



## **ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ**

ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΜΕΤΑΛΛΕΙΩΝ – ΜΕΤΑΛΛΟΥΡΓΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΥΛΙΚΩΝ

### **ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΣΥΝΘΕΤΩΝ ΒΙΟΚΕΡΑΜΙΚΩΝ ΜΕ  
ΒΑΣΗ ΤΟΝ ΥΔΡΟΞΥΔΡΑΤΙΤΗ ΓΙΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΕΣ  
ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

**ΣΚΙΑΔΙΩΤΗ ΜΑΡΙΑ - ΦΑΝΗ**

**ΕΠΙΒΛΕΨΗ:**

**Α.ΤΣΕΤΣΕΚΟΥ**

Αναπληρώτρια

Καθηγήτρια Ε.Μ.Π

ΑΘΗΝΑ 2014

## *Ευχαριστίες*

Πρώτα απ' όλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα της διπλωματικής εργασίας μου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα Αθηνά Τσετσέκου, για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή της κατά τη διάρκεια της δουλειάς μου. Επίσης, είμαι ευγνώμων στα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής της διπλωματικής εργασίας μου, Καθηγήτρια κα Ηλιάνα Χαλικιά και Αναπληρωτή Καθηγητή κ Δημήτριο Πάνια, για την προσεκτική ανάγνωση της εργασίας μου. Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη διδάκτορα κα Δέσποινα Μπρασινίκα για την πολύ καλή συνεργασία που είχαμε και την προθυμία της να ασχοληθεί με την κάθε απορία μου. Τέλος, ευχαριστώ τους γονείς και τους φίλους μου για την αγάπη και την ηθική υποστήριξή τους.

Μαρία-Φανή Σκιαδιώτη

<b>Περιεχόμενα</b>	<b>Σελ.</b>
Ευχαριστίες	2
Περίληψη	5
Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή	6
1.1. Ιστική Μηχανική – Αντικείμενο, Στόχοι, Μελλοντικές Προοπτικές	7
1.2. Ικρίωματα- In vivo και in vitro στρατηγικές της Ιστικής Μηχανικής	9
Κεφάλαιο 2. Βιοϋλικά	12
2.1 Εισαγωγή στα Βιοϋλικά	12
2.2 Μεταλλικά Βιοϋλικά	17
2.3 Πολυμερή Βιοϋλικά	18
2.3.1 Κολλαγόνο	20
2.3.2 Χιτοζάνη	26
2.4 Κεραμικά Βιοϋλικά	29
2.4.1 Κεραμικά Βιοϋλικά Φωσφορικού Ασβεστίου – Υδροξυαπατίτης	30
2.4.2 Σύνθετα Βιοϋλικά	34
Κεφάλαιο 3. Δομή και σύσταση του οστού	35
3.1 Οστά-Δομή και λειτουργίες	35
3.2 Σύσταση των οστών - Κύτταρα του οστίτη ιστού	38
3.3 Ασβεστοποίηση του οστεοειδούς	40
Κεφάλαιο 4. Αμινοξέα- L-Λυσίνη	42
4.1 Αμινοξέα	42
4.1.1 L-Λυσίνη	43
Κεφάλαιο 5. Πειραματικό Μέρος	45
<i>A. Πειραματική Διαδικασία Παρασκευής Αιωρημάτων Υδροξυαπατίτη Παρουσία Βιοπολυμερούς και Αμινοξέων</i>	45
5.1 Περιγραφή	45
5.2 Παρασκευή πρόδρομων διαλυμάτων/αιωρημάτων	47
<i>B. Πειραματική Διαδικασία Ανάπτυξης Ικρίωμάτων</i>	50
5.3 Φυγοκέντρωση	50
5.4 Λυοφιλίωση (Freeze-drying)	50
5.5 Μέθοδος Χημικής Διασύνδεσης (Cross- linking)	53

Κεφάλαιο 6. Τεχνικές Χαρακτηρισμού	54
6.1 Περίθλαση Ακτίνων Χ (X-ray Diffraction Analysis-XRD)	54
6.2 Φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy –FT-IR)	58
6.3 Παρατήρηση στο Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (SEM)	66
6.4 Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης (TEM)	70
Κεφάλαιο 7. Αποτελέσματα και Συζήτηση	73
<i>A. Ανάπτυξη Υβριδικών Νανο- Κρυστάλλων Υδροξυαπατίτη/Βιοπολυμερών/Λυσίνης</i>	73
7.1 Αποτελέσματα XRD και Σχολιασμός τους	73
7.2 Αποτελέσματα FT-IR και Σχολιασμός τους	77
7.3 Εικόνες TEM και σχολιασμός	80
<i>B. Ανάπτυξη Ικτριωμάτων Υδροξυαπατίτη</i>	82
7.4 Αποτελέσματα Παρατήρησης στο SEM και Σχολιασμός	82
Κεφάλαιο 8. Συμπεράσματα	86
Βιβλιογραφία	88

## **Περίληψη**

Στη συγκεκριμένη εργασία έγινε μία προσπάθεια ανάπτυξης σύνθετων βιοκεραμικών με βάση τον υδροξυαπατίτη, τα οποία να συγκεντρώνουν ικανοποιητικές βιολογικές και μηχανικές ιδιότητες για βιοϊατρικές εφαρμογές.

Στο πρώτο κεφάλαιο, παρουσιάζεται συνοπτικά ο σκοπός της παρούσας εργασίας και γίνεται μνεία στο αντικείμενο, τους στόχους και τις μελλοντικές προοπτικές του κλάδου της Ιστικής μηχανικής. Παράλληλα, γίνεται αναφορά και στις μεθόδους που χρησιμοποιεί η Ιστική μηχανική σε ό,τι αφορά την εμφύτευση τριδιάστατων κριωμάτων για την αποκατάσταση νοσούντων ιστών.

Στο δεύτερο κεφάλαιο, εισάγεται η έννοια των βιοϋλικών και των επιμέρους κατηγοριών στις οποίες αυτά διακρίνονται με βάση τον τρόπο που αλληλεπιδρούν με το σώμα και τη φύση τους. Ιδιαίτερη αναφορά γίνεται στα βιοϋλικά που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, δηλαδή στα βιοπολυμερή κολλαγόνο και χιτοζάνη και στο άλας του φωσφορικού ασβεστίου, υδροξυαπατίτη, το οποίο είναι ένα από τα κύρια συστατικά από τα οποία αποτελείται το ανόργανο τμήμα των σκληρών ανθρώπινων ιστών. Ειδικά για τον υδροξυαπατίτη, αναπτύσσονται και οι πιο διαδεδομένες τεχνικές παραγωγής του, στις οποίες και περιλαμβάνεται και η υβριδική τεχνική της βιομιμητικής απόθεσης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία.

Στο τρίτο κεφάλαιο, αναλύονται η δομή και η σύσταση των οστών, ενώ στο τέταρτο κεφάλαιο γίνεται μνεία στα αμινοξέα και συγκεκριμένα στο αμινοξύ L-λυσίνη, το οποίο και χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του υδροξυαπατίτη.

Στο πέμπτο κεφάλαιο, γίνεται η περιγραφή των δύο μερών της πειραματικής διαδικασίας, δηλαδή της διαδικασίας που ακολουθήθηκε για την παρασκευή αιωρημάτων υδροξυαπατίτη παρουσία βιοπολυμερούς και αμινοξέων και για την ανάπτυξη κριωμάτων υδροξυαπατίτη αντίστοιχα.

Στο έκτο κεφάλαιο, γίνεται ανάλυση των τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν για τον χαρακτηρισμό των κόνεων και κριωμάτων υδροξυαπατίτη. Τα υλικά μελετήθηκαν ως προς την καθαρότητα και κρυσταλλικότητα των φάσεων καθώς και τη μορφολογία τους.

Στο έβδομο κεφάλαιο, παρουσιάζονται η ανάλυση των αποτελεσμάτων των τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο. Τέλος, ακολουθούν τα συμπεράσματα που προέκυψαν.

## **Θεωρητικό Μέρος**

### ***Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή***

#### **Σκοπός**

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η σύνθεση νανο-υδροξυαπατίτη παρουσία των βιοπολυμερών χιτοζάνη ή κολλαγόνο υπό την ταυτόχρονη παρουσία του αμινοξέος L-λυσίνη σε βιομιμητικές συνθήκες θερμοκρασίας (40 °C). Τα συγκεκριμένα αντιδραστήρια και συνθήκες επιλέχθηκαν με απώτερο στόχο την παρασκευή νανοκρυστάλλων υδροξυαπατίτη με μορφολογία και μέγεθος όσο το δυνατόν κοντύτερα σε αυτά του υδροξυαπατίτη που απαντάται στο φυσικό οστό. Για αυτό το λόγο, μελετήθηκαν διάφορες περιεκτικότητες λυσίνης κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, ενώ η αναλογία μαζών υδροξυαπατίτη/βιοπολυμερές (κολλαγόνο ή χιτοζάνη) διατηρήθηκε στο 70/30, που είναι περίπου η αναλογία που απαντάται στα φυσικά οστά. Οι σκόνες που παρήχθησαν με τη μεθοδολογία αυτή, χαρακτηρίστηκαν ως προς τη δομή και τη μορφολογία τους μέσω περίθλασης ακτίνων X (XRD), φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR) και παρατήρησης στο μικροσκόπιο διερχόμενης δέσμης (TEM).

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η ανάπτυξη τρισδιάστατων ικριωμάτων νανο- υδροξυαπατίτη παρουσία χιτοζάνης και L- λυσίνης με αναλογία 1:1 με τη μέθοδο της λυοφιλίωσης. Τα ικριώματα που παρασκευάστηκαν μελετήθηκαν με τη βοήθεια του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM) για να διερευνηθεί το πορώδες δίκτυο που αναπτύσσεται με αυτή τη μέθοδο. Για τη βελτίωση των μηχανικών αντοχών, επιχειρήθηκε επίσης η χημική διασύνδεση πριν τη λυοφιλίωση με γλουταραλδεΐδη και τα ικριώματα που αναπτύχθηκαν, μελετήθηκαν επίσης με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης.

### 1.1 Ιστική Μηχανική – Αντικείμενο, Στόχοι, Μελλοντικές Προοπτικές

Στη σημερινή εποχή, έχουν προκύψει ολόκληρα πεδία επανορθωτικής χειρουργικής για να βελτιώσουν την ποιότητα ζωής, αντικαθιστώντας ελλιπή λειτουργία μέσω της ανοικοδόμησης των δομών του σώματος. Τα μοριακά και κυτταρικά γεγονότα της ανοσοποιητικής ανταπόκρισης έχουν διευκρινιστεί επαρκώς για να καταστείλουν την απόρριψη στην κλινική μεταμόσχευση και να παρατείνουν την επιβίωση και λειτουργία του μοσχεύματος σε ασθενείς.

Η Ιστική Μηχανική, ένας όρος που επινοήθηκε επίσημα το 1987, έχει αναδειχθεί ως ένα επιστημονικό πεδίο διαφοροποιημένο από την εξέλιξη των ιατρικών επιστημών, αλλά συχνά παράλληλο με αυτές μέσω της άμεσης παροχής νέων τεχνολογιών με πρακτικές κλινικές εφαρμογές.

Μία θεμελιώδης σύμβαση από την ιατρική πρακτική που διατηρείται και στην ιστική μηχανική είναι ότι το σώμα έχει μία επίκτητη ικανότητα να θεραπεύεται μόνο του. Αυτή η ικανότητα αυτοίασης από ασθένεια ή τραυματισμό και αναδόμησης βασίζεται στον ειδικό ιστό ή σύστημα οργάνων, περιοριζόμενη σε μεγάλο βαθμό από το βαθμό της βλάβης, την απώλεια λειτουργίας και τη συμμετοχή πολλαπλών ιστών.

Η ενεργοποίηση αυτής της διαδικασίας αναδόμησης έχει σε μεγάλο βαθμό βελτιωθεί από προόδους στην ιατρική τεχνολογία. Στο πεδίο της επανορθωτικής χειρουργικής για παράδειγμα, έχουν συμβάλει σημαντικά οι εξελίξεις στην ιστική μηχανική, ιδιαίτερα μέσω ξено-μεταμόσχευσης ιστών, νέων προσθετικών και τοπικού χειρισμού θέσεων αλλοίωσης σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο. Τέτοιες εξελίξεις έχουν πλέον εισαχθεί παράλληλα στις συμβατικές επανορθωτικές προσεγγίσεις, όπως η άλλο- και αυτό- μόσχευση.

Εν ολίγοις, η ιστική μηχανική είναι ένας διεπιστημονικός ερευνητικός τομέας που αφορά την ιατρική, τη βιολογία, την επιστήμη των υλικών και τη μηχανική.

Ένας κύριος στόχος του κλάδου αυτού είναι ο σχεδιασμός βιοϋλικών ικριωμάτων που να επιτρέπουν την αναγέννηση λειτουργικού ιστού στον ξενιστή ως εναλλακτική στις συμβατικές μεθόδους μεταμόσχευσης οργάνων και ανακατασκευής ιστού.

## *Η Σκοπιά της Ιστικής Μηχανικής*

Η μεταμόσχευση από ένα άτομο σε ένα άλλο, παρότι πολύ επιτυχής, έχει σοβαρούς περιορισμούς, και μέσα σ' αυτό το πλαίσιο είναι που προέκυψε το πεδίο της ιστικής μηχανικής. Στην ουσία, νέος και λειτουργικός ζωντανός ιστός κατασκευάζεται χρησιμοποιώντας νέα και λειτουργικά ζώντα κύτταρα, τα οποία συνδέονται συνήθως με τον ένα ή τον άλλο τρόπο με μία μήτρα ή ικρίωμα για να καθοδηγηθεί η ανάπτυξη των ιστών. Το πεδίο βασίζεται σε μεγάλο βαθμό σε μία έκρηξη νέων γνώσεων από διάφορους αλληλοσυνδεόμενους καθιερωμένους κλάδους, αλλά αντιμετωπίζει ένα τεράστιο φάσμα προκλήσεων –τόσο επιστημονικών όσο και κοινωνικών.

## *Η πρόκληση του να μιμηθείς τη φύση*

Για να επιτύχουν η ιστική μηχανική και αναγεννητική ιατρική τις δυνατότητες τους και να καλύψουν τις ανάγκες των ασθενών, πρέπει το πεδίο να αναλάβει την πρόκληση μίμησης της φύσης. Για να γίνει αυτό πρέπει να κατανοηθεί το μικροπεριβάλλον του κυττάρου. Με την κατανόηση αυτή θα υπάρξουν νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις .

Η τελική πρόκληση σε μια προσέγγιση η οποία, ακόμη και σε περιορισμένο βαθμό, μιμείται τη φύση, είναι η μετάφραση της ιδέας στο ζωντανό οργανισμό. Αυτό περιλαμβάνει μία ποικιλία θεμάτων που σχετίζονται με τα κύτταρα που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν, τη στρατηγική για την επίτευξη της ανοσοποιητικής αποδοχής, το εάν πρόκειται να χρησιμοποιηθούν αλλογενή κύτταρα, τις μεθόδους για τη διεξαγωγή της θεραπείας και μία διαδικασία κατασκευής που να υποστηρίζει το πέρασμα της ιδέας στις κλινικές μελέτες και τελικά στην εμπορευματοποίηση. Όλα αυτά μπορούν να επιτευχθούν μόνο μέσω μιας ενσωμάτωσης των κλάδων που να οδηγεί στη βαθύτερη κατανόηση και, με τη βοήθεια των κλινικών ιατρών, στην ανάπτυξη νέων θεραπειών.

## *Μελλοντικές Προοπτικές*

Η Ιστική Μηχανική συνδυάζει τις αρχές των υλικών και της κυτταρικής μεταμόσχευσης για την ανάπτυξη υποκατάστατων ιστών και/ή την προώθηση ενδογενούς αναγέννησης. Η προσέγγιση είχε αρχικά σχεδιαστεί για να αντιμετωπιστεί το κρίσιμο χάσμα μεταξύ του αυξανόμενου αριθμού ασθενών σε λίστα αναμονής για



μεταμόσχευση οργάνων, αλλά θα επικεντρωθεί αυξανόμενα στις επικρατούσες συνθήκες στις οποίες η αναδόμηση του λειτουργικού ιστού θα απαντούσε σε μία μέχρι στιγμής ακάλυπτη ιατρική ανάγκη. Από τη σύλληψή της έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος, άλλα μέχρι σήμερα μόνο ελάχιστα σύνθετα προϊόντα που να ενσωματώνουν τα κύτταρα μαζί με ικριώματα έχουν αποκτήσει κανονιστική έγκριση, και αυτά έχουν επιτύχει μόνο περιορισμένη διείσδυση στην αγορά. Παρ' όλα αυτά, πρόσφατες κλινικές εκθέσεις με πολλαπλά χρόνια υπομονετικής παρακολούθησης καταγράφουν την ωρίμανση του τομέα και επικυρώνουν την ανάπτυξη νέο-ιστών και νέο-οργάνων και η βιομηχανία γίνεται γρήγορα οικονομικά εύρωστη. Ο συνδυασμός των χορηγήσεων τόσο στην κλινική ανάπτυξη όσο και στην εμπορευματοποίηση υποδεικνύει ότι οι τεχνολογίες αυτές θα φθάσουν αυξανόμενους αριθμούς ασθενών στα προσεχή έτη.

#### *In vitro έλεγχος των ιστών*

Η Ιστική Μηχανική επιδιώκει να αποκαταστήσει τη λειτουργία των νοσούντων ή κατεστραμμένων ιστών μέσω της χρήσης κυττάρων, βιοϋλικών, και βιολογικά ενεργών μορίων. Η επόμενη γενιά αντικαταστατών των λειτουργικών ιστών θα απαιτεί, κατά πάσα πιθανότητα, επιπρόσθετα εξωγενή ερεθίσματα για την επίτευξη πολλών από τις σημαντικές απαιτήσεις για μακροπρόθεσμη κλινική επιτυχία. Δύο τέτοιες απαιτήσεις- φυσιολογικές μηχανικές ιδιότητες και ικανότητα ανάπτυξης και αναδιαμόρφωσης κατά τρόπο που να επιτρέπει την αποκατάσταση της φυσιολογικής λειτουργίας- μπορούν να επιτευχθούν με τη συνετή επιλογή των παραμέτρων της *in vitro* καλλιέργειας.[1]

### **1.2 Ικριώματα- In vivo και in vitro στρατηγικές της Ιστικής Μηχανικής**

Το ικριώμα αποτελεί τη μήτρα πάνω στην οποία θα δημιουργηθεί ο νέος ιστός. Δίνει το κατάλληλο σχήμα και δομή ανάλογα με τον ιστό τον οποίο επιθυμούμε να κατασκευάσουμε και υποστηρίζει την κατασκευή μέχρι να αποκτήσει σταθερότητα. Γενικά μπορεί να αποτελείται από σπογγώδες υλικό του οποίου τα κενά έρχεται να καλύψει ο νέος ιστός. Το υλικό του ικριώματος οφείλει να είναι βιοδιασπώμενο ή να είναι με κάποιο τρόπο δυνατό να το απομακρύνουμε μετά το

πέρας της κατασκευής του ιστού και πριν γίνει η μεταμόσχευση του νέου ιστού στον ασθενή.

Η έρευνα στον τομέα των βιοϋλικών έχει στραφεί στην ανάπτυξη βελτιωμένων ικριωμάτων για τη μηχανική των ιστών. Ένας αριθμός βιοδιασπώμενων πολυμερών ως ικριωμάτων έχει διερευνηθεί διεξοδικά για εφαρμογές στην ιστική μηχανική.

Η μοναδικότητα των ικριωμάτων της Ιστικής Μηχανικής έγκειται στο ότι είναι σε θέση να δημιουργήσουν τρισδιάστατα περιβάλλοντα για πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα και συγκεκριμένα σηματοδοτικά κύτταρα που μπορούν να μιμηθούν τα περιβάλλοντα των φυσικών ιστών. Τέτοια ικριώματα μπορεί να είναι φυσικά, συνθετικά ή υβρίδια και των δύο.

Η χρήση των σηματοδοτικών κυττάρων έχει τη δυνατότητα να αυξήσει σημαντικά την αποτελεσματικότητα του ικριώματος, κατευθύνοντας τους φαινότυπους των περιεχόμενων κυττάρων καθώς και εμμέσως αυτούς των περιβάλλοντων κυττάρων. Τα ζώντα κύτταρα-ξενιστές μπορούν επίσης να μεταναστεύσουν μέσα σε ένα εμφυτευμένο ικρίωμα που να περιέχει μόνο βιολειτουργικούς χώρους (ακυτταρική στρατηγική *in vivo*), ή να επεκταθούν και να αφεθούν να συνδεθούν με τα ικριώματα ως υποστρώματα στην ιστοκαλλιέργεια πριν την εμφύτευση (κυτταρική στρατηγική *in vitro*). Τέτοια κύτταρα μπορούν να απομονωθούν ως ώριμα κύτταρα από τους προς αναδόμηση ιστούς, ως έκφυτα από δευτερεύουσες τοποθεσίες, ή ως νέο-διαφοροποιημένοι ιστοί από πηγές βλαστικών κυττάρων.

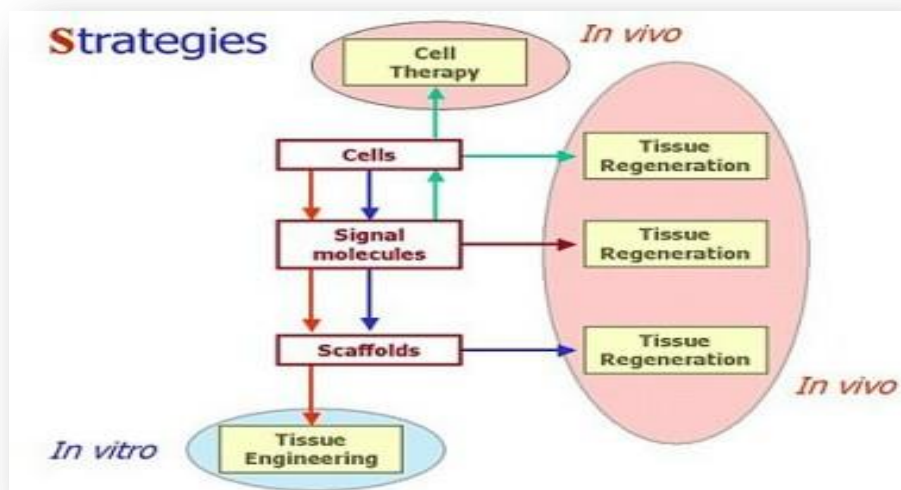
Οι κυτταρικές (*in vitro*) στρατηγικές της ιστικής μηχανικής, περιλαμβάνουν κατ' ουσία την εισαγωγή κυττάρων στο ικρίωμα πριν την εμφύτευση. Τα κύτταρα που περιέχονται εντός του ικριώματος στη συνέχεια συγχωνεύονται με τον ιστό στο σημείο της εμφύτευσης και ωθούν το νέο ιστό να διεισδύσει ενώ το ίδιο το υλικό του ικριώματος σταδιακά διασπάται *in vivo*. Όταν το υλικό επαναπορροφάται πλήρως, παραμένει μόνο ο νέο-παραγόμενος λειτουργικός ιστός.

Οι ακυτταρικές (*in vivo*) στρατηγικές πετυχαίνουν το ίδιο αποτέλεσμα, εμφυτεύοντας όμως άμεσα ένα ικρίωμα χωρίς έμφυτα κύτταρα στην κατεστραμμένη περιοχή για να επιτραπεί η διείσδυση νέων αιμοφόρων αγγείων και νευρικών ινών,

συνδεδεμένων με την εναπόθεση μακρομοριακών δικτύων εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (ECM). Με αυτό τον τρόπο, η αναδόμηση ιστού μπορεί να διεγερθεί από σηματοδοτικά κύτταρα που έχουν εισαχθεί μέσα στα ικριώματα για την υποστήριξη και τον έλεγχο των έμφυτων κυττάρων (π.χ. βλαστικών κυττάρων του μυελού των οστών, ενδοθηλιακών προγονικών κυττάρων, μακροφάγων κ.λπ.) από τη ροή του αίματος και τον περιβάλλοντα ιστό.

Ένας συνδυασμός των δύο παραπάνω στρατηγικών μπορεί επίσης να εφαρμοστεί, κατά τον οποίο εισάγονται πρώτα τα κύτταρα στα ικριώματα και μετά απομακρύνονται με ενζυμική κατεργασία και άλλους παράγοντες που καθορίζονται άμεσα από τα κύτταρα. Αυτή η προσέγγιση έχει πλεονεκτήματα, όπως είναι η ελαχιστοποίηση της απόρριψης των ξένων κυττάρων από τον ξενιστή ιστό.[2]

Συνοψίζοντας, η μηχανική βιοσυμβατών ικριωμάτων που προσομοιάζουν ιστό, στον οποίο τοποθετούνται, είτε *in vivo* είτε *in vitro*, συγκεκριμένοι τύποι κυττάρων, είναι θεμελιώδους σημασίας στην αναδόμηση λειτουργικών ιστών.



**Εικόνα 1.** Σχηματική απεικόνιση της *in vivo* και *in vitro* προσέγγισης στον τομέα της Ιστικής μηχανικής.

## **Κεφάλαιο 2: Βιοϋλικά**

### **2.1 Εισαγωγή στα Βιοϋλικά**

#### **❖ Ορισμός:**

Βιοϋλικό κατά τον Williams (1987) είναι ένα υλικό που χρησιμοποιείται στη βιοϊατρική τεχνολογία ή ιατρική συσκευή και το οποίο έρχεται σε επαφή η αλληλεπιδρά με βιολογικά συστήματα ή βιολογικούς οργανισμούς.[3]

Υπό τον ευρύ όρο ‘βιοϋλικά’, περιλαμβάνονται όλα τα υλικά που μπορούν να εμφυτευτούν ασφαλώς και με υψηλό δείκτη συμβατότητας στο ανθρώπινο σώμα. Στην καθ’ ημέρα πράξη πάντως, ο όρος χρησιμοποιείται με περιορισμένη ευρύτητα και συνήθως αφορά μεταλλικά υλικά, ιατρικό χάλυβα και τιτάνιο, που είναι και τα ευρύτερα χρησιμοποιούμενα.[4]

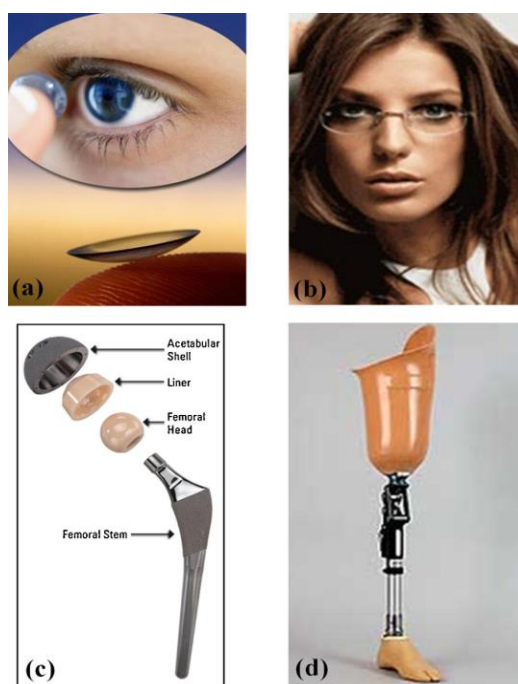
Παραδείγματα βιοϋλικών και εφαρμογών βιοϋλικών είναι:

- Αποκατάσταση αρθρώσεων
- Πλάκες υποστήριξης οστών
- Τεχνητοί τένοντες
- Οδοντικά εμφυτεύματα
- Καρδιακές βαλβίδες
- Υποκατάστατα δέρματος
- Φακοί επαφής
- Προσθετική στήθους κ.α.

#### **❖ Ιστορική Αναδρομή:**

Η χρήση των βιοϋλικών πρακτικά δεν είχε επέλθει μέχρι την έλευση μίας ασηπτικής χειρουργικής τεχνικής που αναπτύχθηκε από τον Δρ. J. Lister γύρω στο 1860. Προηγούμενες χειρουργικές διαδικασίες, είτε περιλάμβαναν βιοϋλικά είτε όχι, είχαν γενικά ανεπιτυχή αποτελέσματα λόγω λοιμώξεων.

Τα αρχικά επιτυχή εμφυτεύματα, όπως και ένα μεγάλο μέρος των μεταγενέστερων, αφορούσαν το σύστημα του σκελετού. Το 1900 περίπου, αναπτύχθηκαν στην κατεύθυνση της στερέωσης μεγάλων καταγμάτων των οστών οι πλάκες των οστών, πολλές εκ των οποίων έσπασαν λόγω κακού μηχανικού σχεδιασμού (ήταν πολύ λεπτές και στα άκρα τους είχαν συγκεντρωμένες τάσεις). Επιπλέον, υλικά όπως ο βαναδιούχος χάλυβας, η επιλογή του οποίου βασιζόταν στις καλές μηχανικές του ιδιότητες, διαβρώθηκαν γρήγορα στο σώμα επιδρώντας αρνητικά στη διαδικασία της επούλωσης.



**Εικόνα 2.** Γραφική απεικόνιση βιοϋλικών και μη που χρησιμοποιούνται σε ιατρικές συσκευές. (a) φακοί επαφής, (b) γυαλιά μυωπίας, (c) ολική αντικατάσταση ισχίου, (d) προσθετικό ολόκληρου ποδιού. Τα (a) και (c) αποτελούν βιοϋλικά, ενώ τα (b) και (d) είναι κατασκευασμένα από βιοϊατρικά υλικά αλλά όχι βιοϋλικά.

Τις προσπάθειες αυτές ακολούθησαν βελτιωμένοι σχεδιασμοί και υλικά, όπως ο ανοξείδωτος χάλυβας και τα κράματα κοβαλτίου-χρωμίου, η εισαγωγή των οποίων το 1930 έδωσε καλύτερα αποτελέσματα στην κατεύθυνση της στερέωσης των καταγμάτων, ενώ παρουσιάστηκαν και τα πρώτα υποκατάστατα συνδέσμων στη χειρουργική.

Κατά τη διάρκεια του Β' Παγκοσμίου Πολέμου, βρέθηκε ότι οι πιλότοι που τραυματίζονταν από θραύσματα του πλαστικού καλύμματος του αεροσκάφους (κατασκευασμένο από πολυμεθακρυλικό μεθυλεστέρα –PMMA-), δεν παρουσίαζαν δυσμενείς χρόνιες αντιδράσεις εξαιτίας αυτών των θραυσμάτων στο σώμα τους.

Αυτή η διαπίστωση οδήγησε στην ευρέα χρήση του πολυμερούς PMMA σε αναπληρώματα κερατοειδούς χιτώνα και μερών κατεστραμμένων οστών του κρανίου. Με βάση την πρόοδο της χειρουργικής επιστήμης και των υλικών, το 1950 δοκιμάστηκαν υποκατάστατα για βαλβίδες καρδιάς και τα υποκατάστατα αρθρώσεων με τσιμέντο.

#### ❖ *Επίδοση των βιοϋλικών:*

Η επιτυχία των βιοϋλικών στο σώμα εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως οι ιδιότητες, ο σχεδιασμός και η βιοσυμβατότητα του χρησιμοποιούμενου υλικού καθώς και από παράγοντες μη ελεγχόμενους από το μηχανικό, όπως π.χ η τεχνική του χειρουργού, η υγεία και η κατάσταση του ασθενούς, καθώς και οι δραστηριότητές του.

#### *Βιοσυμβατότητα:*

Η βιοσυμβατότητα συνδέεται με την αποδοχή του τεχνητού εμφυτεύματος από τους ιστούς που το περιβάλλουν, καθώς και από ολόκληρο το σώμα. Τα βιοσυμβατά υλικά δεν ερεθίζουν τις περιβάλλουσες δομές, δεν προκαλούν καμία αφύσικη φλεγμονώδη αντίδραση, δε δημιουργούν αλλεργικές ή ανοσολογικές αντιδράσεις και δεν προκαλούν καρκίνο.

Άλλα χαρακτηριστικά που πρέπει να πληρούνται είναι τα εξής:

- Επαρκείς μηχανικές ιδιότητες
- Κατάλληλες οπτικές ιδιότητες αν το υλικό πρόκειται να χρησιμοποιηθεί σε μάτι, δέρμα ή δόντι
- Κατάλληλη πυκνότητα

Επίσης πρέπει να ληφθούν υπόψη η δυνατότητα αποστείρωσης και κατασκευής, ο μεγάλος χρόνος αποθήκευσης και ο κατάλληλος μηχανολογικός σχεδιασμός. [5]

#### ❖ *Διαχωρισμός των βιοϋλικών:*

Υπάρχουν τρεις κατηγορίες βιοϋλικών ανάλογα με τον τρόπο που αλληλεπιδρούν με το σώμα: τα βιοαδρανή, τα βιοαπορροφούμενα και τα βιοενεργά.

- *Βιοαδρανή:* Στην πραγματικότητα κανένα υλικό δεν είναι πλήρως αδρανές κατά την εμφύτευση. Στην περίπτωση των βιοαδρανών υλικών όμως, η μόνη αντίδραση που λαμβάνει χώρα με τον οργανισμό είναι ο εναγκαλισμός του υλικού με τον ινώδη ιστό. Τέτοια υλικά είναι η αλούμινα, τα ανοξείδωτα μέταλλα και το πυκνό πολυαιθυλένιο, τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως σε υποκαταστάσεις ισχίου.
- *Βιοαπορροφούμενα:* Είναι τα υλικά τα οποία διαλύονται κατά την επαφή τους με τα βιολογικά υγρά και τα προϊόντα της διάλυσης αυτής αποβάλλονται από τον οργανισμό μέσω των νεφρών. Συνηθέστερα υλικά της κατηγορίας αυτής είναι ευκόλως διασπώμενα πολυμερή, όπως η πολυγλυκόλη (PGA), τα πολυλακτικά οξέα (PLLA) και τα συμπολυμερή τους και χρησιμοποιούνται κυρίως για ράμματα.
- *Βιοενεργά:* Τα βιοϋλικά της κατηγορίας αυτής έχουν επιφάνεια η οποία μετασχηματίζεται στο περιβάλλον του σώματος, με τέτοιο τρόπο, ώστε να επιτυγχάνεται άμεση σύνδεση του υλικού με τον ανθρώπινο ιστό. Μερικά παραδείγματα βιοενεργών βιοϋλικών είναι ο συνθετικός υδροξυαπατίτης (HA) και τα διάφορα φωσφορικά υλικά με ασβέστιο (συμπεριλαμβανομένων και των υδροθερμικά μετασχηματισμένων κοραλλιών).

Τα βιοενεργά βιοϋλικά διακρίνονται σε δύο επιμέρους κατηγορίες: τα βιοενεργά υλικά τάξης Α και αυτά της τάξης Β. Τα δεύτερα, στα οποία ανήκει και ο συνθετικός υδροξυαπατίτης (HA), συνδέονται με το σκληρό ιστό (οστό) και προάγουν την ανάπτυξη του νέου ιστού στην επιφάνειά τους. Τέτοια υλικά χρησιμοποιούνται στην κάλυψη ατελειών των οστών λόγω κυστών και για οστεϊκές συνδέσεις (τσιμέντο).

Τα υλικά τάξης Α, όχι μόνο συνδέονται με το οστό και προάγουν την ανάπτυξη νέου ιστού κατά μήκος της επιφάνειάς τους, αλλά έχουν τη δυνατότητα να παράγουν νέο οστό, το οποίο συνδέεται με τους μαλακούς ιστούς, όπως είναι τα ούλα και ο χόνδρος. Τα υλικά της κατηγορίας αυτής χρησιμοποιούνται κλινικά για τη θεραπεία περιοδοντικών ασθενειών, για την κάλυψη οστεϊκών ατελειών και για την αντικατάσταση των οστών μέσου ωτού, βελτιώνοντας την ακοή χιλιάδων ασθενών.

Γενικά, σε ό,τι αφορά τις εφαρμογές τους, τα αδρανή βιοϋλικά χρησιμοποιούνται κυρίως για την ακινητοποίηση μιας τραυματικής περιοχής, ενώ τα βιοαπορροφούμενα και βιοενεργά στοχεύουν στην επιτάχυνση της κινητικής ίασης. Τα βιοαπορροφούμενα υλικά έχουν το πλεονέκτημα ότι στο τέλος έχουν αντικατασταθεί εντελώς από το νεοσχηματισμένο ιστό. Καθ' όλη τη διάρκεια όμως της απορρόφησης, το εμφύτευμα πρέπει να είναι εντελώς ακινητοποιημένο. Κατά αντίθετο τρόπο λειτουργούν τα βιοενεργά βιοϋλικά.[6]

Ο παραπάνω διαχωρισμός των βιοϋλικών αναπαριστάται στον παρακάτω πίνακα:

**Πίνακας 1.** Κατηγορίες Βιοϋλικών[6]

<b>ΒΙΟΪΛΙΚΑ</b>			
<b>Βιοαδρανή</b>	<b>Βιοαπορροφήσιμα</b>	<b>Βιοενεργά</b>	
		<b>Τάξης Α</b>	<b>Τάξης Β</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Αλουμίνα</li> <li>• Ανοξειδωτα μέταλλα</li> <li>• Πυκνό πολυαιθυλένιο</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Πολυγλυκόλη (PGA)</li> <li>• Πολυλακτικό οξύ (PLLA)</li> <li>• Συμπολυμερή</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Βιοϋάλιοι (Bioglass<sup>®</sup>, Perioglass<sup>®</sup>, Novabone<sup>®</sup>)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Συνθετικός υδροξυαπατίτης (HA)</li> <li>• Φωσφορικά κεραμικά ασβεστίου</li> <li>• Κοράλλια</li> </ul>
<b>Ιατρική χρήση</b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Αντικαταστάσεις ισχίου</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ράμματα</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Θεραπεία περιοδοντικών ασθενειών (Perioglass<sup>®</sup>)</li> <li>• Κάλυψη οστεϊκών ατελειών (Novabone<sup>®</sup>)</li> <li>• Αντικατάσταση οστών μέσου ωτός (Bioglass<sup>®</sup>)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Κάλυψη ατελειών των οστών λόγω κυστών</li> <li>• Οστεϊκές συνδέσεις (τσιμέντο)</li> </ul>

Ένας δεύτερος διαχωρισμός των βιοϋλικών είναι ο διαχωρισμός με βάση τη φύση τους και φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:



**Πίνακας 2.** Κατηγορίες βιοϋλικών με βάση τη φύση τους.[6]

<b>ΒΙΟΪΛΙΚΑ</b>				
<b>Κεραμικά</b>	<b>Πολυμερή</b>	<b>Μέταλλα</b>	<b>Σύνθετα</b>	<b>Υλικά βιολογικ. προελεύσεως</b>
-Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , ZrO <sub>2</sub> , TiO <sub>2</sub> -Άλατα ασβεστίου -Απατίτες -Φωσφορικά υαλοκεραμικά με ασβέστιο	-Βιοδιασπώμενα -Βιοσταθερά	-Ανοξειδωτο ατσάλι -Μεταλλικά κράματα Co-Cr, Ti -Μαγνητικά μέταλλα	-Κεραμικές, μεταλλικές και οργανικές μήτρες	-Ελασίνη -Κολλαγόνο κ.α.

Αναλυτικότερα:

### 2.2 Μεταλλικά Βιοϋλικά

Τα μέταλλα χρησιμοποιούνται ως βιοϋλικά χάρη στην άριστη θερμική και ηλεκτρική αγωγιμότητά τους, αλλά και στις μηχανικές τους ιδιότητες. Ο λόγος είναι η ύπαρξη των ελεύθερων ηλεκτρονίων, τα οποία μπορούν γρήγορα να μεταφέρουν ηλεκτρικό φορτίο και θερμική ενέργεια. Τα κινούμενα ελεύθερα ηλεκτρόνια δρουν ως συνδετική δύναμη που συγκρατούν τα θετικά μεταλλικά ιόντα μαζί. Αυτή η επίδραση είναι δυνατή, όπως γίνεται αντιληπτό, από τη διάταξη μέγιστης συμπύκνωσης, έχοντας ως αποτέλεσμα υψηλό ειδικό βάρος και τα υψηλά σημεία τήξης των περισσότερων μετάλλων. Καθώς ο μεταλλικός δεσμός είναι μη κατευθυντικός, η θέση των μεταλλικών ιόντων μπορεί να τροποποιηθεί χωρίς να καταστραφεί η κρυσταλλική δομή οδηγώντας σε ένα στερεό που παραμορφώνεται πλαστικά.

Μερικά μέταλλα χρησιμοποιούνται ως παθητικά υποκατάστατα για σκληρούς ιστούς, όπως για παράδειγμα στην ολική αρθροπλαστική ισχίου και γόνατος, για την υποστήριξη της επούλωσης καταγμάτων με τη μορφή οστεοσυνθετικών πλακών ή κοχλιών, σε συσκευές συγκράτησης της σπονδυλικής στήλης, αλλά και στα οδοντικά εμφυτεύματα χάρη στις άριστες μηχανικές ιδιότητες. Μερικά μεταλλικά κράματα χρησιμοποιούνται με πιο ενεργό ρόλο σε συσκευές όπως οι αγγειακές ενδοπροθέσεις

(stents), τα σύρματα καθοδήγησης σε καθετηριασμούς, ορθοδοντικά τόξα και κοχλιακά εμφυτεύματα.

Μερικές φορές τα μεταλλικά στοιχεία στις φυσικές τους μορφές είναι σημαντικά για τις λειτουργίες των ερυθροκυττάρων (σίδηρος) ή τη σύνθεση της βιταμίνης B12 (κοβάλτιο), ωστόσο δεν είναι ανεκτά σε μεγάλες ποσότητες.

Η βιοσυμβατότητα των μεταλλικών εμφυτευμάτων είναι ένα θέμα στο οποίο επικεντρώνεται σε μεγάλο βαθμό το ερευνητικό ενδιαφέρον, καθώς είναι δυνατόν να διαβρωθούν και σε *in vivo* περιβάλλον, προκαλώντας την καθεαυτή αποσύνθεση του εμφυτεύματος που το αποδυναμώνει, αλλά και βλαβερή επίδραση των προϊόντων της διάβρωσης στους περιβάλλοντες ιστούς και όργανα.[7]

### 2.3 Πολυμερή Βιοϋλικά

Πολυμερή χαρακτηρίζονται τα υλικά που αποτελούνται από πολύ μεγάλα μόρια- αλυσίδες ατόμων άνθρακα, στα οποία συνδέονται διάφορα άτομα ή ρίζες. Γίνεται αντιληπτό ότι τα μακρομόρια αυτά αποτελούνται από ομάδες μονομερών, δηλαδή μικρότερες δομικές μονάδες, που επαναλαμβάνονται κατά μήκος της αλυσίδας, με αποτέλεσμα το μοριακό βάρος να είναι πολύ υψηλό, υπερβαίνοντας κάποιες φορές το ένα εκατομμύριο. Οι αλυσίδες δεν είναι πάντα γραμμικές, αλλά συχνά μπορούν να διακλαδώνονται, να διασταυρώνονται ή να δικτυώνονται σχηματίζοντας τρισδιάστατες δομές. Αυτές οι διαμορφώσεις επιφέρουν αλλαγές στα φυσικά χαρακτηριστικά και τη συμπεριφορά του υλικού.

#### ❖ *Διαχωρισμός πολυμερών βιοϋλικών:*

Τα πολυμερή που χρησιμοποιούνται ως βιοϋλικά είναι είτε φυσικά είτε τεχνητά. Τα φυσικά πολυμερή, που ανήκουν στην κατηγορία των βιομοριακών υλικών, παράγονται μέσα από βιολογικές διεργασίες και απαντώνται, κατά κύριο λόγο, στο εξωκυττάριο υλικό των συνδετικών ιστών, όπως επί παραδείγματι στους τένοντες, στο δέρμα, στα οστά, στα δόντια και στα αιμοφόρα αγγεία. Αντιπροσωπευτικά δείγματα είναι το κολλαγόνο, η ελαστίνη, το μετάξι, η κερατίνη, η ακτίνη και η μυοσίνη. Λειτουργικός τους ρόλος είναι η μηχανική στήριξη, η

εξωτερική προστασία, η θερμική μόνωση, η συστολή και κινητικότητα, μπορεί όμως να έχουν και δομικό ρόλο. Η δομή και οι ιδιότητές τους παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον και, ως εκ τούτου, αξιοποιούνται και στα τεχνητά εμφυτεύματα στην προσπάθεια μίμησης των φυσικών βιολογικών δομών.

Αρκετά εκτεταμένη, ωστόσο, είναι και η χρήση των τεχνητών πολυμερών ως βιοϋλικών, κυρίως χάρη στην ικανότητά τους να μορφοποιούνται εύκολα και να αποκτούν διάφορες μορφές, όπως νήματα, ράβδοι, ιξώδη υγρά και υμένα. Παρά το γεγονός, όμως, ότι κατασκευάζονται και μορφοποιούνται αρκετά εύκολα, υστερούν σε σχέση με άλλα βιοϋλικά στη συμπεριφορά τους μεσομακροπρόθεσμα.

Οι κυριότερες κατηγορίες τεχνητών πολυμερών με εφαρμογές στα βιοϋλικά είναι το πολυαιθυλένιο, τα πολυαμίδια, ο πολυμεθακρυλικός μεθυλεστέρας, το πολυτετραφθοροαιθυλένιο, οι πολουρεθάνες και άλλες κατηγορίες.

Οι κυριότερες απαιτήσεις που τίθενται όσον αφορά στη χρησιμοποίηση των πολυμερών ως βιοϋλικών είναι:

- η βιοσυμβατότητα
- οι φυσικές ιδιότητες, δηλαδή η αντοχή, η ελαστικότητα και η σταθερότητα του υλικού
- η ικανότητα μορφοποίησης (με εξώθηση, σε καλούπι ή σχηματισμός ινών)
- η ικανότητα αποστείρωσης (σε αυτόκλειστο, με θερμή ξήρανση, με αέριο αιθυλενοξειδίο και ακτινοβολία).

#### ❖ *Σύγκριση φυσικών και τεχνητών πολυμερών:*

Στα πλεονεκτήματα των φυσικών πολυμερών συγκαταλέγονται η χημική τους ομοιότητα με μακρομόρια του περιβάλλοντος όπου εμφυτεύονται, το γεγονός ότι δεν προκαλούν φλεγμονές και τοξικές αντιδράσεις και η ικανότητα αποικοδόμησής τους με φυσικό μεταβολικό τρόπο από τον οργανισμό. Τροχοπέδη στην αξιοποίησή τους αποτελούν η ανοσολογική αντίδραση του οργανισμού εναντίον τους, με εξαίρεση το κολλαγόνο, η διαφοροποίησή τους από ιστό σε ιστό και η απώλεια της δραστητικότητάς τους σε θερμοκρασίες πολύ χαμηλότερες από το σημείο τήξεως.

Συγκρινόμενα με τεχνητά υλικά, τα βιομοριακά υλικά, συνήθως, δεν υπερτερούν μεμονωμένα σε κρίσιμα μεγέθη και μηχανικές ιδιότητες, όπως το μέτρο ελαστικότητας, η αντοχή σε εφελκυσμό και η ανθεκτικότητα. Με άλλα λόγια, δεν μπορούν να χαρακτηριστούν ως «υλικά υψηλών επιδόσεων», όμως ως επί το πλείστον εμφανίζουν χαμηλές πυκνότητες, κυρίως λόγω του τρόπου οργάνωσής τους.

Τα βιοπολυμερή που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη εργασία είναι το κολλαγόνο τύπου I και η χιτοζάνη. Παρακάτω αναλύονται η δομή, η βιοσύνθεση και οι ιδιότητές τους. [8]

### 2.3.1 Κολλαγόνο

#### ❖ *Δομή:*

Το κολλαγόνο είναι επιμήκης πρωτεΐνη. Η βασική δομική μονάδα του αποτελείται από τρεις πολυπεπτιδικές αλυσίδες, οι οποίες διαμορφώνονται δεξιόστροφα σε τριπλή έλικα βήματος περίπου 8.6 nm και σχηματίζουν τελικά μία άκαμπτη ράβδο μήκους περίπου 300nm και μοριακού βάρους 300000. Σε κάθε περιστροφή της έλικας, απαντώνται περίπου 3 αμινοξέα. [9]

Οι αλυσίδες, ωστόσο, μπορεί να διαφοροποιούνται ως προς το μέγεθος και την ακριβή σύσταση ανάλογα με τον τύπο του κολλαγόνου. Έως σήμερα, έχουν αναγνωριστεί δεκαοκτώ τύποι κολλαγόνου. Στη συγκεκριμένη διπλωματική χρησιμοποιήθηκε κολλαγόνο τύπου I. Το μόριό του αποτελείται από δύο ίδιες αλυσίδες  $\alpha 1(I)$  και μία  $\alpha 2(I)$  και ο μοριακός του τύπος παριστάνεται ως  $\alpha 1(I)_2 \alpha 2(I)$ . Πολύ σπάνια μπορεί να εμφανιστεί ως τριμερές  $\alpha 1(I)_3$  αλυσίδων.

Το κολλαγόνο απαντάται σε οστό, χόνδρο, δέρμα και ουλώδεις ιστούς και έχει άριστες ιδιότητες βιοσυμβατότητας, βιοδιάσπασης και οστεοαγωγιμότητας.

#### ❖ *Βιοσύνθεση:*

Το κολλαγόνο παράγεται ενδοκυτταρικά, στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο εξειδικευμένων κυττάρων, όπως είναι οι ινοβλάστες, οι οστεοβλάστες, οι

χονδροβλάστες και οι οδοντοβλάστες και αυτοσυγκροτείται σε λειτουργικό μόριο στον εξωκυττάριο χώρο.

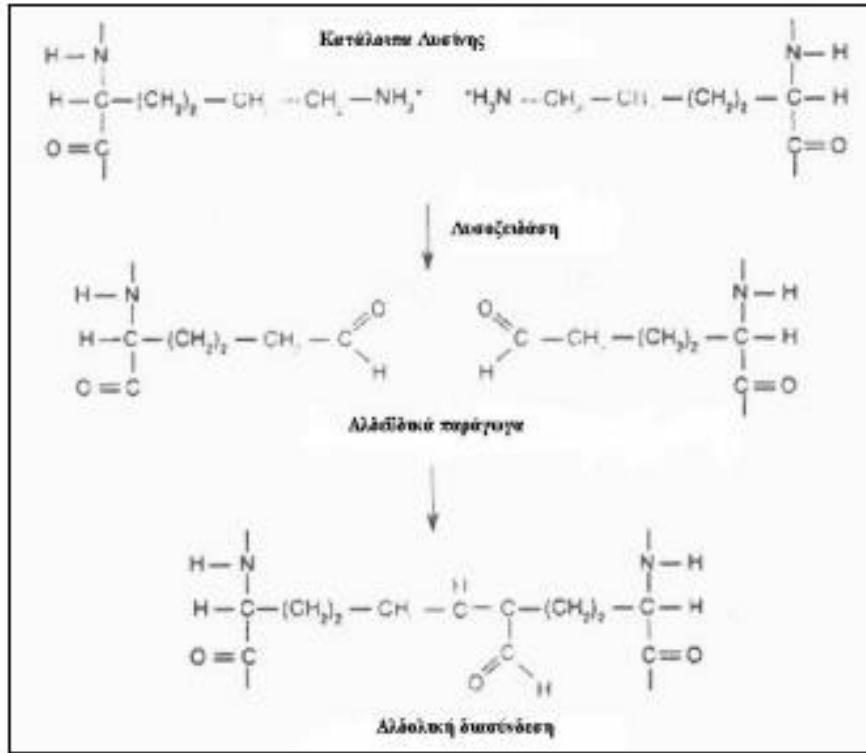
Η σύνθεσή του περιλαμβάνει την ακόλουθη σειρά αντιδράσεων:

- i. Σχηματισμός των πεπτιδικών αλυσίδων
- ii. Υδροξυλίωση της προλίνης και της λυσίνης
- iii. Προσθήκη σακχάρων, όπως η γλυκόζη και η γαλακτόζη, ομοιοπολικά με τη δράση ειδικών ενζύμων. Ο αριθμός των μονάδων των υδατανθράκων εξαρτάται από τον εκάστοτε ιστό.
- iv. Σχηματισμός της τριπλής έλικας στα ριβοσωμάτια. Το προϊόν είναι μία πρωτεΐνη αρκετά μεγαλύτερη του κολλαγόνου, που καλείται προκολλαγόνο, και είναι το πρόδρομο μόριο του κολλαγόνου.
- v. Έκκριση των δεσμών του προκολλαγόνου στον εξωκυττάριο χώρο. Εκεί οι πρωτεάσες κόβουν τα μη ελικοειδή άκρα και το προϊόν ονομάζεται τροποκολλαγόνο.
- vi. Συγκρότηση των μορίων του τροποκολλαγόνου σε σειρές μετατοπισμένες η μία προς την άλλη, που δίνει ως αποτέλεσμα ινίδια κολλαγόνου. Τα ινίδια σταθεροποιούνται με χιαστούς δεσμούς και συναθροίζονται προς σχηματισμό ινών.
- vii. Ισχυροποίηση των ινών κολλαγόνου με τη δημιουργία διασυνδέσεων μέσα στο μόριο ή μεταξύ διαφορετικών μορίων του τροποκολλαγόνου. Οι διασυνδέσεις είναι χιαστοί ομοιοπολικοί δεσμοί που σχηματίζονται ανάμεσα στα αμινοξέα της λυσίνης και της υδροξυλυσίνης και σχηματίζουν ένα πλέγμα που αυξάνει την αντοχή και τη χημική αντίσταση του κολλαγόνου.

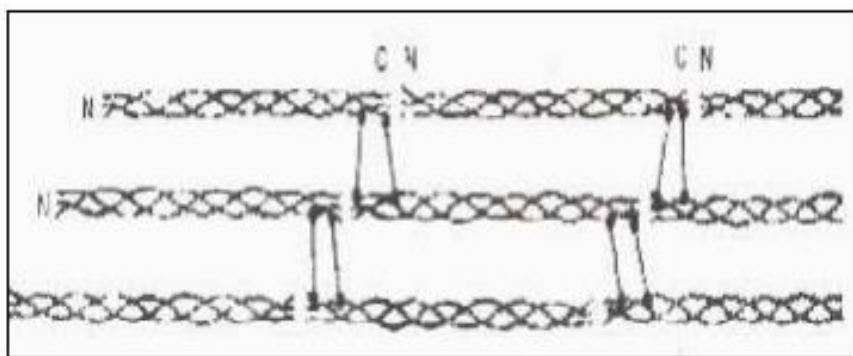
Ενδομοριακά γίνονται μεταξύ των καταλοίπων λυσίνης και υδροξυλυσίνης με τη βοήθεια του ενζύμου λυσοξειδάσης, που καταλύει τη μετατροπή της ε-αμινομάδας της λυσίνης σε αλδεϋδη. Κατόπιν τα αλδεϋδικά παράγωγα δύο καταλοίπων λυσίνης υφίστανται συμπύκνωση, η οποία ονομάζεται αλδολική συμπύκνωση (Εικόνα 3) [9].

Διαμοριακά γίνονται μεταξύ δύο καταλοίπων υδροξυλυσίνης και ενός καταλοίπου λυσίνης. Σε αυτό το είδος διασυνδέσεων, η αμινοτελική περιοχή ενός μορίου συνδέεται με την καρβοξυτελική ενός άλλου που βρίσκεται στη γειτονική

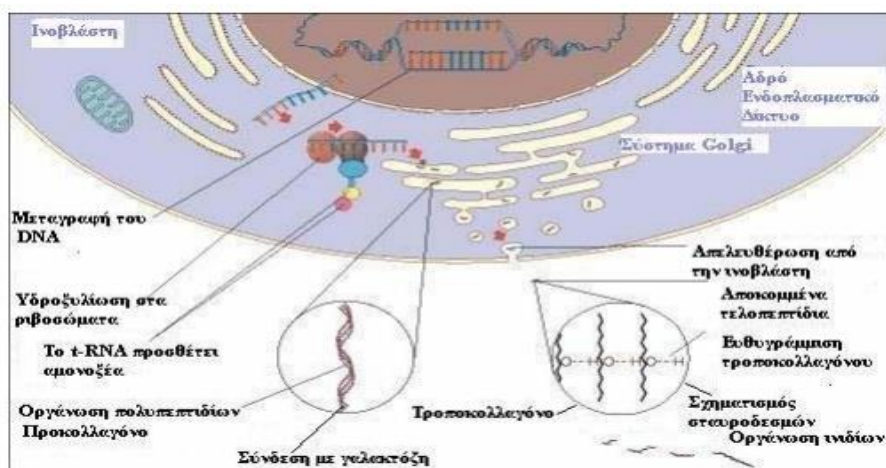
σειρά. Επίσης, έχει βρεθεί και άλλο ένα είδος χιαστού δεσμού με το αμινοξύ ιστιδίνη (Εικόνα 4) [10].



**Εικόνα 3.** Σχηματισμός μιας αλδολικής διασύνδεσης από δύο πλευρικές αλυσίδες λυσίνης. [9]



**Εικόνα 4.** Διασύνδεση μεταξύ μορίων τροποκολλαγόνου. [9]



**Εικόνα 5.** Η βιοσύνθεση του κολλαγόνου στις θέσεις του κυττάρου της ινοβλάστης.

[Medical, site]

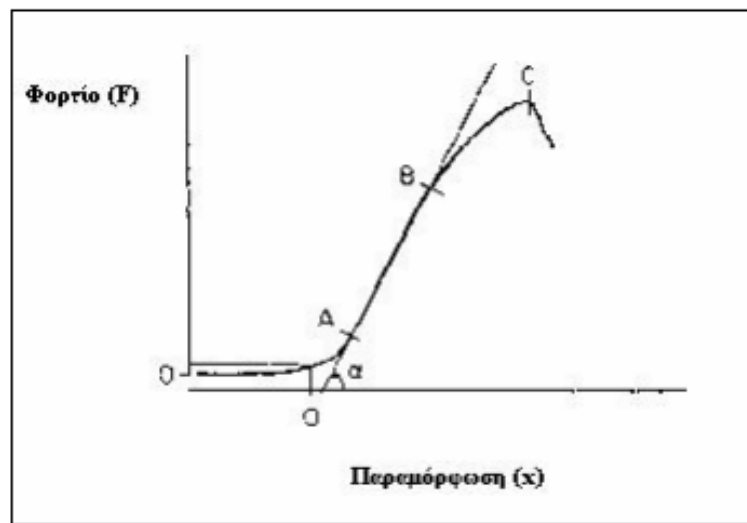
#### ❖ *Μηχανικές Ιδιότητες:*

Το κολλαγόνο είναι το βασικό δομικό στοιχείο των μαλακών και σκληρών ιστών και δίνει ευστάθεια και δύναμη στους οργανισμούς. Είναι ο κύριος φορέας φορτίων σε καίρια σημεία των οργανισμών. Ενδεικτικά αναφέρονται τα αιμοφόρα αγγεία, το δέρμα, οι τένοντες, οι χιτώνες των οφθαλμών και τα οστά.

Οι μηχανικές ιδιότητες των ιστών ποικίλλουν ανάλογα με τον τρόπο οργάνωσης της δομής των ινών, των κυττάρων και της θεμέλιας ουσίας. Η απλούστερη δομή, ως προς τις ίνες κολλαγόνου, περιλαμβάνει παράλληλες ίνες, όπως στην περίπτωση των τενόντων και των συνδέσμων. Ιστοί με κύρια λειτουργία τη διαβίβαση τάσης, όπως οι τένοντες, έχουν παράλληλες ίνες κολλαγόνου, οι οποίες φαίνονται ελαφρώς κυματοειδείς σε κατάσταση ηρεμίας και ευθυγραμμίζονται υπό τάση. Οι σύνδεσμοι έχουν παρόμοια δομή, αλλά πιο άτακτη, με ίνες που συχνά καμπυλώνονται και άλλοτε εκτείνονται σε οξεία γωνία με την κατεύθυνση κίνησης.

Στο δέρμα, η δομή των ινών του κολλαγόνου είναι πιο πολύπλοκη, καθώς εμφανίζονται πολύπλοκα δι- και τρισδιάστατα δίκτυα, ωστόσο η πιο συνήθης κατεύθυνση των ινών είναι παράλληλα με την επιφάνεια. Η δομή των ινών του κολλαγόνου στα αιμοφόρα αγγεία είναι επίσης τρισδιάστατη.

Μία τυπική καμπύλη φόρτισης- παραμόρφωσης για επιμήκυνση υπό σταθερό ρυθμό φόρτισης σε έναν τένοντα έχει την ακόλουθη μορφή:



**Εικόνα 6.** Η καμπύλη τάσης-παραμόρφωσης για το κολλαγόνο. [11]

Όπως παρατηρούμε, η καμπύλη έχει τρεις διακριτές περιοχές:

- i. Από το σημείο O έως το A, το φορτίο αυξάνεται εκθετικά αυξανόμενης της παραμόρφωσης.
- ii. Μεταξύ των σημείων A και B, η σχέση είναι γραμμική.
- iii. Στο τελευταίο τμήμα, η σχέση είναι μη γραμμική και καταλήγει σε αστοχία.

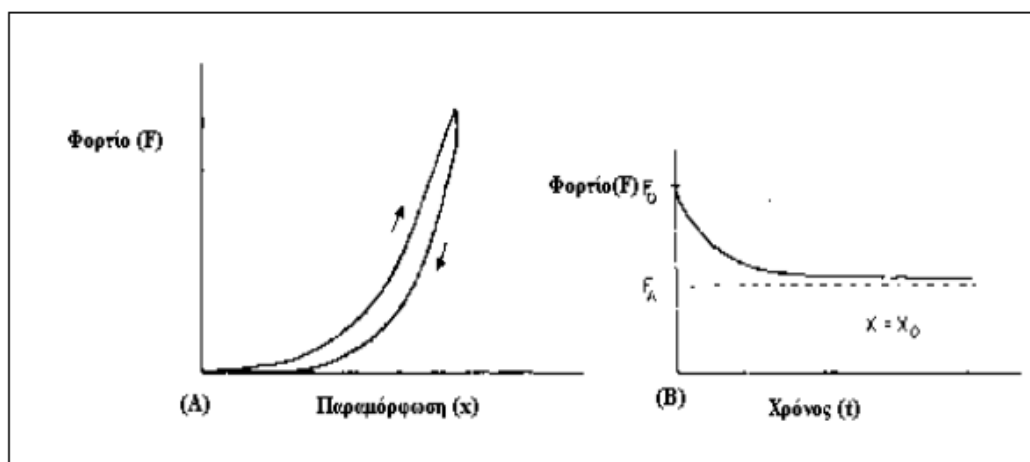
Τα σημεία O και A χωροθετούν την περιοχή στην οποία συνήθως λειτουργεί ο ιστός, ενώ οι άλλες δύο περιοχές αντιστοιχούν στο απόθεμα αντοχής (reserve strength) του τένοντα.

Η μέγιστη τιμή φορτίου για τον ανθρώπινο τένοντα που αντιστοιχεί στο σημείο C κυμαίνεται μεταξύ 50 και 100 MPa, ενώ η μέγιστη παραμόρφωση είναι περίπου 10-15%.

Το κολλαγόνο δεν υπακούει εντελώς στο νόμο του Hooke, όμως η κλίση του τμήματος AB του διαγράμματος τάσης- παραμόρφωσης μας δίνει το εφαπτομενικό μέτρο ελαστικότητας Young που είναι περίπου 1.24 GPa.



Αν ο ιστός φορτιστεί με ένα καθορισμένο ρυθμό και το μήκος του κρατηθεί σταθερό, τότε εμφανίζει το φαινόμενο χαλάρωσης τάσης. Το σχήμα που ακολουθεί αποδίδει αυτή τη συμπεριφορά.



**Εικόνα 7.** Καμπύλες (Α) εφαρμοζόμενου φορτίου- παραμόρφωσης και (Β) χαλάρωσης κολλαγόνου. [11]

Ένα εξίσου σημαντικό χαρακτηριστικό είναι το εξής:

Αν πάρουμε ένα δείγμα ιστού από έναν οργανισμό, το θέσουμε σε δοκιμή ελέγχου φορτίου- παραμόρφωσης για ένα κύκλο φόρτισης και αποφόρτισης με σταθερό ρυθμό, το αφήσουμε μέχρι να ανακάμψει και επαναλάβουμε την ίδια διαδικασία φόρτισης, θα δούμε ότι η καμπύλη θα είναι μετατοπισμένη σε σχέση με την αρχική. Αν η δοκιμή επαναληφθεί αόριστα, τότε διαπιστώνεται ότι η διαφορά μεταξύ των κύκλων μειώνεται ή ακόμη εξαφανίζεται (preconditioned δοκίμιο). Αυτό συμβαίνει λόγω της αλλαγής της εσωτερικής δομής που υφίσταται ο ιστός με την κυκλική φόρτιση. Με επανάληψη των κύκλων τελικά φτάνουμε σε μία στάσιμη κατάσταση, όπου δε λαμβάνει χώρα καμία περαιτέρω αλλαγή αν δε μεταβληθούν και τα όρια της κυκλικής φόρτισης.

Έχει παρατηρηθεί με πολλές διαφορετικές μεθόδους (περίθλαση ακτίνων X σε μικρές γωνίες, ηλεκτρονική μικροσκοπία, φασματοσκοπία Raman κ.ο.κ.) ότι η εφαρμογή τάσης σε ένα ιστό που περιέχει κολλαγόνο επιφέρει αλλαγή της μοριακής δομής του. Αυτή η μεταβολή οφείλεται κυρίως στην έκταση των ελίκων και την ευθυγράμμιση των μοριακών ατελειών (kinks).

Στους 65° το κολλαγόνο των θηλαστικών συρρικνώνεται στο ένα τρίτο του αρχικού του μήκους λόγω της κατάρρευσης της κρυσταλλικής του δομής. Δεν δίνει ίχνη σε περίθλαση ακτίνων X και είναι ελαστικό με μέτρο Young περί το 1 MPa.

#### ❖ *Εφαρμογή ως βιοϋλικού:*

Το ιδιαίτερο ενδιαφέρον που εκδηλώνεται για την αξιοποίηση του κολλαγόνου ως βιοϋλικού απορρέει από τα φυσικά χαρακτηριστικά του. Κατ' αρχήν, προκαλεί μειωμένη έως μηδενική ανοσοαντίδραση του οργανισμού έναντι του, γεγονός πολύ σημαντικό για την αποφυγή επιπλοκών. Επίσης, έχει την ικανότητα να διαμορφώνεται αποκτώντας διάφορες μορφές (φύλλα, σπογγώδη υλικά, γέλες (gels), σκόνη και ενέσιμα αιωρήματα), ενώ υπάρχει και η δυνατότητα εγκλωβισμού σε αυτά διαφόρων φαρμάκων, παρέχοντας έτσι τη δυνατότητα για μεγάλο εύρος εφαρμογών με ταυτόχρονη επίτευξη συγκεκριμένων θεραπευτικών στόχων.

Αξιοσημείωτη εφαρμογή του κολλαγόνου είναι η χρησιμοποίησή του ως υλικού επούλωσης πληγών και εγκαυμάτων, καθώς παρουσιάζει υψηλή ικανότητα απορρόφησης των ιστικών εκκριμάτων, διατηρεί την υγρασία του τραυματισμένου ιστού, παρέχει μηχανική προστασία από επιπλέον τραυματισμούς και προστασία από βακτηριακή λοίμωξη, ενώ προάγει την κυτταρική δραστηριότητα και συμβάλλει στην ταχύτερη ανάπτυξη του τραυματισμένου ιστού.

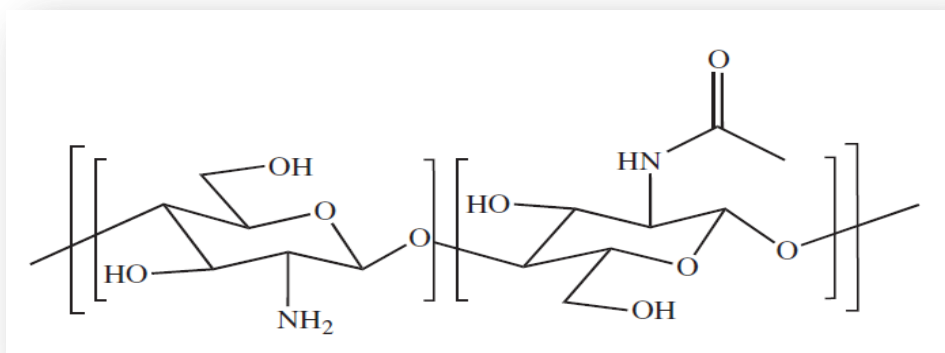
Καθώς, όμως, το κολλαγόνο αποτελεί δομικό υλικό όχι μόνο των μαλακών ιστών, αλλά και των σκληρών, με σημαντικά ποσοστά κολλαγόνου να περιέχονται στα οστά και τα δόντια, άκρως ενδιαφέρονσα είναι η προσπάθεια αξιοποίησής του στα τεχνητά εμφυτεύματα- υποκατάστατα των ιστών αυτών, σε συνδυασμό με άλλα υλικά, προκειμένου να προσομοιαστούν οι φυσικές και μηχανικές ιδιότητες των βιολογικών ιστών.[11]

### 2.3.2 Χιτοζάνη

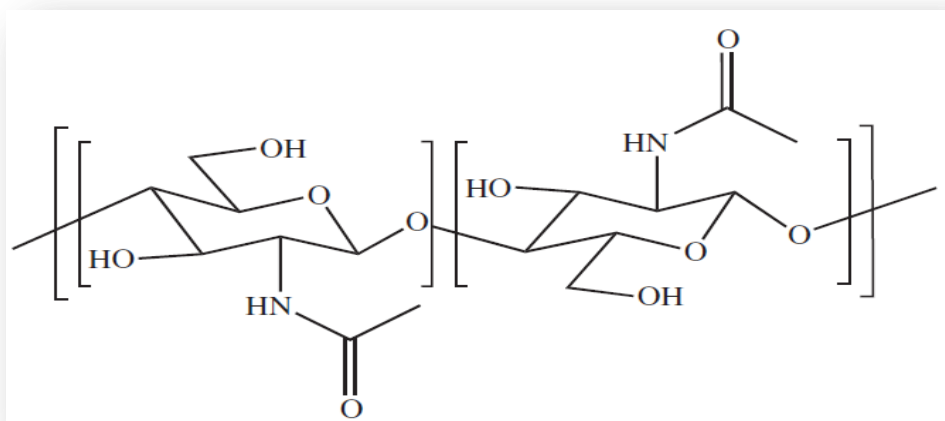
#### ❖ *Δομή και σύνθεση:*

Η χιτοζάνη είναι ένας γραμμικός, ημι-κρυσταλλικός πολυσακχαρίτης που προέρχεται από τη μερική αποακετυλίωση της χιτίνης (πολυ(β-(1→4)-N-ακετυλο-D-

γλυκοζαμίνη)), ενός φυσικού πολυσακχαρίτη υψηλής σημασίας. Η δομή τους φαίνεται στις παρακάτω εικόνες:



**Εικόνα 8.** Δομή χιτοζάνης



**Εικόνα 9.** Δομή χιτίνης

Μετά την κυτταρίνη, η χιτίνη είναι το δεύτερο σε αφθονία βιοπολυμερές και απαντάται στη φύση σε υψηλώς διαταγμένες κρυσταλλικές μικροϊνώδεις δομές. Αποτελεί δομικό συστατικό των εξωσκελετών των αρθροπόδων και των κυτταρικών τοιχωμάτων διαφόρων μυκήτων και ζυμών και χαρακτηρίζεται από εξαιρετικές ιδιότητες, καθώς είναι σκληρή και αδιάλυτη, αλλά ταυτόχρονα εύκαμπτη, και παρουσιάζει άριστη βιοσυμβατότητα.

Ωστόσο, παρά την αφθονία στη φύση, η έλλειψη ικανοποιητικών τεχνικών καθαρισμού μετά την απομόνωσή τους από τους φυσικούς οργανισμούς, έτσι ώστε να

προκύπτει ένα άχρωμο προϊόν απαλλαγμένο από κάθε είδους επιμολύνσεις για να είναι κατάλληλο να χρησιμοποιηθεί ως βιοϋλικό, ήταν ο κύριος ανασταλτικός παράγοντας για τη χρήση της μέχρι πρόσφατα. Σήμερα έχουν ήδη υιοθετηθεί χημικές τεχνικές για την εξαγωγή της από τα κελύφη των αρθρόποδων και οστρακόδερμων, όπως επίσης και για τον καθαρισμό και τον αποχρωματισμό της.

Η χιτοζάνη είναι το παράγωγο της χιτίνης μετά τη μερική αποακετυλίωσή της σε στερεή κατάσταση κάτω από αλκαλικές συνθήκες (συμπυκνωμένο καυστικό νάτριο ή καυστικό αμμώνιο) ή με ενζυματική υδρόλυση. Λόγω της ημικρυσταλλικής μορφολογίας της χιτίνης, η χιτοζάνη που αποκτάται έχει ετερογενή κατανομή ακετυλομάδων κατά μήκος των αλυσίδων. [12,13,14]

#### ❖ *Εφαρμογή ως βιοϋλικού:*

Η χιτοζάνη παρουσιάζει ένα μοναδικό κατιονικό χαρακτήρα και μία εξαιρετική ικανότητα σχηματισμού φιλμ ενώ η βιολογική της δραστηριότητα την καθιστά κατάλληλη για ένα μεγάλο αριθμό εφαρμογών.

Η χιτοζάνη θεωρείται πολύ αποτελεσματική στη θεραπεία εγκαυμάτων. Αυτό οφείλεται στην ικανότητά της να δημιουργεί ισχυρές, απορροφητικές, βιοσυμβατές μεμβράνες με την εφαρμογή απευθείας στο έγκαυμα ενός διαλύματος οξικής χιτοζάνης. Όταν εφαρμοσθεί το μίγμα για μερικές ημέρες μπορεί να θεραπεύσει πλήρως έγκαυμα τρίτου βαθμού. Τα περαιτέρω πλεονεκτήματα της χρήσης της χιτοζάνης είναι η διαπερατότητά της στο οξυγόνο που επιτρέπει στον τραυματισμένο ιστό να αναπνέει, καθώς και η φυσική αποδόμησή της από ένζυμα του οργανισμού, με αποτέλεσμα να μην απαιτείται η αφαίρεσή της μετά το πέρας της θεραπείας αποφεύγοντας περαιτέρω τραυματισμό ιστού στην πάσχουσα περιοχή. Η ικανότητά της να προσδένεται στα ερυθροκύτταρα και να προωθεί τη συγκόλλησή τους οδηγεί στη χρήση της ως αιμοστατικής ουσίας και ταυτόχρονα ερευνάται η χρήση της ως βακτηριοστατικού, αφού έχει την ιδιότητα να προσδένεται σε μία σειρά βακτηριακών ή ευκαρυωτικών κυττάρων. [14]

Πέραν των προαναφερθέντων ιδιοτήτων της σχετικά με τον ανθρώπινο οργανισμό όπως της μεγάλης βιοσυμβατότητας και βιοδιασπασιμότητας, η χιτοζάνη υστερεί όσον αφορά τις μηχανικές της ιδιότητες. Για το λόγο αυτό, έχουν

πραγματοποιηθεί πολλές έρευνες σχετικά με το συνδυασμό της με άλλα υλικά όπως ο υδροξυαπατίτης, το φωσφορικό τριασβέστιο, το φωσφορικό ασβέστιο και βιοϋλικά όπως η ζελατίνη.

#### **2.4 Κεραμικά Βιοϋλικά**

Ο όρος κεραμικά αναφέρεται σε θερμικά κατεργασμένα υλικά (με έψηση) τα οποία προέρχονται από αργιλικές πρώτες ύλες. Τα κεραμικά υλικά σήμερα καλύπτουν μεγάλο εύρος εφαρμογών στην ιατρική.

Εν αντιθέσει με τα μέταλλα και τα πολυμερή, τα κεραμικά, λόγω της ιοντικής φύσης του δεσμού και του ελαχίστου αριθμού των συστημάτων ολίσθησης, είναι δύσκολο να κοπούν πλαστικά, γεγονός που τα καθιστά μη-όλκιμα και άρα ευπαθή σε χαράξεις ή μικρορωγμές. Στην άκρη της ρωγμής, η τάση μπορεί να είναι πολλές φορές υψηλότερη από την τάση στο υπόλοιπο υλικό με αποτέλεσμα μία συγκέντρωση τάσεων η οποία το αδυνατίζει σημαντικά. Έτσι, τα κεραμικά υλικά έχουν χαμηλή αντοχή σε κόπωση σε σύγκριση με την αντοχή σε συμπίεση.

Τα κεραμικά υλικά είναι γενικά σκληρά και χαρακτηρίζονται από υψηλή αντοχή στη θλίψη, χαμηλή αντοχή στον εφελκυσμό, υψηλές θερμοκρασίες τήξης και χαμηλή ηλεκτρική και θερμική αγωγιμότητα.

Προκειμένου ένα κεραμικό υλικό να χαρακτηριστεί ως βιοκεραμικό πρέπει να συγκεντρώνει τις ακόλουθες ιδιότητες:

- i. Δεν πρέπει να είναι τοξικό.
- ii. Δεν πρέπει να είναι καρκινογόνο.
- iii. Πρέπει να είναι υποαλλεργικό.
- iv. Δεν πρέπει να προκαλεί φλεγμονές.
- v. Πρέπει να είναι βιοσυμβατό.
- vi. Για τη διάρκεια ζωής του στον ξενιστή πρέπει να είναι βιο-λειτουργικό.

Τα κεραμικά που χρησιμοποιούνται στην κατασκευή εμφυτευμάτων μπορούν να χαρακτηρισθούν ως μη απορροφήσιμα (σχετικά αδρανή), βιοενεργά ή επιφανειακής αντίδρασης (ημι-αδρανή) και βιοδιασπώμενα ή απορροφήσιμα (μη-αδρανή). Η αλούμινα, η ζirkονία, τα νιτρίδια σιλικόνης και τα καρβίδια υπάγονται

στα αδρανή βιοκεραμικά. Στα απορροφήσιμα βιοκεραμικά υπάγονται τα κεραμικά γυαλιού, οι πυκνοί υδροξυαπατίτες, τα φωσφορικά και αργιλικά άλατα του ασβεστίου.

#### **2.4.1 Κεραμικά Βιοϋλικά Φωσφορικού Ασβεστίου – Υδροξυαπατίτης**

Τα άλατα φωσφορικού ασβεστίου συγκεντρώνουν το ερευνητικό ενδιαφέρον ως προς τη δυνατότητα χρήσης τους ως χειρουργικών εμφυτευμάτων, οδοντικών εμφυτευμάτων, αλλά και ως υλικών πλήρωσης οστικών ελλειμμάτων. Εκτός από τη βιοσυμβατότητα αυτών των υλικών, σημαντικό χαρακτηριστικό είναι η ικανότητά τους να ενισχύουν την ανάπτυξη οστεογενετικών κυττάρων, ενώ η επιφανειακή εναπόθεσή τους, κυρίως υδροξυαπατίτη, σε μεταλλικά προσθετικά υλικά συντελεί στην καλύτερη πρόσδεση του βιοϋλικού με το φυσικό οστό. Παρ' όλα αυτά, στην περίπτωση που η επικάλυψη δεν είναι επιτυχής και υπάρχει αποκόλληση της σκόνης, έχουν αναφερθεί προβλήματα λοίμωξης στους παρακείμενους ιστούς. Για το σκοπό αυτό, η έρευνα εστιάζεται στην ανάπτυξη τεχνικών επικάλυψης.

Τα κεραμικά του φωσφορικού ασβεστίου που είναι διαθέσιμα σήμερα στο εμπόριο και χρησιμοποιούνται ως εμφυτεύματα στηρίζονται στις παρακάτω ενώσεις:

- Υδροξυαπατίτης ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) (HA)
- Φωσφορικό τριασβέστιο ( $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) ( $\beta\text{-TCP}$ )
- Διφασικές ενώσεις φωσφορικού ασβεστίου (μίγμα υδροξυαπατίτη και  $\beta\text{-TCP}$ )

Ο υδροξυαπατίτης (HA) είναι ένα από τα κύρια συστατικά του ανόργανου τμήματος των σκληρών ανθρώπινων ιστών (οστά και δόντια) και αποτελεί ένα από τα συνηθέστερα βιοϋλικά που έχουν μελετηθεί στο πλαίσιο της μηχανικής των οστικών ιστών λόγω της καλής του βιοσυμβατότητας. Μπορεί να σχηματίσει έναν άμεσο χημικό δεσμό με τους περιβάλλοντες ιστούς και είναι οστεαγωγίμο, μη- τοξικό, αντιφλεγμονώδες και δεν προκαλεί ανοσοποιητική αντίδραση. Παρόλα αυτά υπάρχουν κάποιοι περιορισμοί αναφορικά με τη χρήση του καθώς η ευθραυστότητά του καθιστά δύσκολη τη μορφοποίησή του.[6]

❖ **Βιομημητική σύνθεση νανο-υδροξυαπατίτη και επίδραση δενδριμερικών πολυμερών**

Το οστό θεωρείται ως μία νανο-σύνθεση μετάλλων και πρωτεϊνών και τελευταία ο νανο-ΗΑ έχει ερευνηθεί και αποδειχθεί πως έχει θετική επίδραση στην αλληλεπίδραση κυττάρου-βιούλικού. Εντούτοις, η ‘μετανάστευση’ των σωματιδίων νανο-ΗΑ από την περιοχή εμφύτευσης στους περιβάλλοντες ιστούς μπορεί να προκαλέσει βλάβη στον υγιή ιστό. Για να βρεθεί λύση, ερευνήθηκαν συνθέσεις ΗΑ και πολυμερών προς εύρεση υλικού που να διατηρεί τις καλές ιδιότητες του νανο-ΗΑ και να παρεμποδίζει την προαναφερόμενη ‘μετανάστευση’ του. Μια τέτοια προσπάθεια είναι και η σύνθεση ΗΑ-χιτοζάνης και ΗΑ-κολλαγόνου προς παραγωγή πορωδών ικριωμάτων έπειτα από λυοφιλίωση (freeze drying) του μίγματος.

Ενώ πολυάριθμα κράματα πολυμερών – υδροξυαπατίτη έχουν ερευνηθεί , πολύ λίγα έχουν διεξαχθεί με δενδριτικά πολυμερή και υδροξυαπατίτη. Όπως τελικά φαίνεται, τα δενδριτικά πολυμερή και ιδιαιτέρως τα δενδριμερή έχουν πολλαπλές λειτουργίες, ειδικότερα δε ότι είναι διαθέσιμα για χημικές αντιδράσεις ή σχεδιασμένες αλληλεπιδράσεις. Αυτό το στοιχείο είναι πλεονεκτικό για την ιστική μηχανική (tissue engineering).

Αναλυτικότερα, η ύπαρξη των δενδριμερών πολυμερών προσομοιάζει την ύπαρξη των πρωτεϊνών που υπάρχουν κατά τη φυσική διαδικασία σύνθεσης του οστού. Τα δενδριμερή, σε σύγκριση με τα γραμμικά πολυμερή, παρουσιάζουν το όφελος της ακριβούς αρχιτεκτονικής διάταξης, καθώς είναι μόρια έντονα διακλαδισμένα αποτελούμενα από ένα κεντρικό μόριο, ένα μεγάλο αριθμό κλάδων που αναπτύσσονται από αυτόν και τις τερματικές ομάδες για αυξημένη λειτουργικότητα (functionalization) των μορίων.

Τα δενδριμερή έχουν ακριβές μοριακό βάρος και μέγεθος, σφαιρικό σχήμα και τη δυνατότητα να εγκλείουν στο εσωτερικό τους μεταλλικά ιόντα ή και οργανικά μόρια. Το σημαντικότερο παράγοντα αποτελεί η ύπαρξη πολλαπλών λειτουργικών ομάδων στην επιφάνεια των μορίων τους, γεγονός που τα καθιστά ιδανικά για τη μελέτη της ρύθμισης βιολογικών διαδικασιών, δίνοντας ταυτόχρονα τη δυνατότητα δημιουργίας μιας διαδικασίας σύνθεσης που προσεγγίζει τη φυσική, όπως αυτή συμβαίνει εντός βιολογικών συστημάτων, βάση της δυνατότητας σύνδεσης των λειτουργικών ομάδων με τους αναπτυσσόμενους κρυστάλλους.

Οι πολλαπλές λειτουργίες των δενδριμερών θα μπορούσαν να επιτρέψουν αυξημένη αλληλεπίδραση με τον κεραμικό υδροξυαπατίτη. Μία συμβιοτική αλληλεπίδραση θα ενδυνάμωνε τη μήτρα και θα μπορούσε να βοηθήσει στον περιορισμό της κρυστάλλωσής του. Αυτή η άμορφη εκδοχή του υδροξυαπατίτη μοιάζει πιο πολύ με τον απατίτη που ευρίσκεται φυσικά στο κόκκαλο . Ακόμη, οι αυξημένες αλληλεπιδράσεις ωθούν προς την κατεύθυνση της αύξησης της αντοχής του υδροξυαπατίτη μέσα στο κράμα .

Παρόλο που ο έλεγχος της μικροδομής φαίνεται λογικά ως μεγάλη πρόκληση, η βιολογία έχει δώσει ήδη κάποια στοιχεία για να επιτευχθεί αυτό. Η ελεγχόμενη πυρήνωση και η διαδικασία της κρυσταλλικής ανάπτυξης , μετριάζόμενες από τον έλεγχο του μακρομορίου και από την οργάνωση των κυττάρων μπορούν να καταλήξουν στη λήψη ομοιόμορφων προϊόντων.

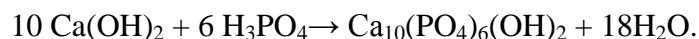
Μονοσακχαρίτες και πολυμερή χρησιμοποιούνται για να επηρεάσουν τη μορφολογία του συνθετικού υδροξυαπατίτη.[15,16]

#### ❖ *Διαδεδομένες τεχνικές παραγωγής υδροξυαπατίτη:*

Η σύνθεση του υδροξυαπατίτη μπορεί να γίνει με την εφαρμογή ποικίλων μεθόδων, οι βασικότερες απ' τις οποίες αναλύονται παρακάτω:

- Καταβύθιση-Χημική εναπόθεση

Η πιο διαδεδομένη τεχνική που χρησιμοποιείται για την παραγωγή του υδροξυαπατίτη είναι η καταβύθιση (wet, aqueous or chemical precipitation). Αυτή η μέθοδος προτάθηκε από τους Yagai Aoki σύμφωνα με τον Bouyer. Οι χρησιμοποιούμενες πρώτες ύλες είναι υδροξείδιο του ασβεστίου και ορθοφωσφορικό οξύ με παραπροϊόντα της αντίδρασης μόνο νερό σύμφωνα με τα παρακάτω:



Η μορφή του παραγόμενου υδροξυαπατίτη εξαρτάται από τον ρυθμό προσθήκης του οξέος και τη θερμοκρασία. Η ίδια μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί με διαφορετικά πρόδρομα συστατικά με απώτερο στόχο την ομογενή κρυστάλλωση υδροξυαπατίτη σε διάλυμα κατάλληλου pH και θερμοκρασίας.



Κατά περίπτωση, τα προϊόντα που προκύπτουν μπορεί να διαφέρουν ως προς τη μορφολογία ή το μέγεθος ανάλογα με την διαδικασία παρασκευής.

- Τεχνική Sol-Gel

Η μέθοδος Sol-Gel είναι πολύ αποτελεσματική για τη σύνθεση νανο-απατίτη, γιατί δίνει την δυνατότητα ελέγχου των παραμέτρων της διαδικασίας. Έχει παρατηρηθεί ότι τα δείγματα υδροξυαπατίτη που παρήχθησαν με αυτή τη μέθοδο είναι αποδοτικά στη βελτίωση της επαφής και της σταθερότητας στη διεπιφάνεια φυσικού-συνθετικού οστού, τόσο σε περιβάλλον *in vitro* αλλά και *in vivo*.

Για τη σύνθεση υδροξυαπατίτη με χρήση sol-gel, έχουν χρησιμοποιηθεί διάφοροι συνδυασμοί πρόδρομων υλικών-πηγών ασβεστίου και φωσφόρου. Και πάλι η χημική δραστηριότητα και η απαιτούμενη θερμοκρασία για τον σχηματισμό δομής απατίτη εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη φύση των πρόδρομων υλικών.

- Υδροθερμική Τεχνική

Η υδροθερμική τεχνική είναι μια διεργασία που εκμεταλλεύεται αντιδράσεις απλές ή ετερογενούς φάσης σε υδατικό διάλυμα και σχετικά αυξημένες θερμοκρασίες ( $T > 25^{\circ}\text{C}$ ) και πίεση ( $P > 100\text{kPa}$ ) για την κρυστάλλωση κεραμικών υλικών απευθείας από διάλυμα. Με τη χρήση της εν λόγω τεχνικής, ο λόγος Ca/P βελτιώνεται με την αύξηση, είτε της υδροθερμικής πίεσης, είτε της θερμοκρασίας.

- Τεχνική βιομιμητικής απόθεσης

Στην τεχνική αυτή, ένα μετασταθές συνθετικό σωματικό υγρό (SBF) με συνθετικό οργανικό άλας παρεμφερούς σύστασης με αυτής του οργανισμού, διευκολύνει την αυθόρμητη πυρήνωση και ανάπτυξη νανομεγέθους ανθρακούχου υδροξυαπατίτη που μιμείται το φυσικό σε φυσιολογικό pH και θερμοκρασία.

Ο σχηματισμός του στρώματος του απατίτη με βιομιμητική απόθεση σε διαφορετικά βιοϋλικά, έχει αποδειχτεί ότι προωθεί *in vitro* μηχανισμούς που οδηγούν στην δημιουργία ισχυρής πρόσδεσης με το οστό. Πιο συγκεκριμένα, αποδείχτηκε, ότι προωθεί την *in vitro* κυτταρική διαφοροποίηση και ότι προκαλούσε οστεογενετική

κυτταρική διαφοροποίηση με αποτέλεσμα τη δημιουργία ισχυρής σύνδεσης οστού και σύνθετης μήτρας.

Με τη βιομιμητική αυτή μέθοδο, διάφορα πορώδη εμφυτεύματα μπορούν να επικαλυφθούν με ανθρακούχο υδροξυαπατίτη νανοδιαστάσεων με βύθιση τους σε διάλυμα συνθετικών σωματικών υγρών (SBF). Η φύση των επιστρώσεων υδροξυαπατίτη μπορεί να επηρεάσει την οστεογεννητική κυτταρική διαφοροποίηση της επικάλυψης (osteogenecity), καθώς και τη διαδικασία επανασχηματισμού του οστού μέσω της μικροδομής τους, του ρυθμού διάλυσης τους και των ειδικών αλληλεπιδράσεων τους με τα σωματικά υγρά.[17,18]

#### 2.4.2 Σύνθετα Βιοϋλικά

Στην κατηγορία των σύνθετων υλικών εντάσσονται τα υλικά που αποτελούνται από δύο ή περισσότερα συστατικά, τα οποία συνδυάζονται για να επιτευχθούν ειδικές ιδιότητες και χαρακτηριστικά, που καθένα από τα συμμετέχοντα συστατικά δεν μπορεί από μόνο του να επιτύχει.

Τα σύνθετα υλικά αποτελούνται από δύο τουλάχιστον μακροσκοπικά διακρινόμενα συστατικά, τη μήτρα και την ενισχυτική φάση, με το συστατικό ενίσχυσης να προσδίδει στο υλικό βελτιωμένες μηχανικές, κυρίως, ιδιότητες. Η μήτρα είναι, συνήθως, χαμηλής πυκνότητας και η συμμετοχή της στο σύνθετο εξασφαλίζει τη μέγιστη δυνατή εκμετάλλευση των ιδιοτήτων της ενίσχυσης. Ανάλογα με τη μορφή του συστατικού ενίσχυσης, τα σύνθετα κατατάσσονται σε:

- Σύνθετα υλικά με ενίσχυση ινών (fibrous composites)
- Σύνθετα υλικά με ενίσχυση σωματιδίων (particulate composites)
- Στρωματικά σύνθετα υλικά (laminar composites)

Τα σύνθετα υλικά βρίσκουν εφαρμογή στην Ορθοπαιδική και στην Οδοντιατρική. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η αξιοποίηση του υδροξυαπατίτη στα σύνθετα υλικά με στόχο τη μίμηση της δομής και των ιδιοτήτων των φυσιολογικών οστών, με προοπτική τη δυνατότητα αξιοποίησης τέτοιων σύνθετων υλικών ως οστικών υποκατάστατων.[19]

## **Κεφάλαιο 3: Δομή και Σύσταση του Οστού**

### **3.1 Οστά- Δομή και Λειτουργίες**

Το οστό είναι ένα φυσικό σύνθετο υλικό που αποτελείται από οργανικό και ανόργανο μέρος. Το κολλαγόνο αποτελεί ένα από τα κύρια συστατικά του οργανικού μέρους, το οποίο και συνιστά το 35% του οστού, και εμφανίζει υψηλή ελαστικότητα και αντοχή σε κάμψη. Το οργανικό μέρος συμπληρώνουν τα κύτταρα και οι πρωτεΐνες, όπως η οστεοκαλσίνη, η οστεονεκτίνη και οι πρωτεογλυκάνες.

Κύρια συστατικά του ανόργανου μέρους του οστού, το οποίο συνιστά το 60-65% του ξηρού βάρους του οστού, είναι το άλας του φωσφορικού ασβεστίου και ο υδροξυαπατίτης, τα οποία προσδίδουν σκληρότητα και υψηλή αντοχή σε θλίψη. Άλλα συστατικά του ανόργανου μέρους είναι ιόντα, όπως  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{HPO}_4^-$ ,  $\text{Cl}^-$  και  $\text{F}^-$ , καθώς και ιχνοστοιχεία. Η περιεκτικότητα σε ανθρακικά ιόντα κυμαίνεται μεταξύ 3-5%. Επιπλέον, σε μικρότερη αναλογία, απαντώνται ανθρακικό ασβέστιο, χλωριούχο ασβέστιο και άλλα ιόντα που δρουν ως ενεργοποιητές ενζύμων. Το 20% κ.β του ανόργανου μέρους αποτελείται από νερό.

Όλα τα παραπάνω στο σύνολό τους αποτελούν ένα στηρικτικό ιστό που εμφανίζει υψηλή εξειδίκευση και χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερα σκληρή σύσταση και ακαμψία. Κύρια ιδιότητά του είναι η κατάσταση συνεχούς σύνθεσης και αποδόμησης στην οποία βρίσκεται υπό τον έλεγχο ορμονικών και φυσικών παραγόντων. Αυτή η σταθερή δραστηριότητα επιτρέπει τις διαδικασίες ανάπτυξης, επούλωσης και ανακατασκευής του οστού σε περιπτώσεις πώρωσης αλλά και σκελετικής κόπωσης.

Ο κύκλος ανακατασκευής του οστού διατηρείται σε χαμηλούς ρυθμούς στον ώριμο ενήλικα, ενώ στα βρέφη και στα παιδιά είναι έντονος προς κάλυψη των ολοένα αυξανόμενων σκελετικών αναγκών. Στην περίπτωση των ενηλίκων, ο κύκλος ανακατασκευής μπορεί κατ' εξαίρεση να αυξηθεί από τα βασικά του επίπεδα προκειμένου να αντιμετωπίσει οποιαδήποτε αύξηση των αναγκών προκύπτει, όπως για παράδειγμα στην περίπτωση αποκατάστασης ενός κατάγματος. Μια άλλη περίπτωση αυξημένου ρυθμού ανακατασκευής είναι αυτή παθολογικών καταστάσεων που οδηγούν σε κάποια οστική νόσο.



### **Εικόνα 10.** Τυπική δομή του οστού:

Ο οστίτης ιστός ταξινομείται ως συμπαγής ή σπογγώδης. Τα περισσότερα οστά έχουν μία βασική δομή που αποτελείται από μία εξωτερική φλοιώδη ή συμπαγή ζώνη και μια εσωτερική δοκιδώδη ή σπογγώδη ζώνη.

Το φλοιώδες οστό σχηματίζει ένα άκαμπτο εξωτερικό περίβλημα ικανό να αντιστέκεται σε δυνάμεις παραμόρφωσης, ενώ η εσωτερική δοκιδώδης ζώνη ισχυροποιεί το οστό καθώς λειτουργεί σαν ένα πολύπλοκο σύστημα εσωτερικών στηριγμάτων. Οι χώροι μεταξύ οστικών δοκίδων της σπογγώδους καταλαμβάνονται από ερυθρό μυελό των οστών.

Η αναλογία μεταξύ συμπαγούς και δοκιδώδους οστού δεν είναι η ίδια σε όλα τα οστά. Ακόμη, είναι προφανές ότι ο δοκιδώδης ιστός είναι αραιότερος του συμπαγούς και άρα η δομή του καταστρέφεται ευκολότερα. Αποτελεί το 20% περίπου της σκελετικής μάζας αλλά, λόγω του μεγάλου πηλίκου επιφάνεια/μάζα, συγκεντρώνει ένα μεγάλο ποσοστό του οστικού μεταβολισμού. Εν αντιθέσει, τα συμπαγή οστά, παρά το γεγονός ότι αποτελούν το 80% της σκελετικής μάζας, αντιπροσωπεύουν ένα μικρό μόνο μέρος του οστικού μεταβολισμού.

Τα εξειδικευμένα κύτταρα των οστών απαντώνται είτε σε επιφανειακές θέσεις, είτε σε μικρούς σκαφοειδείς χώρους του σχηματισμένου ιστού που ονομάζονται βοθρία.

### **3.2 Σύσταση των οστών - Κύτταρα του οστίτη ιστού**

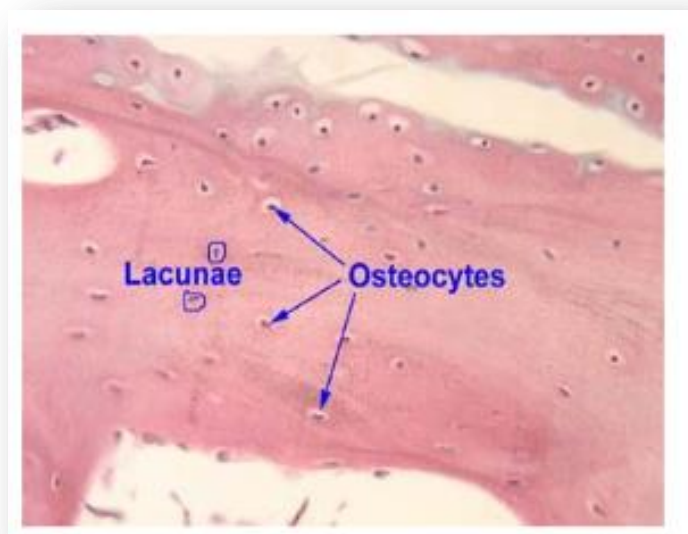
Εκτός από τα βασικά δομικά συστατικά του (βιοαπατίτης-κολλαγόνο), στο οστό υπάρχει και ένας σημαντικός αριθμός κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά είναι τριών ειδών, οι οστεοβλάστες, οι οστεοκλάστες και τα οστεοκύτταρα και η κύρια λειτουργία τους είναι η ρύθμιση του μεταβολισμού του οστού. Το οστό συντίθεται από τους οστεοβλάστες, συντηρείται από τα οστεοκύτταρα και αποδομείται από τους οστεοκλάστες. Πρόκειται για μια σειρά κυττάρων συνδετικογενούς προελεύσεως και ιδιαίζουσας δυναμικότητας. Αναλυτικότερα:

i. Κύτταρα αναδόμησης ή οστεοβλάστες:

Οι οστεοβλάστες συνθέτουν και εκκρίνουν την οργανική θεμέλια ουσία, δηλ. κολλαγόνο τύπου I, μικρές ποσότητες κολλαγόνου τύπου V, και πολυάριθμα άλλα μακρομόρια που περιλαμβάνονται στο σχηματισμό και αναδιαμόρφωση του οστού. Πιο συγκεκριμένα, πρόκειται για κατά προσέγγιση κυβοειδή μονοπύρρηνα κύτταρα αρμόδια για τη σύνθεση, την απόθεση και την επιμετάλλωση της οστικής θεμέλιας ουσίας, την οποία και εκκρίνουν. Παράλληλα, διαδραματίζουν ένα βασικό ρόλο στην ορμονική ρύθμιση της απορρόφησης των οστών, δεδομένου ότι εκφράζουν τους δέκτες για τη παραθυρεοειδική ορμόνη (PTH), την 1,25-διϋδροξυβιταμίνη D3 και άλλους υποκινητές (Standing, 2008). Να σημειωθεί, πως όταν οι οστεοβλάστες ενσωματωθούν στη θεμέλια ουσία, μετατρέπονται σε οστεοκύτταρα.

ii. Οστεοκύτταρα

Τα οστεοκύτταρα είναι πρώην οστεοβλάστες που έχουν παγιδευτεί μέσα σε μικρές κοιλότητες από οστεοποιημένη εξωκυττάρια ουσία που οι ίδιοι έχουν παράγει. Αποτελούν το 90% των κυττάρων του ώριμου σκελετού. Ο κύριος ρόλος τους είναι η συντήρηση της δομής και της σύστασης της εξωκυττάριας ουσίας, ενώ ο μεταβολικός τους ρυθμός και η παραγωγή τους υστερεί σε σχέση με των οστεοβλαστών. Ακόμη ελέγχουν την εξωκυττάρια συγκέντρωση του ασβεστίου και του φωσφόρου και εντοπίζουν αλλαγές στα επίπεδα ορμονών όπως τα οιστρογόνα και τα γλυκοκορτικοειδή που επηρεάζουν την επιβίωσή τους.

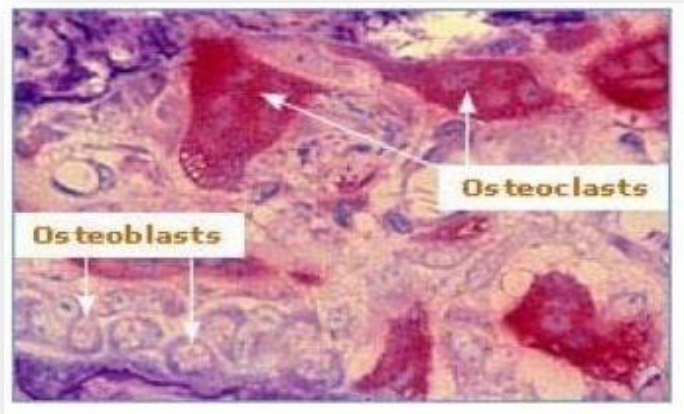


### **Εικόνα 11.** Απεικόνιση οστεοκυττάρων από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

#### iii. Κύτταρα αποδόμησης ή οστεοκλάστες

Οι οστεοκλάστες είναι μεγάλα κύτταρα με πολλαπλούς πυρήνες και άφθονο κυτταρόπλασμα. Προέρχονται από τη σειρά των μακροφάγων του αίματος, πρόδρομα μονοκύτταρα και συνένωση γιγαντοκυττάρων. Κύριος ρόλος τους είναι η συμμετοχή στην ομοίωση των οστών. Οι διαδικασίες της σύνθεσης και της αποδόμησης του οστεοειδούς είναι αλληλοσυνδεδεμένες, αλλά η δεύτερη συμβαίνει με μεγαλύτερη ταχύτητα. Σε έλλειμμα ασβεστίου του οργανισμού ενεργοποιούνται οστεοκλάστες απελευθερώνοντας τοπικά ένζυμα που αυξάνουν τη διαλυτότητα των κρυστάλλων του υδροξυαπατίτη αντλώντας την απαραίτητη ποσότητα ασβεστίου για τον οργανισμό.

Οι λειτουργίες των οστεοβλαστών και των οστεοκλαστών φαινομενικά δείχνουν να είναι αντίθετες. Στην πραγματικότητα όμως είναι περισσότερο συμπληρωματικές και ίσης σημασίας, αφού οι μεν οστεοκλάστες είναι υπεύθυνοι για την αποδόμηση του οστού, ενώ οι οστεοβλάστες είναι αυτοί που το αναδομούν.



**Εικόνα 12.** Σχηματική απεικόνιση οστεοβλαστών και οστεοκλαστών

### 3.3 Ασβεστοποίηση του οστεοειδούς

Η σκληρότητα και η ακαμψία του οστού οφείλεται στην παρουσία ανόργανων αλάτων στη θεμέλια οργανική ουσία του οστεοειδούς. Αυτά τα άλατα αποτελούν ένα κρυσταλλικό σύμπλεγμα υδροξειδίου του ασβεστίου και φωσφορικών που ονομάζεται, όπως έχει ήδη αναφερθεί, υδροξυαπατίτης ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ).

Η ασβεστοποίηση του οστού απαιτεί την παρουσία της τοπικής συγκέντρωσης, τόσο ιόντων ασβεστίου  $\text{Ca}^{2+}$ , όσο και μονάδων φωσφόρου  $\text{PO}^{4-}$ , πάνω από μία συγκεκριμένη τιμή που είναι αποτέλεσμα επίδρασης πολλών παραγόντων.

Μια γλυκοπρωτεΐνη του οστεοειδούς (η οστεοκαλσίνη) δεσμεύει τα εξωκυττάρια ιόντα  $\text{Ca}^{2+}$ , με αποτέλεσμα την αύξηση της τοπικής συγκέντρωσης αυτών. Το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση που βρίσκεται άφθονο στους οστεοβλάστες, αυξάνει την τοπική συγκέντρωση των  $\text{Ca}^{2+}$  και  $\text{PO}^{4-}$ .

Οι οστεοβλάστες παράγουν κυστίδια θεμέλιας ουσίας, τα οποία συσσωρεύουν ιόντα  $\text{Ca}^{2+}$  και  $\text{PO}^{4-}$  και επιπλέον είναι πλούσια σε ένζυμα όπως η αλκαλική φωσφατάση και η φωσφορυλάση που μπορούν να αποσπών  $\text{PO}^{4-}$  από μεγαλύτερα μόρια. Τα κυστίδια θεμέλιας ουσίας είναι σχεδόν στρογγυλά και περιβάλλονται από μεμβράνη που πιθανώς προέρχεται από την κυτταρική μεμβράνη.

Κατά τη διάρκεια σχηματισμού του οστεοειδούς, τα κυστίδια αυτά αποσπώνται από τους οστεοβλάστες μέσα στο μεσοκυττάριο χώρο και δημιουργούν τους πυρήνες εναπόθεσης αλάτων υδροξυαπατίτη.

Αν οι τοπικές συγκεντρώσεις  $\text{Ca}^{2+}$  και  $\text{PO}^{4-}$  είναι φυσιολογικές, τότε η ασβεστοποίηση συμβαίνει λίγο μετά το σχηματισμό του νέου οστεοειδούς. Σε καταστάσεις όμως αυξημένης οστεογένεσης, οι οστεοβλάστες παράγουν σε μικρό χρονικό διάστημα μεγάλες ποσότητες οστεοειδούς με αποτέλεσμα την καθυστέρηση της ασβεστοποίησής του. Ο συγχρονισμός φυσιολογικού ρυθμού ασβεστοποίησης και παραγωγής οστεοειδούς επιτυγχάνεται μόνο όταν η τελευταία επανέλθει στο φυσιολογικό ρυθμό.



Συμπερασματικά, η δόμηση του οστού επιτυγχάνεται με τον ισορροπημένο συνδυασμό: α) δημιουργίας νέου ιστού από τους οστεοβλάστες και β) εκλεκτικής απορρόφησης σχηματισμένου οστού από τους οστεοκλάστες.[6,20]

*Αντικείμενο της παρούσας μελέτης*

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω, το οστό είναι ουσιαστικά ένα κεραμικό σύνθετο υλικό αποτελούμενο από μέταλλα και πρωτεΐνες. Για το λόγο αυτό, για την παραγωγή τεχνητού οστού προτιμάται ένα σύνθετο υλικό που μιμείται τις ιδιότητες του φυσικού.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα βιοπολυμερή κολλαγόνο τύπου I και χιτοζάνη και συνδυάστηκαν με υδροξυαπατίτη παρουσία του αμινοξέος L-λυσίνη, στο οποίο γίνεται αναφορά παρακάτω.

## ***Κεφάλαιο 4: Αμινοξέα- L-Λυσίνη***

### **4.1 Αμινοξέα**

Αμινοξέα ονομάζονται τα καρβονικά οξέα που περιέχουν μία τουλάχιστον αμινομάδα. Δεκαεννέα (19) από αυτά και ένα (1) ιμινοξύ (η προλίνη) χρησιμοποιούνται στην κατασκευή των περισσότερων πρωτεϊνών των ζωντανών οργανισμών στη Γη. Αυτά ονομάζονται πρωτεϊνικά αμινοξέα.

Στον άνθρωπο, οκτώ από τα είκοσι αμινοξέα που χρησιμοποιούνται στη σύνθεση πρωτεϊνών δεν μπορούν να συντεθούν από τον οργανισμό και πρέπει να λαμβάνονται από την τροφή, για το λόγο αυτό καλούνται απαραίτητα ή βασικά αμινοξέα. Τέσσερα από τα είκοσι είναι ημιαπαραίτητα, αφού δεν μπορούν να συντεθούν στα παιδιά. Τα υπόλοιπα 8 συντίθενται μέσω των μεταβολικών μονοπατιών.

Πολλά αμινοξέα δημιουργούνται (συντίθενται) από άλλα αμινοξέα με μια διαδικασία που λέγεται τρανσαμίνωση (transamination), αν και οι περισσότεροι οργανισμοί λαμβάνουν τα βασικά αμινοξέα (essential aminoacids) με την τροφή.

*Εφαρμογές στο σχηματισμό του υδροξυαπατίτη:*

Έχει αποδειχθεί πως η κρυσταλλική πυρήνωση του υδροξυαπατίτη επηρεάζεται από μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες που απαντώνται σε μικρές ποσότητες στους ιστούς των οστών. Τέτοιες είναι η αργινίνη (Arg), η λυσίνη (Lys), το ασπαρτικό οξύ (Asp) και το γλουταμικό οξύ (Glu).

Έρευνες in vitro καταδεικνύουν πως οι εν λόγω πρωτεΐνες μπορούν, τόσο να ρυθμίσουν το σχηματισμό του απατίτη, όσο και να ελέγξουν το σχήμα και το μέγεθος του τελικού κρυστάλλου. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως κάποιες έρευνες αναφέρουν ότι πολλά από αυτά τα μόρια μπορεί κάποιες φορές να έχουν τα αντίθετα αποτελέσματα στις διαδικασίες κρυστάλλωσης, ανάλογα με τη συγκέντρωση των πρωτεϊνών και το αν η πρωτεΐνη βρίσκεται σε διάλυμα ή σε δεσμευμένη κατάσταση.

Σε πολλές έρευνες χρησιμοποιούνται βιομόρια ως αναστολείς ανάπτυξης του υδροξυαπατίτη. Στο πλαίσιο αυτό, η χρήση αμινοξέων ως πιθανών αναστολέων παρουσιάζει πλεονεκτήματα, καθώς τα αμινοξέα είναι βιοενεργές, φυσιολογικές ουσίες που μετακινούνται ελεύθερα μέσω της κυκλοφορίας του αίματος σε όλους τους ιστούς του σώματος των σπονδυλωτών.

Παρόλα αυτά, παρά τη σημασία των μη- κολλαγονούχων πρωτεϊνών και αμινοξέων στο σχηματισμό του υδροξυαπατίτη, η ακριβής επίδρασή τους στην κρυστάλλωσή του δεν είναι ακόμη ξεκάθαρη.

#### **4.1.1 L-Λυσίνη**

Η L- λυσίνη είναι ένα βασικό αμινοξύ που χρησιμοποιείται από τον οργανισμό σαν θεμέλιος λίθος για πολλές λειτουργίες σημαντικές για την ανάπτυξη και τη διατήρηση της υγείας. Παρόλα αυτά, δεν μπορεί να συντεθεί φυσικά από τον οργανισμό και γι' αυτό θεωρείται ως ένα από τα οκτώ απαραίτητα ή βασικά αμινοξέα. Είναι διαθέσιμη σε πολλές διατροφικές πηγές, άλλα μπορεί να ληφθεί με προσοχή και ως διατροφικό συμπλήρωμα από ανθρώπους που χρειάζονται συμπληρωματικές δόσεις.

Ως θεμέλιο συστατικό για την πρωτεΐνη, αμινοξέα όπως η L- λυσίνη είναι απαραίτητα για την κανονική ανάπτυξη. Ειδικότερα, η L-λυσίνη είναι αναγκαία για τη σύνθεση από τον οργανισμό της καρνιτίνης, μίας ουσίας που χρησιμοποιείται στη μετατροπή των λιπαρών οξέων σε ενέργεια. Ακόμη, βοηθά στην απορρόφηση του ασβεστίου και το σχηματισμό του κολλαγόνου, διαδικασίες σημαντικές για τη μυϊκή και οστική υγεία.

Τροφές πλούσιες σε L- λυσίνη είναι οι ξηροί καρποί, το κόκκινο κρέας, τα αβγά, το γάλα, το τυρί, τα φασόλια και οι σαρδέλες.

#### *Οφέλη της L-λυσίνης:*

Η L- λυσίνη είναι σημαντικό και αναπόσπαστο συστατικό των πρωτεϊνών. Όπως προαναφέρθηκε, παίζει ρόλο στην παραγωγή της καρνιτίνης και του κολλαγόνου. Οι ευεργετικές της επιδράσεις είναι οι παρακάτω:

- Προωθεί την κανονική ανάπτυξη αυξάνοντας το σχηματισμό του κολλαγόνου.
- Υποστηρίζει την παραγωγή άλλων πρωτεϊνών όπως τα ένζυμα, τα αντισώματα και τις ορμόνες.
- Προωθεί την υγεία των οστών αυξάνοντας την απορρόφηση ασβεστίου. Προλαμβάνει την οστεοπόρωση ή τα αδύναμα οστά μειώνοντας την απώλεια οστών.
- Βοηθά στη μετατροπή λιπαρών οξέων σε ενέργεια, βοηθώντας στην απώλεια βάρους.
- Βοηθά στη μείωση των επιπέδων κακής χοληστερόλης, μειώνοντας έτσι τον κίνδυνο καρδιακής νόσου.
- Προωθεί την υγεία του δέρματος μέσω της αυξημένης παραγωγής κολλαγόνου.
- Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία ικτών μολύνσεων.
- Μπορεί να ανακουφίσει ημικρανίες και άλλους τύπους πόνου και φλεγμονής.

- Όταν λαμβάνεται με άλλα θρεπτικά συστατικά όπως η βιταμίνη C, μπορεί να περιορίσει πόνους στο θώρακα (στηθάγχη) σχετιζόμενους με καρδιακή νόσο.
- Όταν λαμβάνεται με άλλα αμινοξέα όπως η αργινίνη, βοηθά στο ‘χτίσιμο’ μυών.

Η L- λυσίνη είναι το αμινοξύ που χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη εργασία σε διάφορες αναλογίες.[21]

## ***Κεφάλαιο 5: Πειραματικό μέρος***

### *A. Πειραματική Διαδικασία Παρασκευής Αιωρημάτων Υδροξυαπατίτη Παρουσία Βιοπολυμερούς και Αμινοξέος*

#### **5.1 Περιγραφή**

Στη συγκεκριμένη εργασία, επιχειρήθηκε η βιομιμητική σύνθεση ναοκρυστάλλων υδροξυαπατίτη παρουσία των βιοπολυμερών χιτοζάνη και κολλαγόνου και του αμινοξέος L-λυσίνη. Η βιομιμητική προσέγγιση στην παρασκευή των βιοαλάτων που ακολουθήθηκε, στοχεύει στην παραγωγή τελικού προϊόντος, που να μιμείται καλύτερα τις ιδιότητες των οστών (δομή, μηχανικές ιδιότητες και βιοαποικοδομησιμότητα). Η χρησιμοποιούμενη τεχνική συνδυάζει τη μέθοδο της χημικής καταβύθισης με την sol-gel, καθώς το τελικό παραγόμενο προϊόν που προκύπτει δεν είναι ίζημα, αλλά αιώρημα.

Τα οφέλη της συγκεκριμένης υβριδικής τεχνικής έγκεινται στην παραγωγή ελεγχόμενων δομών που προσεγγίζουν τη δομή του βιοαπατίτη των οστών με χρήση σχετικά απλών αντιδραστηρίων, στην ευκολότερη και οικονομικότερη παραγωγή προϊόντος σε σύγκριση με άλλες μεθόδους και στην παραγωγή τελικού βιοσυμβατού προϊόντος.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση του υδροξυαπατίτη είναι τα εξής:

- Ορθοφωσφορικό οξύ ( $H_3PO_4$ ), 85% g/g, για τη διάλυση του βιοπολυμερούς χιτοζάνη, η οποία διαλύεται μόνο σε όξινα διαλύματα, και του κολλαγόνου καθώς και σαν πηγή ιόντων φωσφόρου
- Υδροξείδιο του ασβεστίου ( $Ca(OH)_2$ ), σαν πηγή ιόντων ασβεστίου

Για τη σύνθεση των ναοκρυστάλλων υδροξυαπατίτη μελετήθηκαν διάφορες παράμετροι με αφετηρία τη μοριακή αναλογία ασβεστίου προς φώσφορο  $Ca/P=10/6=1,67$ . [22]

Στη συνέχεια, υπολογίστηκε η επιθυμητή συγκέντρωση του βιοπολυμερούς σε σχέση με την τελική ποσότητα υδροξυαπατίτη που θα παραχθεί. Η αναλογία μαζών υδροξυαπατίτη/βιοπολυμερές που επιλέχθηκε ήταν η αναλογία 70/30. Αναφορικά με το ορθοφωσφορικό οξύ, με βάση προηγούμενες έρευνες, επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί τελική συγκέντρωση 0,06 M. Τέλος, υπολογίστηκε η συγκέντρωση της L- λυσίνης με βάση τις μοριακές αναλογίες  $Ca^{2+}/αμινοξύ = 1:1, 1:2, 2:1$  και  $3:2$ .

Αναλυτικότερα:

- Χιτοζάνη

Μοριακό βάρος HA = 502,31

Αρχικά υπολογίστηκε η ποσότητα ορθοφωσφορικού οξέος ( $H_3PO_4$ ) με βάση τη μοριακή αναλογία Ca/P = 10/6.

$$a \text{ ml } H_3PO_4 \rightarrow (0,85 * a * 1,689) / 98 = 0,014649 * a \text{ mol} = n_1$$

Έστω  $n_2$  τα mol  $Ca^{2+}$ . Τότε έχουμε:

$$n_2 = n_1 * 1,67 = 0,024465 * a \text{ mol } Ca^{2+} \text{ και } \acute{\alpha}\rho\alpha \ n_2 * 74,1 = 1,8128 * a \text{ g } Ca(OH)_2$$

Έστω  $n_3$  τα mol του HA. Τότε ισχύει:  $n_3 = n_1 / 3$  ή  $n_2 / 5$

$$\text{Επομένως η μάζα του HA είναι: } 0,00489 * a * 502,31 = 2,4578 * a \text{ g}$$

Με βάση την αναλογία μαζών HA/ βιοπολυμερές = 70/30 υπολογίζουμε τη μάζα του βιοπολυμερούς χιτοζάνη, η οποία προκύπτει  $1,0533 * a \text{ g}$ .

Αντικαθιστώντας  $a = 0,6 \text{ ml}$ , έχουμε:

$$m_{Ca(OH)_2} = 1,0877 \text{ g και } m_{chit} = 0,632 \text{ g}$$

Εν συνεχεία, με βάση τις μοριακές αναλογίες  $Ca^{2+}/αμινοξύ$  υπολογίζουμε τη μάζα της L-λυσίνης.

- Αναλογία 1:1

$$n_{lys} = n_{Ca^{2+}}, \acute{\alpha}\rho\alpha \ m_{lys} = 0,024465 * a * 164,21 = 2,4104 \text{ g}$$

- Αναλογία 1:2

$$n_{lys} = 2 * n_{Ca^{2+}}, \acute{\alpha}\rho\alpha \ m_{lys} = 4,8208 \text{ g}$$

- Αναλογία 2:1

$$n_{\text{lys}} = 0,5 * n_{\text{Ca}^{2+}}, \text{ \acute{a}\rho\alpha } m_{\text{lys}} = 1,2052\text{g}$$

- Αναλογία 3:2

$$n_{\text{lys}} = 0,67 * n_{\text{Ca}^{2+}}, \text{ \acute{a}\rho\alpha } m_{\text{lys}} = 1,6069\text{ g}$$

### 5.2 Παρασκευή πρόδρομων διαλυμάτων/αιωρημάτων

Το πρώτο βήμα για την παρασκευή των προς αντίδραση διαλυμάτων ή αιωρημάτων ήταν η ζύγιση των επιθυμητών ποσοτήτων αντιδραστηρίων και η τοποθέτηση των αντίστοιχων ποσοτήτων απιονισμένου νερού σε ποτήρια ζέσεως.

Στο ένα ποτήρι ζέσεως προστίθενται τα ml του νερού, τα 0,6 ml  $\text{H}_3\text{PO}_4$  και τα γραμμάρια της χιτοζάνης. Το μίγμα τοποθετείται για περίπου 30-35 λεπτά για ανάδευση με κατάλληλο αναδευτήρα (dispenser) μέχρι να επιτευχθεί η διάλυση της χιτοζάνης. Η ανάδευση ρυθμίζεται αρχικά περίπου στους 8.000 rpm και οι στροφές αυξομειώνονται κατά τη διάρκεια της ανάδευσης ανάλογα με τη θερμοκρασία του ποτηριού ζέσεως.



**Εικόνα 13.** Πειραματική διαταξη διάλυσης της χιτοζάνης και υδροξειδίου του ασβεστίου.

Στη συνέχεια, προετοιμάζεται το αντιδραστήριο νερού και  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , το οποίο αναδεύεται με τον ίδιο τρόπο. Έπειτα, προετοιμάζεται το τελευταίο αντιδραστήριο νερού-λυσίνης, το οποίο τοποθετείται σε λουτρό σταθερής θερμοκρασίας  $40^\circ\text{C}$  υπό ανάδευση. Σε αυτό προσθέτουμε παράλληλα στάγδην τα αντιδραστήρια του ασβεστίου και φωσφορικού οξέος-χιτοζάνης για τη σύνθεση του υδροξυαπατίτη.



**Εικόνα 14.** Πειραματική διάταξη διάλυσης της λυσίνης με διατήρηση της θερμοκρασίας σε λουτρό.

Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται για κάθε μία από τις τέσσερις μοριακές αναλογίες  $\text{Ca}^{2+}$ /αμινοξύ.

Τα παραληφθέντα αιωρήματα τοποθετούνται σε λουτρό θερμοκρασίας  $40^\circ\text{C}$  για 24h. Εν συνεχεία φυγοκεντρήθηκαν για 20 λεπτά στις 11.000 στροφές και, μετά την αφαίρεση του υπερκείμενου νερού, τοποθετήθηκαν σε κάψες και παρέμειναν για 72h σε πυριαντήριο στους  $40^\circ\text{C}$  έως ότου απομακρυνθεί πλήρως η υγρασία. Τελικά κονιορτοποιήθηκαν σε γουδί από αχάτι για να ακολουθήσει ο φυσικοχημικός χαρακτηρισμός των κόνεων.



- Κολλαγόνο

Για το κολλαγόνο ακολουθήθηκε ακριβώς η ίδια διαδικασία με τη διαφορά ότι στην περίπτωση της παρασκευής του πρόδρομου αντιδραστηρίου με το κολλαγόνο απαιτείται ανάδευση για 2h για την επίτευξη τελικά ενός παχύρευστου αιωρήματος.



**Εικόνα 15.** Πειραματική διάταξη διάλυσης κολλαγόνου.

Κατά τη διάρκεια της όλης πειραματικής διαδικασίας, μετρήθηκαν και οι τιμές pH του διαλύματος νερού-λυσίνης, καθώς και του τελικού αιωρήματος. Αυτές παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα:

	pH διαλύματος λυσίνης	pH τελικού αιωρήματος
<i>Κολλαγόνο-λυσίνη 1:1</i>	10,18	9,70
<i>Κολλαγόνο-λυσίνη 1:2</i>	10,20	9,84
<i>Κολλαγόνο-λυσίνη 2:1</i>	10,17	9,35
<i>Κολλαγόνο-λυσίνη 3:2</i>	10,16	9,04
<i>Χιτοζάνη-λυσίνη 1:1</i>	10,18	9,47
<i>Χιτοζάνη-λυσίνη 1:2</i>	10,17	9,88
<i>Χιτοζάνη-λυσίνη 2:1</i>	10,06	9,45
<i>Χιτοζάνη-λυσίνη 3:2</i>	10,05	9,28

## *B. Πειραματική Διαδικασία Ανάπτυξης Ικριωμάτων*

### **5.3. Φυγοκέντρωση**

Αιώρημα ΗΑ/ Χιτοζάνης με μοριακή αναλογία  $Ca^{2+}$ /αμινοξύ (L-λυσίνη) 1:1 επιλέχθηκε για την παραγωγή ικριωμάτων με τη μέθοδο της λυοφιλίωσης.

Αρχικά το λαμβανόμενο αιώρημα φυγοκεντρείται για να φύγει το νερό. Έπειτα τοποθετείται σε καλούπι κυλινδρικού σχήματος και ακολουθούν τρεις φυγοκεντρίσεις στους 10000 rpm, δύο διάρκειας 10 λεπτών και μία τρίτη διάρκειας 2 λεπτών. Στη συνέχεια ακολουθεί το στάδιο της λυοφιλίωσης, το οποίο θα αναλυθεί αμέσως παρακάτω.

Σε αυτό το σημείο, πρέπει να γίνει μνεία στα επιθυμητά χαρακτηριστικά των λαμβανόμενων ικριωμάτων.

Για τη μηχανική ιστών ο φορέας των κυττάρων (ικρίωμα), θα πρέπει να είναι ταυτόχρονα βιοσυμβατός και βιοαποδομήσιμος. Η επιφάνεια του φορέα θα πρέπει να έχει κατάλληλες φυσικές και χημικές ιδιότητες ώστε να μπορέσουν τα κύτταρα να δεσμευτούν, να αναπτυχθούν και να οργανωθούν με τον επιθυμητό τρόπο. Τα ικριώματα θα πρέπει επίσης να έχουν υψηλό πορώδες ώστε να παρέχουν τον απαιτούμενο χώρο στα κύτταρα για προσκόλληση και για ανάπτυξη καθώς και για να επιτρέπουν τη μεταφορά θρεπτικών συστατικών και αποβλήτων.

### **5.4 Λυοφιλίωση (Freeze drying)**

#### **❖ Αρχές λειτουργίας και εργαστηριακές συσκευές**

Η λυοφιλίωση αποτελεί μία μέθοδο ξήρανσης, η οποία χρησιμοποιείται κυρίως για τη διατήρηση ευπαθών υλικών ή για τη δημιουργία τρισδιάστατων δομών με εσωτερικό πορώδες δίκτυο. Η αρχή λειτουργίας της βασίζεται στην ψύξη τους

προς ξήρανση δείγματος και την εν συνεχεία τοποθέτησή του μέσα σε θάλαμο υψηλού κενού, ώστε οι παγωμένοι κρύσταλλοι του νερού να μεταβούν απευθείας από τη στερεή στην αέρια φάση. Η εξάχνωση πραγματοποιείται με τη βοήθεια αντλίας κενού, η οποία δημιουργεί το υψηλό κενό στο εσωτερικό του δοχείου λυοφιλίωσης.

Η εξάχνωση αρχικά πραγματοποιείται στην επιφάνεια του προϊόντος και βαθμιαία προχωρά προς το εσωτερικό του. Κατά τα πρώτα στάδια της ξήρανσης, περίπου το 95% του νερού απομακρύνεται από το προϊόν. Με τον τρόπο αυτό, με την εξάχνωση δηλαδή του σχηματιζόμενου πάγου, διασφαλίζεται ότι η δομή του δείγματος θα παραμείνει άθικτη.

Τα κυριότερα μέρη των εργαστηριακών συσκευών λυοφιλίωσης είναι ο θάλαμος κατάψυξης, ο ψυχόμενος συμπυκνωτής, από τον οποίο διέρχονται οι υδρατμοί ενώ παράλληλα παρέχει τη δυνατότητα απομάκρυνσης του σχηματιζόμενου πάγου χωρίς να διακόπτεται το κενό στους θαλάμους, και η αντλία κενού που διατηρεί την πίεση μέσα στο θάλαμο στα επιθυμητά επίπεδα.

#### ❖ Πλεονεκτήματα της μεθόδου

Τα πλεονεκτήματα της λυοφιλίωσης συνίστανται σε:

- Δυνατότητα ξήρανσης μεγάλων ποσοτήτων σε μικρό χρονικό διάστημα
- Ηπιότερες συνθήκες ξήρανσης συγκριτικά με άλλες μεθόδους
- Μικρές πιθανότητες μόλυνσης του δείγματος λόγω της απομάκρυνσης έως και 98% της υγρασίας
- Δυνατότητα γρήγορης και τέλει επανυδάτωσης του δείγματος
- Παρασκευή ευαίσθητων αντιβιοτικών
- Συντήρηση της βιωσιμότητας των μικροοργανισμών και της δραστηριότητας των πρωτεϊνών, των πεπτιδίων και των φαρμακευτικών ενεργών ουσιών.

#### ❖ Παράμετροι της μεθόδου

Οι παράμετροι της λυοφιλίωσης είναι οι εξής:

- Ρυθμός ψύξης – Θερμοκρασία ψύξης

Όταν η διαδικασία της κατάψυξης είναι γρήγορη, σχηματίζονται μόνο μικροί κρύσταλλοι πάγου. Στην περίπτωση της αργής ψύξης αντίθετα, πιθανόν να υπάρξει σχηματισμός πολύ μεγαλύτερων κρυστάλλων πάγου και κατά συνέπεια να καταστραφεί η ομοιογένεια και η δομή του εκάστοτε δείγματος. Ανάλογα με την εκάστοτε εφαρμογή, χρησιμοποιούνται και διαφορετικοί ρυθμοί ψύξης του υλικού.

- Ρυθμός εξάχνωσης – Τιμές επιβαλλόμενης εσωτερικής πίεσης

Η τιμή της επιβαλλόμενης πίεσης, καθορίζει και το ρυθμό εξάχνωσης. Ο ρυθμός αυτός καθορίζει το ποσοστό του σχηματιζόμενου πορώδους καθώς και του μεγέθους των πόρων. Αξίζει να σημειωθεί ότι κατά τη διάρκεια της εξάχνωσης, δηλαδή στο στάδιο της εφαρμογής κενού στο εσωτερικό του δοχείου λυοφιλίωσης, η χαμηλή πίεση προστατεύει τα παγωμένα δείγματα από το να υγροποιηθούν και επιταχύνει το πρωταρχικό στάδιο της ξήρανσης.

Όπως προαναφέρθηκε, τα παραγόμενα ικρίωματα, εκτός από το να είναι βιοσυμβατά, πρέπει να φέρουν δίκτυο από μικροπόρους και μακροπόρους για τη διέλευση μέσω αυτών θρεπτικών συστατικών από τα κύτταρα. Δεδομένου όμως ότι τα υλικά αυτά θα χρησιμοποιηθούν για βιολογικές εφαρμογές πρέπει να παρουσιάζουν και αξιόλογες μηχανικές ιδιότητες.[23]

#### ❖ Πειραματική διαδικασία λυοφιλίωσης και παρατηρήσεις

Το αιώρημά μας ψύχθηκε για 3h στους  $-55^{\circ}\text{C}$ , έχοντας ως αποτέλεσμα να παγώσει το περιεχόμενο νερό. Εν συνεχεία, διατηρώντας τη θερμοκρασία σταθερή, πραγματοποιείται εξάχνωση (0,35 mbar για 24h), οπότε και το νερό απομακρύνεται.

Το πορώδες δίκτυο που προέκυψε παρατηρήθηκε στο Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (SEM). Παρατηρήθηκε οπτικά ότι τα τρισδιάστατα ικρίωματα που προέκυψαν είχαν χαμηλή μηχανική αντοχή σε κάμψη και εφελκυσμό. Για την επίλυση αυτού, ακολουθήθηκε η μέθοδος της διασταυρούμενης ή διαμοριακής σύνδεσης (cross-linking), η οποία θα αναλυθεί προσεχώς.

### 5.5 Μέθοδος Χημικής Διασύνδεσης (Cross-Linking)

Η μέθοδος της χημικής διασύνδεσης στηρίζεται στην κατεργασία με χημικά αντιδραστήρια πρωτεϊνικών δειγμάτων, για τη δημιουργία διασυνδέσεων ανάμεσα σε γειτονικά πρωτεϊνικά μόρια. Αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο για τη δημιουργία διμερών ή ολιγομερών μιας πρωτεΐνης in vitro.

Στην περίπτωση μας, έγινε χρήση του οργανικού διασυνδέτη γλουταραλδεΐδη (GA) σε διάλυμα περιεκτικότητας 1%. Το αιώρημα αναδεύτηκε για 2h και στη συνέχεια ακολουθήθηκε φυγοκέντριση και έκπλυση (5-6 εκπλύσεις) με νερό θερμοκρασίας 52°C για να απομακρυνθούν τα υπολείμματα της γλουταραλδεΐδης που δεν έχουν αντιδράσει με τα πολυμερή του αιωρήματος. Έπειτα ακολουθήθηκε για άλλη μια φορά η διαδικασία διοχέτευσης του αιωρήματος σε καλούπι, η διαδικασία λυοφιλίωσης και η παρατήρηση στο SEM.

Η γλουταραλδεΐδη είναι ένα δίπολο μόριο του οποίου το άτομο άνθρακα αποτελεί πυρηνόφιλο κέντρο. Οι αμινο- και ιμινο- ομάδες των πρωτεϊνών αντιδρούν με την γλουταραλδεΐδη οδηγώντας στο σχηματισμό μιας βάσης Schiff. Αυτό το ενδιάμεσο προϊόν αντιδρά με μια δεύτερη αμινομάδα με αποτέλεσμα τη δημιουργία διασυνδέσεων.

Οι βάσεις του Schiff ή αλλιώς ιμίνες, είναι οργανικές ενώσεις που περιέχουν το διπλό δεσμό  $C=N$  και ο γενικός τους τύπος είναι  $RR'C=NR''$ , όπου R= αρύλιο ή αλκύλιο, R'= άτομο υδρογόνου ή αρύλιο ή αλκύλιο και R''= αλκύλιο ή αρύλιο. Οι βάσεις Schiff, στις οποίες υπάρχει τουλάχιστον μία αρυλομάδα με δεσμό στο άτομο του αζώτου ή του άνθρακα, είναι εξαιρετικά σταθερές και συντίθενται εύκολα. Αντιθέτως στην περίπτωση που οι ομάδες R, R' και R'' είναι απλά αλειφατικά συστήματα παρατηρείται ταχεία αποσύνθεση ή πολυμερισμός της ιμίνης.

Εκτός από το πεδίο της χημείας ένταξης, οι βάσεις Schiff έχουν πολλές εφαρμογές και στη βιολογία καθώς εμφανίζουν αντιμικροβιακή, αντιβακτηριδιακή, αντιφλεγμονώδη και αντικαρκινική δράση. Ειδικότερα, μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί επιβεβαιώνουν το σχηματισμό βάσεων Schiff ως ενδιάμεσα σε ορισμένες ενζυμικές αντιδράσεις, οι οποίες περιλαμβάνουν την αλληλεπίδραση της αμινο ομάδας του ενζύμου (η οποία συνήθως προέρχεται από ένα κατάλοιπο λυσίνης)

με την καρβόνυλο ομάδα του υποστρώματος. Επιπλέον με μελέτες με φασματοσκοπία NMR που πραγματοποιήθηκαν στις βάσεις Schiff που παράγονται από φωσφορική πυριδοξάλη και αμινοξέα, διαπιστώθηκε ότι αυτές είναι ανάλογες με διάφορα ενδιάμεσα προϊόντα σημαντικών βιολογικών αντιδράσεων, όπως των αποκαρβοξυλιώσεων και των τρανσαμινώσεων.[24]

## ***Κεφάλαιο 6: Τεχνικές Χαρακτηρισμού***

### **6.1 Περίθλαση Ακτίνων X (X-ray Diffraction Analysis -XRD)**

Για το χαρακτηρισμό των κόνεων, μελετήθηκε αρχικά η κρυσταλλικότητα και η καθαρότητα φάσεων του υδροξυαπατίτη μέσω της μεθόδου περιθλασιμετρίας ακτίνων X.

Η περίθλαση, περιγράφεται στη φυσική, ως το φαινόμενο της διάχυσης των κυμάτων προς όλες τις κατευθύνσεις όταν αυτά προσπίπτουν σε ένα φράγμα ή οπή με διαστάσεις παραπλήσιες του μήκους κύματος. Το φράγμα αποτελείται από παράλληλες σχισμές ίσου πλάτους  $d$ , και θα πρέπει να ισχύει ο περιορισμός  $d \leq \lambda$ .

Ο Max von Laue ήταν ο επιστήμονας που έθεσε τα θεμέλια της τεχνικής του XRD και πρότεινε ότι θα ήταν δυνατό ένας φυσικός κρύσταλλος να αποτελέσει ένα είδος τρισδιάστατου φράγματος περίθλασης των ακτίνων X αφού η διάταξη των ατόμων στον κρύσταλλο μπορεί να θεωρηθεί ως μια σειρά από παράλληλα δικτυωτά επίπεδα, τα οποία ισαπέχουν μεταξύ τους αποστάσεις της τάξης του 1 Å. Ως συνέπεια αυτού, μια δέσμη ακτίνων X θα μπορούσε να υποστεί σκέδαση, να απορροφηθεί και να εκπεμφθεί εκ νέου, από μεμονωμένα άτομα του κρυστάλλου.

Η τεχνική της περίθλασης ακτίνων-X προσφέρει τη δυνατότητα να γίνει χαρακτηρισμός των κρυσταλλικών υλικών, όπως μετάλλων, κεραμικών, ορυκτών, πολυμερών, πλαστικών, ανόργανων ή οργανικών ενώσεων.

Πρόκειται για ένα ανεκτίμητο ερευνητικό εργαλείο για την μελέτη της κρυσταλλικής δομής των υλικών. Είναι δυνατή η επακριβής μέτρηση των αποστάσεων των ατόμων στο κρυσταλλικό πλέγμα, καθώς και ο προσδιορισμός της

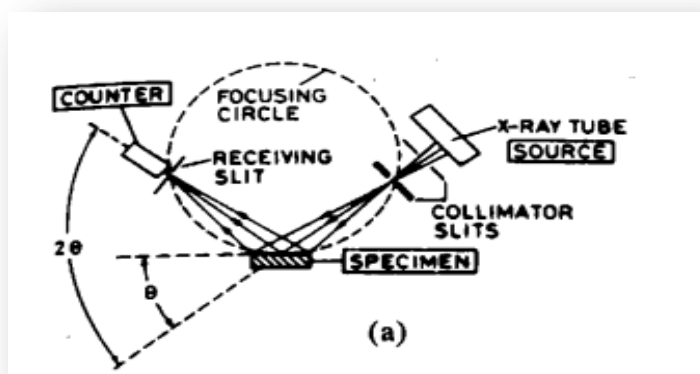
πλεγματικής δομής σύνθετων κρυστάλλων αυξημένης δομικής πολυπλοκότητα. Επιπλέον, δύναται να χρησιμοποιηθεί για προσδιορισμό των επιμέρους φάσεων του δείγματος, από τις πρώτες ύλες μέχρι το τελικό προϊόν, και να παρέχει πληροφορίες για τη φυσική κατάσταση του υλικού, όπως το μέγεθος κόκκων, την υφή κ.ά.

Καταλυτικό ρόλο για τη χρησιμοποίησή του στην επιστήμη της συντήρησης παίζει το γεγονός πως εντάσσεται στις μη καταστρεπτικές μεθόδους, δίνει γρήγορα και αξιόπιστα αποτελέσματα και μπορεί να χρησιμοποιηθεί επιτόπου, *in situ*. Μετρήσεις μπορούν να ληφθούν από κρυστάλλους μερικών μικρών μέχρι σύνολα από κρυστάλλους, παρόλο που το μέγεθος της περιοχής του δείγματος που θα εξετασθεί σπάνια υπερβαίνει  $1\text{cm}^2$ .

Οι εφαρμογές των μεθόδων περίθλασης ακτίνων X είναι ευρύτατες, σε ποικίλα επιστημονικά πεδία. Βρίσκουν ιδιαίτερη εφαρμογή στην κρυσταλλοδομή αλλά και στην ανάλυση φάσεων σε διάφορα φυσικά, βιολογικά και τεχνητά υλικά [25].

Οι κορυφές ενός φάσματος XRD χαρακτηρίζονται από καθορισμένη θέση σε αυτό, χαρακτηριστική ένταση ανάλογα το υλικό και διαφορετικό σχήμα. Οι εντάσεις των κορυφών σχετίζονται με τον τύπο των ατόμων, τη διεύθυνση τους στον κρύσταλλο και μπορούν επίσης να ποσοτικοποιηθούν και να δώσουν ακριβείς πληροφορίες για το υλικό. Το σχήμα των κορυφών στο φάσμα είναι μια ένδειξη της τελειότητας ενός κρυστάλλου.

Η δομή του οργάνου φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 16. Σχηματική απεικόνιση της οργανολογίας του XRD.

Η μελέτη της δομής, απαιτεί την εφαρμογή του νόμου της σκέδασης ή συνθήκη του Bragg, προς τιμή των πρωτοπόρων της έρευνας στην περιοχή της περίθλασης ακτίνων X, W. και L. Bragg, πατέρα και υιού, που συνδέει το μήκος κύματος,  $\lambda$ , της ακτινοβολίας, τη γωνία περίθλασης,  $\theta$ , και την πλεγματική απόσταση (interplanar distance),  $d$  μεταξύ των ατόμων σε ένα κρύσταλλο:

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot \eta \mu \theta \quad (n=0,1,2,3\dots),$$

όπου  $n$  ακέραιος αριθμός που παίρνει τιμές 0, 1, 2, 3, 4 και αναφέρεται στα διαδοχικά παράλληλα νοητά κρυσταλλικά επίπεδα, που όλα παράγουν ενισχυτική συμβολή.

Ένα κρυσταλλικό υλικό με τη μορφή κόνης είναι το σύνολο ενός μεγάλου αριθμού κρυστάλλων. Κάθε κρύσταλλος σχηματίζεται από την επαναλαμβανόμενη διευθέτηση στο χώρο της μοναδιαίας κυψελίδας, η οποία αποτελεί το ελάχιστο δομικό στοιχείο ενός κρυστάλλου. Η μοναδιαία κυψελίδα από την άλλη, προκύπτει από τη συμμετρική επανάληψη των ατόμων ή μορίων του υλικού και τα χαρακτηριστικά της είναι μοναδικά για κάθε υλικό. Για να προσδιοριστεί η κρυσταλλική δομή ενός υλικού είναι απαραίτητο να προσδιοριστούν τα χαρακτηριστικά της μοναδιαίας κυψελίδας του κρυστάλλου (διαστάσεις πλευρών και οι μεταξύ τους γωνίες). Για ένα δεδομένο κρυσταλλικό πλέγμα, οι γωνίες περίθλασης των ακτίνων X είναι ίδιες ανεξάρτητα από το περιεχόμενο της μοναδιαίας κυψελίδας, τα άτομα ή τα μόρια δηλαδή από τα οποία αποτελείται και εξαρτώνται μόνο από το σχήμα αυτής. Οι γωνίες περίθλασής λοιπόν δίνουν πληροφορίες σχετικά με τα χαρακτηριστικά της κυψελίδας και του κρυσταλλικού πλέγματος γενικότερα.

Με άλλα λόγια, τα άτομα ή τα μόρια ενός υλικού δρουν ως φράγματα περίθλασης των ακτίνων X. Ανάλογα με τον τρόπο που αυτά είναι διατεταγμένα στο χώρο, περιθλούν τις ακτίνες κατά ένα μοναδικό για κάθε υλικό τρόπο, παρέχοντας μία απεικόνιση της κρυσταλλικής δομής του στο χώρο.

Εκτός από τον προσδιορισμό της κρυσταλλικής δομής, η εν λόγω μέθοδος δίνει πληροφορίες και για τις ενώσεις που υπάρχουν σε ένα υλικό και τις μορφές τους. Πραγματοποιείται δηλαδή και ποιοτική ανάλυση. Μεγάλος αριθμός κρυσταλλογραφικών δεδομένων για τις γνωστές κρυσταλλικές δομές έχουν καταγραφεί σε βάσεις δεδομένων (JCPDS - Powder Diffraction File), και χρησιμοποιούνται ως μέτρο σύγκρισης για τα λαμβανόμενα φάσματα από το υπό



εξέταση υλικό. Προσδιορίζονται οι ενώσεις και οι μορφές τους, καθώς οι βάσεις δεδομένων περιλαμβάνουν δεκάδες χιλιάδες εγγραφές για ορυκτά, ανόργανες και οργανικές ενώσεις. Μετράμε τη γωνία  $\theta$  και τη σχετική ένταση των ισχυρότερων κορυφών και συγκρίνουμε με αυτές τις πιθανές φάσεις, για να προσδιοριστεί η δομή του δείγματος. Η διαδικασία αναζήτησης και σύγκρισης μπορεί να γίνει και αυτόματα από έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή με κατάλληλο λογισμικό.

Παράλληλα με την ποιοτική ανάλυση, πραγματοποιείται και ποσοτική ανάλυση, καθώς η σχετική ένταση των ανακλάσεων δύο ή περισσοτέρων φάσεων στο ίδιο διάγραμμα εξαρτάται από τη συγκέντρωσή τους το υλικό, οπότε και είναι δυνατό να υπολογιστεί το ποσοστό κάθε φάσης.

Τέλος, μέσω του πλάτους των ανακλάσεων της κάθε κρυσταλλικής φάσης προσδιορίζεται το μέγεθος των κρυσταλλιτών (το μέγεθος των κρυσταλλιτών είναι αντιστρόφως ανάλογο του πλάτους των ανακλάσεων στο διάγραμμα περίθλασης, καθώς όσο μικρότερο είναι το μέγεθος τους, τόσο διευρύνεται η κορυφή).[26]

#### ❖ **Περίθλαση ακτίνων X κόνεων (X-ray Powder Diffraction-XRPD)**

Αν και η γνώση των κρυσταλλογραφικών παραμέτρων ενός υλικού αποτελεί τον απόλυτο χαρακτηρισμό των πολύμορφων φάσεων μιας ουσίας, ωστόσο υπάρχουν περιορισμοί στη χρήση της. Αυτοί έγκεινται στη δυσκολία παρασκευής του μονοκρυστάλλου, καθώς επίσης και στην πολυπλοκότητα ανάλυσης των πειραματικών δεδομένων. Γι' αυτό το λόγο, η τεχνική η οποία χρησιμοποιείται κατά κόρον για αναλύσεις ρουτίνας όσον αφορά τον προσδιορισμό των πολυμόρφων είναι η περίθλαση ακτίνων X κόνεως. Στην πραγματικότητα, οι περισσότερες ουσίες λαμβάνονται κατά την παρασκευή τους ως μικροκρυσταλλικά στερεά, τα οποία δεν αποτελούνται από τέλειους κρυστάλλους και επομένως δεν είναι δυνατό να προσδιοριστούν τα χαρακτηριστικά της μοναδιαίας κυψελίδας.

## 6.2 Φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy –FT-IR)

Φασματοσκοπία είναι η μελέτη της αλληλεπίδρασης της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας (φως, ραδιοκύματα, ακτίνες X, κλπ.) με την ύλη. Τα άτομα, που αποτελούνται από ηλεκτρικά φορτισμένους πυρήνες και ηλεκτρόνια, μπορούν και αλληλεπιδρούν με το ταλαντευόμενο ηλεκτρικό και μαγνητικό πεδίο του φωτός και απορροφούν την ενέργεια που μεταφέρει.

Ένα άτομο/μόριο διεγείρεται μόνο από φωτόνια ενέργειας ίσης με την διαφορά ενέργειας μεταξύ του διεγερμένης και του ουδέτερης κατάστασης. Με ακτινοβολία (φως) υπερύθρων συχνοτήτων ( $10 - 12800 \text{ cm}^{-1}$ ), λόγω της χαμηλής ενέργειας του φωτονίου, μπορούν να διεγερθούν μόρια από ένα δονητικό ενεργειακό επίπεδο σε άλλο. Η ενέργεια μιας τέτοιας ακτινοβολίας ( $1 - 800 \text{ meV}$ ) είναι αρκετή, ώστε να προκαλέσει δονήσεις στα μόρια που την απορροφούν. Ωστόσο, οι περιστροφικές ενέργειες των μορίων είναι ακόμα μικρότερες από τις δονητικές, με αποτέλεσμα η συγκεκριμένη ακτινοβολία να είναι ικανή να προκαλέσει παράλληλα και περιστροφικές μεταπτώσεις. Στην περίπτωση αυτή, η φασματοσκοπία ονομάζεται δονητική (vibrational spectroscopy).

Οι δονητικές φασματοσκοπικές τεχνικές αποτελούν τα πιο χρήσιμα εργαλεία για την κατανόηση της φύσης των χημικών δεσμών ενός συστήματος και τη μελέτη χημικών αντιδράσεων. Τέτοιες τεχνικές είναι η φασματοσκοπία FT-IR και η φασματοσκοπία Raman. Οι εν λόγω τεχνικές είναι μη καταστροφικές ως προς το δείγμα και σχετίζονται κυρίως με μελέτες μεταβάσεων μεταξύ δονητικών και περιστροφικών επιπέδων της βασικής ηλεκτρονικής κατάστασης, ιόντων και μορίων. Η φασματοσκοπία υπερύθρου προκύπτει από απορρόφηση της ακτινοβολίας και μετάβαση σε ανώτερο ενεργειακό επίπεδο. Η Raman φασματοσκοπία διαφέρει στο ότι η πληροφορία αποκτάται από σκέδαση φωτός

### ❖ Βασικές αρχές της φασματοσκοπίας

Όταν ένα μόριο αλληλεπιδρά με ηλεκτρομαγνητικό πεδίο γίνεται μεταφορά ενέργειας από το πεδίο στο μόριο όταν ικανοποιείται η συνθήκη του Bohr  $\Delta E = h \cdot \nu$ , όπου  $\Delta E$  η διαφορά ενέργειας μεταξύ δύο κβαντισμένων ενεργειακών καταστάσεων

του μορίου,  $h$  η σταθερά του Planck και  $\nu$  η συχνότητα της ακτινοβολίας. Κάθε ηλεκτρονιακή στάθμη υποδιαιρείται σε στάθμες ταλαντώσεων, οι οποίες χαρακτηρίζονται από τον κβαντικό αριθμό ταλαντώσεως  $\nu$ , ενώ κάθε στάθμη ταλαντώσεως υποδιαιρείται σε στάθμες περιστροφής των οποίων η ενέργεια χαρακτηρίζεται από τον κβαντικό αριθμό  $J$ .

Οι ενεργειακές στάθμες λόγω περιστροφής βρίσκονται η μία κοντά στην άλλη και επομένως μεταπτώσεις μεταξύ γειτονικών σταθμών λαμβάνουν χώρα σε χαμηλές συχνότητες (ή μεγάλα μήκη κύματος). Τέτοιες μεταπτώσεις δίδουν τα φάσματα περιστροφής (rotational spectra), τα οποία μετρώνται στην περιοχή των μικροκυμάτων και άπω υπέρυθρου, δηλαδή  $1\text{ cm}^{-1}$  ( $10000\ \mu\text{m}$ ) έως περίπου  $10^2\ \text{cm}^{-1}$  ( $100\ \mu\text{m}$ ).

Η συχνότητα ( $\nu$ ) μετατρέπεται σε κυματάρηθους ( $u$ ) ή σε μήκος κύματος ( $\lambda$ ) μέσω της σχέσης:  $\lambda = c/\nu = 1/u$ , όπου  $c$  η ταχύτητα του φωτός. Η απόσταση μεταξύ δονητικών ενεργειακών σταθμών είναι μεγαλύτερη, με αποτέλεσμα οι σχετικές ενεργειακές μεταπτώσεις να λαμβάνουν χώρα σε μεγαλύτερες συχνότητες (μικρότερα μήκη κύματος) απ' ό,τι οι μεταπτώσεις λόγω περιστροφής. Τα δονητικά φάσματα (vibrational spectra) μετρώνται συνήθως στην περιοχή  $10^2\ \text{cm}^{-1}$  ( $102\ \mu\text{m}$ ) έως  $10^4\ \text{cm}^{-1}$  ( $1\ \mu\text{m}$ ) (περιοχή υπέρυθρου). Τέλος, η μεγάλη ενεργειακή απόσταση μεταξύ των ηλεκτρονιακών ενεργειακών σταθμών έχει ως αποτέλεσμα τα αντίστοιχα ηλεκτρονιακά φάσματα (electronic spectra) να μετρώνται στην περιοχή  $10^4\ \text{cm}^{-1}$  ( $1\ \mu\text{m}$ ) έως  $10^5\ \text{cm}^{-1}$  ( $0.1\ \mu\text{m}$ ) (περιοχή ορατού και υπεριώδους).

#### ❖ Αρχή φασματοσκοπίας υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR)

Στη φασματοσκοπία υπέρυθρου μελετάμε την απορρόφηση υπέρυθρου φωτός από το δείγμα συναρτήσει της συχνότητας. Το μόριο απορροφά ενέργεια  $\Delta E = h \cdot \nu$  από την IR πηγή (που εκπέμπει ακτινοβολία έντασης  $I$ ) σε κάθε δονητική μετάβαση.

Αν ένα μόριο είναι συμμετρικό δεν παρατηρείται απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας. Ένα μόριο θα απορροφήσει στο IR μόνο εφόσον μεταβάλλεται η διπολική ροπή του κατά την διάρκεια της δόνησης. Διαφορετικά, η δόνηση θεωρείται ανενεργή στο IR. Όσο μεγαλύτερη είναι η μεταβολή της διπολικής ροπής, τόσο ισχυρότερη είναι και η απορρόφηση.

Οι δονήσεις που λαμβάνουν χώρα διακρίνονται σε 2 κατηγορίες:

- Δονήσεις τάσης: Τα άτομα του δεσμού διαδοχικά πλησιάζουν και απομακρύνονται μεταξύ τους κινούμενα κατά μήκος του δεσμού.
- Δονήσεις κάμψης: Τα άτομα των γειτονικών δεσμών κινούνται έτσι ώστε να αλλάζει η γωνία των δεσμών.

Εκτός από τις παραπάνω λαμβάνουν χώρα και συνδυασμένες δονήσεις.

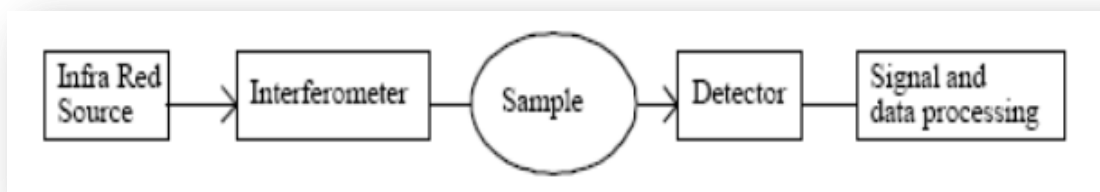
Οι μοριακές ταλαντώσεις ορισμένων ομάδων είναι ιδιαίτερα χαρακτηριστικές. Για αυτό και η φασματοσκοπία υπέρυθρου είναι κατάλληλη για τον χαρακτηρισμό ορισμένων ομάδων σε ένα μόριο (π.χ. υδροξύλια, καρβοξύλια, αμινομάδες, διπλοί και τριπλοί δεσμοί κ.α.)

#### ❖ Αρχή λειτουργίας του φασματοφωτόμετρου FT-IR

Έως το τέλος της δεκαετίας του 1960 τα φασματοφωτόμετρα τα οποία χρησιμοποιούνταν για την καταγραφή φασμάτων απορρόφησης στην περιοχή του υπέρυθρου ήταν φασματοφωτόμετρα διασποράς. Τα τυπικά μέρη τους απαρτίζονταν από την πηγή υπέρυθρης ακτινοβολίας, το θάλαμο υποδοχής του δείγματος, το μονοχρωμάτορα, ο οποίος διαχώριζε την ακτινοβολία, και τέλος τον ανιχνευτή. Με την εξέλιξη της τεχνολογίας ο μονοχρωμάτορας αντικαταστάθηκε από το ιντερφερόμετρο Michelson και τη χρήση του μαθηματικού μοντέλου των μετασχηματισμών Fourier.

Έτσι σήμερα η κλασσική διάταξη απορρόφησης υπέρυθρου στηρίζεται πλέον στο συμβολόμετρο Michelson και ονομάζεται για συντομία FT-IR (Fourier Transform InfraRed).

Η οργανολογική διάταξη FT-IR φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:



**Εικόνα 17.** Οργανολογία FT-IR.

Σαν πηγή ενέργειας μπορεί να χρησιμοποιηθεί ράβδος από κεραμικό υλικό, το οποίο μετά από ηλεκτρική θέρμανση στους 1600°C, δίνει ένα μεγάλο μέρος σε υπέρυθη ακτινοβολία.

#### ❖ Μέτρηση

Επειδή η ύαλος και ο χαλαζίας κόβουν την υπέρυθη ακτινοβολία χρησιμοποιούνται κυψελίδες από κρυστάλλους, όπως NaCl, KCl κ.α. Λόγω της ευαισθησίας των παραπάνω μορίων στην υγρασία είναι αναγκαία η απουσία νερού ακόμη και από το δείγμα. Η ποσότητα της ουσίας που χρησιμοποιείται για τις μετρήσεις στην φασματοσκοπία υπέρυθρου κυμαίνεται από 1-15mg. Ο προσδιορισμός γίνεται:

1. Σε αέρια φάση
2. Σε υγρή φάση μεταξύ δύο πλακών NaCl.
3. Σε διάλυμα
4. Σε στερεή κατάσταση υπό μορφή αιωρήματος σε παραφινέλαιο
5. Σε στερεή κατάσταση υπό μορφή δισκίου με KBr.

#### ❖ Πλεονεκτήματα της μεθόδου

Η χρήση οργάνων μετασχηματισμού Fourier παρουσιάζει αρκετά και σημαντικά πλεονεκτήματα.

Το πρώτο πλεονέκτημα σχετίζεται με την ικανότητα μέτρησης ασθενών σημάτων γνωστό και ως πλεονέκτημα Jaquinot (Jaquinot advantage), επειδή τα όργανα μετασχηματισμού Fourier αποτελούνται από λίγα μόνο οπτικά στοιχεία και καμία σχισμή δεν εξασθενίζει την ακτινοβολία. Κατά συνέπεια, η ισχύς της ακτινοβολίας, η οποία φθάνει στον ανιχνευτή, είναι κατά πολύ μεγαλύτερη από αυτή των οργάνων που διασπείρουν την ακτινοβολία και συνεπώς ο λόγος σήματος προς θόρυβο είναι επίσης μεγαλύτερος.

Ένα δεύτερο πλεονέκτημα των οργάνων μετασχηματισμού Fourier είναι η εξαιρετικά υψηλή διακριτική τους ισχύς και η επαναληψιμότητα ως προς το μήκος κύματος, τα οποία καθιστούν δυνατή την ανάλυση πολύπλοκων φασμάτων, όπου θα ήταν δύσκολος ο προσδιορισμός των μεμονωμένων φασματικών χαρακτηριστικών λόγω της πυκνότητας των γραμμών και των φασματικών επικαλύψεων.

Ένα τρίτο πλεονέκτημα μπορεί να αποδοθεί στο ότι όλη η πληροφορία, που βρίσκεται στην ακτινοβολία, φθάνει συγχρόνως στον ανιχνευτή. Το χαρακτηριστικό αυτό καθιστά δυνατή τη συλλογή δεδομένων για ολόκληρο το φάσμα σε ένα δευτερόλεπτο ή και λιγότερο.

Συνοπτικά μπορούμε να πούμε ότι τα πλεονεκτήματα της εν λόγω μεθόδου ανάλυσης συνίστανται στην αυξημένη διακριτική ικανότητα και ευαισθησία, καθώς και η μεγάλη ακρίβεια συνοδευόμενη από την ταχεία λήψη αποτελεσμάτων.

#### ❖ Ερμηνεία των φασμάτων υπερύθρου

Το φάσμα απορρόφησης το οποίο λαμβάνεται με τα όργανα IR διασποράς ή με τα FT-IR μετά το μετασχηματισμό Fourier είναι ένα διάγραμμα με τεταγμένη τη διαπερατότητα του δείγματος επί τοις % και τετμημένη τον κυματάρημο σε  $\text{cm}^{-1}$ .

*Βασικότεροι Παράμετροι μιας ζώνης απορρόφησης στο IR*

- Θέση της ζώνης

Αναφέρεται ως ο κυματάρημος της μέγιστης απορρόφησης

- Πλάτος ημιζώνης

Το πλάτος ημιζώνης αναφέρεται ως το πλάτος σε  $\text{cm}^{-1}$  στο ήμισυ του ύψους

- Ένταση

Η μοριακή απορροφητικότητα που μετρείται στο μέγιστο της κορυφής και δίνεται από το νόμο του Lambert-Beer:

$$\varepsilon^{\alpha} = \text{απορρόφηση} \cdot \text{μοριακό βάρος} / \text{mg/ml} \cdot \text{οπτική διαδρομή κυψελίδας}$$

- Ολοκληρωμένη ένταση

Η μέτρηση του εμβαδού της κορυφής

Οι ανωτέρω παράμετροι εκτός από τη θέση της ζώνης εξαρτώνται από την ταχύτητα σάρωσης του φάσματος και από το πλάτος σχισμής του μονοχρωμάτορα.

Γενικά διακρίνονται στα υπέρυθρα φάσματα δύο φασματικές περιοχές, η περιοχή ταυτοποίησης (περιοχή με τις συχνότητες των χαρακτηριστικών ομάδων,  $4000-1400 \text{ cm}^{-1}$ ) και η περιοχή αποτύπωσης ( $1400-400 \text{ cm}^{-1}$ ).

Στην πρώτη περιοχή οφείλονται οι κύριες ζώνες απορρόφησης που προκύπτουν από τη δόνηση ομάδων με δύο μόνο άτομα και με συχνότητα χαρακτηριστική των μαζών τους και της σταθεράς δύναμης που τα συνδέει. Οι δονήσεις αυτές αντιπροσωπεύουν δονήσεις θεμελιώδους τάσης  $\nu(\text{X}-\text{Y})$  και είναι με πρώτη προσέγγιση ανεξάρτητες από την επίδραση του υπόλοιπου μορίου (π.χ. όλες οι αλκοόλες έχουν  $\nu(\text{O}-\text{H})$  στα  $3600 \text{ cm}^{-1}$  περίπου). Στην περιοχή αυτή επιτυγχάνεται η ταυτοποίηση των χαρακτηριστικών ομάδων των μορίων.

Στην περιοχή αποτύπωσης, οι ζώνες απορρόφησης σχετίζονται με τις δονήσεις ολόκληρου του μορίου (αμοιβαία επίδραση των ατόμων μεταξύ τους) και στην περιοχή αυτή γίνεται η ταυτοποίηση ολόκληρου του μορίου.

Κατά την ερμηνεία των IRφασμάτων γίνεται στην αρχή η αναγνώριση διαφόρων δραστικών ομάδων που υπάρχουν στο μόριο χρησιμοποιώντας κατάλληλους πίνακες ή λογισμικά.

Ο παρακάτω πίνακας δίνει τις αναμενόμενες περιοχές συχνοτήτων και την ένταση κάθε δραστικής ομάδας:

Δεσμός	Είδος ένωσης	Συχνότητα cm <sup>-1</sup>	Ένταση		
$\begin{array}{c}   \\ -C-H \\   \end{array}$	αλκάνια	2850 – 2960	ισχυρή		
$\begin{array}{c}   \\ -C-D \\   \end{array}$	δευτερωμένα αλκάνια	~ 2200	ισχυρή		
$=C-H$	αλκίνα και αρένια	3010 – 3100	μεσαία		
$\begin{array}{c}   \\ =C-H \\   \end{array}$	αλκίνα	3300	ισχυρή, οξεία		
$\begin{array}{c}   \quad   \\ -C-C- \\   \quad   \end{array}$	αλκάνια	600 – 1500*	ασθενείς		
$\begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ C=C \\ \diagdown \quad \diagup \end{array}$	αλκίνα	1620 – 1680	μεταβλητή		
$-C=C-$	αλκίνα	2100 – 2260	μεταβλητή		
$-C=N$	νιτρίλια	2200 – 2300	μεταβλητή		
$\begin{array}{c}   \\ -C-O- \\   \end{array}$	αλκοόλες	$\begin{array}{c}   \\ -C-OH \\   \end{array}$	αιθέρες $\begin{array}{c}   \quad   \\ -C-O-C- \\   \quad   \end{array}$	1000 – 1300	ισχυρή
	καρβοξυλικά οξέα	$\begin{array}{c} O \\    \\ -C \\   \\ O-H \end{array}$	εστέρες $\begin{array}{c} O \\    \\ -C \\   \\ O-C- \\   \end{array}$		
$\begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ C=O \\ \diagdown \quad \diagup \end{array}$	αλδεΐδες	$\begin{array}{c} O \\    \\ -C-H \end{array}$		1720 – 1740	ισχυρή
$\begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ C=O \\ \diagdown \quad \diagup \end{array}$	κετόνες	$\begin{array}{c} O \\    \\ -C-C-C- \\   \quad   \end{array}$		1705 – 1725	ισχυρή
$\begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ C=O \\ \diagdown \quad \diagup \end{array}$	οξέα	$\begin{array}{c} O \\    \\ -C \\   \\ O-H \end{array}$	εστέρες $\begin{array}{c} O \\    \\ -C \\   \\ O-C- \\   \end{array}$	1700 – 1750	ισχυρή
$-O-H$	αλκοόλες	$\begin{array}{c}   \\ -C-O-H \\   \end{array}$	φαινόλες $\begin{array}{c}   \\ -C-O-H \\   \end{array}$	3590 – 3650	μεταβλητή, οξεία
$-O-H$	δεσμοί υδρογόνου	$-O-H \cdots O$	αλκοόλες και φαινόλες	3200 – 3400	ισχυρή, φαρδιά
$-O-H$	δεσμοί υδρογόνου	$-O-H \cdots O$	οξέα	2500 – 3000	φαρδιά, μεταβλητή
$-NH_2$	αμίνες	$\begin{array}{c}   \\ -C-NH_2 \\   \end{array}$		3300 – 3500	φαρδιά, μεσαία (διπλή κορυφή)
$\begin{array}{c}   \\ -N-H \\   \end{array}$	αμίνες	$\begin{array}{c} H \\   \\ -C-N-C- \\   \quad   \end{array}$		3300 – 3500	μεσαία (μία κορυφή)

\* Γενικά οι δονήσεις τύπου C – C δεν χρησιμοποιούν για την ταυτοποίηση.

**Πίνακας 3.** Περιοχές συχνοτήτων και εντάσεων κάθε δραστηκής ομάδας.

Κατόπιν συγκρίνοντας και τις άλλες ζώνες απορρόφησης που παρατηρούνται στο φάσμα στην περιοχή αποτύπωσης με τις συχνότητες αντιστοίχων πινάκων και έχοντας και άλλες βασικές πληροφορίες για το μόριο, όπως μοριακό βάρος ή μοριακός τύπος  $C_xH_yO_z$ , χρησιμοποιείται η μέθοδος της διαφοροποίησης με αποκλεισμό και επιτυγχάνεται με αυτό τον τρόπο η ταυτοποίηση της άγνωστης



ένωσης. Με το συνδυασμό και άλλων τεχνικών, όπως UV, NMR, MS, σημείου τήξης, σημείου βρασμού κ.λπ διευκολύνεται η ταυτοποίηση αγνώστων ουσιών.

Αναλυτικότερα:

Ένα φάσμα υπέρυθρου μπορεί να χωριστεί στις παρακάτω περιοχές, με βάση τα άτομα ή τις ομάδες των οποίων οι δονήσεις προκαλούν απορρόφηση στο IR:

- Περιοχή τάσης Υδρογόνου ( $4.000 - 2.500\text{cm}^{-1}$ ). Η απορρόφηση στις περιοχές αυτές προκαλείται από δονήσεις τάσεων δεσμών C-H, O-H, N-H και S-H. Η συχνότητα απορρόφησης εξαρτάται από το άτομο που με το οποίο συνδέεται το H.
- Περιοχή τάσεως τριπλού δεσμού ( $2.500 - 2.000\text{ cm}^{-1}$ ). Στην περιοχή αυτή απορροφούν οι τριπλοί δεσμοί μεταξύ ατόμων άνθρακα και οι τριπλοί δεσμοί μεταξύ ατόμων άνθρακα και αζώτου. Στην ίδια περιοχή απορροφούν και οι δεσμοί  $\text{-C}\equiv\text{C-}$  και  $\text{N}\equiv\text{C=O}$ .
- Περιοχή τάσης διπλού δεσμού ( $2.000 - 1.600\text{ cm}^{-1}$ ). Υπεύθυνες για την απορρόφηση στην περιοχή αυτή είναι οι δονήσεις των δεσμών  $\text{C}=\text{C}$ ,  $\text{C}=\text{O}$  και  $\text{C}=\text{N}$ .
- Περιοχή τάσης και κάμψης απλού δεσμού ( $1.500 - 700\text{ cm}^{-1}$ ). Στην περιοχή αυτή εμφανίζονται πολλές απορροφήσεις, π.χ. δονήσεις κάμψεως των δεσμών C-H και οι δονήσεις τάσεων και κάμψεως απλών δεσμών που συνδέουν ομάδες, όπως του μεθυλενίου ( $\text{-CH}_2\text{-}$ ), μεθυλίου ( $\text{-CH}_3$ ) και αμινομάδες. Η περιοχή αυτή ονομάζεται περιοχή δακτυλικού αποτυπώματος, επειδή το φάσμα στην περιοχή αυτή χαρακτηρίζει το μόριο ως σύνολο.

#### ❖ Δυνατότητες και εφαρμογές της IR

Οι κυριότερες εφαρμογές της μεθόδου, είναι:

- Η διελεύκανση της δομής οργανικών και ορισμένων ανόργανων ενώσεων (π.χ. διαχωρισμός βαιμίτη από διάσπορο)
- Ο έλεγχος καθαρότητας ουσιών
- Η οργανική ποσοτική ανάλυση στη χημική βιομηχανία (π.χ. φάρμακα, πολυμερή, πετρελαιοειδή κ.λπ.)
- Συνεχής παρακολούθηση αερίων ρύπων (π.χ.  $\text{CO}$ ,  $\text{CO}_2$ ) με τα μη διασπείροντα φασματόμετρα IR. [27]

### 6.3 Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (SEM)

Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης είναι ένα όργανο που λειτουργεί όπως περίπου και ένα οπτικό μικροσκόπιο μόνο που χρησιμοποιεί δέσμη ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας αντί για φως, για να εξετάσει αντικείμενα σε λεπτομερή κλίμακα.

Τα ηλεκτρόνια λόγω της κυματικής τους φύσης, μπορούν να εστιαστούν όπως και τα φωτεινά κύματα αλλά σε πολύ μικρότερη επιφάνεια (π.χ. κόκκος υλικού). Η δέσμη ηλεκτρονίων σαρώνει την επιφάνεια του δείγματος με το οποίο αλληλεπιδρά. Από την αλληλεπίδραση αυτή προκύπτουν πληροφορίες σε σχέση με τα άτομα των στοιχείων που απαρτίζουν το εξεταζόμενο υλικό.

Από τα άτομα των στοιχείων εκπέμπονται κυρίως δευτερογενή (secondary) και οπισθοσκεδαζόμενα (backscattered) ηλεκτρόνια καθώς και ακτίνες X. Τα δευτερογενή ηλεκτρόνια είναι αυτά που διεγείρονται από την επιφάνεια του δείγματος και έχουν χαρακτηριστικό μήκος κύματος. Αυτά συλλέγονται μέσω ανιχνευτή δευτερογενών ηλεκτρονίων που υπάρχει στο μικροσκόπιο. Είναι πολύ χρήσιμα γιατί δίνουν την δυνατότητα σχηματισμού εικόνων που όπως πληροφορούν για την τοπογραφία (ανάγλυφο) του εκάστοτε δοκιμίου. Όπως δίνουν, αναλόγως, επιλεκτικές φωτογραφίες στα όρια των κόκκων.

Από την πρόπτωση των πρωτογενών ηλεκτρονίων σε κάποιο βάθος από την επιφάνεια του δοκιμίου παίρνουμε σήμα από τα οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια. Τα οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια μειονεκτούν γιατί, προερχόμενα από το βάθος του δοκιμίου, απορροφώνται από τη μάζα επειδή είναι χαμηλής ενέργειας. Για τον λόγο αυτό συλλέγονται με άλλο ανιχνευτή, ο οποίος τοποθετείται όσο πιο κοντά γίνεται στην επιφάνεια του δοκιμίου και ονομάζεται ανιχνευτής οπισθοσκεδαζόμενων ηλεκτρονίων.

Τα οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια είναι σημαντικά γιατί μας πληροφορούν για το μέσο ατομικό αριθμό της περιοχής από την οποία προέρχονται. Ο μέσος ατομικός αριθμός που είναι το ημίθροισμα δύο στοιχείων, δίνει πληροφορίες για τη μέση σύσταση ανάλογα με την αναμενόμενη χημική σύσταση της περιοχής.

Οι πληροφορίες που εξάγουμε για το μέσο ατομικό αριθμό, πιστοποιούνται αργότερα με την μέθοδο χημικής ανάλυσης. Οι εικόνες που παράγονται και οφείλονται στα οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια, παρουσιάζουν αντίθεση εικόνας η οποία οφείλεται στο μέσο ατομικό αριθμό. Όσο μικρότερος ατομικός αριθμός, τόσο σκουρόχρωμη αντίθεση, ενώ όσο μεγαλύτερος τόσο ανοιχτόχρωμη αντίθεση. Γενικά αναμένουμε πληροφορίες σχετικά με την ανακατανομή των χημικών στοιχείων.

Η ένταση των εκπεμπομένων ηλεκτρονίων επηρεάζεται από τα χαρακτηριστικά της επιφάνειας. Έτσι, το SEM δίνει πληροφορίες που αφορούν κυρίως στη μορφολογία και στη σύσταση της επιφανείας. Εφαρμόζοντας ένα σύστημα ανίχνευσης της διασποράς των ενεργειών των ακτίνων X που δημιουργούνται στην επιφάνεια από την προσπίπτουσα δέσμη, μπορεί να γίνει ημιποσοτική στοιχειακή ανάλυση του υλικού.

Επομένως το SEM χρησιμοποιείται για την εξέταση μικροδομής στερεών δειγμάτων και για να δίνει εικόνες υψηλού βαθμού διεύθυνσης.

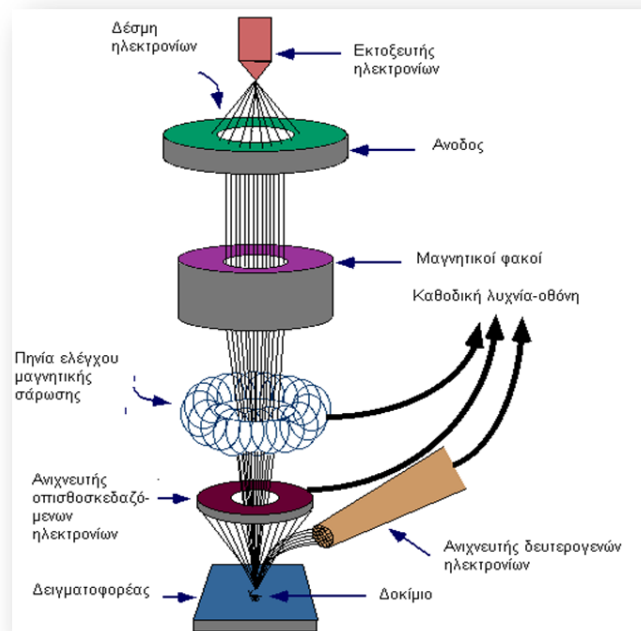
### ❖ **Οργανολογία**

Όπως προαναφέρθηκε, η λειτουργία του SEM στηρίζεται στις αλληλεπιδράσεις του προς εξέταση δείγματος και της προσπίπτουσας σε αυτό δέσμης ηλεκτρονίων. Οι βασικές διατάξεις που υπάρχουν στο μικροσκόπιο είναι το σύστημα παραγωγής δέσμης ηλεκτρονίων, το σύστημα κατεύθυνσης της δέσμης, το σύστημα πληροφοριών και τέλος το σύστημα κενού.

Τα βασικά στάδια λειτουργίας ενός ηλεκτρονικού μικροσκοπίου είναι:

- Σχηματίζεται μια δέσμη ηλεκτρονίων από την πηγή η οποία επιταχύνεται προς το δείγμα μέσω ενός θετικού ηλεκτρικού δυναμικού.
- Χρησιμοποιώντας μεταλλικά ανοίγματα, ηλεκτρομαγνητικούς φακούς και πηνία σάρωσης, επιτυγχάνεται μια λεπτή εστιασμένη μονοχρωματική δέσμη η οποία σαρώνει την επιφάνεια του δείγματος.
- Οι αλληλεπιδράσεις δέσμης δείγματος καταγράφονται από τους ανιχνευτές και μετατρέπονται σε εικόνα.

Τα παραπάνω στάδια ισχύουν για όλους τους τύπους ηλεκτρονικών μικροσκοπίων.



**Εικόνα 19.** Σχηματική απεικόνιση λειτουργίας SEM.

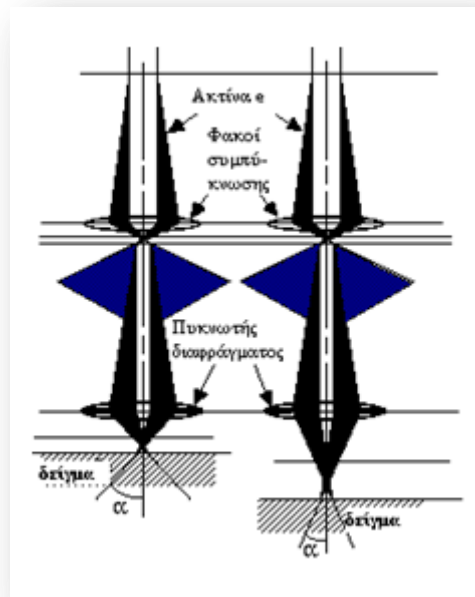
*Πηγή ηλεκτρονίων:*

Τα ηλεκτρόνια παράγονται από ένα νήμα βολφραμίου (υπάρχουν και άλλα υλικά), το οποίο λειτουργεί σαν κάθοδος. Μέσα από το νήμα περνάει ρεύμα (filament current). Καθώς το ρεύμα αυξάνεται, εκπέμπονται ηλεκτρόνια τα οποία κατευθύνονται προς την άνοδο στην οποία εφαρμόζεται ένα δυναμικό (accelerating voltage).

Τα ηλεκτρόνια επιταχύνονται από την άνοδο και περνούν μέσα από ένα ηλεκτρομαγνητικό φακό συμπύκνωσης (condenser lens) που τα μετατρέπει σε δέσμη (Στάδιο απομεγένθυσης). Η ισχύς αυτού του φακού καθορίζει την διάμετρο της δέσμης (spot size).

Άλλοι ηλεκτρομαγνητικοί φακοί ελέγχουν την εστίαση της δέσμης πάνω στην επιφάνεια του δείγματος. Τα παρακάτω σχήματα παρουσιάζουν δύο διαφορετικές συνθήκες εστίασης της δέσμης των ηλεκτρονίων: σε μικρή απόσταση εργασίας από το δείγμα (αριστερά) και σε μεγαλύτερη (δεξιά). Και στις δύο περιπτώσεις

χρησιμοποιούνται ίδιοι φακοί και με το ίδιο μέγεθος διαφράγματος. Όμως, καθώς μετακινείται το δείγμα μακριά από τους φακούς παρατηρούνται τα εξής:



**Εικόνα 20.** Συνθήκες εστίασης της δέσμης των ηλεκτρονίων.

- Η απόσταση εργασίας  $S$  αυξάνει.
- Η απομεγέθυνση ελαττώνεται.
- Το μέγεθος του σημείου αυξάνει.
- Η γωνία απόκλισης  $\alpha$  ελαττώνεται.

#### *Σύστημα Κενού:*

Κατά τη χρήση του SEM, η στήλη πρέπει να βρίσκεται υπό κενό για να μπορεί να παραχθεί και διατηρηθεί σταθερή η ακτίνα των ηλεκτρονίων. Ειδάλλως τα ηλεκτρόνια συγκρούονται με τα μόρια του αέρα και απορροφώνται. Το κενό επιτυγχάνεται με την χρήση δύο αντλιών και είναι της τάξης των  $2 \cdot 10^{-3}$  Pa.

*Σύστημα Πληροφοριών:*

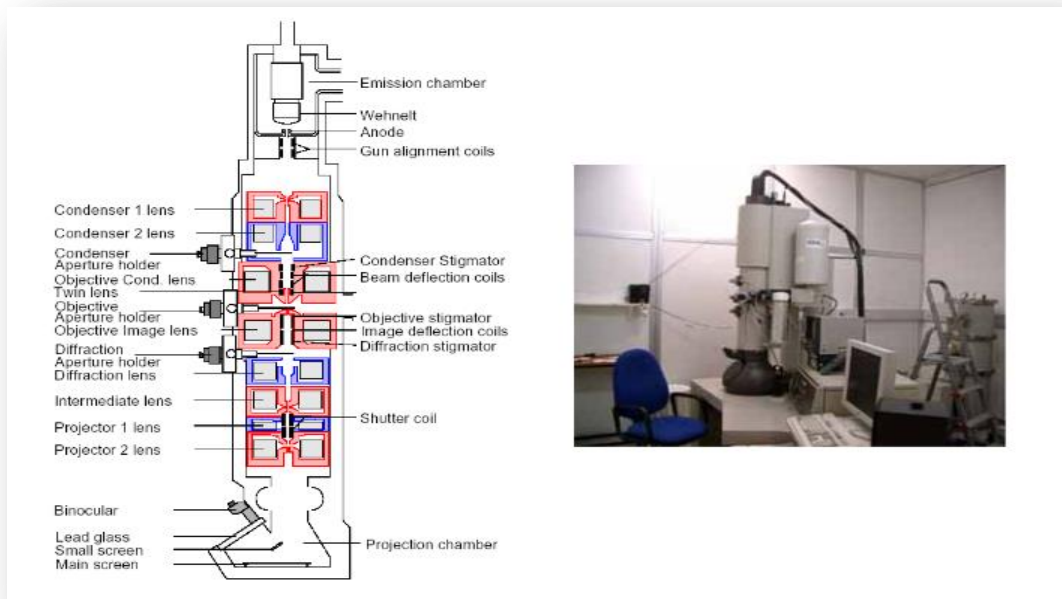
Περιλαμβάνει τους διάφορους ανιχνευτές που δέχονται τα σήματα που παράγονται από την αλληλεπίδραση της δέσμης ηλεκτρονίων με το δείγμα και το σύστημα παρουσίασης (μεγέθυνση-παρουσίαση-καταγραφή).

Οι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι ανιχνευτές δευτερογενών ηλεκτρονίων όπως ο ανιχνευτής Everhart – Thornley (ETD), ο ανιχνευτής ευρέως πεδίου (Large Field Detector, LFD), ο ανιχνευτής σε ατμοσφαιρική πίεση (Gaseous Electron Detector GED), ο ανιχνευτής διόδου στερεάς φάσης (Solid State Electron Detector, SSED) για τα οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια (BSE), καθώς και ο ανιχνευτής διόδου λιθίου – πυριτίου (SiLi), με τον οποίο ανιχνεύουμε ενεργειακή διασπορά ακτίνων - X (Energy Dispersive Spectrometer, EDS).[28]

#### **6.4 Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης (TEM)**

Η μορφολογία των κρυστάλλων (μέγεθος, σχήμα) του παραγόμενου υδροξυαπατίτη παρουσία χιτοζάνης- L-λυσίνης και κολλαγόνου- L-λυσίνης καθώς και η ομοιογένεια αυτών μελετήθηκε μέσω του Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Σάρωσης (TEM).

Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης (TEM), αποτελείται από ένα ηλεκτρονικό κανόνι για την παραγωγή των ηλεκτρονίων της δέσμης τα οποία επιταχύνονται με μία τάση 100-400kV. Κατόπιν, η δέσμη εστιάζεται από δύο συμπυκνωτές φακούς σε μία συνήθως παράλληλη δέσμη η οποία διέρχεται μέσα από ένα λεπτό δείγμα πάχους ~100nm. Τέλος, το σχηματιζόμενο είδωλο εστιάζεται και μεγεθύνεται από ένα αντικειμενικό και δύο προβολικούς φακούς και προβάλλεται, είτε σε μια φθορίζουσα οθόνη, είτε σε ένα CCD.



**Εικόνα 18.** Οργανολογία TEM.

Θα πρέπει να τονιστεί ότι το δείγμα πρέπει να είναι πολύ λεπτό, έτσι ώστε τα ηλεκτρόνια να διέλθουν από μέσα του. Συνεπώς, τα περισσότερα ηλεκτρόνια σκεδάζονται ελαστικά ή δεν σκεδάζονται εν αντιθέσει με το SEM, όπου τα ηλεκτρόνια σταματούν μέσα στο δείγμα.

#### ❖ Αρχή λειτουργίας

Η αρχή λειτουργίας του TEM σχετίζεται με το νόμο του Bragg. Τα ηλεκτρόνια που ικανοποιούν το νόμο του Bragg σκεδάζονται κατά γωνία  $2\theta$  και το ίχνος τους είναι μία κηλίδα στη φθορίζουσα οθόνη που απέχει απόσταση  $R$  από τα μη σκεδασμένα ηλεκτρόνια. Η γωνία σκέδασης είναι πολύ μικρή ( $\sim mrad$ ) και κατά συνέπεια  $\sin\theta \approx \tan\theta \approx \theta$ , οπότε η σχέση  $n \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot \eta \mu \theta$ , γίνεται:

$$R \cdot d = \lambda \cdot L$$

Γνωρίζοντας το μήκος  $L$ , το μ.κ. των ηλεκτρονίων ( $\lambda$ ) και μετρώντας την απόσταση  $R$  από την παραπάνω σχέση είναι δυνατό να υπολογίσουμε την πλεγματική απόσταση  $d$  των επιπέδων του υλικού.

Το κοντράστ σε μία εικόνα φωτεινού πεδίου οφείλεται στη σκέδαση των ηλεκτρονίων στα διάφορα σημεία του δείγματος. Σκουρόχρωμες παρουσιάζονται οι περιοχές όπου τα ηλεκτρόνια σκεδάζονται ισχυρότερα. Σε ένα δείγμα που αποτελείται από διάφορα στοιχεία οι περιοχές που περιέχουν τα βαρύτερα στοιχεία σκεδάζουν εντονότερα τα ηλεκτρόνια και φαίνονται πιο σκούρες. Ακριβώς το ίδιο συμβαίνει και όταν το δείγμα έχει διαφορετικά πάχη. Με άλλα λόγια, σκούροι φαίνονται οι κρυσταλλίτες που ικανοποιούν τη συνθήκη του Bragg.

Αντίθετα, αν με το διάφραγμα του αντικειμενικού φακού επιτρέψουμε μόνο στα ηλεκτρόνια που έχουν σκεδαστεί κατά Bragg να σχηματίσουν εικόνα, η οποία ονομάζεται εικόνα σκοτεινού πεδίου, τότε φωτεινοί φαίνονται οι κρυσταλλίτες που ικανοποιούν τη συνθήκη περίθλασης.

Η διακριτική ικανότητα του TEM δίνεται από τη σχέση:

$$r = 1,21 * \lambda^{3/4} * C_s^{1/4},$$

όπου  $\lambda$  το  $\mu\text{.κ}$  των ηλεκτρονίων της δέσμης και  $C_s$  η σφαιρική εκτροπή του αντικειμενικού φακού. Τα σύγχρονα TEM έχουν διακριτική ικανότητα 0,15-0,35nm.[26]



## **Κεφάλαιο 7: Αποτελέσματα και Συζήτηση**

### *A. Ανάπτυξη υβριδικών νανοκρυστάλλων HA/βιοπολυμερών/λυσίνης*

Η κρυσταλλικότητα και η καθαρότητα των παραγόμενων φάσεων υδροξυαπατίτη μελετήθηκαν αρχικά μέσω της περίθλασης ακτίνων X (XRD), ενώ περαιτέρω ανάλυση πραγματοποιήθηκε μέσω της φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR). Τέλος, εξήχθησαν συμπεράσματα για τη μορφολογία των κρυστάλλων του υδροξυαπατίτη μέσω της παρατήρησης στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης (TEM).

#### **7.1 Αποτελέσματα XRD και σχολιασμός τους**

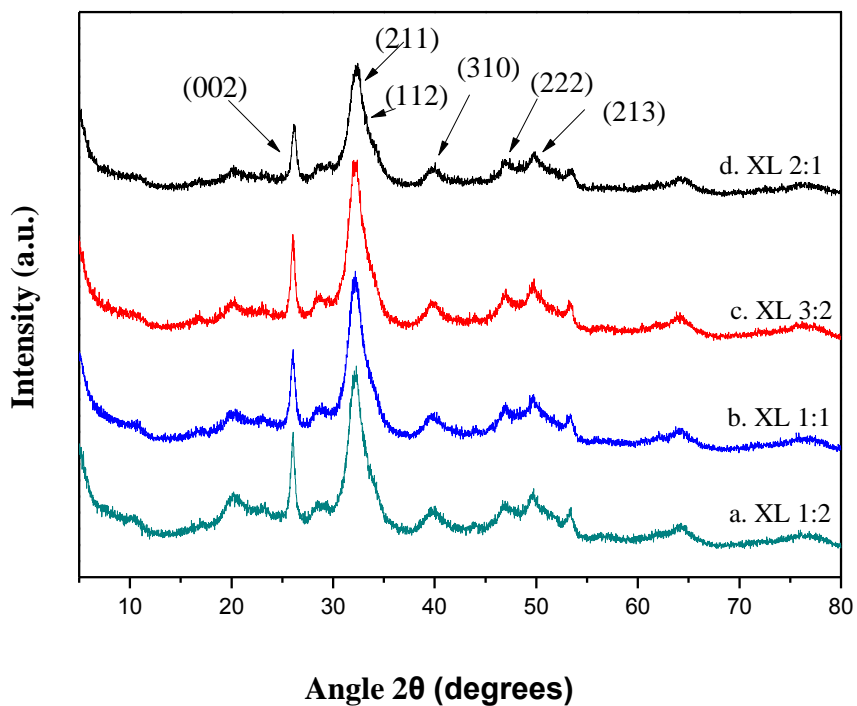
Η ταυτοποίηση φάσεων για το εκάστοτε δείγμα πραγματοποιήθηκε συγκρίνοντας τις κορυφές των διαγραμμάτων που προέκυψαν με αυτές του καθαρού υδροξυαπατίτη.

Τα διαγράμματα και ο σχολιασμός τους παρατίθενται αμέσως παρακάτω.

Στο Σχήμα 1 παρουσιάζονται τα διαγράμματα που αφορούν στο υλικό που αναπτύχθηκε παρουσία χιτοζάνης και με αναλογίες  $Ca^{2+}$ / αμινοξύ (L-λυσίνη): 1:2, 1:1, 3:2 και 2:1.

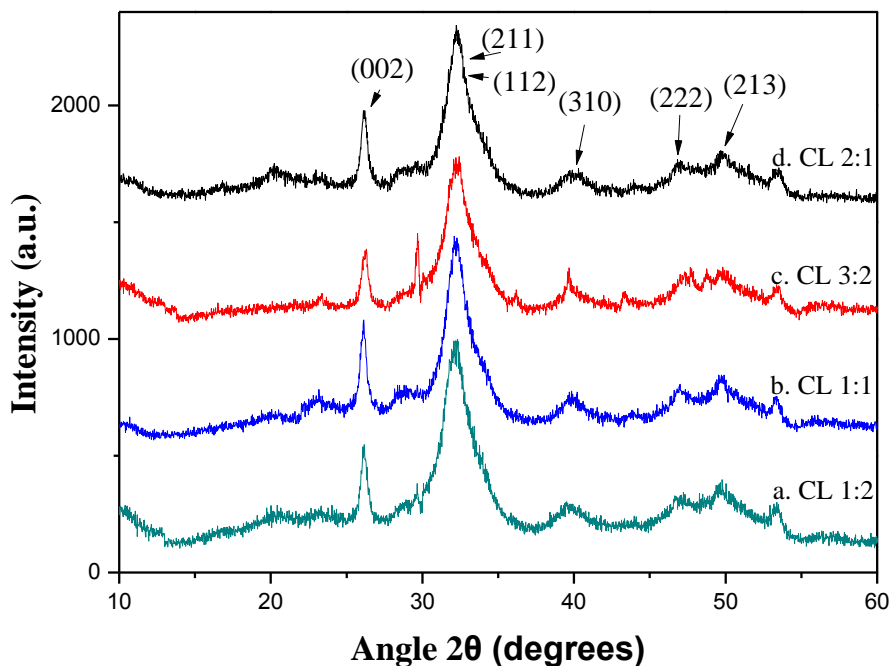
Οι κορυφές που εμφανίζονται στα λαμβανόμενα φάσματα αντιστοιχούν στον κρυσταλλικό εξαγωνικό υδροξυαπατίτη (JCPDS 09-0432).[22] Σημαντικό σε αυτή την περίπτωση, είναι ότι ο υδροξυαπατίτης είναι η μόνη φάση που ταυτοποιείται, ενώ δεν ανιχνεύονται άλλες πρόδρομες φάσεις όπως ο μονετίτης ή/και ο μπρουσίτης (τύποι). Αυτό συμβαίνει για όλες τις εξεταζόμενες περιπτώσεις, συνεπώς, η διαφορετική περιεκτικότητα σε λυσίνη δεν επηρεάζει την ορυκτολογική σύσταση του προϊόντος που προκύπτει. Επιπροσθέτως, τα τέσσερα δείγματα παρουσιάζουν

παρόμοια δομή, καθώς δεν αλλάζει το εύρος της κεντρικής κορυφής του υδροξυαπατίτη.



**Σχήμα 1.** Διάγραμμα XRD για τα δείγματα HA παρουσία του βιοπολυμερούς χιτοζάνη και του αμινοξέος L-λυσίνη με αναλογία μαζών HA/χιτοζάνη = 70/30 και μοριακές αναλογίες  $\text{Ca}^{2+}$ / αμινοξύ (L-λυσίνη): a. 1:2, b. 1:1, c. 3:2 και d. 2:1 αντίστοιχα.

Ανάλογα αποτελέσματα λαμβάνονται στην περίπτωση που η σύνθεση έγινε παρουσία του κολλαγόνου (Σχήμα 2). Και σε αυτή την περίπτωση η μόνη κρυσταλλική φάση που ανιχνεύεται είναι ο υδροξυαπατίτης.

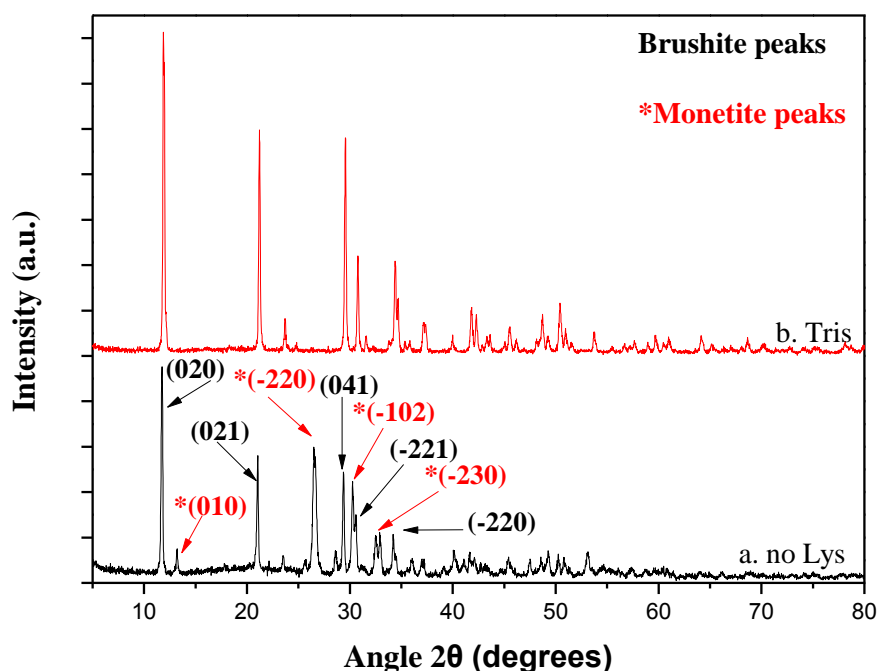


**Σχήμα 2.** Διάγραμμα XRD για τα δείγματα HA παρουσία του βιοπολυμερούς κολλαγόνο και του αμινοξέος L-λυσίνη με αναλογία μαζών HA/κολλαγόνο = 70/30 και μοριακές αναλογίες  $\text{Ca}^{2+}$ / αμινοξύ (L-λυσίνη): a. 1:2, b. 1:1, c. 3:2 και d. 2:1 αντίστοιχα.

Για συγκριτικούς λόγους, έγινε ανάπτυξη των νανοκρυστάλλων και χωρίς την παρουσία του αμινοξέος. Σε αυτή την περίπτωση παρασκευάσαμε ένα υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα Tris, έτσι ώστε το pH να ρυθμιστεί στο 9, δηλαδή σε μια τιμή pH ανάλογη με αυτήν του διαλύματος της λυσίνης. Σε αυτό το διάλυμα έγινε η στάγδην προσθήκη των δύο πρόδρομων αντιδραστηρίων (δηλαδή του υδροξειδίου του ασβεστίου και του φωσφορικού οξέος/ κολλαγόνο). Επίσης, μελετήθηκε και η περίπτωση κατά την οποία δεν είχαμε ρυθμίσει το pH, δηλαδή η προσθήκη των δύο πρόδρομων αντιδραστηρίων γινόταν σε καθαρό νερό. Οι σκόνη που παρασκευάστηκαν με αυτόν τον τρόπο μελετήθηκαν με περίθλαση ακτίνων X και τα αποτελέσματα φαίνονται στο Σχήμα 3.

Στο φάσμα που προέκυψε από το δείγμα απουσία αμινοξέος και χωρίς κάποια ρύθμιση του pH, δε λάβαμε υδροξυαπατίτη, αλλά τις πρόδρομες φάσεις μονετίτη,  $\text{CaHPO}_4$  (JCPDS 09-0080) και μπρουσίτη,  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (JCPDS 09-0077). Στην περίπτωση ρύθμισης του pH με το ρυθμιστικό διάλυμα Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethane) λάβαμε μόνο την πρώιμη φάση του μπρουσίτη.

Σε αυτό το σημείο είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι και στις δύο περιπτώσεις όπου απουσίαζε το αμινοξύ, με ρύθμιση ή μη του pH, δεν προέκυψε υδροξυαπατίτης, αλλά πρόδρομες φάσεις, και κατ' επέκταση, η παρουσία αμινοξέος είναι απαραίτητη για την παρασκευή του.



**Σχήμα 3.** Διάγραμμα XRD για τα δείγματα HA παρουσία του βιοπολυμερούς κολλαγόνο με αναλογία μαζών HA/κολλαγόνο = 70/30 και απουσία αμινοξέος a. χωρίς ρύθμιση του pH b. ρυθμίζοντας το pH με το ρυθμιστικό διάλυμα Tris.

## 7.2 Αποτελέσματα FT-IR και σχολιασμός τους

Με την FT-IR ανάλυση πραγματοποιείται περαιτέρω διαλεύκανση της δομής των δειγμάτων μέσω της ταυτοποίησης των δεσμών που δίνουν χαρακτηριστικές κορυφές στο διάγραμμα.

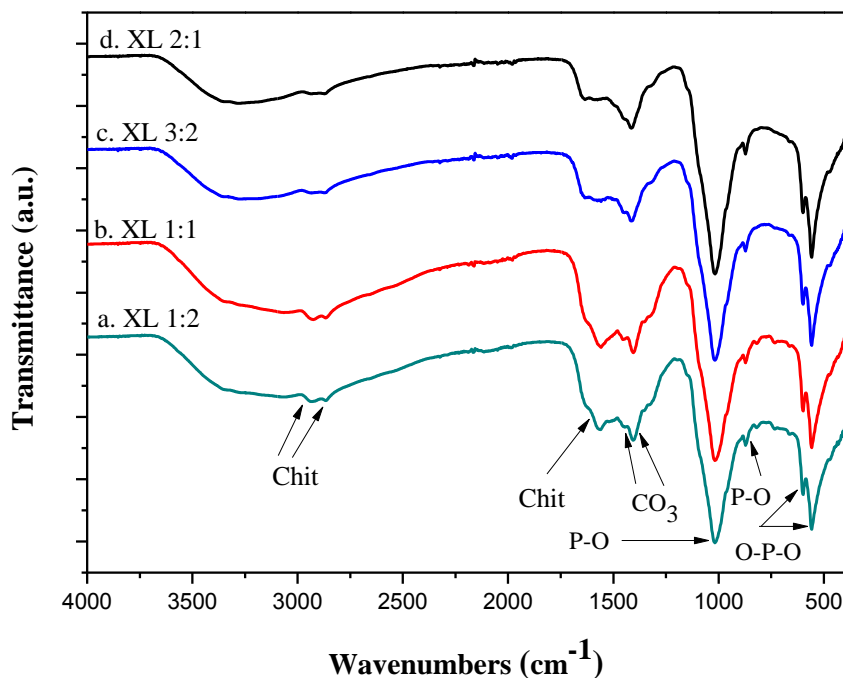
Τα διαγράμματα και ο σχολιασμός τους παρατίθενται παρακάτω.

Στο Σχήμα 4 παρουσιάζονται τα φάσματα που αφορούν στο υλικό που αναπτύχθηκε παρουσία χιτοζάνης και με αναλογίες  $\text{Ca}^{2+}$ / αμινοξύ (L-λυσίνη): 1:2, 1:1, 3:2 και 2:1.

Όλα τα φάσματα παρουσιάζουν τις κορυφές στα 557 και 598  $\text{cm}^{-1}$  που αναφέρονται στις τάσεις κάμψης του δεσμού O-P-O[29,30], παράλληλα με τις κορυφές στα 872 και 1016  $\text{cm}^{-1}$  που αντίστοιχα αναφέρονται στις τάσεις κάμψης του δεσμού P-O[31,32]. Συνεπώς, σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της ανάλυσης XRD, έχουμε σχηματισμό κρυστάλλων υδροξυαπατίτη.

Επιπροσθέτως, η ανάλυση FT-IR κατέδειξε την ύπαρξη ανθρακικών στα δείγματά μας. Πιο συγκεκριμένα, οι κορυφές γύρω στα 1405 και 1455  $\text{cm}^{-1}$  αναφέρονται στην εκτατική δόνηση του  $\text{CO}_3^{2-}$  και είναι παρούσες σε όλα τα δείγματα.[22]

Τέλος, σε όλα τα δείγματα παρουσιάζονται οι χαρακτηριστικές κορυφές της χιτοζάνης στα 1558, 2866 και 2925  $\text{cm}^{-1}$ .



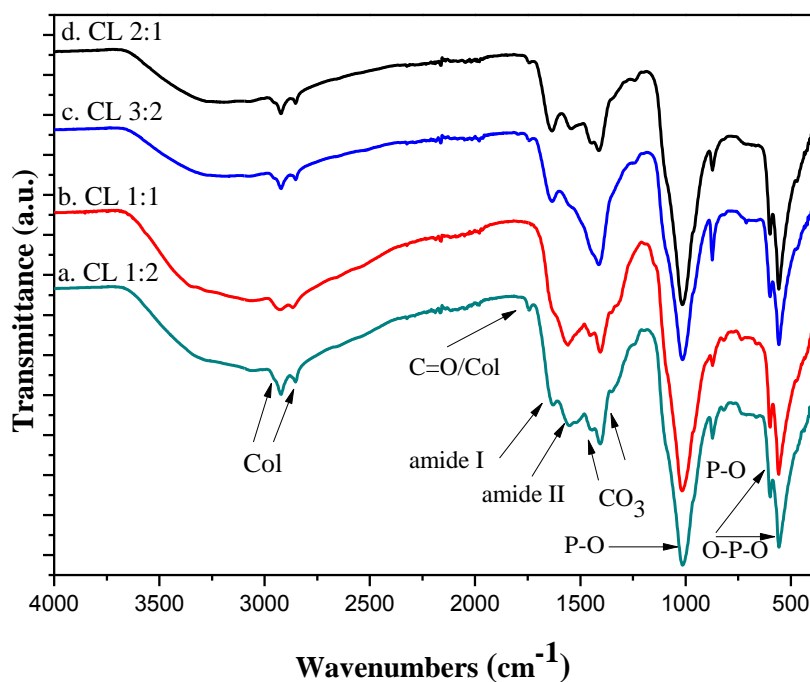
**Σχήμα 4.** Φάσματα FT-IR για τα δείγματα HA παρουσία του βιοπολυμερούς χιτοζάνη και του αμινοξέος L-λυσίνη με αναλογία μαζών HA/χιτοζάνη = 70/30 και μοριακές αναλογίες  $\text{Ca}^{2+}$ / αμινοξύ (L-λυσίνη): a. 1:2, b. 1:1, c. 3:2 και d. 2:1 αντίστοιχα.

Στο Σχήμα 5 παρουσιάζονται τα φάσματα που αφορούν στο υλικό που αναπτύχθηκε παρουσία κολλαγόνου και με αναλογίες  $\text{Ca}^{2+}$ / αμινοξύ (L-λυσίνη): 1:2, 1:1, 3:2 και 2:1.

Κατ' αντιστοιχία με την περίπτωση των δειγμάτων παρουσία του βιοπολυμερούς χιτοζάνη και σε συμφωνία με την ανάλυση XRD, στα δείγματα του κολλαγόνου έχουμε και πάλι σχηματισμό κρυστάλλων υδροξυαπατίτη. Εδώ οι χαρακτηριστικές κορυφές που αντιστοιχούν στις τάσεις κάμψης του δεσμού O-P-O εμφανίζονται στα 558 και 599  $\text{cm}^{-1}$ , ενώ αυτές που αντιστοιχούν στις τάσεις κάμψης του δεσμού P-O στα 871 και 1019  $\text{cm}^{-1}$ .

Και στην περίπτωση του κολλαγόνου έχουμε τις κορυφές στα 1406 και 1443  $\text{cm}^{-1}$  που αναφέρονται στην εκτατική δόνηση του  $\text{CO}_3^{2-}$ .

Τέλος, στα δείγματα του κολλαγόνου εμφανίζονται οι χαρακτηριστικές κορυφές του κολλαγόνου στα 1744, 2852 και 2920  $\text{cm}^{-1}$ , καθώς και η κορυφή των αμιδίων Ι[33] του κολλαγόνου στα 1630  $\text{cm}^{-1}$  και των αμιδίων ΙΙ[34] της πρωτεΐνης στα 1551  $\text{cm}^{-1}$ .



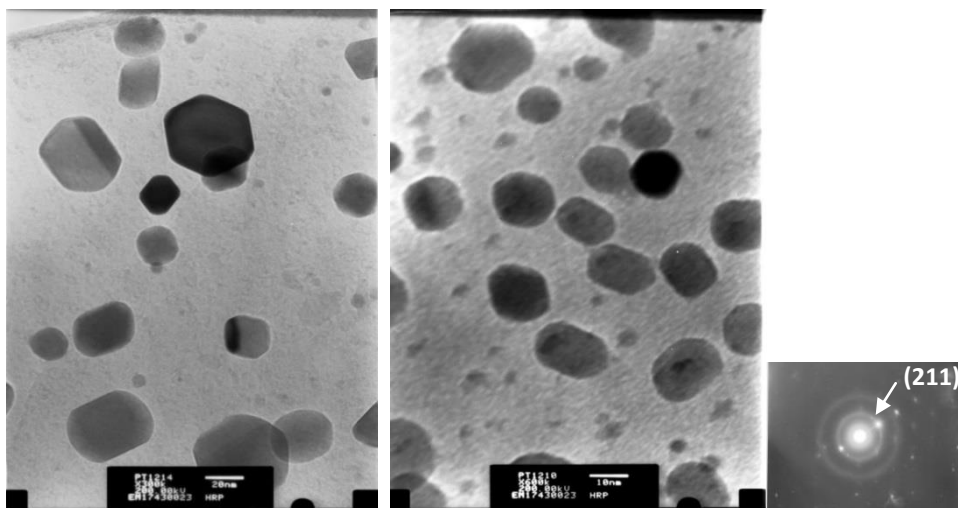
**Σχήμα 5.** Φάσματα FT-IR για τα δείγματα HA παρουσία του βιοπολυμερούς κολλαγόνου και του αμινοξέος L-λυσίνη με αναλογία μαζών HA/κολλαγόνου = 70/30 και μοριακές αναλογίες  $\text{Ca}^{2+}$ / αμινοξύ (L-λυσίνη): a. 1:2, b. 1:1, c. 3:2 και d. 2:1 αντίστοιχα.

### 7.3 Εικόνες TEM και σκολιασμός

Όπως προαναφέρθηκε, από την παρατήρηση στο TEM μπορούμε να εξάγουμε συμπεράσματα για το μέγεθος, το σχήμα και την ομοιογένεια των κρυστάλλων.

Οι εικόνες TEM για το δείγμα παρουσία του βιοπολυμερούς κολλαγόνο και του αμινοξέος L-λυσίνη με μοριακή αναλογία  $\text{Ca}^{2+}/\text{L-λυσίνη} = 1:1$  (Σχήμα 6), καταδεικνύουν την ανάπτυξη καλοσχηματισμένων πλακόμορφων κρυστάλλων υδροξυαπατίτη ομοιόμορφου σχήματος, αλλά με μικρή διασπορά ως προς τη μέση τιμή μεγέθους (συγκεκριμένα αυτή κυμαίνεται μεταξύ 10x10 nm και 20x20 nm). Το εξαγωνικό σχήμα των κρυστάλλων έρχεται σε συμφωνία με τη θεωρία και με τη μορφολογία που συναντάται στη φύση. Συνεπώς, έχουμε επιτυχή σύνθεση κρυσταλλικού υδροξυαπατίτη.

Με τη SAED ανάλυση, η οποία μας δίνει πληροφορίες για τα κρυσταλλικά επίπεδα σε πολύ μικρές περιοχές, βλέπουμε τους χαρακτηριστικούς δακτυλίους του εξαγωνικού υδροξυαπατίτη σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της ανάλυσης XRD. Συνεπώς, και με τη μέθοδο αυτή αποδεικνύεται η ανάπτυξη κρυσταλλικού εξαγωνικού υδροξυαπατίτη.

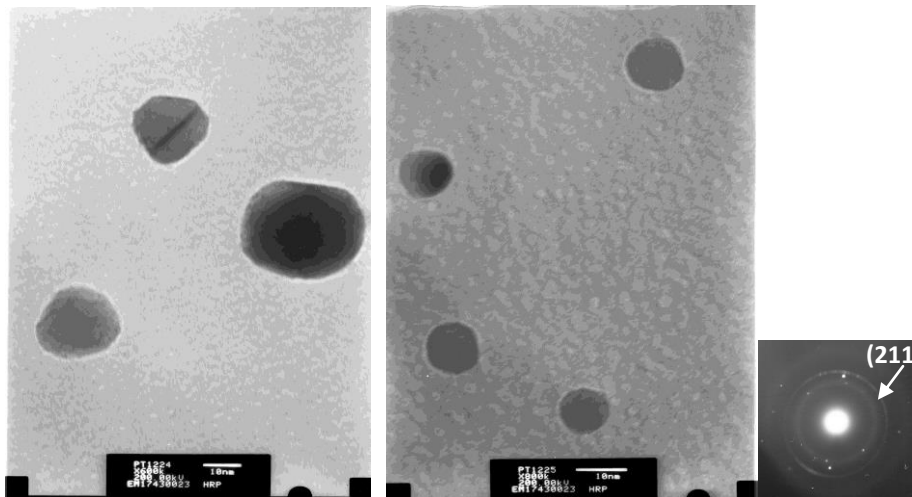


**Σχήμα 6.** Εικόνες TEM για τα δείγματα HA παρουσία του βιοπολυμερούς κολλαγόνο και του αμινοξέος L-λυσίνη με αναλογία μαζών HA/χιτοζάνη = 70/30 και μοριακές αναλογίες  $\text{Ca}^{2+}/\text{L-λυσίνη} = 1:1$ .



Κατ' αντιστοιχία, στο Σχήμα 7, το οποίο αφορά το δείγμα παρουσία του βιοπολυμερούς χιτοζάνη και του αμινοξέος L-λυσίνη, με μοριακή αναλογία  $\text{Ca}^{2+}/\text{L-λυσίνη} = 1:1$ , παρατηρούνται επίσης καλοσχηματισμένες λεπτές πλάκες υδροξυαπατίτη με ομοιόμορφη μορφολογία κρυστάλλων. Από τη σύγκριση των εικόνων, μπορεί ίσως να ειπωθεί ότι στην περίπτωση του κολλαγόνου, οι κρύσταλλοι είναι ελαφρώς καλύτερα σχηματισμένοι και κάπως μεγαλύτεροι από ό,τι στην περίπτωση της χιτοζάνης. Και εδώ όμως έχουμε επιτυχή σύνθεση ναοκρυσταλλικού υδροξυαπατίτη, οι κρύσταλλοι του οποίου κυμαίνονται επίσης μεταξύ 10x10 και 20x20 nm.

Η SAED ανάλυση δίνει επίσης τους χαρακτηριστικούς δακτυλίους του εξαγωνικού υδροξυαπατίτη σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της ανάλυσης XRD. Επομένως και εδώ επιτεύχθηκε ανάπτυξη κρυσταλλικού εξαγωνικού υδροξυαπατίτη.



**Σχήμα 7.** Εικόνες TEM για τα δείγματα HA παρουσία του βιοπολυμερούς χιτοζάνη και του αμινοξέος L-λυσίνη με αναλογία μαζών HA/χιτοζάνη = 70/30 και μοριακές αναλογίες  $\text{Ca}^{2+}/\text{L-λυσίνη} = 1:1$ .

## *B. Ανάπτυξη ικριωμάτων υδροξυαπατίτη*

Τα προηγούμενα αποτελέσματα κατέδειξαν παρόμοια συμπεριφορά μεταξύ τόσο των διαφορετικών περιεκτικότητων σε λυσίνη, όσο και μεταξύ των δειγμάτων κολλαγόνου και χιτοζάνης. Έτσι, επιλέχθηκε να αναπτυχθούν ικριώματα υδροξυαπατίτη παρουσία του βιοπολυμερούς χιτοζάνη και αναλογίας  $\text{Ca}^{2+}/\text{L-λυσίνη} = 1:1$ .

Τα ικριώματα αυτά παρήχθησαν με τη μέθοδο της λυοφιλίωσης, ενώ πραγματοποιήθηκε χημική διασύνδεση με σκοπό την επίτευξη βελτιωμένων μηχανικών ιδιοτήτων.

### **7.4 Αποτελέσματα παρατήρησης στο SEM και σχολιασμός**

Ο χαρακτηρισμός του πορώδους δικτύου των ικριωμάτων πραγματοποιήθηκε με την παρατήρησή τους στο SEM. Οι εικόνες που λήφθηκαν παρατίθενται παρακάτω:

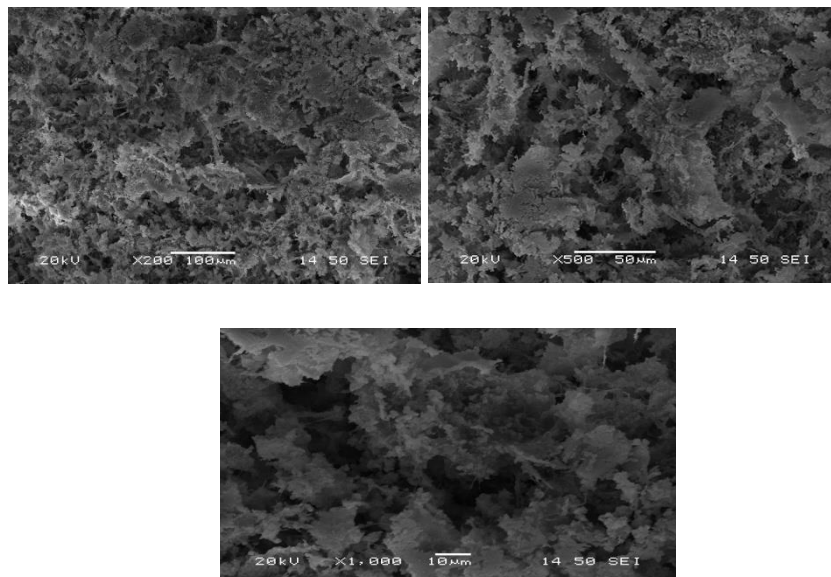
Στο Σχήμα 8 παρουσιάζονται οι εικόνες του SEM που λήφθηκαν από εγκάρσια και κάθετη τομή των ικριωμάτων του υδροξυαπατίτη παρουσία του βιοπολυμερούς χιτοζάνη και του αμινοξέος L-λυσίνη σε μεγεθύνσεις x200, x500 και x1000 πριν την πραγματοποίηση διαμοριακής διασύνδεσης με χρήση του οργανικού διασυνδέτη γλουταραλδεΐδη. Τα συμπεράσματα που εξάγουμε από την παρατήρησή τους είναι τα ακόλουθα:

Αρχικά παρατηρείται ότι το ικρίωμα παρουσιάζει παρόμοια δομή κατά την εγκάρσια και κάθετη τομή, γεγονός ενδεικτικό της ομοιόμορφης κατανομής πόρων στο εσωτερικό του.

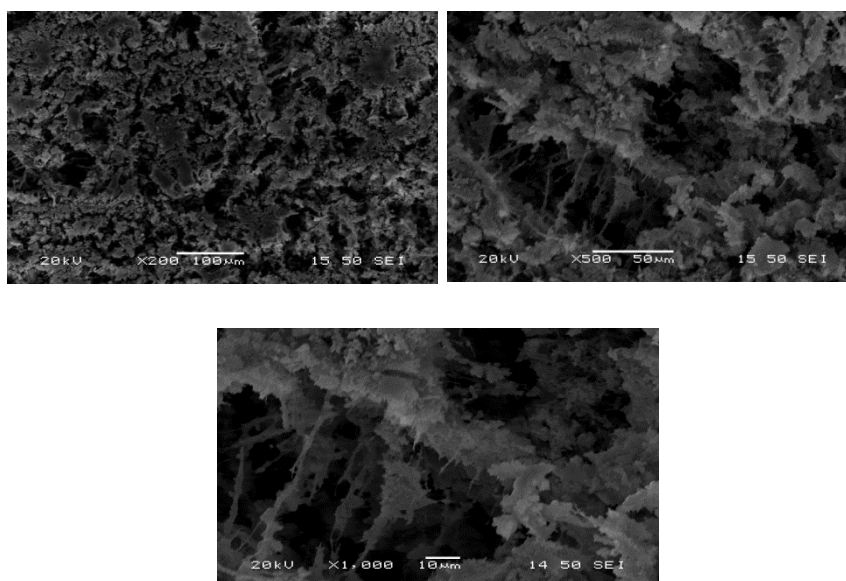
Ακόμη, παρατηρείται ομοιόμορφο, εκτεταμένο πορώδες δίκτυο το οποίο απαρτίζεται από μεγάλους πόρους και μικρότερους πόρους. Οι μεγαλύτεροι πόροι έχουν ένα μέσο μέγεθος που κυμαίνεται περίπου μεταξύ 100 – 200  $\mu\text{m}$ , το οποίο είναι ιδανικό για την είσοδο των κυττάρων στο ικρίωμα. Αντίστοιχα, οι μικρότεροι πόροι (οι οποίοι φαίνονται καλύτερα στη μεγαλύτερη μεγέθυνση) φαίνεται να έχουν ένα

μέγεθος που κυμαίνεται μεταξύ 10 – 25  $\mu\text{m}$ , το οποίο κρίνεται πολύ χρήσιμο για τη διέλευση των θρεπτικών υλικών σε μια δυναμική κυτταροκαλλιέργεια.

#### *Εγκάρσια τομή*



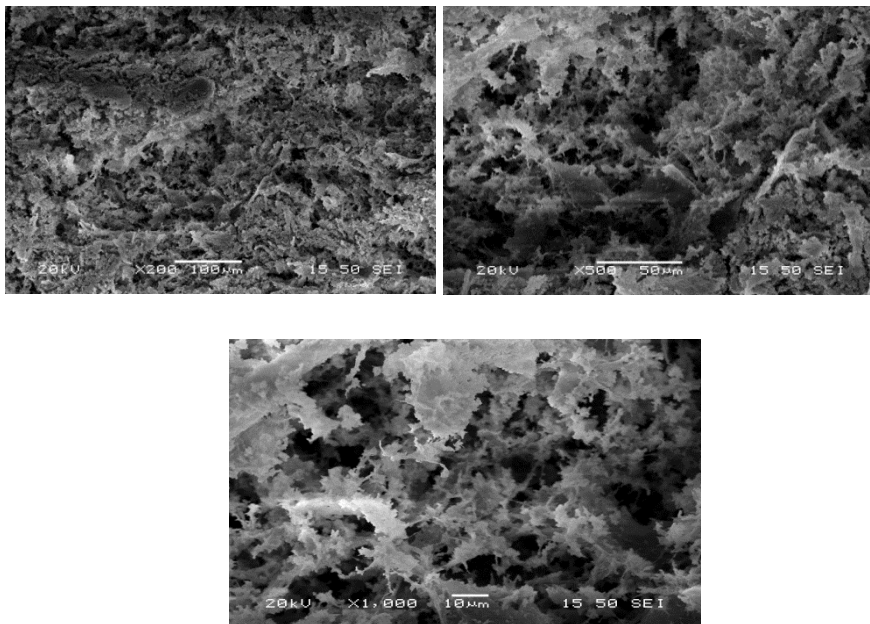
#### *Κάθετη τομή*



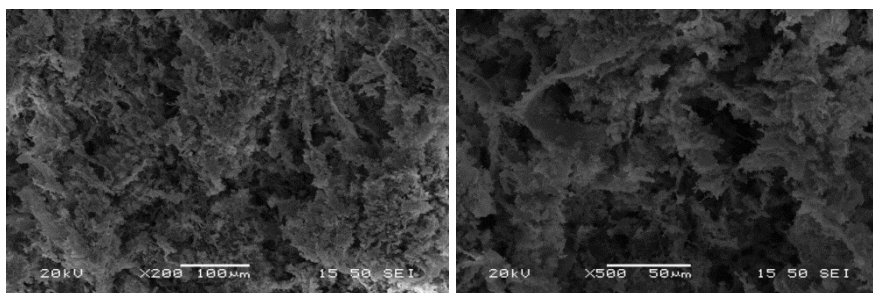
**Σχήμα 8.** Εικόνες SEM από εγκάρσια και κάθετη τομή κριωμάτων που αποτελούνται από HA, το βιοπολυμερές χιτοζάνη και το αμινοξύ L-λυσίνη χωρίς μοριακή διασύνδεση σε μεγεθύνσεις  $\times 200$ ,  $\times 500$  και  $\times 1000$ .

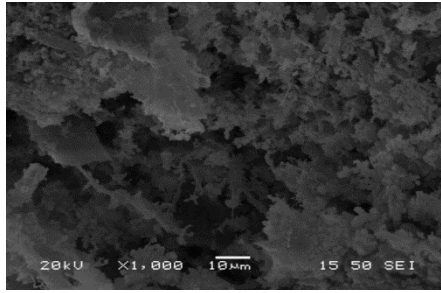
Ακολουθως, στο Σχήμα 9, παρουσιάζονται οι εικόνες από την εγκάρσια και κάθετη τομή των κριωμάτων του υδροξυαπατίτη παρουσία του βιοπολυμερούς χιτοζάνη και του αμινοξέος L-λυσίνη μετά από διασύνδεση με γλουταραλδεύδη στις αντίστοιχες μεγεθύνσεις. Εδώ παρατηρείται μία ελαφριά μείωση των μικρών πόρων. Ως προς τις μηχανικές αντοχές, το κρίωμα ήταν ικανοποιητικότερο.

### *Εγκάρσια τομή*



### *Κάθετη τομή*





**Σχήμα 9.** Εικόνες SEM από εγκάρσια και κάθετη τομή ικριωμάτων που αποτελούνται από HA, το βιοπολυμερές χιτοζάνη και το αμινοξύ L-λυσίνη με μοριακή διασύνδεση με διάλυμα γλουταραλδεύδης 1% σε μεγεθύνσεις x200, x500 και x1000.

## ***Κεφάλαιο 8: Συμπεράσματα***

Συμπερασματικά, η πειραματική διαδικασία της συγκεκριμένης εργασίας συνίσταται σε δύο επιμέρους ενότητες: α. την παρασκευή αιωρημάτων υδροξυαπατίτη παρουσία των βιοπολυμερών χιτοζάνη και κολλαγόνο και του αμινοξέος L-λυσίνη με αναλογία μαζών υδροξυαπατίτη/βιοπολυμερές=70/30 και μοριακές αναλογίες  $Ca^{2+}/αμινοξύ=$  1:1, 1:2, 2:1 και 3:2 με τη χρήση μιας υβριδικής τεχνικής βιομιμητικής σύνθεσης και β. την παρασκευή ικριωμάτων υδροξυαπατίτη παρουσία των των βιοπολυμερών χιτοζάνη και κολλαγόνο και του αμινοξέος L-λυσίνη με αναλογία μαζών υδροξυαπατίτη/βιοπολυμερές=70/30 και μοριακή αναλογία  $Ca^{2+}/αμινοξύ=$  1:1 με τη μέθοδο της λυοφιλίωσης. Τα επιμέρους συμπεράσματα των δύο αυτών ενότητων παρατίθενται συνοπτικά αμέσως παρακάτω.

### *Συμπεράσματα Α' ενότητας:*

Σκοπός της ενότητας αυτής ήταν η παραγωγή ενός τελικού βιοσυμβατού προϊόντος που να μιμείται καλύτερα τις ιδιότητες των οστών (δομή, μηχανικές ιδιότητες και βιοαποικοδομησιμότητα). Από τα παραληφθέντα αιωρήματα λήφθηκαν κόνεις, οι οποίες και χαρακτηρίστηκαν ως προς την κρυσταλλικότητα και την καθαρότητα των φάσεων με τη μέθοδο XRD και συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα αποτελέσματα που προέκυψαν με την απουσία κάποιου αμινοξέος με και χωρίς ρύθμιση του pH. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν, απέδειξαν την ανάπτυξη κρυσταλλικού εξαγωνικού υδροξυαπατίτη στην περίπτωση της χρήσης αμινοξέων, ενώ αντίθετα την ανάπτυξη των πρόδρομων φάσεων μονετίτη και μπρουσίτη και όχι υδροξυαπατίτη στην περίπτωση της απουσίας αμινοξέος. Συνεπώς, αποδείχτηκε η αναγκαιότητα προσθήκης κάποιου αμινοξέος για τη λήψη του υδροξυαπατίτη.

Σε συμφωνία με την ανάλυση XRD, η μέθοδος FT-IR κατέδειξε επίσης το σχηματισμό υδροξυαπατίτη.

Εν συνεχεία, τα δείγματα υδροξυαπατίτη παρουσία των βιοπολυμερών χιτοζάνη και κολλαγόνο και του αμινοξέος L-λυσίνη με αναλογία μαζών υδροξυαπατίτη/βιοπολυμερές=70/30 και μοριακής αναλογίας  $Ca^{2+}/αμινοξύ=$  1:1 μελετήθηκαν στο TEM ως προς το σχήμα, τη μορφολογία και την ομοιογένεια των κρυστάλλων. Η μελέτη αυτή κατέδειξε την επιτυχή σύνθεση νανοκρυσταλλικού υδροξυαπατίτη.

### Συμπεράσματα Β' ενότητας:

Σκοπός της δεύτερης ενότητας της πειραματικής διαδικασίας ήταν η ανάπτυξη τρισδιάστατων ικριωμάτων υδροξυαπατίτη που να συνδυάζουν αξιόλογες βιολογικές και μηχανικές ιδιότητες: δηλαδή να είναι βιοσυμβατά, να φέρουν αξιόλογο πορώδες δίκτυο που να απαρτίζεται από μεγαλύτερους πόρους για την είσοδο των κυττάρων και μικρότερους για την διέλευση των θρεπτικών συστατικών σε μία ενδεχόμενη κυτταροκαλλιέργεια και να παρουσιάζουν μηχανικές ιδιότητες κατάλληλες για βιολογικές εφαρμογές. Τα ικριώματα αυτά (ικριώματα υδροξυαπατίτη παρουσία των βιοπολυμερών χιτοζάνη και κολλαγόνο και του αμινοξέος L-λυσίνη με αναλογία μαζών υδροξυαπατίτη/βιοπολυμερές=70/30 και μοριακή αναλογία  $Ca^{2+}$ /αμινοξύ= 1:1) παρήχθησαν με τη μέθοδο της λυοφιλίωσης, ενώ για τη βελτίωση των μηχανικών ιδιοτήτων ακολουθήθηκε η μέθοδος της διαμοριακής διασύνδεσης με τη χρήση του οργανικού διασυνδέτη γλουταραλδεΐδη.

Τα παραγόμενα ικριώματα πριν και μετά τη διασύνδεση μελετήθηκαν ως προς το πορώδες δίκτυο στο SEM, το οποίο αποδείχθηκε ομοιόμορφο και εκτεταμένο και σύμφωνο με τις προδιαγραφές που είχαν τεθεί. Παρόλα αυτά, με οπτική παρατήρηση το υλικό αποδείχθηκε αρκετά εύθρυπτο, γι' αυτό και επιχειρήθηκε βελτίωσή του μέσω της μεθόδου της χημικής διασύνδεσης. Στα δείγματα που προέκυψαν μετά τη διασύνδεση με γλουταραλδεΐδη παρατηρήθηκαν ικανοποιητικότερες μηχανικές ιδιότητες, ενώ κατά η παρατήρηση στο SEM κατέδειξε μία μικρή μείωση των μικρών πόρων.

Επομένως, η παρούσα έρευνα είχε ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη υλικών με ικανοποιητικές βιολογικές ιδιότητες σύμφωνες με τις προδιαγραφές, οι μηχανικές ιδιότητες των οποίων όμως αφήνουν περιθώρια για βελτίωση και περαιτέρω έρευνα μελλοντικά.

## ***Βιβλιογραφία:***

- [1] Robert M. Nerem, Stacey, Chapter 2 – The Challenge of Imitating Nature in “Principles of Tissue Engineering (Fourth Edition)” Edited by Robert Lanza, Robert Langer and Joseph P. Vacanti, Academic Press, 2014, p. 9–24.
- [2] Qizhi Chen, Shuling Liang, George A. Thouas, “Elastomeric biomaterials for tissue engineering”.
- [3] D.F Williams, Review “Tissue-Biomaterials Interaction”, Journal of Material Science 22 (1987) 3421-3445
- [4] Σ.Γαλανάκος, Ι.Π Σοφιανός, Σ.Α Παπαδάκης, Orthopaedics&Traumatology, “Ο Ρόλος των Βιοϋλικών και Ειδικά των Βιοαπορροφήσιμων Υλικών στη Χειρουργική της Σπονδυλικής Στήλης”
- [5] Billotte W. G., 2000. Ceramic Biomaterials. The Biomedical Engineering Handbook, 2nd edition.
- [6] Σαράντη Αθανασία. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων- Σχολή Επιστημών και Τεχνολογιών – Τμήμα Μηχανικών Επιστήμης Υλικών. Ιωάννινα 2009. Διδακτορική Διατριβή- “Βιοενεργές Ύαλοι και Βιοσυμβατά Κεραμικά Υλικά με Βάση το P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>” (<http://phdtheses.ekt.gr/eadd/handle/10442/18622>)
- [7] Park B. Joon, Young Kon Kim, 2000. Metallic Biomaterials. The Biomedical Engineering Handbook, 2nd edition.
- [8] Lee Bang Hai, Khang Gilson, Lee Ho Jin. 2000. Polymeric Biomaterials. The Biomedical Engineering Handbook, 2nd edition.
- [9] Ν. Μπουρόπουλος, Ο. Παύλου, «Εισαγωγή στα Βιοϋλικά», Πανεπιστήμιο Πατρών, 2002
- [10] Ε.Καφαντάρη, «Μελέτη του Κολλαγόνου σε Παθήσεις των Οστών» Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων , 2000



- [11] Fung, Y. C., “Mechanical Properties of Living Tissues 2nd ed.”, 1993
- [12] Florence Croisier, Christine Jérôme, “Chitosan-based biomaterials for tissue engineering”.
- [13] In-Yong Kim, Seog-Jin Seo, Hyun-Seuk Moon, Mi-Kyong Yoo, In-Young Park, Bom-Chol Kim, Chong-Su Cho. 2007. “Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications
- [14] Marguerite Rinaudo, “Chitin and chitosan: Properties and applications”.
- [15] J.J.J.M. Donners, R.J.M. Nolte, N.A.J.M. Sommerdijk “Dendrimer based Hydroxyapatite composites with remarkable Material properties” , *Advanced Materials*, 2003, 15, (4), 313–316
- [16] Dimitris Tsiourvas, Athena Tsetsekou, Maria-Izoldi Kammenou, Nikos Boukos, “Controlling the formation of Hydroxyapatite nanorods with dendrimers” *Journal of the American Ceramic Society*, 2011, 94, (7), 2023–2029
- [17] Amit Kumar Nayak, “Hydroxyapatite Synthesis methodologies: An overview”, *International Journal of ChemTech Research*, 2010
- [18] M.P.Ferraz, F.J.Monteiro, C.M. Manuel, “Hydroxyapatite nanoparticles: a review of Preparation Methodologies, *Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics*” *Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics* 2004; 2: 74-80.
- [19] Lakes Roderic. 2000. *Composite Biomaterials. The Biomedical Engineering Handbook*, 2nd edition.
- [20] Michael H. Ross, Wojciech Pawlina. “Ιστολογία με έγχρωμο άτλαντα 5<sup>η</sup> Έκδοση”.
- [21] <http://www.md-health.com/L-Lysine-Benefits.html>
- [22] A. Tsetsekou, D. Brasinika, V. Vaou, E. Chatzitheorides, “On the synthesis of tailored biomimetic hydroxyapatite nanoplates through a

bioinspired approach in the presence of collagen or chitosan and L-arginine”,  
J. Mater. Sci. Eng. C, 43 (2014) 555-565.

[23] Εργαστηριακές Σημειώσεις στο πλαίσιο του μαθήματος «Κεραμικά  
Υλικά»

[24] Ελευθέριος Γ. Ανδριώτης. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης –  
Σχολή Θετικών Επιστημών – Διατμηματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών  
Σπουδών «Νανοεπιστήμες και Νανοτεχνολογίες N&N» - “In vitro  
επιφανειακή τροποποίηση πολυδροξυαλκανοϊκών οξέων με χρήση  
βιομορίων”. Θεσσαλονίκη, 2010

[25] Λιτσαρδάκης Γ., “Περίθλαση Ακτίνων Χ- Σημειώσεις για το μάθημα Β  
3.2”, Διατμηματικό Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών, Β΄ Έκδοση,  
Θεσσαλονίκη 2004.

[26] Σημειώσεις Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας  
([http://www.physics.ntua.gr/~micronano/ERG%20TEXNIKES/Simeioseis\\_TE  
M.pdf](http://www.physics.ntua.gr/~micronano/ERG%20TEXNIKES/Simeioseis_TE_M.pdf))

[27] Μαρία Όξενκιουν – Πετροπούλου. “Φασματομετρικές Μέθοδοι Β΄  
Έκδοση”, Εκδόσεις Συμμετρία

[28] Χριστίνα Γιαννούλη. Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο – Σχολή Μηχανικών  
Μεταλλείων και Μεταλλουργών – Τομέας Επιστήμης και Τεχνολογίας των  
Υλικών – Εργαστήριο Μεταλλογνωσίας - Διπλωματική Εργασία – “Συσχέτιση  
Μικροδομής και Μαγνητικών Ιδιοτήτων σε Χάλυβες DUPLEX”. Αθήνα,  
Μάρτιος 2010

[29] Koutsopoulos S., “Synthesis and characterization of hydroxyapatite  
crystals: A review study on the analytical methods”. J Biomed Mater Res  
2002;62[4]:600-612.

[30] M.C. Chang, J. Tanaka, “FT-IR study for hydroxyapatite / collagen  
nanocomposite cross-linked by glutaraldehyde”, J. Biomaterilas, 23 (2002)  
4811-4818.

- [31] V.M. Rusu, C.H. Ng, M. Wilke, B. Tiersch, P. Fratzl, M.G. Peter, “Size – controlled hydroxyapatite nanoparticles as self – organized organic – inorganic composite materials”, *J. Biomaterials*, 26 (2005) 5414-5426.
- [32] W. Tie, L. Yubao, C. Weiqun, Z. Yi, “A study of nano-composite of hydroxyapatite”, *J. Mater. Sci.*, 38 (2003) 3303-3306.
- [33] K.J. Payne, A. Veis, “Fourier transform IR spectroscopy of collagen and gelatin solutions: deconvolution of the amide I band for conformational studies”, *J. Biopolymers*, 27 (1988) 1749-1760.
- [34] S. Krimm, J. Bandekar, “Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides and proteins”, *J. Adv. Protein. Chem.*, 38 (1986) 181-365.

