανο νανοδιείσδυσης Hysitron TriboLab®, χρησιμοποιώντας ένα δι-διάστατο μετατροπέα δύναμης μετατόπισης. Το όργανο έχει τη δυνατότητα να εφαρμόζει φορτία μεταξύ του εύρους των 1-10.000 μN με πολύ υψηλή διακριτική ικανότητα του 1 nN, ενώ το μέγιστο βάθος διείσδυσης που μπορεί να καταγεγραφεί είναι 3000 nm (3 μm) με επίσης υψηλή διακριτική ικανότητα των 0.04 nm. Η ακίδα που χρησιμοποιήθηκε, για την πραγματοποίηση των μετρήσεων των τιμών σκληρότητας (H) και σύνθετου μέτρου ελαστικότητας (E_r), ήταν από διαμάντι και κωνοσφαιρική γεωμετρία, με ακτίνα καμπυλότητας 50 μm . Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε καθαρό περιβάλλον με ~45% υγρασία και σε θερμοκρασία δωματίου 23°C [55]. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν, ένα κάθε φορά, πάνω στην X-Y τράπεζα του οργάνου. Οι τιμές σκληρότητας (H) και σύνθετου μέτρου ελαστικότητας (E_r) εξάγονται από τα πειραματικά δεδομένα χρησιμοποιώντας τη μέθοδο των Oliver και Pharr, βασιζόμενοι στην υπόθεση της ελαστικής θεωρίας και της θεωρίας των μηχανικών επαφής [41, 56-57].



Φωτογραφία 1: a) το όργανο και b) η διάταξη της νανοδιείσδυσης

Για τα δείγματα της PCL, CS και του συμπολυμερούς CS-g-PCL διεξήχθησαν πειράματα προφίλ βάθους (depth profile) χρησιμοποιώντας τη μέθοδο με ελεγχόμενο φορτίο, όπου το φορτίο ακολουθεί μία τραπεζοειδή καμπύλη κατά την οποία η διάρκεια φόρτισης, χρόνου παραμονής και αποφόρτισης διαρκούν 10s η κάθε μία όπως φαίνεται στην Εικόνα 21 (a). Πραγματοποιήθηκαν πειράματα πρόσφυσης τα οποία διεξήχθησαν με τη μέθοδο ελεγχόμενης μετατόπισης για ρυθμό φόρτισης 50 $\mu\text{N/s}$ και μέγιστο βάθος διείσδυσης 200 και 800 nm. Στη συνέχεια ακολούθησαν και άλλες δοκιμές για διάφορα μέγιστα φορτία (500-4000 μN για τα δοκίμια CS και PCL, ενώ 50-500 μN για το δοκίμιο του συμπολυμερούς CS-gPCL) κατά τις οποίες χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικοί ρυθμοί φόρτισης (5, 25 και 50 $\mu\text{N/s}$) για τη μελέτη της χρονοεξαρτώμενης συμπεριφοράς. Ακόμη για τη μελέτη της ιξωδοελαστικής συμπεριφοράς πραγματοποιήθηκαν δοκιμές με διαφορετικούς χρόνους παραμονής (1, 10 και 100 s) στο μέγιστο φορτίο. Ακολούθησαν πειράματα σε δοκίμια του

συμπολυμερούς τα οποία είχαν εμβαπτισθεί σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα με pH 7.4 (Phosphate Buffered Saline, PBS) για 6 εβδομάδες, το ένα υπό στατικές συνθήκες και το άλλο υπο αναδευόμενες. Στα δοκίμια αυτά πραγματοποιήθηκαν δοκιμές νανοδιείσδυσης για διαφορετικούς ρυθμούς φόρτισης (25 και 50 $\mu\text{N/s}$ για το δείγμα υπό στατικές συνθήκες, 5 και 10 $\mu\text{N/s}$ για το δείγμα υπό αναδευόμενες συνθήκες) για μέγιστα φορτία 50, 100 και 200 μN , για τη μελέτη της χρονοεξαρτώμενης συμπεριφοράς. Τέλος, για αυτά τα δύο δοκίμια καθώς και για το δοκίμιο του συμπολυμερούς όπως παράχθηκε, πραγματοποιήθηκαν πειράματα 4 επαναλαμβανόμενων κύκλων φόρτισης όπως φαίνεται στην Εικόνα 21 (b) και διεξήχθησαν και συγκρίθηκαν οι τιμές σκληρότητας, σύνθετου μέτρου ελαστικότητας και διαχεόμενης ενέργειας.



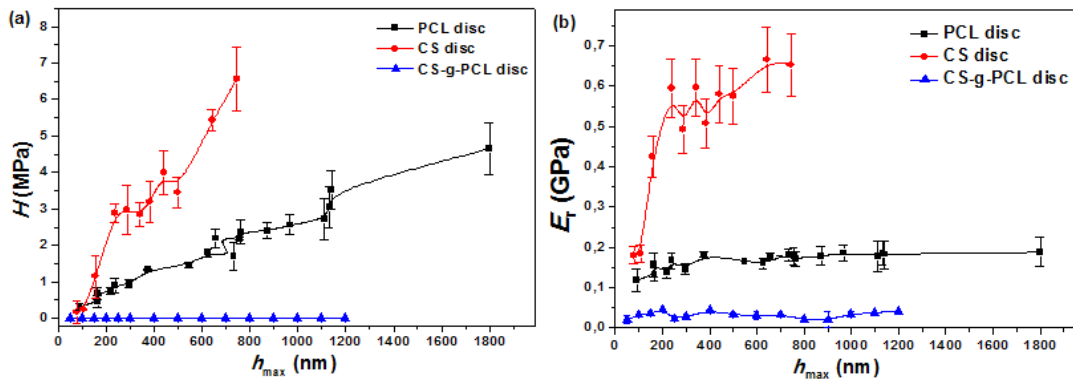
Εικόνα 21: Καμπύλες σύμφωνα με τις οποίες η ακίδα πραγματοποιεί τις μετρήσεις. a) Μέθοδος ελεγχόμενου επιβαλλόμενου φορτίου, κατά την οποία το φορτίο ακολουθεί τραπεζοειδή καμπύλη. b) Τέσσερις επαναλαμβανόμενοι κύκλοι φόρτισης-αποφόρτισης, κατά τους οποίους ελεγχόμενο είναι το βάθος διείσδυσης.

Αφού ολοκληρώθηκαν τα πειράματα αυτά, ακολούθησε η εμβάπτιση των δειγμάτων CS, PCL και CS-g-PCL σε θρεπτικό μέσο *a*-MEM εμπλουτισμένο με 10% βόειο ορό πλάσματος (FBS) για συνολικά 4 εβδομάδες. Σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα (2, 24, 72, 120, 168, 336, 504, 672 h) πραγματοποιούνταν μετρήσεις νανοδιείσδυσης για τον προσδιορισμό της σκληρότητας και του σύνθετου μέτρου ελαστικότητας.

Κεφάλαιο 3. Παρουσίαση και Συζήτηση Πειραματικών Αποτελεσμάτων

3.1 Αποτελέσματα Σκληρότητας (H) και Σύνθετου Μέτρου Ελαστικότητας (E_r)

Στο Κεφάλαιο 2.2 περιγράφηκε η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη μέτρηση των νανομηχανικών ιδιοτήτων των υλικών. Αρχικά, όπως έχει ήδη γραφτεί, έχουν πραγματοποιηθεί μετρήσεις σε διαφορετικά επιβαλλόμενα φορτία και ακολουθείται η ίδια μορφή καμπύλης, επομένως ο επιβαλλόμενος ρυθμός φόρτισης μεταβάλλεται όσο αυξάνεται το φορτίο. Από τις παραπάνω μετρήσεις εξήχθησαν τα αποτελέσματα H και E_r συναρτήσει του μέγιστου βάθους διείσδυσης και παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 1. Υψηλότερες τιμές σκληρότητας (Διάγραμμα 1a) παρατηρούνται για τη CS στη συνέχεια για την PCL και πολύ μικρότερες για το συμπολυμερές. Γενικά παρατηρείται αυξητική τάση για τη σκληρότητα των δειγμάτων με την αύξηση του βάθους διείσδυσης. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία [58-59] για μικρά βάθη διείσδυσης -σε σχέση με την ακτίνα της ακίδας- οι τιμές της σκληρότητας εξαρτώνται από το βάθος, καθώς επηρεάζονται από τη γεωμετρία της ακίδας. Συγκεκριμένα, αναφέρεται, για ιδανική κωνική ακίδα με σφαιρικό τελείωμα και δείγμα έλαστο-πλαστικό, οι τιμές της σκληρότητας αυξάνονται καθώς αυξάνεται το βάθος διείσδυσης επειδή αλλάζει η καμπυλότητα της ακίδας με την οποία έρχεται σε επαφή το δείγμα. Επομένως η αύξηση της σκληρότητας που παρατηρείται οφείλεται στην κωνο-σφαιρική ακίδα 50 μm ακτίνας καμπυλότητας που χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση των πειραμάτων. Η αύξηση της σκληρότητας που παρατηρείται, με την αύξηση του επιβαλλόμενου φορτίου (ή αύξηση του βάθους διείσδυσης), μπορεί να οφείλεται στο αντίστροφο φαινόμενο μεγέθους κατά τη σκληρομέτρηση (Reverse Indentation Size Effect - RISE) [60]. Κατά αυτό το φαινόμενο το δείγμα υπόκειται σε χαλάρωση, η οποία σχετίζεται με απελευθέρωση τάσης, κατά μήκος της επιφάνειας, μακριά από το σημείο της διείσδυσης και μπορεί να προκαλείται για παράδειγμα από δημιουργία ρωγμών [61]. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μεγαλύτερου μεγέθους αποτυπώματος με συνέπεια τη μικρότερη τιμή σκληρότητας για τα μικρότερα επιβαλλόμενα φορτία [62]. Όμως, το φαινόμενο RISE, μέχρι σήμερα δεν είναι πλήρως κατανοητό [63]. Στην επιφάνεια η CS και η PCL παρουσιάζουν σχεδόν ίδια τιμή σκληρότητας (0,2-0,3 MPa αντίστοιχα). Αντίστοιχα με τη σκληρότητα, μεγαλύτερες τιμές σύνθετου μέτρου ελαστικότητας (Διάγραμμα 1b) παρουσιάζει η CS, με κατά 71% μικρότερη τιμή ακολουθεί η PCL και τέλος το συμπολυμερές. Είναι αναμενόμενο οι τιμές του E_r να είναι ανεξάρτητες από το βάθος διείσδυσης, από ένα βάθος διείσδυσης και πάνω, αφού πρόκειται για ιδιότητα του υλικού. Για την PCL και το συμπολυμερές εμφανίζονται μικρές αυξομειώσεις φτάνοντας την τιμή των 0,2 GPa και 0,03 GPa, αντίστοιχα. Για τη CS παρατηρείται από τα 200nm μέχρι τα 400 nm μεγάλη αύξηση των τιμών E_r και ακολουθεί σταθεροποίηση (0,7 GPa).



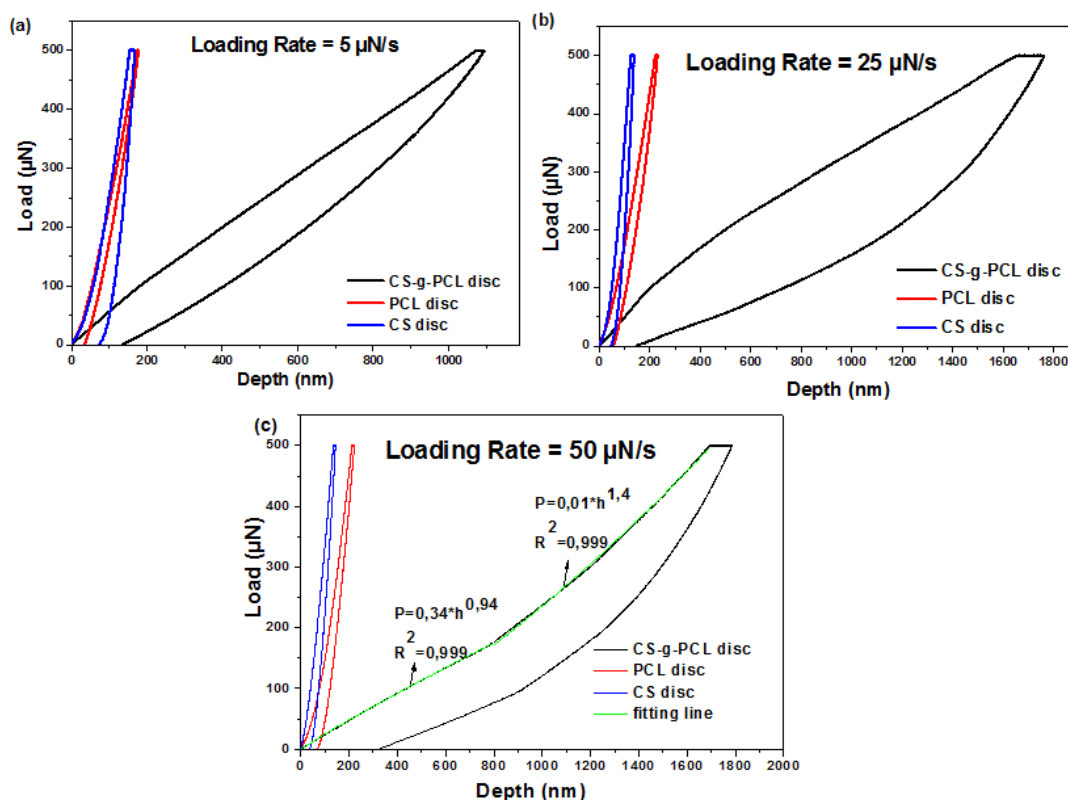
Διάγραμμα 1: Σύγκριση τιμών (a) H και (b) E_t για τα δείγματα CS, PCL, CS-g-PCL.

Η πιθανή αιτία για την οποία η CS παρουσιάζει υψηλότερες τιμές H και E_t είναι η δημιουργία δεσμών υδρογόνων που αναπτύσσονται μεταξύ των αλυσίδων του πολυμερούς λόγω της ύπαρξης αμινο-ομάδων και υδροξυλομάδων. Ενώ οι χαμηλές τιμές H και E_t που παρουσιάζει το δοκίμιο του συμπολυμερούς CS-g-PCL σε σχέση με τα δύο πολυμερή οφείλεται στη πιθανή μη συνεκτική δομή του. Όπως επίσης από μία πρόσφατη έρευνα [64] βρέθηκε ότι με τη παραγωγική διαδικασία [65] που χρησιμοποιήθηκε στο συγκεκριμένο πείραμα για την παρασκευή του συμπολυμερούς, η ποσότητα της PCL που έχει εμβολιαστεί είναι πολύ μικρή καθιστώντας έτσι αυτήν την παραγωγική διαδικασία όχι και τόσο ωφέλιμη για την παραγωγή του συμπολυμερούς, ενισχύοντας έτσι τις υποψίες για τη μη συνεκτική δομή του δοκιμίου. Άλλωστε, η CS και PCL είναι θερμοδυναμικά μη αναμίξιμα πολυμερή, αλλά μπορεί να επιτευχθεί ανάμιξη τους όταν χρησιμοποιηθούν κατάλληλες μέθοδοι προετοιμασίας των υλικών που επιδρούν στους δεσμούς υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ της CS και της PCL, έτσι ώστε να επιτευχθεί σε ένα βαθμό συμβατότητα [66]. Τέλος, σημειώνεται ότι η σύνδεση μεταξύ της CS και της PCL μέσω των δεσμού υδρογόνου που αναπτύσσονται, πραγματοποιείται μόνο όταν υπάρχει άμορφη κατάσταση, οπότε μειώνεται η κρυσταλλικότητα της PCL κατά την ανάμιξη [67], με αποτέλεσμα τις μειωμένες μηχανικές ιδιότητες του συμπολυμερούς.

3.2 Καμπύλες φόρτισης αποφόρτισης

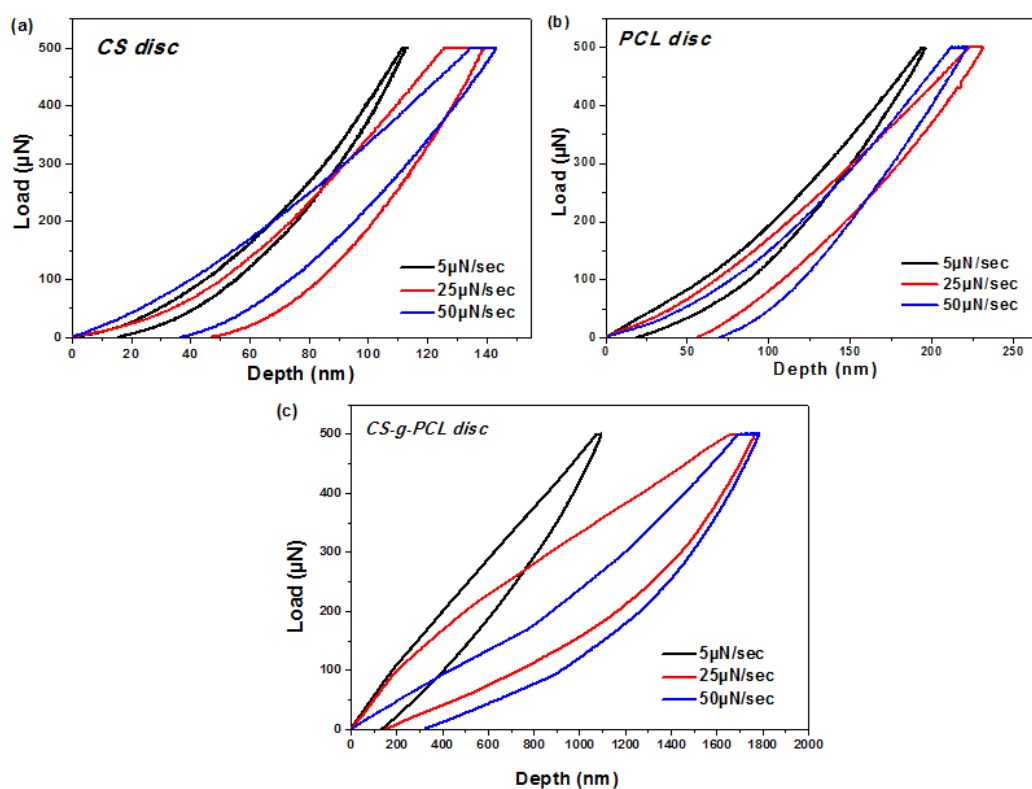
Τα πολυμερή παρουσιάζουν χρονοεξαρτώμενη συμπεριφορά [68], δηλαδή επηρεάζονται από το ρυθμό φόρτισης και αποφόρτισης. Η εξάρτηση των τιμών H και E_t από το ρυθμό φόρτισης οφείλεται στην ιξώδη συμπεριφορά τους κυρίως. Επομένως, για να ελεγχθεί η χρονοεξαρτώμενη συμπεριφορά των δειγμάτων πραγματοποιούνται μετρήσεις με διαφορετικό ρυθμό φόρτισης, με στόχο να παρατηρηθεί κατά πόσο αλλάζει η απόκριση των υλικών στα επιβαλλόμενα φορτία αλλά και οι τιμές H και E_t . Στο Διάγραμμα 2 που ακολουθεί παρατίθενται τυπικές καμπύλες φόρτισης αποφόρτισης για διαφορετικούς ρυθμούς φόρτισης για όλα τα δείγματα. Όπως είναι αναμενόμενο και για τα τρία δοκίμια με την αύξηση του επιβαλλόμενου φορτίου αυξάνεται το βάθος διείσδυσης. Η CS και η PCL παρουσιάζουν μεγάλη αντίσταση προς τα επιβαλλόμενα φορτία για κάθε ρυθμό φόρτισης. Τα δείγματα παρουσιάζουν παρόμοια ελαστοπλαστική συμπεριφορά σε

κάθε ρυθμό φόρτισης. Αντίθετα όμως, το συμπολυμερές CS-g-PCL παρουσιάζει μικρότερη αντίσταση στο επιβαλλόμενο φορτίο των 500 μN συγκριτικά με τα δείγματα CS και PCL. Επίσης, παρατηρείται για το συμπολυμερές ότι όταν ο ρυθμός φόρτισης αυξάνει (25 και 50 $\mu\text{N/s}$) το δείγμα παρουσιάζει μικρότερη αντίσταση συγκριτικά με το μικρό ρυθμό φόρτισης, ενώ παράλληλα παρατηρούνται αλλαγές στην κλίση των καμπυλών φόρτισης. Συγκεκριμένα, η αλλαγή στην κλίση σημειώνεται στο Διάγραμμα 2c, όπου έχει πραγματοποιηθεί εκθετική προσαρμογή στα τμήματα της καμπύλης φόρτισης πριν και μετά την αλλαγή στην κλίση (~800 nm) και παρατηρείται αύξηση στον εκθετικό παράγοντα n από 0,94 σε 1,4. Από τη βιβλιογραφία, ο εκθέτης στον εκθετικό νόμο (power law) του Sneddon: $P = \alpha \cdot h^n$ όπου P το επιβαλλόμενο φορτίο, h η μετατόπιση και α σταθερά, λαμβάνει διαφορετικές τιμές ανάλογα με τη γεωμετρία της ακίδας. Για επίπεδες είναι 1, για παραβολικές και σφαιρικές σε μικρές μετατοπίσεις 1,5 και για κωνικές είναι 2 [69]. Είναι επομένως φανερό ότι για τα μικρά βάθη διείσδυσης ο εκθετικός παράγοντας βρίσκεται κοντά στη μονάδα καθώς λόγω της πολύ μεγάλης ακτίνας της κωνοσφαιρικής ακίδας (50 μm) σε σχέση με το βάθος διείσδυσης το δείγμα «αντιλαμβάνεται» μία επίπεδη ακίδα. Ενώ στα μεγαλύτερα βάθη διείσδυσης μετά την αλλαγή της κλίσης ο εκθετικός παράγοντας πλησιάζει την τιμή 1,5 υποδηλώνοντας ότι το δείγμα του συμπολυμερούς «αντιλαμβάνεται» την ακίδα ως σφαίρα ή ως παραβολοειδές. Γεγονός το οποίο βρίσκεται σε συμφωνία με τα παραπάνω σχόλια για την αλλαγή της γεωμετρίας και της καμπυλότητας της ακίδας που έρχεται σε επαφή με το δείγμα κατά την διάρκεια της νανοδιείσδυσης.



Διάγραμμα 2: Καμπύλες φόρτισης αποφόρτισης για CS, PCL, CS-g-PCL, για ρυθμούς φόρτισης (a) 5 $\mu\text{N/s}$, (b) 25 $\mu\text{N/s}$ και (c) 50 $\mu\text{N/s}$.

Παρακάτω στο Διάγραμμα 3 παρουσιάζονται οι τυπικές καμπύλες φόρτισης-αποφόρτισης σε σχέση με το βάθος διείδυσης για το κάθε δείγμα συγκριτικά με τους ρυθμούς φόρτισης. Είναι φανερό πως όλα τα δείγματα παρουσιάζουν χρονοεξαρτώμενη συμπεριφορά με το συμπολυμερές CS-g-PCL να εμφανίζει την πιο έντονη καθώς για μεγαλύτερους ρυθμούς φόρτισης (25μN/sec, 50 μN/sec) παρουσιάζει μεγαλύτερο μέγιστο βάθος διείδυσης. Επίσης υπάρχει ένδειξη ότι το δείγμα του δισκίου του συμπολυμερούς παρουσιάζει τη μεγαλύτερη πλαστική παραμόρφωση σε σχέση με το δείγμα της CS και της PCL αφού το τελικό βάθος (h_f) μετά την αποφόρτιση του δείγματος του CS-g-PCL είναι μεγαλύτερο (~200nm-300nm) σε σχέση με τα άλλα δύο δείγματα (μικρότερα από 80nm). Τέλος, είναι φανερό ότι η CS και η PCL παρουσιάζουν μεγαλύτερη ακαμψία σε σχέση με το συμπολυμερές αφού για ίδιο μέγιστο επιβαλλόμενο φορτίο το βάθος διείδυσης που προκύπτει είναι σημαντικά μικρότερο από του CS-g-PCL. Η χαμηλότερη ακαμψία του συμπολυμερούς πιθανότατα οφείλεται στη μη συνεκτική δομή του και στη μειωμένη κρυσταλλικότητα του.

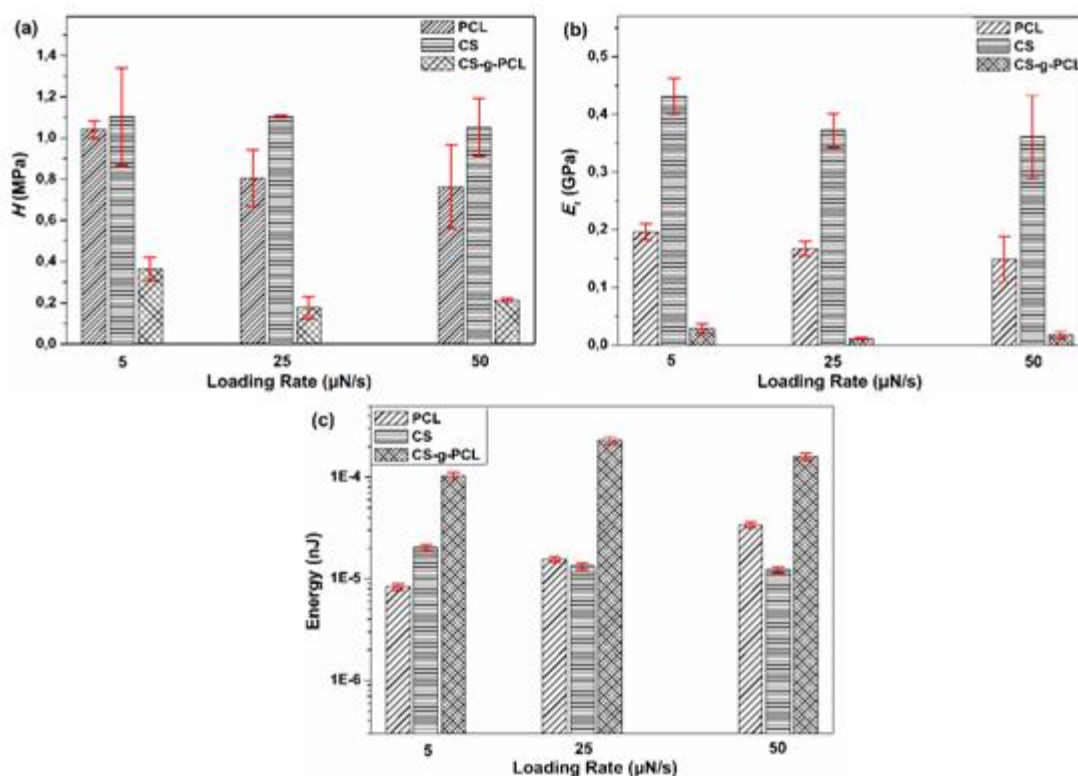


Διάγραμμα 3: Καμπύλες φόρτισης αποφόρτισης στους διαφορετικούς ρυθμούς φόρτισης (5 μN/s, 25 μN/s και 50 μN/s) για τα δείγματα (a) CS, (b) PCL και (c) CS-g-PCL.

Στο Διάγραμμα 4 που ακολουθεί παρουσιάζονται οι τιμές H (4a) και E_r (4b), όπως υπολογίστηκαν σύμφωνα με τη θεωρία των Oliver και Pharr, καθώς και η ενέργεια που αποθηκεύεται, σε σχέση με τους διαφορετικούς ρυθμούς φόρτισης. Παρατηρείται πως και για τα τρία δείγματα οι τιμές H και E_r μεταβάλλονται, για τους διαφορετικούς ρυθμούς φόρτισης. Συγκεκριμένα μειώνονται με την αύξηση του ρυθμού φόρτισης. Όπως έχει σημειωθεί και εξηγηθεί και παραπάνω (κεφάλαιο 3.1) αντίστοιχα και εδώ φαίνεται ότι η CS παρουσιάζει τις υψηλότερες τιμές H και E_r , ενώ

το συμπολυμερές τις χαμηλότερες λόγω της μη συνεκτικής του δομής και των άμορφων περιοχών του.

Στο Διάγραμμα 4 (c) παρουσιάζεται η αποθηκευμένη ενέργεια μεταξύ της καμπύλης φόρτισης και αποφόρτισης για όλα τα δείγματα και για τους τρεις διαφορετικούς ρυθμούς φόρτισης. Γενικά παρατηρείται ότι για το συμπολυμερές η πλαστική παραμόρφωση είναι μεγαλύτερη σε σχέση με τα άλλα δύο δείγματα καθώς η ενέργεια που αποθηκεύεται είναι συγκριτικά μεγαλύτερη. Γεγονός το οποίο βρίσκεται σε συμφωνία με τα σχόλια που έγιναν προηγουμένως για το Διάγραμμα 3. Παρατηρείται ότι το δείγμα της CS δεν επηρεάζεται από την αλλαγή του ρυθμού φόρτισης σε αντίθεση με τα δείγματα της PCL και του CS-g-PCL, όπου παρατηρείται αύξηση της αποθηκευμένης ενέργειας, δηλαδή της πλαστικής παραμόρφωσης, με την αύξηση του ρυθμού φόρτισης και πιθανώς οφείλεται στη μηχανική πίεση που υπέστησαν τα δείγματα κατά την παραγωγή των δισκίων.



Διάγραμμα 4: (a) Τιμές σκληρότητας H , (b) τιμές σύνθετου μέτρου ελαστικότητας E_r , και (c) τιμές αποθηκευμένης ενέργειας για τα δείγματα CS, PCL και CS-g-PCL, για διαφορετικούς ρυθμούς φόρτισης (5, 25, 50 $\mu\text{N}/\text{sec}$)

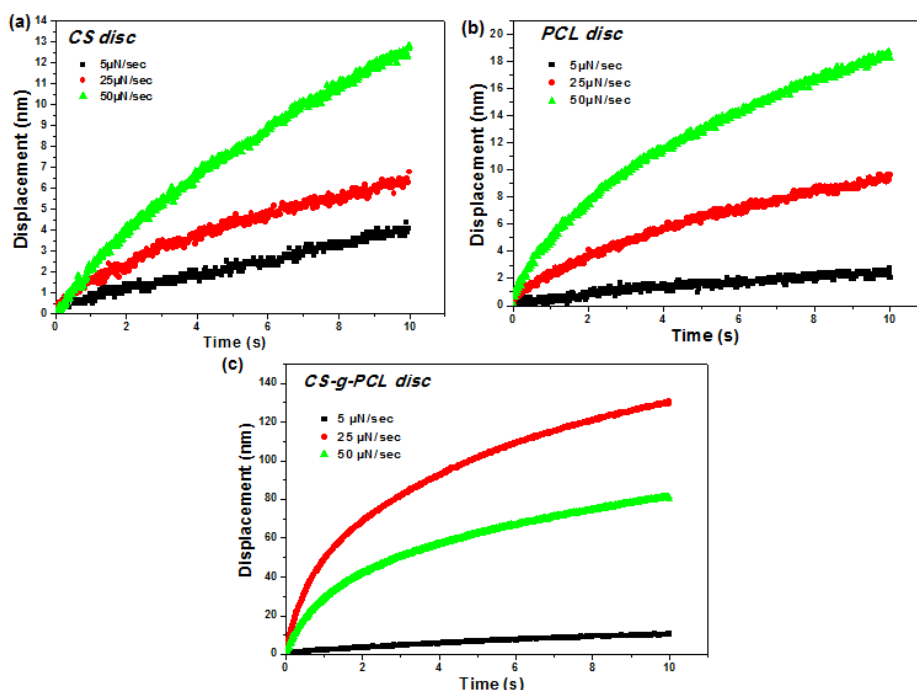
3.3 Ερπυσμός

Οι διαφορετικοί ρυθμοί φόρτισης όπως αναφέρθηκε παραπάνω επηρεάζουν τη συμπεριφορά των υλικών που παρουσιάζουν χρονοεξάρτηση, μεταβάλλοντας τις μετρούμενες τιμές H και E_r , αλλά και τον ερπυσμό που παρουσιάζουν τα υλικά υπό σταθερά επιβαλλόμενα φορτία. Ο ερπυσμός που παρουσιάζουν τα υλικά γενικά επηρεάζεται από πολλές παραμέτρους. Κυρίως επηρεάζεται από το ρυθμό φόρτισης.

Στο Διάγραμμα 5 που ακολουθεί παρουσιάζονται τα γραφήματα βάθους διείδυσης συναρτήσει του χρόνου παραμονής (hold time) στο μέγιστο επιβαλλόμενο φορτίο το οποίο είναι 500μN.

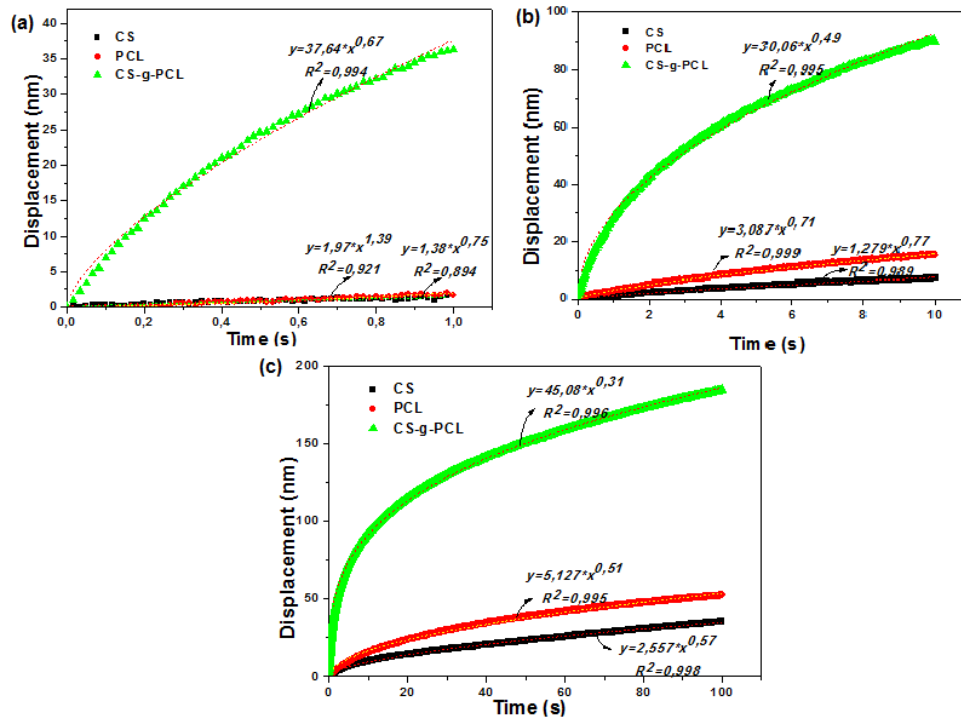
Αρχικά παρατηρείται ότι με την αύξηση του ρυθμού φόρτισης αυξάνεται το βάθος διείδυσης κατά το διάστημα που παραμένει η ακίδα στη δομή των δειγμάτων υπό σταθερό φορτίο και για τα τρία δείγματα. Αυτό υποδηλώνει ότι τα υλικά όταν υπόκεινται σε γρήγορες φορτίσεις έρπονται, διότι δεν δίνεται χρόνος (χρονοεξαρτώμενη συμπεριφορά) στα ιξωδοελαστικά υλικά να παραμορφωθούν παράλληλα με την ακίδα [70]. Επίσης, αυτή η παραμόρφωση που ακολουθεί επηρεάζεται και από πιθανή διαφορετική μετατόπιση των εσωτερικών στρωμάτων κάτω από την ακίδα, η οποία προκαλείται από τους διαφορετικούς ρυθμούς φόρτισης [70]. Συγκρίνοντας τα δείγματα της CS και της PCL παρατηρείται ότι το φαινόμενο του ερπυσμού είναι πιο έντονο για τη PCL, λόγω της χρονοεξαρτώμενης και ιξωδοελαστικής συμπεριφοράς που παρουσιάζει. Από την άλλη μεριά το συμπολυμερές παρουσιάζει την πιο έντονη μετατόπιση κατά το πείραμα ερπυσμού, λόγω της μη συνεκτικής δομής του και την επίδραση της PCL.

Συνοψίζοντας, οι μεγαλύτεροι ρυθμοί φόρτισης και οι μεγάλοι χρόνοι παραμονής στο μέγιστο επιβαλλόμενο φορτίο ενδείκνυνται για τον προσδιορισμό των μηχανικών ιδιοτήτων των υλικών, διότι το φαινόμενο του ερπυσμού εξελίσσεται σε στατικές συνθήκες και δίνεται η δυνατότητα επαναφοράς του υλικού μαζί με την ακίδα κατά την αποφόρτιση. Όμως κατά τη διάρκεια των πειραμάτων παρατηρήθηκε ότι για υψηλούς ρυθμούς φόρτισης υπήρχε απώλεια δεδομένων, ένδειξη κατάρρευσης των δειγμάτων, λόγω της σύνθεσης τους, με συνέπεια να επιλεγθούν μικρότεροι ρυθμοί φόρτισης, οι οποίοι είναι πιο κατάλληλοι.



Διάγραμμα 5: Βάθος διείδυσης συναρτήσει του χρόνου παραμονής στο μέγιστο επιβαλλόμενο φορτίο για διαφορετικούς ρυθμούς φόρτισης (5, 25 και 50 μN/s) για τα δείγματα CS, PCL και CS-g-PCL.

Στη συνέχεια στο Διάγραμμα 6 παρουσιάζεται πως επηρεάζεται ο ερπυσμός των δειγμάτων αυξάνοντας το χρόνο παραμονής στο μέγιστο επιβαλλόμενο φορτίο. Για όλα τα δείγματα ο ρυθμός φόρτισης είναι ίδιος (50 μN/s). Παρατηρείται ότι η PCL εμφανίζει μεγαλύτερη παραμόρφωση λόγω ερπυσμού σε σχέση με τη CS. Το γεγονός αυτό οφείλεται πιθανότατα στο ότι η PCL γενικώς παρουσιάζει σημαντικά χαμηλότερη θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης (T_g) σε σχέση με τη CS, οι οποίες είναι -60°C και $140-150^{\circ}\text{C}$ αντίστοιχα [71-72]. Όπως έχει αναφερθεί στην παράγραφο 2.2 της πειραματικής διαδικασίας, τα πειράματα διεξήχθησαν σε θερμοκρασία δωματίου. Κατά συνέπεια, το δοκίμιο της PCL υπέστη τις πειραματικές δοκιμασίες της νανοδιείσδυσης σε θερμοκρασίες υψηλότερες της T_g , επομένως οι αλυσίδες του πολυμερούς αυτού ήταν ελεύθερες να χαλαρώσουν κατά τη διάρκεια του χρόνου παραμονής όπου επιβαλλόταν σταθερό φορτίο. Σε αντίθεση με το δοκίμιο της CS το οποίο υπέστη τις πειραματικές δοκιμές σε θερμοκρασία χαμηλότερη από αυτή της T_g , έχοντας ως συνέπεια οι αλυσίδες της CS να μη βρίσκονται σε ιξώδη κατάσταση. Σημαντικά υψηλότερη παραμόρφωση λόγω ερπυσμού παρουσιάζει το συμπολυμερές CS-g-PCL, υποδηλώνοντας υψηλότερη ιξώδη συμπεριφορά. Η συμπεριφορά αυτή του συμπολυμερούς οφείλεται στη T_g της PCL, στη μη συνεκτική δομή του καθώς και σε μία πιθανή καταστολή της κρυστάλλωσης τόσο της CS καθώς και της PCL λόγω του εμβολιασμού (graftication) [73]. Το φαινόμενο του ερπυσμού που παρατηρείται, ειδικά για το CS-g-PCL δοκίμιο έχει ως αποτέλεσμα την υπερεκτίμηση των τιμών του E_r [74]. Παρόλα αυτά, οι λαμβανόμενες τιμές του σύνθετου μέτρου ελαστικότητας όλων των δοκιμών παρέχουν ένα μέτρο σύγκρισης της σχετικής ακαμψίας, ελαστικότητας καθώς και της ψαθυρής συμπεριφοράς, αφού όλες οι πειραματικές δοκιμές πραγματοποιήθηκαν κάτω από τις ίδιες συνθήκες φόρτισης [75].



Διάγραμμα 6: Βάθος διείσδυσης συναρτήσει του χρόνου παραμονής στο μέγιστο επιβαλλόμενο φορτίο για τα δείγματα CS, PCL και CS-g-PCL και για χρόνους 1, 10 και 100 s.

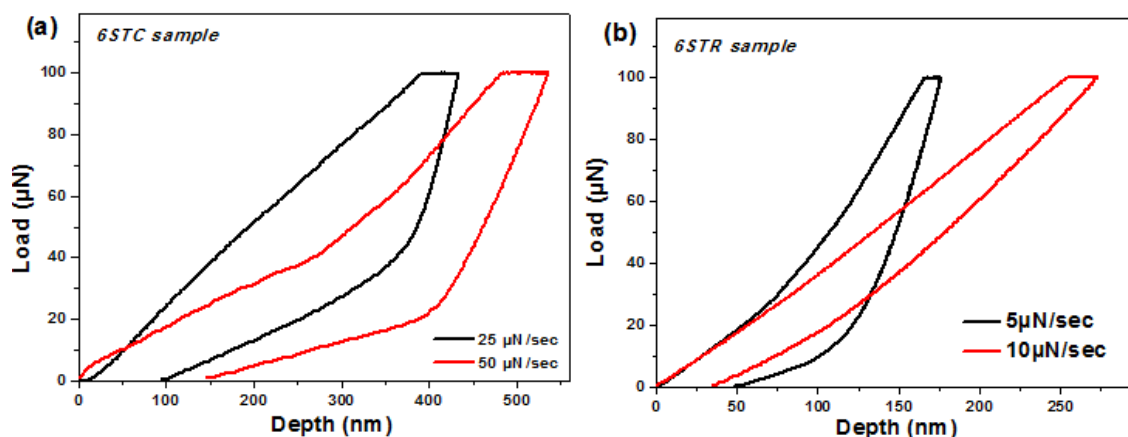
3.4 Σύγκριση δειγμάτων μετά από εμβάπτιση σε θρεπτικό υλικό για 6 εβδομάδες (μετά από ξήρανση)

Κατά την πειραματική διαδικασία μελετήθηκαν οι νανομηχανικές ιδιότητες δειγμάτων που είχαν εμβαπτιστεί σε PBS για διάστημα 6 εβδομάδων. Τα δείγματα βρίσκονταν σε στατικές (6STC) και υπό ανάδευση (6STR) συνθήκες, με στόχο να μελετηθεί η απώλεια μάζας και η διαφοροποίηση των μηχανικών ιδιοτήτων. Η απώλεια μάζας ήταν 12% για το δείγμα CS-g-PCL υπό σταθερές συνθήκες και 17% για το δείγμα CS-g-PCL υπό ανάδευση, γεγονός λογικό, καθώς στην περίπτωση των συνθηκών υπό ανάδευση, το δείγμα υπόκειται και σε μηχανική καταπόνηση.

Τα δείγματα 6STC και 6STR ήταν διογκωμένα και παρουσίαζαν πολύ μεγάλη τραχύτητα. Επίσης, δεν ακουμπούσαν καλά στην τράπεζα, δηλαδή δεν εφαπτόταν η κάτω πλευρά απόλυτα στην τράπεζα διότι δεν υπήρχε λεία επιφάνεια, με αποτέλεσμα την ανομοιομορφία των αποτελεσμάτων. Τα δείγματα παρουσίασαν αυτή την μορφή λόγω της αποδόμησης που είχαν υποστεί και της μετέπειτα ξήρανσης.

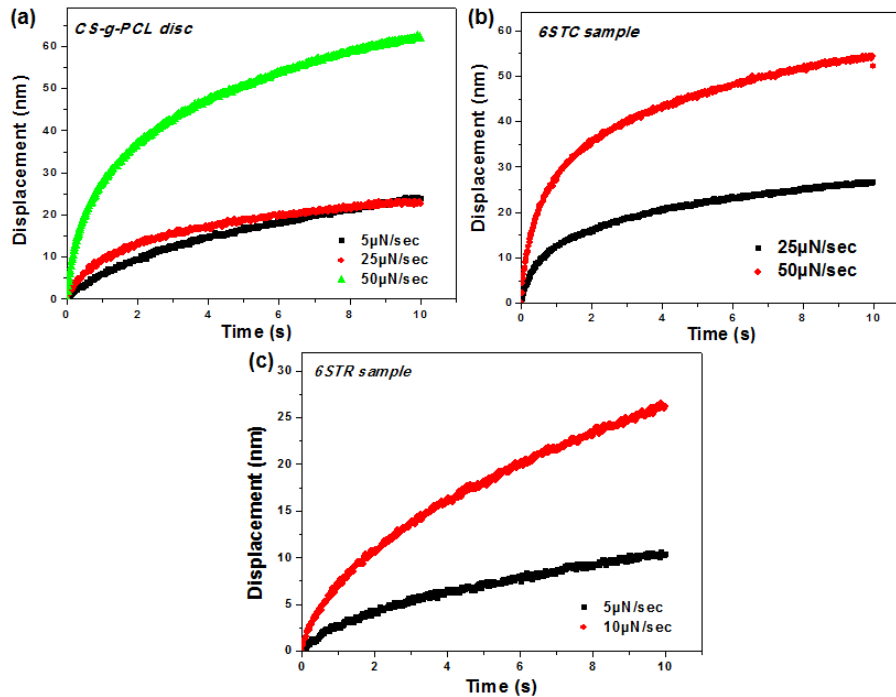
Παρακάτω στο Διάγραμμα 7 παρουσιάζονται τυπικές καμπύλες φόρτισης-αποφόρτισης των δειγμάτων του συμπολυμερούς 6STC και 6STR, αφού ακολούθησε ξήρανση, για διαφορετικούς ρυθμούς φόρτισης, όπως σημειώνονται στα διαγράμματα. Αρχικά παρατηρείται ότι τα δείγματα 6STC, 6STR συνεχίζουν να εμφανίζουν χρονοεξαρτώμενη συμπεριφορά, καθώς επηρεάζονται από το ρυθμό φόρτισης όπως φαίνεται από τις καμπύλες. Με αύξηση του ρυθμού φόρτισης, υπάρχει αύξηση του μέγιστου βάθους διείδυσης, όπως παρατηρήθηκε και στο Διάγραμμα 3 για τα αρχικά δείγματα. Επίσης, παρατηρείται ότι τα δείγματα 6STC και 6STR εμφανίζουν ελαστο-πλαστική συμπεριφορά, με έντονες αλλαγές κλίσης και φαινόμενα “elbow”. Οι έντονες αλλαγές κλίσης και τα φαινόμενα elbow, οφείλονται στην ψαθυρή συμπεριφορά των υλικών λόγω της αποδόμησης που είχαν υποστεί και της ξήρανσης.

Από τα πειράματα επαναλαμβανόμενων κύκλων φόρτισης που θα αναλυθούν και θα συζητηθούν παρακάτω ήταν φανερό ότι το δείγμα 6STC εμφανίζει μικρότερη αντίσταση στα επιβαλλόμενα φορτία από το συμπολυμερές CS-g-PCL όπως παράχθηκε. Το δείγμα 6STR όμως εμφανίζει τη μικρότερη αντίσταση σε σχέση με τα άλλα δύο δείγματα, δηλαδή τη μικρότερη ακαμψία, καθώς για το ίδιο μέγιστο βάθος διείδυσης (600 nm) το φορτίο που απαιτήθηκε για το δείγμα CS-g-PCL όπως παράχθηκε, το 6STC και το 6STR ήταν περίπου 180 μN , 140 μN και 20 μN , αντίστοιχα. Η μειωμένη αυτή αντίσταση των δειγμάτων οφείλεται στην αποδόμηση του συμπολυμερούς και όπως φαίνεται από την απώλεια μάζας που αναφέρθηκε στην αρχή αυτής της παραγράφου, ήταν αναμενόμενο τη μεγαλύτερη μείωση αντίστασης να την εμφανίσει το δείγμα 6STR. Σημειώνεται ότι για το δείγμα 6STR επιλέχθηκαν μικρότεροι ρυθμοί φόρτισης (5 και 10 $\mu\text{N/s}$) συγκριτικά με τα άλλα δείγματα (25 και 50 $\mu\text{N/s}$), διότι λόγω ψαθυρότητας το δείγμα κατέρρεε και δεν λαμβάνονταν πειραματικά δεδομένα για τον υπολογισμό του σύνθετου μέτρου ελαστικότητας και της σκληρότητας μέσω του μοντέλου των Oliver-Pharr.



Διάγραμμα 7: Καμπύλες φόρτισης αποφόρτισης με διαφορετικούς ρυθμούς φόρτισης για τα δείγματα CS-g-PCL μετά από εμφύσηση 6 εβδομάδων σε PBS υπό (a) στατικές συνθήκες και (b) ανάδευση.

Στη συνέχεια ακολουθούν τα αποτελέσματα από τα πειράματα ερπυσμού. Στο Διάγραμμα 8 παρουσιάζονται για κάθε δείγμα CS-g-PCL όπως παράχθηκε, 6STC και 6STR τα βάθη διείσδυσης σε συνάρτηση με το χρόνο παραμονής, για τους διαφορετικούς ρυθμούς φόρτισης και για μέγιστο φορτίο 100 μN. Παρατηρείται ότι γενικώς και για τα τρία δείγματα η παραμόρφωση λόγω ερπυσμού επηρεάζεται από το ρυθμό φόρτισης. Οι λόγοι για τους οποίους συμβαίνει αυτό έχουν σχολιασθεί παραπάνω στη παράγραφο 3.3 για το Διάγραμμα 5. Μία αρχική απότομη αύξηση της παραμόρφωσης για τα πρώτα δευτερόλεπτα του χρόνου παραμονής παρατηρείται για τα δείγματα CS-g-PCL και 6STC και στη συνέχεια ακολουθεί περιοχή με μικρότερο ρυθμό αύξησης του βάθους διείσδυσης λόγω ερπυσμού. Το αρχικό στάδιο της απότομης αύξησης αντιστοιχεί στον παροδικό ερπυσμό [70] και έπειτα η διείσδυση της ακίδας συνεχίζει αλλά με μικρότερο ρυθμό και τείνει να λάβει μία σταθερή τιμή. Το δείγμα 6STC και για τους δύο ρυθμούς φόρτισης (25 μN/sec και 50 μN/sec) παρουσιάζει παρόμοια βάθη παραμόρφωσης λόγω ερπυσμού με αυτά του δείγματος CS-g-PCL όπως παράχθηκε (περίπου 55 nm και 25 nm αντίστοιχα). Σε αντίθεση με το δοκίμιο 6STR που για ρυθμό φόρτισης 5 μN/sec εμφανίζει μικρότερη παραμόρφωση λόγω ερπυσμού σε σχέση με το δοκίμιο CS-g-PCL όπως παράχθηκε (περίπου 10 nm και 25 nm αντίστοιχα).

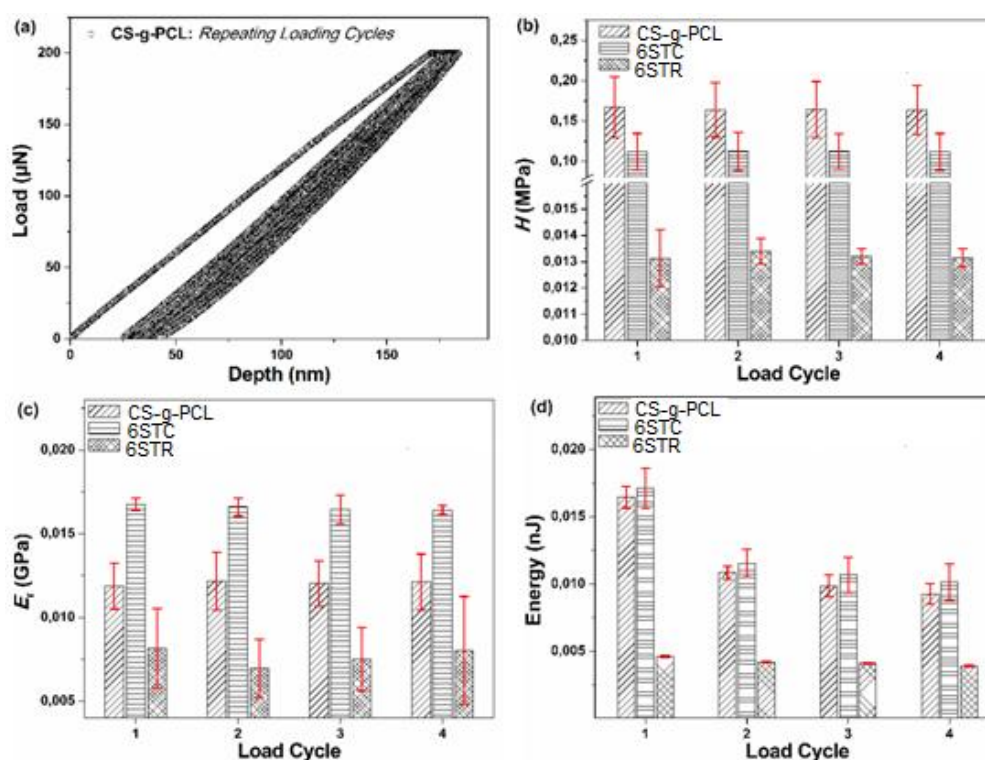


Διάγραμμα 8: Βάθος διείσδυσης συναρτήσει του χρόνου παραμονής στο μέγιστο επιβαλλόμενο φορτίο για διαφορετικούς ρυθμούς φόρτισης για τα δείγματα CS-g-PCL (a) πριν την εμβάπτιση, μετά από εμβάπτιση 6 εβδομάδων σε PBS υπό (b) στατικές συνθήκες και (c) ανάδευση.

Παρακάτω στο Διάγραμμα 9 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του πειράματος των επαναλαμβανών κύκλων. Η μέθοδος αυτή μιμείται τη δοκιμή κόπωσης που εφαρμόζεται στη μικρο-κλίμακα και συνήθως χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό της ιξώδους συμπεριφοράς από την ελαστική και πλαστική παραμόρφωση. [76-77]. Η καμπύλη φόρτισης-αποφόρτισης των τεσσάρων επαναλαμβανόμενων κύκλων φόρτισης του συμπολυμερούς CS-g-PCL παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 9 (a). Στη συνέχεια στο Διάγραμμα 9 (b) και (c) παρουσιάζονται οι τιμές H και E_r αντίστοιχα, για κάθε κύκλο φόρτισης για κάθε ένα από τα τρία δείγματα, CS-g-PCL όπως παράχθηκε, 6STC και 6STR για βάθος διείσδυσης 600 nm. Παρατηρείται ότι οι τιμές H και E_r παραμένουν σταθερές για κάθε κύκλο φόρτισης. Μέσω αυτού του πειράματος είναι εφικτή η μέτρηση των τιμών σκληρότητας H με μεγαλύτερη ακρίβεια καθώς όπως αναφέρουν οι Lucas και Oliver [78] οι τιμές της H επηρεάζονται κυρίως από το χρόνο παραμονής. Επομένως, για τη μέτρηση της σκληρότητας γενικώς προτιμώνται μικροί χρόνοι παραμονής για να ελαχιστοποιηθεί η επίδραση του ερπυσμού, όμως όπως έχει αναφερθεί παραπάνω λόγω της επίδρασης του ιξώδους είναι δύσκολο να αποφευχθεί το φαινόμενο «μύτης» αν ο χρόνος παραμονής δεν είναι αρκετά μεγάλος, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η υποψία για τη θερμική επίδραση στο υλικό λόγω του οργάνου (thermal drift). Κατά συνέπεια, με τη χρήση της μεθόδου των επαναλαμβανόμενων κύκλων φόρτισης, μειώνονται η επίδραση του ερπυσμού και η χρόνο-εξαρτώμενη πλαστικότητα.

Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 9(c) τις υψηλότερες τιμές E_r εμφανίζει το δείγμα 6STC, ένδειξη ψαθυρής συμπεριφοράς. Η αύξηση της ψαθυρής συμπεριφοράς μπορεί να οφείλεται στην πιθανή εναπόθεση ανόργανων ενώσεων στο συμπολυμερές από το

θρεπτικό υλικό PBS. Στον Πίνακα 1 παρατηρείται η σύγκριση τιμών του σύνθετου μέτρου ελαστικότητας για τα αρχικά υλικά (CS, PCL και CS-g-PCL) και μετά από 6 εβδομάδες εμβάπτισης του CS-g-PCL. Οι μικρές τιμές E_r που παρατηρούνται για τα δύο δείγματα 6STC και 6STR (Πίνακας 1), δείχνουν την αποδόμηση του συμπολυμερούς (degradation) κατά την παραμονή των δειγμάτων CS-g-PCL στο θρεπτικό υλικό. Αντίστοιχα, οι μειωμένες τιμές H που εμφανίζουν τα δείγματα 6STC και 6STR, οφείλονται στη μειωμένη αντίσταση που παρουσιάζουν τα δείγματα λόγω απώλειας μάζας και αποφλοιώσης. Στο Διάγραμμα 9 (d) παρατηρείται ότι για τα δείγματα CS-g-PCL όπως παράχθηκε και 6STC η ιξώδης συμπεριφορά είναι κυρίαρχη σε αντίθεση με την περίπτωση του δείγματος 6STR, όπου κυρίαρχη είναι η πλαστική παραμόρφωση. Το οποίο υπήρχε ως ένδειξη και είναι σε ακολουθία με τα αποτελέσματα του ερπυσμού για το Διάγραμμα 8.



Διάγραμμα 9: (a) Επαναλαμβανόμενοι κύκλοι φόρτισης του δείγματος CS-g-PCL. (b) Τιμές H (c) τιμές E_r και (d) τιμές ενέργειας για τα τρία δείγματα CS-g-PCL πριν και μετά την εμβάπτιση στο θρεπτικό υλικό για κάθε κύκλο φόρτισης.

Πίνακας 1: Τιμές E_r για τον όγκο (1μm βάθος διείσδυσης) των δειγμάτων PCL, CS και CS-g-PCL πριν και μετά την εμβάπτιση

	PCL Disc	CS Disc	As prepared	CS-g-PCL Discs	
				6 weeks static conditions	6 weeks stirring conditions
E_r (GPa)	0.19±0.03	0.65 ±0.08	0.035±0.006	0.017±0.001	0.008±0.002

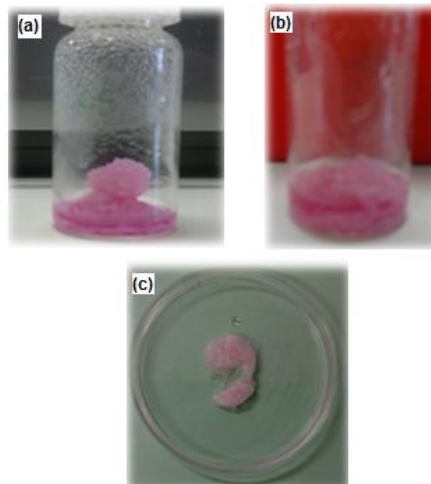
3.5 Σύγκριση δειγμάτων μετά από εμβάπτιση σε θρεπτικό υλικό για 4 εβδομάδες (με περιεχόμενη υγρασία)

Στη συνέχεια μελετήθηκε η μεταβολή των μηχανικών ιδιοτήτων των δειγμάτων κατά τη διάρκεια εμβάπτισης τους σε α -MEM στους 37°C , καθώς επηρεάζονται από την προσροφημένη υγρασία [79,80].

A. Παρουσίαση των δειγμάτων μετά την εμβάπτιση

Το δείγμα της CS παρουσίασε έντονη διόγκωση μέσα στις 2 πρώτες ώρες εμβάπτισης, ενώ διαλύθηκε μέσα στις πρώτες 24 ώρες, γεγονός το οποίο δικαιολογείται λόγω του υδρόφιλου χαρακτήρα της CS. Παρακάτω στην Εικόνα 22 a) και b) παρουσιάζεται το δείγμα της CS στις πρώτες 2 και 24 ώρες εμβάπτισης. Οι μηχανικές ιδιότητες του δοκιμίου της CS κατά τη διάρκεια της εμβάπτισης δεν μπόρεσαν να προσδιοριστούν λόγω της διάλυσης του υλικού.

Το δείγμα της PCL δεν εμφάνισε έντονη διόγκωση ή αλλαγή σχήματος μέσα στις 4 εβδομάδες εμβάπτισης γεγονός αναμενόμενο αφού από τη βιβλιογραφία είναι γνωστή η αργή αποδόμηση της PCL [81]. Σε αντίθεση, το συμπολυμερές παρουσίασε διόγκωση και ήταν εμφανής η αποσύνθεσή του. Η συμπεριφορά αυτή του δείγματος CS-g-PCL οφείλεται στην περιεχόμενη CS. Στην Εικόνα 22 c) που ακολουθεί παρουσιάζεται το δείγμα του συμπολυμερούς μετά από 72 ώρες εμβάπτισης.

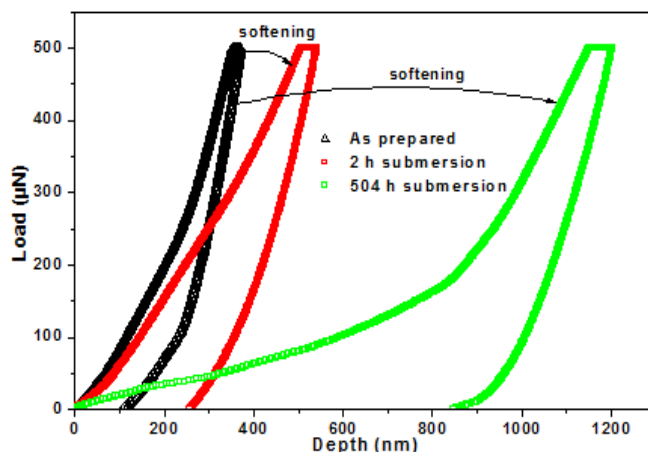


Εικόνα 22: a) CS μετά από 2 h εμβάπτισης σε α -MEM , b) CS μετά από 24 h εμβάπτισης σε α -MEM, c) CS-g-PCL μετά από 72 h εμβάπτισης σε α -MEM.

B. Παρουσίαση καμπυλών φόρτισης – αποφόρτισης

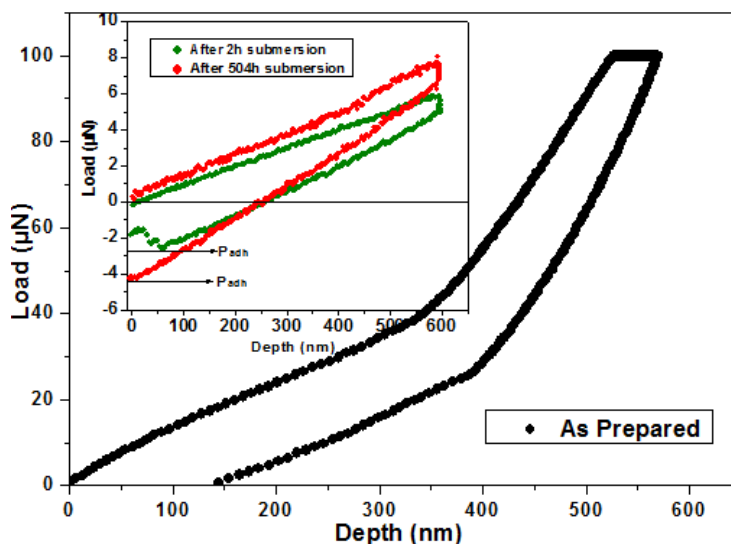
Στο παρακάτω Διάγραμμα 10 παρουσιάζονται, συγκριτικά, οι καμπύλες φόρτισης – αποφόρτισης του δείγματος της PCL όπως παράχθηκε, μετά από 2 και 504 ώρες εμβάπτισης σε α -MEM. Είναι εμφανής η μείωση της αντίστασης που παρουσιάζει το δείγμα με την πάροδο του χρόνου, αφού για την επιβολή συγκεκριμένου μέγιστου φορτίου ($500\mu\text{N}$) το βάθος διείδυσης αυξάνεται, και οφείλεται στην αποδόμηση της PCL. Η καμπύλη φόρτισης για 504 h εμβάπτισης, παρουσιάζει αλλαγή κλίσης που

υποδηλώνει ότι το υλικό μετά από τα 800 nm περίπου εμφανίζεται πιο άκαμπτο, και οφείλεται στην αποφλοιώση του δείγματος με αποτέλεσμα τη δημιουργία στρωμάτων όπου το δισκίο σε μεγαλύτερα βάθη είναι πιο συμπαγές.



Διάγραμμα 10: Καμπύλες φόρτισης-αποφόρτισης του δείγματος PCL όπως παράχθηκε και μετά από εμβάπτιση 2 και 504 h εμβάπτισης.

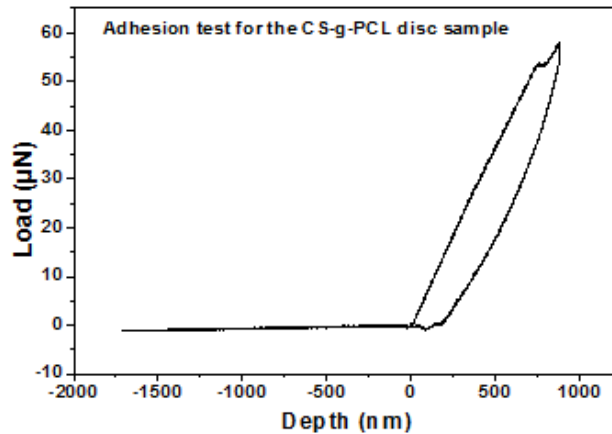
Αντίστοιχα, στο Διάγραμμα 11, παρουσιάζονται οι καμπύλες φόρτισης – αποφόρτισης για το δείγμα του συμπολυμερούς όπως παράχθηκε, μετά από 2 και 504 ώρες εμβάπτισης σε α -MEM. Σε αυτή την περίπτωση τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν ελέγχοντας το βάθος διεϊσδυσης γιατί το δείγμα ήταν ιδιαίτερα μαλακό. Για το δείγμα του συμπολυμερούς παρατηρείται μείωση της αντίστασης μετά την εμβάπτιση, που οφείλεται στην αποδόμηση του CS-g-PCL.



Διάγραμμα 11: Καμπύλες φόρτισης-αποφόρτισης του δείγματος CS-g-PCL όπως παράχθηκε και μετά από εμβάπτιση 2 και 504 h εμβάπτισης.

Επίσης, παρατηρείται από τα αρνητικά φορτία που σημειώνονται (P_{adh}), ότι το δείγμα του συμπολυμερούς μετά την εμβάπτιση παρουσιάζει το φαινόμενο της πρόσφυσης, δηλαδή υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ του δείγματος και της ακίδας. Από το

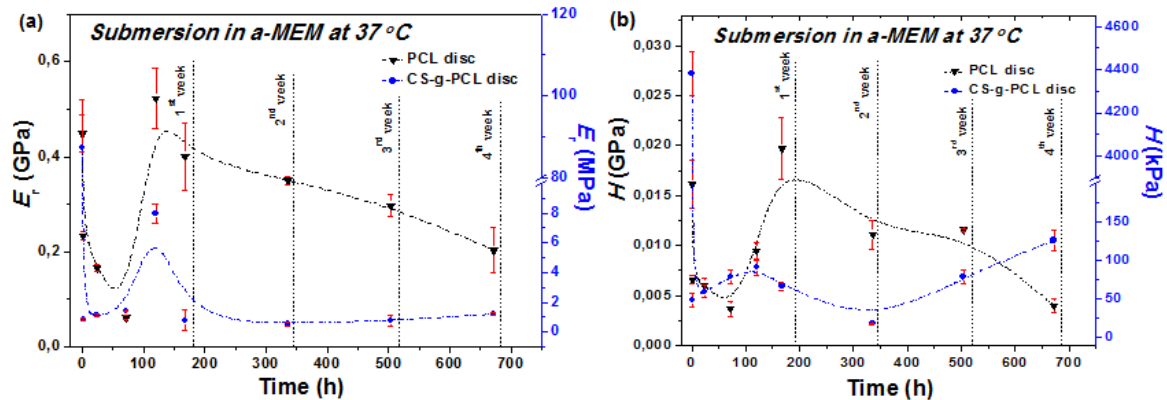
Διάγραμμα 12, το οποίο λήφθηκε από τη δοκιμή πρόσφυσης του συμπολυμερούς όπως παράχθηκε, είναι φανερό ότι δεν υπήρχε αλληλεπίδραση μεταξύ του δοκιμίου και της ακίδας. Επομένως, η πρόσφυση που παρουσιάζει το δείγμα μετά την εμφάνιση σε α -MEM οφείλεται στις ηλεκτροστατικές δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ της προσροφημένης υγρασίας στο δείγμα και την ακίδα. Παρατηρείται, επίσης, ότι για μεγαλύτερη διάρκεια εμφάνισης (504 h) το αρνητικό φορτίο είναι μεγαλύτερο υποδηλώνοντας πιο έντονες αλληλεπιδράσεις, επομένως και πιθανώς μεγαλύτερη ποσότητα προσροφημένης υγρασίας.



Διάγραμμα 12: Δοκιμή πρόσφυσης για το δείγμα του συμπολυμερούς όπως παράχθηκε.

Γ. Παρουσίαση δεδομένων σκληρότητας και σύνθετου μέτρου ελαστικότητας

Παρακάτω στο Διάγραμμα 13 παρουσιάζονται οι τιμές E_r και H για τα δείγματα της PCL και του CS-g-PCL σε σχέση με το χρόνο εμφάνισης τους στο θρεπτικό μέσο α -MEM. Για το δισκίο της PCL παρατηρείται μείωση της τιμής του σύνθετου μέτρου ελαστικότητας που στη συνέχεια αυξάνει, ενώ ακολουθεί μία αργή, ομαλή, πτωτική τάση από την πρώτη μέχρι την τέταρτη εβδομάδα. Αντίστοιχη συμπεριφορά παρουσιάζουν και οι τιμές της σκληρότητας του δείγματος αυτού. Ενώ το δείγμα του συμπολυμερούς παρουσιάζει απότομη μείωση, μίας τάξης μεγέθους, της τιμής E_r , στις 2 πρώτες ώρες εμφάνισης που οφείλεται κυρίως στη διάλυση της χιτοζάνης και στη συνέχεια από τη 1^η έως και την 4^η εβδομάδα οι τιμές του σύνθετου μέτρου ελαστικότητας παραμένουν σταθερές.



Διάγραμμα 13: **a)** Οι τιμές σύνθετου μέτρου ελαστικότητας (E_r) των δειγμάτων PCL και CS-g-PCL για διάφορες χρονικές στιγμές κατά τη διάρκεια εμφάνισης τους σε θρεπτικό μέσο α -MEM στους 37°C . **b)** Αντίστοιχα, οι τιμές σκληρότητας (H) για τα ίδια δείγματα.

Ο αλειφατικός πολυεστέρας, όπως είναι η PCL, όταν βρίσκεται σε υδατικό μέσο τότε αποδομείται μέσω υδρόλυσης, καθώς πραγματοποιείται διάσπαση του εστερικού δεσμού [82]. Η κρυσταλλικότητα και η υδροφοβία επηρεάζουν το βαθμό αποδόμησης του [81]. Οι άμορφες περιοχές προσλαμβάνουν περισσότερη ποσότητα νερού από ότι οι κρυσταλλικές, γιατί τα μόρια του νερού μπορούν να εισχωρήσουν ευκολότερα στις περιοχές αυτές, οπότε και η αποδόμηση πραγματοποιείται ευκολότερα σε αυτές [82-84]. Θα ήταν αναμενόμενο η PCL να μην παρουσίαζε τόσο έντονη μείωση των μηχανικών ιδιοτήτων από τις πρώτες ώρες εμβάπτισης διότι ως ημικρυσταλλικός πολυεστέρας παρουσιάζει κρυσταλλικές περιοχές, και λόγω του υδρόφοβου χαρακτήρα της καθίσταται ανθεκτική στην υδρόλυση. Όμως, η σχάση του εστερικού δεσμού στους αλειφατικούς πολυεστέρες αυτοκαταλύεται από την ύπαρξη καρβοξυλικών ομάδων που βρίσκονται στα άκρα, τέτοια μόρια προκύπτουν από την αποδόμηση τους [85]. Στην εργασία αυτή όμως, η σκόνη που συμπίεσθηκε για την κατασκευή του δισκίου PCL, πρόκειται, όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 2.1.2, για PCL η οποία παρασκευάσθηκε έτσι ώστε να έχει καρβοξυλικές ομάδες στα άκρα, δηλαδή πρόκειται για τη PCL-COOH. Επομένως, οι καρβοξυλικές ομάδες που βρίσκονται στα άκρα των μορίων, υπάρχουν εξ αρχής με αποτέλεσμα να πραγματοποιείται πιο γρήγορα η υδρόλυση και κατά συνέπεια να παρατηρείται μείωση των μηχανικών ιδιοτήτων. Στη συνέχεια, η αύξηση των μετρούμενων τιμών H και E_t οφείλεται και πάλι στο μηχανισμό της υδρόλυσης, καθώς όπως αναφέρθηκε, πρώτα πραγματοποιείται σχάση του εστερικού δεσμού στις άμορφες περιοχές, ενώ επίσης υπάρχει πιθανότητα τα τμήματα του πολυμερούς που προκύπτουν από την αποδόμηση να επανακρυσταλλοποιούνται, όπως έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία για το πολυγαλακτικό οξύ (Polylactic acid – PLA) [82], με αποτέλεσμα τελικά να αυξάνεται η κρυσταλλικότητα και κατά συνέπεια να βελτιώνονται οι μετρούμενες μηχανικές ιδιότητες [86]. Ενώ έπειτα να μειώνονται λόγω της συνέχισης της αποδόμησης του πολυμερούς μέσω της υδρόλυσης.

4. Συμπεράσματα

Κύριος στόχος της εργασίας αυτής ήταν η μελέτη των νανομηχανικών ιδιοτήτων του καινοτόμου ικρίωματος κατασκευασμένο από το συμπολυμερές CS-g-PCL, το οποίο πρόκειται να χρησιμοποιηθεί για την αναγέννηση του ιστού του μυοκαρδίου. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε διότι είναι σημαντικό οι μηχανικές ιδιότητες του ικρίωματος να συμβαδίζουν με αυτές του ιστού για το οποίο προορίζεται. Για την καλύτερη κατανόηση της συμπεριφοράς του ικρίωματος του πολυμερούς μελετήθηκαν παράλληλα και ικρίωματα τα οποία ήταν κατασκευασμένα από τα πολυμερή CS και PCL.

Πραγματοποιήθηκαν δοκιμές νανοδιείσδυσης στα δοκίμια της CS, της PCL και του CS-g-PCL υπό διαφορετικούς ρυθμούς φόρτισης. Το **συμπολυμερές** εμφάνισε, με διαφορά μίας τάξης μεγέθους, τις **μικρότερες τιμές σύνθετου μέτρου ελαστικότητας και σκληρότητας**, καθώς και την **υψηλότερη πλαστική συμπεριφορά** και **μικρότερη ακαμψία** σε σχέση με τα άλλα δύο δοκίμια. Αυτό οφείλεται πιθανόν στη μη συνεκτική δομή του συμπολυμερούς, στη δυσκολία ανάμειξης των δύο υλικών, που επηρεάζεται έντονα από τη διαδικασία μορφοποίησης των CS και PCL που ακολουθείται, και στις άμορφες περιοχές που εμφανίζει. Τις **υψηλότερες τιμές σύνθετου μέτρου ελαστικότητας και σκληρότητας** παρουσίασε η **CS** λόγω της δημιουργίας δεσμών υδρογόνου που αναπτύσσονται ανάμεσα στις αλυσίδες της. **Όλα τα δείγματα παρουσίασαν χρονοεξαρτώμενη συμπεριφορά και φαινόμενα ερπυσμού**. Επομένως, ακολούθησαν δοκιμές για τη μελέτη του ερπυσμού των δειγμάτων και το **συμπολυμερές CS-g-PCL** παρουσίασε την **υψηλότερη ιξώδη συμπεριφορά** που οφείλεται στην PCL, αφού τα πειράματα διεξήχθησαν σε θερμοκρασία υψηλότερη από τη θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης της, στη μη συνεκτική δομή του καθώς και στην καταστολή της κρυστάλλωσης της CS και της PCL λόγω του εμβολιασμού. Η ιξωδοελαστική αυτή συμπεριφορά έχει ως αποτέλεσμα την υπερεκτίμηση των τιμών του σύνθετου μέτρου ελαστικότητας.

Στη συνέχεια ακολούθησαν δοκιμές στα δείγματα που είχαν **εμβαπτισθεί για 6 εβδομάδες** σε PBS υπό στατικές και αναδεδόμενες συνθήκες. Τα δείγματα αυτά λόγω της αποδόμησης και της ξήρανσης που υπέστησαν ήταν παραμορφωμένα. Παρουσίασαν **μείωση των μηχανικών ιδιοτήτων** λόγω της αποδόμησης, με τη **μικρότερη ακαμψία** και τη **μεγαλύτερη απώλεια μάζας** να παρουσιάζει το δείγμα που βρισκόταν **υπό ανάδευση**. Από τα πειράματα των επαναλαμβανόμενων κύκλων φόρτισης-αποφόρτισης, που προσομοιάζουν τη δοκιμή κόπωσης, το δείγμα που ήταν υπό **στατικές συνθήκες** και το συμπολυμερές CS-g-PCL **όπως παράχθηκε**, παρουσίασαν **κυρίως ιξώδης συμπεριφορά**, σε αντίθεση με το δείγμα που βρισκόταν **υπό ανάδευση**, που παρουσίασε **έντονα πλαστική παραμόρφωση**.

Τέλος, σημαντικές πληροφορίες για την αποδόμηση των υλικών έδωσε η μελέτη των νανομηχανικών ιδιοτήτων των ικρίωμάτων κατά τη διάρκεια εμβάπτισης τους σε θρεπτικό μέσο α -MEM και θερμοκρασία 37°C, προσομοιάζοντας έτσι τις συνθήκες του ανθρώπινου οργανισμού. Το δοκίμιο της **CS** **διαλύθηκε** μέσα στις πρώτες 24

ώρες εμβάπτισης, το δοκίμιο της PCL παρέμεινε σχεδόν αμετάβλητο οπτικά, ενώ το δοκίμιο του **συμπολυμερούς διογκώθηκε** και ήταν εμφανής η **αποσύνθεση** του μέσα στις 4 εβδομάδες εμβάπτισης, αποτέλεσμα που οφείλεται κυρίως στην περιεχόμενη CS. Και τα δύο δοκίμια, της **PCL** και του **συμπολυμερούς**, μετά την εμβάπτιση τους, παρουσίασαν μείωση της αντίστασης στα επιβαλλόμενα φορτία, δηλαδή **μαλάκωσαν** σε σχέση με τα αρχικά δοκίμια λόγω της αποδόμησης τους. Επίσης, το δοκίμιο της **PCL** εμφάνισε **μείωση έπειτα αύξηση** και στη συνέχεια **σταδιακή μείωση** των τιμών του σύνθετου μέτρου ελαστικότητας και της σκληρότητας, που οφείλεται στο μηχανισμό αποδόμησης της και της ανακρυστάλλωσης των άμορφων περιοχών. Ενώ, το **συμπολυμερές** αρχικά εμφάνισε **μεγάλη μείωση** των τιμών του **σύνθετου μέτρου ελαστικότητας** και της **σκληρότητας** που στη συνέχεια **σταθεροποιήθηκαν**. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι το συμπολυμερές λόγω της προσροφημένης υγρασίας, εμφάνισε φαινόμενο **πρόσφυσης** το οποίο είναι υπεύθυνο για την **υπερεκτίμηση** των **τιμών** του σύνθετου μέτρου ελαστικότητας. Επομένως, ανάμειξη της CS και της PCL, έχει ως αποτέλεσμα την γρήγορη αποδόμηση του δείγματος του συμπολυμερούς λόγω της διάλυσης της χιτοζάνης, αλλά παρόλη την αρχική μείωση των μηχανικών ιδιοτήτων κατά την εμβάπτιση, το συμπολυμερές παρουσίασε **σταθερότητα υπό την επιβολή φορτίων** και οι **μηχανικές ιδιότητες** του είναι **κοντά** σε αυτές που έχουν αναφερθεί για τους **μαλακούς ιστούς**, όπως αυτός του μυοκαρδίου [87-88], καθιστώντας το **κατάλληλο για χρήση ως ικριώμα**.

Μελλοντική εργασία

Για την ολοκληρωμένη μελέτη του ικριώματος κατασκευασμένου από το συμπολυμερές CS-g-PCL για τη χρήση του ως μέσο ανάπτυξης ιστού του μυοκαρδίου, θα ήταν εύστοχο στη συνέχεια να μελετηθούν βελτιωμένα 3D ικριώματα από το συμπολυμερές αυτό. Καθώς επίσης να ακολουθηθεί μία νέα σειρά πειραμάτων μελέτης των μηχανικών ιδιοτήτων, όπως αυτή που πραγματοποιήθηκε στην εργασία αυτή, για ικριώματα στα οποία έχουν εμφυτευθεί κύτταρα ή και ακόμα να μελετηθούν οι μηχανικές ιδιότητες του ιστού που αναπτύχθηκε στη δομή του ικριώματος, με στόχο τελικά να συγκριθούν οι μηχανικές ιδιότητες του νέου ιστού με του υγιούς.

Βιβλιογραφία

1. N. M. Reza. Tissue engineering, Past, Present and future. *Journal of Tissue Engineering Research*. 2012, Τόμ. 1, 1, σσ. 3-4.
2. Mrunal S. Chapekar. Tissue Engineering: Challenges and Opportunities. *Journal of Biomedical Material Research*. 2000, Τόμ. 53, σσ. 617–620.
3. J. J. Marler, J. Upton, R. Langer, J. P. Vacanti. Transplantation of cells in matrices for tissue regeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1998, Τόμ. 33, σσ. 165-182.
4. J. Leor, Y. Amsalem, S. Cohen. Cells, scaffolds, and molecules for myocardial tissue engineering. *Pharmacology & Therapeutics*. 2005, Τόμ. 105, σσ. 151-163.
5. G. Chen, T. Ushida, T. Tateishi. Scaffold Design for Tissue Engineering. *Macromolecular Bioscience* 2002, Τόμ. 2, σσ. 67-77.
6. R. Langer. Tissue Engineering. *Molecular Therapy*. 2000, Τόμ. 1, 1, σσ. 12-15.
7. Department of Textile Technology. [Ηλεκτρονικό] 2013. <http://textile.iitd.ac.in/highlights/fo18/01.htm>.
8. M. W. Kessler, D. A. Grande. Tissue engineering and cartilage. *Organogenesis*. 2008, Τόμ. 4, 1, σσ. 28-32.
9. R. Langer. Microscale technologies for tissue engineering and biology. *PNAS*. 2006, Τόμ. 103, 8, σσ. 2480–2487 .
10. F. J. O'Brien. Biomaterials and scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*. 2011, Τόμ. 14, 3, σσ. 88-95.
11. P. KDV Yarlagadda, M. Chandrasekharan, J. Y. M. Shyan. Recent Advances and Current Developments in Tissue Scaffolding. *Bio-Medical Materials and Engineering*. 2005, Τόμ. 15, 3, σσ. 159-177.
12. A. J. Engler, S. Sen, H. L. Sweeney, D. E. Discher. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell*. 2006, Τόμ. 126, σσ. 677-689.
13. A. H. Yusop, A. A. Bakir, N. A. Shaharom, M. R. A. Kadir, H. Hermawan. Porous Biodegradable Metals for Hard Tissue Scaffolds: A Review. *International Journal of Biomaterials*. 2012, Τόμ. 2012, σσ. 1-10.
14. X. Liu, P. X. Ma. Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Annals of Biomedical Engineering*. 2004, Τόμ. 32, 3, σσ. 477–486.
15. P. X. Ma. Biomimetic Materials for Tissue Engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2008, Τόμ. 60, 2, σσ. 184–198.

16. Y. Yang, Y. Kang, M. Sen, S. Park. Bioceramics in Tissue Engineering. *Biomaterials for Tissue Engineering Applications*. Wien : Springer, 2011.
17. E. Sachlos, J.T. Czernuszka. Making Tissue Engineering Scaffolds Work. Review on the Application of Solid Freeform Fabrication Technology to the Production of Tissue Engineering Scaffolds. *European Cells and Materials*. 2003, Τόμ. 5, σσ. 29-40.
18. S. Oh, N. Oh, M. Appleford, J. L. Ong. Bioceramics for Tissue Engineering Applications – A Review. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. 2006, Τόμ. 2, 2, σσ. 49-56.
19. CellSupports. [Ηλεκτρονικό] <http://www.cellsupports.com/>.
20. BioNews Texas. [Ηλεκτρονικό] 2013. <http://bionews-tx.com/news/2013/04/02/rice-university-md-anderson-researchers-polymer-scaffolds-offer-more-realistic-tumor-growth-and-response-to-anti-cancer-drugs/>.
21. P. X. Ma. Scaffolds for tissue fabrication. *Materials Today*. 2004, Τόμ. 7, 5, σσ. 30-40.
22. T. Lu, Y. Li, T. Chen. Techniques for fabrication and construction of three-dimensional scaffolds for tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine*. 2013, Τόμ. 8, σσ. 337–350.
23. P. X. Ma, J.-W. Choi. Biodegradable Polymer Scaffolds with Well-Defined Interconnected Spherical Pore Network. *Tissue Engineering*. 2001, Τόμ. 7, 1, σσ. 23-39.
24. B. Subia, J. Kundu, S. C. Kundu. Biomaterial scaffold fabrication techniques for potential tissue engineering applications. *Tissue Engineering*. s.l. : InTech, 2010, 7.
25. R. Sravanthi. *Preparation and characterization of poly (ε-caprolactone) PCL scaffolds for tissue engineering applications*. Department of Biotechnology and Medical Engineering National Institute of Technology Rourkela, 2009. (thesis http://ethesis.nitrkl.ac.in/1458/1/final_thesis_with_page_nu.pdf)
26. H. Patel, M. Bonde, G. Srinivasan. Biodegradable Polymer Scaffold for Tissue Engineering. *Trends in Biomaterials and Artificial Organs*. 2011, Τόμ. 25, 1, σσ. 20-29.
27. P. K. Dutta, J. Dutta, V. S. Tripathi. Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. *Journal of Scientific & Industrial Research*. 2004, Τόμ. 63, σσ. 20-31.
28. X. Guan, D. Quan, X. Shuai, K. Liao, K. Mai. Chitosan-graft-Poly(ε-caprolactone)s: An Optimized Chemical Approach Leading to a Controllable

Structure and Enhanced Properties. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*. 2007, Τόμ. 45, σσ. 2556–2568.

29. L. Liu, Y. Li, H. Liu, Y. Fang. Synthesis and characterization of chitosan-graft-polycaprolactone copolymers. *European Polymer Journal*. 2004, Τόμ. 40, σσ. 2739–2744.

30. T. Chakrabarty, M. Kumar, V. K. Shahi. Chitosan Based Membranes for Separation, Pervaporation and Fuel Cell Applications: Recent Developments. *Biopolymers*. s.l. : Sciyo, 2010, 10.

31. C. E. Olteanu, D. Enescu. Chitosan involved Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Romanian Biotechnological Letters*. 2007, Τόμ. 12, 3, σσ. 3217-3233.

32. S. Pok, J. D. Myers, S. V. Madihally, J. G. Jacot. A multilayered scaffold of a chitosan and gelatin hydrogel supported by a PCL core for cardiac tissue engineering. *Acta Biomaterialia*. 2013, Τόμ. 9, σσ. 5630–5642.

33. F. Wu, J. Wei, C. Liu, B. O’Neil, Y. Ngothai. Fabrication and properties of porous scaffold of zein/PCL biocomposite for bone tissue engineering. *Composites: Part B*. 2012, Τόμ. 43, σσ. 2192–2197.

34. A. Sarac, D. Şakar, O. Cankurtaran, F. Y. Karaman. The ratio of crystallinity and thermodynamical interactions of polycaprolactone with some aliphatic esters and aromatic solvents by inverse gas chromatography. *Polymer Bulletin*. 2005, Τόμ. 53, σσ. 349–357.

35. J. O. Zoppe, M. S. Peresin, Y. Habibi, R. A. Venditti, O. J. Rojas. Reinforcing Poly(ϵ -caprolactone) Nanofibers with Cellulose Nanocrystals. *Applied Materials & Interfaces*. 2009, Τόμ. 1, 9, σσ. 1996-2004.

36. J. D. Kaufman, J. Song, C. M. Klapperich. Nanomechanical analysis of bone tissue engineering scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2007, Τόμ. 81, 3, σσ. 611-23.

37. M. L. Oyen. Nanoindentation of Biological and Biomimetic Materials. *Experimental Techniques*. 2011, Τόμ. 37, 1, σσ. 73-87.

38. M. L. Oyena, R. F. Cook. A practical guide for analysis of nanoindentation data. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*. 2009, Τόμ. 2, σσ. 396-407.

39. A. C. Fischer-Cripps. Nanoindentation Testing. *Nanoindentation*. s.l. : Springer, 2011, Τόμ. 1, 2, σσ. 21-37.

40. M. R. VanLandingham, J. S. Villarrubia, W. F. Guthrie, G. F. Meyers. Nanoindentation of Polymers: An Overview. *Macromolecular Symposia*. 2001, Τόμ. 167, σσ. 15-43.

41. W.C. Oliver, G.M. Pharr. An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments. *Journal of Material Research*. 1992, Τόμ. 7, 6, σσ. 1564-1583.
42. M. R. VanLandingham. Review of Instrumented Indentation. *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology*. 2003, Τόμ. 108, σσ. 249-265.
43. H. Li, J. J. Vlassak. Determining the Elastic Modulus and Hardness of an Ultrathin Film on a Substrate Using Nanoindentation. *Journal of Materials Research*. 2009, Τόμ. 24, 3, σσ. 1114-1126.
44. J. D. Kaufman, C. M. Klapperich. Surface detection errors cause overestimation of the modulus in nanoindentation on soft materials. *Journal of the mechanical behavior of biomadeical materials*. 2009, Τόμ. 2, σσ. 312-317.
45. D. M. Ebenstein, L. A. Pruitt. Nanoindentation of biological mterials. *Nanotoday*. 2006, Τόμ. 1, 3, σσ. 26-33.
46. J. D. Kaufman, G. J. Miller, E. F. Morgan, C. M. Klapperich. Time-dependent mechanical characterization of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels using nanoindentation and unconfined compression. *Journal of Material Research*. 2008, Τόμ. 23, 5, σσ. 1472–1481.
47. UNL Negineering Researh . [Ηλεκτρονικό]
<http://www.engineering.unl.edu/research/bm3/Nanoindenter.shtml#details>.
48. A.C. Fischer-Cripps. *The IBIS Handbook of Nanoindentation*. Australia : Fischer-Cripps Laboratories Pty Ltd, 2009.
49. A. C. Fischer-Cripps. Factors Affecting Nanoindentation Data. *Introduction to Contact Mechanics*. USA : Springer, 2000.
50. R. E. Smallman, A.H.W. Ngan. Characterization and Analysis. *Modern Physical Metallurgy*. 8th Edition. s.l. : Butterworth-Heinemann, 2014, 5.
51. A. K. Bembey, M. L. Oyen, A. J. Bushby, A. Boyde. Viscoelastic properties of bone as a function of hydration state determined by nanoindentation. *Philosophical Magazine*. 2006, Τόμ. 86, 33-35, σσ. 5691-5703.
52. D. M. Ebenstein, L. A. Pruitt. Nanoindentation of soft hydrated materials for application to vascular tissues. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2004, Τόμ. 69A, 2, σσ. 222–232.
53. A. Skarmoutsou, C. A. Charitidis, A. K. Gnanappa, A. Tserepi, E. Gogolides. Nanomechanical and nanotribological properties of plasma nanotextured superhydrophilic and superhydrophobic polymeric surfaces. *Nanotechnology*. 2012, Τόμ. 23, 50.

54. A. Hirai, H. Odani, A. Nakajima. Determination of Degree of Deacetylation of Chitosan by H-1-Nmr Spectroscopy. *Polymer Bulletin*. 1991, Τόμ. 26, σσ. 87-94.
55. C.A. Charitidis. Nanomechanical and nanotribological properties of carbon-based thin films: A Review. *International Journal of Refractory Metals & Hard Materials*. 2010, Τόμ. 28, σσ. 51-70.
56. R. B. King. Elastic analysis of some punch problem for a layered medium. *International Journal Solids Structures*. 1987, Τόμ. 23, 12, σσ. 1657-1664.
57. I. N. Sneddon. Boussinesq's problem for a rigid cone. *Mathematical Proceedings of the Cambridge Philosophical Society*. 1948, Τόμ. 44, σσ. 492-507.
58. W. Chen, M. Li, T. Zhang, Y.-T. Cheng, C.-M. Cheng. Influence of indenter tip roundness on hardness behavior in nanoindentation. *Materials Science and Engineering*. 2007.
59. M. Li, W. Chen, Y.-T. Cheng, C.-M. Cheng. Influence of contact geometry on hardness behavior in nano-indentation. *Vacuum*. 2010.
60. W. Tayon, R. Crooks, M. Domack, J. Wagner, A. A. Elmustafa. *EBSD and Nanoindentation-Related Study of Delamination Fracture in Al-Li Alloy 2090*. USA : NASA Technical Reports Server, 2008.
61. H.S. Güder, E. Sahin, O. Sahin, H. Göçmez, C. Duran, H. A. Çetinkara. Vickers and Knoop Indentation Microhardness Study of β -SiAlON Ceramic. *Acta Physica Polonica A*. 2011, Τόμ. 120.
62. S. Suthar. *Growth and Characterization of some Doped Calcium Tartrate Systems*. Saurashtra University, 2007. <http://theses.saurashtrauniversity.edu/id/869>.
63. Y. Wang, J. Shi. Effects of water molecules on tribological behavior and property measurements in nano-indentation processes - a numerical analysis. *Nanoscale Research Letters*. 2013, Τόμ. 8, σ. 389.
64. Z. Wang, L. Zheng, C. Li, D. Zhang, Y. Xiao, G. Guan, W. Zhu. A novel and simple procedure to synthesize chitosan-graft-polycaprolactone in an ionic liquid. *Carbohydrate Polymers*. 2013, Τόμ. 94, σσ. 505-510.
65. G.Q. Cai, H.L. Jiang, K.H. Tu, L.Q. Wang, K.J. Zhu. A Facile Route for Regioselective Conjugation of Organo-Soluble Polymers onto Chitosan. *Macromolecular Bioscience*. 2009, Τόμ. 9, σσ. 256-61.
66. V. Chiono, G. Vozzi, M. D'Acunto, S. Brinzi, C. Domenici, F. Vozzi, A. Ahluwalia, N. Barbani, P. Giusti, G. Ciardelli. Characterisation of blends between poly(ϵ -caprolactone) and polysaccharides for tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering C*. 2009, Τόμ. 29, σσ. 2174-2187.

67. T. Honma, T. Senda, Y. Inoue. Thermal properties and crystallization behaviour of blends of poly(ϵ -caprolactone) with chitin and chitosan. *Polymer International*. 2003, Τόμ. 52, σσ. 1839-1846.
68. I. Emri, M. Gergesova. Time-dependent behavior of solid polymers. *Rheology, Encyclopedia of life support systems*. United Kingdom : Eolss, 2010.
69. W.C. Oliver, G.M. Pharr. An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments. *Journal of Materials Research*. 1992, Τόμ. 7, 6, σσ. 1564-1583.
70. Z. Ma, S. Long, Y. Pan, Y. Zhou. Creep Behavior and Its Influence on the Mechanics of Electrodeposited Nickel Films. *Journal of Material Science and Technology*. 2009, Τόμ. 25, 1, σσ. 90-94.
71. V.R. Sinha, K. Bansal, R. Kaushik, R. Kumria, A. Trehan. Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: An overview. *International Journal of Pharmaceutics*. 2004, Τόμ. 278, σσ. 1-23.
72. Y. Dong, Y. Ruan, H. Wang, Y. Zhao, D. Bi. Studies on Glass Transition Temperature of Chitosan With Four Techniques. *Journal of Applied Polymer Science*. 2004, Τόμ. 93, σσ. 1553-1558.
73. L. Liu, Y. Li, H. Liu, Y. Fang. Synthesis and characterization of chitosan-graft-polycaprolactone copolymers. *European Polymer Journal*. 2004, Τόμ. 40, σσ. 2739-2744.
74. J. D. Kaufman, J. Song, C. M. Klapperich. Nanomechanical analysis of bone tissue engineering scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2007, Τόμ. 81A, 3, σσ. 611-623.
75. D. M. Ebenstein, L. A. Pruitt. Nanoindentation of soft hydrated materials for application to vascular tissues. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2004, Τόμ. 69A, σσ. 222-232.
76. Z. Fan, J.Y. Rho. Effects of viscoelasticity and time-dependent plasticity on nanoindentation measurements of human cortical bone. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*. 2003, Τόμ. 67, σ. 208.
77. H. Isaksson, S. Nagao, M. Malkiewicz, P. Julkunen, R. Nowak, J.S. Jurvelin. Precision of nanoindentation protocols for measurement of viscoelasticity in cortical and trabecular bone. *Journal of Biomechanics*. 2010, Τόμ. 43, σ. 2410.
78. B.N. Lucas, W.C. Oliver. Indentation Power-Law Creep of High-Purity Indium. *Metallurgical Materials Transactions A*. 1999, Τόμ. 30A, σ. 601 .
79. K. Terzaki, M. Kissamitaki, A. Skarmoutsou, C. Fotakis, C. A. Charitidis, M. Farsari, M. Vamvakaki, M. Chatzinikolaidou. Pre-osteoblastic cell response on three-

- dimensional, organic-inorganic hybrid material scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2013, Τόμ. 101A, 8, σσ. 2283-2294.
80. A. Skarmoutsou, G. Lolas , C. A.Charitidis, M. Chatzinikolaïdou, M. Vamvakaki, M. Farsari. Nanomechanical properties of hybrid coatings for bone tissue engineering. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 2013, Τόμ. 25, σσ. 48-62.
81. Adam L. Sisson, Michael Schroeter, Andreas Lendlein. *Handbook of Biodegradable Polymers: Synthesis, Characterization and Applications*. 1η Έκδοση. s.l. : Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2011, 1.
82. G. Chouzouri, M. Xanthos. Degradation of aliphatic Polyesters in the Presence of Inorganic Fillers. *Journal of Plastic Film & Sheeting*. 2007, Τόμ. 23, σσ. 19-36.
83. S.W. Shalaby. *Biomedical polymers*. New York : Hanser Publishers, 1994.
84. K. C. Dee, D. A. Puleo, R. Bizios. *An Introduction To Tissue-Biomaterial Interactions*. Hoboken : John Wiley & Sons, 2002.
85. S. Li, M. Vert. Biodegradation of Aliphatic Polyesters. [συγγρ. βιβλίου] G. Scott. *Degradable Polymers: Principles and Applications*. the Netherlands : Kluwer Academic Publishers, 2002, 5.
86. L. Lu, S. J. Peter, M. D. Lyman, H. Lai, S. M. Leite, J. Tamada, J. P. Vacanti, R. Langer, A. G. Mikos. In vitro degradation of porous poly(L-lactic acid) foams. *Biomaterials*. 2000, Τόμ. 21, σσ. 1595-1605.
87. W. Hiesinger, M. J. Brukman, R. C. McCormick, J. R. Fitzpatrick, J. R. Frederick, E. C. Yang, J. R. Muenzer, N. A. Marotta, M. F. Berry, P. Atluri, Y. J. Woo. Myocardial tissue elastic properties determined by atomic force microscopy after stromal cell-derived factor 1a angiogenic therapy for acute myocardial infarction in a murine model. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2012, Τόμ. 143, σ. 962.
88. A. B. Mathur, A. M. Collinsworth, W. M. Reichert, W. E. Kraus, G. A. Truskey. Endothelial, cardiac muscle and skeletal muscle exhibit different viscous and elastic properties as determined by atomic force microscopy. *Journal of Biomechanics*. 2001, Τόμ. 34, σσ. 1545-1553.